

Université de Montréal

Synthèse d'un composé fluorogénique permettant l'étude de l'apposition
protéique

par

Marie-Hélène Houle

Département de chimie
Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de
l'obtention d'un grade de maîtrise en chimie organique

avril 2003

© Marie-Hélène Houle, 2003



QD

3

1154

2003

N.023

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
Synthèse d'un composé fluorogénique permettant l'étude de l'apposition
protéique

présenté par:
Marie-Hélène Houle

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

.....

président du jury

.....

membre du jury

.....

membre du jury

SOMMAIRE

Les protéines sont des chaînes polypeptidiques de longueurs variables jouant des rôles extrêmement diversifiés et complexes dans les processus biologiques. Elles peuvent être actives seules ou s'associer entre elles pour former un complexe actif. La présente recherche consiste en le développement d'un nouvel outil permettant l'étude de l'apposition entre les protéines. L'outil élaboré est un fluorogène que l'on souhaite capable de lier deux protéines ayant interagi de façon à former un motif de leucine-zipper. Avant la liaison, le fluorogène ne doit présenter aucune fluorescence. La fluorescence doit cependant devenir importante une fois le composé lié au dimère protéique. Ainsi, l'observation d'une fluorescence indique qu'il y a eu interaction entre les protéines et que le dimère formé a été reconnu par le fluorogène. À l'inverse, l'absence de fluorescence indique que les protéines n'ont pas interagi et que le fluorogène n'a pas rencontré de dimère protéique. La caractérisation spectroscopique du fluorogène développé, la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine, a été effectuée. Ces tests ont confirmé que le fluorogène a la propriété d'émettre en fluorescence uniquement lorsqu'il est dithiolé et que le système élaboré peut donc être utilisé comme sonde fluorescente de type interrupteur ouvert ou fermé. La cinétique de la réaction de cette sonde avec des petite thiols a également été étudiée afin de s'assurer que la dithiolation de la sonde est compatible avec les conditions retrouvées en milieu *in vivo*. Par ailleurs, des tests ont été effectués sur une protéine ne possédant qu'un seul résidu thiolé, soit la thiorédoxine mutante C35A. Ces tests ont permis de démontrer que la sonde est incapable de réagir avec deux équivalents de protéines si celles-ci n'ont pas d'abord interagi. Ils ont également permis de confirmer que l'intermédiaire monothiolé n'est pas fluorescent. La réaction du fluorogène développé avec un leucine-zipper positionnant adéquatement des cystéines dans l'espace reste à être effectuée.

Mots clés: apposition protéique, synthèse, sonde fluorescente, coumarine, PCA

SUMMARY

Proteins are polypeptidic chains of variable length playing extremely diverse and complex roles in biological functions. They can be active on their own or in association with other proteins as part of active complexes. The current study aims to develop a novel tool to investigate protein-protein interactions. This designed tool consists of a fluorogen, which is to bind to chosen proteins, only when and if they interact together via a leucine zipper motif. This fluorogen must not fluoresce when unbound to the target proteins. Conversely, fluorescence should be very intense after docking of the fluorogen on the proteic dimer. Thus, the observation of fluorescence is indicative of a leucine zipper interaction between the tested proteins, which are then recognized by the fluorogen. On the other hand, absence of fluorescence demonstrates that the fluorogen never encountered the leucine zipper dimeric complex, i.e. the tested proteins do not interact. The spectroscopic characterisation of the created fluorogen, the 6-maleimido-3-(4-maleimidophenyl)-coumarine was performed. These tests confirmed that the fluorogen has the property of emitting fluorescent light only when dithiolated and hence that the developed system can be used as a fluorescent probe acting as an on/off switch. The kinetics of the reaction between that probe and small thiol molecules has been documented to ascertain that it could take place in similar conditions as those found *in vivo*. Moreover, further testing was performed on a protein bearing only a single thiolated residue, namely the mutant thioredoxin C35A. These experiments showed the fluorescent probe could not interact even in the presence of two equivalents of the protein, unless the proteins interacted with one another first. They also confirmed that the monothiolated intermediate is not fluorescent. The reaction between the created fluorogen and a leucine zipper, which gives proper spatial orientation to the cystein residues, still has to be realised.

Keywords: protein-protein interaction, synthesis, fluorescent probe, coumarine, PCA

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
SUMMARY	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xiii
LISTE DES ÉQUATIONS	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiv
DÉDICACE	xvi
REMERCIEMENTS	xvii
CHAPITRE 1	1
INTRODUCTION	1
1.1 LES PROTÉINES	1
1.2 MÉTHODES D'ÉTUDES DES PROTÉINES	2
1.2.1 <i>Marquage non spécifique des protéines</i>	2
1.2.2 <i>Marquage spécifique des protéines</i>	3
1.2.3 <i>Détection de l'interaction protéique</i>	4
1.3 BUT DU PROJET	11
1.3.1 <i>Étude de l'interaction protéique</i>	11
1.3.2 <i>Marquage spécifique des protéines</i>	13
1.3.3 <i>Purification de protéines</i>	14
1.4 CHOIX DE LA FLUORESCENCE COMME MÉTHODE DE DÉTECTION	14
1.4.1 <i>Utilisation de la fluorescence en biochimie</i>	14
1.4.2 <i>Avantages de la spectroscopie de fluorescence</i>	15
1.5 CHOIX DU FLUOROGÈNE.....	16
1.5.1 <i>Caractéristiques désirées pour le fluorogène</i>	16
1.5.2 <i>Choix de la coumarine comme coeur fluorescent</i>	17

1.5.3 Raisons justifiant l'introduction de maléimides sur la sonde.....	18
1.5.4 Sonde fluorescente proposée.....	20
1.6 RÉACTION DE LA SONDE AVEC LE SYSTÈME PROTÉIQUE PROPOSÉ.....	21
1.7 CONCLUSION.....	22
CHAPITRE 2.....	23
SYNTHÈSE.....	23
2.1 SYNTHÈSE DE LA SONDE FLUOROGÈNE.....	23
2.1.1 Généralités.....	23
2.1.2 Discussion de l'étape-clé: la formation du coeur de coumarine.....	25
2.1.3 Réduction des groupements nitro en amines.....	28
2.1.4 Introduction des fonctions maléimides.....	30
2.2 DITHIOLATION DE LA SONDE.....	31
2.3 CONCLUSION.....	34
CHAPITRE 3.....	35
CARACTÉRISATIONS SPECTROSCOPIQUES.....	35
3.1 PRINCIPES SPECTROSCOPIQUES.....	35
3.1.1 L'absorption moléculaire.....	35
3.1.2 La fluorescence moléculaire.....	36
3.1.3 Fluorescence de la coumarine.....	41
3.2 BUT DES CARACTÉRISATIONS SPECTROSCOPIQUES.....	42
3.3 CARACTÉRISATION DE L'ABSORBANCE DES MOLÉCULES D'INTÉRÊT.....	42
3.4 CARACTÉRISATION DE LA FLUORESCENCE DES MOLÉCULES.....	47
3.4.1 Détermination des longueurs d'onde d'excitation et d'émission.....	47
3.4.2 Effet de la concentration des solutions sur l'intensité du signal de fluorescence.....	50
3.4.3 Calcul des rendements quantiques de fluorescence.....	52
3.5 CONCLUSION.....	57

CHAPITRE 4.....	58
CINÉTIQUES CHIMIQUES.....	58
4.1 GÉNÉRALITÉS	58
4.2 DÉTERMINATION DE L'ÉTAPE LIMITANTE DE LA RÉACTION MODÈLE	59
4.3 EFFET DU pH SUR LA VITESSE DE LA RÉACTION MODÈLE	64
4.4 EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA VITESSE DE LA RÉACTION	71
4.5 ESTIMATION DE L'EFFICACITÉ DE LA RÉACTION.....	72
4.6 CONCLUSION	75
CHAPITRE 5.....	76
TESTS PROTÉIQUES	76
5.1 BUT DES TESTS.....	76
5.2 CHOIX DE LA PROTÉINE.....	77
5.3 EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA THIORÉDOXINE MUTANTE	78
5.3.1 <i>Sous-clonage du gène codant pour la protéine d'intérêt dans un plasmide</i>	78
5.3.2 <i>Préparation de cellules compétentes E. coli BL21-pRep4</i>	79
5.3.3 <i>Transformation du vecteur contenant le gène de la TRX C35A dans les cellules bactériennes compétentes.....</i>	80
5.3.4 <i>Expression de la protéine d'intérêt</i>	80
5.3.5 <i>Purification de la protéine d'intérêt.....</i>	81
5.3.6 <i>Évaluation de l'efficacité des étapes de purification de la TRX C35A par gel d'électrophorèse (SDS-Page)</i>	83
5.3.7 <i>Détermination de la concentration des aliquots contenant la protéine d'intérêt à l'aide du test de Bradford.</i>	85
5.4 RÉACTION ENTRE LA SONDE (6) ET TRX C35A.....	86
5.4.1 <i>Première étape de la réaction entre la sonde et TRX C35A.....</i>	86
5.4.2 <i>Deuxième étape de la réaction entre la protéine et TRX C35A</i>	89
5.5 CONCLUSION	93
CHAPITRE 6.....	95

TRAVAUX FUTURS.....	95
6.1 SYNTHÈSE D'AUTRES SONDAS PERMETTANT L'ÉTUDE DE L'APPOSITION PROTÉIQUE.....	95
6.2 TESTS PROTÉIQUES AVEC LA SONDE SYNTHÉTISÉE.....	97
CHAPITRE 7.....	98
PARTIE EXPÉRIMENTALE	98
7.1 SYNTHÈSE DE LA SONDE ET DE SES DÉRIVÉS DITHIOLÉS.....	98
7.1.1 Matériel.....	98
7.1.2 Synthèse du 6-nitro-3-(4-nitrophényl)-coumarine (3).....	100
7.1.3 Synthèse du 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine (4).....	102
7.1.4 Synthèse du 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6).....	104
7.1.5 Synthèse de la 6-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-3-[4-(3- éthane-sulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)phényl]-coumarine (7).....	106
7.1.6 synthèse du 6-[3-(sulfanyl-acetic acid)-pyrrolidine-2,5-dione]-3-[4-(3- [sulfanyl-acetic acid]-pyrrolidine-2,5-dione)-phényl]-coumarine (8).....	108
7.2 CALCUL DES RENDEMENTS QUANTIQUES	110
7.3 EXPRESSION ET PURIFICATION DE TRX C35A ET RÉACTION AVEC LA SONDE (6)	111
7.3.1 Matériel.....	111
7.3.2 Solutions.....	111
7.3.3 Préparation de cellules bactériennes <i>E. coli</i> BL21-pRep4	114
7.3.4 Transformation des cellules bactériennes par le vecteur PQE32 résistant à l'ampicilline et contenant le gène de la TRX C35A	114
7.3.5 Expression de la protéine TRX C35A.....	115
7.3.6 Purification de la protéine TRX C35A	115
7.3.7 SDS-Page.....	117
7.3.8 Quantification de la protéine à l'aide du test de Bradford.....	118
7.3.9 Réactions entre TRX C35A et la sonde élaborée (6).....	118
RÉFÉRENCES.....	121

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1: Réaction entre la sonde fluorescente FLAsH-EDT₂, peu fluorescente, avec le motif tétracystéiné de la protéine d'intérêt pour former un complexe très fluorescent.</i>	4
<i>Figure 2: Détection de l'interaction entre la protéine X et la protéine Y par le système deux hybrides chez la levure.⁸</i>	6
<i>Figure 3: Détection de l'interaction entre la protéine X et la protéine Y par le système du transfert de l'énergie de résonance.</i>	8
<i>Figure 4: Détection de l'interaction entre la protéine X et la protéine Y par la méthode du PCA.</i>	9
<i>Figure 5: Détection de l'interaction entre FKBP et TOR2 in vivo par la méthode du PCA.</i>	10
<i>Figure 6: Enroulement des GCN4 tronquées suite à l'interaction entre les protéines X et Y et réaction du système avec la sonde fluorescente.</i>	12
<i>Figure 7: Réaction de la sonde avec des cystéines introduits sur des GCN4 greffées aux protéines d'intérêts X et Y.</i>	12
<i>Figure 8: Structure générale de la coumarine.</i>	17
<i>Figure 9: Réaction d'addition d'un thiolate sur un maléimide.</i>	19
<i>Figure 10: Addition d'un thiol, dans ce cas une cystéine d'une protéine sur une sonde fluorogène.</i>	20
<i>Figure 11: Sonde fluorescente proposée, la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine.</i>	20
<i>Figure 12: Sonde fluorogène de première génération, la 3,6-bismaléimidocoumarine</i>	24
<i>Figure 13: Sonde fluorogène de deuxième génération, la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6)</i>	24
<i>Figure 14: Schéma réactionnel menant à la synthèse de la sonde fluorogène, la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6).</i>	25

- Figure 15: Mécanisme de la condensation de Knoevenagel de la 2-hydroxy-5-nitrobenzaldéhyde (1) et de l'acide 4-nitrophénylacétique (2) menant à la formation de la 6-nitro-3-(4-nitrophényl)-coumarine (3). _____ 27
- Figure 16: Réaction modèle entre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) et deux équivalents d'éthanethiol pour mener à la 6-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-3-[4-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)phényl]-coumarine (7). _____ 32
- Figure 17: Réaction modèle entre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophéyl)-coumarine (6) et deux équivalents d'éthyl-2-mercaptoacétate pour mener à la 6-[3-(sulfanyl-acetic acid)-pyrrolidine-2,5-dione]-3-[4-(3-[sulfanyl-acetic acid]-pyrrolidine-2,5-dione)-phényl]-coumarine (8). _____ 32
- Figure 18: Une représentation du diagramme de Jablonski.^{11,21} _____ 37
- Figure 19: Structure de la fluoresceine utilisée comme référence dans le calcul des rendements quantiques de fluorescence. _____ 40
- Figure 20: Spectre d'absorbance d'une solution de 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine (4) dans le DMF 100% (1×10^{-4} mol/L). _____ 43
- Figure 21: Spectre d'absorbance d'une solution de la 6-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-3-[4-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-phényl]-coumarine (7) dans le DMF 100% (1×10^{-4} mol/L). _____ 44
- Figure 22: Spectre d'absorbance d'une solution de maléimide dans le DMF 100% (1×10^{-2} mol/L). _____ 44
- Figure 23: Détermination du coefficient d'extinction molaire de la 6-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-3-[4-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-phényl]-coumarine (7) dans le DMF 100% à 332nm, soit $14\,930 \text{ (mol/L)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. _____ 45
- Figure 24: Détermination de la longueur d'onde d'émission maximale d'une solution de 6-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-3-[4-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-phényl]-coumarine (7) dans le DMF 100% (1×10^{-4} mol/L) par l'excitation à 315nm, 332nm et 350nm. _____ 47
- Figure 25: Détermination de la longueur d'onde d'excitation d'une solution de 6-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-3-[4-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-

<i>phényl]-coumarine (7) dans le DMF 100% (1×10^{-4} mol/L) par l'observation de l'émission à 419nm.</i>	48
<i>Figure 26: Observation de l'effet de quench dû à la concentration de solutions de 6-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-3-[4-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-phényl]-coumarine (7) dans le DMF 100%.</i>	51
<i>Figure 27: Comparaison de l'émission de solutions de la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) et des deux dérivés dithiolés (7 et 8) dans le DMF 100% (5×10^{-4} mol/L) à une longueur d'onde d'excitation de 332nm et d'émission de 419nm.</i>	57
<i>Figure 28: Schéma de la réaction modèle entre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) et un thiol.</i>	60
<i>Figure 29: Cinétique de la réaction entre la sonde (6) en solution dans le DMF 100% (10^{-4} mol/L) et quatre équivalents d'éthanethiol (4×10^{-4} mol/L) effectuée en triplicata.</i>	62
<i>Figure 30: Détermination de l'étape limitante de la réaction entre la sonde (6) et l'éthanethiol.</i>	62
<i>Figure 31: Courbes des cinétiques de la réaction entre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) (1×10^{-4} mol/L) et l'éthanethiol (2×10^{-3} mol/L) dans le DMF 10% pour des pH allant de 5,5 à 9,5.</i>	65
<i>Figure 32: Influence du pH sur la constante de vitesse de pseudo premier ordre de la réaction entre la sonde (6) (1×10^{-4} mol/L) et l'éthanethiol (2×10^{-3} mol/L) en solution aqueuse (10%DMF).</i>	66
<i>Figure 33: Schéma de l'hydrolyse des groupements maléimides de la sonde (6) en milieu basique.</i>	68
<i>Figure 34: Élimination d'un équivalent d'éthanethiol aux pH basiques. R = 6-maléimido-3-phénylcoumarine ou 3-(4-maléimidophényl)-coumarine.</i>	68
<i>Figure 35: Schéma de la réaction modèle entre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) et un thiol tenant compte de la réversibilité de chacune des étapes.</i>	69

<i>Figure 36: Observation de la réversibilité de la réaction entre la sonde (6) (1×10^{-4} mol/L) et l'éthanethiol (4×10^{-4} mol/L) en solution aqueuse (10% DMF) à un pH de 9,5.</i>	70
<i>Figure 37: Effet de la température sur la valeur de la constante de vitesse de pseudo premier ordre de la réaction entre la sonde (6) (1×10^{-4} mol/L) et l'éthanethiol (2×10^{-3} mol/L) dans le DMF 100%.</i>	72
<i>Figure 38: Détermination du rendement de la réaction entre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) (1×10^{-4} mol/L) et l'éthyl 2-mercaptoacétate en solution dans le DMF 100%.</i>	73
<i>Figure 39: Schéma du vecteur pQE-32 (Qiagen).⁷⁰</i>	79
<i>Figure 40: Schéma de l'induction de l'expression de l'opéron lac par l'IPTG.</i>	81
<i>Figure 41: Gel d'électrophorèse des différentes étapes de purification de la protéine d'intérêt TRX C35A.</i>	84
<i>Figure 42: Émissions de solutions de 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) ($5,73 \times 10^{-6}$ mol/L), de TRX C35A ($5,73 \times 10^{-6}$ mol/L) et d'un mélange 1:1 de ces deux espèces ($5,73 \times 10^{-6}$ mol/L chacune) dans le MOPS à pH = 7,5.</i>	87
<i>Figure 43: Schéma de la réaction entre la sonde (6) et la protéine TRX C35A dénaturée par le guanidinium.</i>	89
<i>Figure 44: Émissions de solutions de 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) ($5,73 \times 10^{-6}$ mol/L), de TRX C35A ($5,73 \times 10^{-6}$ mol/L) et d'un mélange 1:1 de ces deux espèces ($5,73 \times 10^{-6}$ mol/L chacune) dans le MOPS à pH = 7,5 auxquelles a été ajouté 1 μL d'éthanethiol.</i>	90
<i>Figure 45: Schéma de la réaction entre la sonde (6) et la protéine TRX C35A suite à l'ajout de très grand excès d'éthanethiol.</i>	91
<i>Figure 46: Gel d'électrophorèse de la réaction entre la sonde (6) et la protéine TRX C35A révélé à l'aide du Bleu brillant de Coomassie et en fluorescence.</i>	92

LISTE DES ÉQUATIONS

<i>Equation 1: Loi de Beer-Lambert</i> _____	36
<i>Equation 2: Calcul du rendement quantique de fluorescence via les constantes de vitesse des divers processus de désactivation</i> _____	39
<i>Equation 3: Calcul du rendement quantique de fluorescence par comparaison de l'émission du fluorogène et de l'émission d'une référence</i> _____	40

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1: Valeurs du coefficient d'extinction molaire de certains composés synthétisés à leur longueur d'onde d'absorbance maximale.</i> _____	46
<i>Tableau 2: Valeurs des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des quatre molécules analysées</i> _____	49
<i>Tableau 3: Données menant au calcul du rendement quantique de fluorescence de la 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine (4) dans le DMF 100% en utilisant des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de respectivement 332nm et 419nm.</i> _____	52
<i>Tableau 4: Valeurs moyennes des rendements quantiques de fluorescence dans le DMF des quatre molécules d'intérêt.</i> _____	53
<i>Tableau 5: Comparaison de la fluorescence de trois molécules connues en littérature⁶⁶ avec celle de l'intermédiaire 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine (4).</i> _____	55
<i>Tableau 6: Rendement de la réaction entre la sonde (6) et l'éthyl 2-mercaptoacétate en solution dans le DMF 100%</i> _____	74

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A	Alanine
Å	Angström
Ac	Acétyl
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
C	Cystéine
CCM	Chromatographie sur couche mince
CAPS	Acide 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonique
CHES	Acide 2-(<i>N</i> -cyclohexylamino)-éthanesulfonique
Cys	Cystéine
Da	Dalton
DHFR	Murine déhydrofolate réductase
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
FKBP	Immunophiline
FLAsH-EDT ₂	Fluorescein arsenical helix binder bis-ethylenedithiol
FRET	Fluorescence resonance energy transfert
GFP	Green fluorescent protein
Hz	Hertz
IgG	Gamma globuline bovine
IPTG	Isopropylthiogalactoside
<i>J</i>	Constante de couplage
λ	Longueur d'onde
LB	Luria Broth
M	Molaire
MES	Acide 2-(<i>N</i> -morpholino)-éthanesulfonique
MOPS	Acide 3-(<i>N</i> -morpholino)-propanesulfonique

MTX-F	Méthotrexate
PCA	Protein complementation assay
Pf	Point de fusion
PIPES	1,4-piperazinebis-(acide éthanesulfonique)
PITC	Phénylisothiocyanate
psi	Pound per square inch
Rdmt	Rendement
SDS	Sodium dodécylsulfate
SOB	Sorbitol bétaïne
TB	Transfer buffer
TOR2	Target of rapamycine
TP	Température de la pièce
TRIS	Acide Tris-(hydroxyméthyl)-propanesulfonique
TRX	Thiorédoxine
UA	Unité arbitraire
UV	Ultraviolet
v	Vitesse
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-6-D-galactoside

*À Thérèse Vandandaigue,
ma petite grand-maman*

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, Jeffrey Keillor, de m'avoir accueillie dans son laboratoire à un moment où j'avais particulièrement besoin qu'on me fasse confiance. Je voudrais également remercier mes collègues de travail, ma famille et mes amis qui m'ont encouragée durant mes études. Merci à Martin Houle, Caroline Rivard et Judith Labelle pour leurs conseils, leurs encouragements et leur aide précieuse notamment dans la correction de ce mémoire. Je voudrais remercier particulièrement Judith Labelle pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble depuis la première journée du bacc. Je voudrais remercier le Professeur Michnick pour sa collaboration sur le présent projet ainsi que les membres de son groupe de recherche, particulièrement F.-X. Campbell-Valois. Je remercie enfin le CRSNG et le FCAR pour les bourses de recherche qu'ils m'ont accordées.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Les protéines

Les protéines sont formées d'une ou de plusieurs chaînes peptidiques. Les protéines sont non seulement caractérisées par leur structure primaire, c'est-à-dire la séquence des acides aminés de la chaîne principale, mais aussi par leur structure secondaire et tertiaire. Ces dernières concernent l'arrangement du squelette peptidique et l'arrangement des structures secondaires en domaines compacts. La variété de protéines ainsi engendrée en fait une raison de choix dans un nombre incalculable de rôles physiologiques. Par exemple, les réactions chimiques à l'intérieur des cellules sont effectuées par des enzymes et les grandes structures, tels que les muscles, dépendent des interactions protéine-protéine dans leur fonctionnement. Le contrôle de l'expression des gènes dépend de l'interaction entre des protéines et l'ADN tandis que le contrôle hormonal est basé sur l'interaction entre des hormones et des récepteurs protéiques. L'activité neurologique implique l'interaction entre un neurotransmetteur et une protéine alors que la protection immunitaire comprend l'interaction entre un anticorps et un antigène.¹ Il est à noter que les interactions spécifiques entre les protéines ne sont pas toujours de nature covalente et que plusieurs de ces processus impliquent des associations non-covalentes de protéines. Ainsi, la vie dépend de milliers de protéines qui accomplissent un travail spécifique selon leur structure.

Par ailleurs, le séquençage du génome humain a permis d'identifier un nombre important de gènes qui sont des séquences encodant l'information nécessaire à la synthèse des protéines². Toutefois, seule la fonction d'une proportion très faible de ces protéines est connue. C'est pourquoi, dans les dernières années la communauté scientifique s'est penchée sur l'identification des protéines impliquées

dans divers processus biochimiques. Elle tente également de déterminer le mécanisme, le lieu et l'élément déclencheur de l'interaction entre ces protéines et d'autres protéines.³

1.2 Méthodes d'études des protéines

1.2.1 Marquage non spécifique des protéines

Le marquage non spécifique des protéines consiste à lier une petite molécule à certains acides aminés ou encore à certaines fonctions chimiques rencontrées dans les protéines de façon générale. Par exemple, le colorant *Coomassie Brilliant Blue G-250*⁴ (le bleu Brillant de Coomassie) se lie spécifiquement aux acides aminés aromatiques et aux acides aminés ayant une chaîne latérale basique.⁴ Le phénylisothiocyanate (PITC), quant à lui, lie les groupements α -aminés des protéines.⁵ Ces réactifs sont des chromophores et la couleur développée peut être détectée par spectroscopie UV-visible. Le marquage au bleu brillant de Coomassie est entre autres utilisé pour déterminer la concentration en protéines d'une solution, puisque la couleur développée est fonction du nombre de molécules de chromophore ayant réagi avec les protéines. La relation entre l'absorbance de la solution et sa concentration (loi de Beer-Lambert) peut être appliquée. Le désavantage de cette méthode de marquage protéique est qu'elle ne permet pas de distinguer les différentes protéines présentes dans le milieu. Le phénylisothiocyanate, quant à lui, peut être utilisé pour déterminer la séquence des acides aminés d'une protéine. Toutefois, cette technique ne fonctionne qu'avec des fragments de 20 à 60 acides aminés, alors que la plupart des protéines peuvent en contenir facilement dix fois plus. Le séquençage des protéines avec cette technique demande donc l'intervention d'enzymes coupant les protéines à étudier en petits fragments.

1.2.2 Marquage spécifique des protéines

Le marquage spécifique des protéines consiste à greffer une sonde à une protéine présentant un caractère distinctif des autres protéines du milieu. La plupart du temps, cette sonde fluoresce de façon à ce que la lumière émise puisse être détectée par spectroscopie de fluorescence. La sonde peut être une protéine telle que la *Green fluorescent protein* (GFP) fusionnée génétiquement à la protéine d'intérêt en C ou en N-terminal de façon à former une chimère fluorescente *in situ*.⁶ Cette technique est très utile, car elle permet de localiser la protéine d'intérêt en plus de permettre d'étudier sa dynamique à l'intérieur de la cellule. Toutefois, l'utilisation de la GFP, une protéine de 238 acides aminés dont le repliement est lent, peut perturber l'environnement de la protéine d'intérêt et modifier sa fonction, sa localisation subcellulaire ainsi que sa stabilité (demi-vie). De plus, la GFP n'offre qu'une variété limitée de longueurs d'onde d'émission.⁷

Pour contrer ces problèmes, le groupe de Tsien^{6,7} a développé une méthode dans laquelle un petit motif d'acides aminés naturels formant une hélice- α et greffé génétiquement à la protéine étudiée remplace la grosse protéine fluorescente. Ce motif a la séquence suivante: Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys, où Xaa représente n'importe quel acide aminé naturel sauf la cystéine. Le motif a la caractéristique de se lier spécifiquement à une petite molécule, la FLAsH, constituée d'un coeur de fluoresceine et substituée d'atomes d'arsenic en position 4' et 5'. Ce composé possède au départ deux molécules d'éthanedithiol liées aux atomes d'arsenic (FLAsH-EDT₂) et elle est particulièrement peu fluorescente. La rigidité du positionnement des deux atomes d'arsenic permet à la molécule de réagir de façon spécifique avec le motif tétracystéiné greffé à la protéine d'intérêt. Cet échange des éthanedithiols pour le peptide tétracystéiné forme une molécule 50 000 fois plus fluorescente.

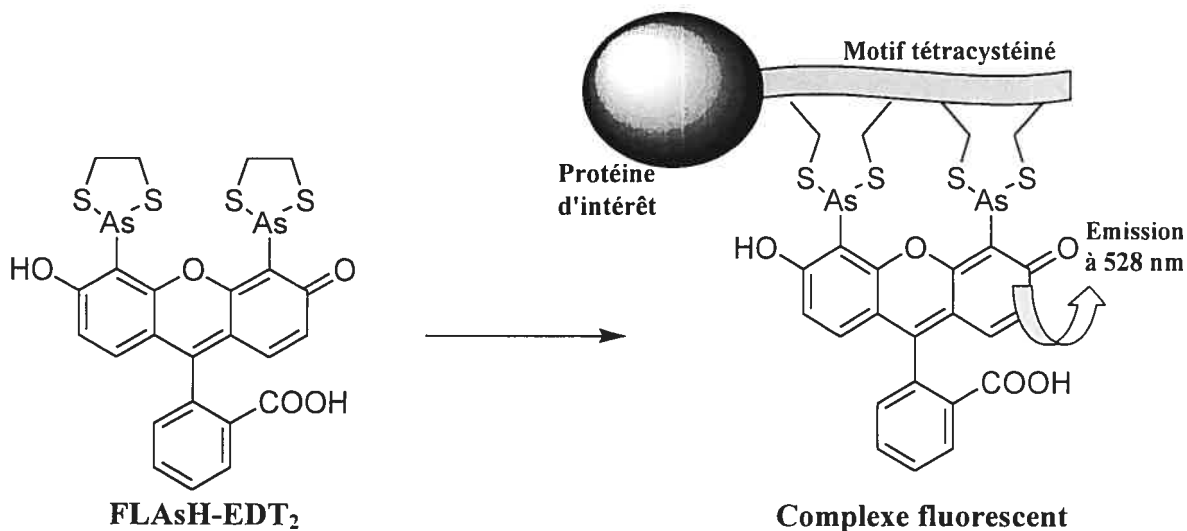


Figure 1: Réaction entre la sonde fluorescente FLAsH-EDT₂, peu fluorescente, avec le motif tétracystéiné de la protéine d'intérêt pour former un complexe très fluorescent.

Les expériences *in vivo* menées par le groupe de Tsien^{6,7} démontrent que la sonde synthétisée réagit spécifiquement avec le motif tétracystéiné greffé à la protéine d'intérêt. En effet, la présence d'autres sources de thiol dans la cellule ne cause pas un problème de faux positifs. Par ailleurs, le marquage protéique demeure visible même après un gel d'électrophorèse dénaturant, mais peut être défait par la suite, par l'ajout d'un 1,2-dithiol. Ainsi, cette méthode peut être utilisée pour la purification de protéines possédant un motif tétracystéiné. Les auteurs notent toutefois qu'un plus grand ratio d'augmentation de fluorescence par rapport au bruit de fond émis par la FLAsH-EDT₂ serait souhaitable pour améliorer la méthode.

1.2.3 Détection de l'interaction protéique

Les interactions protéine-protéine sont l'un des aspects de la biologie cellulaire les plus difficiles à étudier. En effet, les méthodes biochimiques usuelles, soient les méthodes immunologiques, sont limitées par la disponibilité des réactifs

efficaces tels que les anticorps pour l'immunoprécipitation ainsi que par le retrait des protéines de leur contexte cellulaire. De nouvelles techniques ont donc été développées dans le but d'étudier les interactions protéiques dans leur contexte cellulaire.

Le système deux hybrides chez la levure (yeast two-hybrid)

Le système deux hybrides chez la levure est basé sur la séparation de l'activateur de la transcription chez la cellule eucaryote en deux domaines indépendants, un domaine se liant à une séquence d'ADN, le site de liaison (DNA Binding Domain, DBD), et un domaine d'activation de la transcription (transcription Activation Domain, AD).⁸ Chacun des domaines est inactif en soi, mais le rapprochement des deux domaines rétablit l'activité et active la transcription du gène adjacent. Ainsi, les deux domaines peuvent être greffés génétiquement à deux protéines (X et Y) soupçonnées d'interagir. Si les deux protéines interagissent effectivement ensemble, le domaine liant l'ADN rapproche le domaine d'activation de la transcription d'un gène adjacent, ce qui a pour conséquence d'activer la transcription de ce gène (voir Figure 2). L'observation de l'expression du gène rapporteur indique que le domaine liant l'ADN et le domaine d'activation de la transcription se sont rapprochés dans l'espace et donc que les protéines greffées à chacun de ces domaines ont interagi. Chez la levure, le gène rapporteur couramment utilisé est une séquence encodant pour l'expression de la bêta-galactosidase, une enzyme catalysant l'hydrolyse d'un substrat incolore, le X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-6-D-galactoside). Ce substrat a la propriété de devenir bleu après son hydrolyse. Il existe un système équivalent chez la cellule de mammifère qui utilise fréquemment le gène encodant pour la protéine luciférase de la mouche à feu comme gène rapporteur. Cette protéine émet une lumière visible lorsqu'elle est mise en présence de son substrat, la D-luciférine.⁹ Une émission lumineuse implique que les protéines étudiées ont interagi.

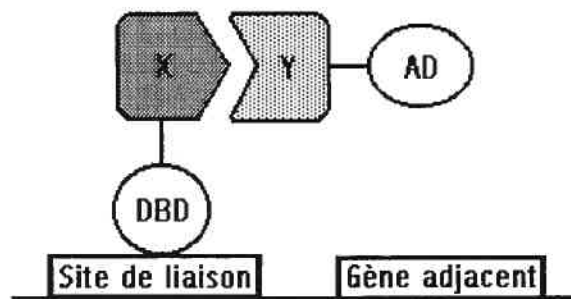


Figure 2: Détection de l'interaction entre la protéine X et la protéine Y par le système deux hybrides chez la levure.⁸

Le système deux hybrides permet d'observer l'interaction entre deux protéines, il est rapide et il est général puisqu'il ne dépend pas de l'identité des deux protéines interagissant. Toutefois, le système ne permet que l'observation indirecte de l'interaction protéique et il ne permet donc pas de faire des études cinétiques du système. De plus, il est dépendant des autres fonctions cellulaires et demande que l'interaction protéine-protéine observée survienne dans le noyau cellulaire. Il faut donc transporter les protéines d'intérêt à l'intérieur du noyau de la levure.¹⁰

Le transfert de l'énergie de résonance (Fluorescence resonance energy transfert, FRET)

Le transfert de l'énergie de résonance est un processus qui survient lorsque le spectre d'émission d'un fluorogène (le donneur), est semblable au spectre d'absorption d'une autre molécule (le receveur). Si le donneur et l'accepteur sont assez près l'un de l'autre dans l'espace, il y a échange d'énergie entre les deux molécules. Les deux molécules sont alors couplées par une interaction dipolaire et l'émission de lumière se fait à une longueur d'onde différente de la longueur d'onde d'émission du donneur seul. L'efficacité du transfert d'énergie est déterminée par la distance physique entre le donneur et l'accepteur et par l'importance du recouvrement des spectres d'émission de l'un et d'absorption de l'autre.¹¹ Le FRET a été utilisé abondamment dans la mesure de distances à l'échelle moléculaire ainsi

que dans l'étude de la structure de molécules biologiques et de leurs complexes.¹² De plus, puisque le système permet des mesures en temps réel, des analyses cinétiques de changements structurels à l'intérieur de macromolécules peuvent être effectuées à l'aide du FRET. Toutefois, le transfert d'énergie est limité à des distances maximales d'environ 70Å entre le donneur et l'accepteur. De plus, la probabilité d'obtenir des faux négatifs est élevée puisque l'orientation du donneur et de l'accepteur doit être adéquate pour que le transfert d'énergie soit efficace.

Par ailleurs, il est possible que le donneur et l'accepteur utilisés dans un système de transfert de l'énergie de résonance soient des grosses protéines, typiquement la *Green fluorescent protein* (GFP)¹³, qui une fois mutées, peuvent émettre à différentes longueurs d'onde. Des mutants de la GFP émettant dans le rouge et émettant dans le bleu ont été synthétisés et sont couramment utilisés dans des expériences de FRET.¹¹ Cependant, lorsque le donneur et l'accepteur sont des macromolécules telle que la GFP, la possibilité d'obtenir des faux négatifs est très importante. En effet, la protéine a un faible rendement quantique de fluorescence, son émission est très sensible à son environnement chimique et il est difficile de distinguer son émission de l'autofluorescence des cellules vivantes. De plus, la protéine doit se replier adéquatement pour que le transfert de l'énergie de résonance survienne, ce qui peut être problématique. Ainsi, bien que le FRET ait été appliqué avec succès à la détection de nombreuses interactions protéine-protéine, cette méthode possède de nombreuses lacunes. La figure 3 présente un exemple de détection de l'interaction entre la protéine X et la protéine Y par le FRET. Dans ce cas, le donneur est une GFP émettant dans le bleu, alors que l'accepteur est une GFP émettant dans le rouge. L'émission observée lorsque la GFP émettant dans le bleu est couplée à une GFP émettant dans le rouge est différente de celle de la GFP émettant dans le bleu non couplée.

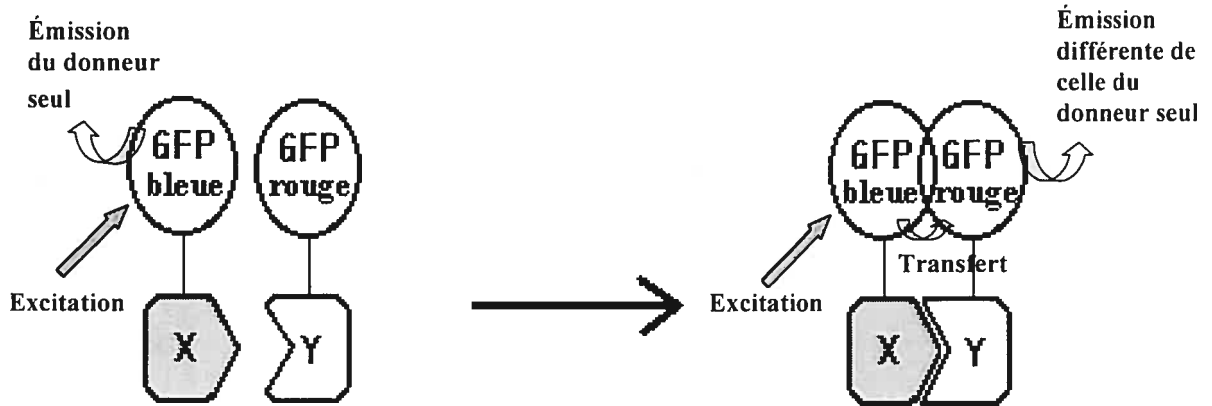


Figure 3: Détection de l'interaction entre la protéine X et la protéine Y par le système du transfert de l'énergie de résonance.

La complémentation de protéines (Protein Complementation Assay, PCA)

La complémentation de protéines est une technique très puissante qui a été mise au point par le Pr. Michnick^{3,14} au département de biochimie de l'Université de Montréal à la fin des années 1990. Elle consiste à séparer génétiquement une enzyme, typiquement la murine dihydrofolate reductase (DHFR), en deux fragments inactifs. À ces fragments sont greffés des protéines susceptibles d'interagir ensemble. Si les deux protéines d'intérêt interagissent effectivement, alors les deux fragments de l'enzyme se recombinent de façon à régénérer l'enzyme active. Le signal observé est donc directement généré à la suite de l'interaction protéique.

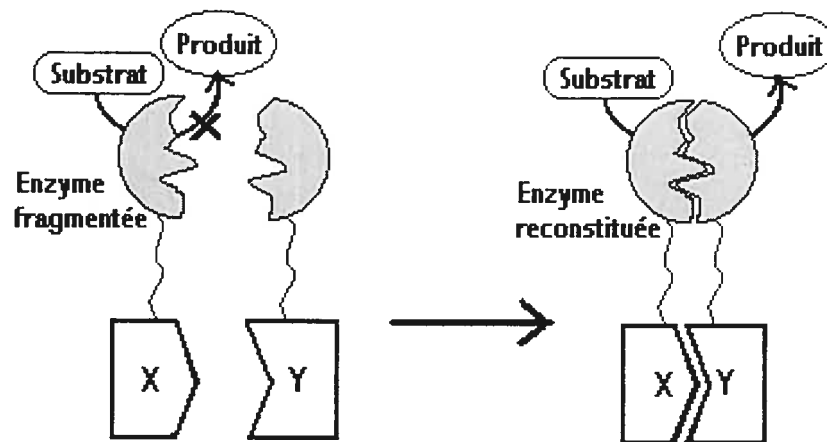


Figure 4:Détection de l'interaction entre la protéine X et la protéine Y par la méthode du PCA.

La DHFR catalyse la réduction du dihydrofolate en tétrahydrofolate utilisé dans la biosynthèse de plusieurs acides aminés. Ainsi, l'activité de la DHFR est absolument nécessaire pour la survie des cellules procaryotes et eucaryotes. La reconstitution de l'enzyme peut donc être observée *in vivo* par la survie cellulaire. D'autre part, le dérivé fluoresceiné du méthotrexate (MTX-F)^{15,16} une molécule fluorogène, est capable de lier la DHFR régénérée dans un complexe 1:1. La reconstitution de l'enzyme et donc l'interaction protéique peut ainsi être suivie par une autre technique, la spectroscopie de fluorescence. En effet, l'émission observée est directement reliée à la quantité de molécules de MTX-F liées à la DHFR reconstituée, car le MTX-F libre est rapidement rejeté hors de la cellule.

Le groupe Michnick¹⁴ a démontré l'efficacité de la technique en observant l'interaction entre l'immunophilin FKBP et la cible de la rapamycine (Target of rapamycin, TOR2) de la *Saccharomyces cerevisiae*. Ces deux protéines sont connues pour interagir uniquement en présence de rapamycine. L'apposition protéique menant à la reconstitution de l'enzyme a été observée *in vivo* par survie cellulaire.

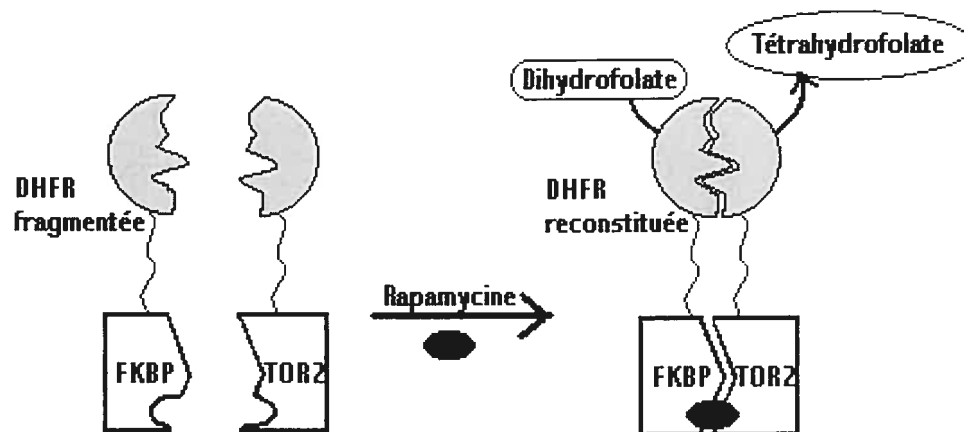


Figure 5: Détection de l'interaction entre FKBP et TOR2 *in vivo* par la méthode du PCA.

Le PCA ne nécessite pas l'action combinée de processus cellulaires ou enzymatiques pour fonctionner. C'est pourquoi il est possible de l'appliquer dans n'importe quel type de cellule et dans le compartiment cellulaire où se déroule l'interaction protéine-protéine ciblée. D'autre part, puisque le signal obtenu est amplifié par une réaction enzymatique, la limite de détection de la méthode est faible. Ce signal peut être observé par la survie cellulaire ou par spectroscopie de fluorescence. Par sa simplicité, le PCA peut être utilisé dans l'analyse des interactions protéiques d'une large librairie de protéines.¹⁷ Par ailleurs, la reconstitution de la structure tridimensionnelle de l'enzyme demande une importante régiospécificité et stéréospécificité dans l'association des deux fragments de l'enzyme. Pour ce faire, les deux parties de l'enzyme doivent absolument être approchées dans l'espace de façon dirigée, ce que font les deux protéines d'intérêt en interagissant. Cela a pour conséquence de minimiser l'obtention de faux positifs³ et de permettre la distinction entre les interactions protéiques parallèles et antiparallèles. Par contre, le désavantage est de favoriser l'obtention de faux négatifs, car il est possible que les protéines interagissent, mais que la structure tertiaire de

l'enzyme ne soit pas parfaitement reconstituée. Il n'y aurait alors pas d'activité enzymatique observée dans le milieu.

1.3 But du projet

1.3.1 Étude de l'interaction protéique

Le but du projet consiste en le développement d'une méthode d'étude des interactions protéine-protéine semblable au PCA, mais dans lequel une petite molécule fluorogène remplace l'enzyme coupée en deux parties. La sonde fluorescente réagit avec des résidus cystéines positionnés adéquatement dans l'espace sur deux protéines, plus particulièrement des GCN4, formant un enroulement de type leucine zipper. Les protéines d'intérêt sont quant à elle greffées à ces GCN4.

La protéine d'activation de la transcription chez la levure, GCN4, a la propriété de former un leucine-zipper, c'est-à-dire un dimère d'hélices- α , aussi appelé super-hélice (coil-coiled).^{18, 19, 20} Toutefois, cet enroulement n'est possible qu'en présence d'un site de nucléation qui induit l'enroulement.¹⁹ Des GCN4 tronquées qui ne possèdent plus leur site de nucléation, ne peuvent pas s'enrouler spontanément en super-hélice. À ces GCN4 tronquées sont greffées des protéines soupçonnées d'interagir. Il est logique de croire que l'interaction des protéines greffées aux GCN4 crée un site de nucléation à partir duquel les GCN4 s'enroulent de façon à former un leucine-zipper. Cet enroulement positionne adéquatement dans l'espace des cystéines judicieusement introduits par mutagenèse dirigée sur les GCN4. La sonde fluorescente peut alors réagir sélectivement avec ces résidus cystéinés. L'observation d'une fluorescence implique que les GNC4 se sont enroulées en super-hélice et que les protéines d'intérêt ont interagi.

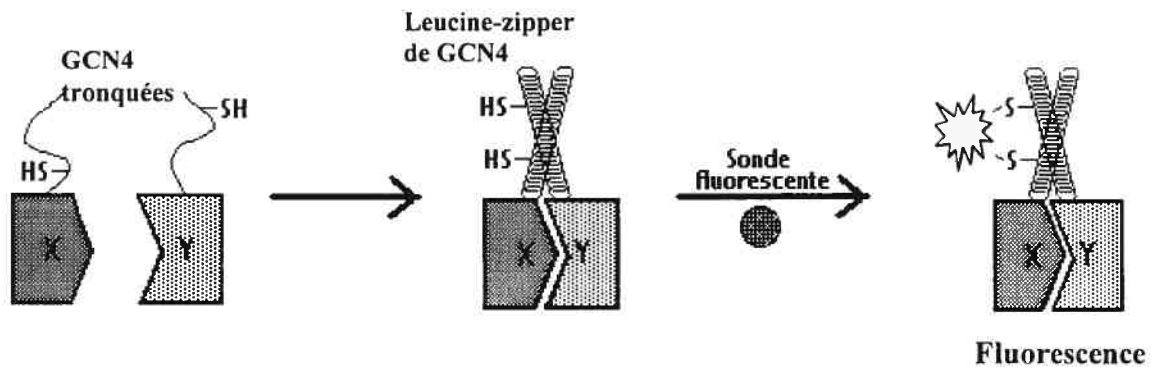


Figure 6: Enroulement des GCN4 tronquées suite à l'interaction entre les protéines X et Y et réaction du système avec la sonde fluorescente.

Il est cependant important que la sonde élaborée ne fluoresce pas si une seule protéine réagit avec elle, afin de ne pas entraîner de faux positifs. De plus, il est souhaitable que la sonde ne puisse pas réagir avec deux cystéines n'étant pas positionnées adéquatement dans l'espace, afin de ne pas entraîner encore une fois de faux positifs. C'est ce qui est représenté à la figure 7.

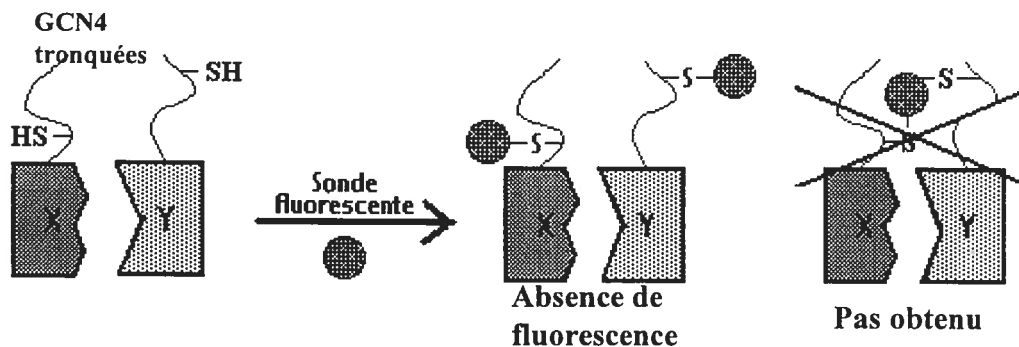


Figure 7: Réaction de la sonde avec des cystéines introduits sur des GCN4 greffées aux protéines d'intérêts X et Y.

Le nouveau type de PCA proposé possède certains avantages que le PCA classique n'a pas. D'une part, les protéines liant la sonde fluorescente sont plus petites que les fragments d'enzyme, ce qui minimise la possibilité d'interférer avec

les interactions protéiques analysées. D'autre part, le signal fluorescent est généré par une simple réaction chimique entre un fluorophore et deux fonctions thiolées, ce qui le rend moins sensible aux différentes conditions cellulaires que le repliement adéquat et la reconstitution d'une enzyme. Finalement, la méthode proposée est d'une grande flexibilité puisqu'il est possible d'introduire les résidus cystéines à différentes positions sur les GCN4, afin d'obtenir l'espacement désiré entre les fonctions thiolées. Il est également possible de synthétiser des sondes fluorescentes plus ou moins "grandes" (dont l'espacement entre les sites réactionnels est variable). Par ailleurs, en synthétisant une sonde fluorescente pouvant pénétrer les parois cellulaires, il serait possible d'observer les interactions protéiques *in vivo*, dans les compartiments cellulaires où elles surviennent. Cet avantage, important dans la caractérisation des interactions protéiques, caractérise également le PCA classique. Toutefois, un désavantage du système proposé est que le signal développé n'est pas amplifié par une réaction enzymatique, ce qui rend la méthode moins sensible que le PCA classique.

1.3.2 Marquage spécifique des protéines

Le système proposé peut également être utilisé comme sonde pour le marquage spécifique des protéines. Comme dans le cas du système développé par le groupe de Tsien^{6,7}, il s'agirait de greffer un petit peptide en C ou en N-terminal des protéines d'intérêt. Ce petit peptide devrait former une structure organisée, telle une hélice- α , et contenir deux résidus cystéines. La sonde pourrait alors réagir spécifiquement avec les fonctions thiols portées par le motif introduit et donc marquer la protéine d'intérêt par fluorescence. L'avantage de notre système par rapport à celui de Tsien est que la sonde proposée ne contient pas d'atome d'arsenic et elle est donc moins susceptible d'être toxique en milieu *in vivo*.

1.3.3 Purification de protéines

Le système proposé peut également être utilisé dans la purification de protéines. Pour se faire, la sonde peut être attachée de façon covalente à un support solide sur lequel passe une solution contenant les protéines à purifier. Ces protéines réagissent alors avec la sonde et sont retenues sur le support solide, alors que les autres composantes du mélange sont éliminées. Le lien covalent doit ensuite être brisé afin de récupérer les protéines purifiées. Le caractère fluorescent de la sonde est mis à profit lors de l'étape d'élution des protéines d'intérêt en ce sens que la résine ne fluoresce plus une fois que les protéines ont complètement été détachées de la sonde. Ce système est semblable à celui des colonnes de nickel (Ni^{2+}) capables de retenir les protéines contenant une queue d'histidines (His-tag). Encore une fois, un petit peptide formant un motif organisé et portant des cystéines devrait pour cela être introduit en C ou en N-terminal des protéines d'intérêt.

Le plus grand désavantage de la méthode de purification de protéines proposée est qu'il faut briser un lien covalent afin de récupérer la protéine pure. Cela est plus difficile que dans le cas de la méthode par chromatographie d'affinité avec les ions Ni^{2+} où les liens à briser sont non-covalents. Des résultats préliminaires quant à la réversibilité de la réaction entre la sonde et des thiols sont présentés au chapitre 4.

1.4 Choix de la fluorescence comme méthode de détection

1.4.1 Utilisation de la fluorescence en biochimie

L'utilisation de la fluorescence est de plus en plus importante en biochimie, en biophysique, en chimie clinique et en chimie environnementale.¹¹ En effet, l'utilisation de sondes fluorescentes remplace les traceurs radioactifs dans l'établissement d'un diagnostic clinique puisqu'elle élimine les dangers de la

manipulation du matériel radioactif et le coût de l'entreposage des déchets. Pour ces mêmes raisons, les sondes fluorescentes remplacent également la radioactivité (tel le ^{32}P) dans la révélation de gels de séparation d'ADN par électrophorèse. Elles ont d'ailleurs été largement utilisées dans le cadre du grand projet de séquençage du génome humain (Human Genome Project).¹¹ Par ailleurs, les sondes fluorescentes sont spécifiques pour une très grande variété de substrats, tels des ions (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{2+} , Cl^-), des drogues de faibles poids moléculaires, des antigènes de hauts poids moléculaires, des sucres (glucose) et des protéines. Elles s'avèrent donc très utiles dans l'analyse des différentes composantes du sang.¹¹

1.4.2 Avantages de la spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est une méthode très sensible, puisque les observations sont effectuées vis-à-vis un fond noir.¹¹ De plus, les méthodes fluorométriques sont généralement de plusieurs ordres de grandeur plus sensibles que les méthodes chromatographiques similaires.²¹ L'instrumentation nécessaire à la spectroscopie de fluorescence est relativement simple, ce qui permet d'observer des émissions à des niveaux microscopiques, comme dans des organelles cellulaires, ainsi qu'à des niveaux macroscopiques tel que sur des gels d'électrophorèse et dans des plaques à multi-puits. Finalement, la fluorescence d'une sonde est fortement influencée par son environnement chimique et par son comportement dans le milieu. En effet, les collisions de la molécule avec des désactivants, sa rotation, sa translation, sa diffusion, son interaction avec le solvant et sa position sur la molécule d'intérêt sont autant de critères qui affectent la fluorescence de la sonde. Ainsi, le rendement quantique de fluorescence, le temps de vie de l'état excité, l'émission et l'anisotropie de la sonde fluorescente sont tous influencés par ces critères. Ces derniers sujets sont traités plus en détails au chapitre 3.

1.5 Choix du fluorogène

1.5.1 Caractéristiques désirées pour le fluorogène

Les composés présentant une forte fluorescence ne sont pas tous de bons candidats pour être utilisés comme sonde fluorescente dans l'analyse *in vivo* des interactions protéiques. D'une part, le fluorogène doit avoir une longueur d'onde d'excitation plus grande que 300 nm et d'émission plus grande que 400 nm pour être distinguable de la fluorescence intrinsèque des protéines.^{11,22} Cette fluorescence intrinsèque est causée principalement par les tryptophanes qui absorbent autour de 280 nm et émettent vers 340 nm.¹¹ D'autre part, son coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'excitation doit être important (10^4 - 10^5 M⁻¹cm⁻¹) et son rendement quantique de fluorescence doit être le plus près possible de l'unité. Par ailleurs, la réaction entre les protéines et le fluorogène doit pouvoir être faite dans des conditions douces, semblables à celles retrouvées dans les milieux biologiques. Ainsi, il serait préférable que la sonde soit soluble dans l'eau, mais un caractère lipophile pourrait être avantageux dans le cas où la protéine devrait traverser les parois cellulaires. De plus, la réaction de la sonde avec les protéines ne doit pas modifier la conformation des protéines ni leurs interactions. Enfin, la sonde doit être stable en milieu physiologique et sous l'effet de la lumière (photostable).²² Si la fluorescence de la sonde est fortement influencée par le pH de la solution, il faut s'assurer que les conditions de pH du milieu physiologique dans lequel elle est utilisée permettent la fluorescence de la sonde.

Par ailleurs, certaines sondes possèdent, en plus d'un coeur fluorescent, un groupement qui n'est pas fluorescent et qui agit comme un désactivateur (les termes anglais « quencheur » et « quench » seront utilisés) intramoléculaire. L'attaque d'un nucléophile, tel un résidu thiolé d'une protéine, sur ce groupement détruit son habilité à « quencher » la fluorescence du coeur de la molécule. L'émission de la sonde devient alors importante. Cette caractéristique permet à la sonde d'agir comme

un interrupteur, ouvert ou fermé, ce qui facilite l'observation de la réaction entre la sonde et la protéine d'intérêt.²² De plus, cela évite d'avoir à enlever le colorant n'ayant pas réagi du milieu réactionnel.²³ Il serait donc très intéressant que la sonde développée possède une telle caractéristique.

1.5.2 Choix de la coumarine comme coeur fluorescent

Les coumarines se retrouvent dans une grande variété de végétaux, tels que le gazon, les orchidées et les légumineuses. Elles ont été isolées pour la première fois par Vogel en 1820.²⁴ Les coumarines naturelles ont été pendant longtemps les seules coumarines disponibles, jusqu'à ce que les chimistes Perkin^{25,26} et von Pechmann²⁷ développent des méthodes pour les synthétiser à la fin du 19^e siècle. Plusieurs autres méthodes de synthèse se sont par la suite ajoutées à celles des deux chimistes, notamment celles de Knoevenagel,^{28,29,30,31} de Wittig^{32,33} et de Reformatsky.^{34,35} Cela a rendu possible la synthèse d'une très grande variété de coumarines différemment substituées. Des coumarines substituées en positions 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 sont retrouvées dans la nature et sont également facilement synthétisables.

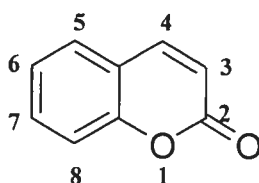


Figure 8: Structure générale de la coumarine.

Les coumarines sont connues pour avoir de nombreux et remarquables effets physiologiques.²⁴ Elles sont notamment reconnues pour leurs effets anticoagulants et vasodilatateurs en plus d'avoir une activité estrogénique, antibactérienne, sédative, hypnotique et analgésique. Elles sont aussi reconnues pour leur photosensibilisation de la peau.²⁴

La coumarine en elle-même (figure 8) a un rendement quantique de fluorescence très faible. Cependant, nombreux de ses dérivés possèdent des propriétés de fluorescence très intéressantes qui sont mises à profit dans plusieurs sphères de l'industrie. Par exemple, les coumarines entrent souvent dans la composition de colorants où elles servent d'agents illuminant la couleur (brightening agents). De plus, elles sont utilisées dans les détergents, le papier et le textile pour masquer la teinte jaunâtre des matériaux. Plus récemment, les coumarines ont été incorporées dans la fabrication de lasers et de matériaux photochromiques.³⁶

La plupart des coumarines présentent une bande d'absorption intense légèrement au-delà de 300 nm, ce qui permet de les exciter à des longueurs d'onde à l'extérieur de la plage d'excitation des protéines et des acides nucléiques.³⁶ D'autre part, le coefficient d'extinction molaire de la coumarine (*cf* figure 8) à la longueur d'onde d'excitation est généralement de l'ordre de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et le rendement quantique de fluorescence est assez important, soit autour de 0,50. Cependant, certaines caractéristiques des solvants telles que leur constante diélectrique, leur température et leur viscosité peuvent affecter grandement la valeur du rendement quantique de fluorescence de molécules fluorescentes en stabilisant plus ou moins leurs états fondamentaux et excités.³⁶ Finalement, la coumarine est une molécule rigide, ce qui permet d'introduire des substituants à des distances fixes et connues les uns des autres. Ces substituants peuvent alors réagir sélectivement avec les résidus cystéines introduits sur les GCN4 auxquelles sont greffées les protéines d'intérêt. (*cf* section 1.3.1) Pour ces raisons, la coumarine est un candidat de choix dans l'élaboration d'une sonde fluorescente permettant d'étudier l'apposition protéique.

1.5.3 Raisons justifiant l'introduction de maléimides sur la sonde

Les maléimides sont des imides cycliques à cinq membres, plus réactifs que leur pendant acyclique, le maléate.³⁷ En présence de thiols, les maléimides procèdent facilement à une réaction d'addition sur leur double liaison pour mener au

thioéther.²¹ Puisque les thiols sont les espèces les plus réactives dans les cellules, les maléimides devraient réagir préférentiellement avec les fonctions thiolés en milieu physiologique.²¹ De plus, cette réaction est spécifique, particulièrement dans des conditions neutres ou légèrement acides.³⁷ En effet, à des pH supérieurs à 8, les maléimides s'hydrolysent pour former l'acide maléamique ou pour former le maléate N-substitué lors de l'ouverture du cycle. De plus, à de très hauts pH, les amines peuvent réagir sur les maléimides en tant que nucléophile. Puisque l'espèce réactive de cette réaction d'addition est l'anion thiolate, une augmentation du pH du milieu augmente la proportion de l'espèce réactive dans le milieu et augmente la vitesse de la réaction. Toutefois, il est préférable d'effectuer la réaction dans des conditions à peu près neutres afin de conserver une bonne régiosélectivité.³⁸

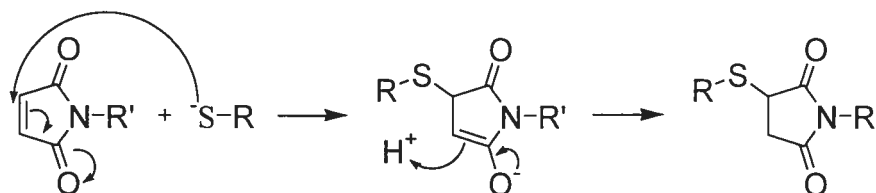


Figure 9: Réaction d'addition d'un thiolate sur un maléimide.

Le rendement quantique de fluorescence d'une molécule fluorescente est dramatiquement diminué par l'ajout d'une fonction maléimide qui lui est conjuguée.^{22,39} Le maléimide joue en effet le rôle d'un quencheur intramoléculaire, un phénomène qui a été expliqué par Wu *et al* en 1976.⁴⁰ Dans la plupart des composés aromatiques, dont la coumarine, la transition électronique de plus basse énergie est de type $\pi \rightarrow \pi^*$. Cette transition est permise et elle est fortement susceptible de se désactiver via un mode radiatif. La fluorescence est alors observée. Le caractère non fluorescent d'un composé aromatique contenant un ou des groupements maléimides est probablement dû à l'introduction de la transition d'encore plus basse énergie qu'est la transition de type $n \rightarrow \pi^*$ des carbonyles des maléimides. Cette transition n'étant pas autant permise que la transition $\pi \rightarrow \pi^*$, le temps de vie de son état excité est beaucoup plus long que celui de l'état excité de la

transition $\pi \rightarrow \pi^*$. La molécule est alors plus susceptible de se désactiver via de l'interconversion interne que via un mécanisme radiatif. Il n'y a alors pas de fluorescence observée. Un changement dans la structure des maléimides affectant leurs états électroniques, telle qu'une addition sur les liens doubles menant au bris de l'aromaticité des cycles, rétablit la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ comme la transition de plus basse énergie de la molécule, ce qui rétablit la fluorescence.^{23,41} Ce phénomène a été maintes fois observé^{21,22,23,39,41,42} et il est à la base de l'élaboration de plusieurs sondes fluorescentes de type interrupteur ouvert ou fermé. Il est à la base de l'élaboration de la sonde proposée dans cette recherche.

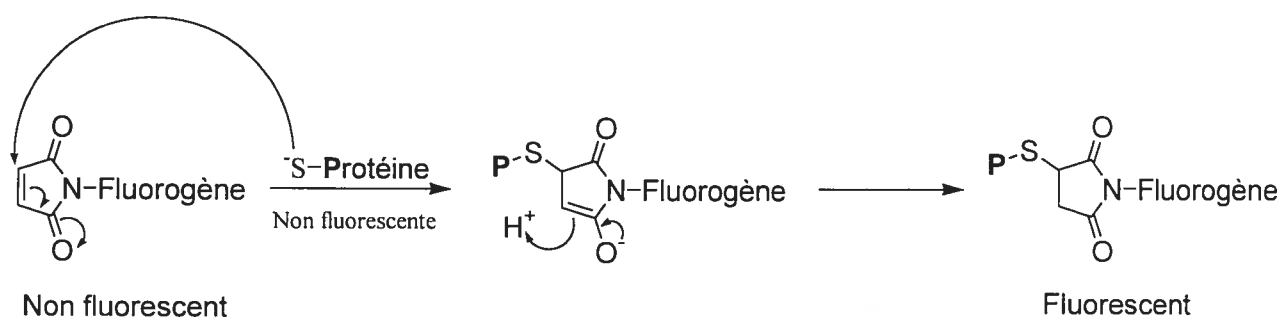


Figure 10: Addition d'un thiol, dans ce cas une cystéine d'une protéine sur une sonde fluorogène.

1.5.4 Sonde fluorescente proposée

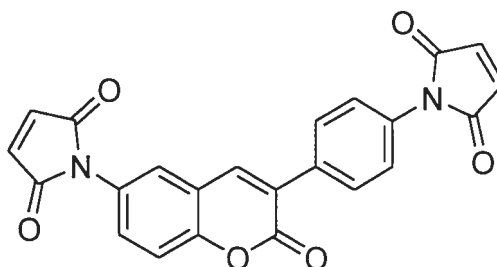


Figure 11: Sonde fluorescente proposée, la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine.

La sonde proposée est formée d'un coeur de coumarine substitué en position 3 par un 4-maléimidophényl et en position 6 par un maléimide. Puisque le système de délocalisation y est plus important que dans la coumarine, la longueur d'onde d'excitation de la molécule devrait être légèrement plus grande que celle de la coumarine, soit vers les 330 nm. Par ailleurs, les groupements maléimides devraient rendre le rendement quantique de fluorescence de cette molécule très faible. La réaction de thiols avec les deux maléimides devrait régénérer la fluorescence du coeur fluorescent. Le rendement quantique de cette molécule thiolée devrait être semblable à celui des coumarines, bien que la rotation possible autour du groupement phényle et des groupements maléimides pourrait l'hypothéquer.

Les groupements maléimides ont été introduits pour plusieurs raisons. D'abord, ils permettent à la sonde de réagir sélectivement avec les résidus cystéines des protéines. Ensuite, ils assurent qu'au départ, la molécule ne fluoresce pas, mais qu'elle devienne fluorescente suite à une réaction avec des thiols. Par ailleurs, l'hypothèse avancée est celle que la réaction d'un seul maléimide avec un thiol ne mène pas à une molécule fluorescente, car le second maléimide est en mesure de quencher la fluorescence de la molécule. Ainsi, seule la réaction de la sonde avec deux résidus cystéines devrait mener à une émission de lumière, ce qui minimise l'obtention de faux positifs. Enfin, la distance entre les deux groupements maléimides est d'environ 15 Å (MM+ calculations, logiciel HyperChem),⁴³ ce qui permet une sélectivité dans la réaction avec les GCN4 mutées sur lesquelles sont greffées les protéines d'intérêt .

1.6 Réaction de la sonde avec le système protéique proposé

L'enroulement des GCN4 en leucine-zipper est connu et la résolution cristallographique de la structure du dimère formé a été effectuée par le groupe de Klemm en 1991.²⁰ Ainsi, en mutant des résidus précis en cystéines sur chaque GCN4, il est possible d'introduire des fonctions thiolées qui soient positionnées de

façon prévisible et adéquate dans l'espace. Il est important que les mutations soient introduites au milieu de chaque hélice- α et que les résidus introduits soient à la surface de la protéine afin de ne pas perturber leur enroulement. Puisque la distance entre les deux groupements maléimides de la sonde proposée est d'environ 15,4Å, la mutation d'un résidu sur chaque GCN4 devrait être effectuée de façon à positionner les thiols à une distance d'environ 15 Å l'un de l'autre. Par ailleurs, en mutant le résidu lysine 8 en cystéine sur une GCN4 et le résidu acide glutamique 10 en cystéine sur l'autre GCN4, il est possible d'obtenir des fonctions thiolées distantes de 10 Å.⁴³ La non-réactivité de la sonde proposée avec les deux cystéines de ce leucine-zipper muté, permettrait de tester la spécificité du fluorogène développé.

1.7 Conclusion

Les prochains chapitres présenteront la voie de synthèse menant au fluorogène proposé, ainsi que les différentes étapes de la caractérisation spectroscopique de la sonde élaborée. La cinétique de la réaction entre cette sonde et des petits thiols sera ensuite discutée. Dans un dernier temps, il sera question de la réaction entre la sonde et une protéine ne contenant qu'un seul résidu cystéiné, soit la thiorédoxine mutée (C35A).

CHAPITRE 2

SYNTHÈSE

2.1 Synthèse de la sonde fluorogène

2.1.1 Généralités

La structure de la sonde fluorescente proposée a grandement été inspirée par celle d'une molécule ayant été synthétisée dans notre laboratoire de recherche, la 3,6-bismaléimidocoumarine (*cf* figure 12).⁴³ Cette sonde de première génération a plusieurs propriétés requises pour l'étude de l'apposition protéique. Elle possède des groupements maléimides qui minimisent son rendement quantique de fluorescence et qui lui permettent de réagir sélectivement avec des cystéines positionnées adéquatement sur des protéines. De plus, la réaction de ces groupements maléimides avec des thiols permet de régénérer la fluorescence du coeur de coumarine. Cependant, son coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'excitation (275 nm) est faible ($1422 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), tout comme son rendement quantique de fluorescence lorsqu'elle a réagi avec deux équivalents de thiol ($\phi_{\text{fluo}} = 0,026$).⁴⁴ C'est pourquoi, une deuxième molécule a été proposée, la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (**6**) (*cf* figure 13). Cette sonde fait l'objet du présent travail. La différence entre la sonde de première génération et la sonde ici proposée est l'introduction d'un substituant phényle en position 3 de la coumarine, entre le coeur fluorescent et le maléimide. Ce phényle est conjugué à la coumarine, ce qui augmente le système de délocalisation et ce qui devrait donc aussi augmenter la fluorescence. En effet, plus le système de délocalisation est grand, plus le coefficient d'extinction molaire de la molécule est important et généralement, plus la constante de désactivation radiative du fluorogène est importante aussi.¹¹

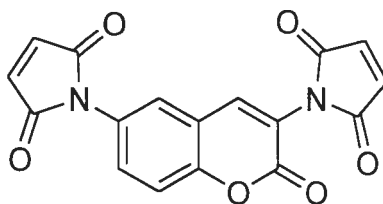


Figure 12: Sonde fluorogène de première génération, la 3,6-bismaléimidocoumarine

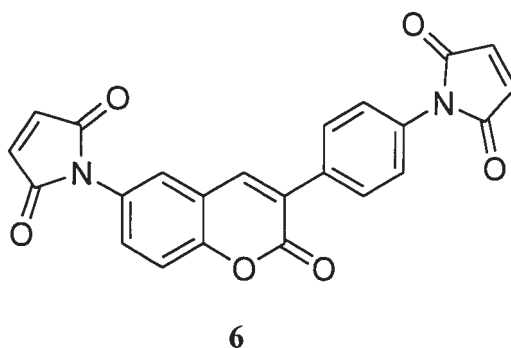


Figure 13: Sonde fluorogène de deuxième génération, la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6)

La synthèse de la sonde de deuxième génération a été inspirée de la synthèse de la sonde de première génération.⁴³ De plus, la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) a déjà été synthétisée dans notre groupe de recherche par Girouard.⁴³ Cependant, dû à un manque de reproductivité, la méthode a été retravaillée. Il est à noter que la synthèse proposée n'est pas optimisée, mais qu'elle permet l'obtention du fluorogène en quantité suffisante pour permettre de le caractériser et pour effectuer les tests protéiques.

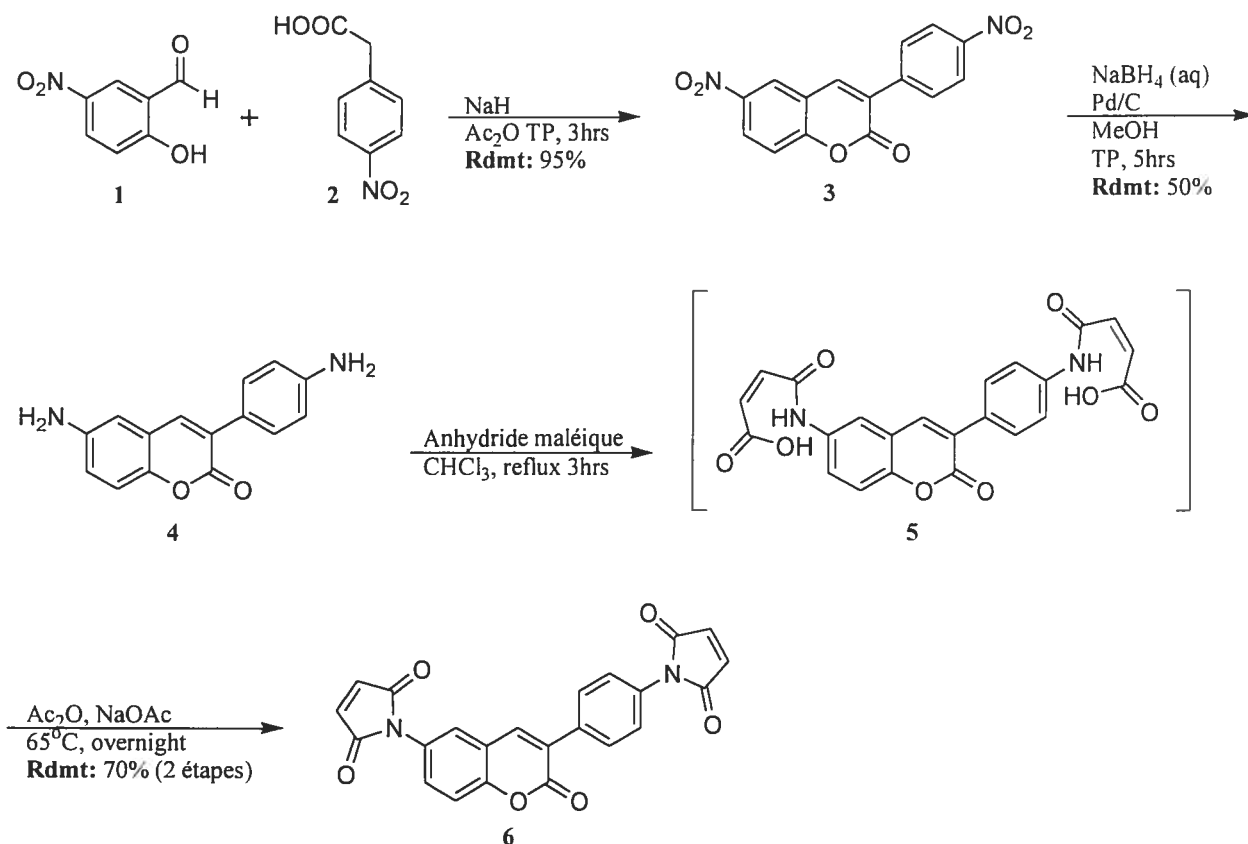


Figure 14: Synthèse de la sonde fluorogène, la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (**6**).

2.1.2 Discussion de l'étape-clé: la formation du coeur de coumarine

L'étape-clé de cette synthèse est la formation du coeur de coumarine. En effet, en choisissant judicieusement les produits de départ, il est possible d'introduire dès la première étape des substituants en position 3 et 6 qu'il sera par la suite aisé de transformer en maléimide et en phénylmaléimide. La formation de la coumarine est étudiée depuis plus d'un siècle et plusieurs méthodes sont connues dans la littérature, dont celles de Perkin,^{25,45} de Pechmann,^{26,27,46,47} de Knoevenagel,^{28,29,30,31,35} de Wittig^{32,33} et de Reformatsky^{34,47}.

La réaction de Pechmann consiste à faire réagir l'acide malique ou un ester β -cétoné avec un phénol en présence d'acide sulfurique. Cette réaction donne toutefois de très faibles rendements, parfois moins de 10%, particulièrement lorsque des substituants nitro ou carboxyles sont présents sur le phénol.²⁷ Ce rendement peut être légèrement augmenté par l'ajout d'un acide de Lewis tel le AlCl_3 .⁴⁷ La réaction de Reformatsky implique un carbonyle tel un aldéhyde, une cétone ou un ester et un α -haloester en présence de zinc. Cette réaction n'est pas appropriée pour les réactions de formation de coumarines utilisant des benzaldéhydes hydroxylées comme produit de départ, à moins de préalablement protéger ces groupements hydroxyles.²⁵ Ces méthodes n'ont donc pas été retenues dans la synthèse du produit désiré (6).

La réaction de Perkin consiste à chauffer un aldéhyde aromatique avec l'anhydride d'un acide aliphatique en présence du sel de sodium de cet acide. Cette réaction est particulièrement appropriée pour la formation des coumarines lorsqu'elle implique des nitrosalicylaldéhydes et des salicylaldéhydes halogénées. Elle donne également de très bons rendements. Ainsi, cette méthode aurait pu être utilisée dans la synthèse de la sonde proposée et s'avérerait une bonne alternative dans le cas où la méthode choisie ne donnerait pas des résultats satisfaisants.

La condensation de Knoevenagel survient entre un groupement méthylène activé et un carbonyle, soit un aldéhyde ou une cétone, en présence d'une base. Knoevenagel a décrit en 1898 la synthèse de la coumarine via la condensation de l'acide malonique et de l'ortho-hydroxyarylaldéhyde (salicylaldéhyde).³⁰ Cette réaction s'effectue dans des conditions douces et mène à de très hauts rendements, alors que les produits obtenus sont généralement très purs. Cette réaction est également connue dans la littérature pour s'effectuer aisément sur des réactifs portant des substituants nitro.²⁵ Pour ces raisons, la condensation de Knoevenagel a été choisie comme méthode pour former le coeur de coumarine de la sonde fluorogène proposée.

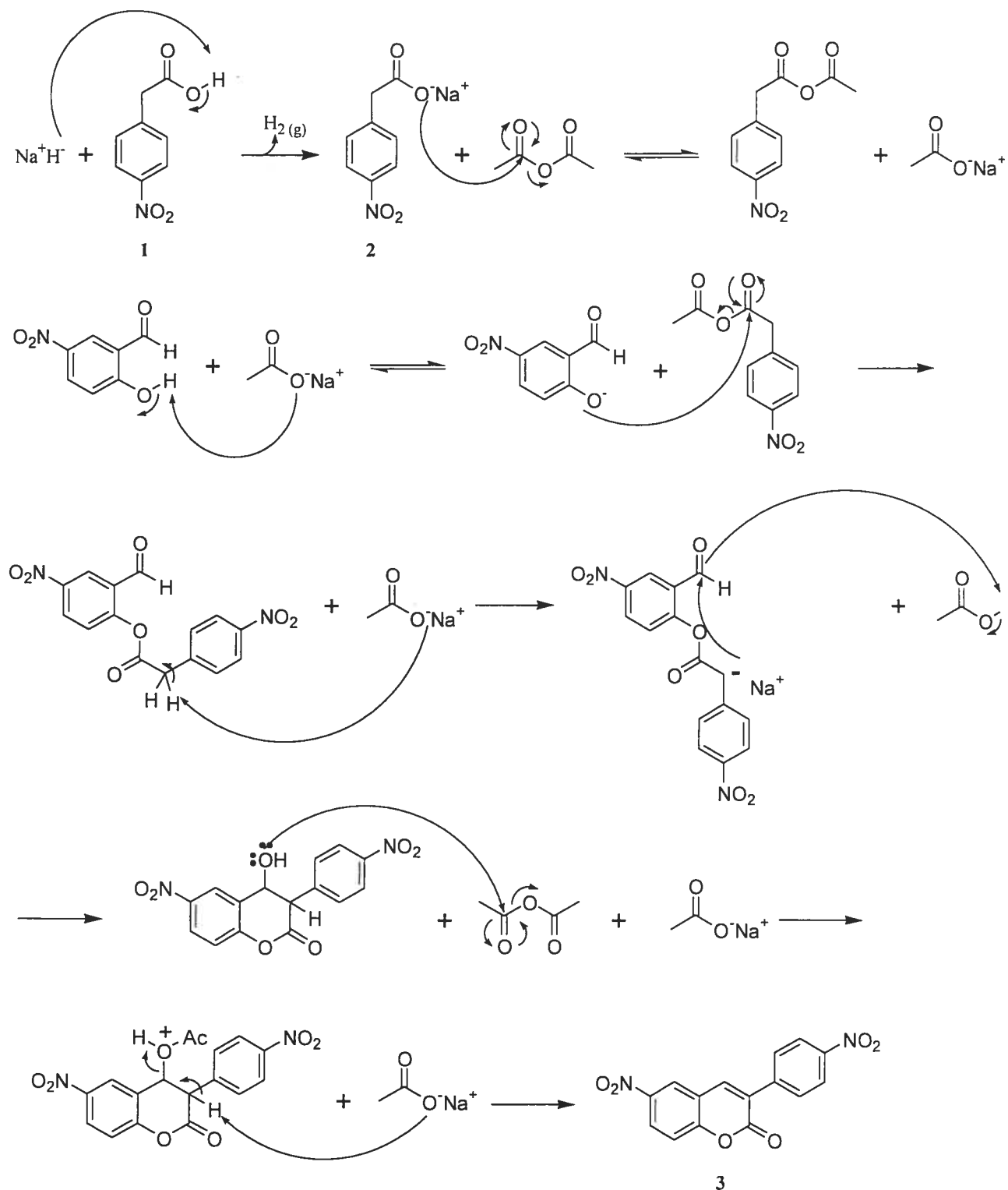


Figure 15: Mécanisme de la condensation de Knoevenagel de la 2-hydroxy-5-nitrobenzaldehyde (1) et de l'acide 4-nitrophénylacétique (2) menant à la formation de la 6-nitro-3-(4-nitrophényl)-coumarine (3).

La formation de la coumarine se fait aisément par la condensation de Knoevenagel. L'ajout de la base à une solution incolore d'anhydride acétique contenant les deux réactifs mène à un dégagement violent d'hydrogène. Le milieu passe rapidement au jaune vif, synonyme de la déprotonation du phénol. Le milieu est agité par la suite à la température de la pièce et un solide beige précipite tranquillement. Ce solide est le produit désiré et une simple filtration permet d'obtenir le 6-nitro-3-(4-nitrophényl)-coumarine avec un rendement excellent (95%) et une bonne pureté, car un seul produit est observé par RMN¹H. Ainsi, bien que la formation du coeur de coumarine soit l'étape-clé de la synthèse, cette étape ne pose aucun problème.

2.1.3 Réduction des groupements nitro en amines

Une grande variété de méthodes permettant de réduire des groupements nitro aromatiques en amines sont connues dans la littérature. Parmi ces méthodes, plusieurs ont été envisagées dans la synthèse de la sonde, dont celle utilisant le dichlorure d'étain dihydraté,^{49,50,51} celle utilisant le fer métallique (Fe⁰),^{52,53,54} celle utilisant un complexe de cuivre et de tétrahydroborate (Cu²⁺/BH₄⁻)⁵⁵ et celle utilisant le tétrahydroborate de sodium en présence de palladium sur charbon.^{23,56,57} Seule la dernière méthode a mené au produit désiré dans un rendement acceptable. En effet, la molécule diaminée a une faible solubilité dans la plupart des solvants organiques, sauf le diméthylsulfoxyde, le diméthylformamide et le méthanol. Ainsi, il fallait absolument se débarrasser du catalyseur par filtration, car il n'était pas possible d'extraire efficacement la molécule d'intérêt du milieu réactionnel. Or, seule la méthode utilisant le NaBH₄ en présence de palladium sur charbon a permis cela, car les autres catalyseurs restent partiellement ou complètement en solution dans le milieu réactionnel. Les autres méthodes ont peut-être permis de former le produit diaminé, mais il n'a jamais été possible de l'isoler ni de l'observer par RMN¹H.

D'autre part, la réduction des groupements nitro par hydrogénation (H_2) en présence d'un catalyseur de palladium sur charbon a également été tentée. Toutefois, lorsque la réaction est agitée à température ambiante sous pression d'hydrogène (100 psi) durant 24 heures, un mélange du composé monoréduit et diréduit est obtenu. Par ailleurs, lorsque le temps réactionnel passe à 72 heures, un produit non-identifié est obtenu. Ce composé est plus polaire que le composé attendu (par CCM) et certains signaux attendus dans la région des aromatiques en RMN¹H ne s'y trouvent pas. L'hypothèse proposée est qu'il y a eu réduction de la double liaison en position 3 de la coumarine. Bien que cela soit très surprenant puisque l'aromaticité de la molécule serait alors en partie brisée, cette observation a déjà été rapportée dans la littérature.²⁴

Ainsi, la réduction du 6-nitro-3-(4-nitrophényl)-coumarine (**3**) en 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine (**4**) se fait en ajoutant une solution aqueuse de tétrahydroborate de sodium à une solution contenant le composé dinitré et le catalyseur dans le méthanol. La réaction évolue lentement et peut être observée par l'apparition d'une coloration jaune dans le milieu réactionnel. En effet, la 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine est d'une couleur jaune très intense. De plus, cette molécule est fluorescente, ce qui permet également de suivre l'évolution de la réaction par chromatographie sur couche mince (CCM) à l'aide de la révélation à la lumière ultraviolette. La réduction d'un premier groupement nitro est d'abord observée, puis ce produit réagit encore pour former la molécule diaminée. Il est probable qu'un des deux groupements nitro soit plus réactif que l'autre et qu'il soit réduit en premier, quoique cela n'ait pas été vérifié dans la présente recherche. La réaction est poussée par un ou des ajouts successifs d'un équivalent de $NaBH_4(aq)$. Après typiquement deux ajouts supplémentaires de $NaBH_4(aq)$ et cinq heures de réaction, la réaction est arrêtée. Une petite quantité de produit de monoréduction demeure parfois visible et cela, même après l'ajout de plusieurs équivalents de $NaBH_4(aq)$ et de plus de douze heures de réaction. À la fin de la réaction, le catalyseur est filtré et le milieu est évaporé. Une purification par colonne de silice est nécessaire pour éliminer les complexes de bore présents dans le solide brun

obtenu. La colonne chromatographique permet aussi de séparer le composé monoaminé du produit diaminé, le cas échéant. Le produit étant insoluble dans l'éluant utilisé, un remplissage à sec (dry packing) de la colonne doit être effectué. Le processus ne permet d'obtenir qu'un rendement de 50%. Le produit obtenu est toutefois très pur (par RMN¹H).

2.1.4 Introduction des fonctions maléimides

L'introduction des groupements maléimides sur une sonde fluorescente est encore peu rapporté dans la littérature et ce, malgré l'immense potentiel que ces systèmes représentent.^{23,58,59,60,61} L'introduction de ces groupements sur notre molécule diaminée se fait en deux étapes. D'abord, les groupements aminés de la 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine réagissent avec l'anhydride maléique pour former l'acide maléamique correspondant. Cela se fait assez aisément en chauffant le composé diaminé dans le chloroforme à reflux, le tétrahydrofurane à reflux ou le diméthylformamide autour de 70 °C en présence d'anhydride maléique. Ce seul produit est observé par RMN¹H, mais le rendement de la réaction n'a pas été déterminé, car le composé est utilisé tel quel dans l'étape suivante. Cette étape consiste en la formation des maléimides cycliques. Il semble que l'excès d'anhydride maléique toujours présent dans le milieu n'interfère pas dans l'étape de fermeture des maléimides.

La méthode classique consiste à chauffer le composé diacide dans l'anhydride acétique à 65 °C en présence d'acétate de sodium. Après un temps réactionnel assez long, entre 12 et 20 heures, la réaction est arrêtée en versant le milieu réactionnel dans de l'eau glacée. La 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine précipite, alors que le produit de départ restant demeure en solution dans l'eau et l'acide acétique. Cette réaction est reconnue pour être difficile et pour mener à de faibles rendements, même si le milieu est chauffé à de hautes températures et que les temps réactionnels sont très longs.^{58,62,63} Ainsi, les rendements obtenus pour

la combinaison des deux étapes peut atteindre les 70%, mais peut aussi être aussi faible que 20% si les temps réactionnels sont trop courts (moins de douze heures) et si le milieu n'est pas chauffé suffisamment (sous les 65 °C). Par contre, le composé est très facile à isoler par simple filtration et quelques lavages avec de l'eau glacée suffisent pour obtenir le produit désiré très pur, par RMN¹H. Il est à noter que le composé diacide est d'un jaune vif, alors que le produit de fermeture portant deux maléimides est beige un peu verdâtre. S'il est récupéré, le produit de départ peut être remis en solution dans l'anhydride acétique en présence d'acétate de sodium pour former la molécule d'intérêt.

Par ailleurs, Reddy *et al*⁵⁸ ont publié une méthode de cyclisation des acides maléamiques à l'aide d'un acide de Lewis, le dibromure de zinc, et l'hexaméthylidisilazane dans le benzène à reflux. Ils rapportent avoir obtenu des rendements excellents (au-delà de 86%) avec plusieurs acides maléamiques aromatiques, dont entre autres l'acide (N-méthylcoumarin-7-yl)-maléamique, un composé semblable au notre. Cette méthode a donc été tentée suite à la formation du diacide maléamique d'intérêt, mais aucune trace de la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine n'a été obtenue. Il semble que l'intermédiaire diacide maléamique a été récupéré (par RMN¹H). Cette réaction n'a cependant été tentée qu'une seule fois et il serait peut-être possible d'obtenir le produit désiré à l'aide de cette méthode en modifiant légèrement les conditions réactionnelles. Ainsi, la méthode classique de formation des maléimides a été retenue, bien que les rendements obtenus ne soient pas excellents.

2.2 Dithiolation de la sonde

Le but de la présente recherche est de caractériser la réaction entre la sonde proposée et des résidus cystéines portés par des protéines. Avant d'effectuer des tests protéiques, la réaction a d'abord été caractérisée en faisant réagir la sonde avec deux équivalents d'un petit thiol. Le produit de cette réaction modèle a été synthétisé

et purifié afin qu'il puisse être caractérisé. La réaction modèle a été effectuée avec deux différents thiols, soient l'éthanethiol et l'éthyl 2-mercaptoacétate.

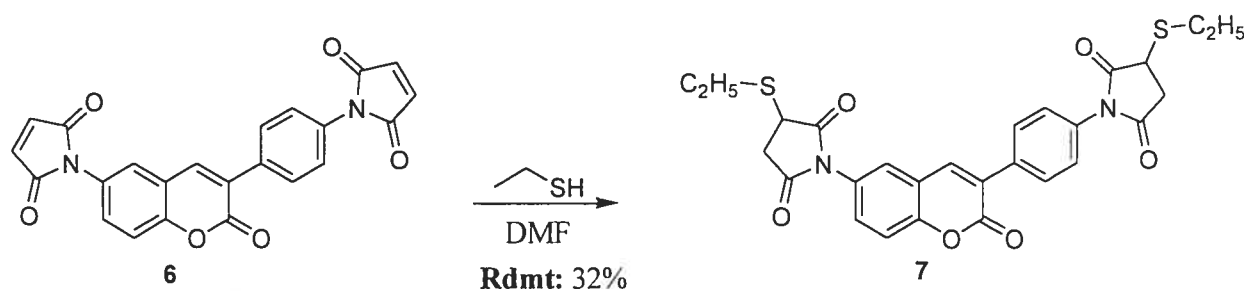


Figure 16: Réaction modèle entre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) et deux équivalents d'éthanethiol pour mener à la 6-(3-éthanesulfanylpyrrolidine-2,5-dione)-3-[4-(3-éthanesulfanylpyrrolidine-2,5-dione)phényl]-coumarine (7).

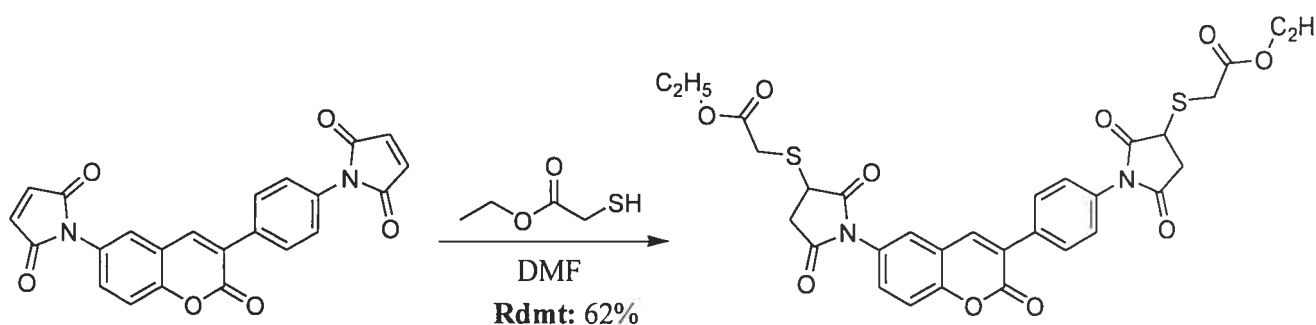


Figure 17: Réaction modèle entre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) et deux équivalents de 2-mercaptoacétate d'éthyle pour mener à la 6-[3-(sulfanyl-acetic acid)pyrrolidine-2,5-dione]-3-[4-(3-[sulfanyl-acetic acid]pyrrolidine-2,5-dione)-phényl]-coumarine (8).

La 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine n'est pas soluble dans la plupart des solvants organiques ni dans l'eau, comme mentionné précédemment. Les seuls solvants dans lesquels la molécule est soluble sont le diméthylsulfoxyde et le diméthylformamide. Si la réaction n'est pas effectuée dans l'un de ces deux solvants, le réactif demeure en suspension dans le milieu et ne réagit pas avec le thiol. C'est ce qui a été observé lorsque la réaction a été tentée dans l'eau, le dichlorométhane et le méthanol.

La réaction modèle a donc été effectuée dans le diméthylformamide pur en présence d'un minimum de 5 équivalents de thiol. Dans le cas de la réaction de la sonde avec l'éthanethiol aussi bien que dans le cas de la réaction avec l'éthyl-2-mercaptoacétate, le milieu, d'abord incolore, passe au rouge brun. Toutefois, les produits réactionnels sont jaune pâle. La réaction peut être suivie par CCM en utilisant la lumière ultraviolette comme révélateur, car les molécules formées sont hautement fluorescentes. Il est à noter que les produits monothiolés ne sont pas observés par CCM, probablement parce qu'ils réagissent avec un deuxième équivalent de thiol immédiatement après avoir été formés. Alors que la réaction entre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) et l'éthanethiol est complétée après quelques heures, la réaction entre la sonde et l'éthyle 2-mercaptoacétate se fait en quelques minutes. Cela peut être expliqué par la plus grande facilité qu'a le 2-mercaptoacétate d'éthyle à perdre son proton qu'en a l'éthanethiol (*cf* section 4.2, p.63 pour les pK_a). Une fois la réaction complétée, le milieu est évaporé et le produit est purifié par colonne de silice. Les faibles rendements obtenus pour les deux réactions ne sont pas dus à l'obtention d'un mélange de produits, car la réaction semble propre par CCM et par RMN¹H du produit brut. Le problème peut résider dans l'isolement et la purification des composés. Le fait de travailler sur de très petites quantités, quelques dizaines de milligrammes, a en effet rendu la purification par colonne chromatographique difficile.

D'autre part, la dithiolation de la sonde par la protéine d'intérêt a été effectuée autrement (*cf* section 5.4 pour les tests protéiques). La sonde a d'abord été dissoute dans le DMSO pur avant d'être placée dans le milieu aqueux contenant la protéine de façon à ce que la proportion de solvant organique dans le milieu soit de 10%. Cette proportion de solvant organique dans un milieu aqueux est le pourcentage maximal généralement toléré par les cellules dans un milieu *in vivo*. Le fluorogène ne précipite alors pas, car il est entouré d'une sphère de molécules de solvant organique. Cela peut cependant affecter ses propriétés de fluorescence.

2.3 Conclusion

La synthèse de la sonde d'intérêt, la 6-maléimido-3-(4-maléimidophéyl)-coumarine (**6**), a été effectuée en quatre étapes avec un rendement global de 33%. Ce rendement n'est pas excellent vu le petit nombre d'étapes, mais la pureté du produit obtenu est très grande par RMN¹H. De plus, les étapes sont courtes et les intermédiaires sont faciles à purifier. Les dérivés dithiolés (**7** et **8**) ont été obtenus avec des rendements faibles, mais leur pureté est bonne par RMN¹H. Ainsi, bien que de façon générale, les rendements des différentes étapes de synthèse ne soient pas excellents, la synthèse effectuée a permis l'obtention de composés purs en quantité assez importante pour permettre de les caractériser par diverses techniques spectroscopiques ainsi que d'effectuer des tests protéiques.

CHAPITRE 3

CARACTÉRISATIONS SPECTROSCOPIQUES

3.1 Principes spectroscopiques

3.1.1 L'absorption moléculaire

L'absorption de la lumière dans le domaine ultraviolet et visible se traduit par des bandes d'absorption électronique qui sont constituées de raies discrètes, mais accolées. Chaque raie correspond à la transition d'un électron de l'état fondamental à un état électronique excité. L'absorption de rayonnement par les molécules organiques à des longueurs d'onde comprises entre 200 et 800 nm résulte des interactions entre les photons de lumière et les électrons les moins bien retenus des molécules. Ces électrons sont retrouvés typiquement dans les liens multiples et les paires d'électrons libres. Les groupements qui absorbent la lumière ultraviolette et visible sont appelés chromophores. La position et l'intensité des bandes d'absorption des molécules sont influencées par les particularités structurales de la molécule, telles que la nature et la conjugaison des groupements chromophores. Le spectre d'absorption d'une molécule lui est donc caractéristique.⁶⁴

L'absorbance d'un rayonnement lumineux par une solution est directement proportionnelle à la longueur d'onde du trajet optique, ainsi qu'à la concentration de l'espèce absorbante dans le milieu. Cette relation est la loi de Beer-Lambert. Le coefficient d'extinction molaire caractérise les molécules à chaque longueur d'onde du spectre lumineux.

$$A = \epsilon l c$$

où: ϵ = coefficient d'extinction molaire $(\text{mol/L})^{-1}\text{cm}^{-1}$

l = longueur du trajet optique en cm

c = concentration de la solution en espèce absorbante (mol/L)

Equation 1: Loi de Beer-Lambert

3.1.2 La fluorescence moléculaire

La luminescence est l'émission de lumière à partir des états électroniques excités d'une molécule. Elle est divisée en deux catégories, la fluorescence et la phosphorescence, qui sont différenciées par la nature de l'état excité à partir duquel l'émission est faite. Dans les états excités singulets, l'électron a un spin inverse à celui de l'électron de l'état fondamental. Le retour à l'état fondamental est donc permis et s'effectue rapidement par l'émission d'un photon. C'est la fluorescence. Dans les états excités triplets, l'électron a un spin identique à celui de l'électron de l'état fondamental. Le retour à l'état fondamental par l'émission d'un photon est une transition interdite et elle s'effectue très lentement. C'est la phosphorescence. Les processus survenant entre l'absorption d'un photon et le retour de la molécule à son état fondamental sont généralement représentés par un diagramme de Jablonski.^{11,21}

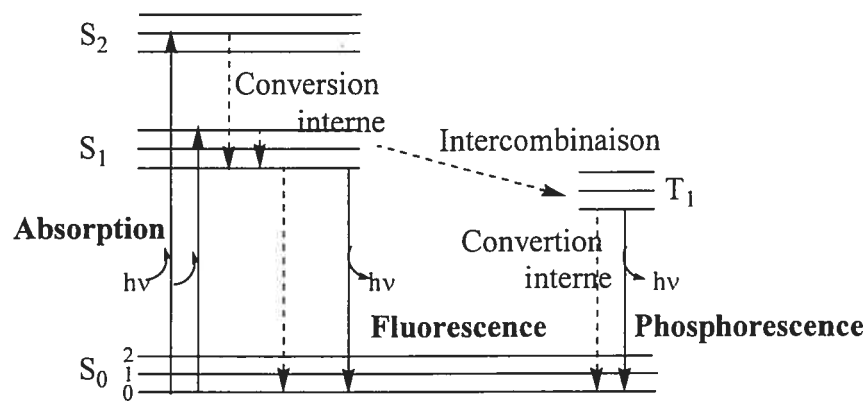


Figure 18: Une représentation du diagramme de Jablonski.^{11,21}

L'état singulet fondamental, celui de premier niveau et celui de deuxième niveau sont représentés sur le diagramme par S₀, S₁ et S₂ respectivement. À chacun de ces niveaux, le fluorogène peut exister dans plusieurs états vibrationnels, désignés par 0, 1 et 2. Les transitions entre les états sont illustrées par des flèches. Les lignes pleines représentent des processus radiatifs et les lignes pointillées représentent des processus non-radiatifs.

À la température de la pièce, l'énergie thermique n'est pas suffisante pour peupler significativement les états excités. De plus, la différence entre les niveaux d'énergie S₀ et S₁ est trop importante pour que l'élévation de la température du fluorogène puisse induire de la fluorescence. Il faut donc absolument que la molécule absorbe de la lumière pour passer à un état excité et cette absorption est faite à partir du niveau fondamental.¹¹

Plusieurs processus peuvent survenir suite à l'absorption de lumière par une molécule. Généralement, la molécule est excitée à des niveaux vibrationnels supérieurs de S₁ ou S₂. La molécule se relaxe alors très rapidement, en moins de 10⁻¹² s, jusqu'au plus bas niveau vibrationnel de S₁. Cela s'effectue bien avant que survienne l'émission de lumière. La molécule dans l'état excité S₁ peut se désactiver par différents processus non-radiatifs, appelés ici conversion interne. Elle peut se

désactiver par l'émission d'un photon, ce qui correspond à la fluorescence. La molécule peut également effectuer un transfert non radiatif entre deux états de multiplicité différente, de l'interconversion, pour se retrouver dans l'état triplet T_1 . À partir de cet état, la molécule peut se désactiver par conversion interne ou par l'émission d'un photon, ce qui correspond à la phosphorescence.

La perte d'énergie entre le photon absorbé par la molécule et le photon émis lors du processus de fluorescence est un phénomène généralement observé. C'est le déplacement de Stoke. Ce phénomène est causé par la désactivation rapide non radiative de la molécule excitée dans les états vibrationnels les plus stables de S_1 . Il peut également être causé par la relaxation du fluorogène des niveaux vibrationnels supérieurs de S_0 . Une molécule peut aussi présenter des déplacements de Stokes plus prononcés dans certains solvants, lors de réactions à l'état excité, s'il y a formation d'un complexe ou lorsqu'il y a un transfert d'énergie (FRET).

Les données spectrales de fluorescence d'une molécule peuvent être présentées dans un spectre d'excitation qui met en relation l'intensité de l'émission à une longueur d'onde d'observation, en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Généralement, ce spectre correspond au spectre d'absorption de la molécule. Les données peuvent également être présentées dans un spectre d'émission qui met en relation l'émission de la molécule à une longueur d'onde d'excitation donnée, en fonction de la longueur d'onde d'observation. Ce spectre correspond souvent à l'image miroir du spectre d'absorption de la molécule, car ce sont les mêmes transitions qui sont impliquées dans l'absorption et dans l'émission. D'autre part, une propriété caractérisant le processus de fluorescence est l'indépendance du spectre d'émission d'un fluorogène par rapport à la longueur d'onde d'excitation. En effet, l'excès d'énergie est rapidement dissipé par conversion interne de façon à laisser la molécule dans le niveau vibrationnel de plus basse énergie de S_1 à partir duquel se fait l'émission du photon.

Le temps de vie de l'état excité, τ , et le rendement quantique de fluorescence, ϕ_{fluo} , sont deux caractéristiques importantes d'un fluorogène. Le temps de vie de l'état excité correspond à la période de temps moyenne qu'une molécule passe à l'état excité avant de retourner à l'état fondamental. Cela représente le temps disponible par le fluorogène pour interagir avec son environnement et se désactiver via différents processus, radiatifs ou non radiatifs. De l'information sur l'émission de la molécule peut donc être déduite de la valeur de τ . Généralement, le temps de vie de la fluorescence se situe autour de 10 ns. Par comparaison, le temps de vie de la phosphorescence se situe autour d'une milliseconde, quoiqu'il puisse atteindre la minute dans le cas des substances brillant dans le noir (*glow in the dark*).

Le rendement quantique de fluorescence est le ratio du nombre de photons émis en fluorescence et du nombre de photons total absorbé. Les molécules ayant un rendement quantique de fluorescence élevé, c'est-à-dire le plus près de l'unité, émettent beaucoup de lumière. Le rendement quantique de fluorescence dépend des constantes de vitesse des différents processus de désactivation, radiatifs et non radiatifs. Ainsi, la fraction de molécules se désactivant via un processus radiatif et donc le rendement quantique de fluorescence d'une molécule est décrit par l'équation suivante:¹¹

$$\phi_{\text{fluo}} = \frac{k_{\text{rad}}}{k_{\text{rad}} + k_{\text{non rad}}}$$

où: ϕ_{fluo} = le rendement quantique de fluorescence

k_{rad} = la constante de vitesse de désactivation radiative (fluorescence)

$k_{\text{non rad}}$ = la constante de vitesse de désactivation non radiative

(tous les autres processus de désactivation)

Equation 2: Calcul du rendement quantique de fluorescence via les constantes de vitesse des divers processus de désactivation

Le rendement quantique de fluorescence peut également être calculé à partir du spectre d'émission du fluorogène et de celui d'une référence, typiquement la fluoresceine. Il s'agit, en effet, de comparer les aires des pics d'émission du fluorogène et d'une solution de fluoresceine dans le NaOH (1mol/L), qui a un rendement quantique de fluorescence de 0,95 dans ce solvant.

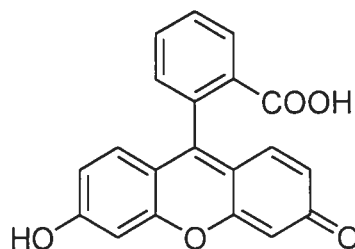


Figure 19: Structure de la fluoresceine utilisée comme référence dans le calcul des rendements quantiques de fluorescence.

La concentration de la solution de référence est ajustée de façon à ce que son absorbance concorde avec celle de la solution de fluorogène à la longueur d'onde d'excitation du fluorogène. L'équation suivante est utilisée pour calculer le rendement quantique de fluorescence des molécules d'intérêt:⁶⁵

$$\phi_{\text{fluorogène}} = \phi_{\text{référence}} \times \frac{\int \text{émission}_{\text{fluorogène}}}{\int \text{émission}_{\text{référence}}}$$

$$\text{où: } \phi_{\text{référence}} = \phi_{\text{fluoresceine}} = 0.95$$

$$\int \text{émission} = \text{l'aire sous le pic d'émission en UA}^2$$

Equation 3: Calcul du rendement quantique de fluorescence par comparaison de l'émission du fluorogène et de l'émission d'une référence

Cette dernière méthode a été utilisée pour calculer les rendements quantiques de fluorescence de l'intermédiaire 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine, de la sonde ainsi que des deux dérivés dithiolés de la sonde.

L'intensité de la fluorescence peut être diminuée par une grande variété de processus. L'ensemble de ces processus est généralement désigné par le terme désactivation, mieux connue sous le terme anglais, *quench*. Différents mécanismes peuvent entraîner une désactivation. Par exemple, la collision du fluorogène excité avec une autre molécule présente en solution, un désactivateur, peut entraîner une désactivation. L'oxygène, les halogènes, les amines et les molécules déficientes en électron, tel l'acrylamide, sont reconnus pour être de bons désactivateurs.¹¹ Dans ce processus, le fluorogène retourne simplement à l'état fondamental. Les molécules fluorogéniques peuvent également former, à l'état excité, des complexes non fluorescents avec des désactivateurs. Le quench peut également s'effectuer à l'état fondamental par certains mécanismes qui atténuent l'absorption de lumière par le fluorogène. Une concentration importante du milieu peut entraîner un tel quench.

3.1.3 Fluorescence de la coumarine

La fluorescence de la coumarine dépend du type de transition menant à l'état excité. Lorsque la transition $n \rightarrow \pi^*$ est la plus favorisée, il n'y a pas de fluorescence, car il s'agit d'une transition interdite. Le temps de vie à l'état excité est très long, ce qui permet une désactivation de la molécule via des processus non radiatifs. Lorsque la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ est la plus favorisée, il y a de la fluorescence, car la transition est permise. Le temps de vie de l'état excité est court et la désactivation de la molécule via un processus radiatif est favorisée.⁶⁶ La coumarine (*cf* figure 8) n'est pas fluorescente, c'est-à-dire que son rendement quantique de fluorescence est nul, car la transition la plus favorisée du système est de type $n \rightarrow \pi^*$. Par comparaison, il est logique de croire que la 3-phénylcoumarine n'est pas fluorescente non plus, bien que cela n'ait pas été vérifié dans la présente recherche. L'introduction de substituants sur la coumarine peut toutefois la rendre fluorescente si l'énergie de la transition $n \rightarrow \pi^*$ n'est que peu influencée, mais que l'énergie de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ est abaissée de façon importante. La nature des substituants ainsi que leur position sur le bicyclic influencent fortement la valeur du rendement quantique de fluorescence. Par

exemple, l'introduction de groupements donneurs à la position 7 de la coumarine induit la fluorescence de la molécule, alors que l'introduction de groupements électroattracteurs sur la partie pyrone de la molécule la diminue.⁶⁶ Ainsi, encore par comparaison, il est logique de croire que la 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine est fluorescente, car le cœur de coumarine possède un groupement électrodonneur sur sa partie benzénique. Cela a été vérifié et sera discuté dans la section 3.2. La sonde fluorogène élaborée, quant à elle, ne devrait pas fluorescer à cause de la présence de groupements maléimides qui agissent comme désactivants intramoléculaires. Finalement, la sonde ayant réagi avec deux équivalents de thiols devrait présenter une fluorescence semblable à celle de l'intermédiaire diaminé.

3.2 But des caractérisations spectroscopiques

Les études spectroscopiques avaient d'abord pour objectif de vérifier que la sonde élaborée possède une fluorescence négligeable, mais que la réaction de la sonde avec deux équivalents d'un thiol mène à la formation d'une espèce hautement fluorescente. Il s'agissait également de déterminer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la sonde dithiolée. Cela permettait de connaître la longueur d'onde optimale avec laquelle irradier le milieu et observer l'émission lors des tests protéiques. D'autre part, la fluorescence d'une molécule est liée à la lumière qu'elle absorbe et c'est pourquoi l'absorbance de la sonde ainsi que celle de ses deux dérivés dithiolés ont été étudiées. L'intermédiaire diaminé a également été étudié en absorbance et en fluorescence afin de comparer son comportement spectroscopique à celui de la sonde et de ses dérivés dithiolés.

3.3 Caractérisation de l'absorbance des molécules d'intérêt

Les spectres d'absorbance du 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine (4), du 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) et des deux dérivés dithiolés de la sonde (7 et 8) ont été enregistrés. Le DMF 100% a été utilisé comme solvant pour

des raisons de solubilité des molécules analysées. Le spectre d'absorbance du dérivé diaminé présente deux bandes importantes. La première est un pic plutôt fin dont le maximum est à 261 nm, alors que l'autre est une bande large entre 300 nm et 450 nm, dont le maximum est à 381 nm. Les spectres d'absorbance de la sonde et de ses deux dérivés dithiolés sont très semblables. Cela est logique, car les thiols additionnés, l'éthanethiol et l'éthyl 2-mercaptoacétate, ne sont pas des groupements chromophores importants. Dans les trois cas, il y a une large bande avec un plateau comme maximum d'absorbance entre 300 nm et 340 nm. Le maximum d'absorbance des maléimides, vers 265 nm, n'est pas observé dans le spectre d'absorbance de la sonde et de ses deux dérivés dithiolés. Ainsi, il semble que la nature électronique des groupements maléimides soit affectée lorsque ceux-ci sont greffés à un coeur aromatique. À titre d'exemple, les spectres d'absorbance de solutions dans le DMF de la 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine (4), de la sonde (6) ayant réagi avec deux équivalents d'éthanethiol (7) et du maléimide (seul) sont présentés aux figures 20, 21 et 22.

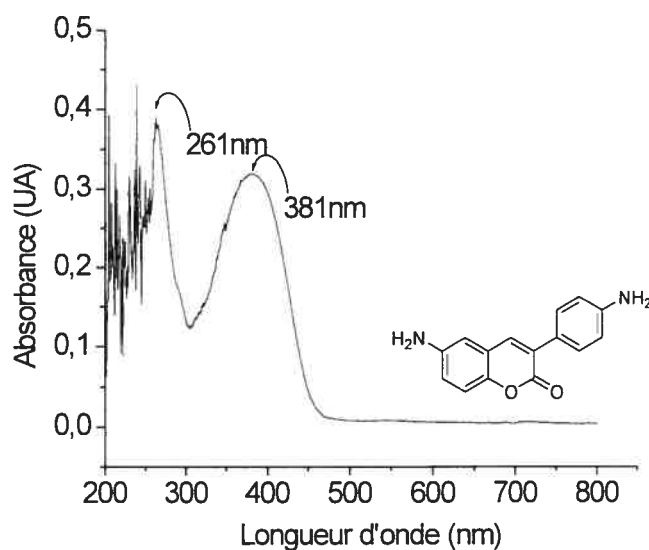


Figure 20: Spectre d'absorbance d'une solution de 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine (4) dans le DMF 100% (1×10^{-4} mol/L).

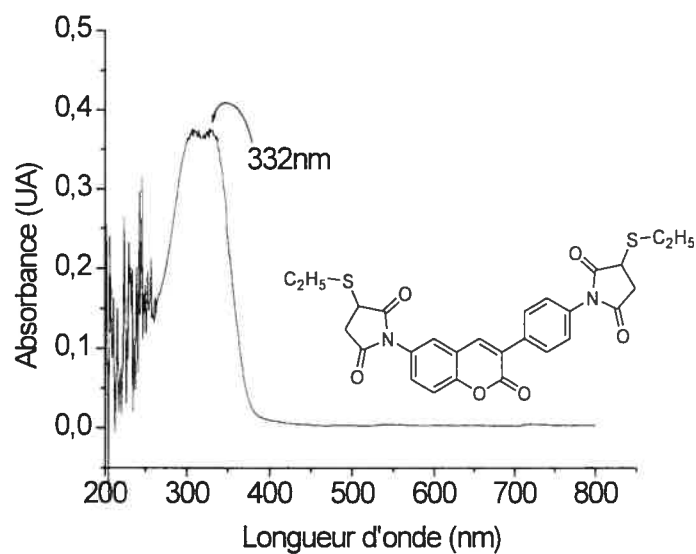


Figure 21: Spectre d'absorbance d'une solution de la 6-(3-éthanesulfanylpyrrolidine-2,5-dione)-3-[4-(3-éthanesulfanylpyrrolidine-2,5-dione)-phényl]coumarine (7) dans le DMF 100% (1×10^{-4} mol/L).

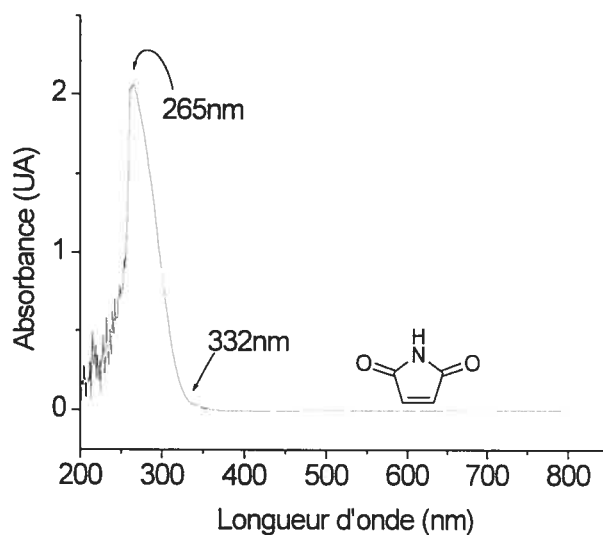


Figure 22: Spectre d'absorbance d'une solution de maléimide dans le DMF 100% (1×10^{-2} mol/L).

Les coefficients d'extinction molaire des molécules à leur longueur d'onde d'absorbance maximale ont ensuite été calculés. Pour ce faire, les absorbances de solutions de différentes concentrations ont été enregistrées. La pente du graphique mettant en relation les absorbances et les concentrations donne la valeur du coefficient d'extinction molaire de la molécule à la longueur d'onde d'observation. (cf équation 1) À titre d'exemple, le graphique utilisé pour déterminer le coefficient d'extinction molaire de la sonde ayant réagi avec deux équivalents d'éthanethiol est présenté à la figure 23. Les résultats obtenus pour les quatre molécules sont résumés dans le tableau 1.

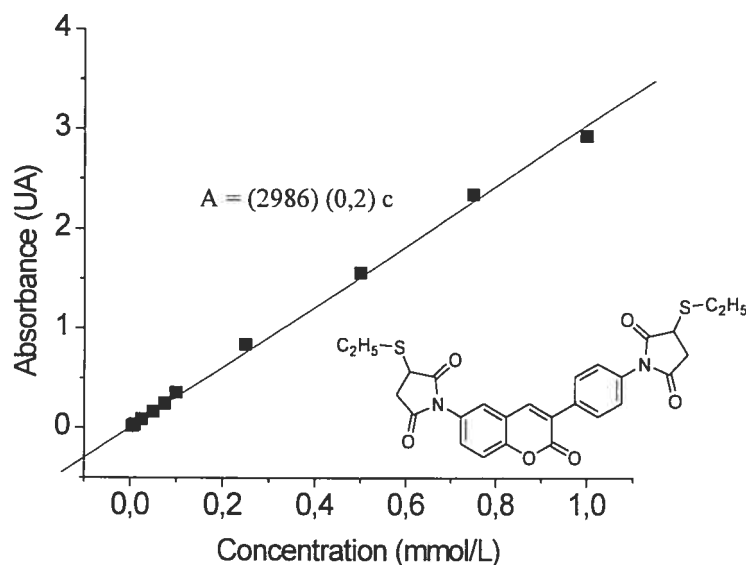
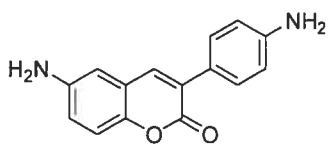
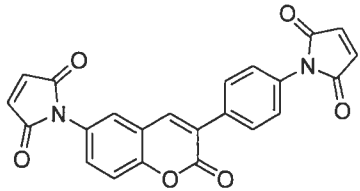
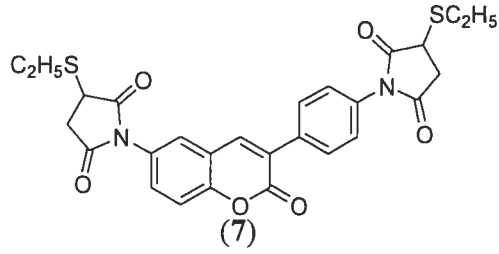
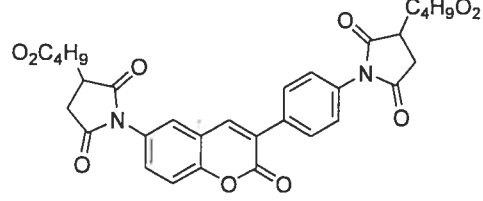
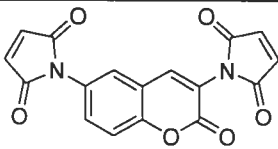


Figure 23: Détermination du coefficient d'extinction molaire de la 6-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-3-[4-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-phényl]-coumarine (7) dans le DMF 100% à 332 nm, soit $14\,930\text{ (mol/L)}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Table 1: Valeurs du coefficient d'extinction molaire de certains composés synthétisés à leur longueur d'onde d'absorbance maximale.

Molécule	$\lambda_{\text{abs max}}$ (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
 <p>(4)</p>	381	15 029
 <p>(6)</p>	332	18 477
 <p>(7)</p>	332	14930
 <p>(8)</p>	332	15882
 <p>Sonde de première génération (cf figure 11)</p>	300	1 422

Les valeurs d'extinction molaire des molécules à leur longueur d'onde d'excitation sont semblables et suffisamment importantes pour que la sonde soit utilisable dans les études de fluorescence proposées. Il semble que l'ajout d'un

groupement phényle sur le coeur de coumarine ait réglé le problème de faible absorbance que présentait la sonde de première génération.

3.4 Caractérisation de la fluorescence des molécules

3.4.1 Détermination des longueurs d'onde d'excitation et d'émission

Les longueurs d'onde d'émission maximale des quatre molécules ont ensuite été déterminées. Pour ce faire, leur émission a été enregistrée à diverses longueurs d'onde d'excitation. Ces longueurs d'onde correspondent à des maxima du spectre d'absorbance des molécules. Dans tous les cas, une seule bande d'émission est observée, ce qui confirme que pour une même molécule, l'émission est indépendante de la longueur d'onde d'excitation. À titre d'exemple, la figure 24 présente l'émission de la sonde ayant réagi avec deux équivalents d'éthanthiol à trois longueurs d'onde d'excitation différentes.

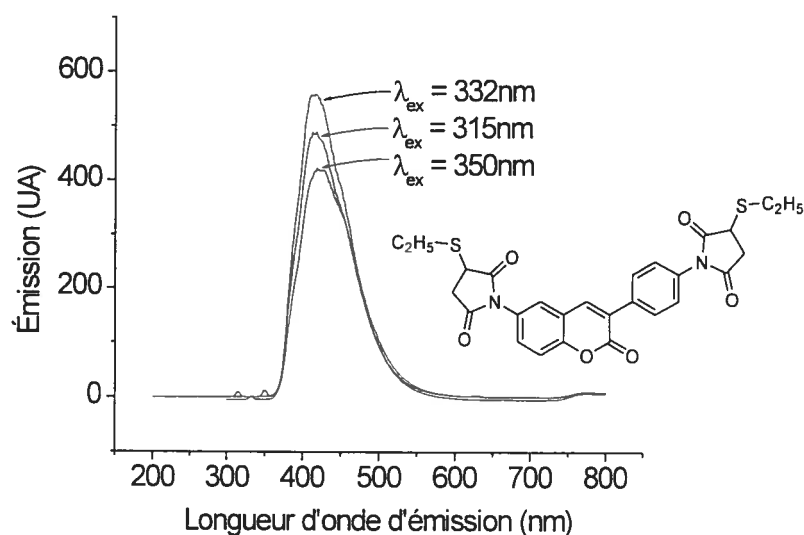


Figure 24: Détermination de la longueur d'onde d'émission maximale d'une solution de 6-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-3-[4-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-phényl]-coumarine (7) dans le DMF 100% (1×10^{-4} mol/L) par l'excitation à 315 nm, 332 nm et 350 nm.

Les trois courbes présentent un maximum à 419 nm et il s'agit donc de la longueur d'onde d'émission maximale. Les petits pics remarquables à 315 nm, 332 nm et 350 nm correspondent à la lumière résiduelle de l'excitation. La longueur d'onde d'excitation menant à l'émission la plus importante a été choisie comme longueur d'onde d'excitation maximale de la molécule. Dans ce cas-ci, il s'agit de celle à 332 nm. Pour confirmer le choix des longueurs d'onde d'excitation, les spectres d'excitation des molécules, c'est à dire leur émission en fonction de la longueur d'onde d'excitation, ont été enregistrés. À titre d'exemple, la figure 25 présente le spectre d'excitation de la sonde ayant réagi avec 2 équivalents d'éthanedithiol. Il est très semblable à son spectre d'absorbance, ce qui est attendu, puisqu'il faut que la molécule ait absorbé de la lumière pour passer à l'état excité et se désactiver via un processus radiatif. Le tableau 2 résume les résultats obtenus pour les quatre molécules.

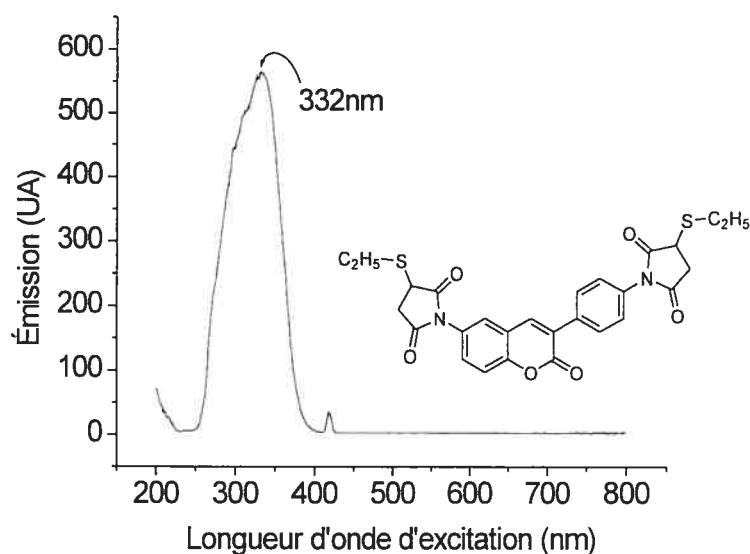
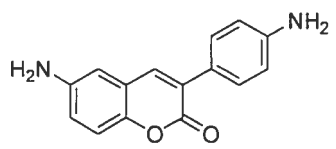
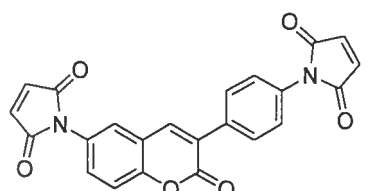
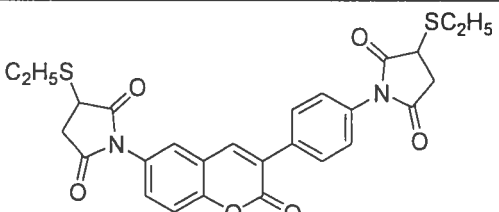
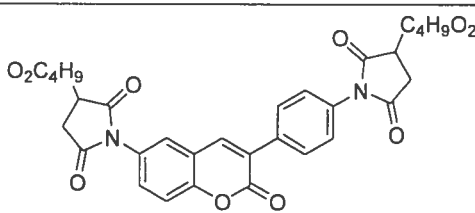
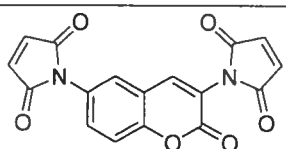


Figure 25: Détermination de la longueur d'onde d'excitation d'une solution de 6-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-3-[4-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5dione)-phényl]-coumarine (7) dans le DMF 100% (1×10^{-4} mol/L) par l'observation de l'émission à 419 nm.

Table 2: Valeurs des longueurs d'onde d'excitation et d'émission des quatre molécules analysées

Molécule	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{émission}}$ (nm)
 <p>(4)</p>	381	539
 <p>(6)</p>	332	419
 <p>(7)</p>	332	419
 <p>(8)</p>	332	419
 <p>Sonde de première génération (cf figure 11)</p>	300	393

La longueur d'onde d'excitation et d'émission de l'intermédiaire diaminé est plus grande que celle des autres molécules. En effet, l'introduction d'un groupement électrodonneur en position 6 ou 7 de la coumarine induit un déplacement vers le

rouge (bathochromic shift) de la longueur d'onde d'excitation, car cela stabilise le transfert de charge lors de l'excitation.⁶⁷ Toutefois, la présence d'un groupement électrodonneur sur la partie pyrone de la coumarine a l'effet contraire et s'oppose à ce déplacement. Ainsi, le déplacement vers le rouge de la longueur d'onde d'excitation serait encore plus important si un groupement électroattracteur et non pas un groupement électrodonneur avait été en position 3 de la coumarine. Par ailleurs, la transformation du groupement amine en maléimide à la position 6 de la coumarine diminue son habilité à donner ses électrons au cycle et c'est pourquoi la longueur d'onde d'excitation de la sonde et de ses deux dérivés dithiolés est davantage vers le bleu. L'addition de thiols sur les groupements maléimides brise l'aromaticité du cycle, mais les azotes peuvent encore délocaliser leurs électrons dans les carbonyles voisins. Ainsi, le caractère donneur des amines n'est pas retrouvé et c'est pourquoi les longueurs d'onde d'excitation des espèces dithiolées sont les mêmes que celle de la sonde. Par ailleurs, l'introduction du groupement phényle augmente le système de délocalisation de la molécule par rapport au coeur de coumarine seul. Cela déplace les longueurs d'onde d'excitation et d'émission vers le rouge, par rapport au coeur de coumarine ne portant pas de substituant phényle, comme c'était le cas dans la sonde de première génération.

3.4.2 Effet de la concentration des solutions sur l'intensité du signal de fluorescence

Les émissions de solutions de différentes concentrations ont été enregistrées afin d'observer l'effet de quench dû à la concentration. Ce phénomène est observé lorsque le signal de fluorescence augmente linéairement en fonction de la concentration sur la plage des faibles concentrations, mais qu'il plafonne et même redescend lorsque les concentrations des espèces en solution deviennent élevées. La figure 26 présente l'intensité du signal de fluorescence de solutions de différentes concentrations de la sonde dithiolée (7). Le signal augmente régulièrement jusqu'à une concentration d'environ $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L, puis l'augmentation du signal diminue

pour finalement atteindre un maximum à une concentration de 5×10^{-4} mol/L. À partir de cette concentration, le signal recommence à diminuer. L'intermédiaire diaminé ainsi que le deuxième dérivé dithiolé présentent ce même effet de « quench » à des concentrations dans le même ordre de grandeur. La fluorescence de la sonde étant très faible, même à de faibles concentrations, l'effet de quench de concentration n'a pas été observé aussi clairement dans son cas que dans le cas des autres molécules. Il est donc important de travailler à des concentrations inférieures à 5×10^{-4} mol/L afin d'obtenir un signal de fluorescence maximal.

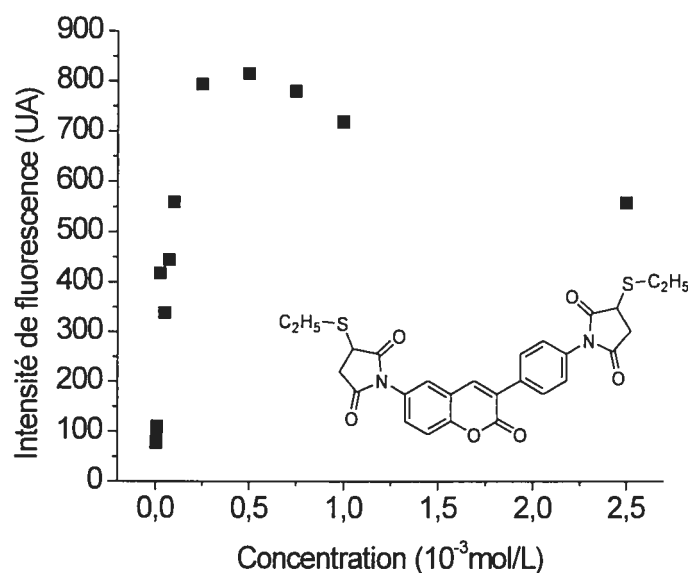


Figure 26: Observation de l'effet de quench dû à la concentration de solutions de 6-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-3-[4-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-phényl]-coumarine (7) dans le DMF 100%.

3.4.3 Calcul des rendements quantiques de fluorescence

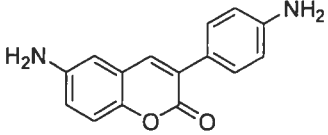
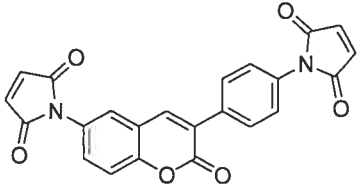
Les rendements quantiques de fluorescence du 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine (4), de la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) et des deux dérivés dithiolés de la sonde (7 et 8) ont été calculés. Pour ce faire, leur émission a été comparée avec l'émission de la fluoresceine à la longueur d'onde d'excitation du fluorogène selon l'équation 3 présentée précédemment. (cf section 3.1.2) Les concentrations des solutions de fluorogène et de la référence sont ajustées de façon à présenter une absorbance similaire à la longueur d'onde d'excitation du fluorogène. Les rendements quantiques de fluorescence ont été calculés avec des solutions d'absorbances différentes et les résultats obtenus sont très près les uns des autres. La plage des absorbances utilisables est cependant restreinte, car la fluoresceine a une émission très importante en fluorescence et son signal plafonne (est plus grand que 1000 UA) dès que l'absorbance de la solution est supérieure à 0,2 UA (environ 1×10^{-4} mol/L à 381 nm).

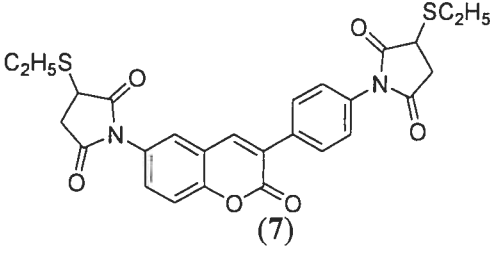
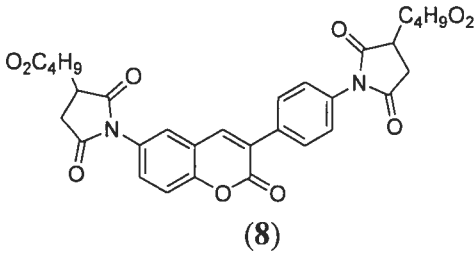
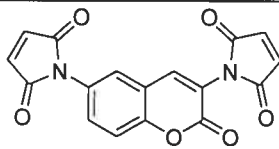
Table 3: Données menant au calcul du rendement quantique de fluorescence de la 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine (4) dans le DMF 100% en utilisant des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de respectivement 332nm et 419nm.

Molécule	Concentration des solutions (mol/L)	Absorbance à 381nm (UA)	Aire sous le pic d'émission (UA ²)	Rendement quantique de fluorescence
Diaminée (4)	1×10^{-5}	0,176	2 217	0,071
Référence	$9,9 \times 10^{-5}$	0,186	29 614	
Diaminée (4)	$7,5 \times 10^{-6}$	0,109	1 527	0,072
Référence	$6,1 \times 10^{-5}$	0,117	20 248	
Diaminée (4)	$5,0 \times 10^{-6}$	0,071	1 064	0,071
Référence	$4,1 \times 10^{-5}$	0,080	14 261	
Moyenne et écart-type				$0,071 \pm 0,001$

Les rendements quantiques ainsi calculés ne sont toutefois pas très exacts. Ils sont plutôt une bonne indication de l'importance de la fluorescence par rapport aux autres processus de désactivation des molécules analysées. En effet, les solutions n'ont pas été dégazées avant les analyses. Puisque l'oxygène est un très bon désactivateur, il est possible que les rendements quantiques de fluorescence calculés soient moins importants que les rendements réels. Par ailleurs, la fluoresceine n'émet pas à la même longueur d'onde que les molécules d'intérêt. Or, le détecteur peut ne pas être aussi sensible à toutes les longueurs d'onde d'émission et les émissions n'ont pas été corrigées pour éliminer ce facteur. Finalement, la différence entre les absorbances des solutions de la molécule d'intérêt et de celles de référence, un écart d'environ 7%, entraîne certainement une incertitude sur les valeurs de rendement quantique déterminées. En effet, si la solution de référence absorbe davantage de lumière que la solution d'analyte, son émission est plus importante et la valeur du rendement quantique de fluorescence est affectée à la baisse.

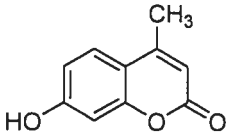
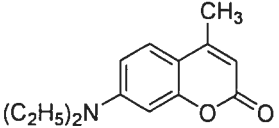
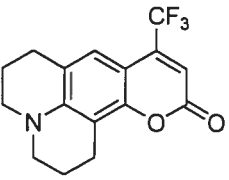
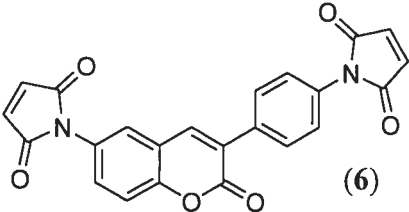
Table 4: Valeurs moyennes des rendements quantiques de fluorescence dans le DMF des quatre molécules d'intérêt.

Molécule	ϕ_{fluo}
 <p>(4)</p>	0,071 ± 0,001
 <p>(6)</p>	0,006 ± 0,002

Molécule	ϕ_{flu0}
 <p>(7)</p>	0,21 ± 0,02
 <p>(8)</p>	0,13 ± 0,04
 <p>Sonde de première génération (cf figure 11)</p>	0,0024 ⁴⁴

Le rendement quantique de fluorescence de la 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine (4) n'est pas excellent, car il est très loin de l'unité. Il peut toutefois être expliqué en le comparant avec quelques valeurs de rendements quantiques de fluorescence retrouvées dans la littérature.

Table 5: Comparaison de la fluorescence de trois molécules connues en littérature⁶⁶ avec celle de l'intermédiaire 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine (4).

Molécule	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{émission}}$ (nm)	ϕ_{fluo}
	320	385	0,21
	353	450	0,73
	421	531	0,38
	381	539	0,071

On constate que l'introduction d'un groupement électrodonneur sur la partie benzénique de la coumarine induit la fluorescence. Celle-ci est d'autant plus importante que le groupement est un électrodonneur puissant. Ainsi, la présence de l'amine en position 6 de la coumarine induit une fluorescence, mais puisque ce groupement amino n'est pas alkylé, le rendement quantique de fluorescence n'est pas aussi important que celui de la 7-diéthylamino-4-méthylcoumarine. Un facteur contribuant à diminuer le rendement quantique de fluorescence du composé 4 est la présence du groupement phényle en position 3 de la coumarine. En effet, il introduit une possibilité de rotation dans la molécule, ce qui diminue la valeur du rendement quantique de fluorescence, car la rotation augmente la probabilité que la molécule se désactive via un processus non-radiatif.

Par ailleurs, la sonde portant les groupements maléimides a un très faible rendement quantique de fluorescence, ce qui était attendu puisque les maléimides jouent le rôle de désactivateurs intramoléculaires.^{22,37,39,41} Le rendement quantique de fluorescence a ainsi chuté d'un ordre de grandeur par rapport à l'intermédiaire diaminé. De plus, ce rendement est probablement sur-évalué, car l'émission de la molécule se confondait facilement avec le bruit de fond de l'appareil. Ce bruit de fond est d'environ une unité arbitraire de fluorescence, alors que la fluorescence maximale de la molécule est d'environ deux UA. Le rendement quantique de fluorescence calculé pour notre sonde n'est donc pas très exact, mais il indique que la fluorescence de la molécule n'est plus significative suite à l'introduction des groupements maléimides.

La dithiolation de la sonde a permis de régénérer la fluorescence du coeur de coumarine comme le montre les valeurs des rendements quantiques de fluorescence des deux dérivés dithiolés. Ces molécules ont une fluorescence au moins vingt à trente fois plus importante que celle de la sonde, ce qui est excellent pour l'élaboration d'un système de type interrupteur ouvert ou fermé. D'autre part, les rendements quantiques de fluorescence des dérivés dithiolés sont du même ordre de grandeur que ceux de l'intermédiaire diaminé.

Afin de visualiser l'importance de la différence entre la fluorescence de la sonde et celles des dérivés dithiolés, un graphique de l'émission des trois molécules pour des solutions de même concentration a été tracé. L'émission de l'intermédiaire diaminé n'a pas été rapportée sur ce graphique, car ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont différentes de celles des trois autres molécules.

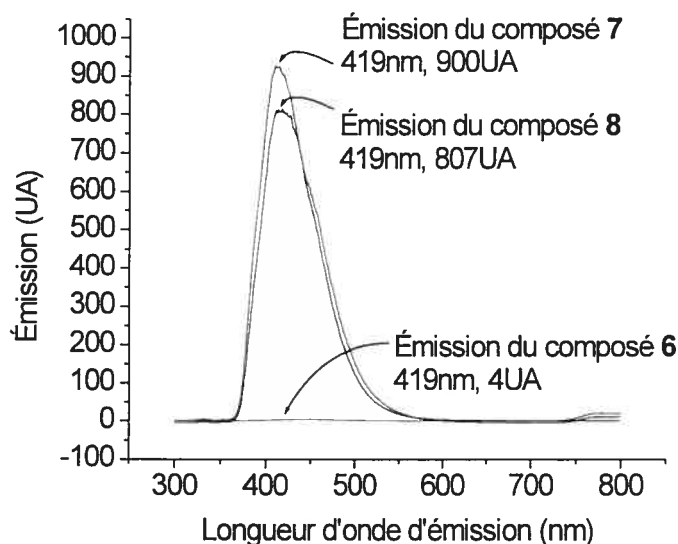


Figure 27: Comparaison de l'émission de solutions de la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (**6**) et des deux dérivés dithiolés (**7** et **8**) dans le DMF 100% (5×10^{-4} mol/L) à une longueur d'onde d'excitation de 332nm et d'émission de 419nm.

3.5 Conclusion

Les études spectroscopiques ont d'abord permis de déterminer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission maximales de la sonde dithiolée, soient respectivement de 332nm et 419nm. Elles ont également démontré que la sonde est très peu fluorescente, avec un rendement quantique d'environ 0,006. La dithiolation de la sonde permet l'obtention d'espèces très fluorescentes ayant un rendement quantique de fluorescence au moins vingt fois plus important que celui de la sonde. Cela prouve que le système élaboré peut être utilisé comme sonde fluorescente de type interrupteur ouvert ou fermé. D'autre part, il a été déterminé que la sonde doit être utilisée dans un milieu de concentration inférieure à 5×10^{-4} mol/L afin d'obtenir un signal qui ne soit pas affecté par un effet de quench dû à la concentration.

CHAPITRE 4

CINÉTIQUES CHIMIQUES

4.1 Généralités

Avant de faire réagir la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) avec des protéines, la réaction de la sonde avec des petites molécules thiolées a d'abord été effectuée. L'éthanethiol et l'éthyl 2-mercaptoacétate ont été utilisés pour effectuer ces réactions modèles. La cinétique de ces réactions a été étudiée afin, d'une part, d'identifier l'étape limitante de la réaction et d'en améliorer la compréhension du mécanisme. D'autre part, l'étude de l'effet du pH sur la vitesse de la réaction a été effectuée dans le but de déterminer la nature de l'espèce réactive, c'est-à-dire, soit le thiol ou l'anion thiolate. De plus, elle a permis de s'assurer que la réaction est compatible avec la plage de pH retrouvés en milieu *in vivo*, soit des pH à peu près neutres. De plus, puisqu'il n'est pas possible d'effectuer la réaction entre la sonde et des protéines dans un milieu comportant plus de 10% de solvant organique, cette étude a permis de déterminer les conditions aqueuses optimales pour les tests protéiques. L'effet de la température sur la vitesse de la réaction a également été étudiée pour confirmer que la vitesse de la réaction est cohérente avec une plage de températures autour de 37 °C. Finalement, le rendement de la réaction entre la sonde et un thiol a été évalué en comparant l'émission du milieu réactionnel une fois la réaction avec de l'éthanethiol complétée et celle d'une solution du produit dithiolé (7).

Les cinétiques chimiques ont été effectuées dans le DMF pur. Il est impossible d'effectuer des tests protéiques dans un milieu complètement organique. Ainsi, les résultats obtenus ne sont pas nécessairement représentatifs de la cinétique de la réaction entre la sonde et des protéines en milieu aqueux et donc en milieu

physiologique. Seule l'étude de l'influence du pH sur la vitesse de la réaction a été effectuée dans des conditions semblables à celles utilisées pour les tests protéiques, soit un milieu aqueux contenant 10% de DMF. D'autre part, toutes les études ont été réalisées à 25°C, sauf celle de l'influence de la température sur la vitesse de la réaction.

L'avancement des réactions a été suivie par l'apparition d'un signal de fluorescence, correspondant à l'apparition du produit dithiolé. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission choisies sont respectivement de 332 nm et de 419 nm. Des mesures de l'intensité de fluorescence ont été enregistrées à toutes les demi-minutes pour des périodes variant de 20 à 120 minutes. Ces périodes se sont avérées suffisamment longues pour observer un plateau dans l'intensité du signal de fluorescence indiquant que les réactions étaient complétées.

4.2 Détermination de l'étape limitante de la réaction modèle

L'étape limitante de la réaction entre la sonde et deux équivalents de thiol a été déterminée. Si la première étape est limitante, il ne devrait pas y avoir d'accumulation de l'intermédiaire monothiolé. Si la deuxième étape s'avère limitante, il est possible que dans certaines conditions réactionnelles, la réaction s'arrête à la formation de l'intermédiaire monothiolé. La sonde perdrait alors toute son utilité, car une absence de fluorescence ne signifierait pas une absence d'interaction protéique. Elle signifierait uniquement une absence de réaction avec un deuxième équivalent de thiol positionné adéquatement dans l'espace ou non. La réaction de la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (**6**) avec un thiol est schématisée à la figure 28. Dans un premier temps, la sonde réagit avec un équivalent de thiol pour former un intermédiaire monothiolé. Cet intermédiaire réagit ensuite avec le deuxième équivalent de thiol pour former le produit dithiolé fluorescent.

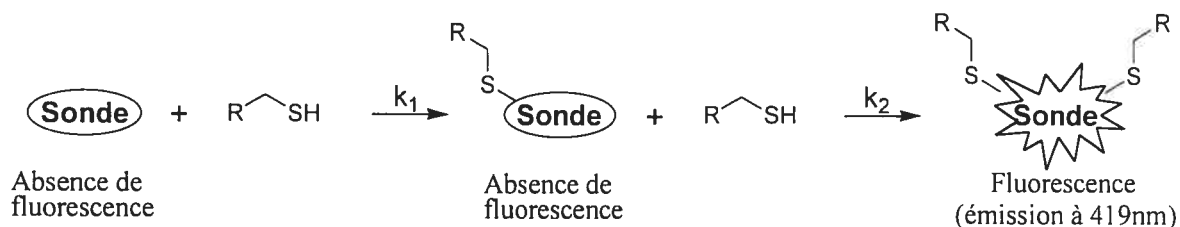


Figure 28: Schéma de la réaction modèle entre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (**6**) et un thiol.

Il est logique de penser que les deux étapes de la réaction sont des réactions bimoléculaires. L'équation de vitesse de l'étape limitante pourrait donc être exprimée par l'une des deux équations suivantes :

$$v_{\text{première étape}} = k_1[\text{sonde}][\text{thiol}]$$

$$v_{\text{deuxième étape}} = k_2[\text{sonde monothiolée}][\text{thiol}]$$

Si la deuxième étape est l'étape limitante, on peut également exprimer la vitesse de la réaction globale par l'équation suivante :

$$v_{\text{apparente}} = k_{\text{obs}} [\text{sonde}][\text{thiol}][\text{thiol}] = k_{\text{obs}} [\text{sonde}][\text{thiol}]^2$$

En mesurant la vitesse de la réaction globale à différentes concentrations de thiol et en gardant la concentration de la sonde constante, il est possible de déterminer laquelle des deux étapes est l'étape limitante de la réaction. En effet, si la première étape est l'étape lente, la vitesse de la réaction globale est fonction directe de la concentration du thiol. Si la deuxième étape est l'étape lente, la vitesse de la réaction globale est fonction du carré de la concentration du thiol. Cela peut être observé sur un graphique mettant en relation la vitesse de la réaction en fonction de la concentration du thiol dans le milieu.

Ainsi, de un à quatre équivalents d'éthanethiol ont été ajoutés à une solution (1×10^{-4} mol/L) de 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (**6**) dans le DMF 100% à 25 °C. Les intensités de fluorescence ont été enregistrées à chaque 30 secondes sur une période d'une demi-heure. Ces réactions ont été effectuées en triplicata. La variation du signal de fluorescence en fonction du temps dans les premiers 10% des réactions correspond à la vitesse des réactions. Les vitesses des réactions ont été déterminées et placées sur un graphique en fonction de la concentration du thiol dans le milieu réactionnel. Le caractère très volatil de l'éthanethiol accroît l'incertitude sur les résultats obtenus, d'où l'importance d'effectuer les mesures à plusieurs reprises. À titre d'exemple, la figure 29 présente la cinétique de la réaction entre la sonde et quatre équivalents d'éthanethiol effectuée en triplicata. L'écart entre les différentes valeurs de vitesse déterminées est d'environ 30%. Malgré cette imprécision sur les vitesses de réaction déterminées, il a été possible de conclure que la vitesse des réactions est directement proportionnelle à la concentration du milieu en thiol et donc que la première étape de la réaction est l'étape limitante. Le graphique de la figure 30 présente une droite et non pas une courbe attribuable à une équation quadratique. Le coefficient de linéarité de la droite est de 0,96, près de un, ce qui confirme que la relation entre la vitesse et le nombre d'équivalents de thiol est bien directement proportionnelle.

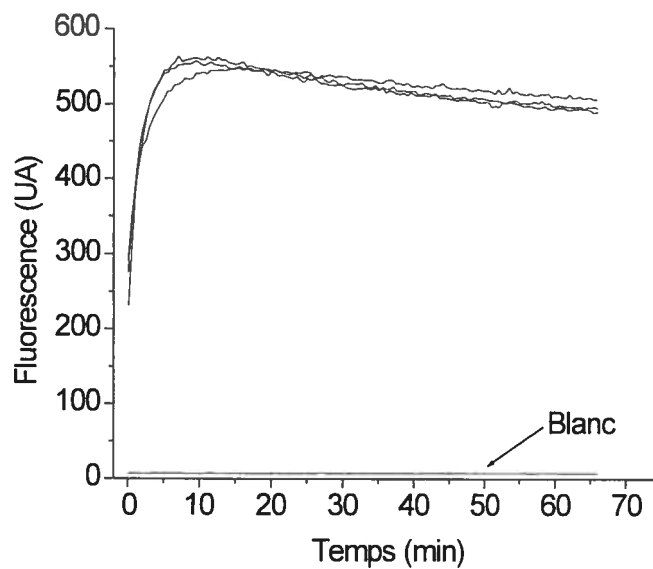


Figure 29: Cinétique de la réaction entre la sonde (6) en solution dans le DMF 100% (10^{-4} mol/L) et quatre équivalents d'éthanethiol (4×10^{-4} mol/L) effectuée en triplicata.

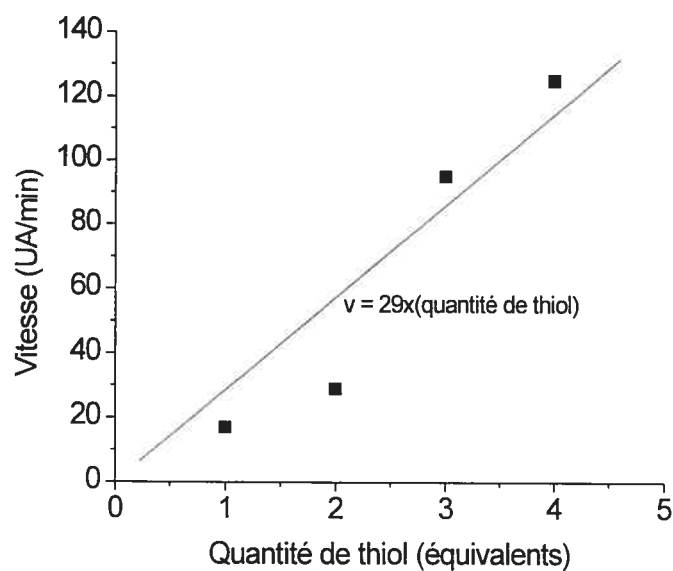


Figure 30: Détermination de l'étape limitante de la réaction entre la sonde (6) et l'éthanethiol.

Afin de contourner le problème d'évaporation de l'éthanethiol, le 2-mercaptoacétate d'éthyle a été utilisé dans la détermination de l'étape limitante de la réaction. Ce thiol a un point d'ébullition de 54°C sous une pression réduite de 12mm Hg⁶⁷ et il ne s'évapore donc pas de façon significative à la température ambiante. Les réactions entre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (**6**) et des quantités de 0,5 à 4 équivalents de 2-mercaptoacétate d'éthyle ont été effectuées. Cependant, la réaction s'est avérée trop rapide pour être observée adéquatement à l'aide d'un spectrofluorimètre usuel. En effet, la réaction est terminée quelques secondes à peine après la mise en présence du thiol et de la sonde. Afin de contrer ce problème, la température du milieu a été abaissée à 10°C, mais même dans ces conditions, la vitesse de la réaction est encore trop importante pour être analysée quantitativement. Cela s'explique par le fait que le proton de la fonction thiol de l'éthyl 2-mercaptoacétate est beaucoup plus acide que celui de l'éthanethiol. Les pK_a des deux espèces, soient 10,35 pour l'éthanethiol⁶⁸ et 7,91 pour le 2-mercaptoacétate d'éthyle⁶⁸, le confirme. Plus la nature anionique du thiol est importante, plus la réaction d'attaque nucléophile est favorisée. Le 2-mercaptoacétate d'éthyle n'est donc pas un choix adéquat pour déterminer l'étape lente de la réaction entre la sonde et un thiol.

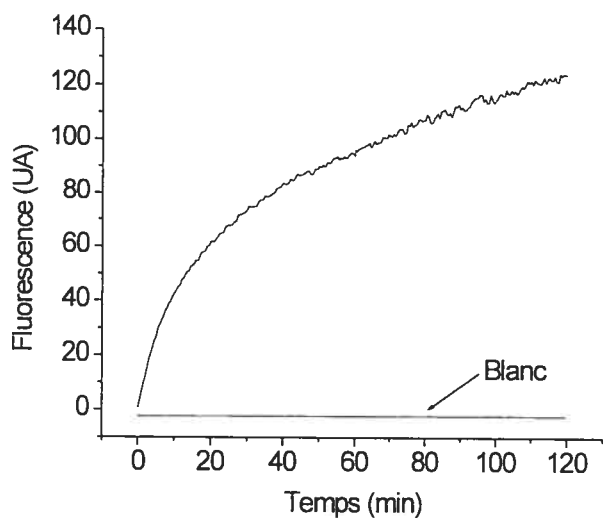
Un thiol moins volatil que l'éthanethiol et ayant un pK_a supérieur à celui du 2-mercaptoacétate d'éthyle serait un meilleur choix dans la caractérisation de la réaction modèle. La cystéine protégée ou le glutathion (γ -L-glutaminy-L-cystéinyglycine) pourraient s'avérer des choix pertinents puisque d'une part, leur pK_a est autour de 8,37⁶⁹ et que ce sont des solides à température ambiante. D'autre part, leur réactivité est nécessairement plus près de celle des résidus cystéines d'une protéine que ne l'est celle des petits thiols utilisés dans cette étude. Par contre, pour des raisons d'accessibilité des réactifs, les réactions avec l'éthanethiol et le 2-mercaptoacétate d'éthyle ont d'abord été tentées. Par la suite, le manque de temps a empêché de refaire les expériences précédentes avec le glutathion ou la cystéine protégée.

La réaction entre la sonde et un nombre variable d'équivalents d'éthanethiol a permis de conclure que l'étape limitante de la réaction est l'addition d'une première molécule thiolée sur la sonde. Ce résultat est cohérent avec ce qui avait été observé lors de la synthèse en laboratoire du dérivé dithiolé de la sonde. En effet, l'intermédiaire monothiolé n'avait pas été observé par CCM lors de la réaction entre la sonde et un grand excès d'éthanethiol. Cela laissait croire que la première étape de la réaction était l'étape limitante.

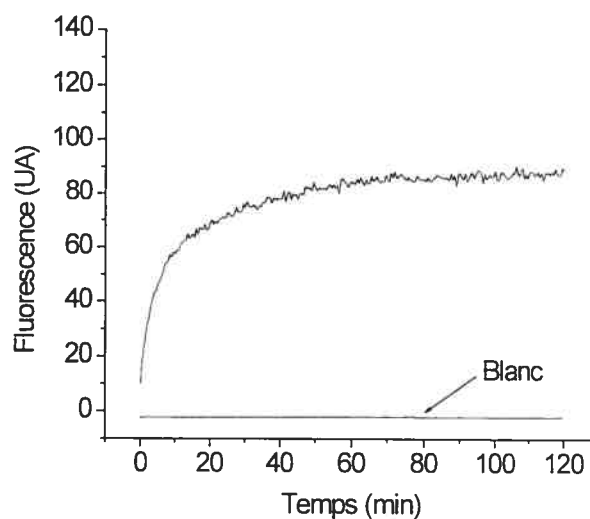
4.3 Effet du pH sur la vitesse de la réaction modèle

L'effet du pH sur la vitesse de la réaction entre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (**6**) avec l'éthanethiol a été étudié qualitativement. Pour se faire, un très grand excès d'éthanethiol a été placé en présence de la sonde de façon à ce que la cinétique observée soit une cinétique de pseudo premier ordre. L'évaporation de l'éthanethiol a empêché l'obtention de résultats quantitatifs quant à la vitesse de la réaction, mais elle n'a pas été assez importante pour empêcher de tirer des conclusions qualitatives. La réaction a été effectuée à cinq pH différents, soient 5,5, 6,8, 7,5, 8,5, 9,5 et 10,5. Différents tampons ont été utilisés pour obtenir la plage de pH désirée. Il s'agit pour la plupart de dérivés de l'acide sulfonique, soient le MES, le CHES, le MOPS et le CAPS. Seul le TRIS est un dérivé hydroxylé de l'aminométhane et non pas un dérivé de l'acide sulfonique. Dans tous les cas, la concentration du tampon est de 25mM.

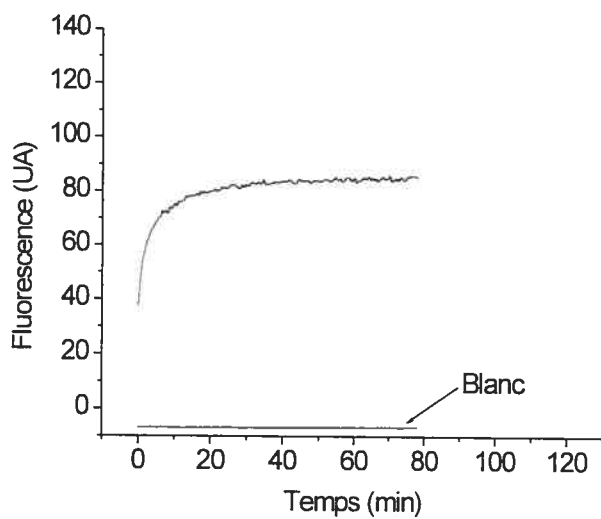
Il a d'abord été vérifié que ces tampons n'absorbaient pas dans la région de 332 nm et n'émettaient pas autour de 419 nm. Ensuite, la sonde a été solubilisée dans le DMF 100% avant d'être placée dans le tampon au pH désiré. Le thiol en solution dans le DMF 100% a été ajouté de façon à ce que la proportion de solvant organique dans le milieu soit de 10%. Les courbes des cinétiques à différents pH sont présentées à la figure 31, alors que les constantes de vitesse de pseudo premier ordre à différents pH ont été rapportés à la figure 32.



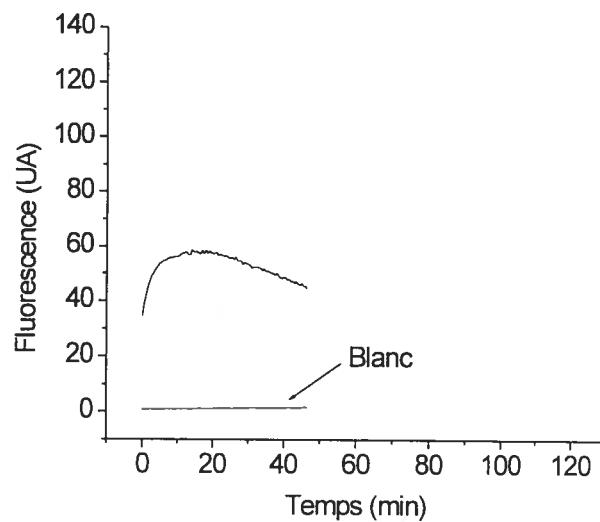
pH = 5,5



pH = 6,8



pH = 7,5



pH = 8,5

Figure 31: Courbes des cinétiques de la réaction entre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (**6**) (1×10^{-4} mol/L) et l'éthanthiol (2×10^{-3} mol/L) dans le DMF 10% pour des pH allant de 5,5 à 9,5.

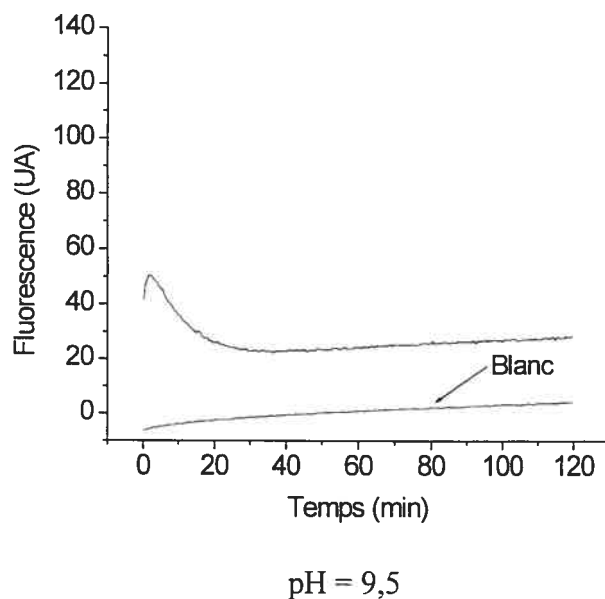


Figure 31: Courbes des cinétiques de la réaction entre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (**6**) (1×10^{-4} mol/L) et l'éthanethiol (2×10^{-3} mol/L) dans le DMF 10% pour des pH allant de 5,5 à 9,5.

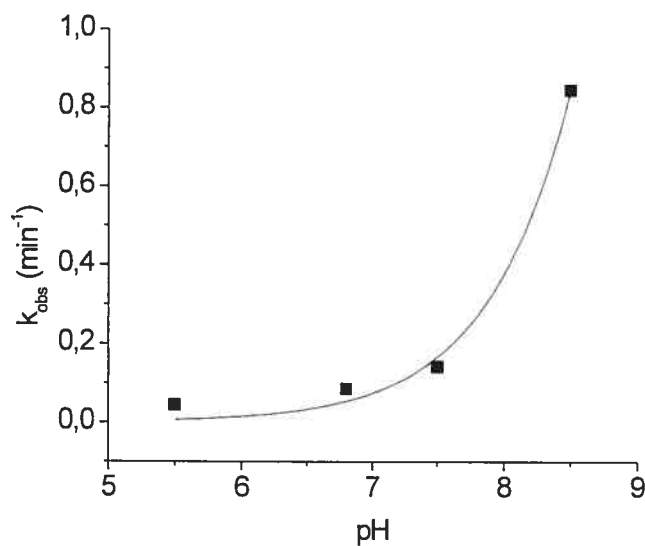


Figure 32: Influence du pH sur la constante de vitesse de pseudo premier ordre de la réaction entre la sonde (**6**) (1×10^{-4} mol/L) et l'éthanethiol (2×10^{-3} mol/L) en solution aqueuse (10% DMF).

Plus le pH du milieu réactionnel est élevé, plus la concentration de l'anion thiolate est importante. L'augmentation de la vitesse de la réaction avec l'augmentation du pH, observée sur le graphique de la figure 32, implique que le thiolate est l'espèce réactive. Une valeur maximale de la vitesse de la réaction aurait d'ailleurs été obtenue et aurait plafonné si le pH du milieu réactionnel avait été élevé au-delà du pK_a de l'éthanethiol, soit au-delà de 10,5. En effet, à ces pH, le thiol aurait existé complètement sous sa forme déprotonnée et le pH n'aurait donc plus été un facteur déterminant dans la cinétique de la réaction. Il n'a cependant pas été possible de mesurer la vitesse de la réaction à de tels pH, car la réaction de formation du composé dithiolé était trop rapide et il y a une décomposition rapide du produit réactionnel aussitôt ce dernier formé. Le profil pH-vitesse de la réaction, c'est-à-dire le graphique mettant en relation le logarithme de la constante de vitesse observée en fonction du pH, aurait présenté une pente positive suivi d'un plateau. Le pH correspondant au changement de la pente aurait correspondu au pK_a du thiol.

On constate par ailleurs, que les « blancs » des réactions, c'est-à-dire des solutions ne contenant que la sonde, ne présentent pas des intensités de fluorescence semblables à tous les pH. En effet, aux pH inférieurs à 8,5, l'émission des blancs est constante en fonction du temps et est très faible, soit moins de 1% de la fluorescence maximale. Toutefois, les blancs des solutions aux pH de 8,5 et de 9,5, présentent une intensité de fluorescence qui augmente en fonction du temps. De plus, cette émission peut être de plusieurs unités de fluorescence. L'hypothèse proposée est que les groupements maléimides de la sonde s'hydrolysent en milieu basique de façon à ce que les cycles s'ouvrent pour former le diacide maléamique. Le diacide étant fluorescent, l'intensité de l'émission de la solution augmente en fonction de l'hydrolyse de la sonde, et donc en fonction du temps.

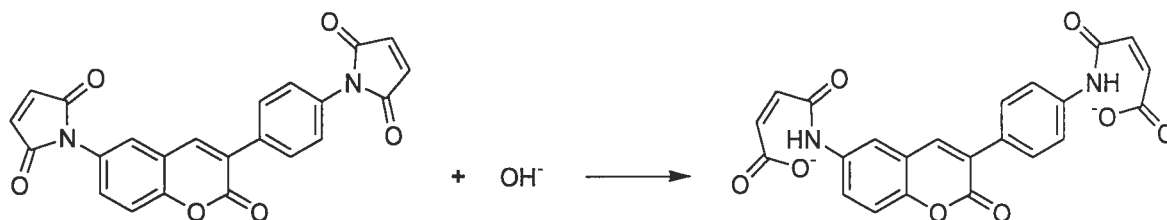


Figure 33: Schéma de l'hydrolyse des groupements maléimides de la sonde (6) en milieu basique.

D'autre part, on constate qu'aux pH élevés, l'intensité de fluorescence atteint une valeur maximale, puis redescend lentement. Cette baisse de fluorescence est due à une réaction parasite qui décompose le produit dithiolé à ces valeurs de pH. Cette réaction mènerait au produit monothiolé par l'élimination d'un équivalent d'éthanethiol, tel que présenté à la figure 34.

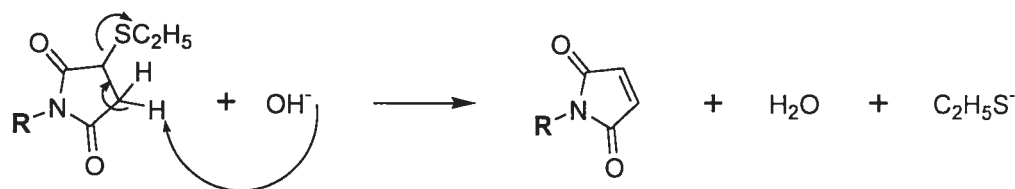


Figure 34: Élimination d'un équivalent d'éthanethiol aux pH basiques. R = 6-maléimido-3-phénylcoumarine ou 3-(4-maléimidophényl)-coumarine.

Ainsi, la deuxième étape de la réaction serait réversible et l'équilibre serait déplacé vers les réactifs avec l'augmentation du pH. Puisque la première étape de la réaction est semblable à la deuxième, cette première étape serait également réversible. La position de l'équilibre dépendrait de la concentration de l'espèce OH^- dans le milieu réactionnel et donc du pH. C'est ce qui est représenté à la figure 35.

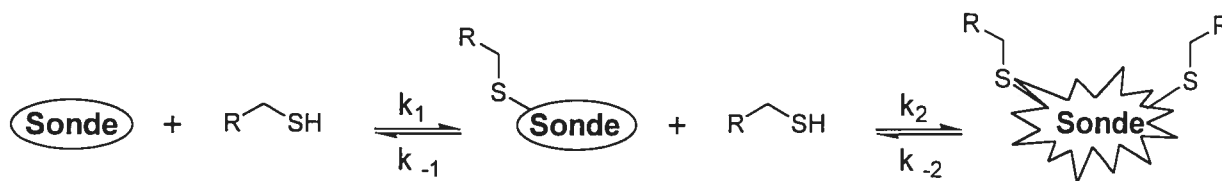


Figure 35: Schéma de la réaction modèle entre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (**6**) et un thiol tenant compte de la réversibilité de chacune des étapes.

Dans le but de confirmer cette hypothèse, un excès de thiol a été ajouté à la réaction lorsqu'une perte de fluorescence était observée, après environ 60 minutes de réaction. Cet ajout avait pour but de pousser l'équilibre réactionnel vers la formation du produit dithiolé et de causer une réaugmentation de l'intensité de la fluorescence. La valeur de fluorescence alors obtenue ne devrait cependant pas dépasser la valeur maximale correspondant à 100% de réaction ayant atteinte en début de réaction. La hauteur des plateaux est déterminée par la position de l'état d'équilibre atteint par le système après le premier et le deuxième ajout de thiol. Si la réaction de décomposition du produit réactionnel ne mène pas à l'intermédiaire monothiolé, l'ajout d'un portion supplémentaire de thiol ne devrait pas causer une augmentation de l'intensité du signal de fluorescence.

Pour se faire, la sonde a été solubilisée dans le DMF avant d'être placée dans le tampon au pH désiré. Quatre équivalents de thiol ont ensuite été ajoutés au milieu de façon à ce que la proportion de solvant organique dans le milieu soit de 10%. Comme il sera discuté dans la section 4.5, l'ajout de deux équivalents de thiol sont suffisants pour obtenir 100% de réaction, mais l'évaporation de l'éthanthiol a justifié l'utilisation d'un excès de thiol. Les mesures ont été enregistrées à toutes les trente secondes sur une période de trois heures. Après 120 minutes, une seconde portion de thiol, soit quatre équivalents, a été ajoutée au milieu réactionnel. La courbe obtenue est présentée à la figure 36.

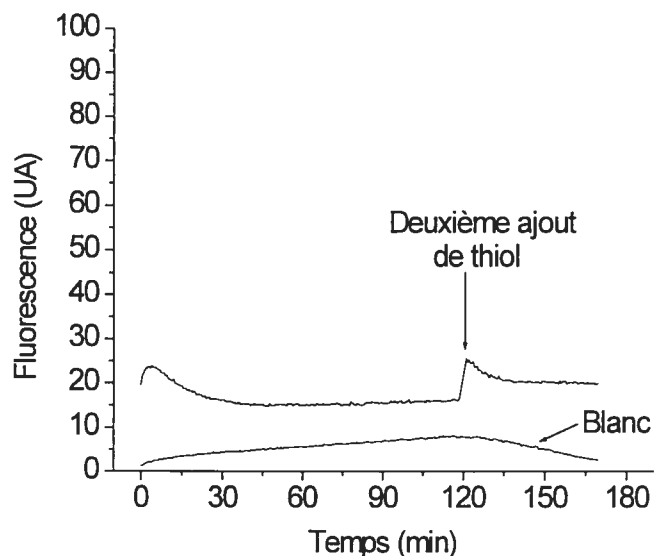


Figure 36: Observation de la réversibilité de la réaction entre la sonde (6) (1×10^{-4} mol/L) et l'éthanethiol (4×10^{-4} mol/L) en solution aqueuse (10% DMF) à un pH de 9,5.

Ces expériences ont confirmé que la réaction parasite décomposant le produit réactionnel était bien l'élimination d'un équivalent d'éthanethiol pour mener à l'intermédiaire monothiolé. En effet, une augmentation de la fluorescence jusqu'à la valeur maximale atteinte en début de réaction a été observée suite à l'ajout d'une portion supplémentaire de thiol. Une fois cette valeur atteinte, la fluorescence a rediminué pour finalement atteindre un plateau indiquant l'atteinte de l'équilibre entre la formation du thiol et la décomposition de produit réactionnel. D'autre part, il n'est pas aisément possible de déterminer si la réaction d'élimination mène à une accumulation de l'intermédiaire monothiolé ou au composé non thiolé (la sonde 6), car les deux molécules ne sont pas fluorescentes.

Ainsi, il est préférable d'effectuer la réaction à un pH supérieur à 7 afin de minimiser le temps de réaction. À ce pH, la réaction est complétée (le plateau d'émission de fluorescence est atteint) en 20 minutes environ. Cependant, il est préférable de maintenir un pH inférieur à 8,5 afin de minimiser la réaction

d'élimination qui décompose le produit dithiolé. C'est pourquoi lors des tests protéiques les réactions ont été effectuées dans le tampon MOPS à une concentration de 25mM et à un pH de 7,5.

Par ailleurs, la réversibilité de la réaction entre la sonde et un thiol aux pH élevés serait très intéressante dans le cas où la sonde serait utilisée pour la purification de protéines. En effet, les protéines d'intérêt pourraient réagir avec la sonde greffée à un support solide, avant d'être purifiées et décrochées du support solide par simple augmentation du pH du milieu. De plus, plusieurs protéines ne se dénaturent pas à des pH autour de 8,5, ce qui indique que l'étape d'élution de la protéine purifiée n'altérerait pas leurs structures tridimensionnelles.

4.4 Effet de la température sur la vitesse de la réaction

L'effet de la température sur la vitesse de la réaction modèle de la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) avec l'éthanethiol a aussi été étudié. Les conditions réactionnelles ont été ajustées afin que le thiol soit en très grand excès de façon à observer une cinétique de pseudo premier ordre.

Pour se faire, la sonde a été solubilisée dans le DMF et la solution a été placée dans un bain thermostaté afin de l'amener à la température désirée. Il a été fait de même avec la solution de thiol dans le DMF. Après quelques minutes, le thiol a été ajouté à la solution contenant la sonde et la réaction a été suivie par fluorescence. La réaction a été effectuée à quatre températures différentes, soient 10 °C, 20 °C, 30 °C et 40 °C. Les résultats obtenus sont représentés à la figure 37.

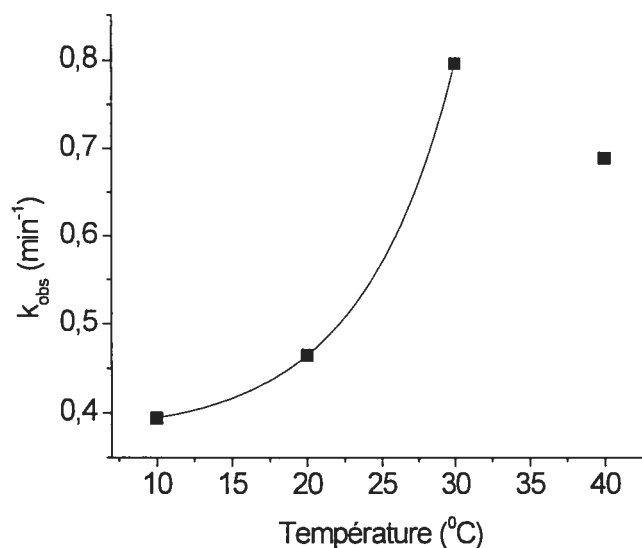


Figure 37: Effet de la température sur la valeur de la constante de vitesse de pseudo premier ordre de la réaction entre la sonde (6) (1×10^{-4} mol/L) et l'éthanethiol (2×10^{-3} mol/L) dans le DMF 100%.

Comme prévu, la vitesse de la réaction augmente avec la température du milieu réactionnel. La valeur de la constante de vitesse obtenue pour une température de 40 °C n'est pas cohérente avec les autres résultats, car à cette température, l'évaporation de l'éthanethiol devient très importante. D'après les résultats obtenus, à la température du corps humain, la réaction de la sonde avec un très grand excès de thiol devrait être complétée en moins de 20 minutes. La température n'est donc pas un facteur limitant dans l'application de la sonde développée dans l'analyse des interactions protéiques *in vivo*.

4.5 Estimation de l'efficacité de la réaction

Le rendement de la réaction entre la sonde et des thiols a été estimé afin d'évaluer l'efficacité de l'outil développé. Pour se faire, la sonde a été mise en solution dans le DMF 100% et de 0,5 à 10 équivalents d'éthyl 2-mercaptoacétate ont

été ajoutés au milieu réactionnel. La réaction a été observée par fluorescence jusqu'à l'obtention d'un plateau, ce qui correspond à la fin de la réaction. L'intensité du signal de fluorescence, c'est à dire la hauteur du plateau observé, est proportionnelle à la concentration de l'espèce fluorescente formée dans le milieu. En comparant cette intensité de fluorescence avec celle d'une solution de la sonde ayant réagi avec deux équivalents de 2-mercaptoacétate d'éthyle (8) dont la concentration correspond à 100% de réaction, il est possible d'avoir une idée du rendement de la réaction d'addition.

Le 2-mercaptoacétate d'éthyle a été choisi comme thiol pour réagir avec la sonde, car son point d'ébullition est assez élevé pour que son évaporation soit négligeable à la température de la pièce. De plus, puisque seule la valeur de la fluorescence à la fin de la réaction est pertinente dans cette expérience, la très grande vitesse de la réaction entre ce thiol et la sonde (6) n'était pas un facteur problématique. La figure 38 présente les différentes courbes obtenues.

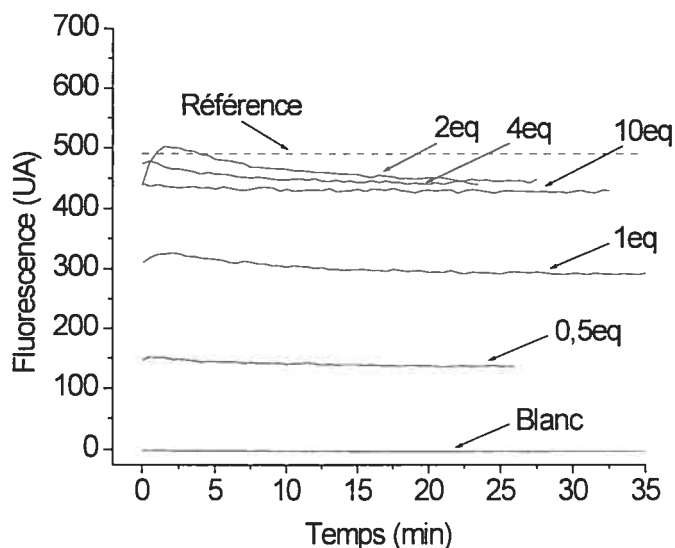


Figure 38: Détermination du rendement de la réaction entre la 6-maléimido-3(4-maléimidophényl)-coumarine (6) (1×10^{-4} mol/L) et le 2-mercaptoacétate d'éthyle en solution dans le DMF 100%.

On constate que le maximum d'émission est atteint après moins de 20 minutes. La fluorescence demeure à peu près constante pour le reste de l'expérience. La valeur de ce maximum de fluorescence est comparée à la valeur de la fluorescence d'une solution de la sonde ayant réagi avec 2 équivalents de thiol (8) de concentration correspondant à 100% de réaction. Les résultats obtenus sont résumés au tableau 6.

Table 6: Rendement de la réaction entre la sonde (6) et le 2-mercaptoacétate d'éthyle en solution dans le DMF 100%

Nombre d'équivalents d'éthyl-2-mercaptoacétate	Intensité maximale de l'émission à 419nm (UA)	Intensité de l'émission à 419nm s'il y avait 100% de réaction (UA)	Rendement approximatif de la réaction
0,5	140	490	29%
1	305	490	62%
2	465	490	95%
4	450	490	92%
10	432	490	88%

Ces résultats montrent que la réaction est complète lorsque deux équivalents de thiol sont ajoutés dans le milieu. Ainsi, l'ajout d'un excès de thiol n'est pas nécessaire. Il semble même mener à une légère diminution du signal de fluorescence par rapport au signal maximal déterminé par la solution de référence. En présence d'une quantité excédentaire de thiol, il y aurait donc un léger effet de quench de concentration.

4.6 Conclusion

La réaction entre la sonde (6) et un nombre variable d'équivalents d'éthanethiol a permis de conclure que l'étape limitante de la réaction est la première addition du thiol. En effet, la vitesse de la réaction est directement proportionnelle avec la concentration de thiol présent dans le milieu et non avec le carré de la concentration en thiol.

D'autre part, l'étude de la vitesse de la réaction entre la sonde et l'éthanethiol en milieu aqueux à différents pH a permis de déterminer les conditions aqueuses optimales pour cette réaction. Ainsi, il est préférable d'effectuer la réaction à un pH supérieur à 7 afin de minimiser le temps de réaction, mais à un pH inférieur à 8,5 afin de minimiser la réaction d'élimination qui décompose le produit dithiolé. La réversibilité de la réaction entre la sonde et un thiol à un pH très basique (pH = 9) a également été observée. Cette propriété pourrait être avantageuse dans le cas où la sonde serait utilisée dans la purification de protéines.

Finalement, la réaction de la sonde avec un très grand excès de thiol est généralement complétée en moins de 20 minutes à des températures autour de la température ambiante. Toutefois, seuls deux équivalents de thiol sont nécessaires pour que la réaction soit complète.

CHAPITRE 5

TESTS PROTÉIQUES

5.1 But des tests

Les tests effectués consistaient à mettre la 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (**6**) en présence d'une protéine contenant un seul résidu cystéiné exposé au solvant par la dénaturation de la protéine. Ces tests avaient pour but de vérifier la capacité de la sonde à réagir avec un résidu cystéiné d'une protéine, malgré l'encombrement stérique engendré par les autres résidus. Ils devaient également permettre de confirmer que la réaction d'addition sur la double liaison des maléimides est spécifique aux thiols à un pH de 7,5. En effet, si cette réaction n'est pas spécifique, la sonde peut réagir avec n'importe quel nucléophile de la protéine, ce qui empêcherait toute spécificité de la sonde pour les protéines d'intérêt et la rendrait inutile. D'autre part, les tests protéiques devaient permettre de vérifier l'incapacité de la sonde à réagir avec les cystéines de deux protéines différentes n'ayant pas interagi. En effet, il n'est pas souhaitable que la sonde puisse réagir avec deux équivalents de n'importe quel thiol présent dans le milieu puisque l'émission observée ne serait pas dû uniquement à la présence de protéines ayant interagi. Finalement, les tests protéiques devaient permettre de confirmer que l'intermédiaire monothiolé n'est pas fluorescent. En effet, dans le cas où la sonde ne réagirait qu'avec un seul équivalent de protéine, la présence de fluorescence impliquerait que la sonde monothiolée est fluorescente. L'absence de fluorescence impliquerait quant à elle que le produit monothiolé n'est pas fluorescent.

5.2 Choix de la protéine

La protéine choisie pour effectuer les tests avec la sonde synthétisée est la thiorédoxine. La thiorédoxine est une protéine rencontrée dans la plupart des types de cellules connues.⁶⁹ Cette protéine d'environ 12 kDa est monomérique et possède une paire de cystéines positionnées assez près l'une de l'autre pour former un pont disulfure.⁶⁹ L'une des cystéines est à la position 32, alors que l'autre est à la position 35. Une grande variété de fonctions cellulaires sont basées sur la réduction ou l'oxydation de la thiorédoxine, tel que la synthèse de l'ADN, la réponse à un stress oxydatif et la formation du glutathion par réduction du glutathion disulfure.⁷⁰ Par ailleurs, la résolution en rayons-X de la structure cristalline de la thiorédoxine est connue depuis plus de 25 ans.⁶⁹

La thiorédoxine de type sauvage ne pouvait pas être utilisée dans les tests protéiques envisagés, car elle possède deux résidus cystéines et donc deux sites pouvant réagir avec la sonde. Toutefois, le mutant C35A, c'est-à-dire le mutant où la cystéine 35 a été mutée en alanine, est connu. Ce mutant a l'avantage de ne présenter qu'un site potentiel de réaction avec la sonde. De plus, le groupe de recherche du professeur Michnick, qui collabore sur le présent projet, possède le gène de la thiorédoxine C35A sous-cloné dans le plasmide pQE-32 (Qiagen).⁷⁰ Ainsi, la disponibilité du gène de cette protéine ne posait pas de problème. De plus, la protéine mutante possède une queue d'histidines (his-tag), ce qui en facilite la purification. Ces deux avantages majeurs ont contribué au choix de la thiorédoxine mutante comme protéine dans les tests avec la sonde développée.

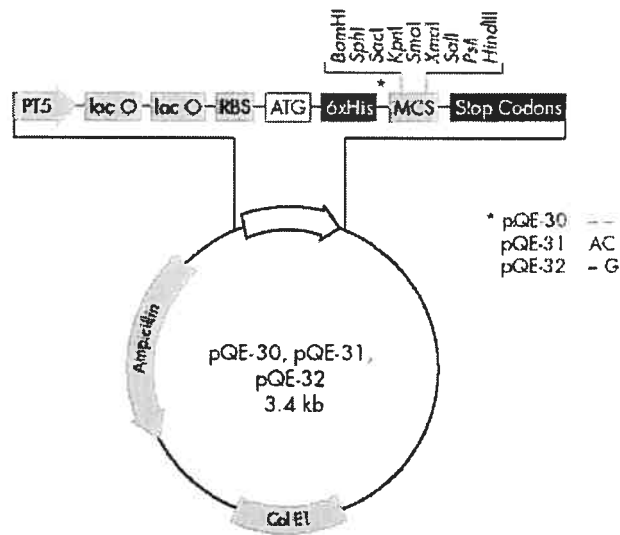
D'autre part, la thiorédoxine C35A est monomérique, ce qui est un avantage dans le sens où cela limite le nombre de site potentiellement réactif avec la sonde. Cela limite également le problème dû au mauvais repliement de la protéine lors de son expression. De plus, la thiorédoxine est une protéine non glycosylée et par conséquent, elle peut être exprimée dans des cellules bactériennes. Ces autres

avantages ont confirmé le choix de la thiorédoxine mutante pour les tests protéiques envisagés.

5.3 Expression et purification de la thiorédoxine mutante

5.3.1 Sous-clonage du gène codant pour la protéine d'intérêt dans un plasmide

La protéine a été exprimée à partir du plasmide pQE-32⁷⁰ contenant le gène codant pour la protéine TRXC35A. Un plasmide⁶⁹ est un double-brin d'ADN circulaire contenant de 1000 à 200000 bases et codant pour la machinerie génétique nécessaire à sa réplication dans une cellule bactérienne hôte. Les plasmides utilisés en biologie moléculaire pour le clonage sont relativement petits, possèdent souvent des gènes de résistance à différents antibiotiques et contiennent des sites de restriction à partir desquels l'ADN à cloner peut être insérée. Le plasmide utilisé dans cette recherche, le pQE-32⁷⁰ possède le gène de résistance à l'ampicilline, ce qui permet de sélectionner les cellules qui ont incorporé le vecteur lors de l'étape de transformation. De plus, il a la propriété de fournir une queue d'histidine en N-terminal de la protéine qui y est sous-clonée. Le plasmide pQE-32 possède également l'opéron *lac*^{1,69} qui permet d'induire l'expression de la protéine via l'ajout d'isopropylthiogalactoside (IPTG) au milieu.



PT5 : Promoteur de la polymérase T5.

lac-O : Opérateur lac.

RBS : Site de liaison du ribosome.

ATG : Séquence codant pour le début de la transcription.

6xHis : Séquence (tag) contenant 6 His.

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

Stop Codon : Séquence codant pour l'arrêt de la transcription dans les 3 cadres de lecture.

Col E1 : Origine de la réplication de l'ADN

Ampicillin : Gène de résistance à l'ampicilline (codant pour la β -lactamase)

Figure 39: Schéma du vecteur pQE-32 (Qiagen).⁷⁰

5.3.2 Préparation de cellules compétentes *E. coli* BL21-pRep4

La première étape consistait à rendre les cellules compétentes afin d'y introduire le vecteur contenant la protéine d'intérêt. Les cellules bactériennes utilisées sont des *E. coli* BL21-pRep4. Ces cellules sont souvent choisies pour effectuer l'expression de protéines, car elles sont déficientes en protéases qui pourraient cliver les protéines d'intérêt exprimées dans ces cellules.⁷² Par ailleurs, les *E. coli* utilisées possèdent en plus un plasmide de résistance à la kanamycine, ce qui permet de les différencier des autres cellules bactériennes pouvant contaminer le milieu en cours d'expérience. Les cellules bactériennes ont été rendues compétentes chimiquement afin que leur membrane soit perméable et apte à incorporer facilement des vecteurs plasmidiques, c'est à dire de l'ADN circulaire superenroulé. Pour ce faire, les cellules ont été suspendues dans un tampon PIPES contenant des sels tels que le $MnCl_2$, le $CaCl_2$ et le KCl . La méthode employée est une adaptation de la méthode proposée par Inoue *et al*⁷³.

5.3.3 Transformation du vecteur contenant le gène de la TRX C35A dans les cellules bactériennes compétentes

La deuxième étape consistait en la transformation du plasmide pQE-32 contenant le gène de la thiorédoxine mutée (C35A) dans les cellules compétentes *E. coli* BL21-pRep4. Un choc thermique a été effectué de façon à ce que les bactéries incorporent l'ADN à l'intérieur de leur parois. Un peu du milieu a été étalé sur une gélose contenant l'antibiotique kanamycine, afin de sélectionner uniquement les *E. coli* BL21-pRep4. La gélose contenait également l'antibiotique ampicilline, afin de sélectionner les bactéries ayant incorporé le vecteur. Les colonies retrouvées sur la gélose après l'incubation contenaient donc uniquement les bactéries transformées. Plusieurs colonies ont poussé sur la gélose, ce qui implique que les étapes précédentes ont fonctionné adéquatement. Une des colonies a été sélectionnée pour l'expression de la protéine d'intérêt.

5.3.4 Expression de la protéine d'intérêt

Les bactéries de la colonie sélectionnée ont été placées dans du milieu de culture en présence d'IPTG afin d'induire l'expression de la protéine d'intérêt par les cellules bactériennes. C'est la présence de l'opéron *lac* sur le plasmide pQE-32 qui permet de contrôler l'induction de l'expression via cet inducteur.

L'opéron *lac* est formé de trois gènes, soit le gène codant pour la β -galactosidase, celui codant pour la galactoside perméase et celui codant pour la thiogalactoside transacétylase. Ces gènes sont sous le contrôle transcriptionnel du même promoteur et forment donc un opéron, l'opéron *lac*. L'opéron *lac* est précédé de l'opérateur constitutif *O* (*lac-O*) qui contrôle l'expression des gènes de l'opéron *lac*. Cette expression est induite par la présence d'un inducteur, initialement le lactose, bien que l'IPTG soit généralement utilisé à cet effet. Cette série de gènes est finalement précédée du gène *lac-i* (*inductibility*) qui code pour une protéine

répresseur du gène *lac*. En absence d'inducteur, le répresseur du gène *lac* est lié spécifiquement à l'opérateur *lac-O* de façon à bloquer physiquement la transcription enzymatique de l'opéron *lac* par l'ARN polymérase. Cependant, en présence d'un inducteur tel que le lactose ou l'IPTG, le répresseur se dissocie de l'opérateur *lac-O* ce qui permet ainsi la transcription et éventuellement la translation des gènes de l'opéron *lac* et du gène de la protéine d'intérêt le suivant.^{1.69} Ce système est représenté à la figure 40.

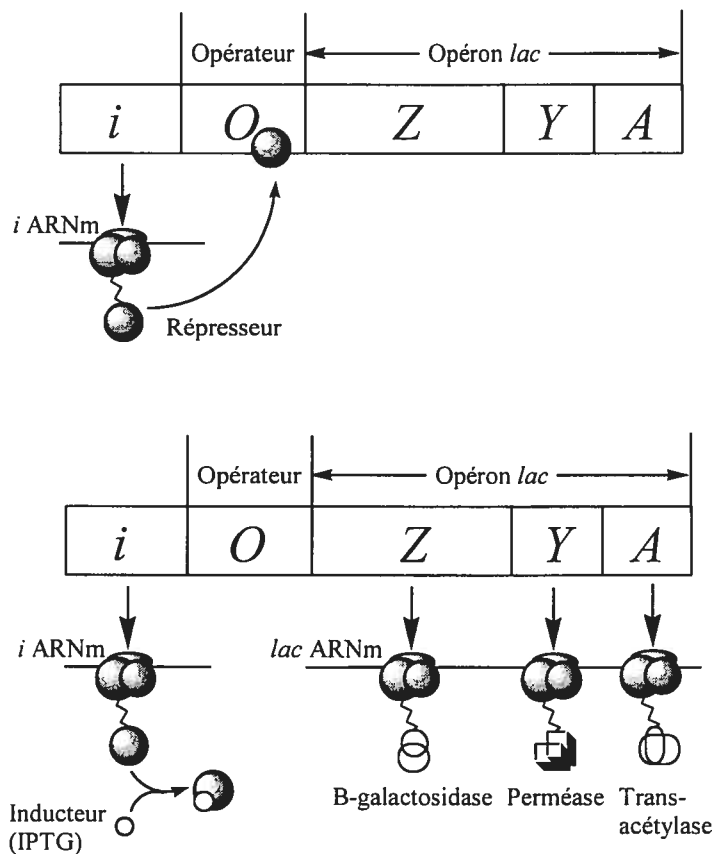


Figure 40: Schéma de l'induction de l'expression de l'opéron *lac* par l'IPTG.

5.3.5 Purification de la protéine d'intérêt

Suite à l'induction de l'expression de la protéine d'intérêt, les bactéries ont été récupérées par centrifugation. Elles ont été ensuite lysées par

sonication en présence de lysosyme. Ce dernier a pour effet de fragiliser la parois des bactéries en hydrolysant les liens glucosidiques $\beta(1\rightarrow4)$ entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine.⁶⁹ La protéine d'intérêt s'est ainsi retrouvée en solution dans le tampon de lyse, alors que la plupart des autres composantes cellulaires non solubles dans le tampon ont été éliminées par centrifugation.

Puisque la protéine d'intérêt possède une queue d'histidines, une colonne de nickel a pu être utilisée pour sa purification. La chromatographie d'affinité avec un métal immobilisé est une technique efficace utilisée pour purifier des protéines. Le nickel est lié par une forte interaction au support solide, ce qui lui laisse deux sites de coordination disponibles pour interagir avec les histidines de la protéine d'intérêt.⁷⁰ Ainsi, en faisant passer le surnageant récupéré à l'étape précédente sur la colonne de nickel, la protéine d'intérêt a été retenue, alors que les autres composantes cellulaires n'ayant pas été éliminées lors de la centrifugation ont été éluées rapidement. La protéine a ensuite été éluée en faisant passer une solution contenant de l'imidazole sur la colonne. En prenant la place des histidines sur les atomes de nickel, l'imidazole décroche la protéine du support solide.

La dernière étape de la purification de TRX C35A consistait à dialyser l'éluant contenant la protéine d'intérêt. La dialyse⁶⁹ est un procédé qui permet de séparer les molécules en fonction de leur grosseur à l'aide d'une membrane semi-perméable contenant des pores de dimensions inférieures à celles des macromolécules. Les pores permettent aux petites molécules tels que les solvants et les ions de diffuser à travers la membrane, mais bloquent le passage aux grosses molécules. La dialyse est fréquemment utilisée pour changer le solvant dans lequel une macromolécule telle une protéine est solubilisée.¹ Dans le cas présent, la dialyse avait pour but de changer le tampon phosphate pour le MOPS, ainsi que d'éliminer l'imidazole présent dans l'éluant. Pour se faire, l'éluant a été scellé dans un sac à dialyse formé d'une membrane de Cellophane™ (acétate de cellulose) et fermé à l'aide d'une pince à chaque extrémité. Le sac a été plongé dans une grande quantité

de MOPS 25mM ayant un pH de 7,5 pour une période d'une vingtaine d'heures. Le contenu du sac a ensuite été récupéré, aliquoté et conservé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3.6 Évaluation de l'efficacité des étapes de purification de la TRX C35A par gel d'électrophorèse (SDS-Page)

À chacune des étapes de la purification de la protéine d'intérêt, un petit aliquot a été récupéré pour fins d'analyse. Tout comme une CCM permet de suivre l'avancement d'une réaction, l'analyse par électrophorèse permet d'identifier les protéines présentes à chacune des étapes de la purification.

L'électrophorèse¹ consiste à faire migrer des particules chargées à l'intérieur d'un champ électrique. Un gel de polyacrylamide est utilisé comme phase stationnaire, car il est plus facile de travailler avec un gel solide qu'avec une solution. Le gel est emprisonné entre deux plaques de verre et la polymérisation est effectuée *in situ*. La porosité du gel fait en sorte que les protéines migrent en fonction de leur grosseur moléculaire.¹ Le sodium dodécylsulfate (SDS) est un détergent utilisé pour dénaturer les protéines à analyser. Il a la propriété de lier fortement les protéines dans un ratio d'environ une molécule de SDS pour deux résidus acides aminés. La charge négative importante du SDS masque les charges intrinsèques des protéines. Cela confère à toutes les protéines traitées au SDS un rapport charge sur masse similaire et une forme tridimensionnelle semblable. Par conséquent, les protéines migrent à travers le gel de polyacrylamide uniquement en fonction de leur masse. Un tampon contenant du β -mercaptoéthanol est généralement utilisé afin de favoriser la dénaturation des protéines par le bris des liens disulfures.⁶⁹ La position des protéines contenues dans le gel peut être révélée de plusieurs façons. Le moyen utilisé dans le cas présent est le Bleu brillant de Coomassie, un colorant réagissant avec les chaînes latérales basiques ou aromatiques des acides aminés. Ce colorant absorbe dans le domaine du visible (595nm), ce qui permet de voir clairement les bandes correspondant aux protéines du gel.

Un échantillon du surnageant provenant de la centrifugation suivant la sonication, ainsi que des échantillons des différentes éluions ont donc été analysés par gel d'électrophorèse.

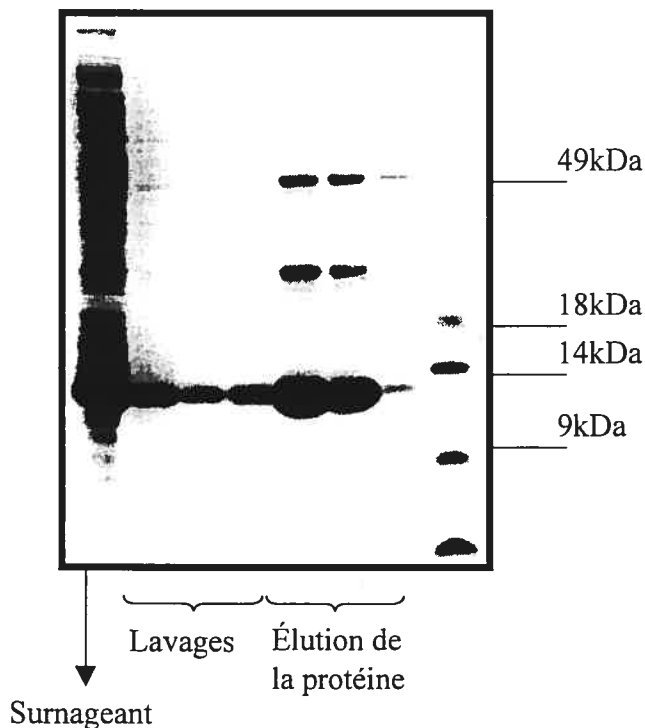


Figure 41: Gel d'électrophorèse des différentes étapes de purification de la protéine d'intérêt TRX C35A.

Le gel montre que la protéine d'intérêt a effectivement été exprimée et était présente dans le surnageant suite à la centrifugation suivant la sonication. La présence de la protéine dans les fractions correspondant aux lavages et à la première élution indique qu'une partie de la protéine ne s'est pas liée à la résine de nickel. Cela peut être dû à la trop grande quantité de TRX C35A dans le milieu, car la protéine a été exprimée en très grande quantité. Néanmoins, c'est dans les fractions correspondant aux deux premières éluions avec le tampon contenant de l'imidazole que les protéines sont en concentration les plus grandes, ce qui était attendu. La prochaine fois, une plus grande quantité de résine pourrait être utilisée afin de récupérer un maximum de protéines. L'ensemble des étapes a permis d'obtenir

quinze aliquots de 100 μL contenant la protéine avec une pureté acceptable (par gel d'électrophorèse). La concentration des aliquots a été déterminée à l'aide du test de Bradford.⁴

5.3.7 Détermination de la concentration des aliquots contenant la protéine d'intérêt à l'aide du test de Bradford.

Le test de Bradford (Bio-Rad Protein Assay)⁴ consiste à mettre un colorant en présence de protéine et à observer la différence de couleur développée en fonction de la concentration du milieu en protéine. Le colorant utilisé est le Bleu brillant de Coomassie dont le maximum d'absorbance se déplace de 465 nm à 595 nm lorsqu'il s'associe à une protéine. La loi Beer-Lambert peut être appliquée afin de quantifier la concentration du milieu en protéine. L'IgG, la gamma globuline bovine, est utilisée comme protéine de référence pour tracer la courbe étalon de l'absorbance du milieu en fonction de la concentration en protéines. Le domaine de linéarité de la méthode lorsque l'IgG est utilisée se trouve entre 0,2 et 1,5 mg/mL. Les aliquots doivent donc être dilués de façon à ce que leur concentration en protéines se trouve à l'intérieur de ce domaine de linéarité. La concentration trouvée pour nos solutions de protéines est de 115 mg/mL. Cela implique qu'au total, environ 170 mg de protéines ont été récupérés, ce qui est excellent. Par comparaison, les mêmes conditions ont permis d'obtenir environ 100 fois moins des protéines GCN4-TOR2 et GCN4-FKBP, des protéines pouvant s'enrouler de façon à former des leucines-zippers en présence de rapamycine. (cf section 1.2 et 1.3) De plus, la quantité de protéines obtenue est largement suffisante pour effectuer les tests protéiques désirés.

5.4 Réaction entre la sonde (6) et TRX C35A

5.4.1 Première étape de la réaction entre la sonde et TRX C35A

La protéine a d'abord été dénaturée à l'aide du chlorure guanidinium, afin que son résidu cystéiné soit exposé au solvant et puisse ainsi réagir avec la sonde. Le guanidinium, de formule chimique $C(NH_2)_3^+$, a la propriété d'augmenter la solubilité des substances non polaires dans l'eau. Son habileté à dénaturer les protéines provient donc de sa capacité à déstabiliser les interactions hydrophobes.⁶⁹ Ainsi, la protéine est placée dans une solution de MOPS ayant un pH de 7,5 contenant 3,25 mol/L de guanidinium et la dénaturation de la protéine est effectuée durant une quinzaine de minutes à la température de la pièce.

À la solution de protéines dans le tampon est ajoutée une solution de la sonde dans le DMSO de façon à ce que la concentration de solvant organique dans le milieu soit de 10%. La concentration de la protéine est alors égale à la concentration de la sonde. L'émission de la solution est ensuite mesurée sur une période de 120 minutes. À titre d'exemple, l'évolution de la fluorescence du milieu en fonction du temps de la solution contenant la protéine seule, de celle contenant la sonde seule et de celle contenant la protéine et de la sonde de concentrations de $5,73 \times 10^{-6}$ mol/L est présentée à la figure 42.

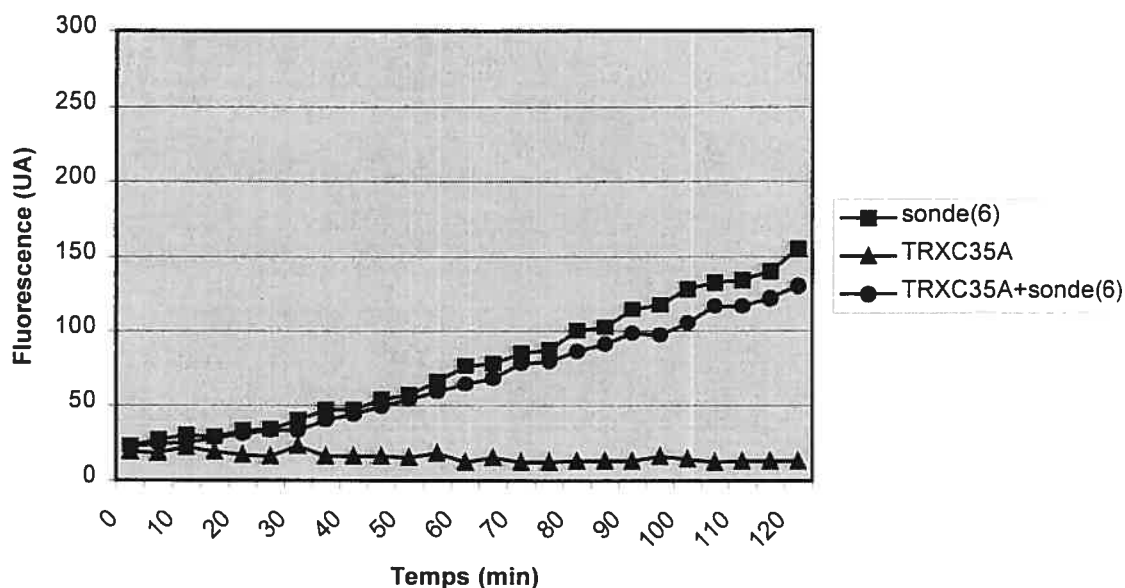


Figure 42: Émissions de solutions de 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) ($5,73 \times 10^{-6}$ mol/L), de TRX C35A ($5,73 \times 10^{-6}$ mol/L) et d'un mélange 1:1 de ces deux espèces ($5,73 \times 10^{-6}$ mol/L chacune) dans le MOPS à pH = 7,5.

La solution ne contenant que la protéine TRX C35A a une fluorescence très faible. La fluorescence de la solution contenant seulement la sonde (6) et celle de la solution contenant la sonde (6) et la protéine présente une augmentation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps. (cf figure 42) Trois hypothèses sont proposées pour expliquer le signal de fluorescence observé. D'abord, la sonde pourrait être légèrement décomposée en milieu basique par l'attaque des ions hydroxydes sur les maléimides de façon à ouvrir ces cycles et à mener à l'acide maléamique correspondant qui lui, est fluorescent (cf. chapitre 3). Cette hypothèse est soutenue par l'étude de l'effet du pH du milieu réactionnel sur la réactivité et la fluorescence de la sonde présentée au chapitre 4. D'autre part, cette fluorescence pourrait être due au produit d'addition d'un équivalent de protéine sur la sonde. Cela n'est pas souhaitable, car la sonde ne serait alors pas du tout spécifique aux thiols de deux protéines ayant interagi et fluorescerait même lorsqu'un seul thiol s'est additionné sur la molécule. Finalement, la fluorescence pourrait être dû au produit

d'addition de deux équivalents de protéines sur la sonde. Cela non plus ne serait pas souhaitable puisque cela signifierait que la sonde est en mesure de réagir avec deux groupements thiolés même si ces derniers ne sont pas disposés adéquatement dans l'espace. Ces deux dernière hypothèses sont toutefois peu probables, car l'intensité de la fluorescence de la solution ne contenant que la sonde et celle de la solution contenant la sonde ainsi que la protéine sont semblables. Or, si l'émission était due à la réaction entre la sonde et la protéine, la fluorescence de la solution ne contenant que la sonde serait beaucoup plus faible que celle contenant les deux espèces.

Il est à noter que l'appareil utilisé ne permettait pas d'exciter le milieu à une longueur d'onde de 332 nm, la longueur d'onde d'excitation de la sonde. Une longueur d'onde d'excitation de 370 nm a donc été utilisée dans cette expérience. De plus, la longueur d'onde d'observation était de 465 nm, alors que la longueur d'onde d'émission de la sonde dithiolée est de 419 nm. Cela a probablement mené à l'enregistrement d'un signal de fluorescence beaucoup plus faible qu'il ne l'était en réalité.

À ce stade de l'expérience, quatre espèces peuvent être retrouvés dans le milieu réactionnel, soient le produit d'addition d'un équivalent de la protéine sur la sonde, le produit d'addition de deux équivalents de protéines sur la sonde ou encore, la sonde et la protéine n'ayant pas réagi ensemble. C'est ce qui est représenté à la figure 43.

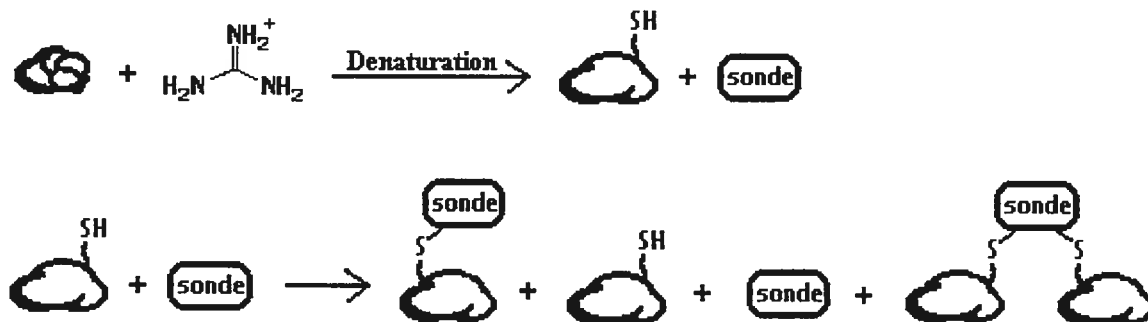


Figure 43: Schéma de la réaction entre la sonde (6) et la protéine TRX C35A dénaturée par le guanidinium.

5.4.2 Deuxième étape de la réaction entre la protéine et TRX C35A

Un très grand excès d'éthanethiol ($1\ \mu\text{L}$ dans $200\ \mu\text{L} = 7,09 \times 10^{-2}\ \text{mol/L}$) a été ajouté au milieu réactionnel suite à la réaction entre la sonde (6) et la protéine TRXC25A afin de saturer les sites réactionnels de la sonde. La fluorescence du milieu est enregistrée sur une période de 240 minutes. L'évolution de la fluorescence des solutions analysées précédemment (cf figure 42) auxquelles a été ajouté $1\ \mu\text{L}$ d'éthanethiol est présentée à la figure 44.

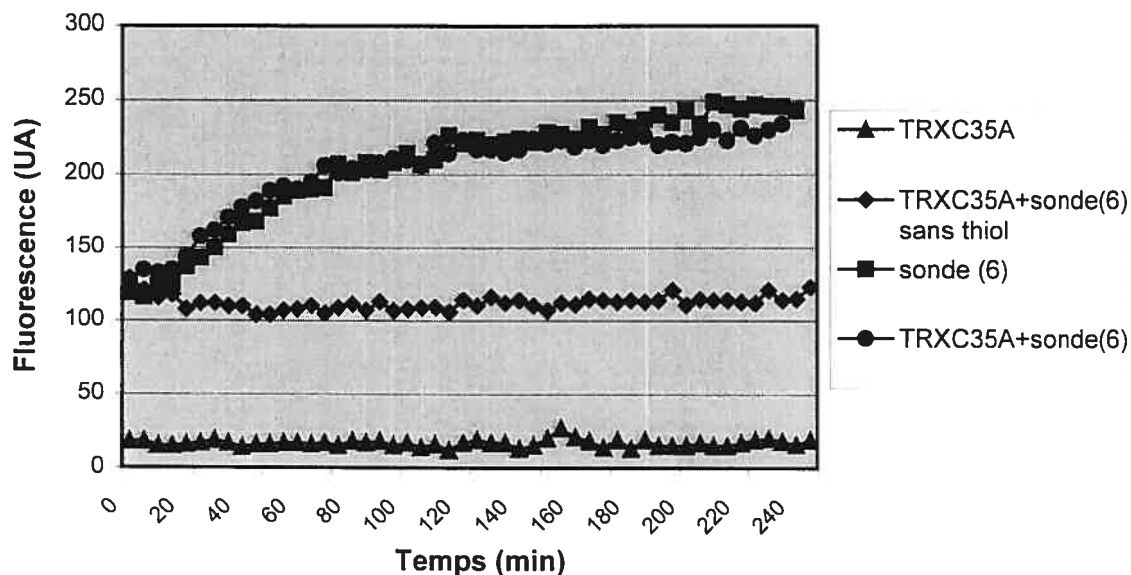


Figure 44: Émissions de solutions de 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6) ($5,73 \times 10^{-6}$ mol/L), de TRX C35A ($5,73 \times 10^{-6}$ mol/L) et d'un mélange 1:1 de ces deux espèces ($5,73 \times 10^{-6}$ mol/L chacune) dans le MOPS à pH = 7,5 auxquelles a été ajouté 1 μ L d'éthanethiol.

Encore une fois, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission utilisées ne sont pas les longueurs d'onde maximisant le signal, soient respectivement 370 nm et 465 nm, au lieu de 332 nm et 419 nm. La solution contenant uniquement la sonde et le 2-mercaptoéthanol présente une intensité de fluorescence importante due à la formation du produit de di-addition très fluorescent (cf chapitre 3). La solution contenant uniquement la protéine et le 2-mercaptoéthanol ne présente pas de fluorescence significative. Ainsi, ni la protéine seule, ni le thiol n'émet à ces longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Enfin, la solution contenant la sonde et la protéine présente une augmentation de son émission en fluorescence dû à l'ajout de l'éthanethiol. À ce stade de l'expérience, quatre espèces peuvent se retrouver dans le milieu réactionnel, soient la sonde ayant réagi avec un équivalent de protéine et un équivalent d'éthanethiol, la sonde ayant réagi avec deux équivalents d'éthanethiol, la protéine n'ayant pas réagi du tout avec la sonde et la sonde ayant réagi avec deux équivalents de protéines. C'est ce qui est présenté à la figure 45.

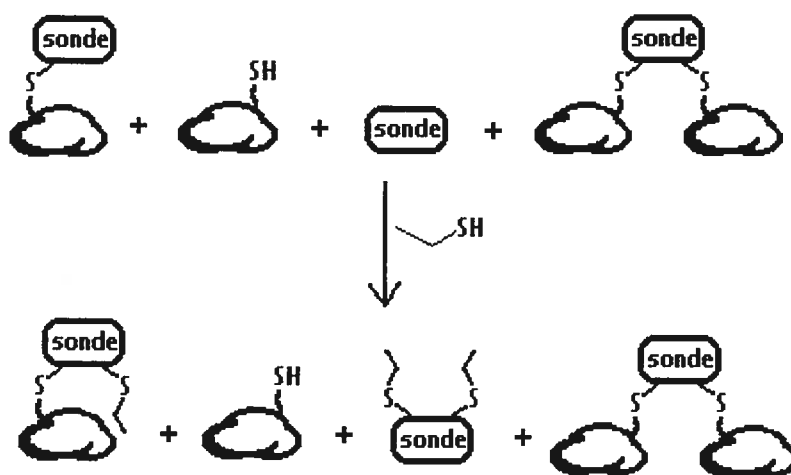


Figure 45: Schéma de la réaction entre la sonde (6) et la protéine TRX C35A suite à l'ajout de très grand excès d'éthanethiol.

Afin de déterminer les espèces présentes en solution à chacune des étapes de l'expérience, une analyse par gel d'électrophorèse (SDS-page) a été effectuée sur les échantillons provenant de la deuxième étape. Le gel a été révélé à l'aide du Bleu brillant de Coomassie afin de pouvoir observer la position des protéines sur le gel de polyacrylamide. Le gel a également été révélé en fluorescence par son irradiation à l'aide d'une lampe UV à large spectre (short wave) et en observant l'émission dans le domaine du visible à l'aide d'une caméra à gel d'électrophorèse.

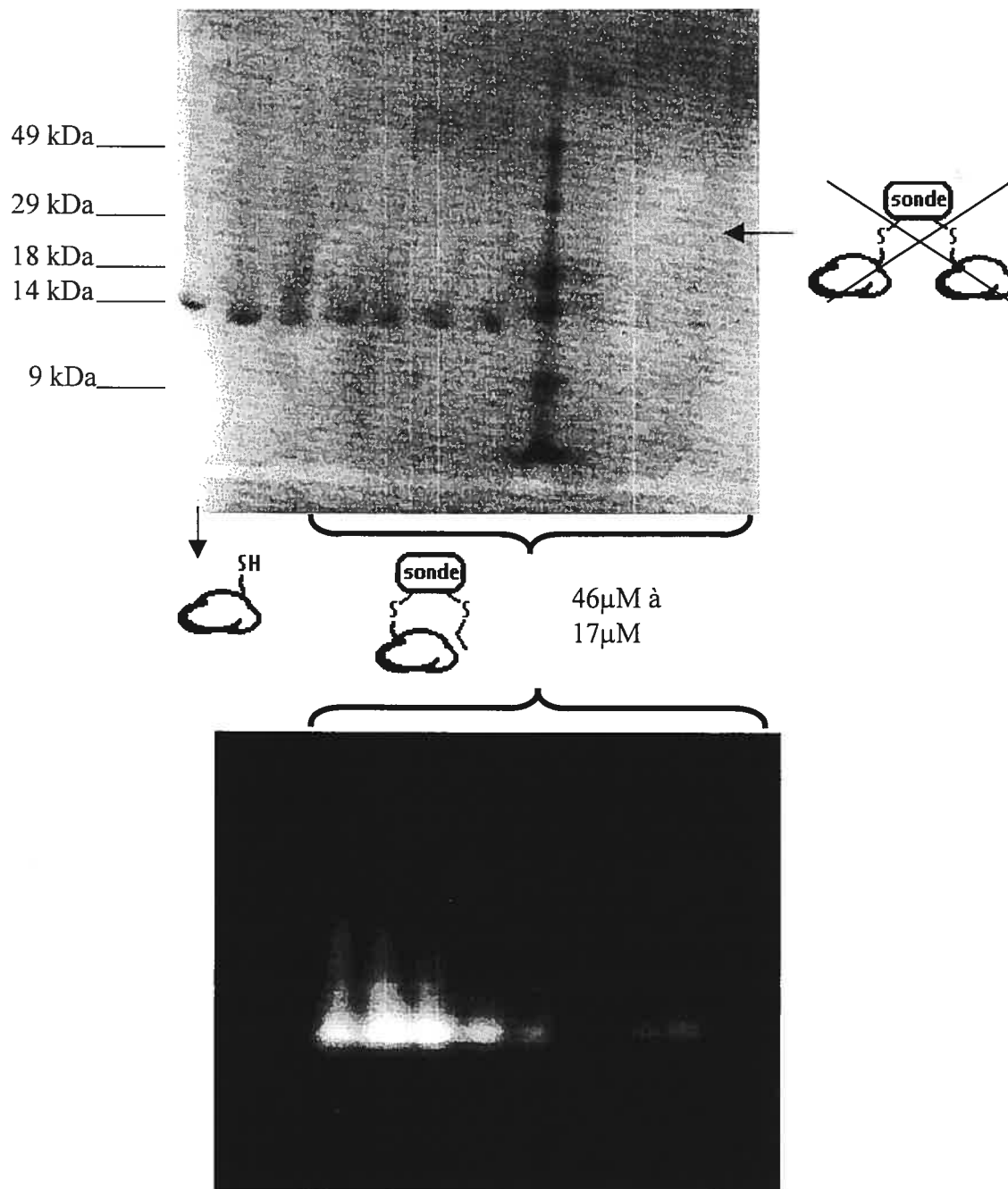


Figure 46: Gel d'électrophorèse de la réaction entre la sonde (6) et la protéine TRX C35A révélé à l'aide du Bleu brillant de Coomassie et en fluorescence.

On constate d'abord que le puits correspondant à la solution de la protéine seule présente une bande autour de 12 kDa, ce qui correspond au poids moléculaire

de la protéine TRX C35A. D'autre part, il n'y a pas de bande correspondant à la réaction de la sonde avec deux équivalents de protéines, car aucune bande n'est visible autour de 24 kDa. La sonde est donc sélective en ce sens qu'elle ne peut pas réagir avec deux protéines n'ayant pas interagi. Pour que la protéine réagisse avec deux résidus cystéinés, il faut que ces résidus soient positionnés adéquatement dans l'espace par l'interaction de deux protéines.

Le puits correspondant à la réaction entre la sonde, la protéine et un grand excès d'éthanethiol présente une bande révélée au bleu brillant de Coomassie vers 12 kDa. Cela correspond à la protéine TRXC35A. Or, cette bande est également fluorescente comme on peut le voir sur la révélation en fluorescence du gel. Ainsi, la protéine a dû réagir avec la sonde pour que le produit final soit fluorescent, mais la sonde monoprotéinée a dû ensuite réagir avec un équivalent d'éthanethiol pour former le produit dithiolé fluorescent. La deuxième étape de l'expérience a donc permis de vérifier que la sonde est capable de réagir avec un résidu cystéine d'une protéine, malgré l'encombrement des autres acides aminés de la protéine. Cela confirme que le composé monothiolé a bien été formé lors de la première étape et l'absence de fluorescence à cette étape permet de conclure que ce composé n'est pas fluorescent.

5.5 Conclusion

Les tests protéiques effectués ont permis de démontrer que la sonde est incapable de réagir avec deux équivalents de protéines si celles-ci n'ont pas d'abord interagi de façon à disposer adéquatement leur résidu cystéiné dans l'espace. D'autre part, les tests ont démontré que la sonde est en mesure de réagir avec un résidu cystéiné d'une protéine, malgré l'encombrement stérique que créent les autres résidus de la macromolécule. De plus, il a été prouvé que l'intermédiaire monothiolé formé durant la première étape n'est pas fluorescent. Ainsi, la sonde développée s'avère un excellent outil de type interrupteur ouvert ou fermé spécifique aux

fonctions thiolées adéquatement positionnées dans l'espace et nécessitant l'addition de deux thioles pour émettre en fluorescence.

Les tests protéiques n'ont cependant pas permis de démontrer que la sonde est en mesure de réagir avec deux fonctions thioles adéquatement positionnées dans l'espace. De plus, ils n'ont pas permis de déterminer que la sonde est applicable dans un contexte *in vivo*. Par exemple, la présence des composantes cellulaires autres que les protéines d'intérêt pourraient affecter de façon importante la réaction entre la sonde et les protéines étudiées. La concentration de molécules thiolées dans une cellule est élevée, ce qui pourrait causer un problème de faux positifs important si la sonde réagit avec ces molécules aussi bien qu'avec les protéines d'intérêt. Cependant, les études menées par le groupe de Tsien^{6,7} semblent démontrer qu'il est possible d'obtenir une grande sélectivité pour les thiols des protéines d'intérêt par rapport aux autres molécules thiolées si la sonde développée possède plusieurs sites réactifs. En effet, les réactions intramoléculaires sont entropiquement plus favorisées que les réactions intermoléculaires.

Un autre facteur pouvant compromettre l'utilisation de la sonde dans un contexte *in vivo* n'ayant pas été vérifié dans la présente recherche est l'effet de quench possiblement entraîné par différentes composantes cellulaires. En effet, ces dernières peuvent soit interagir avec la sonde lorsqu'elle se trouve à l'état excité de façon à la désactiver via un processus non radiatif. Les composantes cellulaires peuvent également absorber la lumière incidente ou émise. Cela pourrait causer un problème de faux négatifs, car l'émission observée serait moins importante qu'elle ne devrait l'être en réalité. La longueur d'onde d'excitation de la sonde est toutefois plus grande que celle des tryptophanes des protéines, des résidus connus pour fluorescer de façon intense, ce qui devrait minimiser l'interaction des protéines avec la lumière incidente ou émise.

CHAPITRE 6

TRAVAUX FUTURS

6.1 Synthèse d'autres sondes permettant l'étude de l'apposition protéique

La sonde de deuxième génération proposée dans la présente recherche présente les qualités nécessaires à une bonne sonde fluorescente de type interrupteur ouvert et fermé. En effet, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont au-delà de celles des protéines et son coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde d'excitation est important tout comme son rendement quantique. La réaction entre la sonde développée et les protéines peut s'effectuer dans des conditions compatibles avec les milieux biologiques et il est peu probable qu'elle modifie les interactions des protéines entre elles. Finalement, la fluorescence du coeur de coumarine de la sonde est quenchée par les groupements maléimides, mais cette fluorescence est restaurée lors de l'addition de deux équivalents de thiol sur la molécule.

Le désavantage le plus important de la sonde élaborée est sa très petite hydrophilie qui la rend pratiquement insoluble dans un milieu aqueux. Cela nous oblige en effet à solubiliser la sonde dans un solvant organique (typiquement le DMF) avant de la placer dans le milieu aqueux contenant le thiol ou les protéines. Ainsi, il serait avantageux de greffer à la molécule un groupement polaire afin d'augmenter sa solubilité dans l'eau. Ce groupement pourrait être introduit en position 7 ou 8 de la coumarine de façon à ce que sa présence n'interfère pas avec la liaison de la sonde avec les résidus thiolés d'un motif leucine-zipper. Ces groupements polaires pourraient être des acides ou des alcools, mais il pourrait également s'agir de sucres. L'avantage des sucres est qu'ils peuvent être reconnus par des récepteurs présents à la surface des cellules et être ainsi introduits à

l'intérieur des cellules. Par conséquent, en plus d'augmenter la solubilité de l'outil développé dans la l'eau, la présence d'un sucre faciliterait l'introduction de la sonde dans les cellules, à l'endroit où se trouvent les protéines d'intérêt.

D'autre part, la spécificité de la sonde pour les protéines d'intérêt pourrait être augmentée en introduisant un troisième groupement maléimide en position 8 du coeur de coumarine. Une des deux protéines d'intérêt devrait porter deux résidus cystéinés judicieusement introduits de façon à ce que l'interaction des deux protéines placent adéquatement dans l'espace les trois groupements thiolés. Ainsi, s'il est peu probable qu'une protéine possède deux thiols adéquatement positionnés dans l'espace pour que la sonde réagisse avec et engendre des faux positifs, il est à peu près impossible qu'une protéine en possède trois! Néanmoins, il serait très important de vérifier que l'addition de deux équivalents de thiols sur cette sonde de troisième génération ne mène pas à un composé fluorescent, car cette sonde ne serait alors pas plus avantageuse que la sonde de deuxième génération proposée dans cette recherche.

Finalement, il pourrait s'avérer avantageux d'utiliser dans une même étude des sondes possédant des longueurs d'onde d'émission différentes. En effet, il serait possible de visualiser plusieurs interactions protéiques distinctes en même temps. Les sondes développées devraient avoir des distances différentes entre leurs groupements maléimides de façon à ce que les réactions avec les protéines soient spécifiques. Un moyen pour y parvenir serait d'ajouter des groupements phényles à la sonde développée. Ainsi, la longueur d'onde d'excitation de la molécule serait modifiée, ainsi que la distance entre ses groupements maléimides. Une autre façon d'arriver à cette fin serait de substituer le coeur de coumarine de la sonde par un autre coeur fluorescent, tel le naphthalène ou la fluoresceine et d'y introduire des groupements maléimides aux positions appropriées.

6.2 Tests protéiques avec la sonde synthétisée

Les tests protéiques préliminaires effectués avec la protéine TRX C35A ont permis de démontrer que la sonde peut réagir avec un résidu cystéiné d'une protéine. La sonde s'est toutefois avérée incapable de réagir avec un second équivalent de protéine, s'il n'y a pas eu interaction entre les protéines de façon à positionner adéquatement dans l'espace les deux résidus thiolés. D'autre part, les tests ont également permis de démontrer que la sonde monothiolée n'est pas fluorescente, alors que la sonde dithiolée l'est.

La prochaine étape du projet consisterait donc à faire réagir la sonde avec une protéine contenant deux résidus cystéinés adéquatement positionnés dans l'espace. La TRX non-mutée pourrait s'avérer un bon choix dans ce cas, puisque les deux cystéines ne sont séparées que par un seul résidu et sont donc assez près dans l'espace l'une de l'autre pour réagir avec les deux maléimides de la sonde.

Finalement, l'application de la sonde dans l'observation de l'interaction entre deux protéines pourrait être testée à l'aide du système protéique envisagé (cf sections 1.2 et 1.3), à savoir deux protéines connues pour interagir, TOR2 et FKBP, greffées à des GCN4 tronquées. En interagissant, ces protéines devraient créer un site de nucléation à partir duquel les GCN4 tronquées pourraient s'enrouler de façon à former un motif de leucine-zipper. Une fois ce motif formé, la sonde réagirait avec les cystéines des GCN4 maintenant placés adéquatement dans l'espace et un signal de fluorescence serait observé. Cependant, il est à noter que ce système n'a jamais été testé et une absence de fluorescence pourrait autant signifier que les GCN4 ne se sont pas enroulées adéquatement ou que la sonde n'a pas réagi avec les protéines d'intérêt. Ainsi, dans le cas d'une absence de fluorescence, il faudrait tester la sonde avec un système protéique davantage connu.

CHAPITRE 7

PARTIE EXPÉRIMENTALE

7.1 Synthèse de la sonde et de ses dérivés dithiolés

7.1.1 Matériel

Les produits commerciaux nécessaires pour la synthèse des différents composés proviennent des compagnies Sigma-Aldrich et Fluka et sont utilisés sans purification supplémentaire. Les solvants proviennent des compagnie Sigma-Aldrich et VWR.

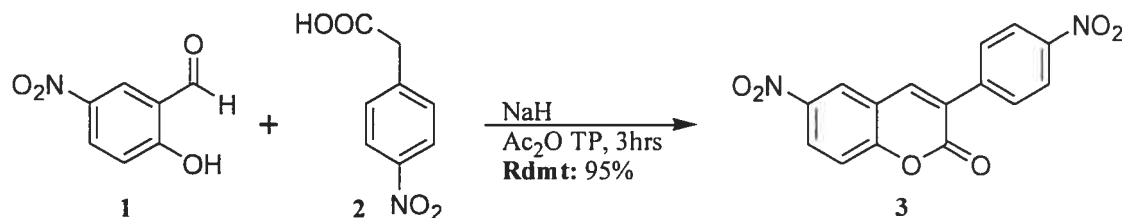
Les spectres RMN¹H et RMN¹³C ont été enregistrés sur des appareils Bruker AMX300 et AMX400 et sur des appareils AV-300 et AV-400. Les points de fusion ont été mesurés à l'aide d'un appareil Unimelt Thomas-Hoover. Les spectres de masse ont été effectués par le centre régional de spectrométrie de masse de l'Université de Montréal. Les spectres infrarouges ont été enregistrés sur un appareil de type Perkin Elmer FTIR

Les valeurs absorbance à une longueur d'onde donnée ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre U.V./visible Pharmacia Biotech Ultrospec 2000. Les spectres absorbance ont été enregistrés sur un spectrophotomètre U.V./visible Cary 100 Bio.

Les analyses en fluorescence ont été effectuées à l'aide d'un spectrofluorimètre Varian Eclipse. Les spectres d'excitation et d'émission ont été enregistrés en mode scan avec une fenêtre spectrale de 300 à 800 nm et des fentes d'excitation et d'émission de 5 nm. Les cinétiques ont été enregistrées en mode

kinetics avec des fentes d'excitation et d'émission de 5nm. Un seul stage était utilisé. Ce dernier avait un cycle de 30 secondes et se terminait après 120 minutes, alors que le temps moyen de chaque lecture (AveTime) était de 0,1 s. Les cuvettes utilisées sont des micro-cuvettes de quartz (1 cm x 0,2 cm) pouvant contenir 500 μ L de solution.

7.1.2 Synthèse du 6-nitro-3-(4-nitrophényl)-coumarine (3)



Dans un ballon de 50mL sont placés le 2-hydroxy-5-nitrobenzaldéhyde (1) (1,00 g, 6,00 mmol) et l'acide 4-nitrophénylacétique (2) (1,08 g, 6,00 mmol). L'anhydride acétique est ajouté et le milieu est agité une minute jusqu'à la dissolution des deux solides et l'obtention d'une solution jaune pâle. L'hydrure de sodium (60% dans l'huile, 240 mg, 6,00 mmol) est ajouté par petites portions, alors qu'un fort dégagement de gaz et de chaleur est observé. La solution est alors d'un jaune vif. Cette couleur s'estompe toutefois en quelques minutes, alors qu'un solide beige précipite. Le milieu est agité environ trois heures à température de la pièce. Le solide beige est ensuite filtré et lavé abondamment à l'éther diéthylique avant d'être séché sous pression réduite. Un solide poudreux beige est récupéré (1,77 g, 5,67 mmol) dans un rendement de 95%.

Pf. : décomposition > 230°C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : δ 8.79 (1H, d, *J*=2,7 Hz) 8.61 (1H, s) 8.47 (1H, dd, *J*=2,7 Hz et *J*=9,1 Hz) 8.36 (2H, d, *J*=9,0 Hz) 8.02 (2H, d, *J*=9,0 Hz) 7.71 (1H, d, *J*=9,0 Hz)

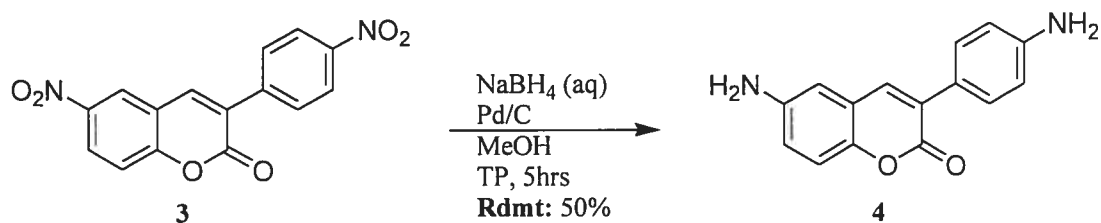
RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) : δ 159.33, 157.75, 148.32, 144.54, 142.15, 141.42, 130.73 (2 carbones), 127.77, 125.64, 124.39 (2 carbones), 120.42 (2 carbones), 118.50

IR : (pastilles de KBr) 3107 et 3059 cm^{-1} (C-H aromatiques), 1745 cm^{-1} (α -pyrone),
1519, 1347, 854 et 845 cm^{-1} (nitro) 1611 cm^{-1} (lien double conjugué)

SMHR : Calculée = 312,0382

Obtenu = 312,0384

7.1.3 Synthèse du 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine (4)



Dans un ballon de 50 mL sec est placé le catalyseur de palladium sur charbon (50% wet 50 mg). Le ballon est purgé à l'azote avant d'y introduire lentement à la seringue une solution de tétrahydroborate de sodium (40 mg, 1,06 mmol) dans l'eau (1mL). La solution jaune vif de 6-nitro-3-(4-nitrophényl)-coumarine (3) (500 mg, 1,28 mmol) dans le méthanol (20 mL) est ensuite ajoutée au milieu réactionnel. Le milieu est agité à température ambiante et son avancement est suivi par CCM. L'acétate d'éthyle 100% est utilisé comme éluant, alors que les révélateurs utilisés sont la lumière ultraviolette et la ninhydrine. L'apparition et la disparition d'un produit plus polaire que le composé 3, mais moins polaire que le composé 4 sont observés par CCM ($R_f = 0,79$). Il s'agit probablement d'un intermédiaire monoréduit. Après trois heures, la réaction n'est pas terminée, mais elle ne semble plus progresser. Un ajout de tétrahydroborate de sodium (40 mg, 1,06 mmol) dans l'eau (1 mL) est effectué et il y a une brève effervescence. Le milieu est agité encore deux heures, jusqu'à ce que la réaction soit terminée par CCM. Il est à noter qu'un autre ajout de tétrahydroborate de sodium peut s'avérer nécessaire pour compléter la réaction. Une fois la réaction terminée, le milieu réactionnel est filtré sur célite et une grande quantité de méthanol est utilisé pour récupérer le composé d'intérêt. Le filtrat, alors d'un jaune très vif, est évaporé de façon à obtenir un solide jaune vif un peu gommeux. Ce solide est purifié par chromatographie sur silice en utilisant l'acétate d'éthyle 100% comme éluant. Le produit brut n'étant pas soluble dans l'éluant utilisé, un remplissage à sec de la colonne a dû être effectué (*Dry pack*). La

purification mène à l'obtention d'un solide jaune très vif (80 mg, 0,32 mmol) dans un rendement de 50%

R_f 6-nitro-3-(4-nitrophényl)-coumarine (**3**) : 0,92 (100% acétate d'éthyle)

R_f 6-amino-3-(4-aminophényl)-coumarine (**4**) : 0,68 (100% acétate d'éthyle)

Pf. : décomposition vers 190°C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : δ 7.85 (1H, s) 7.45 (2H, d, *J*=8,5 Hz) 7.08 (1H, d, *J*=8,7 Hz) 6.77 (1H, dd, *J*=5,1 Hz et *J*=13,9 Hz) 6.59 (2H, d, *J*=8,5 Hz) 5.37 (2H, s) 5.20 (2H, s)

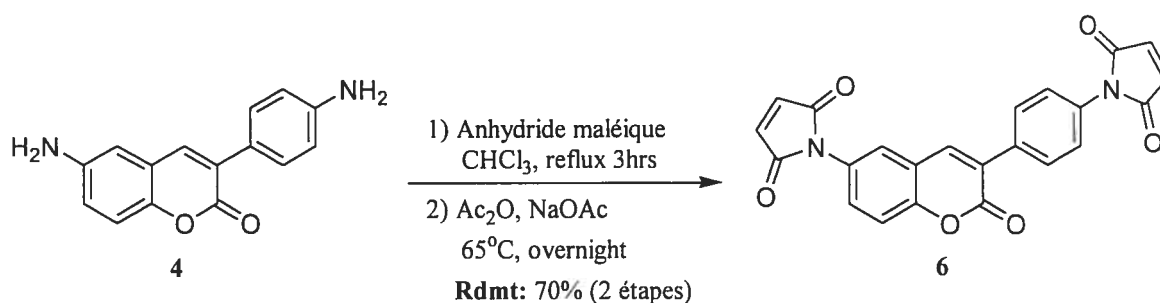
RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) : δ 161.29, 150.09, 137.84, 130.18, 127.62, 122.82 (2 carbones), 121.13 (2 carbones), 118.58 (2 carbones), 116.77, 114.07 (2 carbones), 110.70

IR : (pastilles de KBr) 3458, 3367, 3398, 3331 et 649 cm⁻¹ (NH₂), 3002 et 2935 cm⁻¹ (C-H aromatiques), 1693 (α-pyrone), 1575 (lien double conjugué)

SMHR : Calculée = 252,0899

Obtenue = 252,0898

7.1.4 Synthèse du 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (6)



Dans un ballon de 25 mL flambé est placé la 6-dinitro-3-(4-nitrophényl)-coumarine (4) (50mg, 0,19mmol) et le chloroforme (20 mL). Le milieu est agité quelques minutes, mais le solide ne se dissout pas complètement dans le solvant. L'anhydride maléique est ajouté (240 mg, 2,45 mmol) et le milieu est porté à reflux trois heures, alors qu'un solide jaune précipite. L'évolution de la réaction est suivie par CCM en utilisant acétate d'éthyle 100% comme éluant. Les révélateurs utilisés sont la lumière ultraviolette et la ninhydrine. Une fois le produit de départ disparu par CCM, le milieu est évaporé et un solide jaune pâle poudreux est obtenu. Ce solide contient le produit attendu, mais également l'excès d'anhydride maléique. Cet excès d'anhydride acétique peut être éliminé en plaçant le solide dans de l'eau (10 mL) et en agitant le milieu une heure. Le solide jaune intense peut ensuite être filtré et séché sous pression réduite. Il s'agit de l'acide maléamique correspondant (5) par RMN¹H du produit brut.

R_f (4) : 0,68 (100% acétate d'éthyle)

R_f (5) : 0,01 (100% acétate d'éthyle)

Dans un ballon flambé de 25 mL est placé la totalité du solide obtenu précédemment constitué d'un mélange du composé (5) et de l'excès d'anhydride maléique. L'anhydride acétique (10 mL) ainsi que l'acétate de sodium (70 mg, 0,84 mmol) sont ajoutés au milieu réactionnel et la solution est jaune. Le milieu est

agité à 65 °C pour une période d'environ 12 heures, alors que la solution passe au vert kaki et qu'un solide jaune vert floconneux précipite. Le milieu est amené à la température de la pièce et l'eau (10 mL) est ajoutée au milieu. Le milieu est placé à 4 °C quelques heures afin de permettre l'obtention d'un maximum de précipité. Le milieu est finalement filtré sur buchner, lavé à l'eau et séché sous pression réduite. Un solide jaune verdâtre est obtenu (56 mg, 0,14 mmol) dans un rendement de 72%.

Pf. : décomposition > 230°C

RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) : δ 8.35 (1H, s) 7.85 (2H, d, *J*=8,6 Hz) 7.78 (1H, d, *J*=1,9 Hz) 7.60 à 7,59 (2H, m) 7.45 (2H, d, *J*=8,8 Hz) 7.23 (2H, s) 7.21 (2H, s)

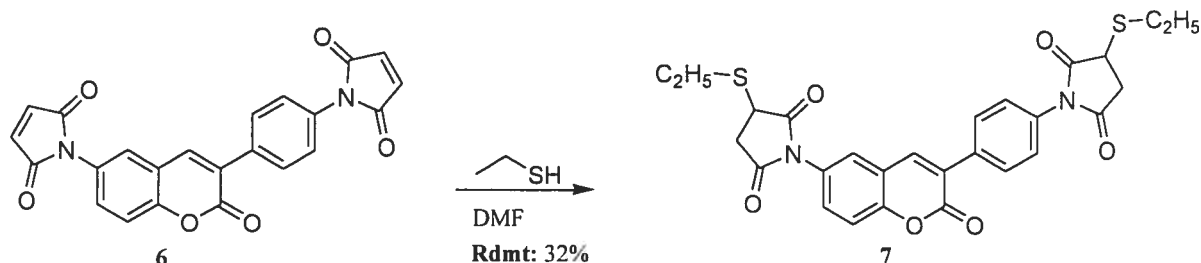
RMN ¹³C (100MHz, DMSO-d₆) : δ 169.94, 159.60, 152.04, 141.00, 134.90, 133.82, 131.96, 130.50, 130.11, 129.25, 127.88, 126.95, 126.50, 119.77, 117.40, 104.30 (certains signaux représentent plus d'un carbone)

IR : (pastilles de KBr) 3454 cm⁻¹ (amide), 3098 cm⁻¹ (C-H aromatiques), 1716 cm⁻¹ (α-pyrone), 1620 cm⁻¹ (lien double conjugué), 1142 cm⁻¹ (C-N amide)

SMHR : Calculée = 412,0695

Obtenue = 412,0710

7.1.5 Synthèse de la 6-(3-éthanesulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)-3-[4-(3-éthane-sulfanyl-pyrrolidine-2,5-dione)phényl]-coumarine (7)



Dans un ballon de 25 mL flambé est placé le 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (**6**) (50 mg, 0,12 mmol) et le DMF 100% (10 mL) pour mener à l'obtention d'une solution jaune clair. L'éthanethiol est ajouté (75 μ L, 63 mg, 1,01 mmol) et le milieu est agité à température ambiante pour deux heures, alors que le milieu passe au rouge. L'évolution de la réaction est suivie par CCM en utilisant l'acétate d'éthyle 100% comme éluant et la lumière ultraviolette comme révélateur. La réaction est considérée comme terminée lorsque le produit de départ est complètement disparu. Plusieurs produits sont présents sur la CCM du milieu réactionnel une fois la réaction terminée, mais certains correspondent aux différents diastéréoisomères obtenus par la réaction d'addition du thiol sur les groupements maléimides. Le solvant est ensuite évaporé et un solide rouge brun est obtenu. Ce solide est purifié par chromatographie sur silice en utilisant l'acétate d'éthyle 100% comme éluant. Un solide jaune citron (20 mg, 0,04 mmol) est obtenu avec un rendement de 32%.

R_f (**6**) = 0,70 (100% acétate d'éthyle)

R_f (**7**) = 0,86 (100% acétate d'éthyle)

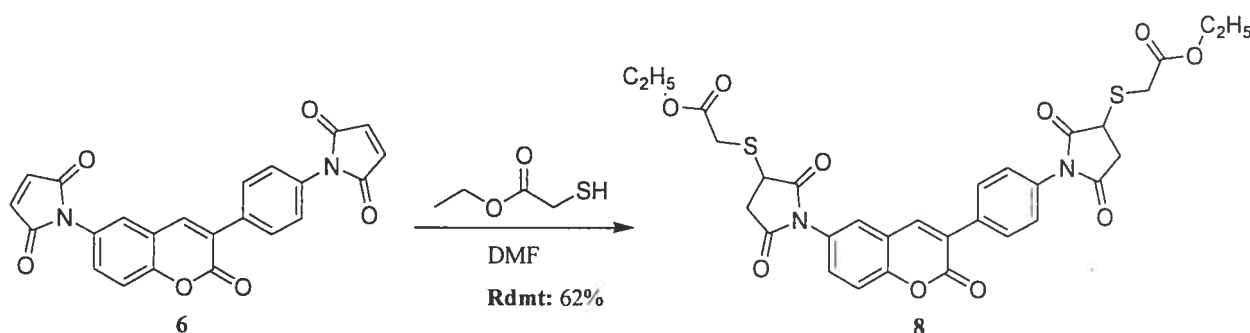
Pf. : décomposition > 230 °C

RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) : δ 8.39 (1H, s) 7.85 (2H, d, $J=8,4$ Hz) 7.74 (1H, d, $J=8,7$ Hz) 7.59 (1H, d, $J=8,9$ Hz) 7.59 (2H, dd, $J=2,2$ Hz et $J=8,7$ Hz) 7.38 (2H, d, $J=2,4$ Hz) 4.18 à 4.14 (2H, m) 3.42 à 3.35 (2H, m) 2.87 à 2.74 (6H, m) 1.25 (6H, t, $J=7,4\text{Hz}$)

SMHR : Calculée = 536,1076

Obtenue (m+1) = 537,1163

7.1.6 synthèse du 6-[3-(sulfanyl-acetic acid)-pyrrolidine-2,5-dione]-3-[4-(3-[sulfanyl-acetic acid]-pyrrolidine-2,5-dione)-phényl]-coumarine (8)



Dans un ballon de 25 mL flambé est placé le 6-maléimido-3-(4-maléimidophényl)-coumarine (**6**) (50 mg, 0,12 mmol) et le DMF 100% (10 mL) pour mener à l'obtention d'une solution jaune clair. Le 2-mercaptoacétate d'éthyle est ajouté (66 μ L, 72 mg, 0,6 mmol) et le milieu est agité à température ambiante pour quelques minutes alors que le milieu passe au rouge vif. L'évolution de la réaction est suivie par CCM en utilisant l'acétate d'éthyle 100% comme éluant et la lumière ultraviolette comme révélateur. La réaction est considérée comme terminée lorsque le produit de départ est complètement disparu. Plusieurs produits sont présents sur la CCM du milieu réactionnel une fois la réaction terminée, mais certains correspondent aux différents diastéréoisomères obtenus par la réaction d'addition du thiol sur les groupements maléimides. Le solvant est ensuite évaporé et une gomme rouge brun est obtenu. Ce solide est purifié par chromatographie sur silice en utilisant l'acétate d'éthyle 100% comme éluant. Puisque la gomme rouge brun n'est pas complètement soluble dans l'éluant utilisé, un remplissage à sec de la colonne est effectué. La purification mène à l'obtention d'un solide jaune pâle (49 mg, 0,07 mmol) avec un rendement de 62%.

R_f (**6**) = 0,70 (100% acétate d'éthyle)

R_f (**8**) = 0,84 (100% acétate d'éthyle)

Pf. : décomposition > 230°C

RMN ^1H (300 MHz, DMSO- d_6) : δ 8.37 (1H, s) 7.84 (2H, d, $J=8,5$ Hz) 7.74 (1H, d, $J=1,8$ Hz) 7.60 à 7.57 (2H, m) 7.52 (2H, d, $J=6,9$ Hz) 4.26 (4H, q, $J=3,9$ Hz) 4.10 (4H, m) 3.76 (1H, d, $J=15,6$ Hz) 3.60 (1H, dd, $J=14,9$ Hz et $J=1,5$ Hz) 3.40 à 3.22 (2H, m) 2.83 à 2.74 (2H, m) 1.19 (6H, t, $J=7,0$ Hz)

IR : (pastille de KBr) 3477 cm^{-1} (amide), 3068 cm^{-1} (C-H aromatiques), 2967 2929 et 1381 cm^{-1} (CH_2) 2554 cm^{-1} (C-S) 1717 cm^{-1} (α -pyrone), 1577 cm^{-1} (lien double conjugué), 1171 cm^{-1} (C-N amide)

SMHR : Calculée = 652,1185

Obtenue = 652,1167

7.2 Calcul des rendements quantiques

Des solutions de composé dont on veut calculer le rendement quantique de fluorescence sont préparées de façon à avoir une gamme d'absorbance à la longueur d'onde d'excitation entre 0,1 et 0,5. Généralement, des solutions de 5×10^{-6} , $7,5 \times 10^{-6}$, 10^{-5} et 2×10^{-5} mol/L sont préparées. L'absorbance de ces solutions à leur longueur d'onde d'excitation est mesurée et leur fluorescence est également enregistrée. L'aire sous le pic d'émission est intégrée, car ce sont ces valeurs qui seront comparées avec l'émission de la référence dans la détermination du rendement quantique de fluorescence du composé.

Une dizaine de solutions de fluoresceine de concentrations entre 5×10^{-6} et 10^{-3} mol/L sont préparées et l'absorbance de ces solutions est mesurée à la longueur d'onde d'excitation du composé dont on veut déterminer le rendement quantique. Le coefficient d'extinction molaire de la fluoresceine à cette longueur d'onde est ainsi déterminé.

Des solutions de fluoresceine sont préparées de façon à ce que leur absorbance à la longueur d'onde d'excitation coïncide avec l'absorbance des solutions du composé dont on veut déterminer le rendement quantique de fluorescence. La fluorescence de ces solutions est également enregistrée et l'aire sous le pic d'émission est intégrée.

Le rapport de l'aire sous les pics d'émission des solutions de composé à analyser et de fluoresceine de même absorbance est effectué. Le résultat obtenu est multiplié par le rendement quantique de la référence (Cf sections 3.1.2 et 3.4.2) pour obtenir le rendement quantique du composé analysé.

7.3 Expression et purification de TRX C35A et réaction avec la sonde (6)

7.3.1 Matériel

Les produits utilisés dans la préparation des tampons et des solutions nécessaires à l'expression et à purification de la protéine proviennent des compagnies Sigma-Aldrich et BioRad et sont utilisés dans purification supplémentaire.

Les valeurs absorbance à une longueur d'onde donnée ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre U.V./visible Pharmacia Biotech Ultrospec 2000. Les analyses en fluorescence ont été effectuées à l'aide d'un spectrofluorimètre CaryEclipse ainsi que sur un lecteur de plaque Perkin Elmer HTS 7000 (Bio assay Reader)

Les gels d'électrophorèse ont migré grâce à une source de potentiel Bio Rad Power PAC 300.

Les photos des gels d'électrophorèse ont été enregistrées à l'aide d'une caméra de BioRad couplée au logiciel Quantity One de BioRad.

7.3.2 Solutions

Le milieu LB (Luria Broth) est une solution aqueuse contenant de la caséine peptone (1% p/p), de l'extrait de levure (0,5% p/p) et du NaCl (1% p/p). Le pH du milieu est d'environ 7,0.

Le milieu SOB (Sorbitol Bétaïne) est une solution aqueuse contenant du bacto tryptone (2% p/p), de l'extrait de levure (0,5% p/v), du NaCl (10mM), du KCl (2,5mM), du MgCl₂ (10mM) et du MgSO₄ (10mM). Le pH du milieu est entre 6,7 et 7,0.

Le milieu TB (transfert buffer) est composé du tampon Pipes (acide 1,4-piperazinebis(éthanesulfonique) (10mM) auquel est ajouté du MnCl₂ (55mM), de CaCl₂ (15mM) et du KCl (250mM). Le pH du milieu est de 6,7.

Le tampon de lyse est constitué de tampon phosphate (50mM) de pH de 8,0 auquel est ajouté du NaCl (300mM) et de l'imidazole (20mM).

L'éluant 1 est composé de tampon phosphate (50mM) de pH de 7,0 auquel est ajouté du NaCl (300mM) et de l'imidazole (20mM).

L'éluant 2 est composé de tampon phosphate (50mM) de pH de 7,0 auquel est ajouté du NaCl (300mM) et de l'imidazole (100mM).

L'éluant 3 est composé de tampon phosphate (50mM) de pH de 7,0 auquel est ajouté du NaCl (300mM) et de l'imidazole (250mM).

Le tampon de remplissage (*SDS-tricine-loading-buffer*) est composé de tampon tricine (0,375M, pH = 8) contenant du SDS (10% p/v), du 2-mercaptoéthanol (5% v/v), du glycérol (10% v/v) et du bleu de bromophénol (1% p/v).

Le gel de séparation (tricine 0,375M, pH = 8, 12%) est préparé en ajoutant à du tampon tricine (1,5M, pH < 8,8, 7,2mL) de l'eau déionisée (0,78mL), de l'acrylamide (40%, 4,80mL), du bis-acrylamide (2%, 3,00mL), du glycérol (50%, 4mL) le persulfate d'ammonium (10%, 0,20mL) et de TMED (N,N,N',N'-tétraméthylènediamine) (0,05%, 0,025mL).

Le gel de concentration (tricine 0,125M, pH = 6,8, 4,0%) est préparé en ajoutant à du tampon tricine (1,5M, pH = 6,8, 7,04mL) de l'acrylamide (40% v/v, 1,20mL), du bis-acrylamide (2%, 0,75mL), le persulfate d'ammonium (10%, 0,10mL) et le TMED (0,005%, 0,015mL).

La solution de coloration a été préparée en ajoutant le bleu de brillant de Coomassie (0,1%v/v dans l'eau) à une solution aqueuse de méthanol (40% v/v) et d'acide acétique (10% v/v).

La solution de décoloration est une solution aqueuse de méthanol (30% v/v) et d'acide acétique (10% v/v) dans l'eau.

Le tampon utilisé pour les tests entre la sonde et la protéine est du MOPS 25mM de pH = 7,5.

Le tampon dénaturant est composé de tampon MOPS 25mM de pH = 7,5 contenant 7,75mol/L de guanidinium.

7.3.3 Préparation de cellules bactériennes *E. coli* BL21-pRep4

225 mL de milieu de culture LB sont placés dans un erlenmeyer stérile de 1000 mL. La kanamycine est ensuite ajoutée au milieu (25 μ g/mL) ainsi que 1,25mL de la pré-culture contenant les bactéries *E. coli* BL21-pRep4. Le milieu est placé à l'incubateur à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,6, ce qui prend environ 4 heures. Le milieu est ensuite mis dans la glace une dizaine de minutes afin d'arrêter la croissance des bactéries et il est centrifugé à 4000 rpm durant 10 minutes à 0 °C. Le culot contenant les cellules compétentes est resuspendu dans 20 mL de tampon de transfert (TB) glacé et du DMSO y est ajouté de façon à ce que sa concentration finale soit de 7%. Le milieu est ensuite aliquoté en portions de 400 μ L et les aliquots sont saisis dans un bain d'éthanol/glace sèche avant d'être placés à -80 °C.

7.3.4 Transformation des cellules bactériennes par le vecteur PQE32 résistant à l'ampicilline et contenant le gène de la TRX C35A

Un aliquot de cellules compétentes dans du TB est décongelé dans la glace de même que le tube de la solution-mère contenant le vecteur (80 ng/ μ L). Un μ L de la solution-mère du vecteur est dilué dans l'eau distillée de façon à avoir une solution de vecteur de concentration égale à 1ng/ μ L. Un μ L de cette solution (donc 1 ng de vecteur) est prélevé et ajouté à 200 μ L de bactéries compétentes. La solution est placée à 42 °C durant 60 secondes afin de créer un choc thermique où les bactéries incorporent le vecteur à l'intérieur de leur paroi cellulaire. Le milieu est ensuite placé dans la glace afin de refermer les parois des bactéries. La solution est placée dans un tube contenant 1mL de LB et le tout est placé à l'incubateur à 37 °C pour une vingtaine de minutes. Le milieu ainsi que sa dilution 1/100 sont ensuite étalés sur une gélose contenant les antibiotiques ampicilline et kanamycine. La gélose est placée à l'incubateur à 37 °C pour la nuit afin de laisser pousser les bactéries.

7.3.5 Expression de la protéine TRX C35A

Les colonies retrouvées le lendemain sur la gélose ne contiennent que les bactéries transformées. Une des colonies est sélectionnée pour effectuer l'expression de la protéine d'intérêt. Pour ce faire, une colonie est grattée de la gélose à l'aide d'un embout de plastique et cet embout est ensuite déposé dans 20 mL de milieu de culture SOB. Les antibiotiques ampicilline et kanamycine sont ajoutés au milieu et le tout est incubé à 37 °C pour la nuit. Le lendemain, le contenu du tube est versé dans un erlenmeyer stérile de 2 L contenant 250 mL de tampon de transfert. Les antibiotiques ampicilline et kanamycine sont encore une fois ajoutés au milieu pour éviter toute contamination bactérienne extérieure. Les bactéries sont mises à croître à 37 °C jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm d'environ 0,85. Cela prend environ quatre heures. L'IPTG est ajouté au milieu de façon à obtenir une concentration en inducteur de 1 mM. L'induction de l'expression de la protéine est effectuée sur une période de quatre heures à 37 °C. Le milieu est ensuite centrifugé à 3500 rpm durant 10 minutes et le culot est conservé à -80 °C jusqu'au lendemain.

7.3.6 Purification de la protéine TRX C35A

Le culot contenant les bactéries ayant exprimé la protéine d'intérêt est décongelé dans la glace et resuspendu dans une dizaine de mL de tampon de lyse. 4 mg de lysosyme en poudre sont ajoutés au milieu et le tout est laissé une demi-heure sur la glace. Les bactéries sont ensuite soniquées par échantillons de 5 mL dans des tubes à essais de 15 mL. durant trente secondes. Le milieu est ensuite laissé dans la glace une minute avant d'être resoniqué une minute. Les échantillons sont ensuite recombinaés et centrifugés à 4 °C. Le surnageant contenant la protéine d'intérêt est conservé pour les étapes subséquentes. Le culot est également conservé à titre de contrôle.

2 mL de solution contenant la résine Ni-NTA-agarose dans l'éthanol (1:1 v/v) est placée dans une colonne. L'éthanol est élué et un peu de tampon MOPS 50mM pH = 7,5 est également passé sur la colonne afin d'en laver toute trace d'éthanol. Le surnageant récupéré à l'étape précédente est placé sur la résine et la colonne est agitée doucement durant environ une heure. Le solvant est ensuite vidé de la colonne, alors que la résine se compacte tranquillement. Les composantes cellulaires indésirées sont éluées avec une dizaine de mL de tampon de lyse, puis avec deux portions de l'éluant 1. La protéine d'intérêt est finalement éluée à l'aide d'une portion d'un mL de l'éluant 2, puis à l'aide de 3 portions d'un mL de l'éluant 3.

La solution contenant la protéine d'intérêt est dialysée. Pour ce faire, des membranes de Cellophane™ sont coupées en portions d'environ 10cm de long et placées dans l'eau déionisée pour une dizaine de minutes afin qu'elles gonflent. Les membranes sont ensuite fermées à une extrémité à l'aide d'une pince de façon à former une poche à l'intérieur de laquelle les fractions récoltées lors de l'éluion 2 et 3 sont placées. La deuxième extrémité de la poche est également refermée à l'aide d'une pince et le sac ainsi formé est placé dans un cylindre gradué de 2 L contenant 2 L de tampon MOPS (50 mM, pH = 7,5) et le tout est agité à l'aide d'un barreau magnétique à 4 °C pour une période de douze heures. La solution contenue dans le cylindre gradué est remplacée par une nouvelle portion de tampon et le milieu est encore agité à 4 °C pour une période de huit heures.

Le contenu des sacs de dialyse est finalement récupéré et aliquoté par échantillons de 100 µL. Les aliquots sont saisis dans l'azote liquide puis conservés à -80 °C.

7.3.7 SDS-Page

Un échantillon de 25 μL du surnageant provenant de la centrifugation suivant la sonication a été récupéré en plus d'un échantillon de chacun des lavages avec l'éluant 1 ainsi que de l'élution avec l'éluant 2 et des trois éluions avec l'éluant 3. À chacun de ces échantillons a été ajouté un volume équivalent de tampon de remplissage (*SDS-tricine-loading buffer*).

Le montage à électrophorèse est d'abord assemblé. Le gel de séparation est préparé et coulé à l'aide d'une pipette pasteur jusqu'à environ 1 cm sous l'endroit où se termine le peigne. Un peu d'isopropanol est ajouté au-dessus du gel de séparation pour éviter la formation de bulles d'air dans le gel. Une période de 45 minutes à une heure est nécessaire à la polymérisation du gel. Une fois le gel de séparation polymérisé, l'isopropanol est enlevé à l'aide d'un papier absorbant et le gel de concentration est préparé et est coulé par dessus le gel de séparation. Le peigne est enfoncé dans le haut du gel de concentration et une période de 30 à 45 minutes est nécessaire pour que le gel polymérise. Le peigne est ensuite retiré du gel avec précaution.

Les plaques entre lesquelles se trouve le gel sont détachées du support et placées dans l'appareil à électrophorèse. Les échantillons ainsi qu'un échantillon de référence de poids moléculaire sont placés dans les puits du gel et les tampons de cathode et d'anode sont placés respectivement en haut et en bas du gel. Un potentiel de 70 V est appliqué le temps que le front de solvant traverse le gel de concentration, puis un potentiel de 140 V est appliqué pour le reste de la migration. Le gel est ensuite retiré des plaques de verre et placé dans un récipient contenant la solution de coloration en quantité suffisante pour couvrir le gel. Le récipient est placé dans un four à micro-onde conventionnel à puissance maximale pour une minute. La solution de coloration est ensuite remplacée par la solution de décoloration encore une fois en quantité suffisante pour que le gel soit couvert. Un papier absorbant est placé en

boule dans le récipient afin d'absorber le colorant. Le récipient est agité doucement une douzaine d'heures, alors que le gel se décolore sauf aux endroits où il y a des protéines.

7.3.8 Quantification de la protéine à l'aide du test de Bradford

La courbe étalon est d'abord tracée en utilisant une solution d'IgG (bovine gamma globuline) de concentration connue.⁴ Six dilutions de la solution-mère d'IgG (1430 $\mu\text{g/mL}$) ont été effectuées de façon à obtenir des concentrations de protéines couvrant le domaine de linéarité de la méthode, soit entre 50 et 500 $\mu\text{g/mL}$. Le colorant réactif⁴ contenant du Bleu Brillant de Coomassie et dilué $\frac{1}{4}$ dans l'eau distillée est ajouté à chacune des dilutions de façon obtenir 200 μL d'une solution contenant 195 μL de colorant en plus de la protéine d'intérêt. L'absorbance des solutions est mesurée à 595 nm et la courbe étalon est tracée.

Des dilutions (1/2,5, 1/5, 1/7,5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100) d'un aliquot contenant la protéine d'intérêt sont ensuite effectuées afin d'obtenir une absorbance se situant à l'intérieur du domaine de linéarité de la courbe étalon. L'absorbance de la dilution 1/50 remplissant cette condition, la concentration des aliquots en protéine a été calculée à partir de cette solution. Ainsi, les aliquots contiennent 115 $\mu\text{g/mL}$ de TRX C35A.

7.3.9 Réactions entre TRX C35A et la sonde élaborée (6)

200 μL d'une solution contenant $5,73 \times 10^{-6}$ mol/L de la sonde (6) sont préparés en prélevant 1,2 μL d'une solution-mère ($9,74 \times 10^{-4}$ mol/L dans le DMSO 100%). 8,8 μL de DMSO sont ajoutés afin que la proportion de solvant organique soit de 10%. 83,9 μL de tampon dénaturant (7,75 mol/L dans le MOPS 25 mM) sont

également ajoutés pour que la concentration de guanidinium dans le milieu soit de 3,25 mol/L. C'est une solution de référence (blanc1).

200 μL d'une solution contenant $5,73 \times 10^{-6}$ mol/L de protéine TRXC35A sont préparés en prélevant 1,2 μL d'une solution-mère ($9,74 \times 10^{-4}$ mol/L). 83,9 μL de tampon dénaturant (7,75 mol/L dans le MOPS) sont ajoutés pour que la concentration de guanidinium dans le milieu soit de 3,25 mol/L. 10,0 μL de DMSO y sont aussi ajoutés pour que la proportion de solvant organique dans le milieu soit de 10%. C'est une solution de référence (blanc2).

200 μL d'une solution contenant $5,73 \times 10^{-6}$ mol/L de protéine TRXC35A et $5,73 \times 10^{-6}$ mol/L de sonde (6) sont préparés en prélevant 1,2 μL de la solution mère de sonde ($9,74 \times 10^{-4}$ mol/L) ainsi que 1,2 μL de la solution-mère de protéine ($9,74 \times 10^{-4}$). 8,8 μL de DMSO sont ajoutés de façon à ce que la quantité de solvant organique dans le milieu soit de 10%. 83,9 μL de tampon dénaturant sont ajoutés de façon à ce que la concentration de guanidinium dans le milieu soit de 3,25 mol/L.

L'évolution de la fluorescence de ces trois solutions est enregistrée sur une période de deux heures à raison d'une lecture par 5 minutes à l'aide d'un lecteur de plaque en mode fluorescence. Les longueurs d'onde d'excitations et d'émissions utilisées sont respectivement de 370 nm et de 419 nm. Des échantillons de 10 μL sont prélevés de chacune des trois solutions pour être analysés par gel d'électrophorèse.

2 μL d'éthanthiol sont ensuite ajoutés à chacun des puits et la fluorescence de ces solutions est enregistrée sur une période d'environ 4 heures à raison d'une lecture par 5 minutes.

Des échantillons de 10 μL sont prélevés de chacune des trois solutions pour être analysés par gel d'électrophorèse.

Un SDS-Page est effectué tel qu'expliqué à la section 7.3.7. Ce gel est révélé en fluorescence en l'irradiant à l'aide d'une lampe U.V. à large spectre (short wave) et en observant l'émission dans le domaine du visible à l'aide d'une caméra. Le gel a également été révélé au Bleu brillant de Coomassie afin de situer les protéines.

RÉFÉRENCES

- 1- Elliott, W.H., Elliott, D.C. *Biochemistry and Molecular Biology*, Second Edition, Oxford University Press Inc, New York, **2001**, pp 33-47
- 2- Ewing, B., Green, P. *Nature genetics* **2000**, *25*, 232
- 3- Remy, I., Michnick, S.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 5394
- 4- Bio-Rad Protein Assay Instruction Manual, *Bio-Rad Laboratories*, 1-800-424-6723
- 5- Hurton, Moran, Oches, Rawn, Scrimgeour. *Principes de Biochimie*, Éditions DeBoeck Université, **1994**
- 6- Griffin, A.B., Adams, S.R., Tsien, R.Y., *Science* **1998**, *28*, 269
- 7- Adams, S.R., Campbell, R.E., Gross, L.A., Martin, B.R., Walkup, G.K., Yao, Y., Llopis, J., Tsien, R.Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6063
- 8- Lin, H., Cornish, V.W., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (5), 871
- 9- Ray, P., Pimenta, H., Paulmurugan, R., Berger, F., Phelps, M.E., Iyer, M., Gambhir, S.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99* (5), 3105
- 10- Rossi, F., Charlton, C.A., Blau, H.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8405
- 11- Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Second Edition, Kluwer Academic Press / Plenum Publishers, New York, **1999**, pp.1-21, 25-40, 63-89, 446-480, 531-532
- 12- Heyduk, E., Heyduk, T. *Anal. Biochem.* **1997**, *248*, 216
- 13- Day, R.N., Nordeen, S.K., Wan, Y. *Anal. Biochem.* **2002**, *306*, 50
- 14- Pelletier, J. N., Campbell-Valois, F.-X., Michnick, S.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12141
- 15- Gapski, G.R., Whiteley, J.M., Rader, J.I., Cramer, P.L., Henderson, G.B., Neef, V., Huennekens, F.M. *J. Med. Chem.* **1975**, *18* (5), 526
- 16- Kaufman, R.J., Bertino, J.R., Schimke, R.T. *J. Biol. Chem.* **1978**, *16* (25), 5852
- 17- Blakely, B.T., Rossi, F.M.V., Tillotson, B., Palmer, M., Estelles, A., Blau, H.M. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 218

- 18- Braden, C., Tooze, J. *Introduction to Protein Structure* Garland Publishing Inc. New York, **1991**, 285 pages
- 19- Kammerer, R.A., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A., Engel, J., Aebi, U., Steinmetz, M.O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13419
- 20- O'Shea, E., Klemm, J.D., Kim, P.S., Alber, T. *Science* **1991**, *254*, 539
- 21- Kanaoka, Y. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1977**, *16*, 137
- 22- Davidson, R.S., Hilchenbach, M.H. *Photochem. Photobiol.* **1990**, *52* (2), 431
- 23- Langmuir, M.E., Yang, J.-R., Moussa, A.M., Laura, R., LeCompte, K.A. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (23), 3989
- 24- Soine, T.O. *J.Pharm. Sci.* **1964**, *53* (3), 231
- 25- Johnson, J.R. *Org. React.* **1942**, *1*, 210
- 26- Holden, M.S., Crouch, D. *J. Chem. Ed.* **1998**, *75* (12), 1631
- 27- Sethna, S., Phadke, R. *Org. React.* **1953**, *7*, 1
- 28- Bigi, F., Chesini, L., Maggi, R., Sartori, G. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1033
- 29- Padmanabhan, S., Peri, R., Triggle, D. *J. Synth. Commun.* **1996**, *26* (4), 827
- 30- Watson, B.T., Christiansen, G.E. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 6087
- 31- Sugino, T. Tanaka, K. *Chem. Lett.* **2001**, *30* (2), 110
- 32- Narasimhan, N.S., Mali, R.S., Barve, M.V. *Synthesis* **1979**, 906
- 33- Yavari, I., Hekmat-Shoar, R., Zonouzi, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2391
- 34- Shirner, R.L. *Org. Réact.* **1942**, *1*, 1
- 35- Khandekar, A.C., Bhushan, M.K., *Synlett* **2002**, *1*, 152
- 36- Thomas, R.W., Leonard, N.J. *Heterocycles* **1976**, *5*, 839
- 37- Russo, A. *Methods of Biochemical Analysis* **1988**, *33*, 165
- 38- Webb, J.L., *Enzymes and Metabolic Inhibitors*, Vol.3, Academic Press, New York, **1966**, pp.337-343
- 39- Kanaoka, Y., Machida, M., Ando, K., Sekine, T. *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, *207*, 269
- 40- Wu, Y.-W., Yarbrough, L.R., Wu, F.Y.-H. *Biochemistry* **1976**, *15* (13), 2863
- 41- Kanaoka, Y., Machida, M., Kokubun, H., Sekine, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1968**, *16* (9) 1747

- 42- Machida, M., Ushijima, N., Machida, M.I., Kanaoka, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, *23* (6), 1385
- 43- Girouard, S. *Élaboration d'un fluorophore permettant une étude d'apposition protéique*. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, **2000**
- 44- Girouard, S., Keillor, J.W. Résultats non publiés
- 45- Yang, J.-R., Langmuir, M.E. *J. Heterocyclic Chem.* **1991**, *28*, 1177
- 46-Reddy, B.M., Reddy, V.R., Giridhar, D. *J. Synth. Commun.* **2001**, *31* (23), 3603
- 47- Khandekar, A.C., Khadilkar, B.M. *Synlett* **2001**, *1*, 152
- 48- Ege, S. *Organic Chemistry, Structure and Reactivity* Third Edition, D. C. Health and Company, Lexington, **1994**, p709
- 49- Eguchi, S., Yamashita, K., Matsushita, Y., Kakehi, A. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4006
- 50- Ling, C., Lahti, P.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8784
- 51- Halterman, R.L., McEvoy, M.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 980
- 52- Krolski, M.E., Renaldo, A.F., Rudisill, D.E., Stille, J.K. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1170
- 53- Webb, R.R., Venuti, M.C., Eigenbrot, C. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4706
- 54- Merlic, C.A., Motamed, S., Quinn, B. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3365
- 55- Cowan, J.A. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27* (10), 1205
- 56- Kokotos, G., Tzougraki, C. *J. Heterocyclic. Chem.* **1986**, *23*, 87
- 57- Petrini, M., Ballini, R., Rosini, G. *Synthesis* **1987**, 713
- 58- Reddy, P.Y., Kondo, S., Fujita, S., Toru, T. *Synthesis* **1998**, 999
- 59- Hoveyda, H.R., Hall, D.G. *Org. Lett.* **2001**, *3* (22), 3491
- 60- Mangaleswaran, S., Argade, N.P. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 3290
- 61- Weltman, J.K., Szaro, R.P., Frackelton, A.R., Dowben, R.M. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248* (9), 3173
- 62- Walker, M.A. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5352
- 63- Corrie, J.E.T. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 2975
- 64- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. *Chimie Analytique*, 7^e Édition, DeBoeck Université, Paris, **1997**, pp557-610

- 65- Burdette, S.C., Walkup, G.K., Spingler, B., Tsien, R.Y., Lippard, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7831
- 66- Kuznetsova, N.A., Kaliya, O.L. *Russ. Chem. Rev.* **1992**, *61* (7), 683
- 67- Aldrich Handbook of fine Chemicals and Laboratory Equipment, 2000-2001
- 68- Pohl, E.R., Wu, D., Hupe, D.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (8), 1759
- 69- Voet, D., Voet, J.G. *Biochemistry* John Wiley & Sons, New York, **1990**, 1223 pages
- 70- www.qiagen.com
- 71- Bauer, H., Kanzok, S.M., Schirmer, R.H. *J. Biol. Chem.* **2002**, *20*, 17457
- 72- <http://www.stratagene.com>
- 73- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. *Gene*, **1990**, *96*, 23
- 74- Bio-Rad Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell Instruction Manual, *Bio-Rad Laboratories*, 1-800-424-6723