



**HAL**  
open science

# Etude des mécanismes d'accumulation de l'iode chez l'algue brune *Laminaria digitata* et chez les mammifères

Elodie Verhaeghe

► **To cite this version:**

Elodie Verhaeghe. Etude des mécanismes d'accumulation de l'iode chez l'algue brune *Laminaria digitata* et chez les mammifères. Chimie. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT : . tel-00351112

**HAL Id: tel-00351112**

**<https://theses.hal.science/tel-00351112v1>**

Submitted on 8 Jan 2009

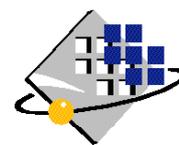
**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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

N° D'ORDRE : 8849



UNIVERSITE PARIS-SUD XI  
Faculté des Sciences d'Orsay



## **THÈSE DE DOCTORAT**

**SPECIALITE : CHIMIE**

*Ecole Doctorale de Chimie de Paris-Sud*

Présentée par :

Elodie VERHAEGHE

*Etude des mécanismes d'accumulation de l'iode  
chez l'algue brune *Laminaria digitata* et chez les mammifères*

Thèse soutenue le 23 novembre 2007 devant la commission d'examen :

Pr. Jean Cros	Rapporteur
Dr. Bernard Kloareg	Rapporteur
Pr. David Bonnaffé	Président du jury
Dr. Bernard Rousseau	Directeur de thèse
Dr. Philippe Potin	Examineur
Dr. Yves Ambroise	Examineur



## Résumé :

Ce travail s'inscrit dans le projet iode du programme inter-organismes de Toxicologie Nucléaire Environnementale (TOXNUC-E) qui vise à mieux comprendre les voies biologiques de transferts et de concentration spécifiques à l'iode qui sont directement liées à sa dissémination dans la biosphère et à la toxicité de ses isotopes. Dans ce contexte, nous avons étudié, par des stratégies de génétique chimique, le mécanisme d'accumulation de l'iode chez deux modèles biologiques : les algues brunes (et plus précisément les laminaires) et les mammifères.

Chez les algues brunes, les halopéroxydases à vanadate (vHPO) seraient des enzymes clés du métabolisme iodé : elles assureraient la captation de l'iode et participeraient à la biosynthèse de composés volatils iodés. Pour vérifier ces hypothèses, nous avons mis en place une stratégie de génétique chimique inverse dans le but d'étudier *in vivo* les effets de l'invalidation des vHPO. A cette fin, nous avons réalisé un test de criblage à haut-débit sur la bromopéroxydase à vanadate d'*Ascophyllum nodosum* pour identifier des inhibiteurs de cette enzyme. Les tests secondaires ont montré que les hits sélectionnés ne sont pas des inhibiteurs mais qu'ils sont très réactifs envers les espèces oxydées de l'iode générées par l'enzyme. Un test *in vivo* a permis de montrer que ces molécules inhibent l'influx des iodures par *Laminaria digitata*, ce qui corrobore l'implication d'une vHPO dans ce mécanisme. De plus, nous avons étudié la distribution tissulaire et subcellulaire de l'iode chez *L. digitata* par microsonde nucléaire et par microsonde SIMS. Cette étude a mis en évidence que l'iode est principalement stocké au niveau du tissu périphérique dans le compartiment apoplastique et non au sein de structures intra-cellulaires. Cette découverte remet en cause le modèle de captation des iodures proposé dans la littérature et ouvre de nouvelles perspectives de recherche.

En ce qui concerne le modèle mammifère, nous avons poursuivi les travaux concernant les inhibiteurs de la captation des iodures chez des modèles cellulaires exprimant le symporteur Na<sup>+</sup>/I thyroïdien en mettant au point leur synthèse, en validant leur activité et en initiant la recherche de leur protéines cibles par photomarquage d'affinité.

**Mots clés :** Iode, *Laminaria digitata*, halopéroxydase à vanadate, criblage à haut-débit, microsonde SIMS, microsonde nucléaire, symporteur Na<sup>+</sup>/I, inhibiteur.



## Remerciements :

J'ai une pensée particulière pour Charles Mioskovski qui a beaucoup œuvré pour le Service de Chimie Bioorganique et de Marquage et qui a permis l'existence de mon sujet de thèse.

Je tiens à remercier très chaleureusement M. Bernard Kloareg, M. Jean Cros et M. David Bonnaffé d'avoir accepté d'être membres de mon jury et d'avoir lu attentivement et critiqué mon manuscrit. Je garde un très bon souvenir de ma séance de questions qui a constitué un véritable échange d'idées et que j'aurais bien voulu prolonger un peu plus !

Je tiens à remercier le programme de Toxicologie Nucléaire Environnementale pour avoir financé cette thèse et m'avoir donné l'opportunité d'évoluer dans un contexte multidisciplinaire très enrichissant. Je remercie vivement Marie-Thérèse Ménager, coordinatrice du programme, pour son dévouement, son enthousiasme communicatif et sa gentillesse.

Je remercie Bernard Rousseau pour son humour, son dynamisme et pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse dans les derniers mois de mon contrat.

Je remercie Yves Ambroise, mon encadrant, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de travailler sur des thématiques très intéressantes et originales. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour sa disponibilité, la correction de mon manuscrit et les conseils judicieux qu'il m'a donnés pour la rédaction et les présentations.

Je tiens à remercier toutes les personnes avec lesquelles j'ai travaillé à travers le programme TOXNUC-E.

Je remercie tout particulièrement Philippe Potin, coordinateur du projet iode (thématique algues), pour son enthousiasme, sa gentillesse, ses encouragements et ses éclairages scientifiques. Je lui suis reconnaissante pour la confiance qu'il m'a témoignée et le travail que nous avons fait tous ensemble en imagerie. Je le considère un peu comme mon second directeur de thèse (même s'il refuse le titre !).

Je remercie chaleureusement Catherine Leblanc pour sa gentillesse, sa positivité et sa grande disponibilité. J'ai une pensée amicale pour les physiologistes du groupe : Bruno Fievet et Claire de l'IRSN. Je remercie également Thierry Pourcher, coordinateur iode (thématique mammifères) pour les échanges que nous avons eus sur la dernière thématique de ma thèse.

Je tiens à adresser un immense merci à Jean-Luc Guerquin-Kern et à Richard Ortega pour la spontanéité avec laquelle ils ont accepté de travailler avec nous ainsi que les efforts qu'ils ont fournis pour mener à bien les études d'imagerie sur *L. digitata*. Je les remercie aussi pour toutes les explications qu'ils m'ont données (avec une mention spéciale à Jean-Luc !). Je remercie également Ting-Di Wu pour ses explications et les expériences de SIMS ainsi que Guillaume Devès et Aurélien Fraysse pour le traitement des données brutes de sonde nucléaire.

J'ai aussi une pensée particulière pour Frithjof Kuepper avec qui j'ai passé un intéressant séjour à l'EMBL, à Hambourg.

Un gros merci au laboratoire combi où j'ai effectué la plus grande partie de mes manips.

Je remercie Roman Lopez et Goulven Merer du SCBM qui ont participé à la réalisation du test de criblage. Je remercie également Goulven pour son aide et ses coups de pouce pour la résolution des problèmes techniques.

Un gros merci à Nathalie pour sa gentillesse, son dynamisme et pour la patience avec laquelle elle m'a expliquée la culture cellulaire. J'ai une pensée particulière pour les anciens post-docs de la combi : Virginie, Michael et Anne-Laure ainsi que pour Ronald avec lesquels il était bien agréable de faire un brin de causette entre deux manips.

Un gros merci à mon laboratoire de rattachement : la recherche.

Je remercie Marie-Pierre Heck pour sa vivacité et sa gentillesse ainsi que Thierry Legall aussi pour les discussions cinéma, son humour décalé et son flegme « so british ».

Un gros merci à mon compagnon de bureau, Benoît, avec qui j'ai refait mille fois le monde et pour la force herculéenne dont il a fait preuve lors des remplissages de l'aquarium... En parlant d'aquarium, comment ne pas évoquer le duo terrible Julie-Maude. Merci les filles pour ces trois folles années et, en particulier, pour les moments de rire, d'excitation et votre soutien ! Une pensée à Aurélie et à Brice, mes deux autres camarades de bureau... Courage pour les derniers mois !

Je remercie également Xavier, les stagiaires, post-docs et thésards qui sont passés à la recherche pendant ma thèse ainsi que l'équipe d'Eurisotop, en particulier, les deux Fred.

Un gros merci à tous les autres thésards et post-docs que j'ai connus au SCBM et, en particulier, à Marie-Laure avec qui, j'espère, pouvoir faire d'autres soirées, à Stéphane avec qui il était bon d'évoquer le sud (peut-être se reverra-t-on à Nice ?), à Aude, à Delphine, à Guillaume ... et j'en oublie...

Je tiens aussi à remercier tous les permanents du service et, en particulier, Dominique et Olivier du C<sub>14</sub> avec lesquels il était plaisant de discuter, Eric Le Gallo, Jean-Christophe, Frédéric, Eric, Florence, Chantal, l'indispensable équipe d'analyse : Elisabeth, Estelle et David, et tous les autres...

Enfin, je tiens à remercier mes parents pour leur soutien et leur affection indéfectibles et ainsi que pour tous les sacrifices qu'ils font pour leurs enfants. Un gros merci aussi à ma belle-famille pour leur gentillesse et les bons repas.

Et finalement, le meilleur pour la fin... Julien...

Table des abréviations.....	13
<b>Introduction générale</b> .....	<b>15</b>
<b>1. Le cycle biogéochimique de l'iode</b> .....	<b>17</b>
<b>2. La génétique chimique</b> .....	<b>20</b>
<b>Objectifs et stratégies</b> .....	<b>21</b>
<b>Plan du mémoire</b> .....	<b>23</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>25</b>
<b>THEMATIQUE ALGUE BRUNE</b> .....	<b>27</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction bibliographique</b> .....	<b>29</b>
<b>1. Notions sur la morphologie et l'histologie de <i>Laminaria digitata</i></b> .....	<b>31</b>
<b>2. L'iode chez les laminaires</b> .....	<b>33</b>
2.1. Richesse et distributions en iode.....	33
2.1.1 Teneur et distribution tissulaires .....	33
2.1.2 Distribution sub-cellulaire.....	34
2.2. Spéciation de l'iode chez les laminaires .....	35
2.3. Physiologie des transferts de l'iode chez <i>Laminaria digitata</i> .....	36
2.3.1 Mécanisme de captation de l'iode : historique .....	36
2.3.2 Commentaires sur le mécanisme de captation .....	38
2.3.3 Mécanisme d'efflux et rôle physiologique de l'iode chez <i>L. digitata</i> .....	39
<b>3. Les halopéroxydases à vanadate</b> .....	<b>41</b>
3.1. Généralités .....	42
3.1.1 Occurrence et rôles putatifs des vHPO .....	42
3.1.2 Clonage et expression des activités vHPO .....	43
3.2. Données structurales concernant les vHPO .....	43
3.2.1 Structures des vHPO .....	43
3.2.2 Le site actif des vHPO .....	44
3.3. Réaction enzymatique et cycle catalytique des vHPO .....	45
3.3.1 Cycle catalytique des vHPO .....	45
3.3.2 Sélectivité des vHPO envers les halogénures .....	47
3.3.3 Halogénéation de substrats organiques .....	49
3.4. Méthodes de suivi des activités des vHPO et chimie en solution. ....	51
<b>4. Conclusion</b> .....	<b>54</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>57</b>
<b>Chapitre 2 : Inhibiteurs de la vBPO d'<i>Ascophyllum nodosum</i></b> .....	<b>63</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>63</b>
<b>2. Suivi des activités de la vBPO</b> .....	<b>65</b>
2.1. Introduction .....	65
2.2. Identification d'une nouvelle sonde.....	67
2.2.1 Etudes préliminaires.....	67
2.2.2 Etude de la famille des sulfone-phtaléines.....	69
2.3. Optimisation de la méthode de suivi par le bleu de thymol .....	72
2.3.1 Principe .....	72
2.3.2 Résultats.....	73
2.4. Validation des méthodes de suivi des activités de la vBPO par le bleu de thymol .....	76
2.4.1 Vérifications préliminaires.....	76

2.4.2	Identification des produits de réaction du bleu de thymol .....	77
2.4.3	Explication de la modification du spectre d'absorbance.....	78
2.5.	Application à la recherche d'inhibiteurs de la vBPO.....	81
2.6.	Conclusion.....	83
<b>3.</b>	<b>Tests de criblage à haut-débit</b> .....	<b>84</b>
3.1.	Mise au point du test de criblage à haut-débit .....	84
3.1.1	Séquence du test de criblage à haut-débit .....	84
3.1.2	Concentration des composés de la chimiothèque.....	86
3.1.3	Paramètres cinétiques et de suivi de la DO(620 nm) .....	86
3.1.4	Choix des témoins et schéma de plaques .....	86
3.1.5	Paramètres d'étude et méthode d'analyse des données.....	87
3.2.	Validation du test de criblage à haut-débit .....	89
3.2.1	Définition des paramètres statistiques Z' et Z.....	90
3.2.2	Détermination des paramètres Z' et Z.....	92
3.3.	Réalisation des tests de criblage à haut-débit .....	93
3.4.	Résultats des tests de criblage à haut-débit.....	93
3.4.1	Remarques générales .....	93
3.4.2	Résultats globaux.....	94
3.4.3	Sélection des hits.....	96
3.5.	Tests de confirmation des hits et sélection des molécules les plus actives .....	98
3.5.1	Test de confirmation : Comparaison avec le test de criblage à haut-débit.....	98
3.5.2	Sélection des molécules les plus actives .....	99
3.6.	Validation et étude du mode d'action des 20 hits .....	105
3.6.1	Conformité et stabilité des composés.....	105
3.6.2	Effet doses-réponses .....	106
3.6.3	Perturbation de la iodation chimique du bleu de thymol.....	108
3.6.4	Comparaison des systèmes $I_3^-$ , vBPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /I et vBPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	110
3.6.5	Conclusion .....	115
3.7.	Identification d'inhibiteurs : discussion et perspectives .....	115
3.7.1	La chimiothèque.....	115
3.7.2	La méthode de suivi des activités de la vBPO .....	116
3.7.3	Structure des vHPO.....	116
3.7.4	D'autres voies pour identifier des inhibiteurs de la vBPO ? .....	117
<b>4.</b>	<b>Conclusion</b> .....	<b>118</b>
	<b>Bibliographie</b> .....	<b>121</b>
<b>Chapitre 3 :</b>	<b>Etude du mécanisme de captation de l'iode</b> .....	<b>125</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>125</b>
<b>2.</b>	<b>Principe d'évaluation</b> .....	<b>125</b>
2.1.	Description .....	125
2.2.	Vérifications préliminaires .....	126
<b>3.</b>	<b>Evaluation des hits du test de criblage à haut-débit</b> .....	<b>127</b>
3.1.	Molécules évaluées.....	127
3.2.	Résultats .....	128
<b>4.</b>	<b>Conclusion</b> .....	<b>130</b>
	<b>Bibliographie</b> .....	<b>131</b>
<b>Chapitre 4</b>	<b>Distributions tissulaire et sub-cellulaire de l'iode chez <i>L. digitata</i></b> .....	<b>133</b>
<b>1.</b>	<b>Introduction</b> .....	<b>133</b>
<b>2.</b>	<b>Présentations des techniques d'imagerie</b> .....	<b>134</b>
2.1.	Microsonde nucléaire.....	134
2.2.	Microsonde SIMS.....	135
2.3.	Comparaison des deux techniques .....	137

<b>3. Préparation des échantillons</b>	<b>137</b>
3.1. Echantillons pour l'analyse par microsonde nucléaire	138
3.2. Echantillons pour l'analyse par microsonde SIMS	138
3.3. Résultats de la préparation des échantillons	139
3.3.1 Echantillons pour l'analyse par microsonde nucléaire	139
3.3.2 Echantillons pour l'analyse par microsonde SIMS	139
<b>4. Résultats</b>	<b>142</b>
4.1. Analyses par microsonde nucléaire	142
4.1.1 Analyse de sections transversales de stipe	142
4.1.2 Analyse de sections transversales de lame	145
4.2. Analyses par microsonde SIMS	147
4.2.1 Dosage de l'iode par analyse par activation neutronique	147
4.2.2 Analyse de coupes chimiquement fixées par microsonde SIMS	148
4.2.3 Analyse de coupes cryofixées par microsonde SIMS	151
<b>5. Discussion</b>	<b>155</b>
5.1. Spéciation et teneurs en iode	155
5.2. Distributions tissulaire et sub-cellulaire de l'iode insoluble	156
5.3. Distributions tissulaire et sub-cellulaire de l'iode total	157
5.3.1 Principaux résultats obtenus	157
5.3.2 Corrélation entre la distribution et les rôles physiologiques de l'iode	158
5.3.3 Propositions de nouveaux mécanismes d'accumulation de l'iode ?	159
<b>6. Conclusion générale et perspectives</b>	<b>163</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>167</b>
<b>THEMATIQUE MAMMIFERE</b>	<b>171</b>
<b>Introduction</b>	<b>173</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction bibliographique</b>	<b>175</b>
<b>1. Méthodes d'identification des protéines cibles en génétique chimique</b>	<b>175</b>
1.1. Approches par déduction	175
1.2. Approches non déductives	176
1.2.1 Les approches d'affinité dites génomiques	176
1.2.2 Les approches d'affinité dites biochimiques	177
1.3. La chromatographie d'affinité	179
1.3.1 Principe et illustration	179
1.3.2 Limitations	180
1.4. Le photomarquage d'affinité	181
1.4.1 Principe et illustration	181
1.4.2 Limitations	184
1.5. Conclusion	184
<b>2. Transport et accumulation de l'iode au niveau de la thyroïde</b>	<b>185</b>
2.1. La glande thyroïde : généralités	185
2.2. Biosynthèse des hormones thyroïdiennes	186
2.3. Le symporteur $\text{Na}^+/\text{I}^-$ : acteur-clé de la captation des iodures	188
2.3.1 Description générale	188
2.3.2 Mécanismes de régulation du NIS au niveau thyroïdien	189
2.3.3 Inhibiteurs du transport des iodures	191
<b>3. Conclusions</b>	<b>192</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>195</b>
<b>Chapitre 2 : Synthèse d'inhibiteurs et d'analogues photoactivables</b>	<b>199</b>

<b>1. Avancées des travaux sur les inhibiteurs du NIS au sein de notre groupe</b>	<b>199</b>
<b>2. Objectifs et stratégies</b>	<b>202</b>
2.1. Objectifs	202
2.2. Choix des inhibiteurs et stratégie de synthèse	203
<b>3. Synthèses des inhibiteurs et de leurs analogues azotures</b>	<b>205</b>
3.1. Synthèses des inhibiteurs <u>1</u> , <u>2</u> , <u>3</u> et <u>4</u>	205
3.1.1 Synthèse du composé <u>1</u>	205
3.1.2 Synthèse des composés <u>2</u> et <u>3</u>	207
3.1.3 Synthèse du composé <u>4</u>	208
3.2. Synthèses des dérivés anilines	209
3.2.1 Synthèses des dérivés anilines de <u>1</u> et <u>4</u>	209
3.2.2 Synthèses des dérivés anilines de <u>2</u> et <u>3</u>	209
3.3. Synthèses des azotures d'aryle	211
3.3.1 Méthodes de synthèse décrites dans la littérature	212
3.3.2 Synthèse de l'azoture <u>9</u>	214
3.3.3 Synthèse des azotures d'aryle <u>10</u> et <u>11</u>	215
3.3.4 Synthèse de l'azoture d'aryle <u>12</u>	216
3.4. Conclusion	217
<b>4. Evaluation de l'activité des composés synthétisés</b>	<b>218</b>
4.1. Principe et conditions expérimentales	218
4.2. Résultats de l'évaluation biologique des composés synthétisés	219
4.2.1 Composé <u>1</u> et analogues	221
4.2.2 Composés <u>2</u> , <u>3</u> et analogues	223
4.2.3 Composé <u>4</u> et analogues	223
4.2.4 Observations générales	224
4.2.5 Conclusion	224
<b>5. Nouvelle voie de synthèse du composé 12</b>	<b>225</b>
<b>6. Perspective : vers la synthèse du composé [<sup>3</sup>H]-12.</b>	<b>227</b>
<b>7. Conclusion et perspectives</b>	<b>229</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>231</b>
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	<b>235</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	<b>241</b>
<b>Chapitre 1 : Recherche d'inhibiteurs de la vBPO d'<i>A. nodosum</i></b>	<b>243</b>
<b>1. Généralités sur le matériel et les produits utilisés</b>	<b>243</b>
<b>2. Mise au point d'une méthode de suivi des activités de la vBPO</b>	<b>244</b>
2.1. Identification d'une nouvelle molécule sonde	244
2.1.1 Etudes préliminaires	244
2.1.2 Etude approfondie de la famille des sulfone-phtaléines	245
2.2. Optimisation de la méthode de suivi par le bleu de thymol	246
2.2.1 Suivi de l'activité iodo-péroxydase de la vBPO par le bleu de thymol	247
2.2.2 Suivi de l'activité bromopéroxydase de la vBPO par le bleu de thymol	248
2.3. Validation de la méthode de suivi des activités de la vBPO par le bleu de thymol	249
2.3.1 Identification des produits responsables de la DO(620 nm)	249
2.3.2 Synthèse des produits d'halogénéation du bleu de thymol par vBPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /X <sup>-</sup>	250
2.3.3 Détermination du pKa du bleu de thymol et de ses dérivés halogénés.	254
<b>3. Tests de criblage à haut-débit sur la vBPO d'<i>A. nodosum</i></b>	<b>256</b>
3.1. Plateforme de criblage à haut-débit et chimiothèque	256

3.2.	Préparation des solutions nécessaires à une journée de criblage .....	257
3.2.1	Test en activité iodopéroxydase .....	258
3.2.2	Test en activité bromopéroxydase.....	258
3.2.3	Résumé des conditions de suivi cinétique.....	259
3.3.	Eléments concernant l'exécution du test de criblage à haut-débit .....	260
3.3.1	Plan de la microplaque de lecture .....	260
3.3.2	Configuration du plan de travail .....	260
3.3.3	Séquence et planification des tâches .....	261
3.4.	Déroulement du test de criblage à haut-débit .....	263
3.5.	Tests secondaires .....	264
3.5.1	Hit Picking (ou récolte des hits).....	264
3.5.2	Principe et mise en œuvre des tests secondaires .....	264
3.5.3	Test de confirmation (test de criblage secondaire).....	264
3.5.4	Effet de l'ajout de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	265
3.6.	Etude du mécanisme d'action des hits .....	265
3.6.1	Effet dose-réponse .....	266
3.6.2	Influence sur la cinétique de iodation chimique de bleu de thymol .....	266
3.6.3	Suivis cinétiques des réactions de EVx avec les systèmes vBPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /I <sup>-</sup> , vBPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et I <sub>3</sub> <sup>-</sup> par CLHP .....	266
3.6.4	Produits formés par réaction de EVx et des systèmes vBPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /I <sup>-</sup> et I <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	269
<b>Bibliographie</b> .....		<b>271</b>
<b>Chapitre 2 : Expériences de suivi de l'influx des iodures par traceur <sup>125</sup>I</b> .....		<b>273</b>
1.	<b>Matériels et procédures communs aux deux séries d'expériences</b> .....	<b>273</b>
2.	<b>Test de suivi de l'influx des iodures<sup>-</sup> chez <i>L. digitata</i></b> .....	<b>274</b>
2.1.	Matériel biologique.....	274
2.1.1	Provenance des algues .....	274
2.1.2	Conservation .....	274
2.1.3	Préparation des solutions .....	275
2.2.	Protocole expérimental .....	275
3.	<b>Evaluation de l'activité des molécules synthétisées</b> .....	<b>276</b>
3.1.	Matériels et produits utilisés en culture cellulaire .....	276
3.2.	Lignée HEK-293.....	278
3.2.1	Description.....	278
3.2.2	Milieu de culture HEK.....	278
3.2.3	Culture des cellules HEK.....	279
3.3.	Lignée FRTL-5 .....	279
3.3.1	Description.....	279
3.3.2	Cocktail d'hormones nécessaire à la culture de FRTL-5 .....	279
3.3.3	Milieu de culture FRTL-5:.....	280
3.3.4	Culture des cellules FRTL-5:.....	280
3.4.	Protocole de passage.....	281
3.5.	Evaluation des IC <sub>50</sub> .....	281
3.5.1	Ensemencement des cellules dans les microplaques .....	281
3.5.2	Préparation des solutions .....	282
3.5.3	Protocole .....	283
<b>Bibliographie</b> .....		<b>285</b>
<b>Chapitre 3 : Synthèses des hits et de leurs dérivés anilines et azotures</b> .....		<b>287</b>
<b>ANNEXES</b> .....		<b>311</b>
Annexe 1 : Molécules testées pour l'identification de la sonde.....		313
Annexe 2 : Tableau récapitulatif concernant le test de criblage à haut-débit .....		314

Annexe 3 : Protocole de sélection des 20 hits les plus actifs.....	315
Annexe 4 : Liste des 20 hits sélectionnés .....	316

## Table des abréviations

AC	Adénylate Cyclase	IR	Infra-Rouge
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire	MCD	Monochlorodimédone
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique	MIT	Mono-Iodotyrosine
ARNm	Acide ribonucléique messenger	MMI	1-méthyl-2mercapto-imidazole
BPO	Bromopéroxydase	NIS	Symporteur Na <sup>+</sup> /I <sup>-</sup>
BSA	Bovine Serum Albumin	PIXE	Particle Induced X-ray Emission
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance	PM	Poids Moléculaire
Cpm	Coups par minute	PTU	6-propylthouracile
CPO	Chloropéroxydase	RBS	Rutherford Backscattering Spectrometry
CVH	Composé Volatil Halogéné	RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
CVI	Composé Volatil Iodé	RTSH	Récepteur à la TSH
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide	SIMS	Spectrométrie de masse d'ions secondaires
DIT	Di-Iodotyrosine	SM	Spectrométrie de Masse
DMSO	Diméthylsulfoxyde	SMHR	Spectrométrie de Masse Haute Résolution
e.e	excès énantiomérique	T3	L-Thyronine
EAO	Espèce Activée de l'Oxygène	T4	L-Thyroxine
EXAFS	Extended X-ray Absorption Fine Structure	TDCI	Troubles Dus à la Carence en Iode
FRTL-5	Fisher Rat Thyroid Line Low serum 5%	TFA	Acide trifluoroacétique
HEK	Human Embryonic kidney (cells)	Tg	Thyroglobuline
HPO	Halopéroxydase	TPO	Thyropéroxydase
HRP	Horseradish Peroxidase	TSH	Thyroid Stimulating Hormone
IC <sub>50</sub>	Half inhibition Concentration	vHPO	Halopéroxydase à Vanadate
Iox	Espèce oxydée de I <sup>-</sup> générée par vHPO	XANES	X-ray Absorption Near Edge Structure
IPO	Iodopéroxydase		
$\epsilon$	Coefficient d'extinction molaire (M <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )		
$\lambda_{\max}$	longueur d'onde d'absorbance maximale (nm)		
DO	Absorbance		
R	Retard (s) c'est-à-dire durée pour laquelle l'absorbance à 620 nm n'augmente pas		
A <sub>fin</sub>	Absorbance finale		
V	Vitesse maximale c'est-à-dire la pente maximale de la courbe DO(620 nm) = f(t)		
V <sub>N</sub>	Vitesse maximale normalisée		
V <sub>i</sub>	Vitesse initiale c'est-à-dire pente à l'origine de la courbe DO(620 nm) = f(t)		



# **Introduction Générale**



# **Introduction générale**

## **1. Le cycle biogéochimique de l'iode**

Découvert par Courtois en 1811 à partir du varech [1], l'iode est un micro-nutriment essentiel à l'homme et aux autres mammifères pour la synthèse des hormones thyroïdiennes T3 et T4. Ces hormones jouent un rôle crucial dans le développement et la maturation du système nerveux ainsi que dans la régulation du métabolisme de la plupart des tissus [2]. Dans une population, un déficit en iode provoque un ensemble de désordres physiologiques (hypothyroïdie, goitre endémique, retards de développement physique et mental sévères) que l'on regroupe sous le nom de « troubles dus à la carence en iode » (TDCI). Ces troubles ont été essentiellement observés chez les populations éloignées des zones côtières qui n'avaient pas accès à une alimentation d'origine marine. Le TDCI est toujours un problème de santé mondial malgré la généralisation de l'enrichissement du sel alimentaire en iode [2-4].

L'espace océanique constitue le compartiment majeur de réserve en iode bio-disponible, avec une teneur de 45-60  $\mu\text{g/l}$ , essentiellement sous forme iodate et iodure [5]. Les sédiments marins renferment, quant à eux, plus de 68% de l'iode de la croûte terrestre [6]. Le cycle biogéochimique de l'iode est basé sur d'intenses échanges du compartiment océanique vers l'atmosphère (Fig.1). Ces échanges reposent principalement sur l'émission de composés volatils iodés ( $\text{CH}_3\text{I}$ ,  $\text{CH}_2\text{I}_2$  ...) et d'iode moléculaire ( $\text{I}_2$ ) par le phytoplancton mais aussi par les macro-algues présentes en zones côtières. Une fois dans l'atmosphère, les composés volatils iodés (CVIs) et l'iode moléculaire sont dissociés par photolyse en radicaux  $\text{I}^\circ$ . Ces radicaux  $\text{I}^\circ$  sont impliqués dans une chimie atmosphérique complexe conduisant, par réaction avec l'ozone, à la formation d'un pool d'espèces oxydées ( $\text{IO}$ ,  $\text{I}_2\text{O}$ ,  $\text{OIO}$ ...). Ces espèces oxydées participent ensuite à la formation d'aérosols et à la condensation des nuages [7-9]. L'iode est, par conséquent, déposé à la surface des continents par les précipitations ou par les aérosols secs, ce qui permet son incorporation dans l'alimentation humaine [5]. Une partie de l'iode est aussi re-émise sous forme de CVIs par les bactéries du sol [6]. Enfin, les eaux de ruissellement et les cours d'eau permettent la re-incorporation de l'iode dans le compartiment océanique.

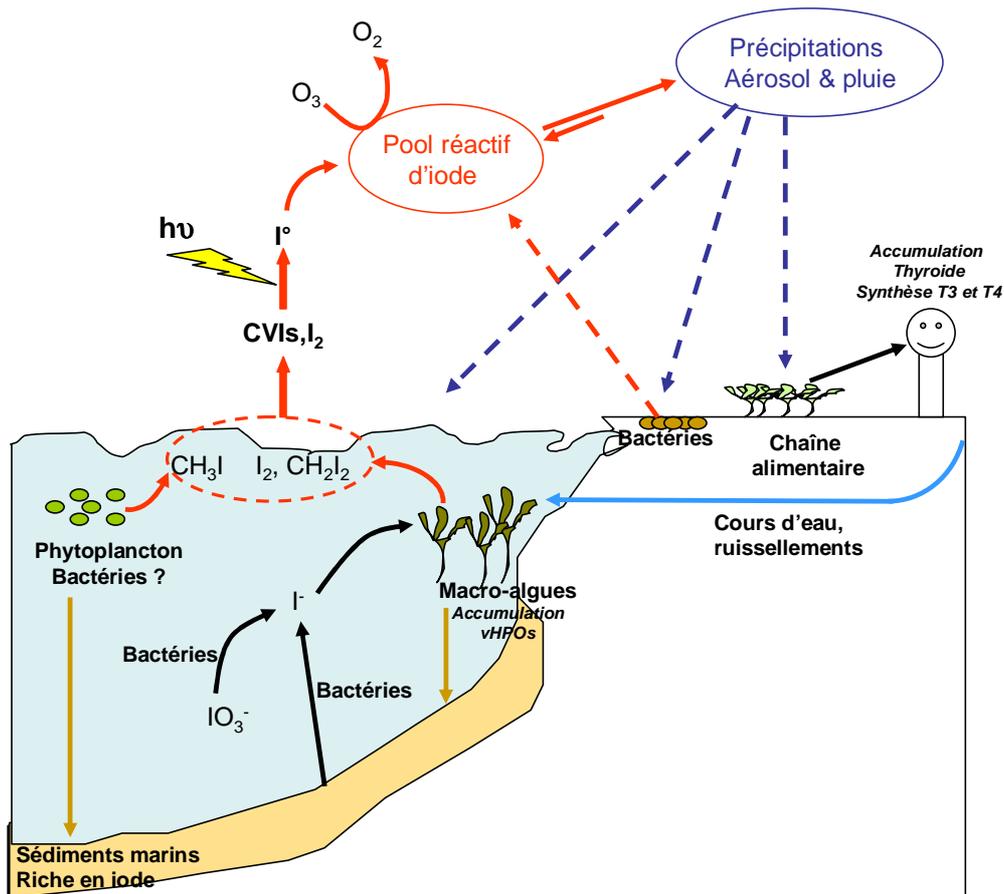


Fig.1 : Cycle biogéochimique de l'iode simplifié d'après Leblanc *et al.*[10]

vHPO : halopéroxydase à vanadate, tri-iodothyronine (T3), L-Thyronine (T4)

Les principaux radio-isotopes de l'iode générés par les activités humaines (centrales et essais nucléaires) sont l'iode 131 (demi-vie de 8,04 jours) et l'iode 129 (demi-vie de 15,7 millions d'années). Compte tenu de leur durée de demi-vie, ils sont susceptibles d'intégrer le cycle géochimique de l'iode et, par conséquent, d'être disséminés sur des territoires étendus et d'incorporer la chaîne alimentaire humaine. Leur radio-toxicité est liée à leur incorporation au niveau de la thyroïde, ce qui induit une augmentation de l'incidence des cancers de cette glande comme observé à la suite de l'accident de Tchernobyl [11, 12].

Par conséquent, la compréhension des mécanismes biologiques qui contrôlent la dissémination de l'iode dans la biosphère est un enjeu environnemental, radio-écologique et de santé publique. Dans ce contexte, le projet iode du programme inter-organisme de Toxicologie Nucléaire Environnementale (TOXNUC-E), dans lequel s'inscrit ce travail de thèse, s'intéresse à deux modèles biologiques présentant des mécanismes d'accumulation de l'iode très différents : les algues brunes et les mammifères.

### Les algues brunes

Les algues brunes, en particulier les laminaires, sont un modèle d'étude unique et particulièrement intéressant. Les laminaires sont des accumulateurs exceptionnels de l'iode puisque leur teneur moyenne peut atteindre jusqu'à 4,7% de leur poids sec (soit un taux d'enrichissement par rapport à l'eau de mer d'un facteur de  $10^5$ - $10^4$ ) [13]. Leur rôle dans le cycle biogéochimique de l'iode a été très récemment re-évalué : Il a été mis en évidence qu'elles sont des acteurs clés des transferts de l'iode en zone côtière par l'émission de CVIs et aussi, en bien plus grande quantité, d'iode moléculaire ( $I_2$ ). Cette émission d'iode moléculaire serait impliquée dans la formation d'aérosols [14-16] et aurait une incidence directe sur la couche d'ozone. La iodovolatilisation par les laminaires fait donc actuellement l'objet de nombreuses études en chimie environnementale, comme l'illustre un numéro spécial de la revue *Environmental Chemistry* [17]. Cependant, les mécanismes biochimiques contrôlant la captation et l'émission de l'iode chez les laminaires n'ont pas été entièrement élucidés. Il est actuellement fortement suggéré que les enzymes appartenant à la famille des halopéroxydases à vanadate (vHPO) sont les principaux effecteurs de ces mécanismes (pour revue : [10]). Démontrer clairement le rôle physiologique de ces protéines est crucial pour la poursuite des études physiologiques. Par ailleurs, les distributions tissulaire et sub-cellulaire de l'iode sont, à l'heure actuelle, inconnues alors que ces données sont des éléments essentiels à la compréhension des transferts de l'iode chez ces organismes.

### Les mammifères

Chez les mammifères, la glande thyroïde est l'organe qui accumule le plus l'iode. Cette accumulation est nécessaire à la synthèse des hormones iodées T3 et T4. Bien que la biosynthèse de ces hormones ait été élucidée, les effecteurs impliqués dans les mécanismes de transport de l'iode au niveau des thyrocytes n'ont pas été entièrement caractérisés. Depuis quelques années, notre groupe s'intéresse au symporteur  $Na^+/I^-$  (NIS) qui est responsable de la captation des iodures plasmatiques par les thyrocytes. Malgré de très nombreuses études, les mécanismes de régulation de cette protéine ne sont pas entièrement élucidés. De plus, aucun inhibiteur spécifique et puissant de la protéine NIS n'a été identifié. Or, de telles molécules constitueraient des outils pharmacologiques permettant de mieux caractériser le transport de l'iode au niveau thyroïdien. Elles pourraient aussi permettre de développer de nouvelles solutions plus efficaces que l'administration d'iodure froid, en cas de contamination accidentelle à l'iode radioactif [12] ainsi que de nouvelles approches thérapeutiques contre certaines pathologies thyroïdiennes (maladie de Grave ou thyroxicoses).

## 2. La génétique chimique

Pour apporter des éléments de réponse à ces deux thématiques de recherche, nous avons mis en place des stratégies de génétique chimique. La génétique chimique est une alternative aux méthodes classiques de génomique. Elle consiste à étudier la fonction d'un gène en modulant l'activité de la protéine dont il contrôle l'expression, grâce à de petites molécules organiques. On distingue deux approches : la génétique chimique directe et la génétique chimique inverse (pour revues : [18, 19]).

La génétique chimique directe consiste à rechercher une molécule capable de générer un phénotype particulier sur un système cellulaire ou un organisme. Cette molécule est ensuite utilisée comme outil moléculaire pour identifier sa protéine cible et comprendre la fonction de cette protéine dans le contexte cellulaire. Cette stratégie permet donc d'identifier les effecteurs protéiques du mécanisme biochimique, souvent complexe, responsable du phénotype étudié. La génétique chimique inverse consiste, quant à elle, à identifier des molécules modulant l'activité d'une protéine purifiée. Ces molécules sont ensuite testées sur un système cellulaire ou un organisme pour étudier le phénotype induit par la modulation de la protéine. Cette approche permet d'identifier la fonction de la protéine d'étude.

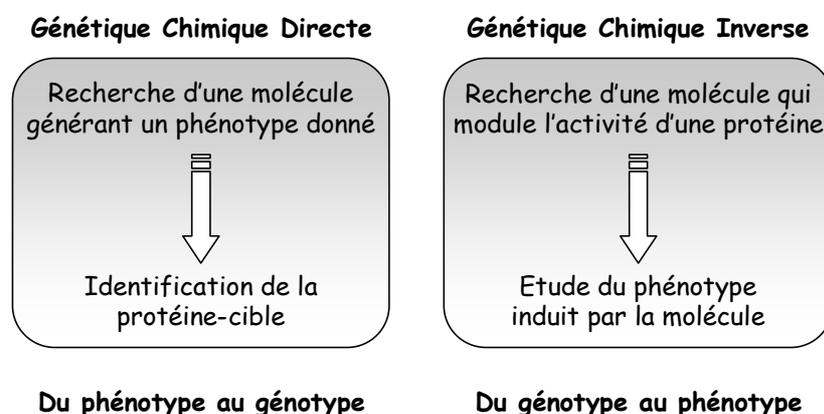


Fig. 2 : Principe de la génétique chimique directe et indirecte

La génétique chimique est indissociable des tests de criblage à haut-débit qui permettent d'identifier rapidement et efficacement les petites molécules organiques d'intérêt pharmacologique. Elle connaît un essor grandissant depuis une dizaine d'années, aussi bien dans le domaine académique que pharmaceutique, grâce à la mise au point des plateformes entièrement automatisées, au développement de la chimie combinatoire et à la mise sur le marché de bibliothèques de molécules.

## **Objectifs et stratégies**

Dans le cadre du projet de recherche dédié aux algues brunes, une stratégie de génétique chimique inverse a été mise en place pour identifier le rôle physiologique des halopéroxydases à vanadate. Nous avons cherché à identifier des inhibiteurs spécifiques d'une vHPO modèle, la bromopéroxydase à vanadate (vBPO) native d'*Ascophyllum nodosum*, par un test de criblage à haut débit. Ces inhibiteurs constitueront des outils pharmacologiques puissants. Leur évaluation *in vivo* permettra d'étudier les réponses induites par l'invalidation des vHPOs et donc de montrer l'implication de ces enzymes dans la captation des iodures et dans la iodovolatilisation chez les algues brunes. Parallèlement, nous nous sommes intéressés à l'algue *Laminaria digitata* qui présente les plus fortes teneurs en iode parmi les laminaires. Nous avons étudié la distribution tissulaire et sub-cellulaire de l'iode chez cette espèce. A cette fin, nous avons mis en place une approche tout à fait originale basée sur l'utilisation de deux techniques d'imagerie chimique hautement résolutive et sensibles : la microsonde par spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) et la microsonde nucléaire. L'ensemble de ces travaux a été effectué dans le cadre d'une collaboration avec P. Potin et C. Leblanc (UMR 7139 CNRS-UPMC, Station Biologique de Roscoff).

Dans le cadre du projet de recherche concernant le transport de l'iode chez les mammifères, une stratégie de génétique chimique directe a été engagée par N. Lecat-Guillet, sous l'encadrement de Y. Ambroise. Le test de criblage à haut-débit effectué au cours de ses travaux de thèse a permis d'identifier des inhibiteurs de l'accumulation des iodures chez un modèle cellulaire exprimant le symporteur  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  humain [20, 21]. Nous avons poursuivi cette étude en mettant au point la synthèse de ces inhibiteurs, en validant leur activité biologique ainsi qu'en initiant l'identification de leurs protéines cibles par photomarquage d'affinité. Nous espérons mettre en évidence que certains inhibiteurs ont une action directe sur la protéine NIS alors que d'autres agissent sur des protéines impliquées dans la régulation de l'activité de ce transporteur.



## **Plan du mémoire**

Le présent mémoire est divisé en trois parties. La première partie est dédiée au projet de recherche concernant les algues brunes. Après une introduction bibliographique concernant l'iode chez les laminaires et les halopéroxydases à vanadate (Chapitre 1), nous présenterons la mise au point et la réalisation du test de criblage à haut-débit sur la vBPO native d'*A. nodosum* ainsi que les résultats obtenus (Chapitre 2). Nous traiterons ensuite des résultats des études *in vivo* d'inhibition de la captation des iodures chez *L. digitata* (Chapitre 3). Finalement, nous décrirons les expériences d'imagerie chimique qui nous ont permis d'établir les distributions tissulaire et sub-cellulaire de l'iode sur des échantillons de *L. digitata* (Chapitre 4). La deuxième partie du mémoire est consacrée à la thématique mammifère. Après une description des stratégies utilisées pour l'identification des protéines cibles en génétique chimique directe et une présentation du contexte biologique de notre étude (Chapitre 1), nous présenterons la mise au point de la synthèse des inhibiteurs et de leurs analogues photo-activables ainsi que leurs évaluations biologiques sur deux lignées cellulaires modèles (Chapitre 2). Finalement, la troisième partie du mémoire est dédiée à la description des protocoles expérimentaux utilisés à travers les différentes études.



## **Bibliographie**

1. Courtois B: **Découverte d'une substance nouvelle dans le Vareck.** *Annales de Chimie* 1813, **88**:304-310.
2. Delange F: **Goitres : Les troubles dus à la carence en iode (TDCI).** In *La Thyroïde*. Edited by Elsevier. Paris; 2001: 355-363
3. Delange F: **Iodine deficiency in Europe and its consequences: an update.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002, **29 Suppl 2**:S404-416.
4. Walker SP, Wachs TD, Gardner JM, Lozoff B, Wasserman GA, Pollitt E, Carter JA: **Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries.** *Lancet* 2007, **369**:145-157.
5. Whitehead DC: **The distribution and transformations of iodine in the environment.** *Environ Int* 1985, **10**:321-339.
6. Muramatsu Y, Yoshida S, Fehn U, Amachi S, Ohmomo Y: **Studies with natural and anthropogenic iodine isotopes: iodine distribution and cycling in the global environment.** *J Environ Radioact* 2004, **74**:221-232.
7. O'Dowd CD, Jimenez JL, Bahreini R, Flagan RC, Seinfeld JH, Kulmala M, Pirjola L, Hoffmann T: **Particle formation in the marine atmosphere controlled by biogenic iodine emissions.** *Nature* 2002, **417**:632-636.
8. McFiggans G: **Marine aerosols and iodine emissions.** *Nature* 2005, **433**:E13.
9. Carpenter LJ: **Iodine in the marine boundary layer.** *Chem Rev* 2003, **103**:4953-4962.
10. Leblanc C, Colin C, Cosse A, Delage L, La Barre S, Morin P, Fievet B, Voiseux C, Ambroise Y, Verhaeghe E, et al: **Iodine transfers in the coastal marine environment: the key role of brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases.** *Biochimie* 2006, **88**:1773-1785.
11. Moysich KB, Menezes RJ, Michalek AM: **Chernobyl-related ionising radiation exposure and cancer risk: an epidemiological review.** *Lancet Oncol* 2002, **3**:269-279.
12. Dayem M, Navarro V, Marsault R, Darcourt J, Lindenthal S, Pourcher T: **From the molecular characterization of iodide transporters to the prevention of radioactive iodide exposure.** *Biochimie* 2006, **88**:1793-1806.
13. Ar Gall E, Küpper FC, Kloareg B: **A survey of iodine content in *Laminaria digitata*.** *Botanica Marina* 2004, **47**:30-37.
14. Saiz-Lopez A, Plane JMC, McFiggans G, Williams PI, Ball SM, Bitter M, Jones RL, Hongwei C, Hoffmann T: **Modelling molecular iodine emissions in a coastal marine environment: the link to new particle formation.** *Atmos Chem Phys* 2006, **6**:883-895.
15. Palmer CJ, Anders TL, Carpenter LJ, Kupper FC, McFiggans GB: **Iodine and Halocarbon Response of *Laminaria digitata* to Oxidative Stress and Links to Atmospheric New Particle Production.** *Environ Chem* 2005, **2**:282-290.
16. McFiggans G, Coe H, Burgess R, Allan J, Cubison M, Alfarra MR, Saunders R, Saiz-Lopez A, Plane JMC, Wevill D: **Direct evidence for coastal iodine particles from**

- Laminaria macroalgae* – linkage to emissions of molecular iodine.** *Atmos Chem Phys* 2004, **4**:701-713.
17. von Glasow R: **Seaweed, Iodine, New Particles and Atmospheric Chemistry—The Current State of Play.** *Environ Chem* 2005, **2**:243-245.
  18. Walsh DP, Chang YT: **Chemical genetics.** *Chem Rev* 2006, **106**:2476-2530.
  19. Westwood NJ: **Chemical genetics: how does it function?** *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 2004, **362**:2761-2774.
  20. Lecat-Guillet N, Merer G, Lopez R, Pourcher T, Rousseau B, Ambroise Y: **A 96-Well Automated Radioiodide Uptake Assay for Sodium/Iodide Symporter Inhibitors.** *Assay Drug Dev Technol* 2007, **5**:535-540.
  21. Lecat-Guillet N: **Identification d'inhibiteurs du Symporteur Sodium-Iode par criblage à haut-débit.** Université Paris XI, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage Moléculaire, CEA-Saclay; 2006.

# **Partie 1**

## **Thématique Algue Brune**

*Identification d'inhibiteurs de la vBPO d'*A. nodosum**

*Etude du mécanisme de captation de l'iode par *L. digitata**

*Etude de la distribution tissulaire et sub-cellulaire  
de l'iode chez *L. digitata**



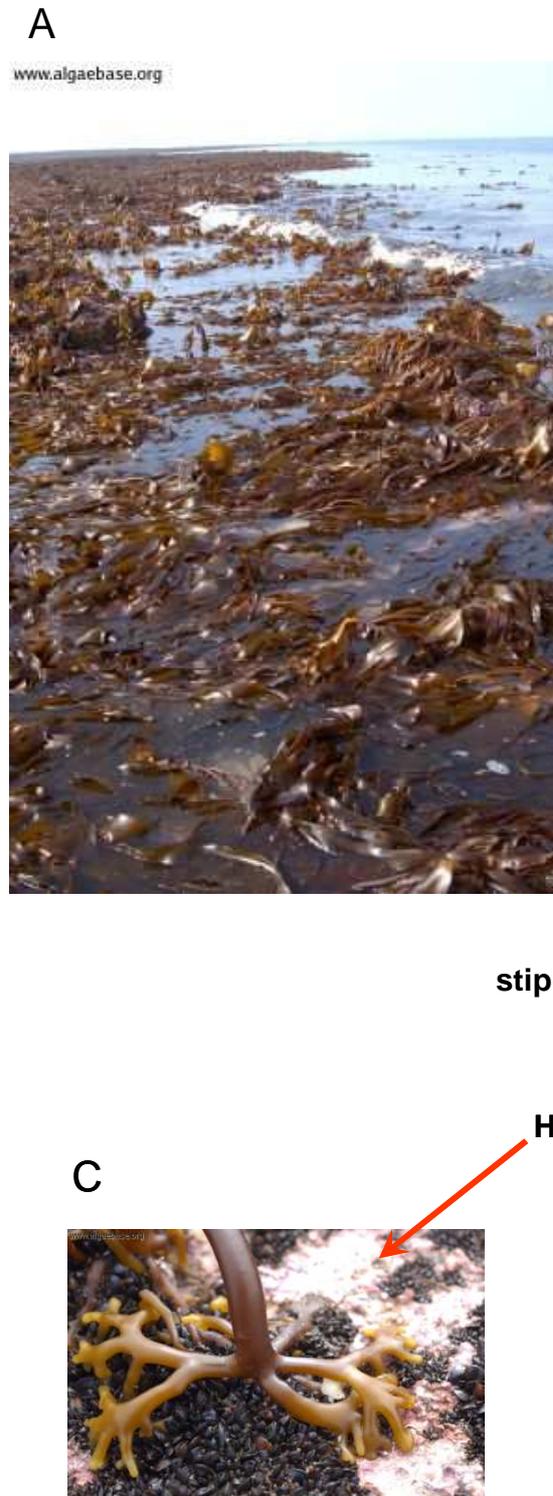
## **Chapitre 1 : Introduction bibliographique**

Ce chapitre bibliographique est divisé en trois parties.

La première partie présente des notions sur la morphologie et l'histologie de *Laminaria digitata*. Ces éléments peuvent aider à la compréhension de la seconde partie du présent chapitre ainsi qu'à celle du Chapitre 4 dédié à l'étude de la distribution tissulaire et sub-cellulaire de l'iode chez *L. digitata*.

La seconde partie de ce chapitre dresse un bilan des connaissances concernant l'accumulation de l'iode chez les laminaires. Elle aborde différents aspects tels que la teneur, la distribution tissulaire et la spéciation en iode. Elle décrit, de plus, les mécanismes biochimiques actuellement proposés pour expliquer la captation et l'efflux d'iode chez *L. digitata*. Ce chapitre présente les éléments bibliographiques nécessaires à la discussion des résultats présentés dans le Chapitre 3 concernant les tests *in vivo* chez *L. digitata* et dans le Chapitre 4.

La troisième partie est dédiée à la présentation des halopéroxydases à vanadium (vHPO). Chez *L. digitata*, ces enzymes jouent, fort probablement, un rôle central dans les mécanismes de transfert de l'iode. Cette partie est liée au Chapitre 2 concernant la recherche d'inhibiteurs de la vBPO d'*Ascophyllum nodosum*.



**Fig. 3 : *Laminaria digitata***

A. Un champ de *Laminaria digitata* au large de Finavarra, Comté de Clare, Irlande.

B. Gamétophyte et sporophyte. Le cycle de *L. digitata* est haplodiplophasique. Le gamétophyte est microscopique alors que le sporophyte est macroscopique. Le thalle du sporophyte peut atteindre plusieurs mètres

C. Gros plan sur les haptères qui permettent la fixation du sporophyte à son substrat.

Ces photographies proviennent du site : [www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)

## 1. Notions sur la morphologie et l'histologie de *Laminaria digitata*

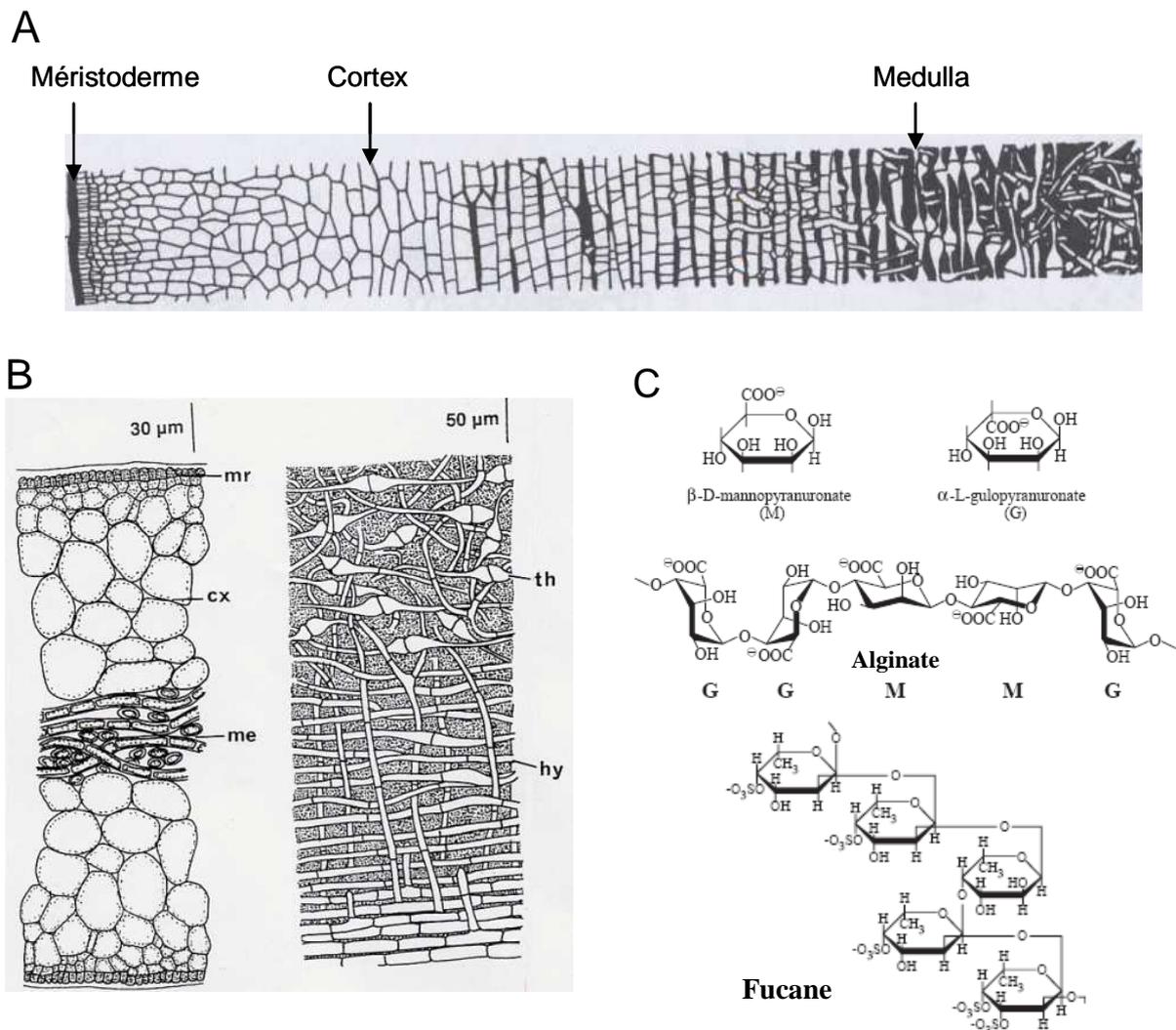
*Laminaria digitata* est une macro-algue faisant parti de la classe des *Phaeophyceae* (signifiant algues brunes) et de l'ordre des Laminariales. Elle présente un cycle de vie haplo-diplophasique caractérisé par un gamétophyte microscopique filamenteux et par un sporophyte macroscopique pouvant atteindre plusieurs mètres de long (Fig. 3.A et Fig. 3.B). Cette espèce est principalement distribuée en zone tempérée froide nord et est localisée dans la zone de balancement des marées, dans le haut de l'étage infralittoral [1-3].

Le thalle de *L. digitata* est composé d'un crampon muni d'haptères qui permet sa fixation au substrat, d'un stipe souple et cylindrique et d'une lame découpée en lanières. Sa croissance est intercalaire et s'effectue à partir d'un méristème situé au niveau de la zone stipo-frondale (Fig. 3.B et Fig. 3.C). L'extrémité de sa lame correspond donc aux tissus les plus âgés [1, 3].

Du point de vue histologique, trois tissus sont observables au niveau du stipe et de la lame. Le tissu le plus externe est le méristoderme (ou épiderme méristématique) : il est constitué d'une assise de petites cellules cubiques très riches en plastes et à très forte activité photosynthétique, qui est recouverte par une épaisse couche protectrice de mucilage. Le méristoderme est prolongé par le cortex, tissu parenchymateux constitué de cellules plus grosses comportant de larges vacuoles [3]. Le tissu central correspond à la medulla (ou moelle) (Fig. 4.A et Fig. 4.B). La medulla est composée d'un enchevêtrement de filaments cellulaires appelés hyphes, baignant dans une matrice mucilagineuse. Ces filaments sont constitués de cellules allongées, aux extrémités pouvant être élargies en pavillon (on parle alors d'hyphes en trompette) (Fig. 4.B). Ces cellules présentent des cloisons transversales perforées permettant la continuité de leur cytoplasme [1, 3]. Ces cellules seraient responsables du transport à longue distance de solutés (en particulier d'anions) mis en évidence par traçage avec des radioéléments [4, 5].

Les parois cellulaires sont composées d'un squelette fibrillaire de cellulose supportant une matrice amorphe mucilagineuse. Cette dernière est principalement composée d'acides alginiques ainsi qu'en proportion plus faible, de polysaccharides sulfatés (Fig. 4.C). Les acides alginiques sont aussi présents dans le mucilage externe et les espaces inter-cellulaires. Ils peuvent représenter jusqu'à 40 % du poids sec de l'algue [6]. Les acides alginiques sont des polymères linéaires composés de blocs d'acide  $\alpha$ -D-mannuronique (bloc MM), de blocs d'acide  $\beta$ -L-guluronique (bloc GG) ainsi que de blocs mixtes alternés (MG). L'alternance des

différents types de blocs ainsi que le rapport global G/M sont responsables des propriétés mécaniques des différentes parties du thallophyte : la lame, souple, est riche en acide  $\alpha$ -D-mannuronique alors que le crampon, rigide, est riche en acide  $\beta$ -L-guluronique. Au pH physiologique, les acides alginiques et les fucanes sont sous forme anionique, ce qui confère à l'apoplaste, sa capacité à complexer les cations, en particulier divalents [7, 8].



**Fig. 4 : Histologie de *L. digitata***

A. Coupe transversale d'un stipe. D'après de Reviere [1]

B. à gauche : Coupe transversale de la lame de *L. digitata*. mr : méristoderme, cx : cortex, me : medulla. à droite : gros plan sur la medulla au niveau d'une coupe transversale de stipe. hy : hyphe, th : hyphe en trompettes. D'après Lee [3]

C. Alginate et fucane : composants principaux de l'apoplaste et des parois cellulaires. D'après Davis *et al.* [7]

## 2. L'iode chez les laminaires

### 2.1. Richesse et distributions en iode

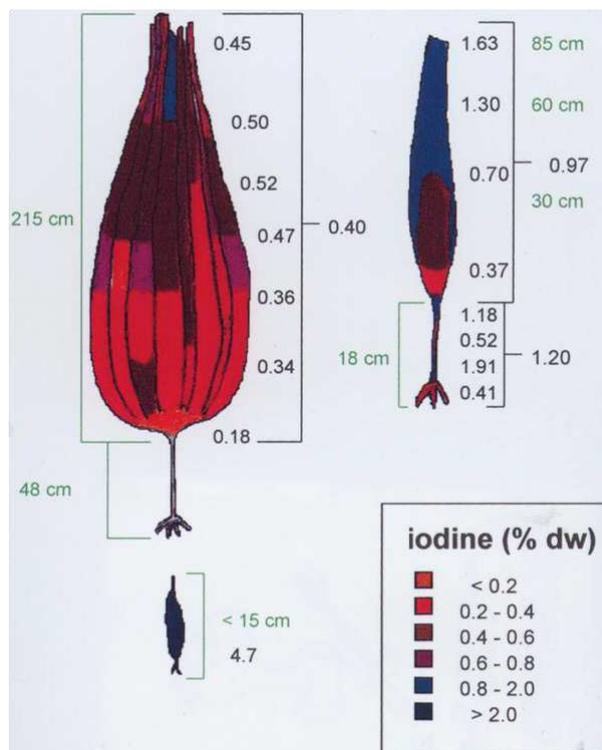
#### 2.1.1 Teneur et distribution tissulaires

Les Laminariales, en particulier les laminaires telle que *L. japonica*, *L. saccharina* et *L. digitata* constituent à l'heure actuelle les plus puissants accumulateurs d'iode du monde vivant avec une teneur moyenne de 0.5-1% de leur poids sec, ce qui correspond à un enrichissement d'un facteur  $10^5$ - $10^4$  par rapport à l'eau de mer ( $\approx 58 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) [9, 10]. Chez l'espèce *L. digitata*, il a été montré que la teneur en iode varie en fonction des saisons ainsi qu'avec l'âge des sporophytes. Ainsi, les sporophytes de petite taille (lame de moins de 20 cm) contiennent jusqu'à 5% de leur poids sec en iode contre environ 1% seulement pour les sporophytes adultes. Annuellement, les teneurs les plus faibles sont observées en été où les sporophytes sont les plus exposés à des stress biotiques et abiotiques (émersion, température élevée), ce qui entraîne une augmentation de leur production de composés volatils iodés [10].

Au sein d'un thallophyte adulte, la distribution de l'iode est hétérogène. La teneur en iode augmente nettement depuis la zone méristématique – correspondant aux tissus les plus jeunes – jusqu'aux parties distales de la lame et jusqu'au crampon [10] (Fig. 5).

Cependant, le rôle des différents tissus – méristoderme, cortex et medulla – dans le stockage de l'iode n'a pas été clairement établi. L'étude la plus récente concernant ce sujet semble dater de 1960. Par le dosage des tissus prélevés à partir de coupes de stipes de *L. hyperborea*, Larsen et Haug ont montré que le tissu périphérique serait le compartiment principal de stockage de l'iode puisque sa teneur en iode ( $\approx 4\%$  en poids sec) est jusqu'à 30 fois supérieure à celle du cortex interne ( $\approx 0,08\%$ ) et de la medulla ( $\approx 0,1\%$ ) [11]. Cependant, cette étude ne permet pas d'évaluer nettement le gradient tissulaire de concentration en iode. Elle est, de plus, quelque peu imprécise compte tenu de la difficulté à séparer les tissus par dissection (en particulier le méristoderme du cortex externe).

A notre connaissance, la distribution tissulaire de l'iode au niveau de la lame n'a jamais été étudiée.



**Fig. 5 : Répartitions de l'iode chez des sporophytes de *L. digitata* d'après Küpper *et al.* [12]**

Chez les sporophytes adultes, les teneurs les plus élevées sont détectées dans les parties distales de la fronde. Chez les sporophytes de moins de 15 cm, la teneur en iode est d'environ 4.7 % du poids sec.

### 2.1.2 Distribution sub-cellulaire

Très peu de données sont actuellement connues sur la localisation sub-cellulaire de l'iode chez les laminaires. De ses observations histologiques, Dangeard a déduit l'absence de structures cellulaires spécialisées dans le stockage de l'iode telles que les cellules glandulaires de certaines rhodophycées [13]. D'après les études histologiques de Mangenot et des hypothèses mécanistiques (cf. paragraphe 2.3.1 p.36), il est actuellement admis par la communauté scientifique que l'iode serait stocké dans le compartiment intra-cellulaire, probablement au sein de physodes (vésicules riches en polyphénols) et/ou au sein de vacuoles non spécialisées [10].

Toutefois, par des analyses par micro-sonde X de coupes chimiquement fixées de stipes de *L. digitata*, *L. saccharina* (récemment renommée *Saccharina latissima*) et *L. hyperborea*, Pedersen *et al.* ont montré que l'iode est présent dans le compartiment apoplastique c'est-à-dire au niveau des parois cellulaires, du mucilage externe et des espaces intercellulaires alors qu'il n'est pas détecté dans les vacuoles. De plus, les physodes ne sont pas forcément observables dans les sections analysées, et lorsqu'ils le sont, ils ne contiennent pas systématiquement de l'iode. Cependant, Pédersen *et al.* ne remettent pas en cause les

hypothèses précédemment citées car lors de la préparation des échantillons par fixation chimique, les nombreux lavages aqueux ont pu entraîner l'extraction des espèces labiles. Par conséquent, l'iode observé – correspondant fort probablement à l'iode fixé sur des structures insolubles – ne représente qu'une très faible proportion de l'iode initialement présent [14] (cf. paragraphe 2.2 ci-dessous).

## 2.2. Spéciation de l'iode chez les laminaires

Il a été depuis longtemps établi qu'au sein des tissus des laminaires l'iode est principalement stocké sous une forme labile. En 1952, les études de Roche et Yagi – par traçage avec le radionucléide  $^{131}\text{I}$  – suggèrent que l'iode est séquestré à plus de 80 % sous forme d'iodure chez *L. digitata* [15]. L'iode restant serait, quant à lui, principalement incorporé sur des résidus tyrosines protéiques. Les études de Tong et Chaikoff aboutirent à une spéciation analogue pour l'algue brune *Nereocystis luetkeana* [16]. Récemment, ces résultats ont été confortés par deux études reposant sur des méthodologies différentes. Shah *et al.* ont analysé des extraits d'algues commerciales par HPLC-ICP-MS<sup>1</sup> et SEC-ICP-MS<sup>2</sup> [17]. Les travaux de Hou *et al.* ont, quant à eux, consisté à séparer les différents composés iodés – dérivés organiques iodés solubles et insolubles,  $\text{I}^-$  et  $\text{IO}_3^-$  – contenus dans des échantillons d'algues par des méthodes chimiques et à les quantifier par analyse par activation neutronique [18]. Ces deux études ont montré que, chez *L. japonica* (renommée récemment *Saccharina japonica*), 90 % de l'iode stocké est sous une forme inorganique analysée être de l'iodure. La proportion d'iodate est, quant à elle, négligeable (< 2 %) dans ces mêmes échantillons [17, 18].

Cependant, nous pouvons émettre des doutes sur la nature exacte de l'espèce de l'iode stockée au sein des tissus des laminaires. En effet, les protocoles expérimentaux utilisés lors des études citées ci-dessus ont comporté une étape d'extraction. Or, compte tenu de la chimie de l'iode en solution (cf. Fig. 16 p.53), il peut être raisonnablement proposé que lors de ces étapes d'extraction, la dilution et une variation du pH et/ou du potentiel redox (par rapport aux conditions *in vivo*) ont modifié la spéciation de l'iode initialement présent dans les tissus [19]. Par conséquent, bien que l'iode soit très probablement séquestré sous une forme inorganique, aucune étude effectuée jusqu'à présent ne prouve de manière irréfutable que l'espèce stockée soit l'iodure.

---

<sup>1</sup> HPLC-ICP-MS : High Pressure Liquid Chromatography – Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry

<sup>2</sup> SEC-ICP-MS : Size Exclusion Chromatography – Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry

## 2.3. Physiologie des transferts de l'iode chez *Laminaria digitata*

### 2.3.1 Mécanisme de captation de l'iode : historique

En 1929, Kylin proposa que la captation de l'iode par *L. digitata* reposait sur un mécanisme oxydatif mettant en jeu une iodure oxydase pariétale [20]. Cette hypothèse fut reconsidérée dans les années 1950 grâce à la généralisation de l'utilisation du radionucléide  $^{131}\text{I}$ . Grâce à ce radionucléide, les premières études cinétiques de captation de l'iode chez diverses algues brunes furent réalisées [15, 21]. Baily et Kelly prouvèrent ainsi que l'iodure, et non l'iodate, était l'espèce captée chez *Ascophyllum nodosum* [22]. Par la suite, Shaw mit en évidence, entre autre, que des agents réducteurs tels que le métabisulfite et le thiocyanate ou facilement halogénables tels que la tyrosine inhibaient la captation des iodures chez *L. digitata*. Il déduisit que les iodures devaient être oxydés pour être transportés. A partir du modèle de Kylin [20], des études de Roche et Yagi [15] et de la spéciation de l'iode en solution, Shaw proposa un mécanisme selon lequel l'iodure serait oxydé par une iodure-oxydase apoplastique en acide hypoiodeux (IOH). IOH, étant une espèce lipophile, pourrait diffuser à travers les membranes. Pour conserver un gradient électrochimique favorable, IOH serait nécessairement réduit dans le compartiment intra-cellulaire pour être ensuite séquestré sous forme d'iodure [23]. Un tel mécanisme est désigné, par certains auteurs, sous le terme de transport par diffusion facilitée [12].

Ce modèle fut affiné par Tong et Chaikoff qui proposèrent que  $\text{H}_2\text{O}_2$  et non  $\text{O}_2$  était impliqué dans l'oxydation des iodures, suggérant ainsi l'intervention d'une iodure-péroxydase plutôt que celle d'une iodure-oxydase [16]. Cette hypothèse fut confortée par E'hOcha et Murphy qui montrèrent l'existence d'une activité iodopéroxydase dans des extraits non cellulaires de *L. digitata* [24].

Au cours des années 1980, des bromopéroxydases à vanadate (vBPO) furent découvertes et isolées chez différentes algues brunes [25] et en particulier chez les espèces du genre *Laminaria* [26, 27]. Comme nous le verrons dans le sous-chapitre 3, en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ces enzymes oxydent spécifiquement les iodures et les bromures en une entité suggérée être l'acide hypohalogéneux correspondant. Il a donc été proposé que cette classe d'enzymes serait impliquée dans la captation des iodures ainsi que dans la formation de composés volatils iodés chez les laminaires.

Plus récemment, Küpper *et al.* entreprirent une étude globale pour confirmer ces hypothèses et vérifier l'implication des vBPO dans le mécanisme de captation [12]. Il fut,

entre autre, montré que l'accumulation des iodures chez *L. saccharina* suivait la loi de Michaelis-Menten, qu'elle était inhibée par des piègeurs des espèces activées de l'oxygène (EAO) et qu'elle n'était pas directement ATP-dépendante. Des expériences menées sur des protoplastes<sup>3</sup> de *L. saccharina* confirmèrent l'implication d'un mécanisme oxydatif lié à H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces résultats suggèrent, de plus, que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> serait généré par une oxydase apoplastique. Küpper *et al.* réussirent aussi à augmenter la captation des iodures chez des gamétophytes de *L. digitata* – qui présentent initialement de très faibles activités halopéroxydases et une très faible teneur en iode – en les incubant avec le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I. Un tel résultat montre que les membranes sont plus perméables aux espèces oxydées (IOH ou I<sub>2</sub>) qu'à l'iode confortant l'idée de l'intervention d'une vBPO dans le mécanisme de captation [12].

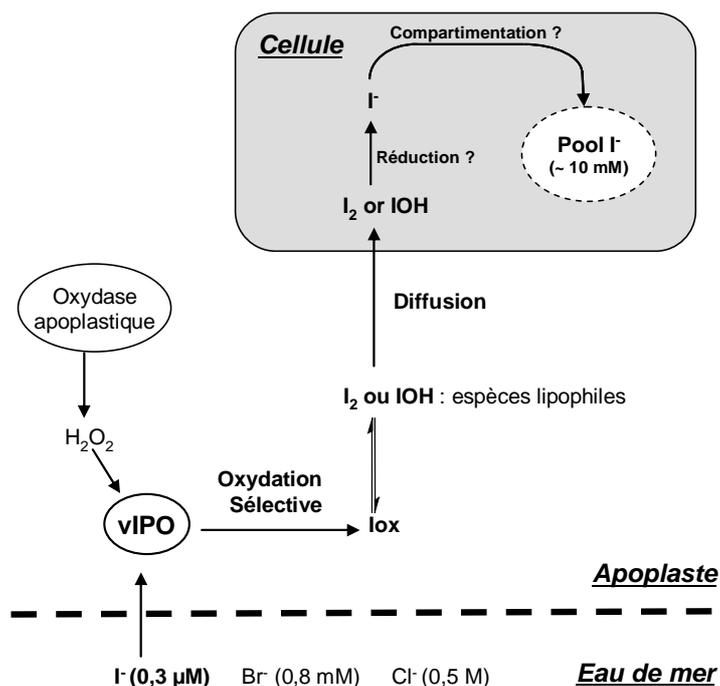
Par la suite, Almeida *et al.* puis Colin *et al.* isolèrent des iodopéroxydases à vanadate (c'est-à-dire des vHPO oxydant sélectivement l'iode) chez *L. hyperborea*, *L. ochroleuca* [28] et *L. digitata* [29, 30]. Ces auteurs montrèrent que les activités peroxydases les plus intenses sont localisées au niveau du tissu périphérique (méristoderme et cortex externe). De plus, les travaux de Colin concernant les protoplastes de *L. digitata* suggèrent très fortement que les vIPO sont apoplastiques [30].

La découverte d'une vIPO périphérique et potentiellement apoplastique chez *L. digitata* conforte donc le modèle de Shaw et de Küpper *et al.* car elle permet d'expliquer à la fois la formation apoplastique d'une espèce oxydée de l'iode ainsi que la très grande sélectivité du mécanisme de captation pour l'iode alors que sa concentration dans l'eau de mer (0,3 µM) est beaucoup plus faible que celle du bromure (0,8 mM) et du chlorure (0,5 M).

A partir de l'ensemble de ces hypothèses et de ces données, le mécanisme de captation suivant peut être proposé (Fig. 6).

---

<sup>3</sup> Les protoplastes sont des cellules (végétales ou bactériennes) obtenues par digestion enzymatique de leur paroi



**Fig. 6 : Mécanisme de captation putatif de l'iodure chez l'algue brune *L. digitata*. Adapté de Shaw et de Küpper *et al.* [12, 23]**

La captation de l'iodure est un mécanisme de diffusion facilitée. La viPO oxyde spécifiquement I<sup>-</sup> en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en une espèce Iox. Iox étant lipophile, diffuse à travers les membranes. Au sein du compartiment intracellulaire, Iox est réduit en iodure et séquestré sous cette forme. viPO : iodopéroxydase à vanadate, Iox : espèce oxydée de l'iode

### 2.3.2 Commentaires sur le mécanisme de captation

Le mécanisme de captation des iodures proposé repose sur un certain nombre d'éléments qui n'ont pas été jusqu'à présent démontrés. Il suppose, en particulier, que l'iode soit stocké sous forme d'iodure. Or, à l'heure actuelle, aucune étude de spéciation ne le démontre de manière irréfutable (cf. paragraphe 2.2 p.35). De même, la localisation intracellulaire de l'iode chez *L. digitata* est un postulat et n'a fait l'objet d'aucune étude d'imagerie chimique, à l'exception de celle de Pedersen *et al.* invalidée par la méthode de préparation des échantillons (cf. paragraphe 2.1.2 p.31). Finalement, bien que l'intervention d'un mécanisme oxydatif ait été établie, l'implication d'une vHPO, certes fort probable, n'a pas été clairement démontrée. L'expérience effectuée par Küpper *et al.* sur les gamétophytes montre que la paroi est plus perméable à l'espèce oxydée Iox (I<sub>2</sub> ou IOH) qu'à l'iodure. Cependant, il faut souligner que le système gamétophyte/vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> ne reproduit pas fidèlement le comportement des tissus du sporophyte. En effet, on peut raisonnablement penser que l'organisation cellulaire du gamétophyte est différente de celle du sporophyte, ce qui pourrait expliquer sa faible capacité à accumuler l'iode. Par ailleurs, les influx déterminés

pour les gamétophytes sont plus faibles que ceux observés pour les tissus des sporophytes [12].

Nous pouvons remarquer que le stockage de l'iode, sous forme iodure, dans le compartiment intracellulaire, nécessiterait une quasi-imperméabilité des membranes. En effet, la concentration intra-cellulaire en iodure serait de l'ordre de 10 mM soit plus de 30 000 fois supérieure à celle de l'eau de mer et *a priori* à celle de l'apoplasme, à moins que ce dernier ne joue le rôle de zone tampon, en établissant un gradient de concentration entre le compartiment intra-cellulaire et le milieu extérieur. De plus, pour que le système soit équilibré, il est nécessaire que le processus de réduction intra-cellulaire de Iox soit très puissant pour maintenir le gradient électrochimique favorable à l'influx et empêcher l'accumulation de Iox, qui, par sa réactivité chimique, est cytotoxique. Ce processus de réduction intracellulaire est à l'heure actuelle, inconnu [31].

### 2.3.3 Mécanisme d'efflux et rôle physiologique de l'iode chez *L. digitata*

En condition basale, on observe un efflux constant d'iodures de telle sorte que le bilan net des échanges soit favorable pour le compartiment algue (Fievet *et al.*, résultat non publié). Cet efflux pourrait être dû à de la simple diffusion. Par traçage par  $^{131}\text{I}$ , cet efflux ne peut pas être quantifié car le facteur de dilution isotopique dans le compartiment intra-cellulaire n'est pas précisément connu [31].

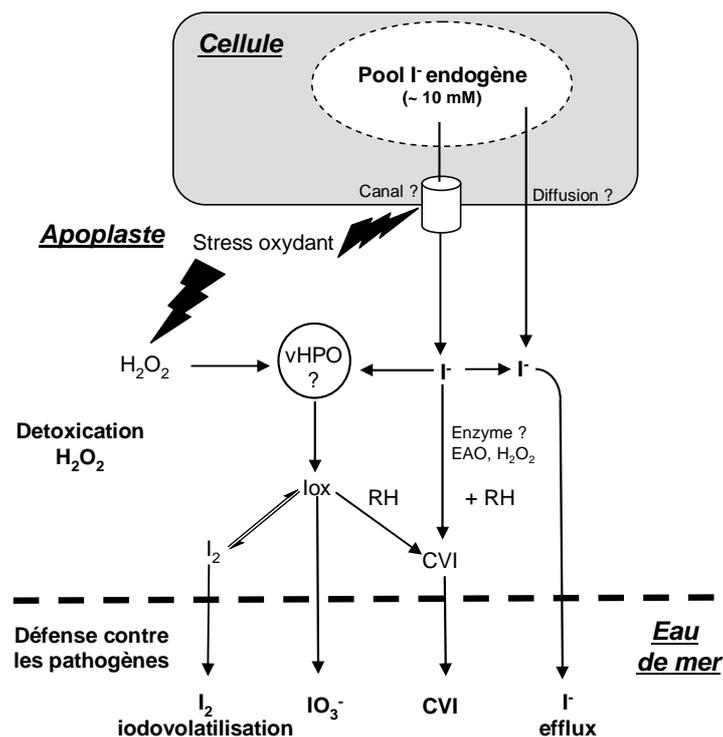
Dans certaines conditions de stress, on observe une remobilisation de l'iode stocké dans les tissus de *L. digitata* par des mécanismes biochimiques qui sont, à l'heure actuelle, inconnus. Il a été montré que de fortes concentrations exogènes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  augmentent l'efflux de radioactivité chez des plantules de *L. digitata* préalablement incubés avec  $^{131}\text{I}$  [12]. L'élicitation par des oligoguluronates – qui mime l'altération des parois par des micro-organismes – provoquent un burst oxydant accompagné d'un efflux net d'iodure (et d'iodate) correspondant à une perte d'environ 1 % du stock total [32]. Ce phénomène est transitoire. De plus, Fievet *et al.* ont observé un phénomène de désensibilisation, lors d'expositions répétées du sporophyte aux oligoguluronates (Fievet *et al.*, résultat non publié). En supposant que l'iode soit effectivement stocké sous forme d'iodure dans le compartiment intra-cellulaire, ces données suggèrent la présence d'un transporteur membranaire, en particulier d'un canal anionique, qui assurerait les efflux transitoires observés.

Par ailleurs, ces conditions de stress c'est-à-dire l'exposition aux oligoguluronates (E. Tessier *et al.*, résultats non publiés) ainsi qu'aux UV et à l'ozone [33, 34], provoquent aussi

chez les sporophytes de *L. digitata* une émission accrue de composés volatils iodés (CVI) et d'iode moléculaire.

L'ensemble de ces données suggère donc que l'iode accumulé par *L. digitata* pourrait participer à des mécanismes de défense ainsi qu'à la régulation du stress oxydant. La libération d'iodures dans le compartiment apoplastique pourrait permettre la production par les vHPO, de CVI et d'iode moléculaire connus pour être biocides et/ou répulsifs [31, 35]. Les iodures apoplastiques pourraient, de plus, participer à la détoxication des espèces activées de l'oxygène et en particulier  $H_2O_2$ , par une action directe ou avec l'appui des vHPO.

En tenant compte des mécanismes de captation et séquestration précédents (Fig. 6) nous pouvons proposer le schéma ci-dessous pour rendre compte des différents mécanismes d'efflux de l'iode (Fig. 7).



**Fig. 7 : Mécanismes d'efflux de l'iode compte tenu du mécanisme de captation de l'iodure proposé par Küpper *et al.* (Fig. 6)**

Certaines conditions de stress engendrent un efflux net d'iodure ainsi qu'une augmentation de l'émission de CVI et  $I_2$ . La biosynthèse de ces espèces aurait lieu dans le compartiment apoplastique et pourrait impliquer les vHPO apoplastiques. CVI : composé volatil iodé, EAO : espèce activée de l'oxygène, RH : précurseur de CVI

Comme présenté précédemment, les mécanismes régissant les transferts de l'iode chez *L. digitata* ne sont pas entièrement élucidés. Cependant, les différentes études menées jusqu'à présent suggèrent très fortement que les vHPO, et plus précisément les vIPO, jouent un rôle clé dans ces mécanismes en facilitant la captation de l'iodure et en participant à la remobilisation de l'iode stocké par l'algue à travers la production des CVI et de l'iode moléculaire. Dans la suite de ce chapitre, nous allons donc présenter, un peu plus en détail, cette classe d'enzymes présente chez un grand nombre de macro-algues.

### **3. Les halopéroxydases à vanadate**

Les halopéroxydases (HPO) regroupent les enzymes qui catalysent l'oxydation des halogénures en utilisant comme co-substrat le peroxyde d'hydrogène. Elles sont particulièrement étudiées car elles facilitent l'halogénéation, dans certains cas de manière régio- et/ou stéréo-sélective, et l'oxydation d'un grand nombre de substrats organiques d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique (pour revues : [36-38])

Les HPO sont définies selon l'halogénure le plus électronégatif qu'elles sont capables d'oxyder : les chloropéroxydases (CPO) oxydent  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  et  $\text{I}^-$ . Les bromopéroxydases (BPO) oxydent  $\text{I}^-$  et  $\text{Br}^-$ . Les iodopéroxydases (IPO) oxydent sélectivement  $\text{I}^-$ .

On distingue plusieurs types de HPO selon la nature de leur co-facteur :

- les HPO sans co-facteur métallique qui sont principalement présentes chez les bactéries, telles que la CPO de *Pseudomonas pyrocinia* [39]
- les HPO à hème. Elles sont prédominantes chez les organismes terrestres et mettent en jeu des oxydations par transfert mono-électronique. On peut citer par exemple la CPO de *Caldariomyces fumago* [40] ou encore la myélopéroxydase (CPO) et la lactopéroxydase (BPO) des mammifères (pour revue : [41]).
- les HPO à vanadate (vHPO). Elles ont été principalement détectées chez les algues marines et chez quelques champignons terrestres. Elles catalysent l'oxydation des halogénures par transfert diélectronique [42].

Dans la suite du chapitre, nous nous intéresserons aux vHPO, seule famille d'enzymes détectée chez les laminaires.

## 3.1. Généralités

### 3.1.1 Occurrence et rôles putatifs des vHPO

La première activité vHPO – plus précisément vBPO – a été caractérisée par Vilter chez *Ascophyllum nodosum* en 1984 [25]. Depuis, de nombreuses activités vBPO ont été découvertes aussi bien chez les chlorophycées (algues vertes) que chez les rhodophycées et les phaeophycées (pour revue :[43]). Quelques activités vIPO strictes ont été détectées chez des algues brunes, principalement chez des laminaires [28, 29, 44]. En revanche, aucune activité réelle vCPO n'a été isolée chez des eucaryotes marins. En ce qui concerne les organismes terrestres, des activités vCPO ont été identifiées chez des champignons hyphomycètes [45, 46] ainsi qu'une activité vBPO chez le lichen *Xanthoria parietina* [47].

Chez les algues marines, les vHPO seraient responsables de la production de composés halogénés en particulier bromés allant de molécules complexes (indoles, terpènes ou polyphénols) à des molécules aliphatiques de petites tailles. Ces composés sont susceptibles d'avoir de nombreuses activités biologiques, notamment anti-bactériennes (par exemple, par inhibition de la formation du biofilm bactérien [48]) et anti-herbivores (pour revue : [35]). La production de composés volatils halogénés (CVH) est très courante chez les macro-algues [49] et constitue, fort probablement, une stratégie développée par ces organismes pour combattre les épiphytes<sup>4</sup> [35, 50, 51]. Par exemple, la production de bromoforme (CHBr<sub>3</sub>) par l'algue rouge *Corallina pilulifera* empêche la prolifération de diatomées microscopiques à sa surface [52].

Il a été observé que l'exposition à de fortes teneurs de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [53, 54] ou à d'autres stress oxydant (UV, O<sub>3</sub>) [33, 34] provoque une augmentation de la production de CVH. Dans ce contexte, il a été proposé que les vHPO participeraient aussi à une activité anti-oxydante par détoxification de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à travers la synthèse de CVH [35, 53].

Les vHPO sont aussi impliquées dans d'autres activités telles que la polymérisation des polyphénols pariétaux pour le renforcement des parois et la synthèse d'adhésifs destinés à la fixation du crampon au substrat [55, 56]. Chez *L. digitata*, les vHPO seraient aussi impliquées dans le mécanisme de captation des iodures (cf. partie 2.3.1) [12, 29].

---

<sup>4</sup> Les épiphytes sont des végétaux qui poussent à la surface d'autres plantes qui leur servent de support.

En ce qui concernent les champignons hyphomycètes tels que *Curvularia inaequalis*, la production de composés organiques halogénés n'a pas été mise en évidence. Puisque ces champignons sont des phytopathogènes et que *C. inaequalis* sécrète la vCPO dans le milieu de culture, il a été proposé que le rôle de la vCPO serait la production exogène d'acide hypochloreux, un oxydant puissant, dans le but de dégrader la paroi de la future cellule hôte [57].

### **3.1.2 Clonage et expression des activités vHPO**

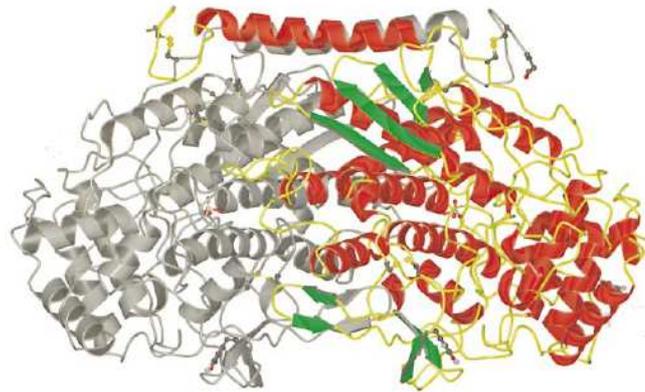
Les gènes codant pour la vCPO du champignon terrestre *C. inaequalis* ainsi que pour plusieurs vBPO d'algues rouges et d'algues brunes ont été clonées et séquencées (pour revue : [31]). Très récemment, Colin *et al.* ont déterminé la séquence d'un ADNc correspondant à une vIPO chez *L. digitata* [58]. Contrairement aux vBPO des espèces du genre *Corallina* [59, 60] et à la vCPO de *C. inaequalis* [61], l'expression de vHPO actives d'algues brunes chez des systèmes hétérologues (*Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*) n'a pas été décrite. Ces enzymes sont donc actuellement obtenues à partir d'extraits algaux, en particulier par le protocole d'extraction par partition de phase mise au point par Vilter *et coll.* [27].

## **3.2. Données structurales concernant les vHPO**

### **3.2.1 Structures des vHPO**

Les vHPO natives (autres que les vCPO) correspondent généralement à des assemblages homo-dimériques de taille variant de 100 kDa jusqu'à 800 kDa. Les monomères ont une taille d'environ 65 kDa et sont associés par des interactions hydrophobes et, dans certains cas, par des ponts disulfures [31]. Certaines enzymes – telles la vBPO d'*A. nodosum* et la vIPO de *L. digitata* – sont de simples homodimères [29, 62] alors que d'autres résultent de l'association de plusieurs entités dimériques telles que les vBPO de *Corallina pilulifera* et *Corallina officinalis* dont les formes natives sont des dodécamères [63, 64]. En solution, la vBPO de *L. digitata* s'associe spontanément pour former un complexe de haut poids moléculaire [29]. La résistance des vHPO à des conditions drastiques (solvants, température, conditions dénaturantes [65-67]) pourrait résulter de ce phénomène d'oligomérisation ainsi que des grandes surfaces d'interaction existant entre leurs monomères constitutifs (46 % de la surface des monomères chez la vBPO d'*A. nodosum*), ce qui stabilise et rigidifie leur structure quaternaire [62]. Les études cristallographiques des vBPO natives de *A. nodosum* [62] et de

*C. officinalis* [63] ont aussi mis en évidence que les monomères sont constitués essentiellement d'hélices  $\alpha$  et de quelques courts feuillets  $\beta$ . La structure ternaire des monomères est dominée par deux motifs à quatre hélices  $\alpha$  (Fig. 8). Ces éléments structuraux se retrouvent chez la vCPO de *C. inaequalis* – bien que cette dernière soit monomérique [68] – et pourraient constituer des caractéristiques générales des vHPO, malgré des identités de séquence relativement faibles [62].



**Fig. 8 : Structure dimérique de la vBPO d'*A. nodosum* d'après Weyand *et al.* [62]**

Monomère 1 : hélices  $\alpha$  en rouge et feuillets  $\beta$  en vert. Monomère 2 : en gris

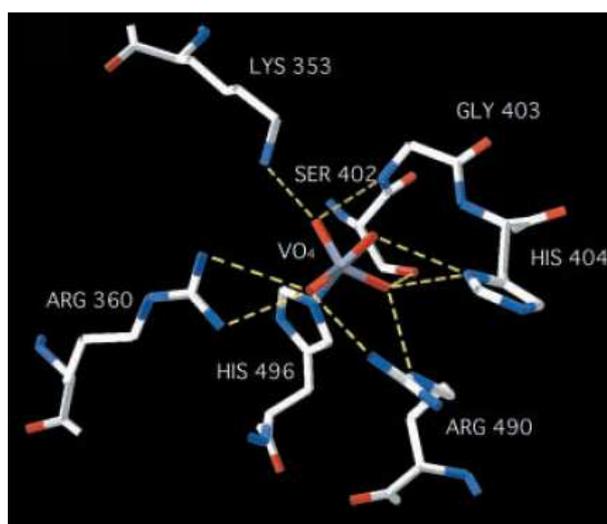
### 3.2.2 *Le site actif des vHPO*

Les études cristallographiques de la vCPO de *C. inaequalis* et des vBPO d'*A. nodosum*, de *C. officinalis* et de *C. pilulifera* ont révélé que ces enzymes présentent un site de fixation du vanadium similaire malgré quelques différences notoires [62, 63, 68]. Son architecture est fort probablement généralisable à d'autres vHPO puisque les analyses des séquences protéiques ont montré que le motif de ce site (HP-S/A-Y-P/G-S/A-GHA) est relativement bien conservé [31].

On dénombre un motif vanadium pour chaque sous-unité monomérique. Le vanadium est fixé au niveau des motifs à quatre hélices  $\alpha$ , au fond d'une large poche composée essentiellement par des résidus hydrophobes et par quelques résidus polaires. Ces résidus – autres que ceux impliqués dans la coordination directe du vanadium – sont très peu conservés entre les différentes vHPO [63] mais constituent un environnement relativement rigide [69].

Au sein du site actif, le vanadium est complexé sous forme de vanadate anionique ( $\text{H}_2\text{VO}_4^-$ ). Il possède une géométrie bipyramidale trigonale : un groupement hydroxyle est en position apicale alors que les trois oxygènes restants (deux oxo et un hydroxyle) constituent le

plan équatorial. Sur la seconde position apicale, le vanadate est en interaction avec l'atome d'azote (Nε2) d'un résidu histidine [62, 63, 68, 70]. Le vanadate est stabilisé par un réseau de liaisons hydrogènes impliquant six acides aminés (dans la première sphère de coordination) : un résidu histidine interagit avec l'hydroxyle apical alors que deux arginines, une lysine, une glycine et une sérine stabilisent les oxygènes du plan équatorial (Fig. 9) [62, 68, 71]. Des études de mutagenèse dirigée sur la vCPO de *C. inaequalis* ont mis en évidence l'importance de ces acides aminés dans la fixation du vanadate et dans l'activité de l'enzyme [61]. La seule vHPO identifiée qui présente une modification au niveau de ces six acides aminés est la vIPO de *L. digitata* : la sérine est remplacée par une alanine [31].



**Fig. 9** : Site actif des vCPO de *C. inaequalis* (PDB ID : 1 IDQ) d'après Tanaka *et al.* [72]

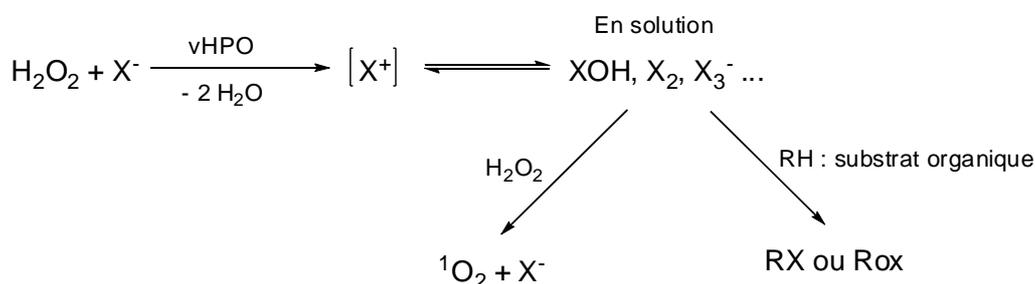
Le vanadate a une géométrie bipyramidale trigonale : 2 groupements oxo et un groupement hydroxyle définissent la base alors qu'un second groupement hydroxyle est en position apicale. Sa sphère de coordination comporte six acides aminés qui sont conservés chez toutes les vHPO séquencées à l'exception de la vIPO de *L. digitata* [31].

### 3.3. Réaction enzymatique et cycle catalytique des vHPO

#### 3.3.1 Cycle catalytique des vHPO

En présence de peroxyde d'hydrogène, les vHPO oxydent l'halogénure  $X^-$ , par transfert diélectronique, en une espèce correspondant formellement à  $X^+$ . Cette espèce ne peut pas être isolée ou détectée directement [73]. Une fois libérée dans le milieu, elle rentre immédiatement en équilibre avec d'autres espèces ( $XOH$ ,  $X_3^-$ ,  $X_2...$ ). La spéciation en solution dépend à la fois des conditions du milieu et de la nature de l'halogène (cf. paragraphe 3.4 p.51). Ces espèces peuvent réagir avec un équivalent supplémentaire de  $H_2O_2$  ce qui amène à la formation de  $X^-$  et d'oxygène singulet. Cette réaction correspond à la dismutation

assistée de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces espèces peuvent aussi halogéner ou oxyder un substrat organique présent dans le milieu (Fig. 10).

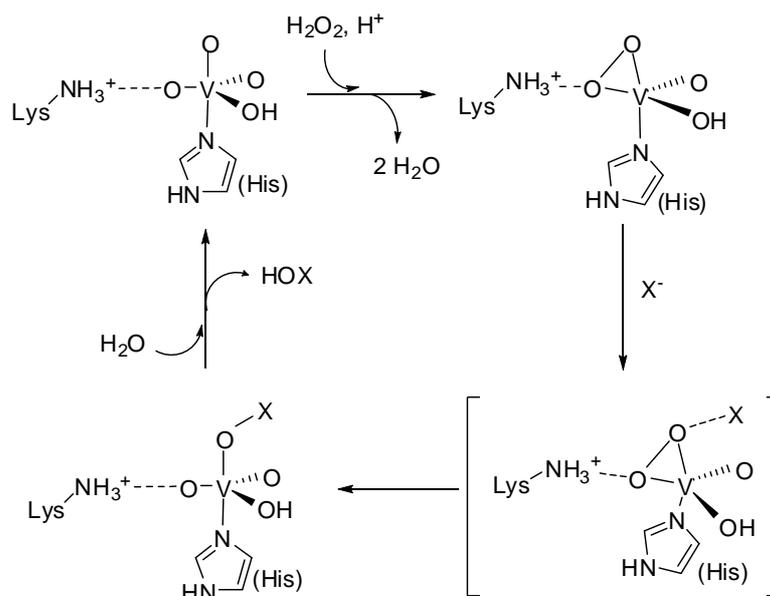


**Fig. 10 : Bilan de la réaction enzymatique et devenir des espèces en solution**

Le cycle catalytique des vHPO actuellement admis est le résultat de nombreuses études effectuées sur trois enzymes modèles : vBPO d'*A. nodosum*, de *C. officinalis* et la vCPO de *C. inaequalis*. Ces études ont eu recours à des techniques très diverses allant de la cristallographie par diffraction de rayons X, de la cinétique enzymatique à la RMN du <sup>51</sup>V ainsi qu'à la spectroscopie d'absorption de rayons X.

Les études de cinétique enzymatique ont clairement montré que le mécanisme mis en jeu est de type bi-bi ping-pong : le peroxyde d'hydrogène est le premier substrat à réagir avec l'enzyme pour former un intermédiaire capable d'oxyder ensuite X<sup>-</sup> [74, 75]. Les expériences de cristallographie par rayons X ont démontré que la réaction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec le vanadate génère un complexe peroxovanadium possédant une géométrie tétragonale distordue [76] (Fig. 11). La base de ce complexe est occupée par le ligand péroxo, ainsi que par un oxygène et l'azote (Nε2) de l'histidine alors qu'un groupement oxo est disposé selon l'axe apical.

La suite du mécanisme du cycle catalytique est, par contre, sujette à controverse. Il est généralement proposé que X<sup>-</sup> attaquerait directement le ligand peroxo induisant la coupure de la liaison O-O et la formation d'un ligand -OX puis finalement, la libération par hydrolyse de l'espèce X<sup>+</sup> qui correspondrait donc à l'acide hypohalogéneux (XOH) [62, 77] (Fig. 11). Cependant, de récentes études théoriques (modélisation moléculaire et théorie de la fonctionnelle de densité) suggèrent que X<sup>-</sup> se coordonnerait au centre métallique avant de réagir avec le groupement peroxo [78]. Pour ces deux modèles, l'attaque de l'halogénure serait facilitée par le résidu lysine qui polariserait la liaison O-O par liaison hydrogène.



**Fig. 11 : Cycle catalytique des vHPO simplifié, généralement proposé d'après Zampella *et al.* [77]**

La première étape est la coordination de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour donner l'intermédiaire peroxovanadium. X<sup>-</sup> attaque ensuite axialement la liaison peroxo polarisée par la lysine. XOH est libérée après hydrolyse. Les acides aminés participant à la coordination du vanadate ne sont pas mentionnés à l'exception de la lysine.

On peut observer que le vanadium demeure à l'état d'oxydation (+V) durant tout le processus [79, 80]. Les transferts sont di-électroniques et non mono-électroniques comme dans le cas des peroxydases à hème pour lesquelles des intermédiaires radicalaires sont observés [81]. Comme proposé par Vilter *et coll.*, le centre métallique des vHPO joue le rôle d'acide de Lewis en activant H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pour faciliter l'attaque nucléophile de X<sup>-</sup> [80]. Compte tenu de la forte conservation du site de fixation du vanadate et des relations phylogénétiques, ce cycle catalytique est pourrait être commun à l'ensemble des vHPO [31].

### 3.3.2 Sélectivité des vHPO envers les halogénures

Pour expliquer la différence de sélectivité des vHPO, l'hypothèse la plus 'naturelle' est de proposer l'existence d'un site de fixation spécifique à l'halogénure. Il est souvent évoqué que ce site pourrait se situer dans la poche contenant le site de actif, au niveau des résidus hydrophobes puisque ces derniers sont faiblement conservés entre les différentes vHPO [38, 42]. Mais aucune étude n'a pu valider cette hypothèse. Aucun co-cristal vHPO-X<sup>-</sup> n'a été décrit dans la littérature. De plus, Weyand *et al.* n'ont pas pu identifier une région pouvant correspondre à un site spécifique de fixation de X<sup>-</sup>, au niveau de la structure de la vBPO d'*A. nodosum* obtenue par cristallographie par rayons X [62].

Or, les études de XANES<sup>5</sup> de la raie de K du vanadium et d'EXAFS<sup>6</sup> de la raie K du brome effectuées sur la vBPO d'*A. nodosum* ont clairement montré que le bromure ne se coordonne pas sur le vanadate en l'absence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Par ailleurs, Dau *et al.* ont suggéré la coordination de Br<sup>-</sup> sur la sérine du site actif par attaque nucléophile [82]. Ce résultat est contesté par la récente étude de Feiters *et al.* [83]. Ces derniers ont clairement montré que le site de bromation est présent sur la vBPO native, en l'absence d'ajout de bromure. Par conséquent, le signal observé correspond à une modification post-traductionnelle de l'enzyme et non à la coordination de Br<sup>-</sup> sur un site spécifique, en vue de la réaction enzymatique. Des analyses par spectrométrie de masse ont mis en évidence que les résidus bromés correspondent à des tyrosines situées hors du site actif [83].

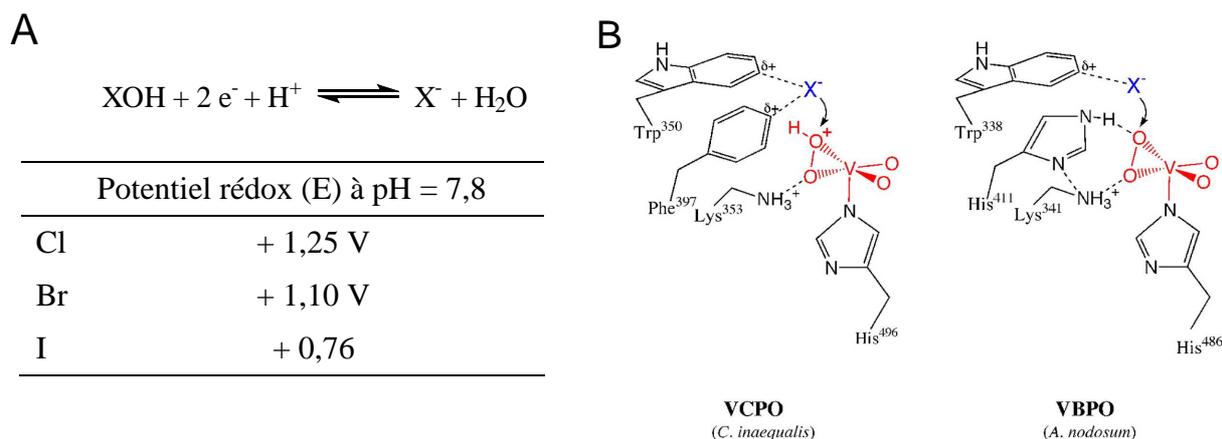
En considérant les résultats des expériences de mutagenèse dirigée [61, 84, 85], les résultats d'EXAFS et les potentiels redox des couples XO<sup>-</sup>/X<sup>-</sup> (Fig. 12.A), une hypothèse plus consensuelle émerge : la sélectivité des vHPO envers l'halogénure pourrait s'expliquer par une différence de pouvoir oxydant du peroxovanadium résultant d'une modification de sa densité électronique [31]. En effet, la densité électronique sur les atomes du vanadate et du peroxovanadium est contrôlée par le réseau de liaisons hydrogènes, en particulier au niveau de la première et de la seconde sphère de coordination. Pour illustration, lors de la comparaison des structures de la vCPO de *C. inaequalis* et de la vBPO d'*A. nodosum*, Weyand *et al.* ont observé que l'histidine (His411) chez la vBPO remplace la phénylalanine (Phe397) chez la vCPO. Cette modification est susceptible de diminuer le potentiel redox du peroxovanadium car elle altère la polarisation de la liaison peroxy (Fig. 12.B) [62]. Cette analyse a été récemment confortée par les études théoriques de Zampella *et al.* (par la théorie de la fonctionnelle de densité) [77].

Par ailleurs, il peut être remarqué que chez la vIPO de *L. digitata*, la substitution de la sérine par un résidu d'alanine dans la première sphère de coordination du vanadate pourrait être à l'origine de sa stricte sélectivité pour l'iode [58].

---

<sup>5</sup> XANES : X-ray Absorption Near Edge Structure

<sup>6</sup> EXAFS : Extended X-ray Absorption Fine Structure



**Fig. 12 : Eléments expliquant la sélectivité des vHPO envers les halogénures**

A. Potentiels rédox des couples XOH/X<sup>-</sup> calculés par l'équation de Nernst à pH = 7,8

B. Modulation du potentiel redox par le réseau de liaisons hydrogènes, comparaison vCPO et vBPO d'après Hasan *et al.* [84]. Chez la vBPO, l'His411 établit une liaison hydrogène avec la Lys341 ce qui diminue la polarisation et donc la réactivité de la liaison peroxy vis-à-vis de X<sup>-</sup>.

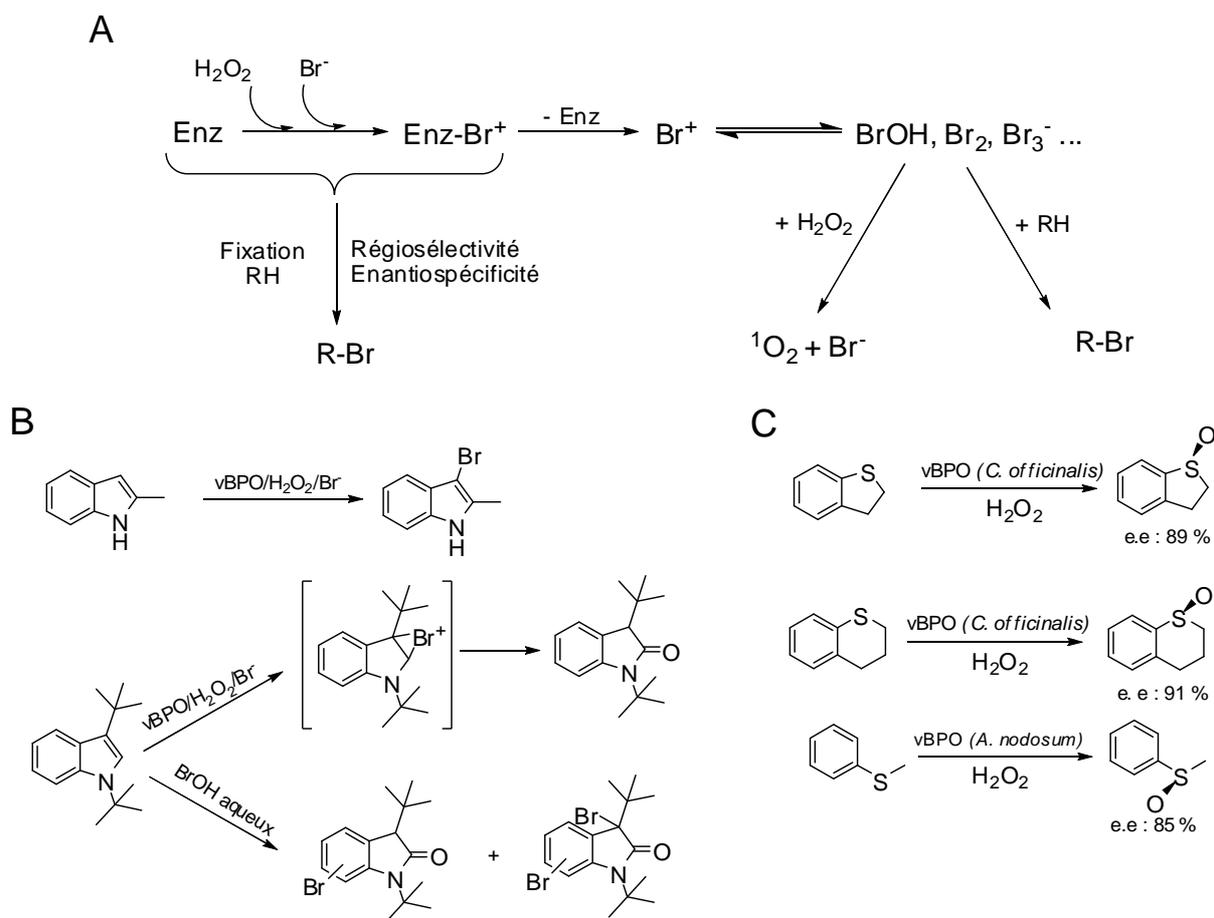
### 3.3.3 Halogénéation de substrats organiques

Par la génération de l'espèce diffusible X<sup>+</sup>, les vHPO catalysent indirectement l'halogénéation de nombreux substrats organiques. Ces réactions ne sont ni énantiométriques ni énantiométriques et induisent des régiosélectivités analogues à la voie purement chimique.

Cependant, Butler et coll. ont montré que le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Br<sup>-</sup> induit la bromation et la cyclisation énantiométrique de certains sesquiterpènes, ce qui laisse suggérer l'intervention des vBPO dans la biogénèse des produits naturels bromés d'origine marine [86]. Ce même système semble induire une bromation régiosélective de certains indoles (Fig. 13.B) [87, 88]. Pour expliquer ces résultats, il est proposé l'intervention d'une espèce X<sup>+</sup> non diffusible (c'est-à-dire liée à l'enzyme) et l'existence d'un site de fixation des substrats organiques, à proximité du site actif, probablement au niveau des résidus hydrophobes (pour revue [89]) (Fig. 13.A).

Un tel site de fixation reste, à l'heure actuelle, à démontrer. Aucune étude de co-cristallisation substrat-enzyme ou de docking n'a été décrite dans la littérature. Weyand *et al.* n'ont pas identifié une région pouvant correspondre à un site de fixation des substrats organiques sur la structure de la vBPO d'*A. nodosum* [62]. De plus, la diversité structurale des substrats ne corrèle pas avec l'existence d'un site de reconnaissance et de fixation. On peut plutôt suggérer que, par des interactions non spécifiques, l'environnement du site actif induit des positionnements particuliers du substrat vis-à-vis du complexe métallique, favorisant

certaines régiosélectivités. L'enzyme se comporterait ainsi comme un simple catalyseur chiral. Cette hypothèse pourrait expliquer aussi l'oxydation énantiosélective des sulfures organiques par le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 13.C) [90-92] pour laquelle Wever *et coll.* évoquent l'idée d'une fixation de faible affinité [93].



**Fig. 13 : Exemples de réactions régiosélectives et énantiosélectives catalysées par les vBPO**

A. Mécanisme incluant la fixation du substrat organique à l'enzyme. Butler *et coll.* proposent le passage par un intermédiaire Enz-Br<sup>+</sup> sur lequel peut se fixer le substrat RH pour expliquer les régiosélectivités et les énantiospécificités observées lors de la cyclisation de certains terpènes et la bromation des indoles. D'après Butler *et coll.* [86-88].

B. Exemples de réactions régiosélectives catalysées par la vBPO d'*A. nodosum*. La bromation du 2-méthylindole s'effectue régiosélectivement en position 3 par le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Br<sup>-</sup>. Le 1,3-di-tert-butyl-1H-indole réagit en présence du système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Br<sup>-</sup> pour donner un produit unique : 1,3-di-tert-butylindolin-2-one. La même réaction réalisée avec une solution acide hypobroméuse aqueuse donne plusieurs produits de bromation d'après Butler *et coll.* [87, 88].

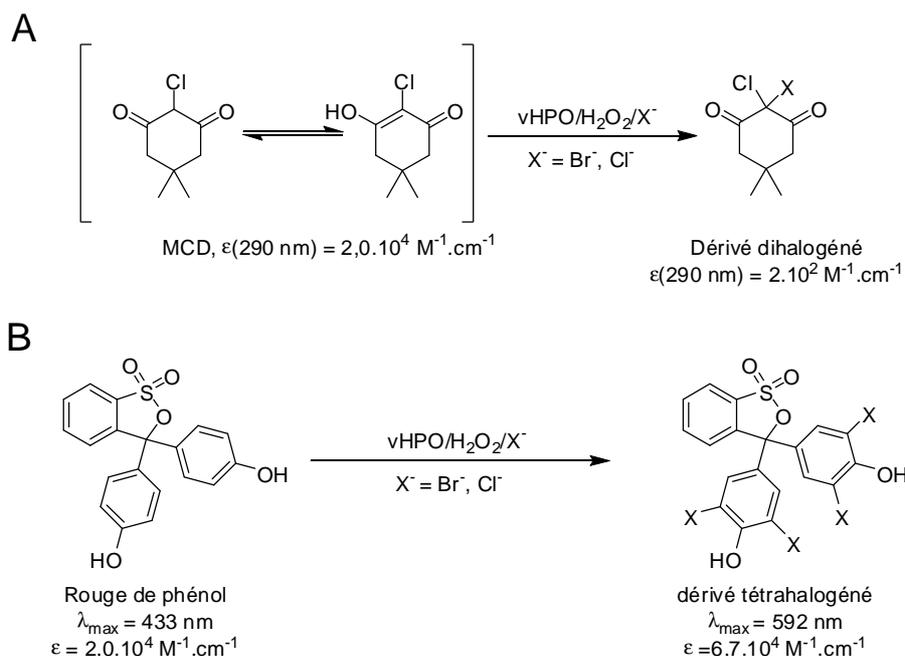
C. Oxydation énantiosélective par le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des sulfures organiques. De fort excès énantiomériques sont observés si la solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est rajoutée très lentement pour éviter l'oxydation directe par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [90, 91].

Etrangement, l'activité iodopéroxydase des vBPO a été systématiquement occultée dans les études de Butler et coll. A notre connaissance, aucune étude d'halogénéation approfondie, à partir d'un système vHPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I, n'est décrite dans la littérature.

### 3.4. Méthodes de suivi des activités des vHPO et chimie en solution.

Le suivi des activités vHPO ne peut pas être effectué par la détection directe du produit de réaction X<sup>+</sup>. Dès sa libération dans le milieu, X<sup>+</sup> entre en équilibre avec différentes espèces oxydées dont la spéciation dépend des conditions du milieu [75]. En condition acide, ces espèces correspondent principalement à XO<sub>2</sub>H, X<sub>2</sub> et X<sub>3</sub><sup>-</sup>. Les seules méthodes de détection et de suivi des activités vHPO sont donc des méthodes indirectes. Elles reposent sur la réactivité et, plus précisément, sur la capacité d'halogénéation des espèces oxydées de l'halogène présentes en solution.

Les activités bromo- et chloro-péroxydases sont généralement suivies par la méthode spectrophotométrique mise au point par Hager [94]. Elle est basée sur l'utilisation d'une 1,3-dicétone : le monochlorodimédone (MCD). Puisque le coefficient d'extinction du MCD à 290 nm est de 2,0.10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> alors que celui de son dérivé dihalogéné n'est que de 2.10<sup>2</sup> M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, la méthode consiste à suivre la DO(290 nm) au cours du temps (Fig. 14.A). Le MCD présente l'avantage d'être très réactif envers X<sup>+</sup> et de ne posséder qu'une seule position d'halogénéation. Le MCD a été largement utilisé pour déterminer les paramètres cinétiques des vHPO [74, 75]. Pour des études qualitatives ou de compétition avec des substrats organiques aromatiques, le rouge de phénol lui est préféré car l'apparition de son produit d'halogénéation est suivie à 592 nm ( $\epsilon = 6,7.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) [65, 95]. Cependant, le rouge de phénol est moins réactif que le MCD et possède quatre positions d'halogénéation, ce qui ne permet pas son utilisation pour la détermination des paramètres cinétiques. De plus, il s'agit d'un indicateur pH, ce qui limite son utilisation à une plage de pH restreinte (6-7) (Fig. 14.B).

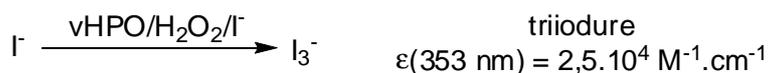


**Fig. 14 : Méthodes de suivi des activités bromo- et chloro-péroxydase**

A. par le MCD : méthode mise au point par Hager [94]

B. par le rouge de phénol. Cette méthode est surtout décrite pour le suivi de l'activité bromopéroxydase d'après Franssen *et al.* [65]

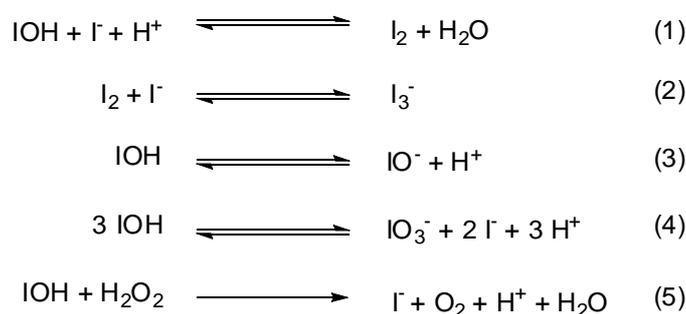
En ce qui concerne l'activité iodopéroxydase, la seule méthode décrite dans la littérature consiste à suivre la formation d' $\text{I}_3^-$  via l'absorbance à 353 nm ( $\epsilon = 2,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) [43] (Fig. 15).  $\text{I}_3^-$  résulte de la complexation de  $\text{I}^-$  excédentaire présent dans le milieu et de  $\text{I}_2$ .  $\text{I}_2$  est formée de manière quasi-immédiate à partir de l'espèce  $\text{I}^\cdot$  générée par la vHPO ( $K_1 = 1,4 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-2}$  [96]) (Fig. 16.(1) et (2)).



**Fig. 15 : Suivi de l'activité iodopéroxydase par la formation de  $\text{I}_3^-$**

Il faut cependant noter que l'utilisation de ces méthodes pour caractériser les propriétés cinétiques des vHPO est délicate compte tenu des équilibres chimiques rapides contrôlant la spéciation des halogènes ainsi que de la réaction de dismutation assistée de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ceci pourrait expliquer les grandes différences d'activité spécifique observées pour les vBPO [31]. Le MCD est utilisé généralement en condition légèrement acide car à pH neutre, les espèces oxydées du brome deviennent très réactives envers  $\text{H}_2\text{O}_2$  entraînant la formation d'oxygène singulet au détriment de la réaction de bromation [73, 75, 81, 97]. C'est d'ailleurs pour cette raison que le suivi de l'activité bromopéroxydase est impossible *via*  $\text{Br}_3^-$  (268 nm,  $\epsilon$

=  $4,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) [74]. En ce qui concerne le suivi de l'activité iodopéroxydase, la formation de  $\text{I}_3^-$  est conditionnée par le pH et la concentration en iodure. A  $\text{pH} < 7$  et en présence d'une certaine concentration initiale de  $\Gamma$ , les espèces prédominantes en solution sont  $\Gamma$ ,  $\text{I}_2$  et  $\text{I}_3^-$ . Les iodates sont généralement négligeables car leur formation est lente (Fig. 16.(3)). Pour un  $\text{pH} > 7$ ,  $\text{I}_3^-$  est dissocié au profit de  $\text{IO}^-$  [19] et comme pour  $\text{Br}^+$ , les espèces  $\Gamma^+$  deviennent plus réactives envers  $\text{H}_2\text{O}_2$  [97]. Par conséquent, les pHs optimaux des activités iodopéroxydase (obtenus autour de  $\text{pH} = 5,5-6$ ) pourraient s'expliquer par la stabilité accrue de  $\text{I}_3^-$  et non par la simple augmentation de l'activité des vIPO [29].



**Fig. 16 : Chimie de l'iode en solution : principaux équilibres**

Si la formation de  $\text{I}_2$  est très favorisée ( $K_1 = 1,4 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-2}$ ), le complexe  $\text{I}_3^-$  présente une faible constante d'association ( $K_2 = 7 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$ ) (Fig. 16.(1) et (2)). Huwiler *et al.* ont montré que pour que 90% des molécules  $\text{I}_2$  contenues dans une solution à  $30 \mu\text{M}$  soit complexé, il est nécessaire que la concentration en  $\Gamma$  soit supérieure à  $10 \text{ mM}$  [98]. Par conséquent, à cause de la faible constante d'association du complexe formé, la méthode de suivi par  $\text{I}_3^-$  est susceptible d'entraîner une sur-évaluation de la  $K_{\text{Mapp}}(\Gamma)^7$  des activités iodopéroxydases car elle ne peut être pas être mise en place à une faible concentration d'iodure. On peut remarquer que les  $K_{\text{Mapp}}(\Gamma)$  sont évaluées aux alentours du  $\text{mM}$  pour les vIPO, soit une valeur  $10^4$  fois supérieure à la concentration en iodure de l'eau de mer [28, 44].

Nous pouvons de plus souligner que la stabilité du complexe  $\text{I}_3^-$  est influencée par la présence d'autres anions ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ) qui peuvent se complexer avec  $\text{I}_2$ . La présence de solvant dans le milieu peut aussi fortement stabiliser  $\text{I}_3^-$  : par exemple, la constante d'association  $K_2$  est de  $2,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  dans un mélange 2-propanol/eau. Elle influence aussi les propriétés spectrophotométriques de  $\text{I}_3^-$  (déplacement de  $\lambda_{\text{max}}$  et variation du coefficient d'extinction) [99].

<sup>7</sup>  $K_{\text{Mapp}}$  : constante de Michaelis apparente

Dans ce contexte, l'étude de l'effet des solvants organiques sur l'activité des vHPO en utilisant le suivi par  $I_3^-$  est donc problématique. Compte tenu de la chimie en solution de l'iode, cette méthode est donc délicate à mettre en œuvre pour déterminer les paramètres cinétiques des activités iodopéroxydases.

#### **4. Conclusion**

Par leur production de composés volatils iodés et d'iode moléculaire ainsi que par leur teneur en iode très élevée (0,5-1% de leur poids sec), les Laminariales, en particulier les laminaires, sont des acteurs clés du cycle géochimique de l'iode.

Cependant, les mécanismes biochimiques contrôlant les transferts d'iode chez ces algues brunes n'ont pas été entièrement élucidés. En effet, bien qu'il soit fort probable que les laminaires stockent l'iode sous une forme inorganique, les études de spéciation entreprises jusqu'à présent ne permettent pas de démontrer de manière irréfutable qu'il s'agit de l'iodure. Le rôle des différents tissus – méristoderme, cortex et medulla – dans l'accumulation de l'iode n'a pas été clairement identifié. Par ailleurs, la localisation sub-cellulaire de l'iode est inconnue et n'a fait l'objet d'aucune étude utilisant une technique d'imagerie moderne. Cependant, les études physiologiques ont mis en évidence que les halopéroxydase à vanadate (vHPO) sont fort probablement des enzymes clés dans les mécanismes de transfert de l'iode. Chez *L. digitata*, une vIPO serait responsable de la captation de l'iodure en permettant sa diffusion facilitée par la production d'une espèce oxydée de l'iode (Iox). Iox, plus lipophile que l'iodure, pourrait diffuser à travers les membranes pour être accumulée, après réduction, dans le compartiment intra-cellulaire. Il est plus généralement proposé que les vHPO seraient impliquées dans la biosynthèse de composés halogénés, en particulier de CVHs.

Découvertes par Vilter en 1984 chez *A. nodosum*, les vHPO sont des enzymes que l'on retrouve chez diverses macro-algues marines. Ces enzymes catalysent l'oxydation des halogénures en présence de  $H_2O_2$  en une espèce supposée être l'acide hypohalogéneux correspondant. Elles ont fait l'objet de très nombreuses études, ce qui a permis de caractériser leurs structures ternaires et quaternaires, leur site actif et leur cyclique catalytique. Cependant, un certain nombre de points reste à élucider : Les éléments structuraux contrôlant leur sélectivité envers halogénure n'ont pas été clairement établis. L'existence d'un site de fixation des substrats organiques – suggérée par les travaux de Butler et coll. – n'a jamais été mise en évidence.

A ce jour, les rôles physiologiques de l'iode et des vHPO n'ont pas été clairement démontrés. Chez les laminaires, il est fortement suggéré qu'ils participent conjointement à des mécanismes de défense contre le stress oxydant et les pathogènes. Dans ce contexte, des inhibiteurs spécifiques des vHPO constitueraient des outils pharmacologiques puissants pour démontrer leur implication *in vivo* dans le mécanisme d'accumulation de l'iode chez les laminaires et pour comprendre leur rôle dans la production des composés volatils halogénés.



## **Bibliographie**

1. De Reviere B: **Place des lignées végétales dans le vivant.** In *Biologie et phylogénie des algues. Volume 1.* Edited by Sup B: Belin 2002: 9-51
2. De Reviere B: **Diversité des structures, des métabolismes et des habitats.** In *Biologie et phylogénie des algues. Volume 1.* Edited by Sup B: Belin 2002: 111-192
3. Lee RE: **Heterokontophyta, Phaeophyceae.** In *Phycology.* 3 edition: Cambridge University Press; 1980: 481-557
4. Amat MA, Srivastava LM: **Translocation of iodine in *Laminaria saccharina* (Phaeophyta).** *J Phycol* 1985, **21**:330-333.
5. Floch J-Y, Penot M: **Etude comparative du transport à longues distance de différents radioéléments dans le thalle de *Laminaria digitata* (Linné) Lamouroux.** *C R Acad Sc Paris* 1976, **282**:989-992.
6. Mabeau S, Kloareg B: **Isolation and Analysis of the Cell Walls of Brown Algae: *Fucus spiralis*, *F. ceranoides*, *F. vesiculosus*, *F. serratus*, *Bifurcaria bifurcata* and *Laminaria digitata*.** *J Exp Bot* 1987, **38**:1573-1580.
7. Davis TA, Volesky B, Mucci A: **A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae.** *Water Res* 2003, **37**:4311-4330.
8. Khotimchenko YS, Kovalev VV, Savchenko OV, Ziganshina OA: **Physical-Chemical Properties, Physiological Activity, and Usage of Alginates, the Polysaccharides of Brown Algae.** *Russian Journal of Marine Biology* 2001, **27**:S53-S64.
9. Saenko GN, Kravtsova YY, Ivanenko VV, Sheludko SI: **Concentration of iodine and bromine by plants in the seas of Japan and Okhotsk.** *Mar Biol* 1978, **47**:243-250.
10. Ar Gall E, Küpper FC, Kloareg B: **A survey of iodine content in *Laminaria digitata*.** *Botanica Marina* 2004, **47**:30-37.
11. Larsen B, Haug A: **The distribution of Iodine and other constituents in stipe of *Laminaria hyperborea* (Gunn.) Foslie.** *Botanica Marina* 1960, **II**:250-254.
12. Küpper FC, Schweigert N, Ar Gall E, Legendre J-M, Vilter H, Kloareg B: **Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide.** *Planta* 1998, **207**:163-171.
13. Dangeard P: **L'iode des algues, les ioduques, l'iodovolatilisation.** *Le Botaniste* 1957, **41**:187-207.
14. Pedersen M, Roomans GM: **Ultrastructural localization of bromine and iodine in the stipes of *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour., *Laminaria saccharina* (L.) Lamour. and *Laminaria hyperborea* (Gunn.) Fosl.** *Botanica Marina* 1983, **26**:113-118.
15. Roche J, Yagi Y: **Sur la fixation de l'iode radioactif par les algues et sur les constituants iodés des laminaires.** *Comptes rendus de la société biologique Paris* 1952, **146**:642-645.
16. Tong W, Chaikoff IL: **Metabolism of <sup>131</sup>I by the marine alga, *Nereocystis luetkeana*.** *J Biol Chem* 1955, **215**:473-484.
17. Shah M, Wuilloud RG, Kannamkumaratha SS, Caruso JA: **Iodine speciation studies in commercially available seaweed by coupling different chromatographic techniques with UV and ICP-MS detection.** *J Anal At Spectrom* 2005, **20**:176-182.
18. Hou X, Chai C, Qian Q, Yan X, Fan X: **Determination of chemical species of iodine in some seaweeds (I).** *Sci Total Environ* 1997, **204**:215-221.

19. Gottardi W: **Iodine and Disinfection: Theoretical Study on Mode of Action, Efficiency, Stability, and Analytical Aspects in the Aqueous System.** *Archiv der Pharmazie* 1999, **332**:151-157.
20. Kylin H: **Über das Vorkommen von Jodiden, Bromiden und Jodidoxydasen bei Meeresalgen.** *Hoppe-Seyley's Z Physiol Chem* 1929, **186**:50-84.
21. Kelly S, Baily NA: **The Uptake of Radioactive Iodine by *Ascophyllum*.** *Biol Bull* 1951, **100**:188-190.
22. Baily NA, Kelly S: **Iodine exchange in *Ascophyllum*.** *Biol Bull* 1955, **109**:13.
23. Shaw TI: **Mechanism of iodine accumulation by the brown seaweed *Laminaria digitata*: the uptake of iodine-131.** *Proc Roy Soc (London)* 1959, **B150**:356-371.
24. Murphy MJ, O'hEocha C: **Peroxidase activity in the brown alga *Laminaria digitata*.** *Phytochemistry* 1973, **12**:2645-2648.
25. Vilter H: **Peroxidases from phaeophyceae: a vanadium (V)-dependent peroxidase from *Ascophyllum nodosum*.** *Phytochemistry* 1984, **23**:1387-1390.
26. De Boer E, Tromp MGM, Plat H, Krenn GE, Wever R: **Vanadium (V) as an essential element for haloperoxidase activity in marine brown algae: purification and characterization of a vanadium (V)-containing bromoperoxidase from *Laminaria saccharina*.** *Biochim Biophys Acta* 1986, **872**:104-115.
27. Jordan P, Vilter H: **Extraction of proteins from material rich in anionic mucilages: partition and fractionation of vanadate-dependent bromoperoxidases from the brown algae *Laminaria digitata* and *L. saccharina* in aqueous polymer two-phase systems.** *Biochim Biophys Acta* 1991, **1073**:98-106.
28. Almeida M, Filipe S, Humanes M, Maia MF, Melo R, Severino N, da Silva JA, Frausto da Silva JJ, Wever R: **Vanadium haloperoxidases from brown algae of the *Laminariaceae* family.** *Phytochemistry* 2001, **57**:633-642.
29. Colin C, Leblanc C, Wagner E, Delage L, Leize-Wagner E, Van Dorselaer A, Kloareg B, Potin P: **The brown algal kelp *Laminaria digitata* features distinct bromoperoxidase and iodoperoxidase activities.** *J Biol Chem* 2003, **278**:23545-23552.
30. Colin C: **Caractérisation biochimique et moléculaire des halopéroxydases dépendantes du vanadate chez l'algue brune *Laminaria digitata*.** PhD report, Ecole doctorale sciences de l'environnement d'Ile-de-France, Université Paris VI; 2004.
31. Leblanc C, Colin C, Cosse A, Delage L, La Barre S, Morin P, Fievet B, Voiseux C, Ambroise Y, Verhaeghe E, et al: **Iodine transfers in the coastal marine environment: the key role of brown algae and of their vanadium-dependent haloperoxidases.** *Biochimie* 2006, **88**:1773-1785.
32. Küpper FC, Kloareg B, Guern J, Potin P: **Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata*.** *Plant Physiol* 2001, **125**:278-291.
33. Palmer CJ, Anders TL, Carpenter LJ, Kupper FC, McFiggans GB: **Iodine and Halocarbon Response of *Laminaria digitata* to Oxidative Stress and Links to Atmospheric New Particle Production.** *Environ Chem* 2005, **2**:282-290.
34. Laturus F, Svensson T, Wiencke C, Oberg G: **Ultraviolet Radiation Affects Emission of Ozone-Depleting Substances by Marine Macroalgae: Results from a Laboratory Incubation Study.** *Environ Sci Technol* 2004, **38**:6605-6609.
35. Manley SL: **Phytogenesis of halomethanes: A product of selection or a metabolic accident?** *Biogeochemistry* 2002, **60**:163-180.
36. Littlechild J: **Haloperoxidases and their role in biotransformation reactions.** *Curr Opin Chem Biol* 1999, **3**:28-34.
37. Dembitsky VM: **Oxidation, epoxidation and sulfoxidation reactions catalysed by haloperoxidases.** *Tetrahedron* 2003, **59**:4701-4720.

38. Carter-Franklin JN, Butler A: **Vanadium bromoperoxidase-catalyzed biosynthesis of halogenated marine natural products.** *J Am Chem Soc* 2004, **126**:15060-15066.
39. Wiesner W, van Pee KH, Lingens F: **Purification and characterization of a novel bacterial non-heme chloroperoxidase from *Pseudomonas pyrrocinia*.** *J Biol Chem* 1988, **263**:13725-13732.
40. Rubin B, VanMiddlesworth J, Thomas K, Hager L: **Crystallization and preliminary X-ray data for chloroperoxidase.** *J Biol Chem* 1982, **257**:7768-7769.
41. O'Brien PJ: **Peroxidases.** *Chem Biol Interact* 2000, **129**:113-139.
42. Butler A: **Vanadium haloperoxidases.** *Curr Opin Chem Biol* 1998, **2**:279-285.
43. Vilter H: **Vanadium-dependent haloperoxidases.** In *Metal ions in biological systems*. Edited by Sigel H, Sigel A. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker; 1995: 325-362
44. Almeida MG, Humanes M, Melo R, Silva JA, da Silva JJ, Wever R: **Purification and characterisation of vanadium haloperoxidases from the brown alga *Pelvetia canaliculata*.** *Phytochemistry* 2000, **54**:5-11.
45. van Schijndel JW, Vollenbroek EG, Wever R: **The chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*; a novel vanadium enzyme.** *Biochim Biophys Acta* 1993, **1161**:249-256.
46. Barnett P, Hemrika W, Dekker HL, Muijsers AO, Renirie R, Wever R: **Isolation, characterization, and primary structure of the vanadium chloroperoxidase from the fungus *Embellisia didymospora*.** *J Biol Chem* 1998, **273**:23381-23387.
47. Plat H, Krenn BE, Wever R: **The bromoperoxidase from the lichen *Xanthoria parietina* is a novel vanadium enzyme.** *Biochem J* 1987, **248**:277-279.
48. Borchardt SA, Allain EJ, Michels JJ, Stearns GW, Kelly RF, McCoy WF: **Reaction of Acylated Homoserine Lactone Bacterial Signaling Molecules with Oxidized Halogen Antimicrobials.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:3174-3179.
49. Baker JM, Sturges WT, Sugier J, Sunnenberg G, Lovett AA, Reeves CE, Nightingale PD, Penkett SA: **Emissions of CH<sub>3</sub>Br, organochlorines, and organoiodines from temperate macroalgae.** *Chemosphere- Global Science Change* 2001, **3**:93-106.
50. Potin P, Bouarab K, Kupper F, Kloareg B: **Oligosaccharide recognition signals and defense reactions in marine plant-microbe interactions.** *Curr Opin Microbiol* 1999, **2**:276-283.
51. Malin G, Küpper FC, Carpenter LJ, Baker A, Broadgate W, Kloareg B, Liss PS: **Trace gas production by seaweeds: defense, oxidative stress, signalling and atmospheric significance.** *J Phycol* 2001, **37**:32-33.
52. Ohsawa N, Ogata Y, Okada N, Itoh N: **Physiological function of bromoperoxidase in the red marine alga, *Corallina pilulifera*: production of bromoform as an allelochemical and the simultaneous elimination of hydrogen peroxide.** *Phytochemistry* 2001, **58**:683-692.
53. Pedersen M, Collen J, Abrahamsson K, Ekdahl A: **Production of halocarbons from seaweeds: an oxidative stress reaction.** *Sci Mar* 1996, **60**:257-263.
54. Collen J, Ekdahl A, Abrahamsson K, Pedersen M: **The involvement of hydrogen peroxide in the production of volatile halogenated compounds by *Meristiella gelidium*.** *Phytochemistry* 1994, **36**:1197-1202.
55. Bitton R, Ben-Yehuda M, Davidovich M, Balazs Y, Potin P, Delage L, Colin C, Bianco-Peled H: **Structure of algal-born phenolic polymeric adhesives.** *Macromol Biosci* 2006, **6**:737-746.
56. Berglin M, Delage L, Potin P, Vilter H, Elwing H: **Enzymatic cross-linking of a phenolic polymer extracted from the marine alga *Fucus serratus*.** *Biomacromolecules* 2004, **5**:2376-2383.

57. Butler A, Carter JN, Simpson MT: **Vanadium in Proteins and Enzymes.** In *Handbook on Metalloproteins*. pp. 153-179; 2001:153-179.
58. Colin C, Leblanc C, Michel G, Wagner E, Leize-Wagner E, Van Dorsselaer A, Potin P: **Vanadium-dependent iodoperoxidases in *Laminaria digitata*, a novel biochemical function diverging from brown algal bromoperoxidases.** *J Biol Inorg Chem* 2005, **10**:156-166.
59. Shimonishi M, Kuwamoto S, Inoue H, Wever R, Ohshiro T, Izumi Y, Tanabe T: **Cloning and expression of the gene for a vanadium-dependent bromoperoxidase from a marine macro-alga, *Corallina pilulifera*.** *FEBS Lett* 1998, **428**:105-110.
60. Coupe EE, Smyth MG, Fosberry AP, Hall RM, Littlechild JA: **The dodecameric vanadium-dependent haloperoxidase from the marine algae *Corallina officinalis*: Cloning, expression, and refolding of the recombinant enzyme.** *Protein Expr Purif* 2007, **52**:265-272.
61. Hemrika W, Renirie R, Macedo-Ribeiro S, Messerschmidt A, Wever R: **Heterologous expression of the vanadium-containing chloroperoxidase from *Curvularia inaequalis* in *Saccharomyces cerevisiae* and site-directed mutagenesis of the active site residues His(496), Lys(353), Arg(360), and Arg(490).** *J Biol Chem* 1999, **274**:23820-23827.
62. Weyand M, Hecht H, Kiess M, Liaud M, Vilter H, Schomburg D: **X-ray structure determination of a vanadium-dependent haloperoxidase from *Ascophyllum nodosum* at 2.0 Å resolution.** *J Mol Biol* 1999, **293**:595-611.
63. Isupov MN, Dalby AR, Brindley AA, Izumi Y, Tanabe T, Murshudov GN, Littlechild JA: **Crystal structure of dodecameric vanadium-dependent bromoperoxidase from the red algae *Corallina officinalis*.** *J Mol Biol* 2000, **299**:1035-1049.
64. Littlechild J, Garcia-Rodriguez E: **Structural studies on the dodecameric vanadium bromoperoxidase from *Corallina* species.** *Coordination Chemistry Reviews* 2003, **237**:65-76.
65. De Boer E, Plat H, Tromp MGM, Wever R, Franssen MCR, van der Plas HC, Meijer EM, Schoemaker HE: **Vanadium containing bromoperoxidase: an example of an oxidoreductase with high operational stability in aqueous and organic media.** *Biotechnol Bioeng* 1987, **30**:607-610.
66. Van Schijndel JW, Barnett P, Roelse J, Vollenbroek EG, Wever R: **The stability and steady-state kinetics of vanadium chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*.** *Eur J Biochem* 1994, **225**:151-157.
67. Rush C, Willetts A, Davies G, Dauter Z, Watson H, Littlechild J: **Purification, crystallisation and preliminary X-ray analysis of the vanadium-dependent haloperoxidase from *Corallina officinalis*.** *FEBS Lett* 1995, **359**:244-246.
68. Messerschmidt A, Wever R: **X-ray structure of a vanadium-containing enzyme: chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:392-396.
69. Macedo-Ribeiro S, Hemrika W, Renirie R, Wever R, Messerschmidt A: **X-ray crystal structures of active site mutants of the vanadium-containing chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*.** *J Biol Inorg Chem* 1999, **4**:209-219.
70. Pooransingh-Margolis N, Renirie R, Hasan Z, Wever R, Vega AJ, Polenova T: **51 V Solid-State Magic Angle Spinning NMR Spectroscopy of Vanadium Chloroperoxidase.** *J Am Chem Soc* 2006, **128**:5190-5208.
71. Ohshiro T, Littlechild J, Garcia-Rodriguez E, Isupov MN, Iida Y, Kobayashi T, Izumi Y: **Modification of halogen specificity of a vanadium-dependent bromoperoxidase.** *Protein Sci* 2004, **13**:1566-1571.

72. Tanaka N, Dumay V, Liao Q, Lange AJ, Wever R: **Bromoperoxidase activity of vanadate-substituted acid phosphatases from *Shigella flexneri* and *Salmonella enterica ser. typhimurium*.** *Eur J Biochem* 2002, **269**:2162-2167.
73. Everett RR, Kanofsky JR, Butler A: **Mechanistic investigations of the novel non-heme vanadium bromoperoxidases. Evidence for singlet oxygen production.** *J Biol Chem* 1990, **265**:4908-4914.
74. de Boer E, Wever R: **The reaction mechanism of the novel vanadium-bromoperoxidase. A steady-state kinetic analysis.** *J Biol Chem* 1988, **263**:12326-12332.
75. Everett RR, Soedjak HS, Butler A: **Mechanism of dioxygen formation catalyzed by vanadium bromoperoxidase. Steady state kinetic analysis and comparison to the mechanism of bromination.** *J Biol Chem* 1990, **265**:15671-15679.
76. Messerschmidt A, Prade L, Wever R: **Implications for the catalytic mechanism of the vanadium-containing enzyme chloroperoxidase from the fungus *Curvularia* by X-Rays structures of the native and peroxide form.** *Biol Chem* 1997, **378**:309-315.
77. Zampella G, Fantucci P, Pecoraro VL, De Gioia L: **Reactivity of peroxy forms of the vanadium haloperoxidase cofactor. A DFT investigation.** *J Am Chem Soc* 2005, **127**:953-960.
78. Raugei S, Carloni P: **Structure and function of vanadium haloperoxidases.** *J Phys Chem B* 2006, **110**:3747-3758.
79. De Boer E, Boon K, Wever R: **Electron paramagnetic resonance studies on conformational states and metal ion exchange properties of vanadium bromoperoxidase.** *Biochemistry* 1988, **27**:1629-1635.
80. Kusthardt U, Hedman B, Hodgson KO, Hahn R, Vilter H: **High-resolution XANES studies on vanadium-containing haloperoxidase: pH-dependence and substrate binding.** *FEBS Lett* 1993, **329**:5-8.
81. Soedjak HS, Walker JV, Butler A: **Inhibition and inactivation of vanadium bromoperoxidase by the substrate hydrogen peroxide and further mechanistic studies.** *Biochemistry* 1995, **34**:12689-12696.
82. Dau H, Dittmer J, Epple M, Hanss J, Kiss E, Rehder D, Schulzke C, Vilter H: **Bromine K-edge EXAFS studies of bromide binding to bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*.** *FEBS Lett* 1999, **457**:237-240.
83. Feiters MC, Leblanc C, Kupper FC, Meyer-Klaucke W, Michel G, Potin P: **Bromine is an endogenous component of a vanadium bromoperoxidase.** *J Am Chem Soc* 2005, **127**:15340-15341.
84. Hasan Z, Renirie R, Kerkman R, Ruijsenaars HJ, Hartog AF, Wever R: **Laboratory-evolved vanadium chloroperoxidase exhibits 100-fold higher halogenating activity at alkaline pH: catalytic effects from first and second coordination sphere mutations.** *J Biol Chem* 2006, **281**:9738-9744.
85. Carter JN, Beatty KE, Simpson MT, Butler A: **Reactivity of recombinant and mutant vanadium bromoperoxidase from the red alga *Corallina officinalis*.** *J Inorg Biochem* 2002, **91**:59-69.
86. Carter-Franklin JN, Parrish JD, Tschirret-Guth RA, Little RD, Butler A: **Vanadium haloperoxidase-catalyzed bromination and cyclization of terpenes.** *J Am Chem Soc* 2003, **125**:3688-3689.
87. Tschirret-Guth RA, Butler A: **Evidence for organic substrate binding to vanadium bromoperoxidase.** *J Am Chem Soc* 1994, **116**:411-412.

88. Martinez JS, Carroll GL, Tschirret-Guth RA, Altenhoff G, Little RD, Butler A: **On the regioselectivity of vanadium bromoperoxidase.** *J Am Chem Soc* 2001, **123**:3289-3294.
89. Butler A, Carter-Franklin JN: **The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products.** *Nat Prod Rep* 2004, **21**:180-188.
90. ten Brink HB, Tuynman A, Dekker HL, Hemrika W, Izumi Y, Oshiro T, Schoemaker HE, Wever R: **Enantioselective Sulfoxidation Catalyzed by Vanadium Haloperoxidases.** *Inorg Chem* 1998, **37**:6780-6784.
91. Andersson M, Willetts A, Allenmark S: **Asymmetric Sulfoxidation Catalyzed by a Vanadium-Containing Bromoperoxidase.** *J Org Chem* 1997, **62**:8455-8458.
92. Andersson MA, Allenmark SG: **Asymmetric sulfoxidation catalyzed by a vanadium bromoperoxidase: Substrate requirements of the catalyst.** *Tetrahedron* 1998, **54**:15293-15304.
93. ten Brink HB, Schoemaker HE, Wever R: **Sulfoxidation mechanism of vanadium bromoperoxidase from *Ascophyllum nodosum*. Evidence for direct oxygen transfer catalysis.** *Eur J Biochem* 2001, **268**:132-138.
94. Hager LP, Morris DR, Brown FS, Eberwein H: **Chloroperoxidase. II. Utilization of halogen anions.** *J Biol Chem* 1966, **241**:1769-1777.
95. Soedjak HS, Butler A: **Chlorination catalyzed by vanadium bromoperoxidase.** *Inorg Chem* 1990, **29**:5015-5017.
96. Eigen M, Kustin K: **The Kinetics of Halogen Hydrolysis.** *J Am Chem Soc* 1962, **84**:1355-1361.
97. Everett RR, Butler A: **Bromide-assisted hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by vanadium bromoperoxidase: absence of direct catalase activity and implications for the catalytic mechanism.** *Inorg Chem* 1989, **28**:393-395.
98. Huwiler M, Kohler H: **Pseudo-catalytic degradation of hydrogen peroxide in the lactoperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/iodide system.** *Eur J Biochem* 1984, **141**:69-74.
99. Stefanic I, Asmus KD, Bonifacic M: **Quantification of iodide oxidation by trichloromethyl peroxy radicals and  $I + I_2 = I_3^-$  equilibrium in alcohol/water mixtures.** *Phys Chem Chem Phys* 2003, **5**:2783-2789.

## **Chapitre 2 : Inhibiteurs de la vBPO d'*Ascophyllum nodosum***

### **1. Introduction**

Les halopéroxydases à vanadate (vHPO) sont très probablement des enzymes clés du métabolisme halogéné des algues brunes. Elles seraient impliquées dans la production de composés volatils halogénés et d'iode moléculaire, qui ont un impact direct sur la chimie atmosphérique en zone côtière (cf. Introduction générale). De plus, chez *L. digitata*, une vIPO interviendrait dans un mécanisme très efficace et sélectif de captation des iodures (cf Chapitre 1 paragraphe 2.3.2.). Cependant, ces différentes fonctions sont, à l'heure actuelle, des conjectures. Dans ce contexte, des inhibiteurs spécifiques des vHPO constitueraient des outils puissants pour explorer *in vivo* l'implication de ces enzymes dans les mécanismes de transfert de l'iode (et du brome) chez les algues brunes.

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons choisi de mettre en œuvre une stratégie de génétique chimique inverse : Grâce à un test de criblage à haut-débit (pour revue : [1, 2]), nous cherchons à identifier des inhibiteurs d'une vHPO modèle. Ces inhibiteurs seront ensuite testés *in vivo* pour étudier le phénotype induit par l'invalidation de cette vHPO. Ceci permettra de préciser les fonctions physiologiques de cette enzyme. L'enzyme modèle choisie est la vBPO<sup>8</sup> native d'*Ascophyllum nodosum* (Fucale). Cette enzyme a été obtenue en quantité suffisante par extraction, pour pouvoir effectuer cette étude contrairement à la vIPO de *L. digitata*.

Puisque la vBPO d'*A. nodosum* présente une double activité, deux tests de criblage à haut-débit – l'un en activité iodo- et le second en activité bromo-péroxydase – ont été mis au point et réalisés dans le but d'identifier des inhibiteurs spécifiques à chaque activité. De tels inhibiteurs seraient particulièrement intéressants pour des études physiologiques et pour comprendre les bases de spécificité des vHPO envers les halogénures. De plus, cette démarche offre l'avantage de développer un test de criblage qui pourra être, par la suite, appliqué à la recherche d'inhibiteurs spécifiques d'une vIPO.

Les inhibiteurs de la vBPO d'*A. nodosum* présentent plusieurs domaines d'application. Comme évoqué précédemment, ils permettront d'explorer les mécanismes de transfert des halogènes chez *A. nodosum*. Par ailleurs, ils pourraient être utilisés dans des études

---

<sup>8</sup> fournie par le Dr. P. Potin (UMR 7139 CNRS-UPMC, Station Biologique de Roscoff)

structurales sur la vBPO par co-cristallisation. De telles études sont susceptibles de conduire à l'identification du putatif site de fixation des substrats organiques.

De plus, nous envisageons d'évaluer ces molécules sur d'autres vHPO, en particulier sur la vIPO de *L. digitata*. En effet, d'après les alignements de séquence primaire et la modélisation de la structure 3D, Colin *et al.* ont suggéré que la vIPO de *L. digitata* et la vBPO d'*A. nodosum* possèdent un site actif en partie conservé [3]. Si certains inhibiteurs se révèlent actifs sur la vIPO, des études *in vivo* sur *L. digitata* pourront être menées pour valider le rôle central de la vIPO dans le mécanisme de captation des iodures [4, 5]. Finalement, ces inhibiteurs pourraient permettre de développer une méthode de purification des vHPO par chromatographie d'affinité.

Dans ce chapitre, sont présentées les différentes étapes nécessaires à l'identification d'inhibiteurs de la vBPO d'*A. nodosum* :

- La mise au point et la validation d'une méthode sensible et robuste de suivi des activités iodo- et bromo-péroxydases des vHPO, applicable à un test de criblage à haut-débit
- La mise au point, la validation et la réalisation du double test de criblage à haut-débit ainsi que la sélection, la confirmation et la validation des hits.

Dans ce qui suit, nous appellerons « inhibiteur » une molécule qui diminue l'activité de la vBPO par fixation réversible (interaction protéine-ligand). « Substrat » désignera une molécule organique qui se fixe à la vBPO pour être halogénée ou oxydée.  $X^-$  désigne dans le contexte de notre étude, l'iode et le bromure.  $X^+$  est une notation formelle qui désigne l'espèce générée à partir de  $X^-$  par le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et libérée en solution. Par abus de langage,  $X^+$  désignera aussi l'ensemble des espèces oxydées de  $X^-$  (XOH, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub><sup>-</sup>... ) présentes en solution à la suite de la spéciation.

## 2. Suivi des activités de la vBPO

### 2.1. Introduction

Pour réaliser les tests de criblage à haut-débit, il est nécessaire de mettre au point une méthode de suivi des activités bromo- et iodo-péroxydases qui soit simple à mettre en œuvre, sensible et robuste.

Pour rappel, la vBPO d'*A. nodosum* oxyde les halogénures  $X^-$  ( $Br^-$ ,  $I^-$ ) en une entité  $X^+$  qui n'est pas détectable directement et qui rentre en équilibre, une fois libérée en solution, avec d'autres espèces (Fig. 17). Jusqu'à ce jour, aucun substrat organique<sup>9</sup> des deux activités de la vBPO n'a été identifié. Dans ce contexte, le suivi des activités iodo- et bromo-péroxydases ne peut être qu'indirect et basé sur la réactivité des espèces  $X^+$  libérées en solution. En nous inspirant des méthodes décrites dans la littérature, nous voulons utiliser, pour le test de criblage à haut-débit, une méthode spectrophotométrique basée sur l'utilisation d'une molécule-sonde qui, après réaction avec  $X^+$ , ait ses propriétés d'absorbance modifiées (Fig. 17). Nous pensons qu'un suivi par spectrophotométrie est plus adapté que par fluorescence en raison des phénomènes de quenching que peuvent induire la présence de l'halogénure [6].

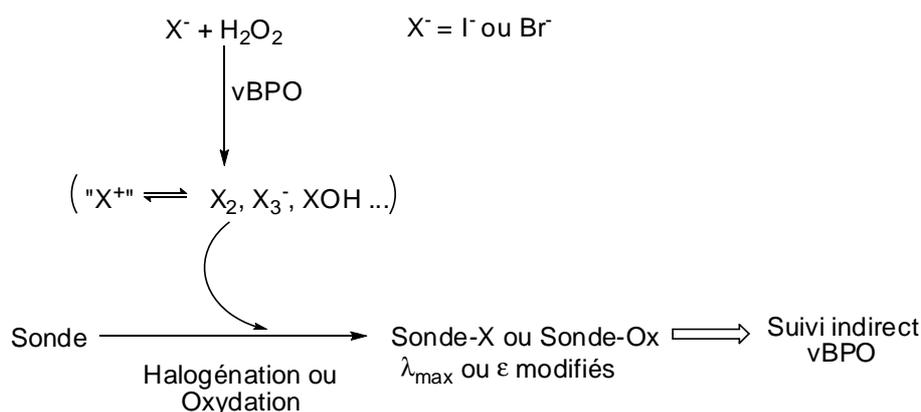


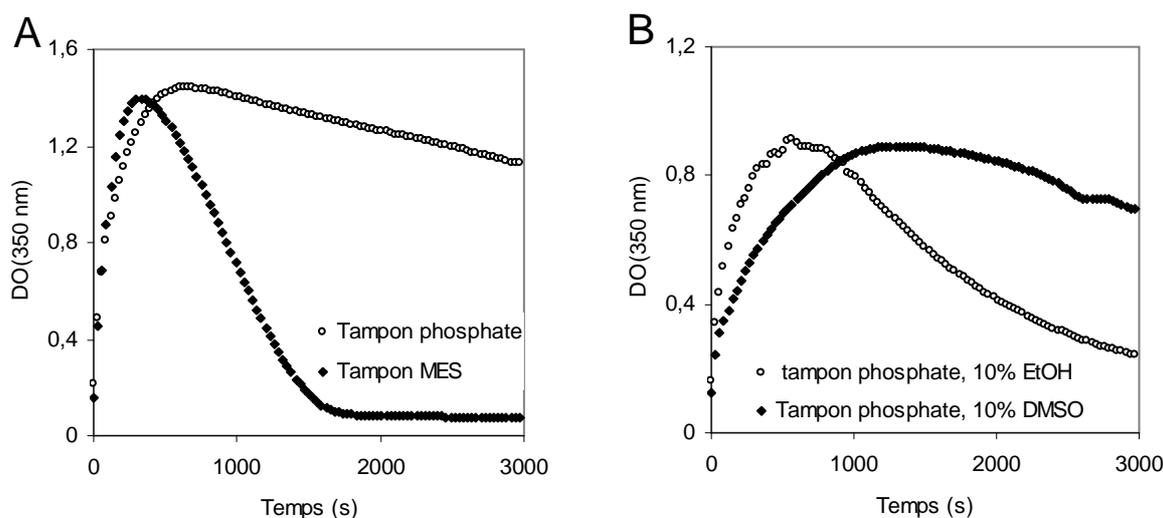
Fig. 17 : Principe de suivi des activités de la vBPO

Pour que la méthode spectrophotométrique soit utilisable dans le cadre de notre test de criblage, la molécule-sonde doit :

<sup>9</sup> Butler et coll. ont proposé que certains indoles et terpènes puissent être substrats de la vBPO en activité bromopéroxydase sans évoquer l'activité iodopéroxydase (cf. Chapitre 1 paragraphe 3.3.3).

- Etre très réactive envers les espèces  $I^+$  et  $Br^+$
- Générer un produit stable donc un signal d'absorbance final stable
- Si possible, ne générer qu'un seul produit après réaction avec  $X^+$
- Permettre de suivre l'activité de l'enzyme au cours du temps par la mesure de l'absorbance (DO) à une longueur d'onde élevée afin d'éviter les interférences avec les molécules aromatiques de la chimiothèque.
- Etre utilisable aussi bien pour le suivi de l'activité iodopéroxydase que pour celui de l'activité bromopéroxydase

Les méthodes de suivi spectrophotométrique décrites dans la littérature ne répondent pas à ces critères. Le suivi de l'activité bromopéroxydase par le MCD s'effectue à une longueur d'onde trop faible ( $\lambda = 290$  nm) pour pouvoir être utilisé en présence de molécules organiques (en particulier aromatiques) [7]. Il en est de même pour le suivi de l'activité iodopéroxydase par le triiodure ( $\lambda = 350$  nm) qui souffre, de plus, de la génération d'un signal final instable à cause de la réaction de dismutation de  $H_2O_2$  assistée par  $I^+$  [8]. De plus, nous avons observé que l'allure et la stabilité du palier final des courbes  $DO(350 \text{ nm}) = f(t)$  peut être très influencée par la nature du tampon et la présence de solvant organique (Fig. 18). La méthode de suivi de l'activité bromopéroxydase par le rouge de phénol paraît mieux adaptée car elle s'effectue à  $\lambda = 592$  nm [9]. Cependant, elle présente le désavantage de générer plusieurs intermédiaires (mono-, di-, et tri-bromés) dont les contributions à la  $DO(592 \text{ nm})$  n'ont pas été déterminées. De plus, cette méthode n'a pas été décrite pour le suivi de l'activité iodopéroxydase (cf Chapitre 1 paragraphe 3.4.).



**Fig. 18 : Suivi de l'activité iodopéroxydase de la vBPO par la formation d'I<sub>3</sub><sup>-</sup>**

A. Effet de la nature du tampon.

B. Effet de la présence d'un solvant : EtOH ou DMSO à 10 % en volume

Conditions : Tampon = 100 mM, pH = 6,5, [vBPO] = 1 µg/ml, [I<sup>-</sup>] = 2,5 mM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0,5 mM

Dans ce contexte, il est donc nécessaire d'identifier une nouvelle molécule-sonde permettant la mise au point d'une méthode de suivi des activités de la vBPO applicable à un test de criblage à haut-débit. Dans ce qui suit, nous allons présenter la démarche que nous avons utilisée pour identifier une telle molécule. Il est à noter que les expériences décrites ci-dessous ont été réalisées en activité iodopéroxydase et en activité bromopéroxydase.

## 2.2. Identification d'une nouvelle sonde

### 2.2.1 Etudes préliminaires

Pour identifier une nouvelle molécule-sonde, nous avons effectué une série de tests sur une dizaine de molécules commerciales (cf. Annexe1). Ces molécules ont été sélectionnées en considérant leur propriété d'absorbance ( $\lambda_{\text{max}}$  élevée), leur réactivité (groupement oxydable ou position d'halogénéation) et leur solubilité. Elles appartiennent essentiellement à la famille des colorants diazoïques aromatiques et à celle des sulfone-phthaléines. L'évaluation de ces molécules s'est effectuée en deux temps :

Dans un premier temps, nous avons évalué si le produit résultant de la réaction entre la molécule testée et les systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup> présentent des caractéristiques d'absorbance modifiées c'est-à-dire une forte variation du coefficient d'extinction ( $\epsilon_{\lambda}$ ) ou de la longueur

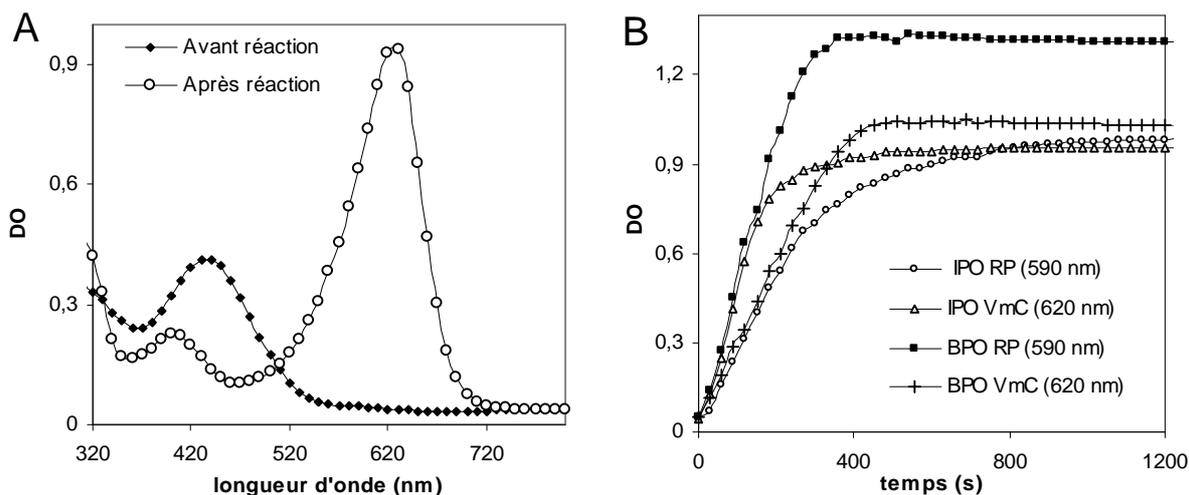
d'onde maximale d'absorbance ( $\lambda_{\max}$ ). Si la modification n'est pas sensible, la molécule est éliminée. Pour les molécules retenues, cette étape nous a permis de déterminer la longueur d'onde d'intérêt ( $\lambda_{\text{int}}$ ) (qui correspond à la  $\lambda_{\max}$  du produit formé ou à celle de la molécule testée) à laquelle pourrait être réalisé le suivi de l'activité enzymatique.

Dans un second temps, pour chaque molécule sélectionnée, l'absorbance (DO) à  $\lambda_{\text{int}}$  a été suivie au cours du temps, en présence des systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup>. Les courbes DO( $\lambda_{\text{int}}$ ) = f(t) obtenues ont été analysées en considérant trois critères :

- L'allure de la courbe : ce critère permet, entre autre, de révéler si plusieurs intermédiaires réactionnels sont formés.
- La stabilité du signal final c'est-à-dire l'existence d'un palier : ceci permet de mettre en évidence la stabilité du produit formé (dans le cas où  $\lambda_{\text{int}} = \lambda_{\max}$  du produit formé)
- La différence entre l'absorbance initiale et l'absorbance finale : ceci traduit la sensibilité de la méthode de suivi (rapport signal sur bruit de fond)

A l'issue de cette série de tests, les molécules autres que les sulfone-phthaléines ont été éliminées car leurs caractéristiques d'absorbance ( $\lambda_{\max}$  ou  $\epsilon_{\lambda_{\max}}$ ) sont trop similaires à celles de leurs produits de réaction. En revanche, les sulfone-phthaléines (rouge de phénol et violet de m-crésol) se sont révélées intéressantes pour le suivi des activités de la vBPO. Leur réaction avec les systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup> entraîne un décalage important de la  $\lambda_{\max}$  de 430 nm à environ 600 nm (Fig. 19.A). De plus, le suivi de l'absorbance à 600 nm au cours du temps (DO( $\lambda_{\max}$ ) = f(t)) se caractérise par une courbe régulière présentant un palier final stable et fournissant un bon rapport signal/bruit (Fig. 19.B).

Cette étude montre donc que le rouge de phénol est utilisable pour le suivi qualitatif de l'activité iodopéroxydase, ce qui n'a jamais été montré dans la littérature alors que son utilisation est décrite en activité bromopéroxydase [9]. En ce qui concerne le rouge de phénol, Franssen *et al.* ont montré en activité bromopéroxydase, que l'augmentation de l'absorbance à 600 nm est corrélée à la formation de son dérivé tétra-bromé [9].



**Fig. 19 : Suivi des activités iodo- et bromo-péroxydases de la vBPO par les sulfone-phtaléines**

A. Spectre d'absorbance du violet de m-crésol avant et après réaction avec vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup>. Le violet de m-crésol absorbe à 430 nm alors que le(s) produit(s) de réaction absorbe(nt) à 620 nm

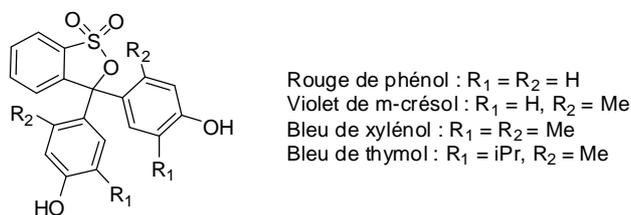
B. Suivi des activités iodo- et bromo-péroxydases. La réaction du rouge de phénol ou du violet de m-crésol avec le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup> induit une augmentation de l'absorbance à 600 nm. RP : rouge de phénol, VmC : Violet de m-crésol

Conditions : Tampon MES 100 mM, pH = 6,5, [Sonde] = 50 μM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0,5 mM, [vBPO] = 1 μg/ml, 10% EtOH, [I<sup>-</sup>] = 1 mM ou [Br<sup>-</sup>] = 10 mM

Compte tenu de ces résultats, nous avons décidé de poursuivre notre étude en nous intéressant à la famille des sulfone-phtaléines.

### 2.2.2 Etude de la famille des sulfone-phtaléines

Compte tenu des résultats précédents, nous avons focalisé notre étude sur quatre sulfone-phtaléines : le rouge de phénol, le violet de m-crésol, le bleu de thymol et le bleu de xylénol dans le but d'identifier la sonde la plus adaptée pour le suivi des activités de la vBPO.



**Fig. 20 : Sulphone-phtaléines étudiées**

Pour chaque molécule, la  $\lambda_{\max}$  de leurs produits de réaction avec les systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup> a été déterminée. Nous avons ensuite effectué les suivis cinétiques des activités iodo- et bromo-péroxydases, à ces  $\lambda_{\max}$  et sur une gamme de pH (5,5-7,1) dans le but de déterminer le pH optimal (pH<sub>opt</sub>) pour chaque sonde. pH<sub>opt</sub> est le pH pour lequel la courbe

$DO(\lambda_{\max}) = f(t)$  présente la pente initiale et l'absorbance finale les plus élevées (Tab. 1). Pour chaque activité, les molécules ont été testées dans des conditions similaires sauf dans le cas du bleu de thymol et du bleu de xylénol, en activité bromopéroxydase, où la concentration en  $H_2O_2$  a été fixée à 0,1 mM contre 0,5 mM pour les autres molécules. Les courbes de suivi  $DO(\lambda_{\max}) = f(t)$  obtenues aux  $pH_{opt}$  ont été comparées entre elles pour les activités iodo- et bromo-péroxydases respectivement, selon deux paramètres : la durée d'atteinte du palier et l'existence d'un point d'inflexion.

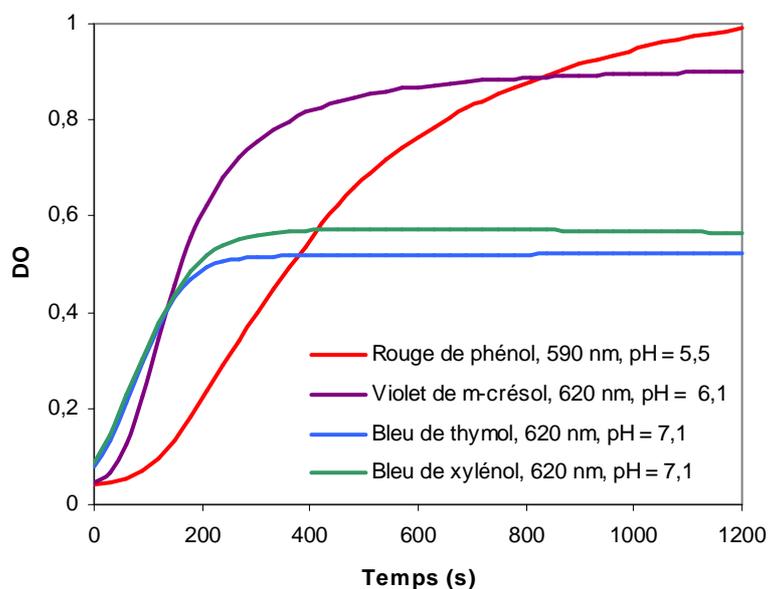
En effet, pour être une sonde efficace, il est nécessaire que la sulfone-phthaléine testée soit très réactive envers les espèces oxydées ( $X^+$ ,  $XOH$ ,  $X_2$ ,  $X_3^- \dots$ ). De plus, le produit responsable de l'absorbance aux environs de 600 nm doit être formé très rapidement et dans l'idéal, plus rapidement que la génération de l'espèce  $X^+$  par l'enzyme. Ces conditions évitent l'accumulation de  $X^+$  dans le milieu et assurent un suivi fidèle de l'activité enzymatique. Au niveau des courbes  $DO(\lambda_{\max}) = f(t)$ , ces conditions se traduisent par l'atteinte rapide d'un palier et par l'absence de palier initial ou de point d'inflexion (ce qui signifie que la vitesse à l'origine est la vitesse maximale observée au cours de la cinétique).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tab. 1). Le bleu de thymol et le bleu de xylénol apparaissent être les molécules les plus adaptées au suivi des activités iodo- et bromo-péroxydases. Leurs courbes  $DO(\lambda_{\max}) = f(t)$  possèdent une allure similaire : Elles se caractérisent par l'absence de point d'inflexion et par l'atteinte rapide du palier (300-400s) (Fig. 21). Pour comparaison, les paliers obtenus dans le cas du rouge de phénol et du violet de m-cresol sont plus tardifs (500-1200 s). En activité iodopéroxydase, les courbes du rouge de phénol et du violet de m-crésol présentent un point d'inflexion très marqué ce qui témoigne d'un manque de réactivité (Fig. 21, Tab. 1).

Molécules	Activité bromopéroxydase				Activité iodopéroxydase			
	pH <sub>opt</sub>	λ <sub>max</sub>	Inflexion	Palier	pH <sub>opt</sub>	λ <sub>max</sub>	Inflexion	Palier
Rouge de phénol	5,5	590	Non	500 s	5,5	590	Oui	>1200 s
violet de m-crésol	6,1	620	Oui	800 s	6,1	620	Oui	500 s
Bleu de thymol	7,1	620	Non	400 s	7,1	620	Non	300 s
Bleu de xylenol	7,1	620	Non	300 s	7,1	620	Non	300 s

**Tab. 1 : Conditions optimales et caractéristiques des courbes de suivi cinétique obtenues pour les sulfone-phtaléines.**

Conditions : tampon phosphate 110 mM, [Sonde] = 50 μM, [Br<sup>-</sup>] = 10 mM ou [I<sup>-</sup>] = 1 mM, [vBPO] = 1 μg/ml [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0,5 mM sauf en activité BPO pour le bleu de thymol et le bleu de xylenol [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0,1 mM,



**Fig. 21: Suivi spectrophotométrique de l'activité iodopéroxydase par les sulfone-phtaléines**

Conditions : Tampon phosphate 110 mM, [Sonde] = 50 μM, [I<sup>-</sup>] = 1 mM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0,5 mM, [vBPO] = 1 μg/ml.

Les caractéristiques des courbes obtenues pour le bleu de thymol et le bleu de xylenol s'expliquent fort probablement par leur plus grande réactivité envers les espèces X<sup>+</sup>. Si la réaction mise en jeu est une halogénéation en position ortho des groupements hydroxyles, les groupements alkyles présents sur ces structures facilitent cette substitution électrophile aromatique grâce à leur effet électro-donneur.

Par ailleurs, le bleu de thymol et le bleu de xylenol ne présentent que deux positions d'halogénéation contre quatre pour le rouge de phénol et le violet de m-crésol ce qui implique un nombre plus faible de produits ou d'intermédiaires réactionnels formés par halogénéation.

De plus, il est à noter que les suivis par le bleu de xylenol et le bleu de thymol s'effectuent à un pH proche du pH physiologique de l'apoplasme des laminaires et de l'eau de mer (pH  $\approx$  7-8), ce qui peut être un avantage pour l'identification d'inhibiteurs actifs *in vivo*.

Les caractéristiques des courbes  $DO(\lambda_{\max}) = f(t)$ , la valeur du  $pH_{\text{opt}}$  ainsi que le nombre de produits halogénés attendus nous ont conduit à sélectionner le bleu de thymol et le bleu de xylenol pour le suivi des activités iodo- et bromo-péroxydases. Puisque les courbes  $DO(\lambda_{\max}) = f(t)$  ne permettent pas de discriminer ces deux molécules, nous avons finalement choisi d'utiliser le bleu de thymol car la pureté du produit commercial (90% en CLHP/SM) est supérieure à celle du bleu de xylenol blue (80% en CLHP/SM).

### **2.3. Optimisation de la méthode de suivi par le bleu de thymol**

Pour pouvoir être transposées à un test de criblage à haut-débit sur la vBPO, les méthodes de suivi des activités iodo- et bromo-péroxydases par le bleu de thymol doivent être optimisées. Dans cette optique, il est nécessaire de déterminer l'influence des différents paramètres – pH, concentrations en  $\Gamma$ ,  $H_2O_2$  et en enzyme – et d'ajuster au mieux leurs valeurs pour obtenir une réponse (courbe  $DO(620 \text{ nm}) = f(t)$ ) la plus sensible et la plus reproductible possible. Compte tenu du fait que les molécules de la chimiothèque sont conservées dans le DMSO, nous allons, de plus, évaluer l'effet de ce solvant.

#### **2.3.1 Principe**

Les différents paramètres de la réaction du bleu de thymol avec les systèmes vBPO/ $H_2O_2$ / $X^-$  ont été modifiés pour déterminer les conditions optimales de suivi cinétique des activités de la vBPO. Les expériences ont été effectuées sur microplaque 96 puits ce qui a permis de modifier simultanément deux paramètres à la fois (un sur chaque dimension). Les concentrations en phosphate, et en bleu de thymol ont été fixées à 110 mM et à 100  $\mu$ M, respectivement. Celles de l'enzyme à 0,5 et 1,0  $\mu$ g/ml pour l'activité iodo- et bromo-péroxydase, respectivement. Les gammes de concentrations de  $H_2O_2$  et de  $X^-$  ont été choisies compte tenu des  $K_{M,app}$  décrits dans la littérature pour les activités iodo- et bromopéroxydase

de la vBPO d'*A. nodosum* (ordre de grandeur :  $K_{M.app}(I^-) \approx 10^{-3}$  M,  $K_{M.app}(H_2O_2) \approx 10^{-4}$  M,  $K_{M.app}(Br^-) \approx 10^{-2}$  M [10-12]).

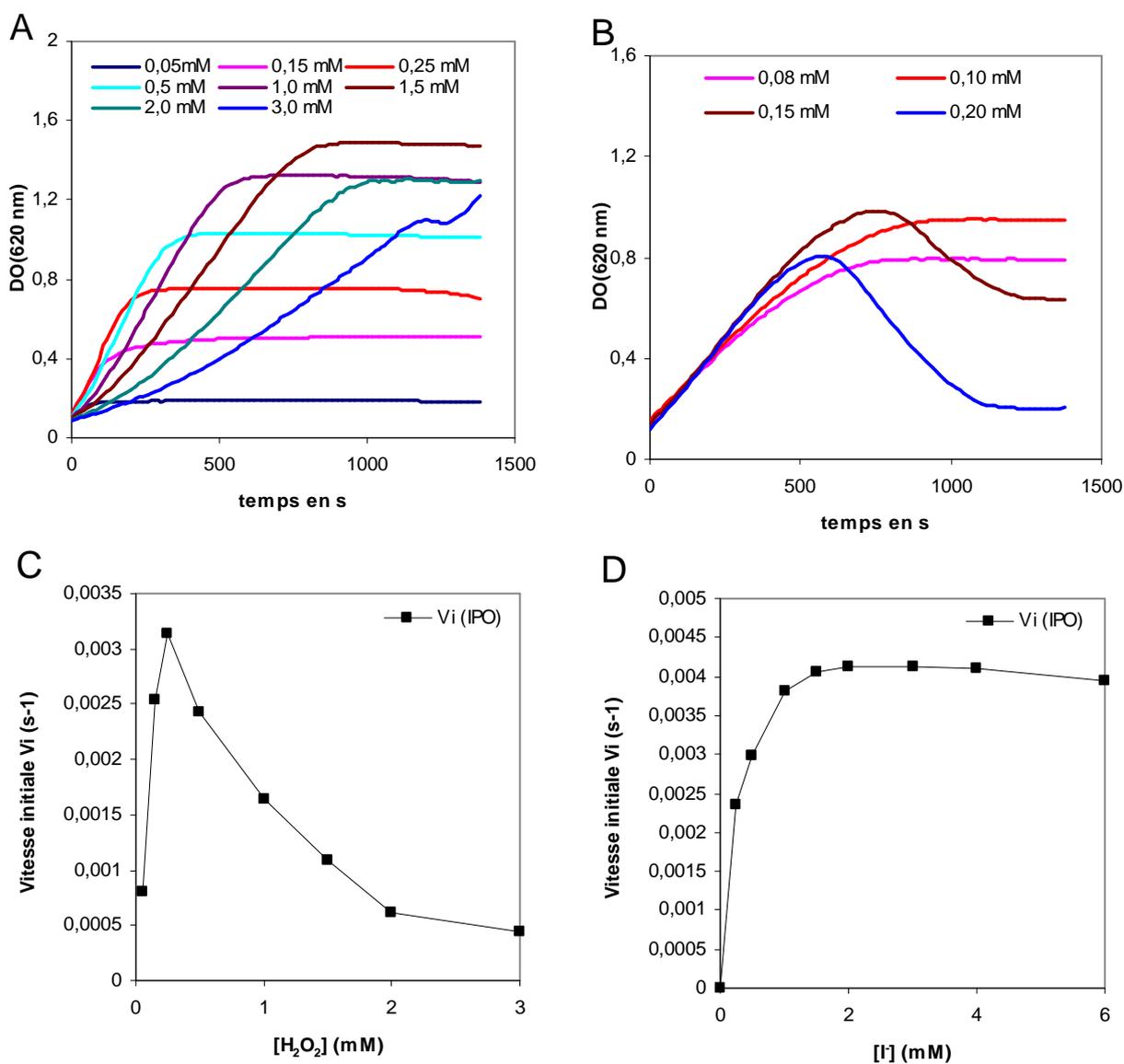
Paramètre	Gamme testée
pH du tampon phosphate (110 mM)	7 à 8
Concentration $X^-$	$I^-$ : 0,5 à 6 mM, $Br^-$ : 1 à 40 mM
Concentration $H_2O_2$	0,05 à 3 mM
% de DMSO	0 à 4 %
Bleu de thymol	Fixée à 100 $\mu$ M
vBPO	Fixée à 1,0 $\mu$ g/ml (BPO) Fixée à 0,5 $\mu$ g/ml (IPO)

**Tab. 2 : Paramètres testés pour l'optimisation des méthodes de suivi par le bleu de thymol**

Une fois ces paramètres déterminés, en raison de contraintes techniques liées à l'utilisation du robot pour le test de criblage (cf. partie 3.1.3), la concentration en vBPO a été diminuée de manière à ce que le palier final de la DO(620 nm) soit atteint au bout d'environ 600 s.

### 2.3.2 Résultats

Les pH optimaux pour le suivi des activités iodo- et bromo-péroxydases sont 7,2 et 7,8, respectivement. En activité iodopéroxydase, pour une concentration fixée en iodure, l'augmentation de la concentration de  $H_2O_2$  entraîne une augmentation de la vitesse initiale ( $V_i$ ) et de l'absorbance finale. Cependant, au-delà d'une certaine concentration de  $H_2O_2$ , le phénomène s'inverse : la réaction de dismutation de  $H_2O_2$  (assistée par  $I_2$ , IOH ...) se produit au détriment de la réaction d'halogénéation (Fig. 22.A et Fig. 22.C). Pour l'activité bromopéroxydase, une concentration en  $H_2O_2$  supérieure à 0,1 mM induit une courbe DO = f(t) en forme de cloche ce qui suggère la dégradation du produit formé (Fig. 22.B). Au-dessus d'une concentration en iodure de 2 mM (Fig. 22.D) ou en bromure de 15 mM (non montré) respectivement, le système est saturé. L'introduction de DMSO dans le milieu n'a pas d'effet sur les activités enzymatiques jusqu'à un pourcentage de 4% en volume.



**Fig. 22 : Influence de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et en halogénure sur le suivi par le bleu de thymol**

A. Influence de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la iodation du bleu de thymol par le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup>.  
 B. Influence de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la bromation du bleu de thymol par le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Br<sup>-</sup>.  
 C. Influence de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la  $V_i$  en activité iodopéroxydase pour [I<sup>-</sup>] = 0,5 mM  
 D. Influence de la concentration en iodure sur la  $V_i$  en activité iodopéroxydase pour une [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0,25 mM.  
 Conditions générales : tampon phosphate 110 mM, pH = 7,2 (IPO) ou 7,8 (BPO), [vBPO] = 1 µg/ml (BPO) ou 0,5 µg/ml (IPO), [Bleu de thymol] = 100 µM.

Les résultats précédents mettent donc en évidence que la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est un paramètre crucial pour le suivi des activités de la vBPO. Elle doit être fixée précisément car une faible variation de sa valeur va entraîner des effets forts sur les cinétiques d'halogénéation du bleu de thymol. En revanche, pour une valeur suffisamment élevée, une variation de la concentration en halogénure n'a pas d'incidence sur les cinétiques. A l'issue de ces études, les conditions optimales de suivi des activités bromo- et iodo-péroxydases par le bleu de thymol ont été déterminées pour le test de criblage à haut-débit (Tab. 3).

Conditions expérimentales	Activité IPO	Activité BPO
Tampon phosphate	110 mM, pH = 7,2	110 mM, pH = 7,8
Halogénure X <sup>-</sup>	1,5 mM (I <sup>-</sup> )	10 mM (Br <sup>-</sup> )
Bleu de thymol	100 μM	100 μM
vBPO	0,25 μg/ml	0,6 μg/ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,35 mM	0,1 mM
DMSO	4 % en volume	4 % en volume

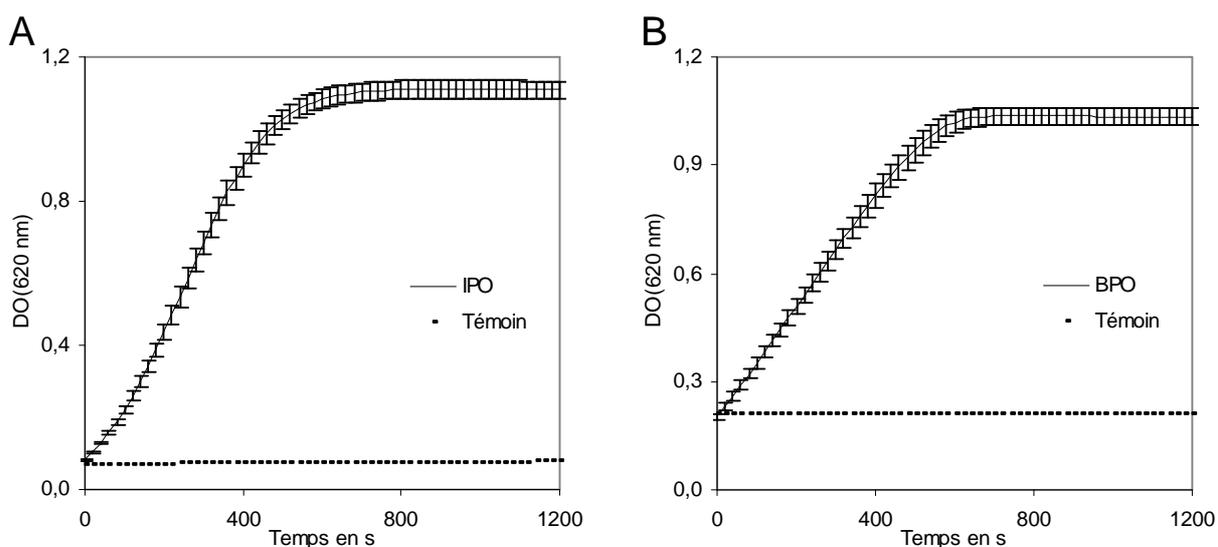
**Tab. 3 : Conditions mises au point pour le suivi par le bleu de thymol des activités de la vBPO**

Ces conditions offrent une réponse sensible et robuste, comme le mettent en évidence les résultats obtenus sur une série de 80 expériences réalisées en microplaque (Fig. 23). Les expériences témoins (c'est-à-dire en l'absence de vBPO) montrent que la réaction non catalysée entre le bleu de thymol et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup> est négligeable durant le temps de l'expérience (Fig. 23). Grâce à ces expériences, nous avons déterminé les paramètres moyens de la courbe DO(620 nm) = f(t). Ces données nous permettront de vérifier, lors du test de criblage à haut-débit, la conformité des conditions expérimentales (en particulier le titre des solutions préparées) avant chaque série d'évaluations (Tab. 4).

Paramètres cinétiques	Activité iodopéroxydase	Activité Bromopéroxydase
Vitesse initiale (s <sup>-1</sup> )*	1,4.10 <sup>-3</sup> ± 0,1.10 <sup>-3</sup>	1,5.10 <sup>-3</sup> ± 0,1.10 <sup>-3</sup>
Atteinte du palier (s)	≈ 660	≈ 660
Absorbance initiale	0,083 ± 0,003	0,20 ± 0,01
Absorbance finale	1,11 ± 0,02	1,03 ± 0,02

**Tab. 4 : Paramètres cinétiques moyens de la courbe DO(620 nm) = f(t)**

Paramètres calculés à partir de 80 expériences. \*Vi calculée par régression linéaire sur l'intervalle (0-100s)



**Fig. 23 : Courbes moyennes DO(620 nm) = f(t) obtenues pour 80 expériences en activité iodopéroxydase (A) et bromopéroxydase (B). Témoïn : sans vBPO**

## **2.4. Validation des méthodes de suivi des activités de la vBPO par le bleu de thymol**

Pour valider ces méthodes de suivi, il convient de montrer que l'augmentation de la DO(620 nm) correspond à l'apparition d'un produit de réaction entre le bleu de thymol et l'espèce  $X^+$  générée par le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup>. Similairement aux résultats de Franssen *et al.* concernant le rouge de phénol [9], nous nous attendons à observer la formation de dérivés halogénés du bleu de thymol.

Dans ce qui suit, après quelques vérifications préliminaires, nous identifierons les produits de réaction du bleu de thymol avec les systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup> puis nous expliquerons la raison de la forte différence de  $\lambda_{\max}$  existant entre le bleu de thymol et ses produits de réaction.

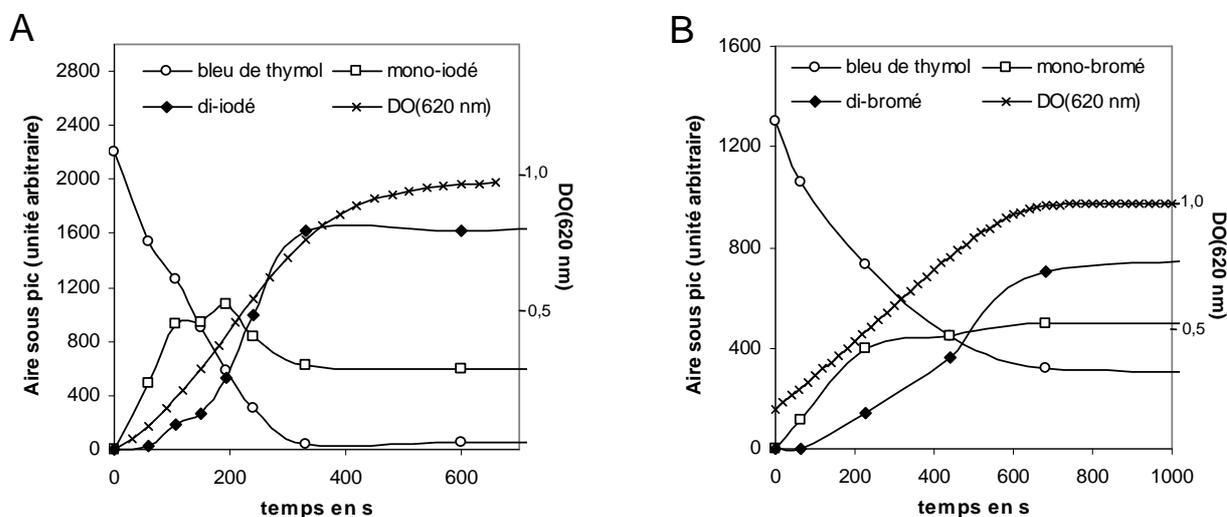
### **2.4.1 Vérifications préliminaires**

Les expériences témoins (en l'absence d'enzyme) démontrent que la présence de la vBPO est nécessaire pour induire une variation de la DO(620 nm) pendant la durée de notre expérience (Fig. 23). L'augmentation de la DO(620 nm) n'est donc pas due à une réaction directe entre le bleu de thymol et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup>

Puisque le bleu de thymol est traditionnellement utilisé comme indicateur de pH ( $pK_a = 8,9$ ), un suivi du pH du milieu réactionnel a été effectué au cours de la réaction enzymatique. Suite à l'ajout des différents réactifs, le pH pour l'activité iodo- et bromo-péroxydase est de 7,44 et de 7,84 respectivement. Les pH des milieux réactionnels sont stabilisés à ces valeurs ( $\pm 0,02$ ), qui sont nettement inférieures au  $pK_a$  du bleu de thymol, pendant toute la durée de suivi des activités ( $\approx 30$  min) (données non montrées). Ceci démontre que l'augmentation de la DO(620 nm) n'est pas liée à l'apparition de la forme basique du bleu de thymol résultant d'une variation du pH du milieu réactionnel.

#### 2.4.2 Identification des produits de réaction du bleu de thymol

Pour chaque activité (iodo- et bromo-péroxydase) et selon les conditions décrites précédemment (Tab. 3), la réaction entre le bleu de thymol et le système  $vBPO/H_2O_2/X^-$  a été suivie au cours du temps par analyse CLHP-SM. Parallèlement, l'évolution de la DO(620 nm) a été enregistrée. Ces analyses mettent en évidence que l'augmentation de la DO(620 nm) est corrélée à la disparition du bleu de thymol au profit de l'apparition de produits de masse correspondant au bleu de thymol mono- et di-halogéné (Fig. 24).



**Fig. 24 :** Suivi cinétique par analyse CLHP-SM de l'apparition des produits halogénés et de la disparition du bleu de thymol, comparaison avec l'évolution de la DO(620 nm) au cours du temps.

A. En activité iodopéroxydase. Conditions : Tampon phosphate 110 mM, pH = 7,2, [vBPO] = 0,25  $\mu\text{g/ml}$ , [I<sup>-</sup>] = 1,5 mM, [Bleu de thymol] = 0,1 mM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0,35 mM, DMSO : 1% en volume

B. En activité bromopéroxydase, en défaut de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Conditions : Tampon phosphate 110 mM, pH = 7,8, [vBPO] = 0,60  $\mu\text{g/ml}$ , [Br<sup>-</sup>] = 10 mM, [Bleu de thymol] = 0,1 mM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0,1 mM, DMSO : 1% en volume

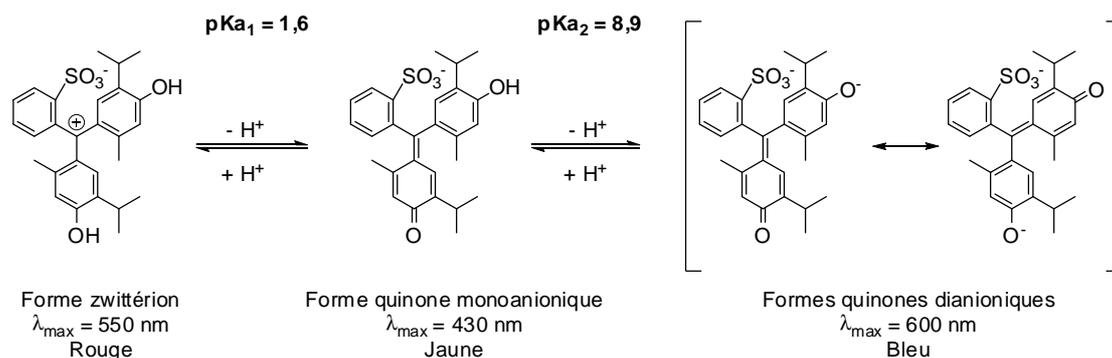
Comme attendu, la formation du produit mono-halogéné précède légèrement celle du produit di-halogéné. La comparaison des courbes d'apparition des produits avec celle de la  $DO(620\text{ nm}) = f(t)$  suggère que les produits mono- et di-halogénés participent à l'absorbance à 620 nm mais que la contribution du produit di-halogéné est plus importante. Ceci est particulièrement observable en activité iodopéroxydase pour laquelle la courbe  $DO(620\text{ nm}) = f(t)$  présente un point d'inflexion semblant être corrélé à l'apparition du produit di-iodé (Fig. 24).

Ces résultats montrent donc que l'augmentation de la  $DO(620\text{ nm})$  est due à l'apparition des produits d'halogénéation du bleu de thymol par les systèmes  $\nu\text{BPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{X}$ . Compte tenu de la réactivité des phénols, il est fort probable que le bleu de thymol soit halogéné en position ortho des groupements hydroxyles.

Pour l'activité iodo-péroxydase, malgré l'utilisation de  $\Gamma$  (7,5 eq) et de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,75 eq) en excès, le bleu de thymol n'est pas entièrement converti en composé di-iodé : il reste une quantité non négligeable de dérivé mono-iodé en fin de réaction. Ceci suggère qu'une fraction de l'espèce  $\Gamma^+$  s'accumule en solution ou participe à la réaction de dismutation de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La méthode de suivi au bleu de thymol n'est donc pas quantitative. De plus, la formation des produits di-halogénés n'est pas immédiate et constitue l'étape limitante du système. Ces éléments montrent que la méthode au bleu de thymol permet de suivi qualitatif des activités de la  $\nu\text{BPO}$ . Cependant, elle ne peut pas être utilisée pour déterminer les paramètres cinétiques de l'enzyme ( $K_M$  et  $V_{\max}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{X}^-$ ).

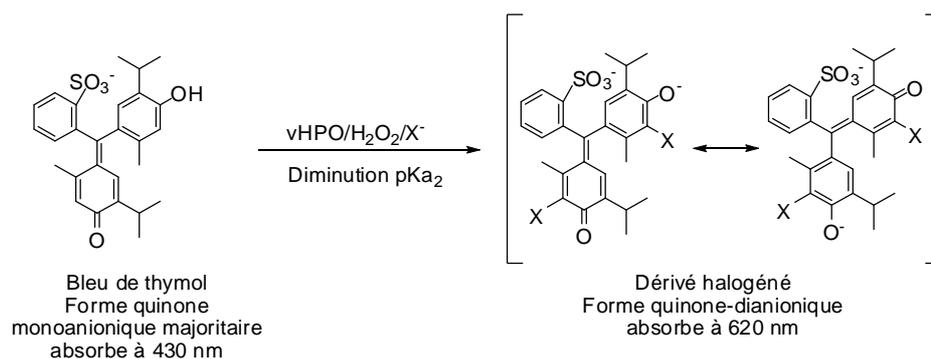
### ***2.4.3 Explication de la modification du spectre d'absorbance***

Le bleu de thymol est un indicateur pH très utilisé. Il se caractérise par deux constantes d'acidité se référant à ses fonctions phénol :  $\text{p}K_{a1} = 1,6$  et  $\text{p}K_{a2} = 8,9$ . Les formes acido-basiques du bleu de thymol ont fait l'objet de différentes études. En solution aqueuse, pour un  $\text{pH} < \text{p}K_{a1}$ , le bleu de thymol serait sous une forme zwitterion de  $\lambda_{\max} = 550\text{ nm}$  [13]. Pour un  $\text{pH}$  compris entre  $\text{p}K_{a1}$  et  $\text{p}K_{a2}$ , il est essentiellement sous une forme quinone monoanionique de  $\lambda_{\max} = 430\text{ nm}$ . Pour un  $\text{pH} > \text{p}K_{a2}$ , ses deux fonctions phénols sont déprotonées, il est essentiellement sous forme de quinones dianioniques, en équilibre mésomère, de  $\lambda_{\max} = 600\text{ nm}$  (Fig. 25) [13-15]. La forme tautomérique correspondant à la sulfone (cycle fermé) n'est pas observée en solution aqueuse même à un  $\text{pH}$  acide [13]. Ces formes acido-basiques sont générales à la famille des sulfone-phthaléines. Les  $\text{p}K_{as}$  de ces molécules dépendent des groupements présents sur les cycles phénoliques [16].



**Fig. 25 : Equilibres acido-basiques du bleu de thymol**

D'après ces éléments, l'hypothèse suivante peut être proposée pour expliquer le changement d'absorbance consécutif à l'halogénéation du bleu de thymol. Dans nos conditions réactionnelles ( $\text{pH} = 7,2$  ou  $7,8$ ), le bleu de thymol est initialement sous forme quinone monoanionique absorbant à  $430 \text{ nm}$  (jaune). Le système  $\text{vBPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{X}^-$  provoque son halogénéation, fort probablement, en position ortho des groupements hydroxyles. Les substituants halogènes introduits exercent un effet électro-attracteur (-I). Ceci provoque une diminution du  $\text{pKa}_2$  qui devient inférieur ou proche du  $\text{pH}$  du milieu réactionnel : la seconde fonction phénol est alors déprotonée entraînant la formation des espèces quinones dianioniques absorbant à  $620 \text{ nm}$  (bleu) (Fig. 26). Cette hypothèse est confortée par les propriétés d'absorbance et le  $\text{pKa}_2$  ( $7,3$ ) du bleu de bromothymol, dérivé commercial dibromé du bleu de thymol.



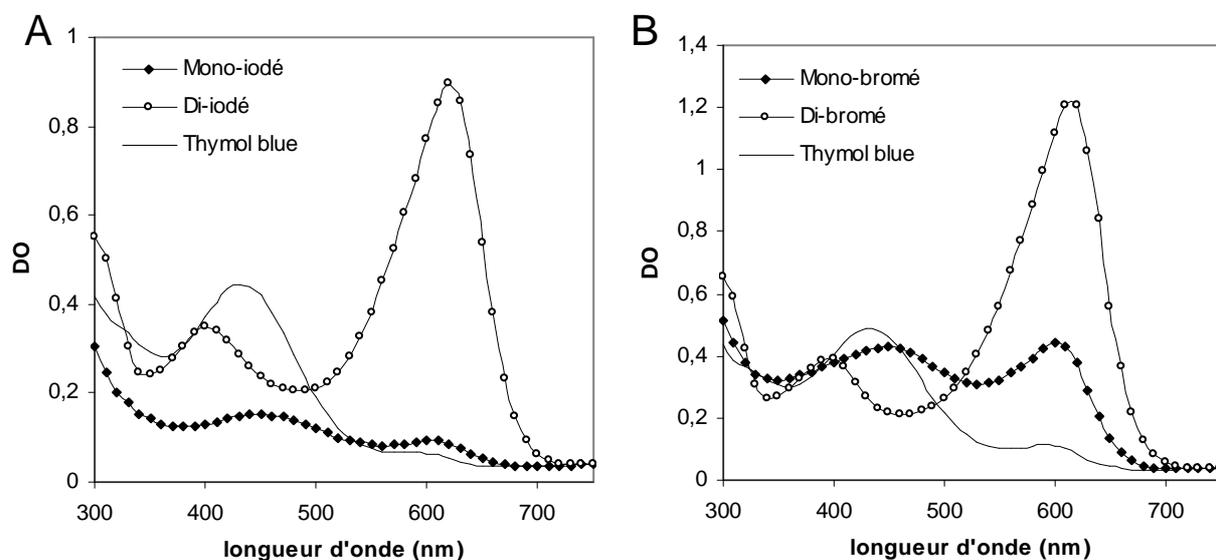
**Fig. 26 : Hypothèse expliquant l'apparition de la DO( $620 \text{ nm}$ ) lors du suivi par le bleu de thymol.**

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé la synthèse des produits mono- et di-halogénés du bleu de thymol par réaction avec les systèmes  $\text{vBPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Br}^-$  et  $\text{vBPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{I}^-$ . Le  $\text{pKa}_2$  de chacun de ces composés a ensuite été déterminé grâce aux spectres d'absorbance obtenus sur une gamme de  $\text{pH}$ , comme décrit dans la partie expérimentale.

pKa <sub>2</sub>	Bleu de thymol	Mono-halogéné	Di-halogéné
Activité IPO	8,9	8,3	7,3
Activité BPO	8,9	8,3	7,2

**Tab. 5 : pKas déterminés expérimentalement à partir des produits synthétisés par voie enzymatique**

Les résultats obtenus montrent qu'effectivement, l'introduction des groupements halogènes induit une baisse significative des pKa (Tab. 5). Les valeurs obtenues corroborent donc le mécanisme proposé (Fig. 26) et le rôle prépondérant des dérivés di-halogénés dans l'augmentation de la DO(620 nm). Les spectres d'absorbance, obtenus à pH = 7,4 et à pH = 7,8 pour les dérivés iodés et bromés respectivement, mettent en évidence la faible absorbance du dérivé monohalogéné à 620 nm par rapport au dérivé di-halogéné (Fig. 27). Il peut être remarquer qu'aux pH des milieux réactionnels, les composés di-halogénés ne sont pas entièrement sous forme quinone-dianionique, comme le suggère le pic d'absorbance à 400 nm (correspondant à la forme quinone mono-anionique).



**Fig. 27 : Spectres d'absorbance des dérivés iodés à pH = 7,4 (A) et des dérivés bromés à pH = 7,8 (B) du bleu de thymol.**

Conditions : tampon phosphate 100 mM, [Composés] = 50  $\mu$ M, EtOH 2,5 % en volume.

A travers les études présentées dans cette partie, nous avons montré que l'augmentation de la DO(620 nm) traduit l'apparition des produits halogénés (principalement di-halogénés) résultant de la réaction du bleu de thymol avec les systèmes  $\nu\text{BPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{X}^\cdot$ . Ces réactions ne sont pas observées en l'absence d'enzyme. Nous avons mis en évidence que l'halogénéation induit une diminution du  $\text{pK}_{\text{a}2}$  du bleu de thymol : au pH réactionnel, les composés dihalogénés sont principalement sous forme quinone dianionique ce qui explique le déplacement de  $\lambda_{\text{max}}$  à une valeur plus élevée (620 nm). Un tel mécanisme est extrapolable au suivi de l'activité bromopéroxydase par le rouge de phénol, ce qui n'a jamais été clairement établi dans la littérature.

## 2.5. Application à la recherche d'inhibiteurs de la $\nu\text{BPO}$

Nous avons précédemment montré et validé que les activités iodo- et bromopéroxydases peuvent être suivies en présence du bleu de thymol *via* la DO(620 nm). Il nous faut à présent déterminer l'influence d'un inhibiteur sur la courbe  $\text{DO}(620 \text{ nm}) = f(t)$  et sélectionner un critère d'étude.

Quel que soit le type d'inhibition, si les concentrations en substrats ne sont pas saturantes (c'est-à-dire  $[\text{I}^\cdot]$  et  $[\text{H}_2\text{O}_2]$  inférieures ou de l'ordre de  $10 \times K_{\text{M.app}}$ ), un inhibiteur de la  $\nu\text{BPO}$  diminuera la vitesse de formation de l'espèce  $\text{X}^\cdot$  et par conséquent, la vitesse d'halogénéation du bleu de thymol : Ceci se traduira par une diminution de la pente à l'origine (ou vitesse initiale  $V_i$ ) de la courbe  $\text{DO}(620 \text{ nm}) = f(t)$  (Fig. 28.A).

Cependant, dans le cadre de notre étude, le paramètre  $V_i$  n'est pas assez discriminant à cause de la libération dans le milieu de l'espèce  $\text{X}^\cdot$  très réactive.  $\text{X}^\cdot$  peut réagir avec la molécule M testée. Lors de l'évaluation d'une molécule M, l'allure de la  $\text{DO}(620 \text{ nm}) = f(t)$  va donc être conditionnée par la réactivité du bleu de thymol pour  $\text{X}^\cdot$  ( $R_t$ ) et celle de la molécule M pour  $\text{X}^\cdot$  ( $R_M$ ). Plusieurs cas de figure sont donc envisageables dans le cas où M n'est pas inhibiteur (Fig. 28.B) :

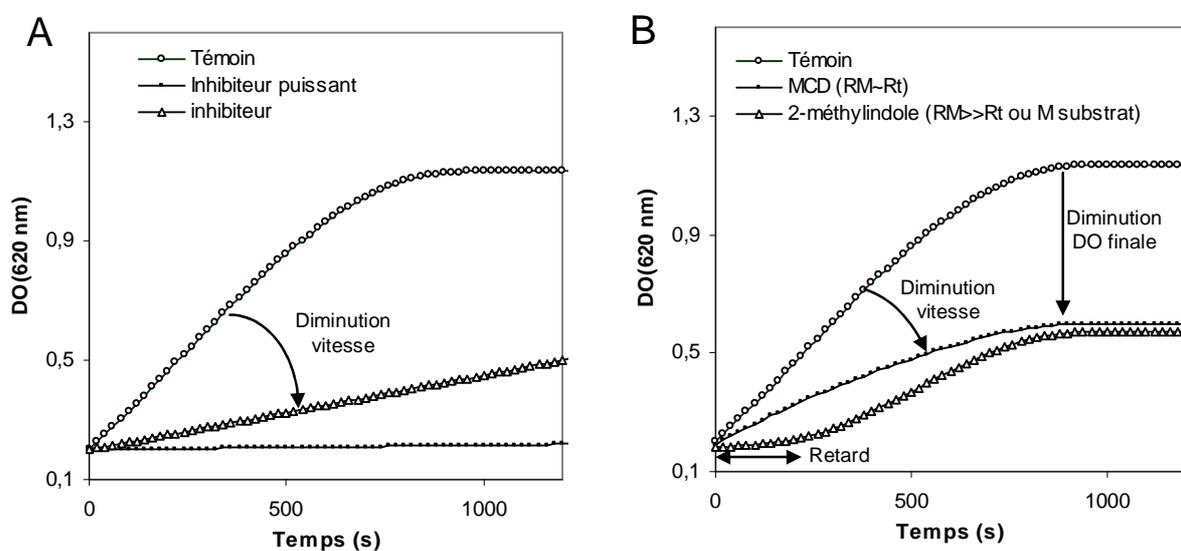
- Si  $R_t \gg R_M$  alors la courbe  $\text{DO}(620 \text{ nm}) = f(t)$  est identique à la courbe témoin.
- Si  $R_t \approx R_M$ , la vitesse d'apparition de la DO(620 nm) est diminuée. Comme  $\text{H}_2\text{O}_2$  est introduit en défaut (0,5 eq en activité BPO) ou en faible excès (1,75 eq en activité IPO), le palier final s'observe à une valeur de DO plus faible.
- Si  $R_t \ll R_M$ , la réaction entre M et  $\text{X}^\cdot$  se produit avant l'halogénéation du bleu de thymol et un retard (ou lag phase) à l'apparition de la DO(620 nm) est donc

observé. Si M présente plusieurs groupements réactifs, l'augmentation de la DO(620 nm) peut être bloquée après ce retard, à cause de la consommation totale de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. D'après les travaux de Butler et coll. concernant l'influence de dérivés indoliques sur la cinétique de bromation du rouge de phénol [17], une courbe avec retard serait aussi observée si M est substrat de l'enzyme.

Ces points illustrent l'importance du choix de la sonde qui doit être la plus réactive possible envers X<sup>+</sup> pour faciliter le traitement de données.

Ces cas de figures ont été vérifiés expérimentalement par l'évaluation de molécules connues pour réagir avec les X<sup>+</sup> (réducteurs ou molécules halogénables) ou décrites comme substrat de la vBPO. A titre illustratif, nous présentons les courbes obtenues en présence de 2-méthylindole [17] et du MCD pour l'activité bromopéroxydase (Fig. 28.B).

A titre indicatif, la molécule pourrait aussi réagir directement avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les allures possibles de la courbe DO(620 nm) = f(t) seraient analogues à celles présentées ci-dessous (Fig. 28.B)



**Fig. 28 : Les différentes courbes possibles DO(620 nm) = f(t). Exemples en activité bromopéroxydase.**

A. Courbes prédites pour des inhibiteurs de la vBPO en activité bromopéroxydase

B. Courbes expérimentales obtenues en présence de MCD (halogénable) et de 2-méthylindole (supposé être substrat). Conditions : tampon phosphate 110 mM, pH = 7,8, [vBPO] = 0,6 µg/ml, [Bleu de thymol] = 100 µM, [Molécule] = 50 µM, [Br<sup>-</sup>] = 10 mM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 0,1 mM.

Pour caractériser le mode d'action d'une molécule sur l'halogénéation du bleu de thymol par le système  $\nu\text{BPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{X}^-$ , il est donc nécessaire de déterminer trois paramètres de la courbe  $\text{DO}(620 \text{ nm}) = f(t)$  : la vitesse maximale d'apparition de la DO ( $V$ ) (et non  $V_i$ ), le retard ( $R$ ) et la valeur de l'absorbance du palier ( $A_{\text{fin}}$ ), s'il est observable.  $V$  et  $R$  sont les paramètres les plus discriminants. Pour un inhibiteur, la vitesse maximale ( $V$ ) est égale à la vitesse initiale. La courbe  $\text{DO}(620 \text{ nm}) = f(t)$  qu'il induit se caractérise soit par une  $V$  faible et un retard ( $R$ ) nul (inhibiteur de moyenne activité) soit par une  $V \approx 0 \text{ s}^{-1}$  et un retard « infini » (inhibiteur de forte activité) (Fig. 28).

## 2.6. Conclusion

Ce travail a permis de mettre en évidence que les molécules de la famille des sulfone-phthaleines peuvent être utilisées pour le suivi des activités de la  $\nu\text{BPO}$  d'*A. nodosum*. Parmi ces molécules, le bleu de thymol permet de suivre les activités iodo- et bromo-péroxydases par la mesure de la  $\text{DO}(620 \text{ nm})$  au cours du temps. Nous avons montré par suivi CLHP-SM que, sous l'action des systèmes  $\nu\text{BPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{X}^-$ , le bleu de thymol est converti en composés mono- et di-halogénés et que l'apparition de ces composés est corrélée à l'augmentation de la  $\text{DO}(620 \text{ nm})$ . Ce résultat a été corroboré par l'isolement des dérivés halogénés du bleu de thymol. La détermination de leurs  $\text{pK}_{\text{a}2}$  a permis de vérifier l'hypothèse selon laquelle les dérivés di-halogénés sont sous forme dibasique (c'est-à-dire sous forme quinone di-anionique) aux pH réactionnels et qu'ils sont principalement responsables de l'absorbance à 620 nm.

La détermination de l'influence des différents paramètres réactionnels nous a permis de développer des méthodes de suivi des activités iodo- et bromo-péroxydases par le bleu de thymol qui sont très sensibles et reproductibles. Cependant, bien que le bleu de thymol soit très réactif envers les espèces  $\text{X}^+$ , ces méthodes ne peuvent pas être utilisées pour caractériser avec rigueur les paramètres cinétiques des  $\nu\text{BPO}$  ( $K_{\text{M}}$ ,  $V_{\text{Max}}$ ) car la réaction entre  $\nu\text{BPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{X}^-$  et le bleu de thymol n'est pas stœchiométrique en raison de la de dismutation assistée de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Par ailleurs, nous avons mis en évidence que la détermination des paramètres ( $R$ ,  $V$  et  $A_{\text{fin}}$ ) de la courbe  $\text{DO}(620 \text{ nm}) = f(t)$  permet de caractériser le mode d'action de toute molécule perturbant l'halogénéation du bleu de thymol. Comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre, les tests de criblage à haut-débit seront faciles à mettre en œuvre grâce à ces méthodes de suivi par le bleu de thymol. Cependant, la discrimination des inhibiteurs de la

vBPO et des molécules présentant une très forte réactivité envers  $X^+$  nécessitera la mise en place d'une stratégie de validation basée, en particulier, sur des études d'effet dose-réponse et sur des analyses CLHP-SM (cf. partie 3.6).

### **3. Tests de criblage à haut-débit**

Dans ce sous-chapitre, nous allons décrire la mise au point, la validation, la réalisation et les résultats obtenus pour les deux tests de criblage à haut-débit – l'un en activité iodo-, l'autre en activité bromopéroxydase – effectués sur la vBPO d'*A. nodosum*. A cette fin, nous avons utilisé les méthodes de suivi par le bleu de thymol décrites précédemment. Le principe de ces tests de criblage est basé sur l'étude de l'influence des molécules d'une chimiothèque commerciale « drug-like » (Diverset, Chembridge) sur l'halogénéation du bleu de thymol par les systèmes BPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup> via le suivi de la DO(620 nm) au cours du temps. Les deux tests de criblage que nous avons réalisés sont très similaires. Les différences concernent la nature des réactifs et les titres des solutions utilisées. L'ensemble des expériences décrites ci-après a été réalisé sur la plateforme de criblage à haut débit du Service de Chimie Bioorganique et de Marquage (iBiTec-S/CEA) en collaboration avec R. Lopez et G. Merer.

#### **3.1. Mise au point du test de criblage à haut-débit**

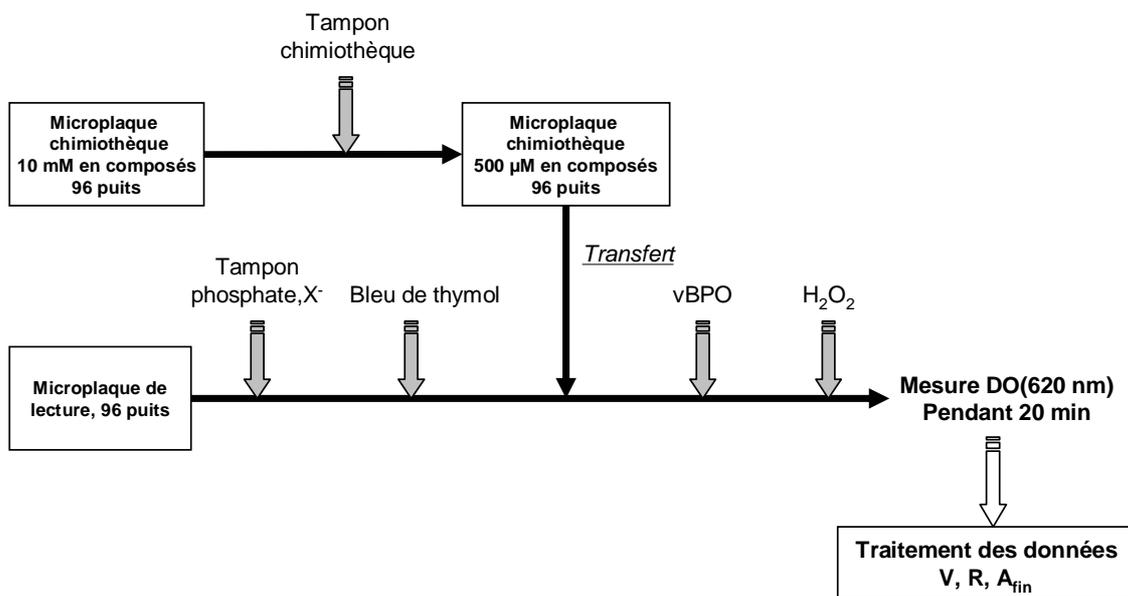
La mise au point du test de criblage a consisté principalement à déterminer la séquence des tâches à accomplir ainsi qu'à définir ou à re-définir certains paramètres compte tenu des contraintes techniques imposées par le robot. Les méthodes de suivi par le bleu de thymol n'ont été que légèrement modifiées. En particulier, les points détaillés ci-dessous ont été traités.

##### ***3.1.1 Séquence du test de criblage à haut-débit***

Cette étape consiste à déterminer la séquence des actions à réaliser par le robot pour l'exécution du test de criblage. Dans le cadre de notre étude, le processus à mettre en place est relativement simple puisque les différents réactifs sont ajoutés successivement, sans période d'incubation. A chaque microplaque de la chimiothèque correspond une microplaque de lecture dans laquelle est réalisé le test enzymatique. La séquence d'action que nous avons choisie est la suivante (Fig. 29) :

- Le robot prend en charge une microplaque de la chimiothèque – contenant dans chacun de ses puits 5  $\mu\text{l}$  d'une solution à 10 mM d'un composé dans le DMSO – et y ajoute la solution de dilution (95  $\mu\text{l}$ ) (tampon chimiothèque).
- Le robot prend ensuite en charge une microplaque de lecture et y ajoute successivement la solution de tampon phosphate contenant l'halogénure puis la solution de bleu de thymol.
- Une fraction (20  $\mu\text{l}$ ) du contenu de chaque puit de la microplaque de la chimiothèque est transférée dans la microplaque de lecture.
- La solution de vBPO puis finalement la solution de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sont ajoutées dans la microplaque de lecture.
- La microplaque de lecture est transférée dans le lecteur d'absorbance UV-visible pour le suivi de la DO(620 nm).

L'ensemble du processus est effectué sur des microplaques 96 puits.



**Fig. 29 : Séquences des actions réalisées par le robot lors du test de criblage à haut-débit.**

V : vitesse maximale, R : retard,  $A_{\text{fin}}$  : absorbance finale

Nous avons choisi d'incorporer l'halogénure au tampon phosphate pour réduire la durée de préparation de la microplaque de lecture. L'ajout de  $\text{H}_2\text{O}_2$  initie la réaction enzymatique et doit être immédiatement suivi par la lecture de la DO(620 nm). La concentration de chaque solution de réactif a été adaptée pour permettre l'obtention d'un

volume optimal à distribuer. En effet, un volume trop faible ( $< 10 \mu\text{l}$ ) implique un pipetage approximatif alors qu'un volume trop important ( $> 100 \mu\text{l}$ ) implique un remplissage de la microplaque en deux temps. Ce dernier cas de figure est à proscrire absolument pour l'ajout de la solution de  $\text{H}_2\text{O}_2$  qui initie la réaction enzymatique.

### ***3.1.2 Concentration des composés de la chimiothèque***

Compte tenu des réactions potentielles avec les espèces  $\text{X}^+$ , les composés de la chimiothèque doivent être évalués à une concentration inférieure à celle du bleu de thymol. Les courbes  $\text{DO}(620 \text{ nm}) = f(t)$  que nous avons obtenues lors de l'évaluation de molécules connues pour réagir avec  $\text{X}^+$  (cf. paragraphe 2.5), nous en conduit à choisir une concentration de  $50 \mu\text{M}$ .

### ***3.1.3 Paramètres cinétiques et de suivi de la DO(620 nm)***

La distribution de la solution de  $\text{H}_2\text{O}_2$  puis le transfert de la microplaque de lecture vers le lecteur nécessite 100 s. Cette contrainte nous a conduit à diminuer la vitesse d'apparition de la  $\text{DO}(620 \text{ nm})$  et donc à rallonger la durée d'atteinte du palier à 660 s. A cette fin, la concentration en enzyme a été diminuée.

Nous avons décidé de suivre la  $\text{DO}(620 \text{ nm})$  pendant 1200 s à raison d'une mesure toutes les 20 s. Cette durée de lecture est suffisante car elle permet de distinguer les différentes courbes  $\text{DO}(620 \text{ nm}) = f(t)$ . De plus, elle correspond à la durée nécessaire à l'ajout des différents réactifs dans la microplaque de lecture. Par conséquent, pendant la lecture d'une microplaque, la microplaque suivante est préparée ce qui permet d'optimiser la durée d'exécution du test de criblage.

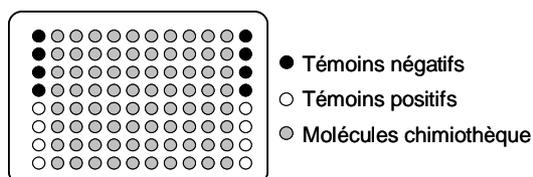
### ***3.1.4 Choix des témoins et schéma de plaques***

Puisque nous ne possédons pas d'inhibiteurs de la vBPO, nous avons défini les expériences témoins de la manière suivante, en reprenant la définition présentée par Inglese *et al.* [18] :

- Expérience témoin positif (sans vBPO et sans molécule de la chimiothèque) : elle correspond à la réaction d'halogénéation du bleu de thymol par le système  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{X}^-$  (en l'absence d'enzyme) c'est-à-dire à la réaction non catalysée. Elle reproduit la réponse attendue pour un inhibiteur très puissant de la vBPO.

- Expérience témoin négatif (sans molécule de la chimiothèque) : elle correspond à la réponse obtenue en l'absence d'élément perturbateur.

Les expériences témoins sont introduites au sein de chaque microplaque de lecture, comme présenté ci-dessous. Elles nous permettent à la fois, de contrôler le bon déroulement du test de criblage à haut-débit et de normaliser les résultats bruts obtenus par microplaque.



**Fig. 30 : Organisation de la microplaque de lecture**

### 3.1.5 Paramètres d'étude et méthode d'analyse des données

Le test de criblage à haut-débit permet d'identifier des molécules perturbant l'halogénéation du bleu de thymol par les systèmes  $vBPO/H_2O_2/X^-$ . Parmi ces molécules, il nous sera nécessaire de discerner trois groupes : des inhibiteurs de la  $vBPO$ , des substrats de la  $vBPO$  ou des molécules réagissant avec  $X^+$ . A chaque groupe correspond des allures  $DO(620\text{ nm}) = f(t)$  spécifiques (cf. Fig. 28 p.82). Pour permettre une pré-discrimination, dès la première phase du test de criblage, il est nécessaire de déterminer, pour chaque molécule testée, les paramètres : Vitesse maximale ( $V$ ) (et Vitesse maximale normalisée  $V_N$ ), Retard ( $R$ ) et Absorbance finale ( $A_{fin}$ ).

Pour gérer les données du test de criblage à haut-débit et déterminer ces paramètres, un programme codé en Matlab a été mis au point avec l'aide du Dr J. Bect (Département Signaux et Systèmes Electroniques, Supélec). Ce programme prend en charge les fichiers générés par le lecteur de microplaque et effectue automatiquement le traitement de données. Il donne donc accès pour chaque molécule testée à la représentation de sa courbe  $DO(620\text{ nm}) = f(t)$  et à ses paramètres cinétiques (Fig. 31). Il permet, de plus, de visualiser les résultats globaux pour pouvoir effectuer la sélection des hits. Nous présentons ci-dessous, de manière très simplifiée, le principe de détermination des paramètres cinétiques. Les microplaques sont traitées indépendamment les unes des autres puisqu'elles contiennent leurs propres témoins positifs et négatifs.

### Détermination de $A_{fin}$ et $A_{in}$

Pour chaque courbe  $DO(620 \text{ nm}) = f(t)$  obtenue, l'absorbance finale ( $A_{fin}$ ) est déterminée comme la moyenne des absorbances des six derniers points de mesure de la cinétique. On définit, de plus, l'absorbance initiale  $A_{in}$  comme la valeur de l'absorbance au premier temps de mesure.

### Détermination du retard $R$

Pour chaque microplaque, les grandeurs caractéristiques  $A_{max.moy}^+$  et  $A_{fin.moy}^-$  sont déterminées, à partir des données des huit expériences témoins positifs et des expériences témoins négatifs.  $A_{max.moy}^+$  correspond à la moyenne des valeurs maximales de l'absorbance des témoins positifs et  $A_{fin.moy}^-$  est la moyenne des valeurs finales de l'absorbance pour les témoins négatifs.

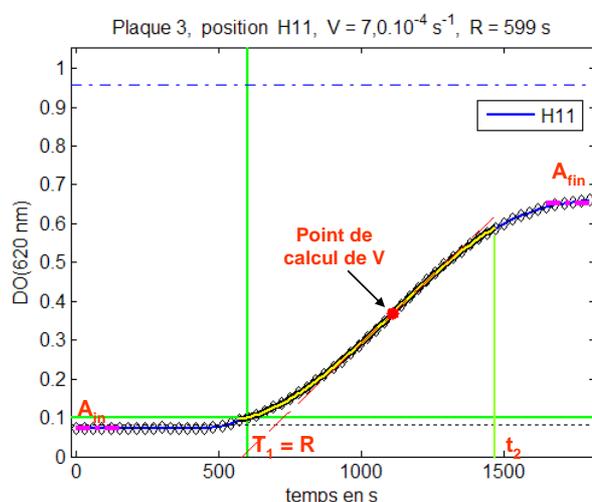
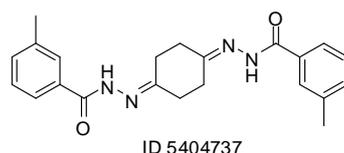
Pour chaque molécule évaluée, le retard ( $R$ ) est défini comme l'instant pour lequel l'absorbance dépasse le seuil  $A_R = A_{max.moy}^+ + 0,02(A_{fin.moy}^- - A_{max.moy}^+)$ .

### Mesure de la vitesse maximale $V$ et normalisation

Pour chaque molécule évaluée, la vitesse maximale  $V$  est déterminée par régression cubique sur un intervalle de temps  $[t_1, t_2]$  où  $t_1$  correspond à  $R$  et  $t_2$  correspond au dernier instant pour lequel l'absorbance est inférieure au seuil  $A_{in} + 0,9(A_{fin} - A_{in})$ .

Un coefficient de normalisation est déduit du calcul de la moyenne des vitesses maximales des témoins négatifs ( $V_{moy}^-$ ). Pour chaque molécule, on définit alors la vitesse

normalisée par :  $V_N = \frac{V}{V_{moy}^-}$ .



**Fig. 31 : Cinétique de l'activité IPO en présence d'une molécule de la chimiothèque (ID5404737) et détermination des paramètres cinétiques.**

### Critères d'identification des hits et des inhibiteurs de la vBPO

Lors du traitement des résultats des tests de criblage à haut-débit, une molécule sera considérée comme active (ou hit) si elle diminue significativement la vitesse d'halogénéation du bleu de thymol. Parmi ces hits, un inhibiteur moyen ou de faible activité se caractérisera par une  $V_N$  faible accompagnée nécessairement d'un retard faible ( $R \approx 0 \text{ s}$ ). Cependant, d'après notre méthode de calcul du retard, un inhibiteur puissant se caractérisera par une  $V_N$  très faible ( $V_N \approx 0$ ) accompagnée d'un retard variable.

### **3.2. Validation du test de criblage à haut-débit**

Suite à sa mise au point, il est nécessaire de valider le test de criblage à haut-débit c'est-à-dire d'évaluer sa robustesse, sa sensibilité et sa justesse pour chaque activité de la vBPO. Cette étape expérimentale va nous permettre de déterminer le degré de confiance attribuable au test de criblage à haut-débit. Dans ce but, nous avons déterminé les paramètres statistiques  $Z$  et  $Z'$  introduits par Zhang *et al.* pour l'évaluation des tests de criblage à haut-débit [19].

### 3.2.1 Définition des paramètres statistiques $Z'$ et $Z$

La détermination des paramètres statistiques  $Z'$  et  $Z$  définis par Zhang *et al.* [19] est actuellement la méthode la plus fiable pour valider un test de criblage à haut-débit [2]. Le paramètre  $Z'$  permet de déterminer si la méthode de mesure d'activité choisie est sensible et reproductible. Il est calculé à partir d'expériences témoins positifs et négatifs réalisées dans les conditions du futur test de criblage à haut-débit.  $Z'$  rend compte à la fois de la variabilité du signal des témoins (négatifs et positifs) et du rapport signal sur bruit (c'est-à-dire de la dynamique de la réponse). Il est défini de la manière suivante :

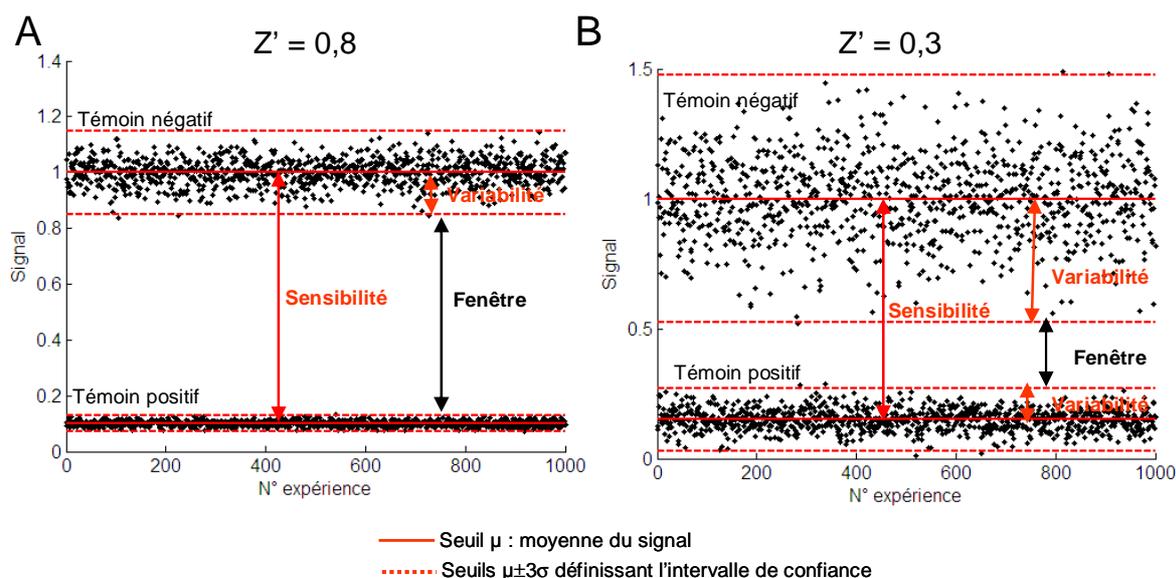
$$Z' = 1 - \frac{3\sigma^+ + 3\sigma^-}{|\mu^- - \mu^+|}$$

soit en développant (dans le cadre de notre étude) : 
$$Z' = \frac{(\mu^- - 3\sigma^-) - (\mu^+ + 3\sigma^+)}{\mu^- - \mu^+}$$

où  $\mu^+$  et  $\mu^-$  correspondent aux moyennes du signal étudié pour les témoins positifs et négatifs respectivement, et  $\sigma^+$  et  $\sigma^-$  aux écarts-types correspondants. La valeur de  $Z'$  est comprise entre  $-\infty$  et 1.

Comme illustré sur la figure ci-après (Fig. 32), le dénominateur souligne la sensibilité de la méthode alors que le numérateur rend compte de la variabilité des réponses. En effet en statistique, il est défini que si la répartition du signal d'étude est gaussienne,  $(\mu \pm 3\sigma)$  correspond à l'intervalle de confiance comprenant 99,73 % des réponses observées. Cet intervalle est d'autant plus large que le signal observé est peu reproductif. Or, la reproductibilité des réponses témoins négatifs et positifs est un élément-clé contrôlant le degré de confiance du test de criblage. En effet, les méthodes illustrées par la figure ci-après (Fig. 32) présentent une sensibilité équivalente (rapport signal/bruit). Cependant, pour la méthode où  $Z' = 0,3$ , la variabilité des réponses des expériences témoins est très importante ce qui réduit la fenêtre d'étude. Le test de criblage à haut débit sera peu discriminant. A l'opposé, pour la méthode où  $Z' = 0,8$ , la variabilité des réponses des expériences témoins est faible ce qui offre une grande fenêtre d'étude. Une telle fenêtre d'étude permet de prévoir que la proportion de faux-positifs et de faux-négatifs sera faible et que le test de criblage sera très discriminant.

Zhang *et al.* définissent que la méthode est valide si le paramètre  $Z'$  est supérieur à 0,5 et optimale si  $Z' = 1$  [19].



**Fig. 32 : Simulation des réponses induites selon la valeur de  $Z'$ .**

Chaque point correspond à une expérience. Comme dans le cadre de notre étude, le signal « haut » correspond aux témoins négatifs, le signal bas aux témoins positifs.

Le paramètre  $Z$  permet d'évaluer si la méthode de mesure d'activité est juste et non biaisée, lorsqu'elle est effectuée en présence de composés. Le paramètre  $Z$  est basé sur le principe que, lors d'un test de criblage à haut-débit, si la chimiothèque n'est pas biaisée, la très grande majorité des molécules évaluées n'a pas d'activité biologique et engendre, par conséquent, une réponse analogue à celle du témoin négatif. Le paramètre  $Z$  est donc calculé de manière analogue à  $Z'$  en remplaçant  $\mu^-$  et  $\sigma^-$  par  $\mu^M$  et  $\sigma^M$  qui correspondent à la valeur moyenne et à l'écart-type du signal d'étude pour un sous-ensemble de la chimiothèque. En général,  $Z$  est déterminé grâce à l'évaluation de 5 % à 10 % de la chimiothèque.

De même que  $Z'$ , on considère que  $Z$  doit être supérieur à 0,5 pour que le test de criblage soit valide. Si  $Z$  est très inférieur à 0,5, la probabilité que les touches (ou hits) soient en réalité des faux positifs est trop importante pour que le test de criblage à haut-débit soit mené (par évaluation unique de chaque composé).

Un test de criblage à haut-débit est d'autant plus robuste et fiable que ses paramètres  $Z$  et  $Z'$  sont proches de 1.

### 3.2.2 Détermination des paramètres $Z'$ et $Z$

Dans le cadre de notre étude, la détermination du paramètre  $Z$  est cruciale pour valider notre protocole compte tenu des réactions potentielles entre  $X^+$  et les molécules de la chimiothèque. Ces réactions sont susceptibles de rendre le test de criblage peu discriminatoire, ce qui se traduira par une valeur de  $Z$  faible ( $< 0,5$ ).

Le calcul de  $Z$  et  $Z'$  a été effectué, pour chaque activité, en utilisant le paramètre le plus discriminant : la vitesse maximale ( $V$ ). Les expériences ont été effectuées dans les conditions du test de criblage à haut-débit sur la plateforme robotisée. Le paramètre  $Z'$  a été calculé à partir des paramètres  $V^+$  et  $V^-$  obtenus lors de l'évaluation de 20 microplaques ne contenant que des expériences témoins positifs et négatifs (soit 1600 expériences témoins négatifs et 320 expériences témoins positifs). Le paramètre  $Z$  a été déterminé à partir des  $V^M$  et  $V^-$  obtenues pour 15 microplaques de la chimiothèque choisies aléatoirement (1200 composés soit 7 % de la chimiothèque).

	$Z'$	$Z$
Activité IPO	0,84	0,72
Activité BPO	0,89	0,51

**Tab. 6 : Détermination des paramètres  $Z'$  et  $Z$**

Les paramètres  $Z'$  déterminés pour les activités iodo- et bromo-péroxydases sont excellents (0,84 et 0,89, respectivement). Ces valeurs mettent en évidence que les méthodes de suivi sont sensibles et robustes. De plus, elles valident l'exécution 'technique' du test de criblage c'est-à-dire la séquence des actions que nous avons choisie ainsi que les différents réglages que nous avons effectués.

En activité iodopéroxydase, la valeur du paramètre  $Z$  (0,72) met en évidence que le test de criblage sera très discriminant. En activité bromopéroxydase, la valeur de  $Z$  est plus faible (0,51) mais reste acceptable. Dans le contexte de notre étude, ces valeurs de  $Z$  confirment aussi que notre choix de sonde est judicieux : le bleu de thymol est très généralement plus réactif envers  $X^+$  que la molécule de la chimiothèque testée.

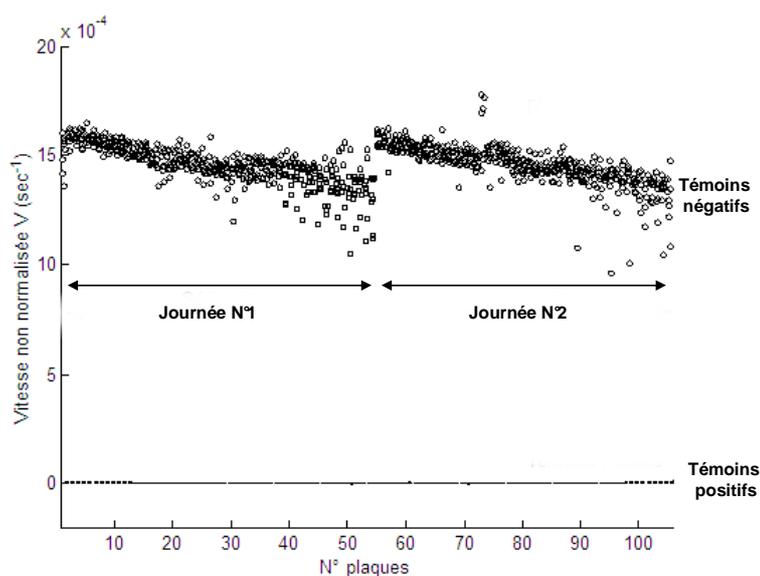
### 3.3. Réalisation des tests de criblage à haut-débit

Nous avons réalisé deux tests de criblage à haut-débit sur la vBPO purifiée d'*A. nodosum*, l'un en activité iodopéroxydase, le second en activité bromopéroxydase, en utilisant les tests de suivi au bleu de thymol. Chaque test de criblage a été réalisé en cinq jours ce qui correspond à une moyenne de 3200 composés testés par jour. Au total, 16720 composés ont été testés sur chaque activité de la vBPO. Le déroulement des tests de criblage ainsi que différents aspects techniques sont décrits dans le Chapitre 1 de la Partie expérimentale. Le tableau de l'annexe 2 résume les caractéristiques et les paramètres du test de criblage à haut-débit.

### 3.4. Résultats des tests de criblage à haut-débit

#### 3.4.1 Remarques générales

Nous avons observé une déviation de la réponse des témoins négatifs au cours d'une journée de criblage (Fig. 33). Cette déviation est due à une perte d'activité de la solution de vBPO et de la solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cet élément nous a conduit à traiter les résultats indépendamment pour chaque microplaque et à effectuer la normalisation en interne comme présentée dans le paragraphe 3.1.5.



**Fig. 33 : Illustration de la déviation de la réponse des témoins négatifs, en activité bromopéroxydase.**

Au cours de deux journées consécutives du test de criblage (2 x 55 plaques). Chaque point correspond à une expérience. Sur chaque microplaque, sont réalisées 8 expériences témoins positifs et 8 témoins négatifs.

### 3.4.2 Résultats globaux

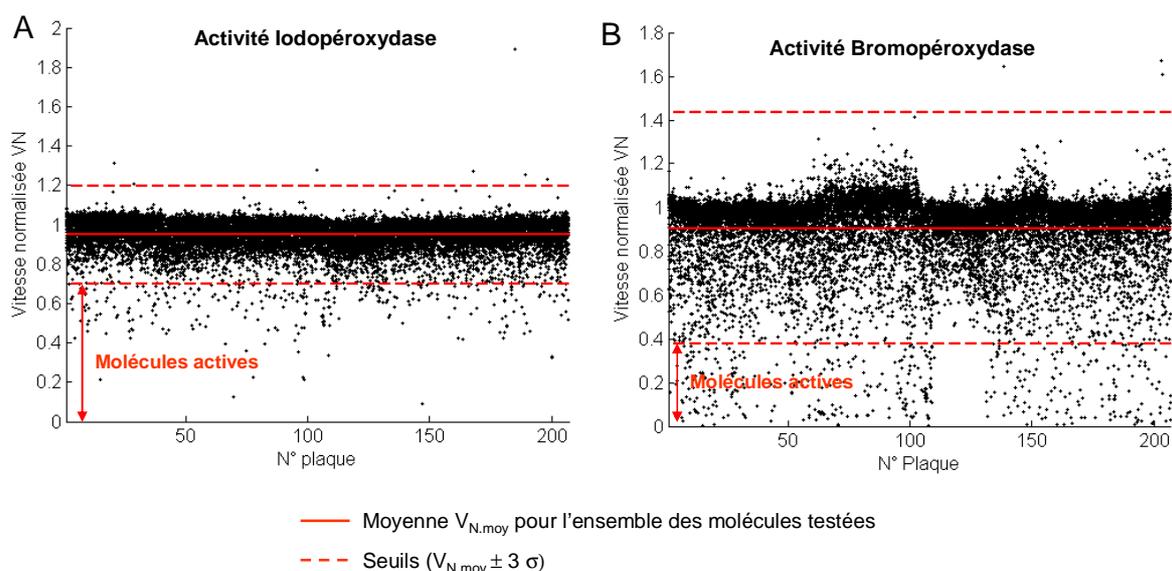
Les résultats obtenus à partir des expériences témoins positifs et négatifs nous ont permis de valider l'ensemble des deux tests de criblage à haut-débit : aucune microplaque de la chimiothèque n'a du être re-évaluée.

Sur l'ensemble du test de criblage, le paramètre  $Z$  en activité iodopéroxydase est de 0,68 ce qui permet de prédire que le test est discriminant et que la majorité des hits sera confirmée. En revanche, en activité bromopéroxydase,  $Z$  n'est que de 0,40, ce qui laisse suggérer une moins bonne discrimination avec un risque potentiel de faux positifs (Tab. 7). Pour améliorer le paramètre  $Z$ , il aurait fallu diminuer la concentration des molécules de la chimiothèque.

	$Z$
Activité Iodopéroxydase	0,68
Activité Bromopéroxydase	0,40

Tab. 7 : Paramètres  $Z$  sur l'ensemble des tests de criblages, calculés à partir de  $V_N$

Les résultats globaux des tests de criblage sont présentés dans la figure Fig. 34. Les graphiques Fig. 34.A et Fig. 34.B représentent, pour chaque molécule, la valeur du paramètre  $V_N$  (vitesse maximale normalisée). Une molécule est considérée comme un hit si  $V_N$  est faible c'est-à-dire si elle diminue de manière significative la vitesse d'halogénéation du bleu de thymol. En prenant en compte la définition de Zhang *et al.* [19], les molécules sont définies comme actives si leur  $V_N$  est inférieure au seuil  $V_{N,moy} - 3\sigma$  où  $V_{N,moy}$  est la valeur moyenne de la vitesse normalisée calculée pour l'ensemble des molécules évaluées et  $\sigma$  l'écart-type correspondant. Ce seuil est calculé à 0,4 pour l'activité bromopéroxydase et à 0,7 l'activité iodopéroxydase. Les composés 'actifs', définis à partir de ces seuils, représentent 3,2 % et 2,7 % de la chimiothèque, pour les activités iodopéroxydase et bromopéroxydase, respectivement.



**Fig. 34 : Résultats globaux des tests de criblage à haut-débit (16 720 composés)**

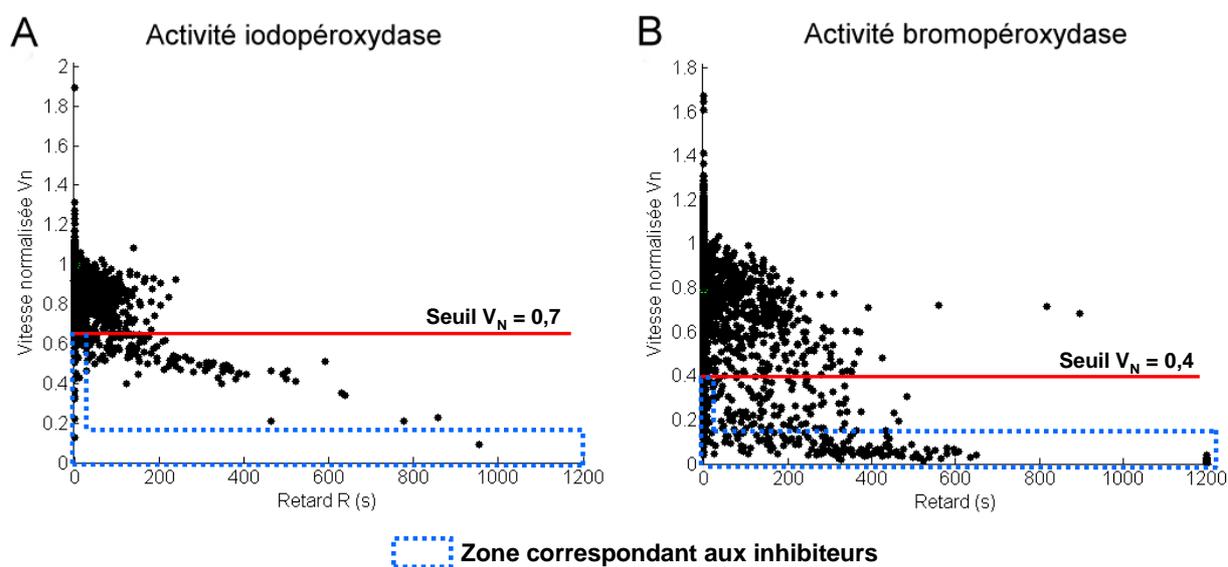
A. Représentation du paramètre  $V_N$  en activité iodopéroxydase. Chaque point correspond à une molécule testée. Les molécules actives se situent au-dessous du seuil  $V_{N,moy}-3\sigma$  (0,7).

B. Représentation du paramètre  $V_N$  en activité bromopéroxydase. Chaque point correspond à une molécule testée. Les molécules actives se situent au-dessous du seuil  $V_{N,moy}-3\sigma$  (0,3)

En activité bromopéroxydase, les  $V_N$  des molécules actives sont beaucoup plus faibles que celles observées en activité iodopéroxydase. Dans le cas d'inhibiteurs de la vBPO, ceci pourrait s'expliquer par une modulation de leur activité selon l'halogénure présent (par compétition avec l'halogénure, par exemple). Dans les autres cas (substrat ou molécules réagissant avec  $X^+$ ), les différences observées s'expliquent par la concentration plus faible de  $H_2O_2$  utilisée en activité bromopéroxydase. On peut aussi mettre en avant que les espèces  $Br^+$  sont beaucoup plus réactives que les espèces  $I^+$  compte tenu de leur pouvoir oxydant. Pour illustration, le couple  $Br_2/Br^-$  a un potentiel rédox standard ( $E^\circ = 1,07$  V) supérieur à celui du couple  $I_2/I^-$  ( $E^\circ = 0,54$  V). Nous verrons, par ailleurs, dans le paragraphe 3.6, que les réactions mises en jeu entre les espèces  $X^+$  et les hits non inhibiteurs de la vBPO sont des réactions d'oxydation.

Sur les graphiques de la figure ci-après (Fig. 35), chaque molécule évaluée est représentée par un point dont les coordonnées sont définies par ses paramètres R et  $V_N$ . Ces graphiques montrent clairement que les molécules actives ( $V_N < 0,4$  et  $0,7$  pour les activités BPO et IPO, respectivement) ne sont pas forcément des inhibiteurs de la vBPO. En effet, comme énoncé dans le paragraphe 3.1.5, des inhibiteurs potentiels de la vBPO se caractérisent soit par une  $V_N$  très faible ( $V_N < 0,2$ ) soit par une  $V_N$  plus élevée ( $0,2 < V_N < V_{Nseuil}$ ) mais

avec un retard très faible ( $R < 30$  s). Compte tenu de ces seuils, les molécules actives potentiellement inhibitrices de la vBPO ne représentent plus que 0,9 % et 2,2 % des composés de la chimiothèque en activité iodo- et bromo-péroxydase, respectivement. Pour l'activité iodopéroxydase, seules deux molécules sont susceptibles d'être des inhibiteurs puissants.



**Fig. 35 : Représentation  $V_N = f(R)$  des résultats des deux tests de criblage à haut-débit**

Chaque molécule testée est représentée par un point dont les coordonnées sont données par le couple ( $R$ ,  $V_N$ ). Au-dessous du seuil  $V_N$  les molécules sont actives. Parmi ces molécules, celles comprises dans la zone délimitée en bleu pointillé sont susceptibles d'être des inhibiteurs de la vBPO.

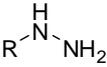
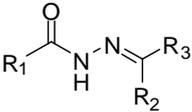
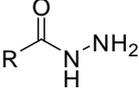
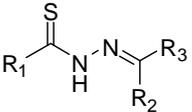
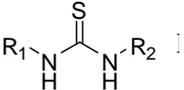
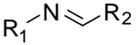
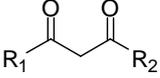
### 3.4.3 Sélection des hits

Compte tenu du faible nombre de molécules actives, nous avons décidé de ne pas discriminer, à ce niveau, les molécules potentiellement inhibitrices de la vBPO des molécules substrats ou réagissant avec  $X^+$ . La sélection des hits a donc été effectuée en considérant uniquement le paramètre  $V_N$ .

En activité iodopéroxydase, nous avons fixé le seuil  $V_N < 0,6$  ce qui a conduit à la sélection de 120 composés. En activité bromopéroxydase, le seuil a été fixé à  $V_N < 0,3$  ce qui a conduit à la sélection de 327 composés à laquelle nous avons rajouté trois molécules supplémentaires se caractérisant par un retard supérieur à 500 s et une  $V_N$  supérieure à 0,6. Après regroupement de ces deux sélections, élimination des doublons et des redondances structurales triviales, un total de 400 hits a été sélectionné.

Bien qu'il soit difficile à ce niveau d'effectuer une étude structure-activité, on peut tout de même remarquer que certaines familles de molécules sont fortement représentées :

hydrazine, hydrazide, imino-hydrazides, imino-thio-hydrazides, thiourées, imines et 1,3-dicétones (Tab. 8). Certaines de ces familles sont connues pour être facilement oxydées ou réagir avec  $X^+$ , ce qui confirme que certains hits ont été sélectionnés pour leur réactivité chimique et non pour leur structure. On peut ainsi remarquer que 46 hydrazides sont présentes parmi les molécules les plus actives alors que la chimiothèque n'en comporte que 69, de structures très diverses. Il en est de même pour les 1,3-dicétones : 12 molécules parmi les 19 de la chimiothèque ont été sélectionnées.

Familles	Structures
Hydrazine	
Immino-hydrazide	
Hydrazide	
Thio hydrazide	
Thiourées	
Imines	
1,3-dicétones	

**Tab. 8 : Familles de composés les plus présentées parmi les 400 hits**

Il peut être remarqué que certaines de ces familles de molécules ont déjà été décrites pour être des pseudo-inhibiteurs des peroxydases à hème. En particulier, les dérivés de la thiourée tels que le 6-propylthiouracile (PTU) et le 1-méthyl-2-mercapto-imidazole (MMI) sont des inhibiteurs de la synthèse des hormones thyroïdiennes iodées (T3 et T4) par la thyroperoxydase (TPO) et sont utilisés dans le traitement symptomatique de certaines pathologies thyroïdiennes telles que la maladie de Grave [20]. Dans certaines conditions, il a été montré que ces composés inactivent de manière irréversible différentes peroxydases à hème telles que la TPO et la lactoperoxydase. Ils sont alors considérés comme des inhibiteurs

suicides [21, 22]. De même, les arylhydrazines et les arylhydrazides sont des inhibiteurs métaboliquement activés des peroxydases à hème (myéloperoxydase, horseradish peroxidase) et ont été utilisés pour l'étude du site actif de ces enzymes [23, 24].

Si l'activité des composés appartenant à la famille des hydrazides et des thiourées est confirmée, il sera donc intéressant de déterminer si leur mode d'action est identique dans le cadre des peroxydases à vanadate et dans le cadre des peroxydases à hème.

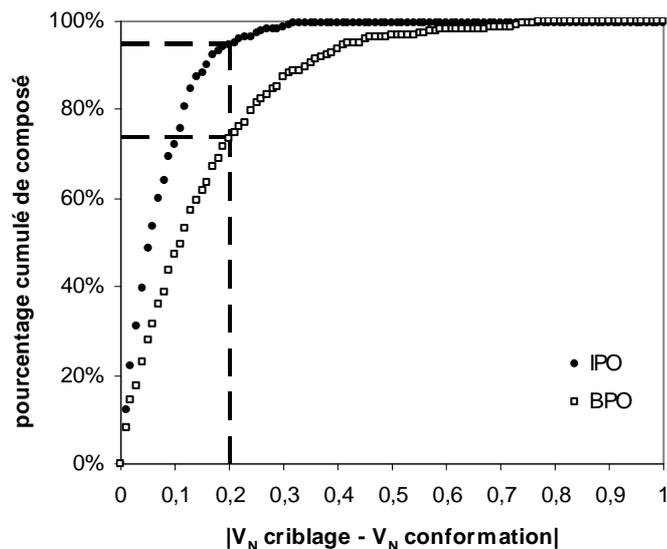
### 3.5. Tests de confirmation des hits et sélection des molécules les plus actives

Après l'étape de Hit Picking qui permet de préparer un jeu de cinq microplaques contenant les 400 hits à partir des microplaques-mère de la chimiothèque, des tests secondaires ont été effectués pour confirmer l'activité des hits et identifier les molécules les plus actives. Deux tests ont été effectués pour chaque activité de la vBPO d'*A. nodosum* :

- Un test de confirmation : ce test se déroule dans les conditions utilisées lors du test de criblage à haut-débit. Il permet de confirmer l'activité des molécules sélectionnées et d'éliminer les éventuels faux-positifs
- Un test secondaire : Puisque  $H_2O_2$  est le réactif introduit en défaut (ou en faible excès), une solution de  $H_2O_2$  est rajoutée à la fin du test de confirmation afin d'observer si cet ajout est capable de provoquer une augmentation de la DO(620 nm). Après l'ajout de  $H_2O_2$ , la DO(620 nm) est donc suivie pendant 20 min supplémentaires. On détermine sur cette nouvelle plage de lecture, la vitesse maximale d'apparition de la DO(620 nm) consécutive à l'ajout de  $H_2O_2$  :  $V_{H_2O_2}$ . Si  $V_{H_2O_2}$  est élevée, cela signifiera que le hit n'est pas un inhibiteur mais une molécule réagissant avec  $X^+$  (ou  $H_2O_2$ ). Si la  $V_{H_2O_2}$  demeure faible, cela signifiera que la molécule active peut être un inhibiteur de la vBPO.

#### 3.5.1 Test de confirmation : Comparaison avec le test de criblage à haut-débit

Pour 95 % et 72 % des composés, en activité iodo- et bromo-péroxydase respectivement, la différence absolue entre la valeur de  $V_N$  obtenue lors du test de criblage et celle obtenue lors du test de confirmation est inférieure à 0,20 (Fig. 36). Un tel résultat met en évidence une bonne reproductibilité entre les deux séries d'expérience. Le pourcentage plus faible de hits confirmés en activité bromopéroxydase est en accord avec la valeur de Z (0,40) que nous avons calculée à partir des résultats du test de criblage à haut-débit (Tab. 7)



**Fig. 36 : Comparaison : test de confirmation et test de criblage à haut débit.**

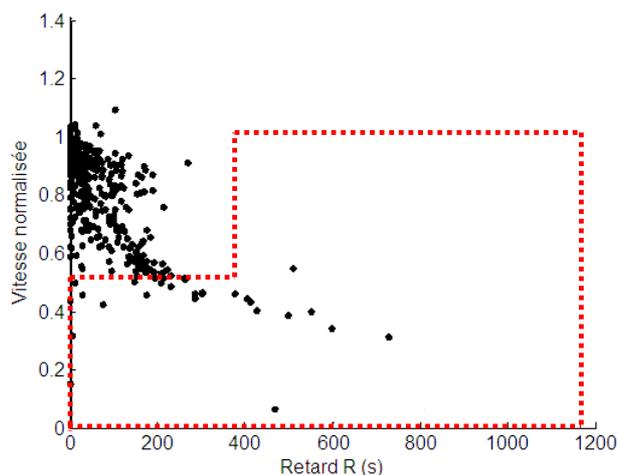
Le pourcentage cumulé de composés est reporté en fonction de la valeur absolue de la différence ( $V_N$  criblage –  $V_N$  confirmation) pour les activités iodo- (IPO) et bromo-péroxydase (BPO).

### 3.5.2 Sélection des molécules les plus actives

Notre objectif principal est de sélectionner des molécules pouvant être potentiellement des inhibiteurs de la  $\nu$ BPO. Cependant, des molécules qui seraient substrats de l'enzyme ou très réactives envers  $X^+$ , pourraient avoir des applications intéressantes dans le contexte d'études *in vivo*. Ce point sera illustré dans le Chapitre 3 ci-après. Nous avons donc décidé d'inclure dans notre sélection de telles molécules. La sélection s'est faite indépendamment pour chaque activité, en appliquant successivement différents filtres sur les paramètres  $V_N$ , R et  $V_{H_2O_2}$ , puis en effectuant un tri manuel dans le but d'éliminer les redondances structurales.

#### Sélection en activité iodopéroxydase

Compte tenu de la faible activité générale des molécules, la sélection a été effectuée à partir des paramètres  $V_N$  et R. En fixant un seuil  $V_N \leq 0,5$  indépendamment de R et un autre seuil à  $R \geq 400$  s indépendamment de  $V_N$ , 24 molécules ont été sélectionnées (Fig. 37). Le nombre de molécules a été réduit, en considérant les redondances structurales, à 12 molécules qui constituent la sélection IPO.

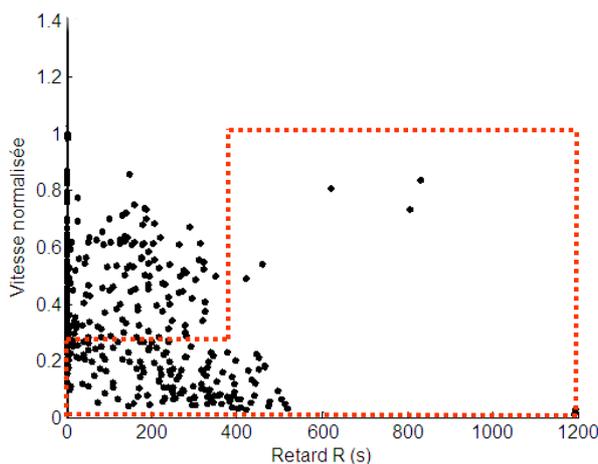


**Fig. 37 : Représentation des résultats du test de confirmation pour les 400 hits en activité iodopéroxydase**

Chaque molécule est représentée par un point de coordonnées ( $V_N, R$ ). La zone délimitée par le trait rouge en pointillé correspond à la sélection IPO obtenue grâce aux seuils  $V_N < 0,5$  ou  $R > 400s$

### Sélection en activité bromopéroxydase

Pour l'activité bromopéroxydase, la sélection a pris en compte  $V_N$  et  $R$  mais aussi le paramètre  $V_{H_2O_2}$ . En établissant un seuil à  $V_N \leq 0,3$ , 167 molécules ont été retenues (Fig. 38). Le test secondaire d'ajout de  $H_2O_2$  a permis, ensuite, de comparer efficacement ces molécules. Pour certaines molécules, l'ajout de  $H_2O_2$  entraîne une forte augmentation de la DO(620 nm) et donne une cinétique analogue à celle des témoins négatifs : elles ne sont donc pas des inhibiteurs. Nous avons appliqué un second seuil  $V_{H_2O_2} \leq 0,001 s^{-1}$  qui a permis de sélectionner 50 molécules parmi les 167 précédentes. Un tri manuel consistant à éliminer les redondances structurales a permis de réduire cette sélection à 27 molécules. Nous avons, de plus, considéré les molécules pour lesquelles  $V_N > 0,3$  et  $R \geq 400 s$ , ce qui a conduit à l'identification de cinq nouvelles molécules (Fig. 38). La sélection BPO comporte donc au final 32 molécules

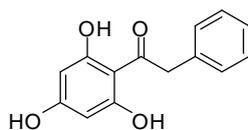


**Fig. 38 : Représentation des résultats du test de conformation pour les 400 hits en activité bromopéroxydase**

Chaque molécule est représentée par un point de coordonnées ( $V_N, R$ ). La zone délimitée par le trait rouge en pointillé correspond à la sélection obtenue grâce aux seuils  $V_N < 0,3$  ou  $R > 400s$ .

### Sélection finale

Après regroupement des composés de la sélection IPO (12) et BPO (32), nous avons éliminé les doublons et les redondances structurales. Nous avons volontairement écarté (EV21), un dérivé du benzène-1,3,5-triole communément appelé phloroglucinol car il est très probablement halogéné par les espèces  $X^+$ . En effet, il a été montré que le phloroglucinol est iodé en trois positions par le système  $vBPO/H_2O_2/I$  [25]. Cependant, nous conservons cette structure pour les tests *in vivo* (cf. Chapitre 3)



**Fig. 39 : Dérivé benzène-1,3,5-triole (EV21)**

Une sélection finale de 20 composés a été finalement obtenue (Tab. 9). L'ensemble du processus de sélection est rappelé en annexe 3.

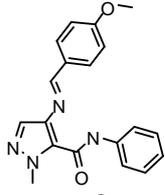
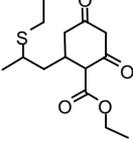
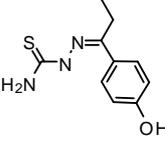
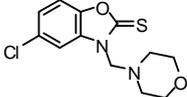
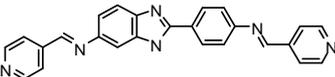
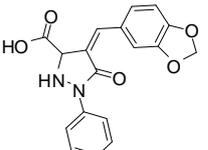
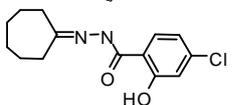
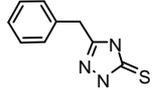
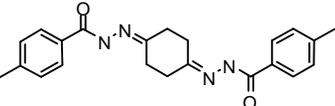
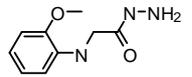
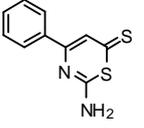
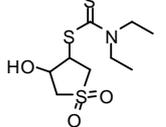
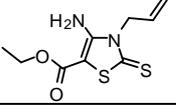
Cette sélection comprend des composés appartenant aux familles chimiques précédemment remarquées parmi les 400 hits, en particulier, les dérivés de la thiourée et les hydrazides. De manière remarquable, 12 molécules comportent un soufre principalement sous forme  $C=S$ . Comme souhaité, les molécules sélectionnées induisent des effets sur la courbe  $DO(620 \text{ nm}) = f(t)$  relativement différents, comme le montrent les valeurs de  $V_N$  et  $R$  (Tab.

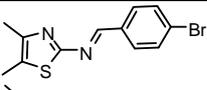
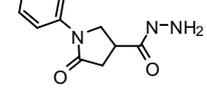
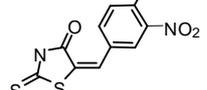
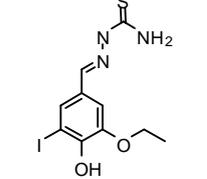
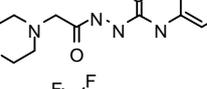
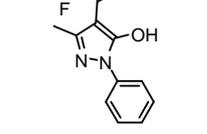
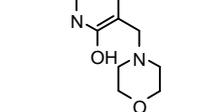
9). On peut remarquer que certaines molécules sont actives en activité bromopéroxydase alors qu'elles ne le sont pas ou très faiblement en activité iodopéroxydase. En revanche, des molécules spécifiques à l'activité iodopéroxydase n'ont pas été identifiées.

En faisant abstraction des structures chimiques, l'analyse détaillée des courbes  $DO(620 \text{ nm}) = f(t)$  obtenues lors du test de confirmation, met en évidence que seuls EV01 et EV05 pourraient exercer une inhibition de l'enzyme en activités iodo- et bromo-péroxydases. Trois autres molécules (EV02, EV13 et EV17) induisent des réponses compatibles avec une inhibition de la vBPO en activité bromopéroxydase alors qu'elles n'ont pas d'incidence sur la courbe  $DO(620 \text{ nm}) = f(t)$  en activité iodopéroxydase : ils pourraient donc s'agir d'inhibiteurs spécifiques de l'activité bromopéroxydase. Les quinze hits restants induisent des courbes  $DO(620 \text{ nm}) = f(t)$  qui sont caractéristiques de molécules réagissant avec  $X^+$  ou de substrats de l'enzyme : ces courbes présentent un retard et/ou une  $A_{\text{fin}}$  faible (c'est-à-dire une atteinte précoce du palier)<sup>10</sup> (Tab. 9).

---

<sup>10</sup> Pour illustration, se référer à la figure Fig. 28 p.82 qui présente les différentes courbes  $DO(620 \text{ nm}) = f(t)$  selon la nature de la molécule évaluée.

N°	Structure	Bromopéroxydase			Iodopéroxydase		
		V <sub>N</sub>	R (s)	Inh ?	V <sub>N</sub>	R (s)	Inh ?
EV01		0,00	1200	O	0,06	470	O
EV02		0,10	324	O	0,94	46	N*
EV03		0,06	407	O	0,42	76	N
EV04		0	1200	O	0,90	169	N
EV05		0,10	6	O	0,15	0	O
EV06		0,78	64	N	0,32	8	N
EV07		0,06	251	O	0,4	553	N
EV08		0,84	830	N	0,97	36	N
EV09		0,22	10	O	0,34	599	N
EV10		0,11	10	O	0,31	730	N
EV11		0,06	383	N	0,83	10	N
EV12		0,20	132	N	0,59	0	N
EV13		0,04	303	O	0,91	0	N*

N°	Structure	Bromopéroxydase			Iodopéroxydase		
		V <sub>N</sub>	R (s)	Inh ?	V <sub>N</sub>	R (s)	Inh ?
EV14		0,17	4	N	0,59	15	N
EV15		0,32	0	N	0,38	499	N
EV16		0,08	392	O	0,81	161	N
EV17		0,05	477	O	0,88	8	N*
EV18		0,03	421	O	0,9	118	N
EV19		0,59	10	N	0,46	30	N
EV20		0,09	274	O	0,91	74	N

**Tab. 9 : Les hits les plus actifs et paramètres cinétiques.**

La colonne inhibiteur mentionne si la courbe  $DO(620 \text{ nm}) = f(t)$  peut correspondre à la courbe induite par un inhibiteur oui (O) ou non (N). N\* souligne que le composé n'a pas d'effet significatif sur la courbe  $DO(620 \text{ nm}) = f(t)$ . N signifie que la cinétique obtenue est caractéristique d'une molécule réagissant avec  $X^+$  ou d'un substrat de l'enzyme.

### 3.6. Validation et étude du mode d'action des 20 hits

A la suite des tests de criblage à haut-débit et de confirmation, 20 molécules perturbant très fortement l'halogénéation du bleu de thymol par les systèmes  $\nu\text{BPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{X}^-$  ont été sélectionnées. Au sein de cette sélection, les allures des courbes  $\text{DO}(620 \text{ nm}) = f(t)$  obtenues lors du test de confirmation suggèrent en première approximation que cinq molécules pourraient être des inhibiteurs de la  $\nu\text{BPO}$ , pour au moins une activité. Les molécules restantes sont susceptibles de réagir avec  $\text{X}^+$  ou d'être substrats de l'enzyme. Une série d'expériences a donc été réalisée dans le but de vérifier ces hypothèses. Pour effectuer ces études, 5 mg de chaque composé ont été commandés chez le fournisseur de la chimiothèque (Chembridge), à l'exception du composé EV09 qui n'était plus disponible.

#### 3.6.1 Conformité et stabilité des composés

La conformité et la pureté des 19 produits commerciaux ont été évaluées par CLHP-SM. A l'issue de cette analyse, seuls 13 composés présentent une pureté satisfaisante ( $> 80\%$  en absorbance UV) et un spectre de masse correct. Les six composés restant sont dégradés ou comportent des produits secondaires en quantité non négligeable. Ces résultats ont été confirmés par des analyses supplémentaires (CLHP-SM et  $^1\text{H}$  RMN) effectuées par le fournisseur. Parmi les 13 produits validés, deux produits se sont révélés instables dans le tampon phosphate à 100 mM et à  $\text{pH} = 7,2$ . A l'issue de cette étude, les composés appartenant à la famille des imines et des hydroxy-imidazoles ont été éliminés.

Catégorie de molécules	Références
Molécules validées et stables en tampon phosphate	EV02, EV03, EV08, EV10, EV11, EV12, EV13, EV15, EV16, EV17, EV18
Molécules validées mais instables en tampon phosphate	EV06, EV19
Molécules dégradées (masse non détectée)	EV01, EV04, EV05, EV20
Molécules à la pureté très insuffisante	EV07, EV14

Tab. 10 : Résultats des analyses CLHP-SM et des études de stabilité dans le tampon phosphate

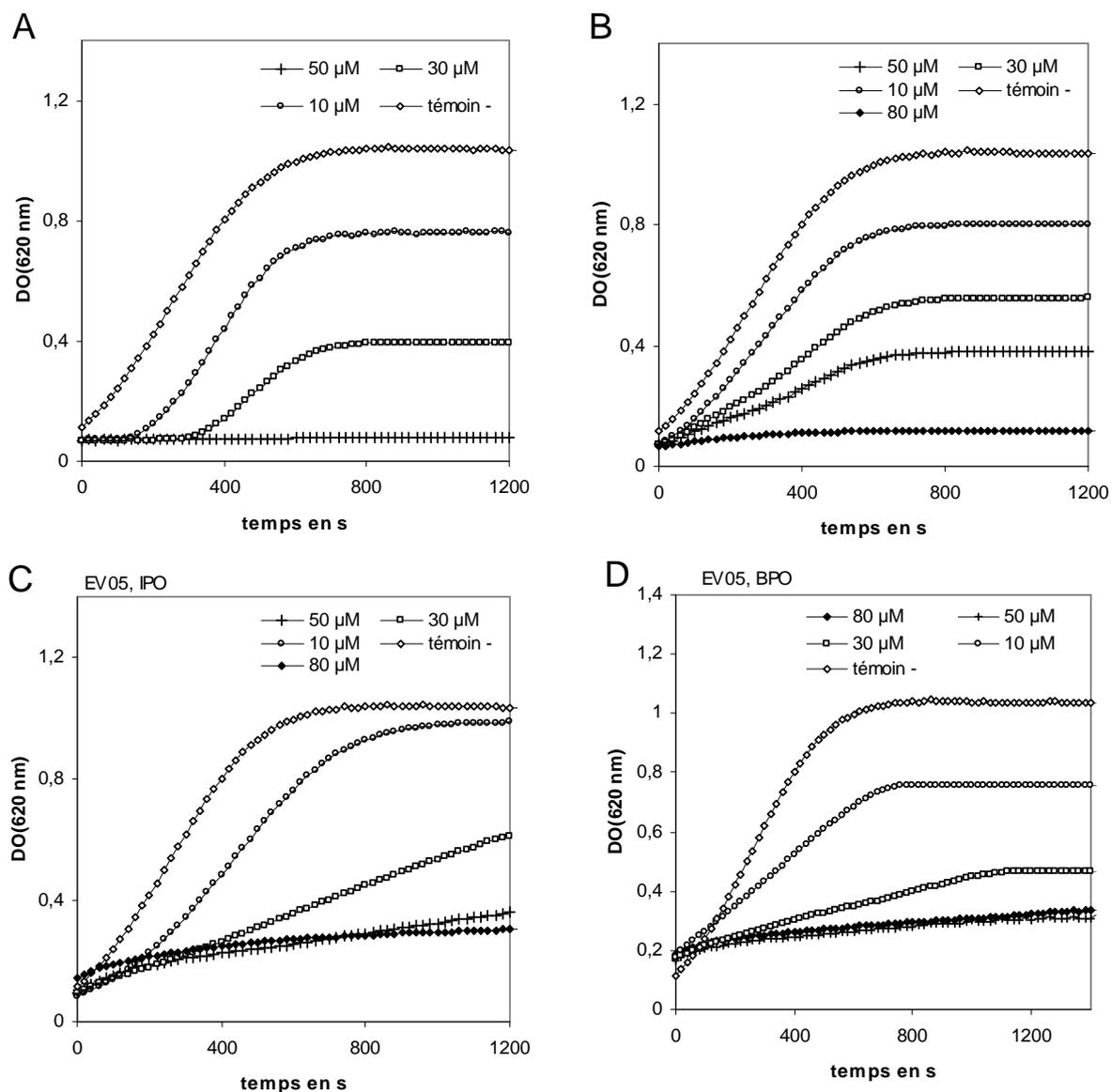
### 3.6.2 Effet doses-réponses

Malgré les résultats des analyses CLHP-SM, les études d'effet dose-réponse ont été effectuées en activité iodo- et bromo-péroxydases sur les 19 molécules. Ces études ont été réalisées dans les mêmes conditions que le test de criblage à haut-débit. Seule la concentration finale des hits a été modifiée (gamme : 10, 30, 50, 80 et 100  $\mu\text{M}$ ).

Les expériences menées à 50  $\mu\text{M}$  ont donné des courbes  $\text{DO}(620 \text{ nm}) = f(t)$  équivalentes à celles obtenues lors du test de confirmation pour tous les composés à l'exception de EV14. Ce résultat suggère que l'état de conservation des composés est similaire dans les microplaques de la chimiothèque et dans les lots de produits envoyés par le fournisseur. Le composé EV14 se révèle inactif pour les deux activités à toutes les concentrations testées. Compte tenu de son activité relativement moyenne détectée pendant le test de validation, aucune étude supplémentaire ne sera menée sur ce composé.

En ce qui concerne les résultats des effets dose-réponse, lorsque la concentration en composé est augmentée, on peut s'attendre à observer quatre types d'évolution pour les courbes  $\text{DO}(620 \text{ nm}) = f(t)$  (Fig. 40) :

- Type 1 : les courbes sont similaires à celles des expériences témoin. Le composé n'a pas ou peu d'effet.
- Type 2 : Le retard (R) augmente et  $A_{\text{fin}}$  diminue. Le composé réagit avec  $X^+$  ou est un substrat de l'enzyme.
- Type 3 : L'absorbance finale ( $A_{\text{fin}}$ ) et la vitesse maximale (V) diminuent. Le composé réagit avec  $X^+$  libéré en solution
- Type 4 : V est diminuée. Les courbes n'ont pas de retard et la valeur de  $A_{\text{fin}}$  est conservée. Le composé est susceptible d'être un inhibiteur de la vBPO.



**Fig. 40 : Les différents effets dose-réponse observés et réponses induites par le composé EV05**

- A. Effet de type 2 : Exemple du composé EV01, en activité iodopéroxydase
- B. Effet de type 3 : Exemple du composé EV03, en activité iodopéroxydase
- C. Effet de type 4 : Exemple du composé EV05, en activité iodopéroxydase
- D. Réponse induite par le composé EV05 en activité bromopéroxydase

Les molécules ont donc été classées selon le type d'effet dose-réponse observé (Tab. 11). Le composé EV05 induit un effet dose-réponse en activité iodopéroxydase qui peut suggérer une inhibition de la vBPO. Cependant, en activité bromopéroxydase, les courbes  $DO(620\text{ nm}) = f(t)$  obtenues lorsque EV05 est introduit à 10 μM et à 30 μM, se caractérisent par un palier final nettement inférieur au palier de la courbe témoin. Ceci suggère donc que EV05 bloque l'augmentation de la DO(620 nm) plutôt par réaction avec les espèces  $X^+$  que par inhibition de l'enzyme. De même, bien que les réponses d'EV07, EV10 et EV15 puissent

évoquer une inhibition de la vBPO en activité bromopéroxydase, les réponses obtenues en activité iodopéroxydase suggèrent fortement que ces molécules sont très réactives envers  $X^+$ .

Activité	Type 1	Type 2	Type 3	Type 4
Iodopéroxydase	EV11, EV13, EV14, EV17	EV01, EV02, EV04, EV07, EV08, EV10, EV15, EV16, EV18, EV20	EV03, EV06, EV12, EV19	EV05
Bromopéroxydase	EV14	EV01, EV04, EV06, EV08, EV19, EV20	EV02, EV03, EV11, EV12, EV13, EV16, EV17, EV18	EV05, EV07, EV10, EV15

**Tab. 11 : Résultats des études dose-réponse**

Cette étude suggère très fortement que les composés sélectionnés ne sont pas des inhibiteurs de la vBPO. Nous allons à présent essayer de déterminer le mode d'action exact de ces molécules. En raison des tests *in vivo* que nous voulons mener grâce à ces molécules (cf. Chapitre 3), seule l'activité iodopéroxydase sera, à présent, considérée.

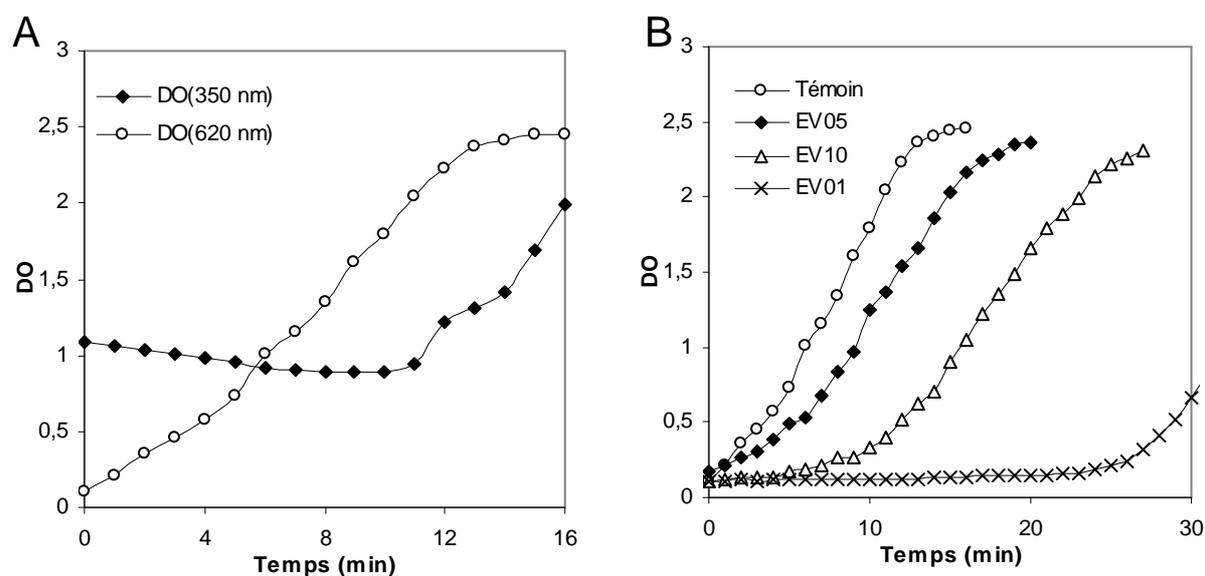
### **3.6.3 Perturbation de la iodation chimique du bleu de thymol**

Pour conforter les résultats des études d'effet dose-réponse et préciser le mode d'action de ces 19 molécules, nous avons évalué leur effet sur la iodation par voie chimique du bleu de thymol (c'est-à-dire en l'absence d'enzyme). Si ces molécules perturbent cette réaction, ceci confortera qu'elles sont capables de réagir avec les espèces  $I^+$  et qu'elles ne sont pas, par conséquent, des inhibiteurs réels de la vBPO.

La iodation chimique du bleu de thymol a été réalisée dans des conditions analogues à la réaction enzymatique, mais sans vBPO et  $H_2O_2$ . Cette expérience consiste à suivre l'évolution de la DO(620 nm) (bleu de thymol iodé) suite à des ajouts successifs d'une solution aqueuse de  $I_3^-$ . Les ajouts successifs de  $I_3^-$  miment « très approximativement » la génération de  $I^+$  par le système vBPO/ $H_2O_2$ / $I^-$ .

On observe que la DO(620 nm) augmente consécutivement aux ajouts de la solution de  $I_3^-$  jusqu'à l'atteinte d'un palier. Le palier est atteint au bout de 15 ajouts ce qui correspond à 3 équivalents de  $I_3^-$ . Consécutivement à l'atteinte du palier de la DO(620 nm), la DO(350 nm) augmente suggérant l'accumulation de  $I_3^-$  dans le milieu (Fig. 41.A).

L'influence de chaque composé, introduit à 50  $\mu\text{M}$ , sur l'évolution de la DO(620 nm) a été évaluée. Les composés induisent soit un retard soit une diminution de la vitesse initiale (Tab. 12, Fig. 41.B). Deux composés ne perturbent pas la cinétique d'halogénéation : il s'agit de EV14 (dételé inactif lors de l'étude dose-réponse) et de EV13. Cependant, le suivi de la DO(350 nm) – longueur d'onde à laquelle absorbe EV13 – suggère que ce produit réagit au cours de l'expérience. Il est intéressant de noter que EV05 induit une diminution de la vitesse initiale d'environ 50 % (Fig. 41.B). Bien que cet effet puisse sembler faible, il confirme que EV05 n'est pas un inhibiteur de la vBPO, même en activité iodopéroxydase, car il réagit avec  $\text{I}_3^-$  aqueux. Compte tenu de ces résultats et des analyses CLHP-SM et  $^1\text{H}$  RMN qui montrent que EV05 correspond à un mélange de produits de dégradation, il ne nous a pas semblé intéressant d'approfondir son étude.



**Fig. 41 : Iodation chimique du bleu de thymol**

A. Suivi spectrophotométrique de  $\text{I}_3^-$  (350 nm) et de la iodation du bleu de thymol (620 nm)

B. Illustration de l'effet des hits sur la iodation du bleu de thymol

Conditions : Volume total = 2 ml, Tampon phosphate 100 mM, pH = 7,2,  $[\text{I}^-] = 1,5$  mM, [Bleu de thymol] = 100  $\mu\text{M}$ , DMSO = 4% en volume, Ajout de 10  $\mu\text{l}$  d'une solution de  $\text{I}_3^-$  à 4 mM toutes les min. [Hit] = 50  $\mu\text{M}$

Effet	Références
Molécules sans effet	EV13, EV14
Molécules diminuant la vitesse initiale (% de diminution de la vitesse initiale)	EV04 (82), EV06 (70), EV17 (66), EV11 (62), EV19 (57) EV05 (49), EV12 (33)
Molécules impliquant un retard (Retard en min)	EV01 (21), EV03 (15), EV18 (15), EV16 (10), EV10 (10), EV07 (7), EV15 (6), EV20 (6), EV08 (4), EV02 (4)

**Tab. 12 : Effet des hits sur la iodation chimique du bleu de thymol**

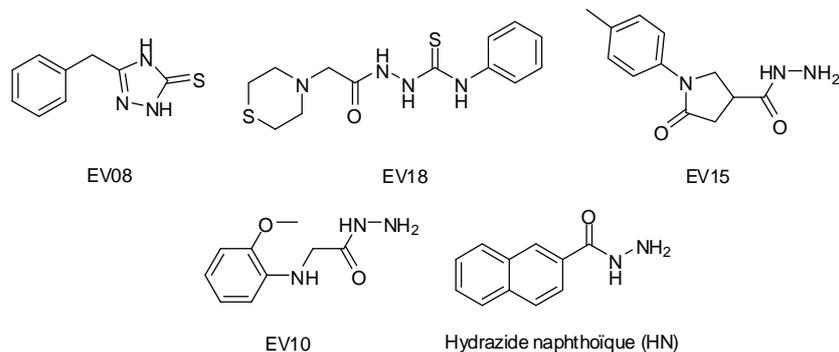
Entre parenthèses est indiqué le pourcentage de diminution de la vitesse initiale par rapport à l'expérience témoin ou le retard en minutes, selon l'effet exercé par la molécule sur la iodation chimique du bleu de thymol

Ces expériences confirment que ces composés ne sont pas des inhibiteurs de la vBPO car ils perturbent de manière significative la iodation chimique du bleu de thymol. De manière remarquable, les molécules perturbant fortement la iodation du bleu de thymol par vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> induisent les perturbations les plus fortes sur la iodation chimique (à l'exception d'EV05). De tels résultats suggèrent très fortement que les hits sélectionnés ne sont pas des substrats de l'enzyme (c'est-à-dire qu'ils ne réagissent pas après fixation sur la vBPO avec l'espèce « E-I<sup>+</sup> » proposées par Butler et coll. [26-28]). Ils réagissent donc fort probablement avec les espèces X<sup>+</sup> libérées en solution par la vBPO.

Compte tenu de ces résultats, il n'est pas nécessaire d'approfondir l'étude des composés révélés non-conformes par les analyses CLHP-SM (cf. paragraphe 3.6.1) ni de déterminer leur composition exacte. Nous allons donc restreindre notre étude aux onze hits validés par les analyses CLHP-SM (cf. Tab. 10 p.105)

#### **3.6.4 Comparaison des systèmes I<sub>3</sub><sup>-</sup>, vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> et vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Pour confirmer l'hypothèse que les hits sélectionnés ne sont ni des inhibiteurs ni des substrats de la vBPO et qu'ils réagissent avec les espèces I<sup>+</sup> libérées dans le milieu, nous avons caractérisé les produits obtenus par réaction des hits avec les trois systèmes suivants : I<sub>3</sub><sup>-</sup>, vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup>. Compte tenu de la faible quantité de produit dont nous disposons pour chaque hit, ces études sont menées par analyses CLHP et CLHP-SM. Parmi les onze hits validés, quatre molécules représentatives et un produit commercial (l'hydrazide naphthoïque) ont été sélectionnés pour cette étude. Nous avons choisi le composé EV08 pour son analogie structurale avec le MMI (Fig. 42).

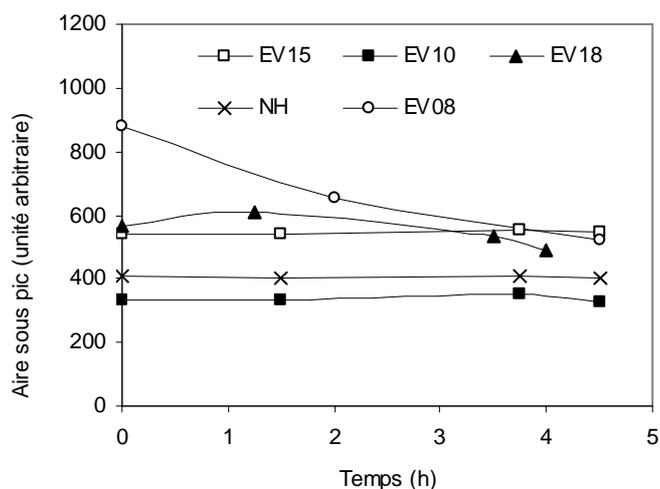


**Fig. 42 : Molécules sélectionnées pour les études CLHP et CLHP-SM**

### Réaction avec le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Pour vérifier que les hits ne réagissent pas directement avec le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ce qui a été observé pour des dérivés sulfures aromatiques [29-31]) ou avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, nous avons suivi leur disparition en présence de ces systèmes par analyse CLHP.

Ces analyses mettent en évidence que EV10, EV15 et l'hydrazide naphthoïque (HN) sont stables en présence du système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A l'inverse, EV18 et EV08 sont lentement dégradés en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou du système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cependant, ces réactions sont beaucoup plus lentes que la réaction d'halogénéation du bleu de thymol par le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I (Fig. 43). Par conséquent, les hits ne bloquent pas la iodation du bleu de thymol par réaction directe avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou avec vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

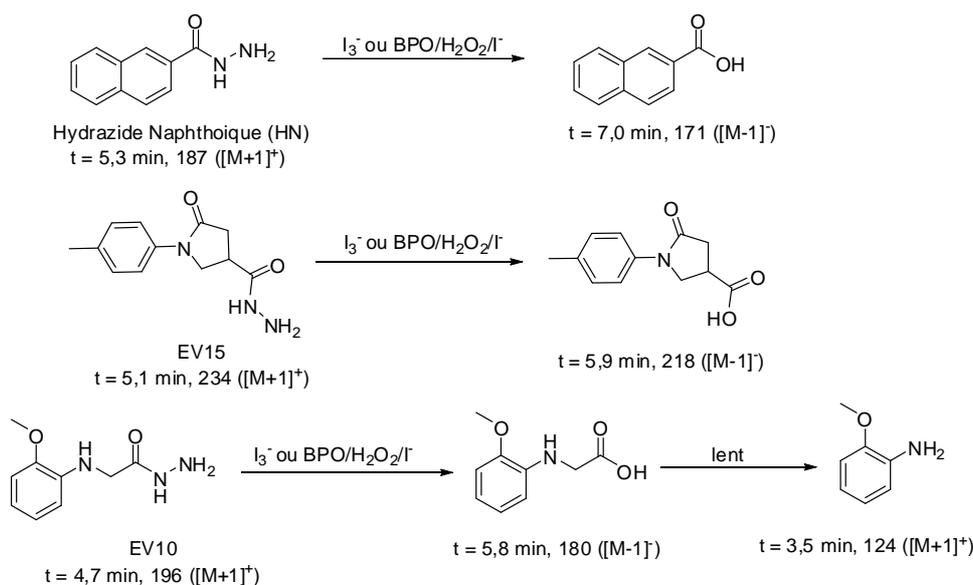


**Fig. 43 : Analyses CLHP : Suivi de l'aire sous pic de chaque hit en présence du système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

### Réactions avec les systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> et I<sub>3</sub><sup>-</sup>

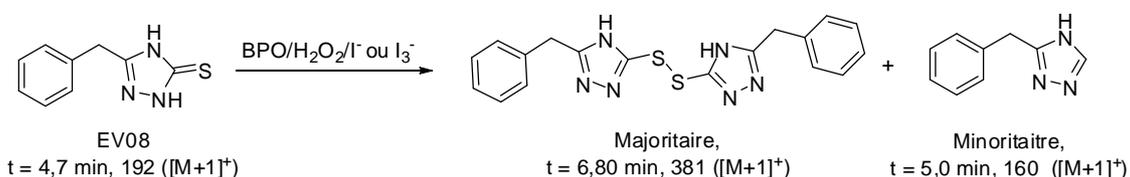
Pour conforter le mécanisme d'action des hits, nous avons déterminé leurs produits de réaction avec le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup>. Les produits des hits avec I<sub>3</sub><sup>-</sup> ont aussi été analysés dans le but de pouvoir comparer les réactions par voie enzymatique et par voie chimique. Les expériences des hits avec les systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> et I<sub>3</sub><sup>-</sup> ont été étudiées par suivi cinétique par CLHP puis analysées par CLHP-SM. Les suivis cinétiques suggèrent qu'à l'exception du composé EV18, les systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et I<sub>3</sub><sup>-</sup> génèrent les mêmes produits dans le même ordre de temps. En ce qui concerne EV18, on observe la formation d'un intermédiaire commun qui est ensuite converti en un autre produit par I<sub>3</sub><sup>-</sup> mais dégradé en présence du système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup>.

Les analyses des bruts réactionnels par CLHP-SM confirment ces résultats. D'après les spectres de masse, les hydrazides (EV15, EV10, HN) donnent, par réaction avec I<sub>3</sub><sup>-</sup> et vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup>, les acides carboxyliques correspondants. Cette réaction classique est décrite avec de nombreux oxydants et a été utilisée pour la synthèse d'esters ou d'amides [32, 33]. Ces acides carboxyliques résulteraient de la formation d'un intermédiaire acyl-diimide par une réaction d'oxydation avec I<sup>+</sup>. Cet intermédiaire subirait ensuite une attaque nucléophile de H<sub>2</sub>O. L'acide carboxylique généré à partir de EV10 est instable et est lentement converti en dérivé aniline par déacétylation (Fig. 44).



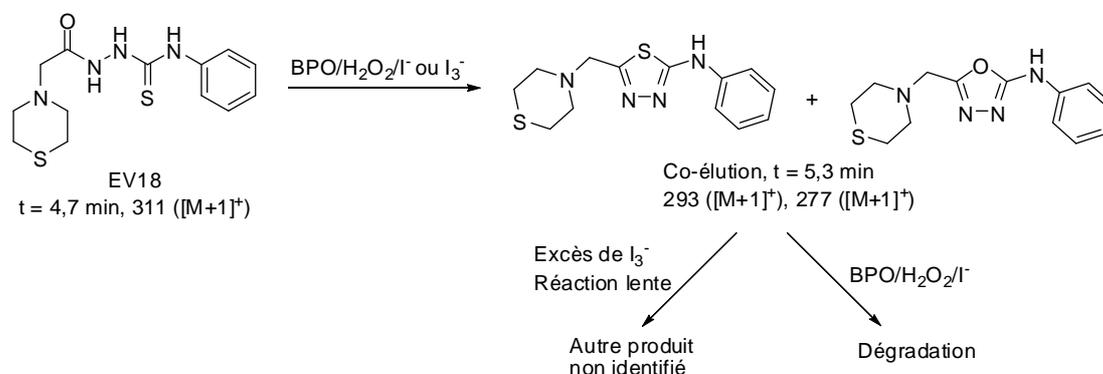
**Fig. 44 : Proposition de réaction des composés EV15, EV10 et HN avec les systèmes BPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> et I<sub>3</sub><sup>-</sup> d'après les analyses CLHP-SM**

EV08 réagit identiquement en présence des deux systèmes pour donner un mélange contenant le produit de dimérisation et son analogue désoufré (Fig. 45). Des réactivités similaires ont été décrites avec le système TPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> (dans certaines conditions) en présence de MMI [34] et d'analogues du MMI [35].



**Fig. 45: Proposition de réaction de EV08 avec les systèmes BPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> et I<sub>3</sub><sup>-</sup> et résultats CLHP-SM**

Les intermédiaires réactionnels observés à partir de EV18 sont susceptibles de correspondre aux produits de cyclisation c'est-à-dire au thiadiazole et à l'oxadiazole correspondants. Cette réaction est une fois encore connue : la cyclisation de dérivés similaires à EV18 par I<sub>2</sub> constitue une voie de synthèse des oxadiazoles (pour illustration : [36]). En présence de vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> ou d'un excès d'un fort excès d'I<sub>3</sub><sup>-</sup>, ces intermédiaires cycliques sont dégradés par des mécanismes que nous n'avons pas identifiés.



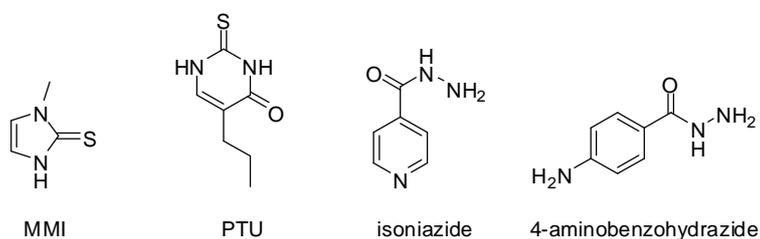
**Fig. 46 : Proposition de réaction de EV18 avec les systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> et I<sub>3</sub><sup>-</sup> et résultats CLHP-SM**

Les réactions des hits avec les systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> et I<sub>3</sub><sup>-</sup> conduisent à la formation des mêmes produits, dans des ordres de temps similaires. Par ailleurs, ces réactions sont décrites dans la littérature. Ces résultats mettent donc en évidence que les hits n'agissent pas par une voie spécifique en présence de vBPO, ce qui confirme qu'ils ne sont pas substrats de l'enzyme. Leurs mécanismes d'action reposent donc fort probablement, sur une réaction avec les espèces X<sup>+</sup> présentes dans le milieu.

### Comparaison des effets des dérivés hydrazides et thiourées sur les peroxydases à hème et à vanadate

Nous avons évoqué dans le paragraphe 3.4.3 que les dérivés de la thiourée et les hydrazides sont connus pour être des inhibiteurs dits métaboliquement activés des peroxydases à hème. Il a été montré que l'oxydation des hydrazides et des dérivés de la thiourée (tels que le PTU et le MMI) est catalysée par les systèmes peroxydase à hème/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (en l'absence d'halogénure) et génère des entités très réactives qui désactivent ces enzymes par formation d'adduit avec leur centre prosthétique [21, 24].

Ces mécanismes d'inactivation ne sont pas observés avec la vBPO. En effet, nous avons montré qu'en absence d'halogénure, le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est incapable de catalyser l'oxydation de EV10, EV15, EV08, EV18 et de la hydrazide naphthoïque (Fig. 43). De plus, la vBPO n'est pas désactivée par incubation avec ces composés en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (donnée non montrée). L'incubation a aussi été réalisée avec des inhibiteurs des peroxydases à hème décrits dans la littérature (MMI, PTU [21], isoniazide [37], 4-aminobenzohydrazide [24]) et a conduit au même résultat (données non montrées). Pour la vBPO, les hits n'agissent donc que par réaction avec X<sup>+</sup> et n'induisent pas d'inactivation de l'enzyme.



**Fig. 47 : Inhibiteurs activés métaboliquement de peroxydases à hème**

Cependant, il existe des homologies « réactionnelles » entre les deux groupes de peroxydases. Il a été montré que l'iodure a un effet protecteur contre l'inactivation de la TPO par le MMI en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Taurog *et al.* ont mis en évidence que l'iodure est préférentiellement oxydé, générant une espèce I<sup>+</sup> (liée à l'enzyme ou libérée dans le milieu) qui réagit ensuite avec le MMI. Par réaction avec I<sup>+</sup>, le MMI est transformé en produit dimère puis en 1-méthylimidazole [34] et la TPO n'est pas désactivée. Dans ces conditions, le mécanisme « d'inhibition » exercé par le MMI sur l'activité de la TPO est tout à fait analogue à ce que nous avons observé pour le composé EV08 sur l'activité de vBPO (Fig. 45).

### 3.6.5 Conclusion

Les résultats obtenus démontrent que les hits sélectionnés ne sont pas des inhibiteurs de la vBPO. Les expériences ont montré qu'ils perturbent la iodation chimique du bleu de thymol. Les analyses CLHP-SM ont révélé que les hits génèrent, en présence des systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I et I<sub>3</sub><sup>-</sup>, les mêmes produits de réaction. Par ailleurs, ces composés ne réagissent pas avec les systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces résultats confirment que les hits n'interagissent pas directement avec la vBPO mais réagissent spécifiquement avec les espèces X<sup>+</sup> libérées dans le milieu. Lors du test de criblage à haut-débit, les hits ont donc été sélectionnés pour leur réactivité chimique envers les espèces X<sup>+</sup>, ce qui explique leur diversité structurale ainsi que la présence récurrente de certains groupements fonctionnels tels que les hydrazides ou les groupements C=S.

Cependant, on observe une grande disparité d'activité pour des composés comportant le même groupement fonctionnel. Ces différences peuvent s'expliquer par l'existence d'autres groupements réactifs sur les structures mais aussi par la présence de produits secondaires non détectés par les analyses CLHP-SM (dans les lots commerciaux et les solutions de composés de la chimiothèque). Par exemple, les hydrazides peuvent être obtenus par réaction de l'hydrazine (NH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) sur l'ester méthylique ou éthylique correspondant. Or, l'oxydation de l'hydrazine par l'iode aqueux est connue pour être rapide et complète à nos pH d'étude [38]. Par conséquent, des quantités résiduelles d'hydrazine pourraient être à l'origine des différences d'activité observées entre les hydrazides de la chimiothèque.

## 3.7. Identification d'inhibiteurs : discussion et perspectives

A la suite du test de criblage à haut-débit et des étapes de validation, aucun inhibiteur de la vBPO n'a été identifié. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce résultat.

### 3.7.1 La chimiothèque

La chimiothèque que nous avons évaluée ne comporte que 16480 composés, bien moins que les chimiothèques des grands groupes pharmaceutiques. De plus, les composés de cette chimiothèque « drug-like » ont été sélectionnés grâce aux descripteurs consensuels (règle de Lipinski) et par confrontation avec une base de pharmacophore 3D déduite de l'étude de cibles protéiques essentiellement mammifères. Or, les vHPO sont exclusivement

exprimées chez des organismes thallophytes et n'ont pas d'homologie structurale forte avec des protéines exprimées chez les mammifères. Il peut donc être supposé que le nombre limité de composés et le mode de construction de la chimiothèque soient responsables de l'absence d'inhibiteurs de la vBPO.

### 3.7.2 *La méthode de suivi des activités de la vBPO*

La méthode de suivi des activités de la vBPO est indirecte et aurait pu se révéler problématique en raison des réactions potentielles entre les espèces  $X^+$  et les composés de la chimiothèque. Cependant, le nombre de hits détectés pour les deux activités s'est révélé tout à fait gérable et les résultats bruts ont pu être analysés de manière efficace grâce à notre programme de traitement de données. Il peut être affirmé qu'aucun inhibiteur actif – dans les conditions utilisées – n'a pu être écarté involontairement.

Les conditions que nous avons utilisées dans notre test de criblage ( $[H_2O_2]$ ,  $[X^-]$ ) sont cohérentes avec les valeurs de  $K_{M.app}$  de la littérature. Cependant, comme évoqué dans le Chapitre 1 (cf. paragraphe 3.4.), il est possible que le  $K_{M.app}$  de la vBPO pour l'iodure soit sur-évalué. Si tel est le cas, nous aurions effectué le test de criblage à haut-débit à une concentration trop élevée en iodure impliquant une saturation du site de fixation de l'iodure ce qui rend difficile la détection d'inhibiteurs compétitifs.

### 3.7.3 *Structure des vHPO*

Jusqu'à présent, malgré les efforts de différentes équipes de recherche, aucune structure de co-cristallisation vHPO- $X^-$  ou vHPO-substrat organique n'a été décrite dans la littérature. Compte tenu des résultats d'EXAFS de la raie K du brome obtenus pour la vBPO en présence de  $Br^-$  [39], l'existence d'un site de reconnaissance de  $X^-$  peut être contestée et par là-même, la possibilité d'une inhibition de la vBPO par compétition vis-à-vis de l'halogénure.

Les vHPO présentent des propriétés structurales remarquables : elles demeurent actives même après une exposition prolongée à des conditions dénaturantes (températures élevées, stockage en présence d'un fort pourcentage de solvant, agent chaotrope ...) [9, 11]. Leur structure quaternaire est stabilisée grâce aux grandes surfaces d'interaction existant entre les monomères [40]. De plus, les expériences de mutagénèse dirigée ont montré que la structure du site actif est très rigide [41]. Par conséquent, il peut se révéler impossible de

déplacer la vBPO vers une conformation inactive par interaction (au niveau ou hors de son site actif) avec une petite molécule telle que celles présentes dans la chimiothèque.

#### ***3.7.4 D'autres voies pour identifier des inhibiteurs de la vBPO ?***

Puisqu'aucun site de reconnaissance des substrats organiques ou de l'halogénure n'a pour l'heure été clairement identifié, il est impossible d'envisager des études de screening *in silico* ou de docking.

On pourrait envisager de tester des chimiothèques autres que celles drug like en particulier celles constituées de produits naturels qui pourraient contenir des structures plus originales et plus volumineuses.

Une autre solution serait la mise au point d'inhibiteur suicide ou métaboliquement activé. Dans ce but, une étude approfondie du cycle catalytique des vHPO est à réaliser. Cependant, cette tâche pourrait se révéler ardue à réaliser puisque les vHPO présentent un turn-over élevé suggérant qu'elles sont peu sensibles aux entités qu'elles génèrent [42].

## 4. Conclusion

Dans le cadre de cette étude, nous avons mis au point et validé une méthode spectrophotométrique de suivi des activités iodo- et bromo-péroxydase applicable à n'importe quelle vHPO. Cette méthode s'est révélée robuste, sensible et plus adaptée que les méthodes décrites dans la littérature pour la réalisation d'un test de criblage à haut-débit. Elle consiste à suivre, au cours du temps, la DO(620 nm) qui rend compte de l'apparition des produits d'halogénéation du bleu de thymol par les systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup>. Nous avons exploré l'application de cette méthode pour l'identification d'inhibiteurs de la vBPO. Nous avons déterminé les types de molécules pouvant modifier la cinétique d'halogénéation du bleu de thymol et caractérisé les paramètres (V, R, A<sub>fin</sub>) de la courbe DO(620 nm) = f(t) afin d'effectuer leur discrimination et d'identifier, en particulier, les inhibiteurs.

A partir de la méthode de suivi au bleu de thymol, nous avons mis au point et validé un double test de criblage robuste ( $Z' > 0,8$ ) dans le but d'identifier des inhibiteurs des activités iodo- et bromo-péroxydases de la vBPO native d'*A. nodosum*. La réalisation du double test de criblage à partir d'une chimiothèque commerciale de 16480 composés a conduit à la sélection de 400 hits c'est-à-dire à la sélection de 400 molécules perturbant fortement l'halogénéation du bleu de thymol. Les tests secondaires ont permis de confirmer 80 % des hits et d'identifier les 20 molécules les plus actives. A ce stade, seulement 5 molécules se sont révélées susceptibles d'être des inhibiteurs de la vBPO, d'après l'analyse des courbes DO(620 nm) = f(t).

Une stratégie de validation a été ensuite développée pour caractériser le mode d'action de ces 20 molécules. Grâce à des études d'effet dose-réponse, à une expérience de perturbation de la iodation chimique du bleu de thymol et à des études CLHP-SM, nous avons montré que les hits ne sont pas des inhibiteurs de la vBPO : ils réagissent avec les espèces X<sup>+</sup> libérés dans le milieu et bloquent de manière artificielle l'action de l'enzyme. Un tel effet est analogue à celui exercé par le MMI sur le système TPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence d'un excès d'iodure. De manière remarquable, les arylhydrazides et les dérivés de la thiourée, connus pour être des inhibiteurs métaboliquement activés des peroxydases à hème, sont largement représentés parmi les hits de la vBPO. Cependant, nous avons vérifié que ces molécules n'inactivent pas la vBPO en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (et en l'absence d'halogénure) contrairement à ce qui a été observé pour les peroxydases à hème.

Puisque nous avons montré qu'ils réagissent avec  $I^+$ , certains hits seront néanmoins évalués *in vivo* pour conforter l'intervention des vHPO dans le mécanisme de captation des iodures chez *L. digitata* (cf. Chapitre 3).

Le diagramme ci-dessous résume les différentes étapes du test de criblage à haut-débit. Les caractéristiques et les paramètres du test de criblage sont résumés dans l'annexe 2.

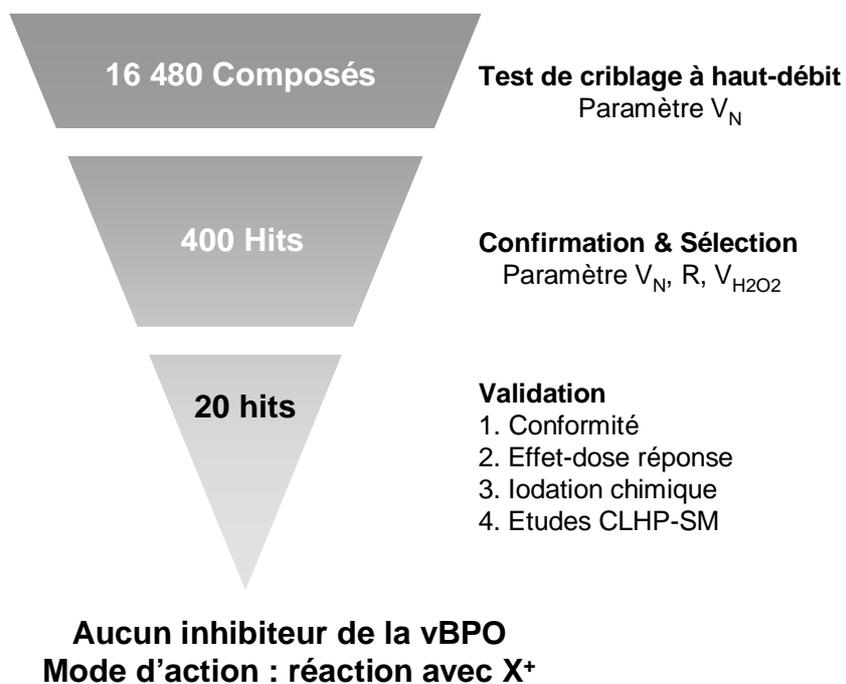


Fig. 48 : Etapes du test de criblage à haut-débit et résultats



## **Bibliographie**

1. Pereira DA, Williams JA: **Origin and evolution of high throughput screening.** *Br J Pharmacol* 2007, **152**:53-61.
2. Inglese J, Johnson RL, Simeonov A, Xia M, Zheng W, Austin CP, Auld DS: **High-throughput screening assays for the identification of chemical probes.** *Nat Chem Biol* 2007, **3**:466-479.
3. Colin C, Leblanc C, Michel G, Wagner E, Leize-Wagner E, Van Dorsselaer A, Potin P: **Vanadium-dependent iodoperoxidases in *Laminaria digitata*, a novel biochemical function diverging from brown algal bromoperoxidases.** *J Biol Inorg Chem* 2005, **10**:156-166.
4. Küpper FC, Schweigert N, Ar Gall E, Legendre J-M, Vilter H, Kloareg B: **Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide.** *Planta* 1998, **207**:163-171.
5. Colin C, Leblanc C, Wagner E, Delage L, Leize-Wagner E, Van Dorsselaer A, Kloareg B, Potin P: **The brown algal kelp *Laminaria digitata* features distinct bromoperoxidase and iodoperoxidase activities.** *J Biol Chem* 2003, **278**:23545-23552.
6. Geddes CD: **Optical halide sensing using fluorescence quenching: theory, simulations and applications—a review.** *Meas Sci Technol* 2001, **12**:R53-R88.
7. Hager LP, Morris DR, Brown FS, Eberwein H: **Chloroperoxidase. II. Utilization of halogen anions.** *J Biol Chem* 1966, **241**:1769-1777.
8. Vilter H: **Vanadium-dependent haloperoxidases.** In *Metal ions in biological systems*. Edited by Sigel H, Sigel A. New York, Basel, Hong Kong: Marcel Dekker; 1995: 325-362
9. De Boer E, Plat H, Tromp MGM, Wever R, Franssen MCR, van der Plas HC, Meijer EM, Schoemaker HE: **Vanadium containing bromoperoxidase: an example of an oxidoreductase with high operational stability in aqueous and organic media.** *Biotechnol Bioeng* 1987, **30**:607-610.
10. de Boer E, Wever R: **The reaction mechanism of the novel vanadium-bromoperoxidase. A steady-state kinetic analysis.** *J Biol Chem* 1988, **263**:12326-12332.
11. Wever R, Plat H, De Boer E: **Isolation procedure and some properties of the bromoperoxidase from the seaweed *Ascophyllum nodosum*.** *Biochim Biophys Acta* 1985, **830**:181-186.
12. Vilter H: **Peroxidases from Phaeophyceae. IV: Fractionation and location of peroxidase isoenzymes in *Ascophyllum nodosum*(L.) Le Jol.** *Botanica marina* 1983, **26**:451-455.
13. McHedlov-Petrosyan NO, Surov YN, Trofimov VA, Tsivadze AY: **Vibrational spectra of certain triphenylmethane dyes and their structure in solution.** *Theoretical and Experimental Chemistry* 1991, **26**:644-653.
14. Balderas-Hernandez P, Ramrez MT, Rojas-Hernandez A, Gutierrez A: **Determination of pK<sub>a</sub>'s for thymol blue in aqueous medium: evidence of dimer formation.** *Talanta* 1998, **46**:1439-1452.
15. Davis MM, Schuhmann PJ, Lovelace ME: **Acid-Base Reactions in Organic Solvents. Behavior of Some Halogenated Derivatives of Phenolsulfone-phthalein with Different Classes of Organic Bases in Benzene.** *Journal of Research of the National Bureau of Standards* 1948, **41**:27-40.
16. Balderas-Hernández P, Ramirez-Silva MT, Romero-Romo M, Palomar-Pardavé M, Roa-Morales G, Barrera-Diaz C, Rojas-Hernández A: **Experimental correlation**

- between the  $pK_a$  value of sulfonphthaleins with the nature of the substituents groups. *Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc* 2007;In press.
17. Tschirret-Guth RA, Butler A: **Evidence for organic substrate binding to vanadium bromoperoxidase.** *J Am Chem Soc* 1994, **116**:411-412.
  18. Inglese J, Shamu CE, Guy RK: **Reporting data from high-throughput screening of small-molecule libraries.** *Nat Chem Biol* 2007, **3**:438-441.
  19. Zhang JH, Chung TDY, Oldenburg KR: **A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays.** *J Biomol Screen* 1999, **4**:67.
  20. Reid JR, Wheeler SF: **Hyperthyroidism: diagnosis and treatment.** *Am Fam Physician* 2005, **72**:623-630.
  21. Engler H, Taurog A, Nakashima T: **Mechanism of inactivation of thyroid peroxidase by thioureylene drugs.** *Biochem Pharmacol* 1982, **31**:3801-3806.
  22. Doerge DR: **Mechanism-based inhibition of lactoperoxidase by thiocarbamide goitrogens. Identification of turnover and inactivation pathways.** *Biochemistry* 1988, **27**:3697-3700.
  23. Kettle AJ, Gedye CA, Winterbourn CC: **Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide.** *Biochem J* 1997, **321**:503-508.
  24. Aitken SM, Ouellet M, Percival MD, English AM: **Mechanism of horseradish peroxidase inactivation by benzhydrazide: a critical evaluation of arylhydrazides as peroxidase inhibitors.** *Biochem J* 2003, **375**:613-621.
  25. Vilter H: **Peroxidases from Phaeophyceae. III: Catalysis of Halogenation by Peroxidases from *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol.** *Botanica Marina* 1983, **XXVI**:429-435.
  26. Martinez JS, Carroll GL, Tschirret-Guth RA, Altenhoff G, Little RD, Butler A: **On the regioselectivity of vanadium bromoperoxidase.** *J Am Chem Soc* 2001, **123**:3289-3294.
  27. Carter-Franklin JN, Parrish JD, Tschirret-Guth RA, Little RD, Butler A: **Vanadium haloperoxidase-catalyzed bromination and cyclization of terpenes.** *J Am Chem Soc* 2003, **125**:3688-3689.
  28. Carter-Franklin JN, Butler A: **Vanadium bromoperoxidase-catalyzed biosynthesis of halogenated marine natural products.** *J Am Chem Soc* 2004, **126**:15060-15066.
  29. ten Brink HB, Tuynman A, Dekker HL, Hemrika W, Izumi Y, Oshiro T, Schoemaker HE, Wever R: **Enantioselective Sulfoxidation Catalyzed by Vanadium Haloperoxidases.** *Inorg Chem* 1998, **37**:6780-6784.
  30. Andersson M, Willetts A, Allenmark S: **Asymmetric Sulfoxidation Catalyzed by a Vanadium-Containing Bromoperoxidase.** *J Org Chem* 1997, **62**:8455-8458.
  31. Andersson MA, Allenmark SG: **Asymmetric sulfoxidation catalyzed by a vanadium bromoperoxidase: Substrate requirements of the catalyst.** *Tetrahedron* 1998, **54**:15293-15304.
  32. Wolman Y, Gallop PM, Patchornik A, Berger A: **Peptide Synthesis via Oxidative Activation of Acid Hydrazides.** *J Am Chem Soc* 1962, **84**:1889-1892.
  33. Kocevar M, Mihorko P, Polanc S: **An Efficient and Simple Thallium(III)-Induced Cleavage of the Hydrazino Moiety.** *J Org Chem* 1995, **60**:1466-1469.
  34. Taurog A, Dorris ML, Guzic FS, Jr.: **Metabolism of  $^{35}\text{S}$ - and  $^{14}\text{C}$ -labeled 1-methyl-2-mercaptoimidazole *in vitro* and *in vivo*.** *Endocrinology* 1989, **124**:30-39.
  35. Doerge DR, Decker CJ, Takazawa RS: **Chemical and enzymic oxidation of benzimidazoline-2-thiones: a dichotomy in the mechanism of peroxidase inhibition.** *Biochemistry* 1993, **32**:58-65.

36. Amir M, Kumar S: **Anti-inflammatory and Gastro Sparing Activity of Some New Indomethacin Derivatives.** *Arch Pharm Chem* 2005, **338**:24-31.
37. Ouellet M, Aitken SM, English AM, Percival MD: **Aromatic hydroxamic acids and hydrazides as inhibitors of the peroxidase activity of prostaglandin H2 synthase-2.** *Arch Biochem Biophys* 2004, **431**:107-118.
38. Liu RM, Margerum DW: **Kinetics and Mechanisms of the Oxidation of Hydrazine by Aqueous Iodine.** *Inorg Chem* 1998, **37**:2531-2537.
39. Feiters MC, Leblanc C, Kupper FC, Meyer-Klaucke W, Michel G, Potin P: **Bromine is an endogenous component of a vanadium bromoperoxidase.** *J Am Chem Soc* 2005, **127**:15340-15341.
40. Weyand M, Hecht H, Kiess M, Liaud M, Vilter H, Schomburg D: **X-ray structure determination of a vanadium-dependent haloperoxidase from *Ascophyllum nodosum* at 2.0 Å resolution.** *J Mol Biol* 1999, **293**:595-611.
41. Macedo-Ribeiro S, Hemrika W, Renirie R, Wever R, Messerschmidt A: **X-ray crystal structures of active site mutants of the vanadium-containing chloroperoxidase from the fungus *Curvularia inaequalis*.** *J Biol Inorg Chem* 1999, **4**:209-219.
42. Everett RR, Kanofsky JR, Butler A: **Mechanistic investigations of the novel non-heme vanadium bromoperoxidases. Evidence for singlet oxygen production.** *J Biol Chem* 1990, **265**:4908-4914.



## **Chapitre 3 : Etude du mécanisme de captation de l'iode**

### **1. Introduction**

Comme nous l'avons présenté dans le Chapitre 1 : Introduction bibliographique, la captation de l'iodure par l'algue brune *L. digitata* repose sur un mécanisme oxydatif. Les travaux de Shaw puis ceux de Küpper *et al.* ont suggéré que l'oxydation de l'iodure en une forme oxydée Iox par une vHPO apoplastique est nécessaire à sa captation. Il est en effet supposé que l'espèce Iox, étant plus lipophile, pourrait diffuser à travers les membranes teindre le compartiment intracellulaire où elle serait accumulée, après réduction [1, 2].

A la suite du test de criblage à haut-débit (Chapitre 2), nous n'avons pas identifié d'inhibiteurs spécifiques de la vBPO d'*A. nodosum*. Cependant, il a été mis en évidence que les hits sélectionnés bloquent indirectement l'activité iodopéroxydase par réaction avec l'espèce Iox générée par le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Γ. De plus, nous avons vérifié que ces molécules sont très peu réactives envers le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Dans ce contexte, nous nous proposons d'évaluer si les hits du test de criblage à haut-débit inhibent la captation de l'iodure par *L. digitata*. Si un tel résultat est obtenu, nous pourrions conforter l'intervention de Iox et donc indirectement, l'implication d'une vHPO dans le mécanisme de captation de l'iode chez *L. digitata*.

### **2. Principe d'évaluation**

#### **2.1. Description**

L'influence de chaque hit sur la captation de l'iodure par *L. digitata* a été étudiée par traçage avec le radionucléide <sup>125</sup>I.

Le mode opératoire consiste à incuber un échantillon de lame (0,5 cm de diamètre, 20 mg), dans de l'eau de mer artificielle en présence de la molécule à tester et du traceur <sup>125</sup>I et à suivre au cours du temps, l'appauvrissement en radioactivité du surnageant. La concentration en iodure dans l'eau de mer artificielle a été déterminée à  $1,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$  (soit environ 4 fois la concentration de l'eau de mer naturelle) par une méthode basée sur la réaction de Sandell-Kolthoff [3]. Il est généralement proposé qu'au sein des tissus de *L. digitata*, la concentration en iodure est d'environ 10 mM. Par conséquent, compte tenu du facteur de dilution isotopique

au sein du tissu d'algue par rapport à celui de l'eau de mer artificielle, on peut supposer qu'en début d'expérience, le suivi de l'appauvrissement en radioactivité du surnageant permet de suivre l'influx d'iodure et non le flux net des échanges.

L'expérience témoin correspond à l'expérience menée en l'absence d'inhibiteur. Pour chaque condition expérimentale, à partir de la courbe moyenne d'appauvrissement du surnageant, la vitesse de l'influx est déterminée par régression linéaire sur l'intervalle 10-100 min. Pour chaque molécule, le pourcentage d'inhibition sur la vitesse d'influx  $Inh(V)$  est déterminé de la manière suivante.

$$Inh(V) = 100 \times \frac{V^T - V}{V^T} \text{ avec } V : \text{Vitesse de l'influx en présence de molécule}$$

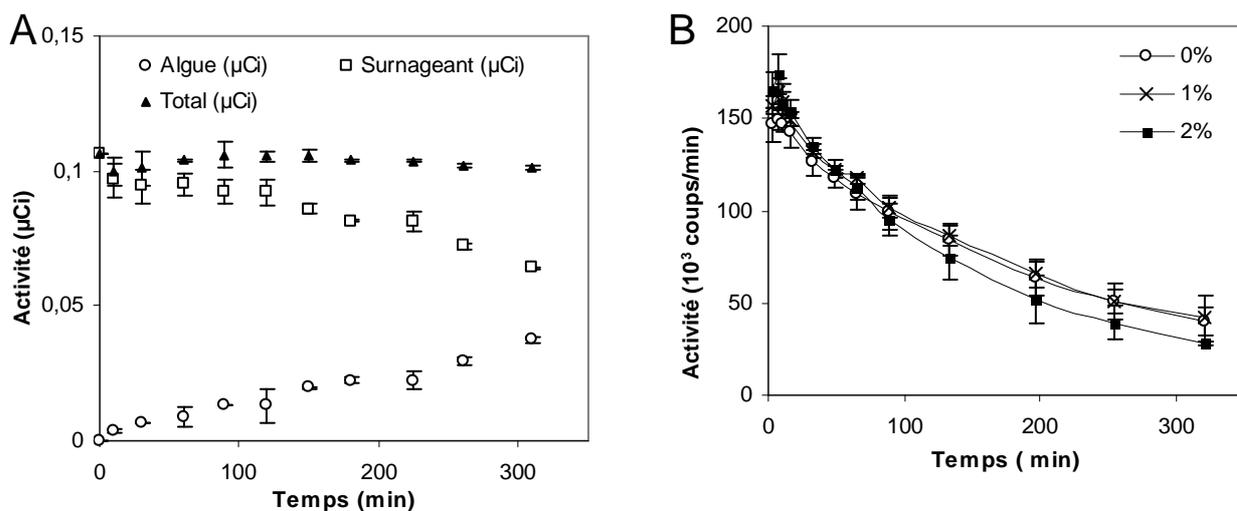
et  $V^T$  : Vitesse de l'influx pour l'expérience témoin

## 2.2. Vérifications préliminaires

Avant d'effectuer l'évaluation des molécules, nous avons voulu vérifier que l'appauvrissement du surnageant se traduit bien par une augmentation quantitative de la radioactivité au sein de l'algue. A cette fin, la variation du taux de radioactivité présente dans l'échantillon et dans le surnageant a été suivie au cours du temps. Comme nous ne disposons pas de compteur de radioactivité  $\gamma$ , la détermination de la radioactivité au sein du tissu d'algue a été effectuée par scintillation liquide. A chaque point de la cinétique correspond donc un échantillon particulier d'algue. Comme présenté sur la figure Fig. 49.A, l'appauvrissement du surnageant se traduit bien par une augmentation de la radioactivité dans l'algue. Le bilan des échanges est quasiment constant ce qui montre que le phénomène d'iodovolatilisation est négligeable sur la durée de l'expérience.

Par ailleurs, l'évaluation des hits et de leurs analogues nécessite l'introduction dans le milieu de DMSO. Nous avons donc vérifié qu'un faible pourcentage de ce solvant n'a pas d'incidence sur la cinétique d'influx d'iodure (Fig. 49.B).

Lors de ces études, nous avons observé que la vitesse moyenne d'influx et le taux final d'accumulation de radioactivité peuvent varier fortement selon la zone de prélèvement de l'échantillon de lame et l'âge du sporophyte prélevé. De telles observations ont été précédemment rapportées par Ar Gall *et al.* [4].



**Fig. 49 : Suivi de la captation des iodures par *L. digitata* par un traçage par  $^{125}\text{I}$**

A. Suivi de l'activité dans le surnageant et au sein de l'échantillon de lame de *L. digitata*.

Condition : 0,05  $\mu\text{Ci/ml}$ , 2 ml de surnageant, triplicat.

B. Effet du DMSO sur la cinétique de captation de  $\text{I}^-$  par *L. digitata*.

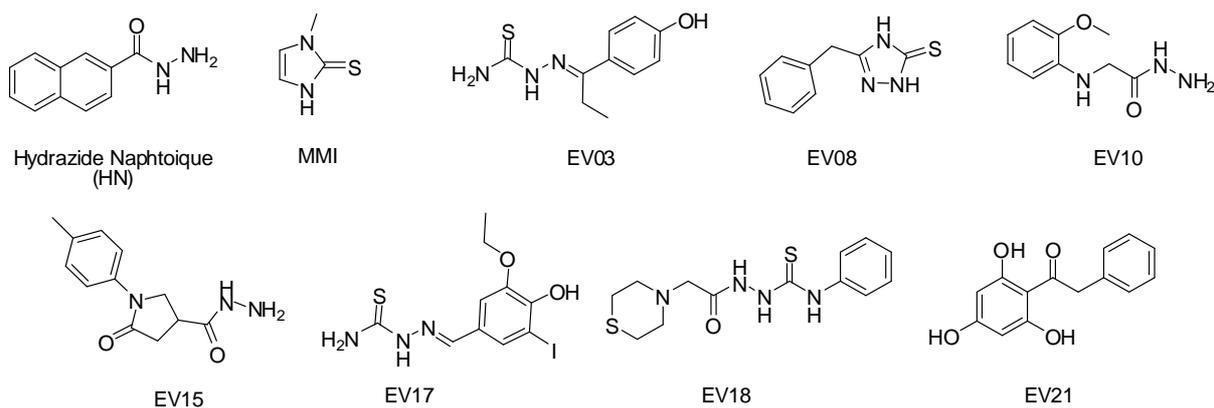
Condition : 6,5  $\mu\text{Ci/ml}$ , 2 ml de surnageant, triplicat

### 3. Evaluation des hits du test de criblage à haut-débit

#### 3.1. Molécules évaluées

Nous avons choisi d'évaluer les hits qui ont été entièrement caractérisés, lors des études de validation du test de criblage à haut-débit c'est-à-dire EV08, EV10, EV15 et EV18 (cf. Chapitre 2 paragraphe 3.6.). De plus, nous avons ajouté à cette liste : l'hydrazide naphtoïque (HN), deux hits analogues à EV18 (EV03 et EV17) et un dérivé du phloroglucinol (EV21). Il a été montré que le phloroglucinol pourrait être un substrat endogène ou plus exactement « un accepteur » des espèces  $\text{X}^+$  générées par les activités bromopéroxydases [5, 6] et qu'il est halogéné par le système  $\nu\text{BPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{I}^-$  [7].

Nous avons aussi sélectionné un inhibiteur de l'organification de l'iode au niveau de la thyroïde : le MMI. Il a été montré que cette molécule réagit avec les espèces  $\text{Iox}$  générées par le système  $\text{TPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{I}^-$ .

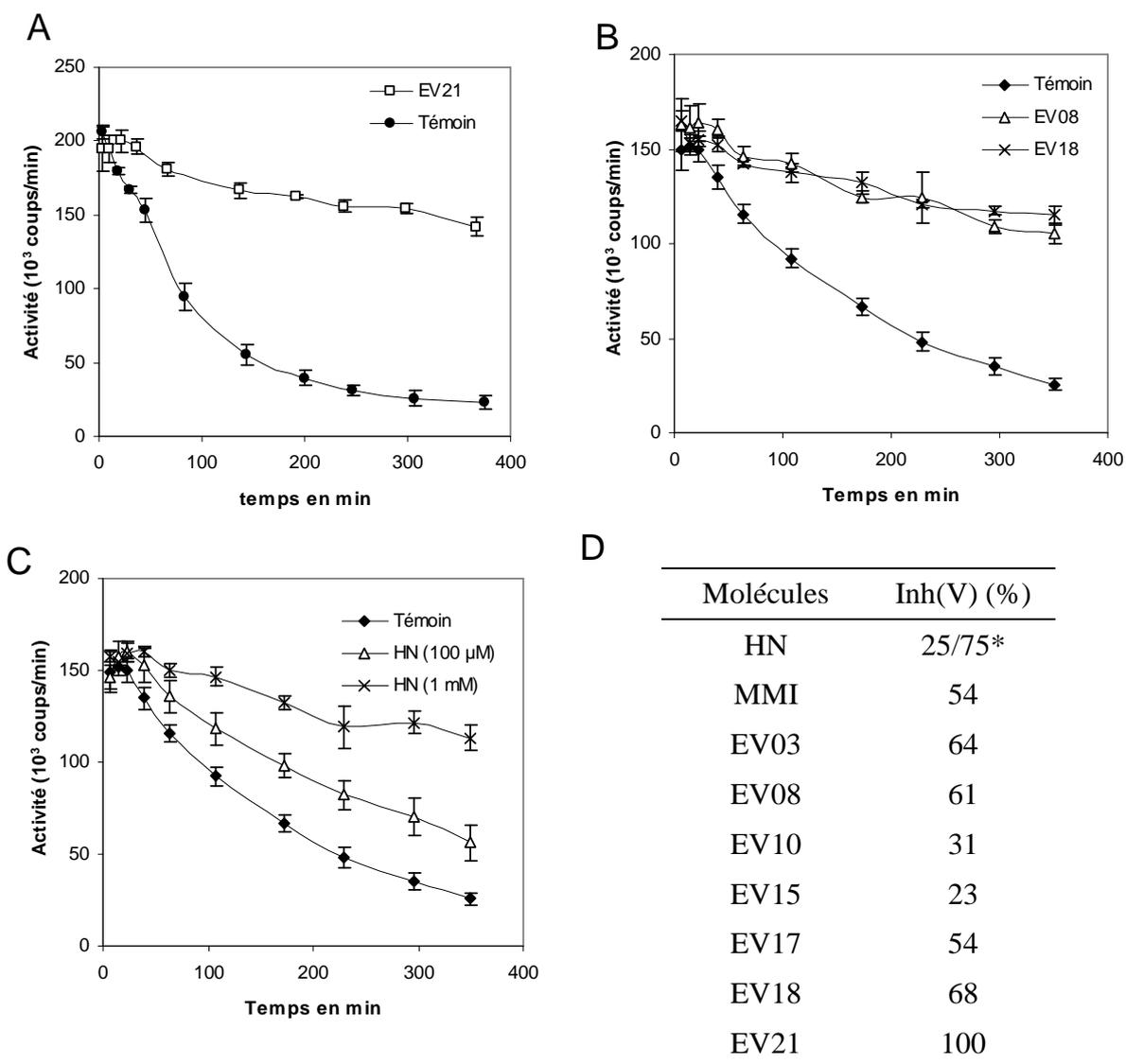


**Fig. 50 : Liste des molécules évaluées**

Ces molécules ont été évaluées à une concentration de 100  $\mu$ M et en présence de 0,7 % de DMSO, en triplicat et lors de deux séries de tests indépendantes.

### 3.2. Résultats

Les molécules testées exercent un effet inhibitoire sur la captation des iodures chez des échantillons de lame de *L. digitata*. La molécule la plus efficace est le dérivé phénolique EV21 qui bloque totalement l'influx en début d'expérience (Fig. 51.A, Fig. 51.D). Un tel effet d'un dérivé phénolique a déjà été observé par Shaw, lors de l'évaluation de la tyrosine dans des conditions expérimentales analogues [2]. La famille des thiocarbamides (EV03, EV08, EV17, EV18, MMI) diminue la vitesse d'influx d'environ 50 % à 70 % (Fig. 51.B, Fig. 51.D). Les dérivés hydrazides (EV10, EV15, hydrazide naphthoïque) sont les composés les moins actifs avec des inhibitions comprises entre 20 % et 30 % (Fig. 51.D). Cependant, l'hydrazide naphthoïque exerce une inhibition équivalente à celle des thiocarbamides lorsqu'elle est introduite à 1 mM (Fig. 51.C, Fig. 51.D).



**Fig. 51 : Suivi de l'influx d'iodure chez *L. digitata***

A. Effet de l'analogue du phloroglucinol EV21. Condition : 8 μCi/ml, triplicat.

B. Effet des analogues de la thiourée : Exemple EV18 et EV08. Conditions : 6,5 μCi/ml, triplicat.

C. Effet de l'hydrazide naphthoïque. Conditions : 6,5 μCi/ml, triplicat.

D. Pourcentage d'inhibition des hits sur la vitesse d'influx d'iodure chez *L. digitata*

Les composés sont testés à 100 μM. \* Inh(V) obtenue pour une concentration de HN de 1 mM

Il est intéressant de noter que les molécules comportant le même groupement fonctionnel exercent des niveaux d'inhibition équivalents et ceci indépendamment de leur structure chimique globale. Ce résultat suggère que l'inhibition exercée par ces molécules est due à une réaction chimique (avec  $I_{ox}$ ) plutôt qu'à une modulation de l'activité d'une protéine impliquée dans le mécanisme d'influx. Cependant, d'un point de vue purement chimique, on aurait pu s'attendre à ce que les molécules perturbant le plus fortement la iodation du bleu de thymol par les systèmes  $\nu BPO/H_2O_2/I^-$  et/ou  $I_3^-$  constituent les inhibiteurs les plus puissants. Cette hypothèse n'est pas vérifiée expérimentalement puisque, bien qu'elles soient les

molécules plus actives sur l'activité iodopéroxydase, EV10 et EV15 exercent les effets d'inhibition les plus faibles. Ce résultat pourrait s'expliquer par des problèmes de solubilité ou de diffusion de ces molécules au sein de l'apoplaste.

#### **4. Conclusion**

Les hits sélectionnés à la suite du test de criblage à haut-débit sur la vBPO d'*Ascophyllum nodosum* et pour lesquels il a été montré qu'ils sont très réactifs envers Iox inhibent la captation de l'iodure chez *L. digitata*. Ce résultat confirme que le mécanisme de captation de l'iodure met en jeu la formation d'une espèce oxydée Iox et conforte par conséquent, l'intervention d'une vHPO apoplastique.

## **Bibliographie**

1. Küpper FC, Schweigert N, Ar Gall E, Legendre J-M, Vilter H, Kloareg B: **Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide.** *Planta* 1998, **207**:163-171.
2. Shaw TI: **Mechanism of iodine accumulation by the brown seaweed *Laminaria digitata*: the uptake of iodine-131.** *Proc Roy Soc (London)* 1959, **B150**:356-371.
3. Sandell EB, Kolthoff IM: **Micro-determination of iodine by a catalytic method.** *Mikrochim Acta* 1937, **1**:9-25.
4. Ar Gall E, Küpper FC, Kloareg B: **A survey of iodine content in *Laminaria digitata*.** *Botanica Marina* 2004, **47**:30-37.
5. Butler A, Soedjak HS, Polne-Fuller M, Gibor A, Boyen C, Kloareg B: **Studies of vanadium-bromoperoxidase using surface and cortical protoplasts of *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta).** *J Phycol* 1990, **26**:589-592.
6. Berglin M, Delage L, Potin P, Vilter H, Elwing H: **Enzymatic cross-linking of a phenolic polymer extracted from the marine alga *Fucus serratus*.** *Biomacromolecules* 2004, **5**:2376-2383.
7. Vilter H: **Peroxidases from Phaeophyceae. III: Catalysis of Halogenation by Peroxidases from *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol.** *Botanica Marina* 1983, **XXVI**:429-435.



## **Chapitre 4 Distributions tissulaire et sub-cellulaire de l'iode chez *L. digitata***

### **1. Introduction**

Comme présenté dans le Chapitre 1 (cf. paragraphe 2.1.), la répartition tissulaire et la localisation subcellulaire de l'iode chez les laminaires demeurent, à l'heure actuelle, inconnues. Cependant, de telles données sont essentielles pour comprendre le rôle physiologique et élucider le mécanisme de captation de cet élément chez ces algues brunes.

Dans le cadre de cette thématique et de la collaboration avec P. Potin (UMR 7139 CNRCS-UPMC), nous avons eu recours à deux techniques d'imagerie chimique complémentaires : la microsonde nucléaire et la microsonde de spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS). La microsonde nucléaire a été utilisée pour déterminer la distribution quantitative de l'iode au niveau de coupes transversales de stipe et de lame de *L. digitata* alors que la microsonde SIMS nous a permis d'explorer la distribution subcellulaire de cet élément. Ces deux techniques étant multi-élémentaires, nous avons étudié en parallèle la distribution du second halogène d'intérêt chez les algues brunes : le brome.

Les expériences de microsonde nucléaire ont été réalisées en collaboration avec R. Ortega, G. Devès et A. Fraysse (Groupe d'Imagerie Chimique Cellulaire et Spéciation, CNAB, UMR 5084, CNRS/Bordeaux 1). Celles de microsonde SIMS ont été réalisées en collaboration avec J.-L. Guerquin-Kern et T.-D. Wu (Plateforme de Microscopie Ionique, Institut Curie/INSERM U759).

Ce travail fait d'un article<sup>11</sup> publié dans la revue *Journal of Biological Inorganic Chemistry*. Le présent chapitre reprend donc en grande partie l'enchaînement de cet article ainsi que les résultats qui y sont décrits. Cependant, certains points comme la présentation des techniques ou la discussion des résultats sont plus approfondis.

Dans ce qui suit, nous présenterons le principe des deux techniques d'imagerie chimique utilisées puis nous décrirons la préparation des échantillons qui constitue le point crucial de notre étude. Les distributions tissulaires et sub-cellulaires seront ensuite présentées et commentées. Nous discuterons, en particulier, de leurs implications physiologiques et

---

<sup>11</sup> Verhaeghe EF, Fraysse A, Guerquin-Kern JL, Wu TD, Devès G, Mioskowski C, Leblanc C, Ortega R, Ambroise Y, Potin P., *J Biol Inorg Chem*, *in press* (DOI : 10.1007/s00775-007-0319-6)

proposerons de nouveaux mécanismes de captation de l'iode chez *L. digitata* compatibles avec ces nouvelles données.

## **2. Présentations des techniques d'imagerie**

### **2.1. Microsonde nucléaire**

La microsonde nucléaire regroupe plusieurs techniques d'analyse multi-élémentaires. En biologie, elle est essentiellement utilisée pour déterminer les distributions quantitatives des éléments traces. Elle offre une résolution latérale de l'ordre du micromètre et une sensibilité comprise entre 1 et 10 µg/g. Les analyses peuvent être effectuées à l'échelle tissulaire ou sur cellules isolées. Cependant, à cause de sa résolution, la microsonde nucléaire ne permet pas d'accéder aux distributions sub-cellulaires fines et de distinguer l'ultra-structure des cellules. Les applications de la microsonde nucléaire sont multiples et concernent aussi bien la physiologie végétale que la pharmacologie [1, 2]. A titre illustratif, nous pouvons citer les travaux de Isaure *et al.* concernant la distribution tissulaire du césium chez *Arabidopsis thaliana* et son influence sur l'homéostasie du potassium [3]. De même, à partir de l'analyse de sections artérielles de lapins, Pinheiro *et al.* ont mis en évidence une teneur anormale en fer au niveau des lésions d'athérosclérose. Cette observation a permis de suggérer que le fer participe à la formation de ces lésions en générant des radicaux libres cytotoxiques [4]. Ortega *et al.* ont étudié, au niveau de cellules isolées, la distribution de l'anti-cancéreux 4'-iodo-4'-deoxy-doxorubicine : ils ont montré que cette molécule est principalement localisée au niveau du noyau et qu'elle entraîne une redistribution du fer cytosolique vers ce compartiment, certainement par un mécanisme de chélation [5].

Les analyses par microsonde nucléaire consistent à déplacer, point par point, à la surface de l'échantillon, un micro-faisceau d'ions légers ( $\text{He}^+$  ou  $\text{H}^+$ ) d'une énergie de l'ordre du MeV qui est généré par un accélérateur de particules. Ce faisceau de particules est en interaction électronique et nucléaire avec les atomes de la cible, ce qui induit l'émission de particules et de rayonnements dont l'énergie est caractéristique de la composition de l'échantillon [6]. En biologie, trois techniques de détection de ces particules et de ces rayonnements sont généralement utilisées conjointement [2, 6] :

*PIXE (Particle Induced X-ray Emission)* : Elle repose sur la détection des raies X émises à la suite de l'excitation des atomes de l'échantillon par le faisceau d'ions incidents. L'énergie de chaque raie (K ou L) détectée est spécifique d'un élément donné et son intensité

est proportionnelle à la teneur locale de cet élément, dans la zone analysée. L'analyse PIXE est utilisable pour les éléments de masse supérieure à celle du sodium ( $Z > 11$ ).

*RBS (Rutherford Backscattering Spectrometry)* : Elle consiste à mesurer l'énergie des ions incidents après rétro-diffusion sur les noyaux cibles (de l'échantillon). Cette énergie est caractéristique de la masse du noyau diffuseur. En analyse biologique, elle permet d'accéder à la teneur en éléments légers et majeurs de l'échantillon (carbone, azote, oxygène) et donc à sa masse locale.

*STIM (Scanning Transmission Ion Microscopy)* : elle consiste à mesurer à l'aide d'un détecteur de particules placé derrière l'échantillon, dans l'axe du faisceau, la perte d'énergie des particules incidentes après leur traversée de la cible. Cette technique donne accès à la densité locale de l'échantillon ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) et permet de fournir son image densimétrique qui révèle ses structures tissulaires ou cellulaires.

Les analyses RBS et STIM permettent de normaliser les signaux de PIXE. Ceci donne accès, pour chaque élément détecté ( $Z > 11$ ), à ses teneurs locales exprimées en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de poids sec et par la même, à sa distribution quantitative [2].

En raison du vide régnant dans la chambre d'analyse, les analyses par sonde nucléaire s'effectuent généralement sur des échantillons déshydratés. Les échantillons peuvent être préparés par un processus couplant cryofixation puis lyophilisation à basse température.

## **2.2. Microsonde SIMS**

La microsonde de spectrométrie de masse d'ions secondaires (microsonde SIMS) est une technique d'imagerie chimique de surface, hautement résolutive ( $< 100$  nm) et très sensible ( $< 0,1$   $\mu\text{g}/\text{g}$ ). Grâce à ces caractéristiques, elle constitue une technique très performante en biologie pour l'étude de la distribution sub-cellulaire de molécules d'intérêt telles que les éléments traces, les isotopes ou les drogues (pour revue : [7, 8]). Pour illustration, par cette technique, Guerquin-Kern *et al.* ont mis en évidence, par détection de l'ion secondaire  $^{127}\text{I}^-$ , que la N-(2-diéthylaminoéthyl)-4-iodobenzamide, un nouvel agent de diagnostic du mélanome, est accumulée essentiellement par les mélanosomes, ce qui démontre son affinité pour la mélanine [9].

La technique SIMS consiste à bombarder avec une microsonde d'ions primaires énergétique la surface de l'échantillon. Sous l'impact du faisceau, les liaisons chimiques sont brisées, provoquant une ionisation partielle de la matière (sur 1 à 2 nm de profondeur). Les

ions secondaires générés sont collectés par un système optique et analysés par un spectromètre de masse, en fonction de leur rapport  $m/z$ . Pour l'étude d'éléments électro-négatifs (c'est-à-dire s'ionisant préférentiellement sous forme d'anion), on utilise des sources primaires d'argon ( $\text{Ar}^+$ ), de césium ( $\text{Cs}^+$ ) ou de gallium ( $\text{Ga}^+$ ). Dans le cas d'éléments électro-positifs, il s'agit généralement d'une source d'ions primaires d'oxygène ( $\text{O}_2^+$ ). Dans le mode dit microsonde, la détection des ions secondaires est effectuée en synchronisme avec le balayage du faisceau d'ions primaires : le signal détecté à un instant donné correspond donc à une position du faisceau primaire focalisé sur la surface de l'échantillon (en un pixel donné) [7, 10].

Les dispositifs microsondes permettent de détecter simultanément plusieurs espèces ioniques à partir d'un même micro-volume. En plus des éléments d'étude, on détecte des ions d'intérêt biologique qui vont apporter des informations structurales sur l'échantillon analysé. Par exemple, avec une source primaire cationique, les images chimiques  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^+$  et  $^{31}\text{P}^+$  sont enregistrées : elles donnent la distribution des molécules riches en liaisons amidiques (essentiellement des protéines) et en polyphosphates (essentiellement l'ADN et l'ARN) respectivement, ce qui permet de localiser les structures cellulaires, les organites et les noyaux [9]. Très récemment, Quintana *et al.* ont montré qu'il est possible d'effectuer successivement sur la même coupe d'échantillon, les analyses par microscopie électronique par transmission et par microsonde SIMS, ce qui permet d'identifier précisément les structures sub-cellulaires et donc de déterminer sans ambiguïté les compartiments de localisation de l'élément étudié [11].

Pour être analysés par microsonde SIMS, en raison du vide poussé régnant dans la chambre d'ionisation, les échantillons de tissu doivent être déshydratés. De plus, ils sont généralement inclus dans une résine. L'inclusion permet de limiter l'effet de matrice c'est-à-dire la variation du taux d'ionisation de l'élément détecté, en fonction de son environnement chimique. Ceci permet d'accéder à sa distribution en quantité relative, au sein d'un échantillon. Contrairement à la microsonde nucléaire, la quantification absolue des éléments au sein d'échantillons biologiques complexes est très difficile à réaliser en microsonde SIMS à cause de cet effet de matrice et nécessite l'introduction d'un étalon interne [7].

### 2.3. Comparaison des deux techniques

Le tableau ci-dessous résume les caractéristiques des deux techniques d'imagerie chimique présentées précédemment [2]. La microsonde SIMS est une technique hautement résolutive et sensible ( $\approx 0,05 \mu\text{m}$  et  $0,1 \mu\text{g/g}$ , respectivement). Cependant, elle est difficilement utilisable pour accéder à la quantification absolue des éléments détectés. A l'inverse, la microsonde nucléaire est 100 fois moins résolutive et au moins 10000 fois moins sensible<sup>12</sup> mais elle permet d'accéder facilement à la quantification des éléments détectés car il n'existe pas d'effet de matrice sur les signaux mesurés. Par conséquent, dans le cadre de notre étude sur *L. digitata*, la microsonde SIMS a été utilisée pour la détermination de la localisation subcellulaire de l'iode alors que la microsonde nucléaire a été privilégiée pour la détermination de sa distribution tissulaire quantitative.

Paramètres	Microsonde SIMS	Microsonde Nucléaire
Limite de détection ( $\mu\text{g/g}$ )	0,1	1-10
Résolution spatiale ( $\mu\text{m}$ )	0,05-0,1	2-5
Détection	Multi-élémentaire (5 masses) Isotopique	Multi-élémentaire
Quantification	Relative	Absolute
Épaisseur analysée	1-2 nm	10-100 $\mu\text{m}$
Nature des échantillons	Déshydraté, infiltré	Déshydraté

**Tab. 13 : Récapitulatifs des caractéristiques des microsondes SIMS et nucléaire compte tenu des appareillages à notre disposition**

### 3. Préparation des échantillons

Les échantillons ont été prélevés au niveau de la lame et du stipe de sporophytes de *L. digitata*. Pour chaque technique d'analyse, à partir de ces échantillons, nous avons préparé des coupes transversales pour étudier la distribution de l'iode au niveau des trois tissus : méristoderme, cortex et medulla.

Au sein des tissus de *L. digitata*, l'iode est principalement séquestré sous une forme labile que est facilement extraite par des solutions aqueuses ou par l'éthanol (cf. Chapitre 1

<sup>12</sup> En raison de la limite de détection couplée à l'épaisseur d'analyse.

paragraphe 2.2.). Or, les méthodes classiques de préparation d'échantillon telles que celles par fixation chimique utilisent des bains de solutions aqueuses et d'éthanol, pour fixer et déshydrater les échantillons. Elles sont donc susceptibles de provoquer une redistribution et une perte massive de l'iode contenu dans les échantillons de *L. digitata*. Pour limiter ces phénomènes et pouvoir observer la distribution de l'iode total, nous avons eu recours à deux procédures originales alliant cryo-fixation et déshydratation par lyophilisation. Dans le cadre de la campagne d'expériences par microsonde SIMS, nous avons aussi utilisé une méthode par fixation chimique pour évaluer l'influence de la technique de fixation et de déshydratation sur la distribution et la teneur en iode ainsi que sur l'aspect histologique des échantillons.

### **3.1. Echantillons pour l'analyse par microsonde nucléaire**

Pour les analyses par microsonde nucléaire, des coupes transversales épaisses de stipe et de lame (0,3-0,5 mm) ont été cryofixées dans l'isopentane refroidi par de l'azote liquide puis lyophilisées à basse température (-35°C) dans un cryostat, pendant cinq jours (méthode adaptée de Ortega *et al.* [12] ). Cette méthode permet de conserver l'intégrité de l'édifice cellulaire, ce qui est suffisant pour une étude tissulaire.

### **3.2. Echantillons pour l'analyse par microsonde SIMS**

Dans le cadre de la campagne d'expérience par microsonde SIMS, deux séries d'échantillons ont été préparées.

La première série d'échantillons a été préparée par une procédure de cryofixation différente de celle utilisée pour les échantillons dédiés à l'analyse par microsonde nucléaire. En effet, la procédure précédemment décrite est inadaptée pour l'obtention d'échantillons analysables par microsonde SIMS car elle est susceptible d'induire la formation de cristaux de glace qui peuvent détruire ou déformer la structure fine des cellules [7]. Nous avons donc eu recours à une technique de cryofixation ultra-rapide dite slamming qui consiste à congeler les coupes de tissus (0,3 mm d'épaisseur) au contact d'un miroir de platine préalablement refroidi à l'azote liquide. Cette procédure permet d'obtenir une solidification de l'eau sous forme vitreuse sur une épaisseur de 15  $\mu\text{m}$  [7]. Les échantillons ont été ensuite lyophilisés sous vide ( $2 \cdot 10^{-3}$  mBar) en augmentant progressivement la température de -110°C à -10°C (sur une période de trois semaines) puis ils ont été infiltrés lentement par de la résine Spurr, à basse température (-10°C), pour limiter la redistribution des espèces diffusibles. Finalement, la

polymérisation de la résine a été effectuée à 65°C (méthode adaptée de Guerquin-Kern *et al.* [9]). A partir de ces inclusions, des coupes fines transversales (0,5 µm) ont été réalisées à l'ultramicrotome pour l'observation au microscope optique et pour les analyses par microsonde SIMS.

La seconde série d'échantillons a été préparée par fixation chimique. Le protocole a consisté à fixer chimiquement des coupes transversales épaisses (2 mm) dans de l'eau de mer contenant 3% en volume de glutaraldéhyde puis dans de l'eau de mer à 1,5% de formaldéhyde. La déshydratation a ensuite été effectuée par des rinçages avec des mélanges eau de mer/éthanol, la proportion d'éthanol étant augmentée à chaque étape de 25 %. Les échantillons ont ensuite été infiltrés par de la résine Spurr pendant quatre jours puis polymérisés. Des coupes fines (0,5 µm d'épaisseur) ont été réalisées à l'ultramicrotome pour l'observation au microscope optique et l'analyse par microsonde SIMS.

Pour pouvoir évaluer la perte d'iode induite par la fixation chimique, des échantillons cryofixés et des échantillons chimiquement fixés, non inclus dans la résine, ont été analysés par activation neutronique par « le Département d'Analyse Élémentaire » du CNRS à Vernaison.

### **3.3. Résultats de la préparation des échantillons**

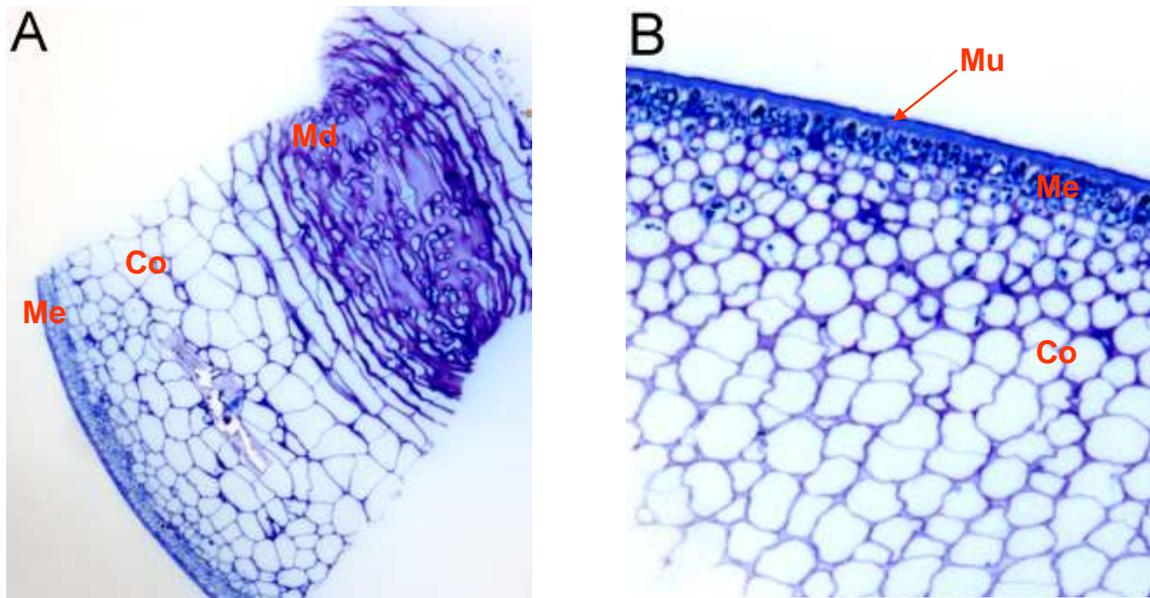
#### ***3.3.1 Echantillons pour l'analyse par microsonde nucléaire***

Par microscopie optique, malgré l'épaisseur des échantillons, nous avons observé que l'intégrité de l'édifice cellulaire des coupes cryofixées est conservée : les tissus sont homogènes et les contours cellulaires sont bien visibles (donnée non montrée).

#### ***3.3.2 Echantillons pour l'analyse par microsonde SIMS***

Les coupes transversales obtenues par fixation chimique présentent un aspect histologique satisfaisant quelle que soit la zone de prélèvement de l'échantillon (lame ou stipe) et l'âge du sporophyte. Nous présentons, à titre illustratif, les images obtenues, en microscopie optique pour des coupes transversales de stipe provenant d'un sporophyte jeune (Fig. 52.A) et d'un sporophyte plus âgé (Fig. 52.B). La coupe présentée dans la figure Fig. 52.A permet d'observer les différents tissus : méristoderme, cortex et medulla. La bande fortement colorée qui recouvre les cellules méristodermiques correspond au mucilage externe.

Les coupes représentées par ces deux images optiques ont été analysées par microsonde SIMS.



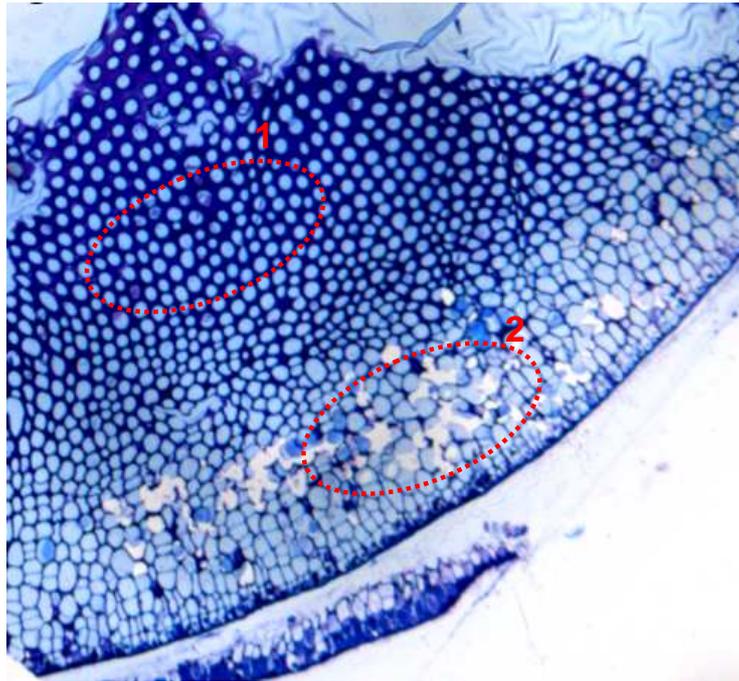
**Fig. 52 : Observations par microscopie optique de coupes transversales de stipe destinées à l'analyse par microsonde SIMS. Préparation par fixation chimique.**

A. Echantillon prélevé sur un sporophyte jeune.

B. Echantillon prélevé sur un sporophyte plus âgé.

Mu : Mucilage, Me : Méristoderme, Md : Medulla, Co : Cortex. Coloration : Bleu de toluidine

La préparation des échantillons par cryofixation s'est révélée problématique. Nous n'avons pas réussi à infiltrer les échantillons de tissus prélevés sur des sporophytes âgés (les échantillons «flottaient» au-dessus de la résine). L'inclusion des échantillons provenant de sporophytes jeunes (moins de 40 cm de long) a été plus satisfaisante. Cependant, les coupes obtenues présentent des défauts, en particulier pour les coupes de stipe. Comme illustré par la figure suivante (Fig. 53), le tissu interne ne présente pas une histologie satisfaisante. En particulier, on observe une atrophie des cellules du cortex interne accompagnée d'un élargissement des espaces intercellulaires. De plus, les coupes obtenues sont très friables ce qui ne permet pas leur analyse par microsonde SIMS. On observe un détachement du contenu intra-cellulaire résultant certainement du gonflement des alginates pariétaux, suite à la coupe à l'ultramicrotome ou à l'exposition de l'échantillon à l'humidité ambiante. Cependant, l'histologie du tissu périphérique est satisfaisante



**Fig. 53 : Exemple de coupe transversale de stipe obtenue par la procédure de cryofixation**

1 : Cellules corticales atrophiées. 2 : Cortex externe friable. En raison de sa friabilité, cette coupe n'a pas pu être analysée par microsonde SIMS. Coloration : Bleu de toluidine

Ces défauts d'infiltration de la résine sont spécifiques aux échantillons de *L. digitata* : ils ne sont pas observés sur des tissus mammifères ou systématiquement sur des tissus végétaux (Guerquin-Kern, communication personnelle) en utilisant cette même procédure de cryofixation. Cette observation laisse suggérer que la composition particulière de l'apoplaste des algues brunes, en particulier sa richesse en alginate, perturbe l'infiltration de la résine et pourrait être aussi à l'origine d'une déshydratation incomplète des échantillons.

A la suite de différentes tentatives de préparation d'échantillon, nous avons finalement réussi à obtenir des coupes cryofixées de lame non friables, possédant une histologie et une infiltration satisfaisante au niveau du tissu périphérique. Cependant, les zones correspondant à la medulla et au cortex interne ne présentent pas une structure satisfaisante (données non montrées). Les analyses par microsonde SIMS ont donc été réalisées au niveau du tissu périphérique de ces coupes cryofixées.

## 4. Résultats

### 4.1. Analyses par microsonde nucléaire

La campagne d'expérience a été réalisée sur la plateforme AIFIRA (Gradignan, France) sur une durée de quatre jours, en collaboration avec R. Ortega et G. Devès. Les échantillons de lame et de stipe ont été analysés au moyen d'un faisceau incident de protons offrant une résolution spatiale de 5  $\mu\text{m}$  ou de 2  $\mu\text{m}$ . La détection de la fluorescence X a été effectuée pour les éléments suivants : Cl, K, I, Ca, Fe, Zn, As et Br. Les analyses RBS ont concerné C, N et O. Le traitement des données brutes obtenues par les analyses RBS et PIXE a été effectué par A. Fraysse. A l'exception du calcium, les cartographies chimiques des éléments ( $Z > 11$ ), obtenues à partir des résultats brutes de PIXE, sont fournies ainsi que les teneurs locales en  $\text{mg.g}^{-1}$  de poids sec. L'erreur standard associée à chaque teneur est mentionnée : elle est déduite des caractéristiques de l'appareil et du bruit de fond. En ce qui concerne le calcium, les cartographies chimiques n'ont pas pu être obtenues à cause des interférences de sa raie d'émission  $K_{\beta}$  (4,01 KeV) avec la raie  $K_{\alpha}$  de l'iode (3,93 KeV) et de sa raie  $K_{\alpha}$  (3,69 KeV) avec la raie  $K_{\beta}$  du potassium (3,59 KeV). Il est à noter qu'en raison d'interférences spectrales, les cartographies chimiques et le traitement des données pour l'iode ont été effectués à partir de la contribution de sa raie  $L_{\beta}$  (4,22 KeV). Dans le cadre de nos échantillons, les limites de détection observées en analyse PIXE varient entre 2  $\mu\text{g.g}^{-1}$  et 165  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , selon l'élément étudié (Tab. 14). La limite de détection de l'iode est relativement élevée (165  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) en raison des interférences spectrales. Cependant, compte tenu des fortes teneurs en iode présentes chez *L. digitata*, cette limite de détection n'a pas eu d'incidence sur la quantification de l'élément.

	K	Fe	Zn	As	Br	I	Cl	Ca
Limite de détection ( $\mu\text{g/g}$ )	70	2	2	2	2	165	80	220

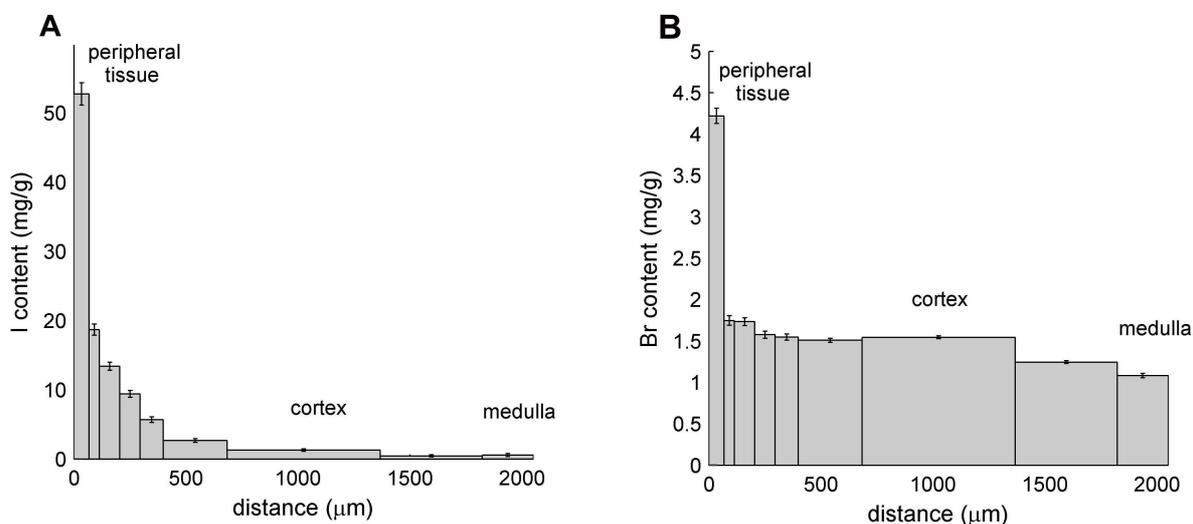
Tab. 14 : Limite de détection des éléments détectés par microsonde nucléaire chez *L. digitata*

#### 4.1.1 Analyse de sections transversales de stipe

L'analyse complète d'une coupe transversale cryofixée de stipe de *L. digitata* – depuis le méristoderme jusqu'au centre de la medulla – avec une résolution spatiale de 5  $\mu\text{m}$  révèle clairement une distribution hétérogène de l'iode. On observe un très fort gradient de répartition depuis le tissu périphérique jusqu'au centre de la médulla. La teneur en iode

diminue de  $53 \pm 1,6 \text{ mg.g}^{-1}$  dans le tissu périphérique à  $1,3 \pm 0,2 \text{ mg.g}^{-1}$  dans le cortex interne et à  $0,6 \pm 0,2 \text{ mg.g}^{-1}$  au sein de la medulla (Fig. 5.A). A partir de ces résultats, nous pouvons déduire que 80 % de l'iode contenu dans la section analysée est localisé dans le tissu périphérique, sur une zone qui ne représente que 20 % de la superficie totale de la section.

De manière remarquable, le brome, le second halogène d'intérêt chez les algues brunes, est aussi préférentiellement localisé au niveau du tissu périphérique avec une teneur locale moyenne de  $4,2 \pm 0,1 \text{ mg.g}^{-1}$ . Cependant, sa répartition est relativement homogène au sein du cortex et de la medulla avec des teneurs variant  $1,65 \pm 0,05 \text{ mg.g}^{-1}$  à  $1,02 \pm 0,02 \text{ mg.g}^{-1}$  (Fig. 5.B).



**Fig. 54 : Distribution quantitative à travers une coupe transversale cryofixée de stipe de *L. digitata***

A. De l'iode (mg/g de poids sec).

B. Du brome (mg/g de poids sec).

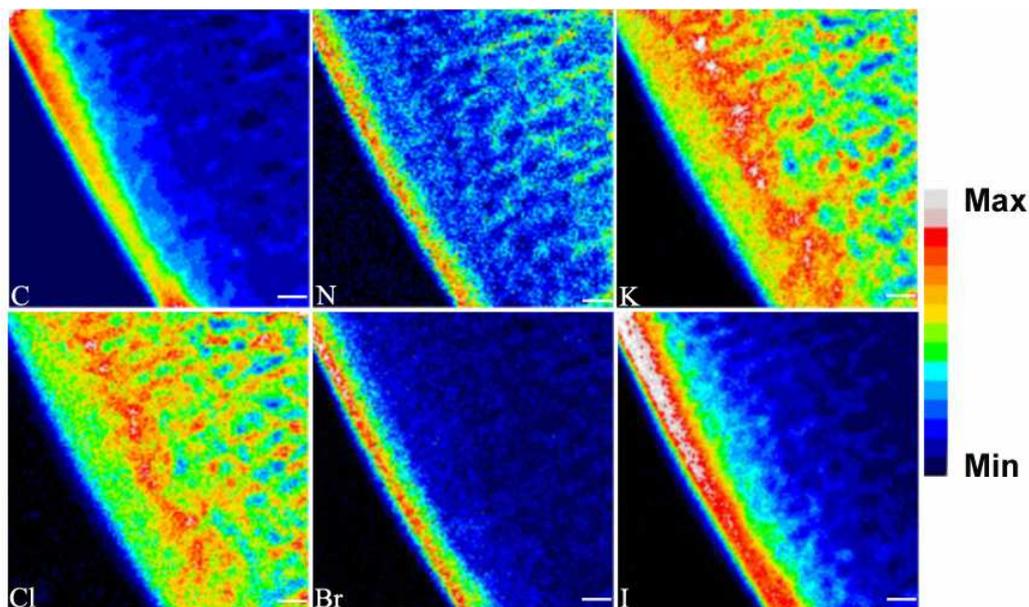
D'après les analyses PIXE et RBS effectuées sur une fenêtre de  $683 \times 2049 \mu\text{m}$  avec une résolution spatiale de  $5 \mu\text{m}$ . Traitement des données par les logiciels Gupix [13] et SIMNRA [14]

L'analyse du tissu périphérique avec une résolution latérale de  $2 \mu\text{m}$  (Fig. 55) met en évidence l'importance du gradient en iode au niveau des couches cellulaires les plus externes. Les teneurs locales en iode et en brome dans le méristoderme sont extrêmement élevées et atteignent  $191 \pm 5 \text{ mg.g}^{-1}$  et  $15,4 \pm 0,3 \text{ mg.g}^{-1}$ , respectivement.

Malgré ces différences notoires de concentration dans le tissu périphérique, les teneurs moyenne en iode et en brome sur l'ensemble de la coupe sont relativement proches :  $4,2 \pm 0,2 \text{ mg.g}^{-1}$  et  $1,50 \pm 0,02 \text{ mg.g}^{-1}$ , respectivement.

Les métaux traces, à savoir Fe, As et Zn, sont très majoritairement séquestrés au niveau du méristoderme. Les teneurs de ces éléments diminuent très fortement à travers le cortex (données non montrées). Ces résultats sont cohérents avec la capacité de l'apoplasme à complexer les cations divalents. Le chlore et le potassium présentent une distribution très différente de celle de l'iode puisque les teneurs les plus faibles sont détectées au sein du tissu périphérique ( $25 \pm 1,5 \text{ mg.g}^{-1}$  et  $52 \pm 2,2 \text{ mg.g}^{-1}$ , respectivement) alors que leur répartition est relativement homogène dans le cortex et la medulla (environ  $109 \pm 2,6 \text{ mg.g}^{-1}$  et  $120 \pm 2,6 \text{ mg.g}^{-1}$ , respectivement) (Fig. 55). A cause des très fortes teneurs en iode et des interférences spectrales qui en résultent, les teneurs en calcium dans le tissu périphérique n'ont pas pu être déterminées correctement. Il semblerait cependant que ces teneurs soient plus élevées dans le méristoderme et que la distribution du calcium soit relativement homogène dans les autres tissus ( $7,6 \pm 0,4$  à  $10,8 \pm 0,6 \text{ mg.g}^{-1}$ , respectivement).

Les cartographies RBS de C et de N suggèrent que le tissu périphérique est plus dense que le cortex et la medulla (Fig. 55).



**Fig. 55 : Cartographies RBS et PIXE du tissu périphérique pour une coupe transversale de stipe de *L. digitata***

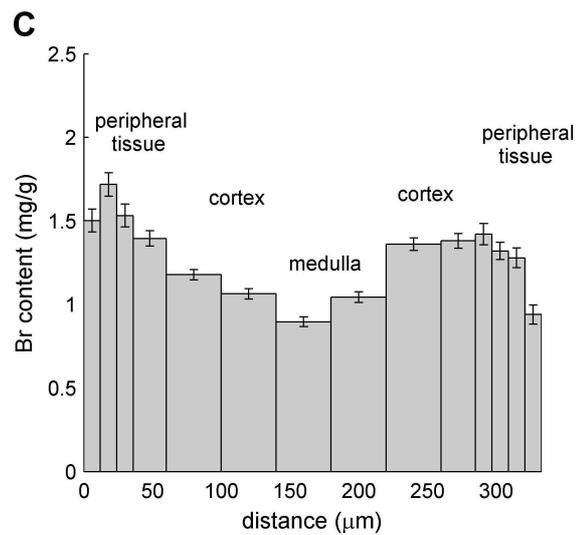
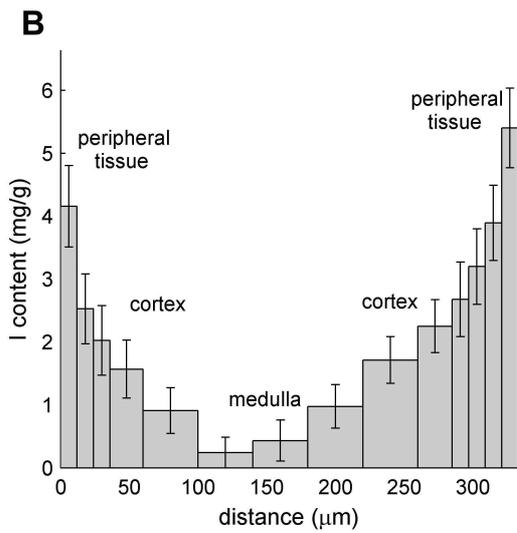
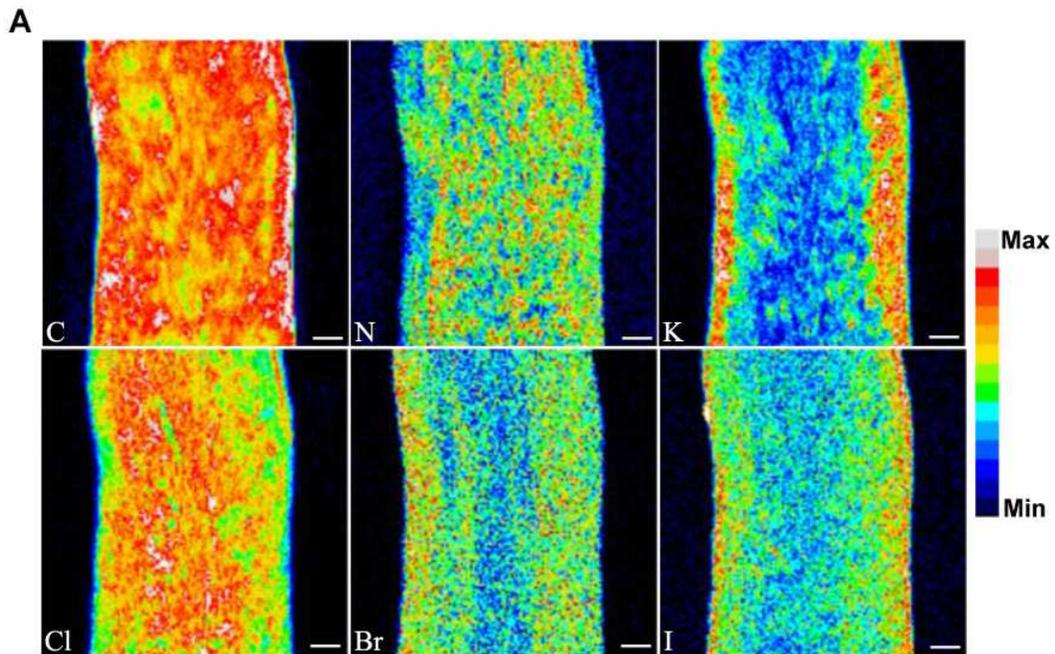
Obtenues à partir des données brutes RBS et PIXE, avant normalisation, par le logiciel SupaVisio [15]  
 Résolution :  $2 \mu\text{m}$ . Temps d'acquisition : 12 h. Fenêtre :  $235 \times 235 \mu\text{m}^2$ . Echelle :  $25 \mu\text{m}$ .  
 L'échelle de couleur Min-Max est linéaire et propre à chaque élément

#### 4.1.2 Analyse de sections transversales de lame

L'analyse par microsonde nucléaire d'une section transversale cryofixée de lame, avec une résolution spatiale de 2  $\mu\text{m}$ , révèle un gradient de concentration en iode depuis le méristoderme jusqu'au sein de la medulla (Fig. 56.A et Fig. 56.B). Ce gradient de concentration est beaucoup moins important que celui observé pour la coupe de stipe puisque les teneurs ne varient que de  $5,4 \pm 0,6 \text{ mg.g}^{-1}$  à la limite de détection ( $\approx 0,2 \text{ mg.g}^{-1}$ ). Cependant, la teneur moyenne en iode de la section de lame est de  $1,7 \pm 0,2 \text{ mg.g}^{-1}$ , ce qui est proche de celle déterminée pour la section de stipe ( $4,2 \pm 0,2 \text{ mg.g}^{-1}$ ).

La distribution du brome est quant à elle, relativement homogène. On note que les teneurs les plus élevées sont détectées dans le cortex externe et non au sein du méristoderme. Un léger gradient de concentration est observable depuis le cortex externe ( $1,72 \pm 0,07 \text{ mg.g}^{-1}$ ) jusqu'au centre de la medulla ( $0,9 \pm 0,03 \text{ mg.g}^{-1}$ ) (Fig. 56 et Fig. 56.C). La teneur moyenne en brome sur la section est de  $1,21 \pm 0,01 \text{ mg.g}^{-1}$ , ce qui est proche de celle déterminée pour la coupe de stipe ( $1,50 \pm 0,02 \text{ mg.g}^{-1}$ ).

Les distributions quantitatives des métaux trace (Zn, Fe, As) et du chlore sont identiques à celles observées pour la section de stipe. La teneur en chlore est de  $73 \pm 3 \text{ mg.g}^{-1}$  dans le méristoderme alors qu'elle varie de  $135 \pm 5 \text{ mg.g}^{-1}$  à  $177 \pm 5 \text{ mg.g}^{-1}$  dans le cortex et la medulla (Fig. 56.A). De manière remarquable, le profil de répartition du potassium est relativement hétérogène avec des teneurs plus élevées dans le cortex que dans les autres tissus (Fig. 56.A). Sa teneur moyenne au sein de la section de lame ( $42 \pm 1 \text{ mg.g}^{-1}$ ) est beaucoup plus faible que celle observée pour le stipe ( $117 \pm 2,5 \text{ mg.g}^{-1}$ ). A l'opposé, la distribution du calcium est homogène sur toute la section, avec des teneurs variant de  $12,1 \pm 0,6 \text{ mg.g}^{-1}$  à  $14,8 \pm 0,8 \text{ mg.g}^{-1}$ .



**Fig. 56 : Cartographies et distributions quantitatives au sein d'une coupe transversale cyofixée de lame de *L. digitata***

A. Cartographies RBS et PIXE obtenues à partir des données brutes RBS et PIXE, avant normalisation, par le logiciel SupaVisio [15]. Résolution : 2 µm. Temps d'acquisition : 12 h. Fenêtre : 500 x 500 µm<sup>2</sup>. Echelle : 50 µm. L'échelle de couleur Min-Max est linéaire et propre à chaque élément.

B. Distribution quantitative de l'iode (mg/g de poids sec)

C. Distribution quantitative du brome (mg/g de poids sec)

Obtenues par le traitement des données brutes PIXE et RBS par les logiciels Gupix [13] et SIMNRA [14]

## 4.2. Analyses par microsonde SIMS

Les expériences ont été effectuées en collaboration avec J.-L. Guerquin-Kern et T-D. Wu, sur la plateforme de microscopie ionique de l'institut Curie (Orsay, France), avec le dispositif Nanosims-50<sup>TM</sup> (CAMECA, France). Les échantillons cryofixés et chimiquement fixés (infiltrés) ont été analysés avec une résolution spatiale de 0,1  $\mu\text{m}$ , sur des fenêtres de 130 x 130  $\mu\text{m}^2$  à 8 x 8  $\mu\text{m}^2$ . Les anions secondaires collectés sont :  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ,  $^{32}\text{S}^-$ ,  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^-$ ,  $^{81}\text{Br}^-$  et  $^{127}\text{I}$ . Pour chaque anion, une image de 256 x 256 pixels est obtenue. L'intensité de chaque pixel correspond à la mesure directe du flux local des ions secondaires. Les cartographies obtenues révèlent donc, pour chaque espèce détectée, sa distribution en quantité relative. Comme mentionné dans le paragraphe 2.2, les cartographies de  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}^-$ ,  $^{32}\text{S}^-$  et  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^-$  permettent de visualiser les caractéristiques chimiques et morphologiques des cellules. Dans le cas particulier de *L. digitata*, le signal  $^{32}\text{S}^-$  se réfère aussi aux polysaccharides sulfatés pariétaux.

### 4.2.1 Dosage de l'iode par analyse par activation neutronique

D'après les analyses par activation neutronique, les teneurs en iode détectées dans des échantillons de lame et de stipe cryofixés sont 11,70  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  et 19,1  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectivement. Ces valeurs sont proches de celles données dans la littérature [16, 17] (cf. chapitre 1, Fig. 5 p.18). Dans les échantillons chimiquement fixés correspondants, on ne mesure plus que 0,50  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  et 1,14  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  d'iode, respectivement. Par conséquent, la procédure par fixation chimique entraîne la perte d'au moins 95 % de l'iode présent initialement dans les échantillons de *L. digitata*. Ce résultat met donc en évidence que l'iode chez *L. digitata* est essentiellement sous une forme labile, ce qui est cohérent avec les études de spéciation menées par d'autres groupes de recherche sur différentes laminaires [18-20].

Les analyses des sections obtenues par cryofixation fourniront la distribution de l'iode total au sein des échantillons de *L. digitata*. Les coupes chimiquement fixées pourraient, quant à elles, permettre d'étudier l'iode dit « insoluble » c'est-à-dire fixé de manière covalente principalement à des macromolécules (cf. paragraphe 5.1).

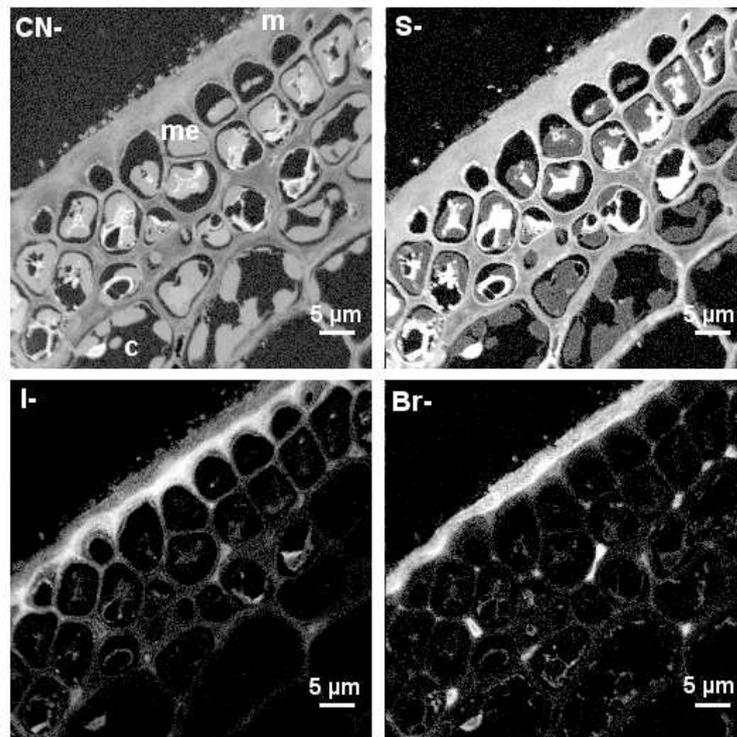
#### 4.2.2 *Analyse de coupes chimiquement fixées par microsonde SIMS*

Les analyses par microsonde SIMS ont été effectuées sur plusieurs coupes transversales chimiquement fixées provenant d'échantillons prélevés au niveau de la lame et du stipe de différents sporophytes. L'ensemble de ces analyses conduit à des résultats similaires.

Les cartographies des ions secondaires  $CN^-$  et  $S^-$  permettent de visualiser nettement les structures cellulaires en délimitant l'apoplaste des compartiments intra-cellulaires. Certains organites tels que les plastes sont nettement identifiables (Fig. 57).

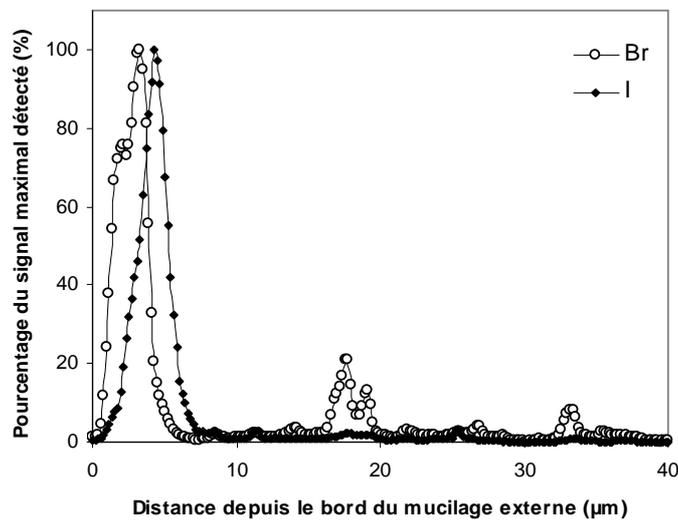
A l'échelle tissulaire, l'iode et le brome sont détectés principalement au niveau du tissu périphérique : leurs signaux sont très faibles voire indétectables dans les tissus internes (cortex et medulla) (données non montrées) alors que de fortes intensités sont détectées au niveau des couches cellulaires les plus externes (Fig. 57).

En ce qui concerne la distribution sub-cellulaire, I et Br sont très majoritairement localisés dans l'apoplaste (Fig. 57). Le mucilage externe, c'est-à-dire la couche de mucus protectrice qui recouvre les cellules épidermiques, est le principal compartiment de stockage. Ce fait est clairement illustré sur la figure ci-après (Fig. 58) qui présente l'évolution de l'intensité du signal de I et Br en fonction de la distance au bord externe du mucilage. De ces résultats, nous pouvons déduire que plus de 70 % du signal total de Br et de I sur la zone d'analyse sont détectés dans le mucilage.



**Fig. 57 : Cartographies des ions secondaires au niveau du tissu périphérique d'une section transversale de stipe chimiquement fixée provenant d'un sporophyte de *L. digitata* jeune**

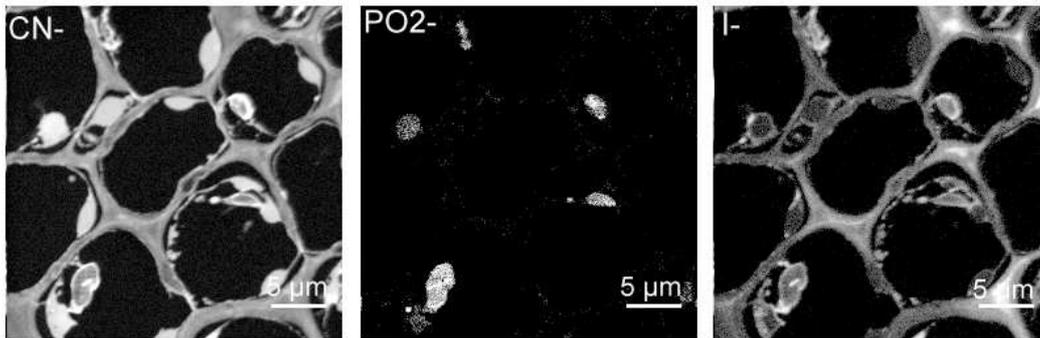
m : mucilage, me : méristoderme, c : cortex. Fenêtre : 50 x 50 µm<sup>2</sup>. Comptage : 5 ms/pixel  
 Chaque image est présentée dans une échelle logarithmique sur 256 niveaux qui lui est propre.  
 Traitement des données avec le logiciel libre ImageJ [21]. Microscopie optique : cf. Fig. 52.A



**Fig. 58 : Profil du signal moyen détecté pour Br<sup>-</sup> et I<sup>-</sup> en fonction de la distance au bord externe du mucilage.**

Profil obtenu à partir des cartographies présentées ci-avant (Fig. 57) par traitement avec Image J [21].

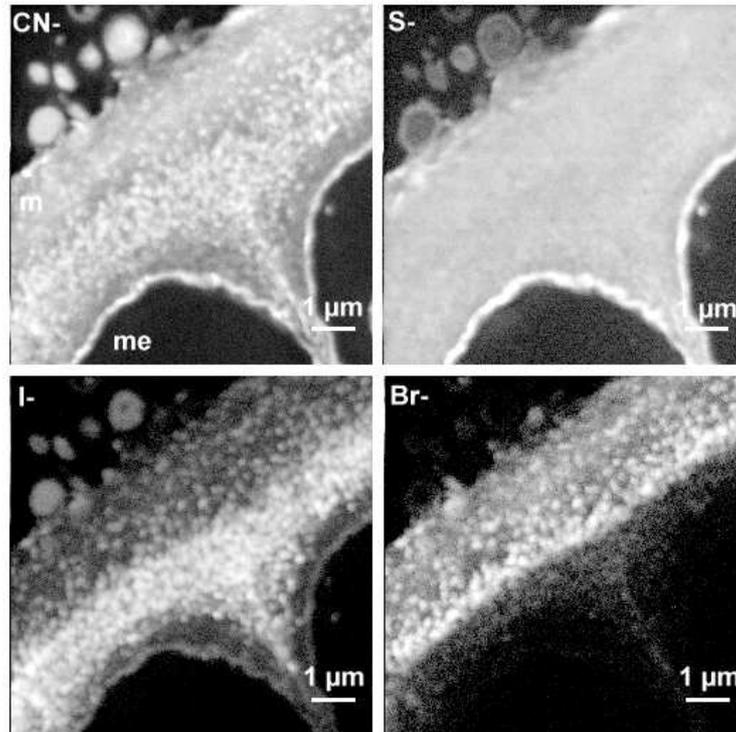
En dehors du mucilage, I et Br sont préférentiellement localisés dans les compartiments extra-cellulaires des premières couches cellulaires (Fig. 57). Les signaux de l'iode et du brome sont très faibles voire indétectables dans les compartiments intra-cellulaires (Fig. 57). Néanmoins, au sein de certaines coupes chimiquement-fixées obtenues à partir de sporophytes plus âgés, on peut observer épisodiquement la présence de structures intra-cellulaires présentant un signal en I,  $CN^-$  et  $S^-$  (non montré). Pour certaines structures, on observe aussi une réponse en  $PO_2^-$  (Fig. 59).



**Fig. 59 : Cartographies des ions secondaires au sein du cortex externe d'une section de stipe chimiquement fixée provenant d'un sporophyte de *L. digitata* âgé**

Fenêtre : 30 x 30  $\mu m^2$ . Comptage : 15 ms/pixel. Chaque image est présentée dans une échelle logarithmique particulière sur 256 niveaux qui lui est propre. Traitement des données avec le logiciel libre ImageJ [21]  
Microscopie optique : cf. Fig. 52.B.

L'analyse par microsonde SIMS du mucilage sur une fenêtre de 8  $\mu m$  met en évidence que le brome et l'iode ne sont pas strictement co-localisés : le brome est détecté dans la partie la plus externe du mucilage alors que l'iode est particulièrement détecté dans sa partie interne, juste au-dessus des cellules méristodermiques. Il peut être observé que le signal du soufre est relativement homogène alors que des spots intenses correspondant à  $CN^-$  sont corrélés à ceux de l'iode et du brome (Fig. 60).



**Fig. 60 : Cartographies des ions secondaires au niveau du mucilage externe d'une section transversale de stipe chimiquement fixée provenant d'un sporophyte de *L. digitata* jeune**

m : mucilage, me : cellule méristodermique. Fenêtre :  $8 \times 8 \mu\text{m}^2$ . Comptage : 30 ms/pixel  
 Chaque image est présentée dans une échelle logarithmique sur 256 niveaux qui lui est propre. Traitement des données avec le logiciel libre ImageJ [21]. Microscopie optique : cf. Fig. 52.A.

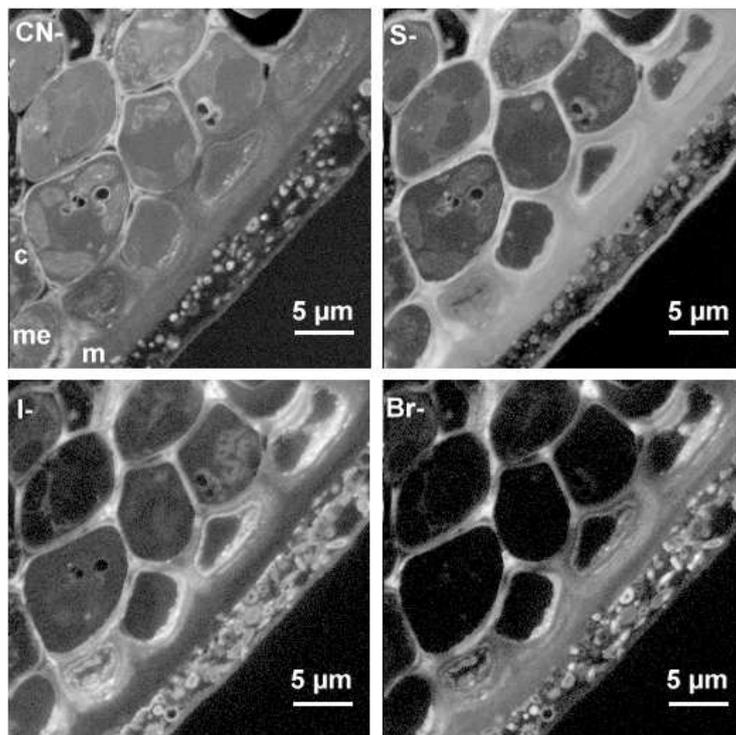
#### 4.2.3 Analyse de coupes cryofixées par microsonde SIMS

Comme décrit dans le paragraphe 3.3, les analyses par microsonde SIMS ont été effectuées sur des coupes cryofixées d'une lame provenant d'un sporophyte jeune. Les études ont été restreintes au tissu périphérique (méristoderme et premières couches cellulaires du cortex externe) car le cortex interne et la medulla n'ont pas été infiltrés par la résine de manière satisfaisante.

Comme précédemment, les images obtenues par la détection des ions secondaires  $\text{CN}^-$ ,  $\text{S}^-$  et  $\text{PO}_2^-$  permettent de révéler les structures cellulaires (Fig. 61). Cependant, la distinction du cytosol et des vacuoles n'est pas évidente. L'aspect histologique des coupes cryofixées est comparable à celui des coupes chimiquement fixées. Néanmoins, les coupes cryofixées présentent une structure supplémentaire recouvrant le mucilage. Cette structure, bien délimitée, présente une composition hétérogène : on y décèle de nombreuses particules présentant des signaux intenses en CN, S, Br et I (Fig. 61). Ces particules pourraient correspondre à des vésicules de sécrétions et la structure globale à une cuticule. D'après la

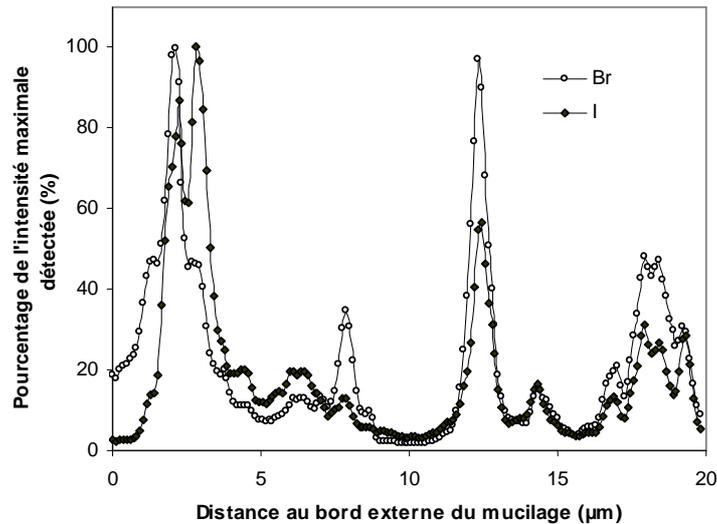
cartographie de  $\text{PO}_2^-$ , on peut aussi suggérer que cette structure corresponde à un film bactérien (Fig. 64).

Alors que l'on s'attendait à identifier des compartiments de stockage intra-cellulaire, les cartographies révèlent que I et Br sont majoritairement localisés dans l'apoplaste dans lequel est détecté environ 60 % du signal total de la section analysée (Fig. 61). Cependant, la distribution fine de ces éléments est clairement différente de celle observée pour les coupes chimiquement fixées. En effet, le mucilage externe n'est pas le compartiment principal de stockage de I et Br et des signaux de plus fortes intensités sont aussi détectés dans les parois cellulaires et les espaces intercellulaires du méristoderme et du cortex externe (Fig. 61, Fig. 62).



**Fig. 61 : Cartographies des ions secondaires au niveau du tissu périphérique d'une section de lame cryofixée provenant d'un sporophyte de *L. digitata* jeune**

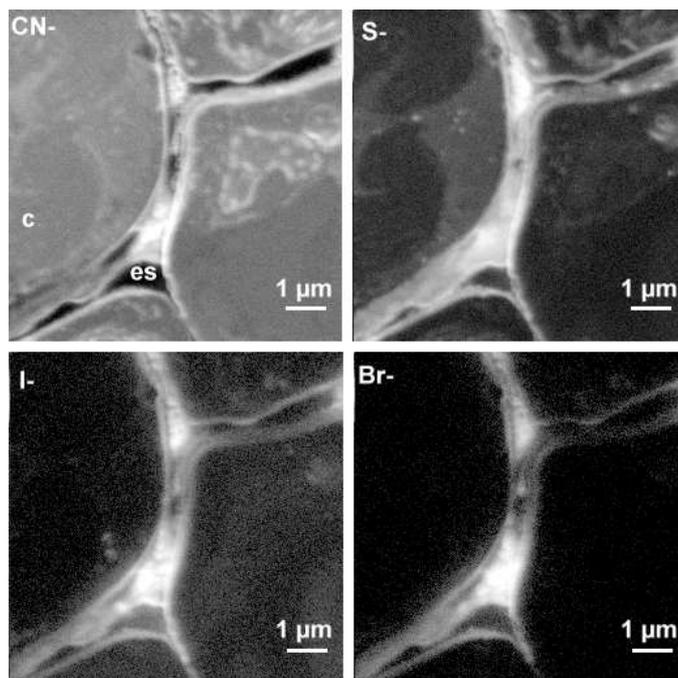
Tissu périphérique. m : mucilage, me : méristoderme, c : cortex. Fenêtre : 30 x 30  $\mu\text{m}^2$ . Comptage : 15 ms/pixel. Chaque image est présentée dans une échelle logarithmique sur 256 niveaux qui lui est propre. Traitement avec ImageJ [21]



**Fig. 62 : Profil du signal moyen détecté pour Br<sup>-</sup> et I<sup>-</sup> en fonction de la distance au bord externe du mucilage.**

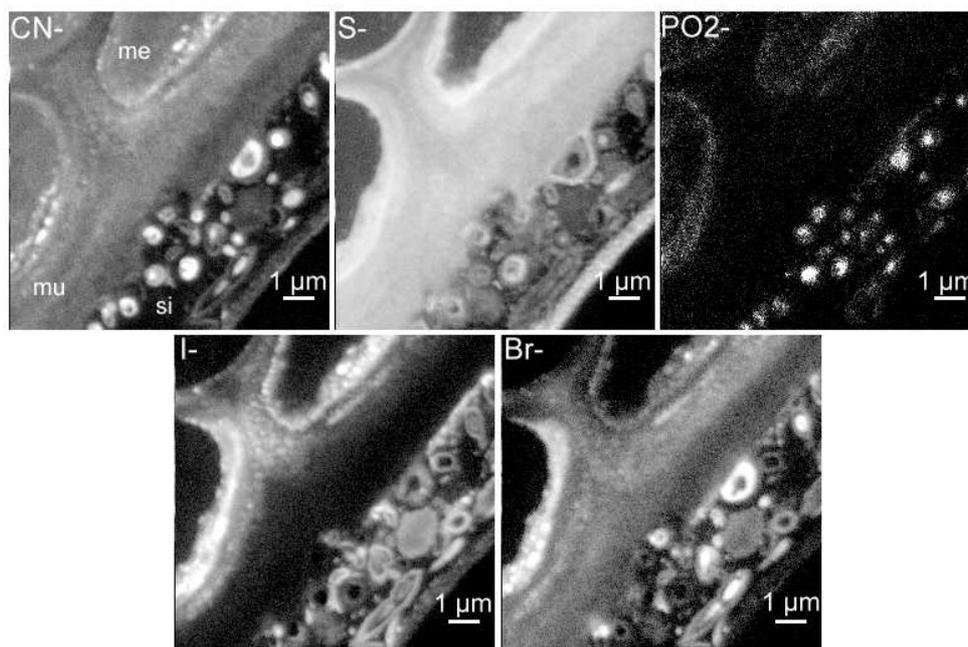
Profil obtenu à partir des cartographies de Fig. 61 par traitement par Image J. A comparer avec Fig. 58

L'analyse d'un espace inter-cellulaire avec une fenêtre de 8 µm montre une très nette corrélation des signaux de I, Br, CN et S (Fig. 63). En ce qui concerne les compartiments intracellulaires, de nettes différences sont observables entre les cellules méristodermiques (c'est-à-dire la couche cellulaire la plus externe) et les cellules corticales. L'analyse des cellules méristodermiques avec une fenêtre de 8 µm révèle l'existence de structures très nettement délimitées. Ces structures semblent être intra-cellulaires et se situent juste au-dessous du mucilage. Elles présentent d'intenses signaux en I et Br mais répondent aussi en S et CN (Fig. 64). De manière remarquable, de telles structures ne sont pas observées sur les coupes chimiquement fixées, ce qui suggère que leur contenu est labile. En ce qui concerne les cellules corticales, le signal en iode dans leur cytoplasme est très faible et diffus et ne permet pas d'identifier des structures de stockage intra-cellulaire telles que des vacuoles (Fig. 61, Fig. 63). Au niveau des sections analysées, le signal relatif au brome est d'intensité équivalente au bruit de fond au sein des cellules corticales.



**Fig. 63 : Cartographies des ions secondaires au niveau d'un espace inter-cellulaire du cortex externe d'une section de lame cryofixée provenant d'un sporophyte de *L. digitata* jeune**

es : espace extracellulaire c : cellule corticale. Fenêtre :  $8 \times 8 \mu\text{m}^2$  Comptage : 30 ms/pixel  
Chaque image est présentée dans une échelle logarithmique sur 256 niveaux qui lui est propre. Traitement avec ImageJ [21]



**Fig. 64 : Cartographies des ions secondaires au niveau du mucilage et des cellules méristodermiques d'une section de lame cryofixée provenant d'un sporophyte de *L. digitata* jeune**

m : mucilage, me : méristoderme, si : structure non identifiée qui pourrait correspondre à un film bactérien.  
Fenêtre :  $10 \mu\text{m}$  Comptage : 15 ms/pixel  
Chaque image est présentée dans une échelle logarithmique sur 256 niveaux qui lui est propre. Traitement des données par ImageJ [21]

## 5. Discussion

### 5.1. Spéciation et teneurs en iode

Les analyses par activation neutronique des coupes chimiquement fixées et cryofixées mettent en évidence que l'iode est très majoritairement stocké (> 95%) au sein des tissus de *L. digitata* sous une forme labile. Ce résultat est tout à fait cohérent avec les études de spéciation décrites dans la littérature.

Lors de la fixation chimique, les lavages aqueux entraînent un relargage massif des espèces labiles. Cependant, une faible part de ces espèces peut être re-localisée en particulier au niveau de structures denses. Il est en général impossible d'évaluer l'importance de ce phénomène. Cependant, dans le cas de notre étude, la distribution sub-cellulaire de l'iode et du brome que l'on observe au niveau du mucilage externe (cf. Fig. 60) n'est pas cohérente avec ce phénomène de relocalisation qui aurait amené une localisation identique pour ces deux éléments. Compte tenu de cette observation et de la cohérence de nos résultats avec les études de spéciation, nous proposons que l'analyse des coupes chimiquement fixées permet d'étudier très majoritairement la distribution des espèces de l'iode (et du brome) dites insolubles c'est-à-dire fort probablement fixées de manière covalente à des macromolécules.

Dans le cadre de notre étude, le principal inconvénient de la fixation chimique devient un précieux outil pour étudier une forme d'iode très minoritaire (moins de 5% de l'iode total) qui serait très difficile de détecter autrement.

Les analyses des coupes cryofixées nous renseignent, quant à elles, sur la distribution de la quasi-totalité de l'iode contenue dans les tissus de *L. digitata*. En effet, lors de la préparation des échantillons par cryofixation et lyophilisation, la seule perte potentielle d'iode correspond à celles des espèces volatiles. Ces espèces sont certainement très minoritaires au sein des tissus de l'algue. D'ailleurs, les teneurs moyennes en iode des coupes cryofixées obtenues par activation neutronique et par sonde nucléaire sont du même ordre de grandeur que celles décrites dans la littérature [16, 18].

Cependant, à titre anecdotique, il peut être observé que les teneurs en iode obtenues en sonde nucléaire ( $1,7 \pm 0,2 \text{ mg.g}^{-1}$  et  $4,2 \pm 0,2 \text{ mg.g}^{-1}$  pour la lame et le stipe, respectivement) sont nettement plus faibles que celles détectées par analyse par activation neutronique ( $11,70 \text{ mg.g}^{-1}$  et  $19,1 \text{ mg.g}^{-1}$  pour la lame et le stipe, respectivement). Ce résultat s'explique par la variation des teneurs en iode chez *L. digitata* en fonction de la période de récolte, de l'âge des

sporophytes et de la zone de prélèvement de l'échantillon [16]. Il est à noter que les teneurs moyennes en brome sont de l'ordre de 0,1-0,2 % du poids sec pour les coupes cryofixées, ce qui est cohérent avec une étude antérieure menée sur des échantillons de *L. japonica* [22].

## 5.2. Distributions tissulaire et sub-cellulaire de l'iode insoluble

Les analyses SIMS effectuées sur des coupes transversales chimiquement-fixées de stipe et de lame de *L. digitata* montrent clairement que les formes insolubles bromées et iodées sont très majoritairement localisées au niveau de l'apoplaste du tissu périphérique (Fig. 57). Le mucilage externe est indéniablement le compartiment principal de stockage de ces formes. Ces résultats confortent et affinent l'étude par microsonde X de Pedersen *et al.* [23].

Différentes études de localisation des activités peroxydases suggèrent que les haloperoxydases à vanadate sont majoritairement localisées dans le tissu périphérique (voire au niveau apoplastique) [24-26]. Puisqu'en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ces enzymes sont capables de générer des espèces diffusibles et halogénantes [27], nous pouvons donc proposer que les vHPOs sont responsables de la biosynthèse et de la localisation de ces espèces insolubles iodées et bromées. Compte tenu des données expérimentales, nous ne pouvons pas déterminer la nature de ces molécules. Cependant, puisque les analyses SIMS montrent une forte corrélation des signaux de I, Br et CN dans l'apoplaste, il pourrait s'agir de composés polyamidiques et en particulier de protéines (Fig. 60). Cette hypothèse est renforcée par plusieurs études de spéciation qui ont montré la présence de mono-iodotyrosine et de di-iodotyrosine dans des hydrolysats protéiques obtenus à partir d'échantillons de laminaires [19, 20, 28]. Plus récemment, des études par spectroscopie d'absorbance X et par spectrométrie de masse ont mis en évidence l'incorporation de Br sur des résidus aromatiques de la vBPO native d'*A. nodosum* [29]. Néanmoins, nous pouvons envisager la présence d'autres composés halogénés de type lipides ou polyphénols (qui ont été observés chez d'autres espèces) même si jusqu'à présent, de telles molécules (halogénées) n'ont pas été isolées chez *L. digitata*.

Le rôle physiologique de ces molécules halogénées insolubles est actuellement inconnu. Compte tenu de leur localisation, ils pourraient s'agir de précurseurs des composés volatils halogénés (CVHs) impliqués dans les mécanismes de défense de *L. digitata*. En ce qui concerne la vBPO d'*A. nodosum*, Feiters *et al.* ont proposé que l'halogénéation puisse être une modification post-traductionnelle qui contrôle son activité [29]. Cette hypothèse n'a pas été, pour l'heure, vérifiée. A titre de remarque, il peut être supposé que le métabolisme des espèces halogénées insolubles puisse varier avec l'âge du sporophyte et être lié à des

mécanismes d'adaptation au milieu. En effet, nous avons observé épisodiquement, au niveau du cortex d'échantillons provenant de sporophytes âgés, des structures intra-cellulaires répondant en  $\Gamma$  qui ne sont pas détectables sur des échantillons de sporophytes jeunes (Fig. 57, Fig. 59). Lors de leur étude, Pédersen *et al.* ont eux-même détectés de l'iode au niveau de vésicules intra-cellulaires supposées être des physodes<sup>13</sup>. Cependant, ils ont observé que ces entités n'étaient pas détectables sur tous les échantillons analysés et que leur présence pouvait être corrélée à la période de récolte et/ou à l'âge des sporophytes de laminaires [23].

### 5.3. Distributions tissulaire et sub-cellulaire de l'iode total

#### 5.3.1 Principaux résultats obtenus

Les analyses par sonde nucléaire effectuées sur les échantillons cryofixés de *L. digitata* mettent nettement en évidence que l'iode est principalement accumulé dans le tissu périphérique (méristoderme et couches cellulaires les plus externes du cortex) à hauteur de 80% et 50% pour les sections de stipe et de lame, respectivement (Fig. 54.A, Fig. 56.B). Ceci implique un très fort gradient de concentration, en particulier au niveau du stipe. Ces résultats confirment les anciennes études menées par Haug et Larsen sur des coupes transversales de stipe de *L. hyperborea* [30] et démontrent le rôle prépondérant du méristoderme dans l'accumulation de l'iode chez *L. digitata*. La distribution quantitative du brome est quelque peu différente de celle de l'iode, en particulier pour les échantillons de lame (Fig. 54.B, Fig. 56.C). Néanmoins, le compartiment de stockage principal du brome est aussi le tissu périphérique. A l'exception du brome, il est difficile de corréler la distribution de l'iode avec celle d'un autre élément. Cependant, il peut être noté qu'au niveau du stipe, le méristoderme présente une composition différente de celles des autres tissus : il est plus dense, moins riche en potassium et en chlore et susceptible de présenter des teneurs plus élevées en calcium que les autres tissus (Fig. 55). Ces éléments pourraient être liés à sa très forte capacité à séquestrer l'iode.

Les analyses du tissu périphérique des coupes cryo-fixées par microsonde SIMS mettent en évidence que le compartiment de stockage de l'iode et du brome est l'apoplaste, principalement au niveau des espaces intercellulaires et des parois des cellules corticales (Fig. 57). Cette distribution subcellulaire est tout à fait inattendue puisque les mécanismes de

---

<sup>13</sup> Physode : vésicule riche en polyphénol

captation de l'iode proposés par Shaw et Kupper *et al.* [17, 31] supposent des compartiments intra-cellulaires de stockage que nous pensions être des vacuoles et/ou des physodes.

Cette localisation apoplastique permet d'expliquer certains résultats antérieurs. Par exemple, Küpper *et al.* ont observé que les protoplastes obtenus à partir d'échantillons de *L. saccharina* ne contiennent plus que 20 % à 50 % de la teneur en iode initialement présente dans les tissus [17]. Il a été proposé que ce phénomène serait dû au stress oxydant induit par la dégradation enzymatique des parois cellulaires. Compte tenu de nos résultats, nous pouvons proposer que cette perte découlerait de la destruction du compartiment de stockage principal de l'iode c'est-à-dire de l'apoplaste.

Cependant, des structures intra-cellulaires présentant un fort signal en I et en Br sont observables au niveau du méristoderme. Ces structures ne correspondent pas à des vacuoles à cause de leur contenu riche en S et CN. Leur positionnement (juste au-dessous du mucilage) et leur contenu potentiellement labile nous font suggérer qu'il s'agit de vésicules de sécrétion (Fig. 64). Ces structures doivent certainement jouer un rôle clé dans les mécanismes de captation et/ou d'efflux d'iode. Elles pourraient être à l'origine de certaines réponses physiologiques très ponctuelles (telle que les efflux d'iodure et l'émission de composés volatils iodés suite à l'élicitation par les oligoguluronates, par exemple). L'identification des structures intra-cellulaires méristodermiques constitue donc un enjeu fondamental, même si elles ne sont pas le principal compartiment de stockage de l'iode

En conclusion, les analyses par microsonde nucléaire et par microsonde SIMS démontrent que l'iode et le brome sont principalement stockés par le tissu périphérique, au sein du compartiment apoplastique.

### ***5.3.2 Corrélation entre la distribution et les rôles physiologiques de l'iode***

La localisation commune de l'iode et du brome au niveau de l'apoplaste suggère que ces éléments jouent un rôle physiologique similaire chez *L. digitata*. Ils pourraient de plus, être en compétition dans le mécanisme de captation. Cependant, les quantifications obtenues par microsonde nucléaire mettent en évidence que le rapport molaire  $n(I)/n(Br)$  dans le méristoderme est 30000 fois supérieur à celui dans l'eau de mer, ce qui illustre la très grande sélectivité de *L. digitata* pour l'iodure.

Comme présenté dans le Chapitre 1, il est fortement suggéré que, chez *Laminaria digitata*, le métabolisme de l'iode soit impliqué dans des mécanismes de défense. Les

distributions tissulaire et subcellulaire que nous observons sont cohérentes avec cette hypothèse. En effet, l'iode est accumulé préférentiellement dans le tissu périphérique qui est continûment exposé aux stress biotiques (épiphyte, bactérie) et abiotiques (exposition aux UVs, dessiccation). De plus, sa localisation au sein de l'apoplaste et dans des vésicules méristodermiques laissent imaginer une re-mobilisation rapide permettant la synthèse et la libération de composés biocides tels que les composés volatils iodés (CVIs) et l'iode moléculaire (I<sub>2</sub>).

De manière remarquable, on note aussi une certaine corrélation entre la distribution tissulaire de l'iode et le siège du burst oxydant observé lors de l'exposition aux oligoguluronates d'échantillon de lame de *L. digitata* [32]. Ceci renforce l'hypothèse proposée par plusieurs auteurs selon laquelle l'iode serait impliqué dans un mécanisme de contrôle du stress oxydant et que les CVIs résulteraient, en partie, du piégeage des espèces activées de l'oxygène [33, 34].

L'ensemble de ces observations nous amène à conclure que la localisation préférentielle de l'iode au niveau de l'apoplaste du tissu périphérique de *L. digitata* est cohérente avec ses rôles physiologiques proposés dans la littérature.

### **5.3.3 Propositions de nouveaux mécanismes d'accumulation de l'iode ?**

Dans le Chapitre 1, nous avons présenté le mécanisme de captation et d'accumulation des iodures chez *L. digitata*, actuellement admis. Pour rappel, ce mécanisme propose que l'iodure serait oxydé par une vHPO apoplastique en une espèce Iox (I<sub>2</sub>, IOH voire I<sub>3</sub><sup>-</sup>) qui, étant plus lipophile, pourrait traverser les membranes pour être accumulée dans le compartiment intra-cellulaire après réduction. Un tel mécanisme n'est donc pas cohérent avec la localisation apoplastique de l'iode que nous avons observée.

Compte tenu des données de la littérature et de nos résultats d'imagerie, nous pouvons proposer des mécanismes de captation de l'iodure compatibles avec cette localisation sub-cellulaire. Si l'on reprend les données de la littérature, nous pouvons considérer que certains points ont été démontrés ou sont très fortement suggérés :

- La forme d'iode captée à partir de l'eau de mer est très probablement l'iodure d'après les travaux de Kelly et Baily sur *A. nodosum* [35]. (Ce résultat a été confirmé chez *L. digitata* (Fievet *et al.*, résultat non publié)).

- Les différentes études de spéciation ont démontré que l'iode est principalement stocké sous une forme inorganique labile chez les espèces appartenant au genre *Laminaria* [18-20]. Cependant, la forme exacte séquestrée n'a pas été démontrée bien que la plupart des auteurs s'accordent à dire qu'il s'agirait de l'iodure
- L'intervention d'un mécanisme oxydatif dans le mécanisme de captation de l'iode chez *L. digitata* a été confortée par plusieurs études [17, 31]. Comme présenté dans le chapitre 3, nous avons observé que des molécules réagissant avec Iox bloquent l'influx d'iodure chez *L. digitata*.

De plus, nos données d'imagerie mettent en évidence clairement une corrélation entre les signaux I, CN et S (Fig. 61.B). Or, CN et S font référence à des macromolécules telles que des protéines et/ou des polysaccharides sulfatés. Puisque l'iode est très majoritairement sous une forme inorganique labile, nous pouvons suggérer que son accumulation au sein de l'apoplaste repose sur la complexation de l'espèce inorganique par un édifice macromoléculaire composé de protéines et/ou de polysaccharides.

A partir de ces observations, du mécanisme précédemment défini par Shaw et Kupper *et al.* et en admettant que la forme stockée soit l'iodure, nous pouvons proposer le mécanisme suivant (mécanisme 1, Fig. 65) : L'iodure serait sélectivement oxydé par une vIPO apoplastique en une entité Iox qui diffuserait dans l'apoplaste. Cette espèce serait ensuite réduite et complexée au sein d'un édifice macromoléculaire. Durant ce mécanisme, une faible proportion de Iox est susceptible de réagir avec les substrats organiques environnants, en particulier, avec les résidus aromatiques des protéines. L'intervention d'une vHPO et plus précisément d'une vIPO, permet d'expliquer la sélectivité pour l'iodure alors que les concentrations en chlorure et en bromure, dans l'eau de mer, sont bien plus élevées.

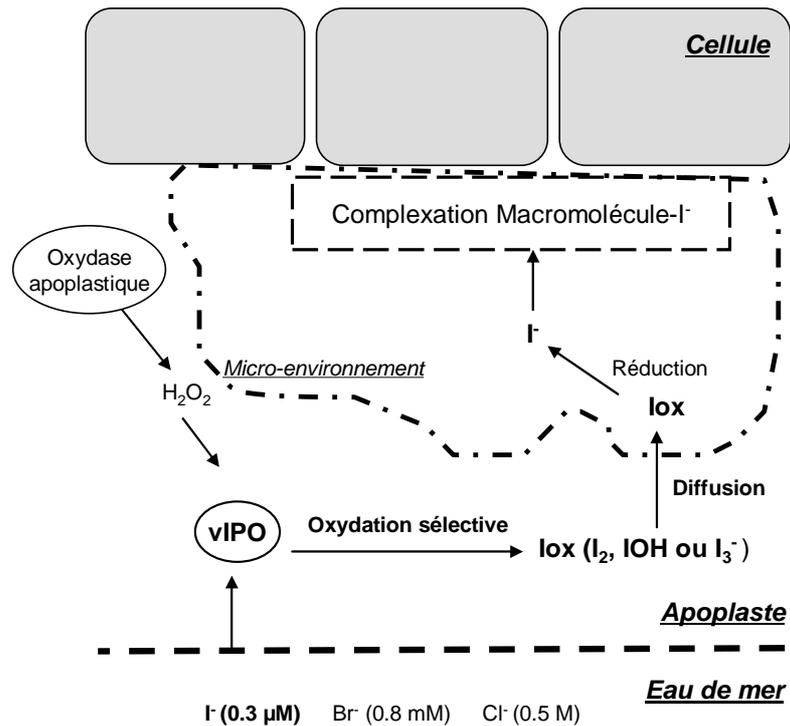


Fig. 65 : Mécanisme 1, affinement du mécanisme proposé par Küpper *et al.* et Shaw

Cependant un tel mécanisme est problématique d'un point de vue physiologique. En effet, est-il possible d'avoir dans le même compartiment une réaction de réduction et d'oxydation ? Peut-on envisager que l'apoplaste puisse être organisé en micro-environnements possédant des potentiels redox et des pH spécifiques ? Ce mécanisme n'est-il pas trop coûteux d'un point de vue énergétique ?

Compte tenu de ces interrogations et des doutes concernant la réelle spéciation de l'iode dans les tissus de *L. digitata*, nous pouvons proposer un second mécanisme (mécanisme 2, Fig. 66) basé sur l'oxydation sélective des iodures par une vHPO apoplastique suivie de la séquestration de l'espèce Iox générée au sein d'un complexe macromoléculaire. Un tel mécanisme apparaît plus simple et moins coûteux énergétiquement. Il est conforté par le fait que la complexation de polyiodure ( $I_3^-$  et autres formes  $I_5^-...$ ) par des entités polysaccharidiques ou polyamidiques telles que l'amidon ou le polyvinyl-pyrrolidones sont décrites dans la littérature [36, 37]. En particulier, grâce à leur stabilité, les complexes polyiodures – polyvinyl-pyrrolidone sont utilisés en formulation, à la place de la traditionnelle solution de lugol, pour permettre une libération contrôlée des espèces oxydées de l'iode.

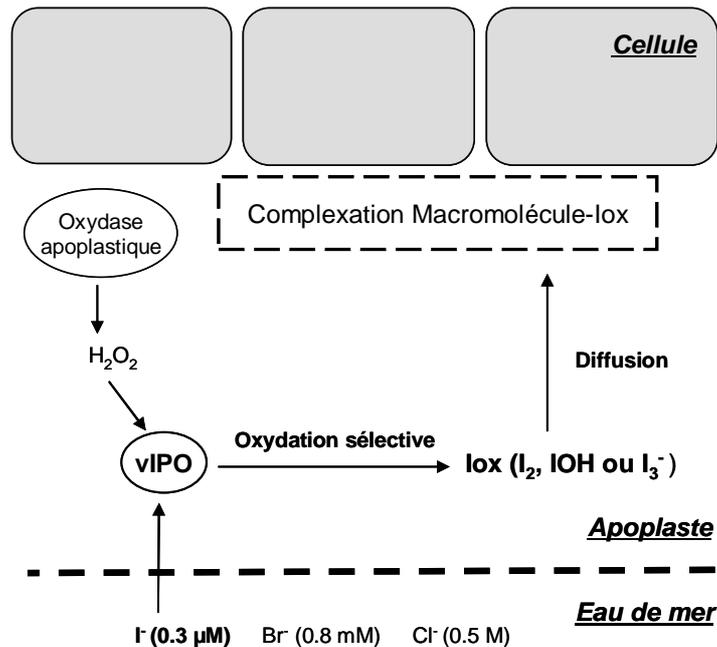


Fig. 66 : Mécanisme 2, mécanisme proposant que I n'est pas la forme stockée dans les tissus

Le mécanisme 2 est donc plus satisfaisant « conceptuellement » que le mécanisme 1. Il permettrait à *L. digitata* d'avoir un stock de biocides prêt à l'emploi. De plus, l'accumulation d'une forme oxydée telles que IOH, I<sub>2</sub> ou, plus vraisemblablement, I<sub>3</sub><sup>-</sup> n'est pas totalement incohérente avec une régulation du stress oxydant puisque par exemple, ces espèces sont capables d'assister la dismutation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cependant, d'un point de vue physiologique, il est légitime de se demander si l'accumulation de l'iode sous une forme réactive telle que I<sub>2</sub>, IOH ou I<sub>3</sub><sup>-</sup> est compatible avec la viabilité des cellules environnantes.

En considérant les données de la littérature et le modèle de Shaw et Küpper *et al.*, nous avons donc proposé deux mécanismes de captation de l'iode chez *L. digitata* compatibles avec une localisation apoplastique de l'iode. Ces mécanismes reposent sur l'intervention d'une vHPO (pour la sélection de I<sup>-</sup>) et sur la complexation de l'iode inorganique par un complexe macromoléculaire. Ce complexe pourrait faire intervenir une entité cationique (qui pourrait être Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> compte tenu des résultats de sonde nucléaire) puisque les polysaccharides apoplastiques sont essentiellement anioniques. Cependant, nous ne sommes pas en mesure de choisir entre le mécanisme 1 et 2 à cause des doutes existant sur la spéciation de l'iode *in vivo*.

Ces mécanismes ne sont que des propositions pour orienter les recherches à venir sur trois axes qui nous semblent principaux :

- La détermination de la spéciation de l'iode *in vivo*

- La confirmation de l'implication d'une vHPO
- L'identification de la structure complexante

En effet, il se pourrait que le mécanisme réel soit plus compliqué avec peut être, l'intervention des cellules méristodermiques.

## **6. Conclusion générale et perspectives**

Par une démarche tout à fait originale basée sur la combinaison de deux techniques d'imagerie chimique, nous avons obtenu la distribution tissulaire quantitative et la localisation subcellulaire de l'iode, au sein d'échantillons de *L. digitata*.

Puisque l'iode est majoritairement stocké sous une forme labile au sein des tissus de *L. digitata*, cette étude a nécessité l'utilisation de procédures de préparation d'échantillon non conventionnelles. Le recours à la cryofixation et à la déshydratation par lyophilisation nous a permis de préserver la distribution et la teneur en iode au sein de coupes transversales (cryofixées) de stipe et de lame de *L. digitata*. En tirant profit du principal inconvénient de la procédure par fixation chimique (c'est-à-dire le relargage des espèces labiles), nous avons de plus, obtenu des coupes transversales (chimiquement fixées) permettant d'étudier principalement la distribution de l'iode insoluble, une forme très minoritaire (< 5%) présente au sein des tissus de *L. digitata*.

Les analyses par microsonde SIMS des coupes chimiquement fixées ont révélées que l'iode insoluble – correspondant très probablement à des macromolécules iodées – est majoritairement localisé dans le tissu périphérique, principalement au niveau du mucilage externe ainsi qu'au sein des espaces intercellulaires. Cette distribution pourrait être similaire à celle des activités peroxydases, ce qui suggère que les vHPOs sont responsables de la synthèse et de la localisation de ces espèces. La nature de ces espèces iodées et leur rôle sont à l'heure actuelle inconnus. Cependant, nos observations expérimentales ainsi que diverses études de spéciation suggèrent très fortement qu'il puisse s'agir en parti de protéines. Compte tenu de leur localisation subcellulaire, ces molécules iodées pourraient être des précurseurs de composés volatils iodés.

Les analyses par microsonde nucléaire sur des coupes cryofixées de lame et de stipe ont mis en évidence que l'iode total est très majoritairement localisé dans le tissu périphérique. De plus, par analyse par microsonde SIMS, nous avons montré que, dans le tissu périphérique de la lame, l'iode total est apoplastique, ce qui est tout à fait inattendu.

Cette distribution périphérique et apoplastique doit permettre au stock d'iode (essentiellement sous forme inorganique) d'être accessible et facilement re-mobilisable dans le cadre d'une activité anti-oxydante ou d'un mécanisme de défense. Nous avons observé que le brome occupe le même compartiment que l'iode, ce qui suggère qu'il possède un mécanisme de captation et un rôle physiologique similaires.

La localisation subcellulaire de l'iode que nous avons observée remet en question le mécanisme de captation par *L. digitata* proposé par Shaw et Küpper *et al.*. Compte tenu des données de la littérature et de nos observations, nous avons été en mesure de proposer deux nouveaux mécanismes compatibles avec la distribution apoplastique de l'iode (Fig. 65, Fig. 66). Ces mécanismes reposent sur l'action d'une vHPO (dont le rôle est de sélectionner spécifiquement l'iodure) et sur le stockage de l'iode par un complexe macromoléculaire qui est, à l'heure actuelle, inconnu. En raison des doutes concernant la spéciation de l'iode chez *L. digitata*, nous ne sommes pas en mesure de privilégier un des deux mécanismes. D'ailleurs, ces modèles sont purement spéculatifs et ont pour but de dégager des axes de recherche qui permettront d'élucider le mécanisme réel de captation de l'iode chez *L. digitata*.

Dans ce contexte, le point crucial est la détermination de la spéciation de l'iode *in vivo*. Küpper *et al.* ont analysé par EXAFS (raie  $L_{\beta}$  de l'iode) des échantillons de lame de *L. digitata*. Leurs résultats montreraient que l'iode serait majoritairement stocké sous forme d'iodure (résultats non publiés). Pour compléter ces résultats, il serait intéressant d'envisager l'utilisation de microsonde XAS qui permettrait de déterminer sans ambiguïté la spéciation de l'iode au sein des différents tissus (méristoderme, cortex et medulla).

Une fois la spéciation de l'iode *in vivo* établie, une stratégie pourra être mise en place pour identifier son mode de séquestration dans l'apoplasme. Nous pensons que le mécanisme mis en jeu est la formation d'un complexe avec des macromolécules. Cette structure pourrait être identifiée en effectuant des expériences de captation d'iode en présence de  $^{125}\text{T}$  à partir de différents systèmes (algue lyophilisée, extrait de paroi cellulaire, extrait de polysaccharides pariétaux...) de telles sortes à identifier la structure minimale capable de séquestrer l'iode. Des analyses chimiques permettraient ensuite d'identifier la nature des complexants.

Parallèlement, des études complémentaires d'imagerie par microsonde SIMS devront être menées. Ces études nécessitent au préalable l'amélioration de la procédure de préparation des échantillons par cryofixation.

Nous pourrions ensuite :

- Compléter l'étude concernant la distribution subcellulaire de l'iode : il faut en particulier démontrer que cette distribution est indépendante de l'âge du sporophyte, de la zone de prélèvement (stipe, lame, haptère) et du tissu étudié (méristoderme, cortex, medulla). Ces points n'ont pas pu être explorés au cours de notre étude, à cause d'une mauvaise infiltration des échantillons par la résine. Or, les résultats de microsonde nucléaire mettent clairement en évidence la présence d'iode au sein des tissus internes ( $\approx 0,5 \text{ mg.g}^{-1}$ ).
- Déterminer la nature des structures intracellulaires méristodermiques riches en iode, en adoptant une méthodologie couplant microscopie par transmission électronique puis microsonde SIMS (selon la procédure utilisée par Quintana *et al.* [11]) : ces structures pourraient jouer un rôle clé dans le mécanisme de captation et/ou d'efflux de l'iode.
- Etudier le devenir de l'iode *in vivo* au cours du temps par traçage avec un radioisotope de l'iode ( $^{129}\text{I}$ ), comme cela a été effectué sur le follicule thyroïdien (pour illustration [7])<sup>14</sup>. Cette étude permettrait de déterminer les étapes du mécanisme de captation et de séquestration de l'iode et de révéler le rôle des cellules méristodermiques. Une perspective plus lointaine serait d'étudier la migration à longue distance de l'iode à travers le cortex et au sein de la medulla. Ce phénomène a été mis en évidence pour l'iode par Amat *et al.* [38].

D'un point de vue technique, cette étude démontre la complémentarité de deux techniques d'imagerie chimique : la microsonde SIMS et la microsonde nucléaire, pour l'étude de la distribution d'éléments (traces) dans des échantillons biologiques complexes. Nous pensons que ces techniques seront de plus en plus utilisées en analyse biologique et qu'elles offrent de nouvelles perspectives d'approche pour les études physiologiques concernant les mécanismes de transport et de séquestration.

---

<sup>14</sup> La microsonde SIMS permet la détection différentielle des isotopes d'un même élément



## **Bibliographie**

1. Berger P, Revel G: **Microsonde nucléaire : Applications.** *Techniques de l'ingénieur* 2005:1-8.
2. Lobinski R, Moulin C, Ortega R: **Imaging and speciation of trace elements in biological environment.** *Biochimie* 2006, **88**:1591-1604.
3. Isaure MP, Fraysse A, Deves G, Le Lay P, Fayard B, Susini J, Bourguignon J, Ortega R: **Micro-chemical imaging of cesium distribution in *Arabidopsis thaliana* plant and its interaction with potassium and essential trace elements.** *Biochimie* 2006, **88**:1583-1590.
4. Pinheiro T, Pallon J, Fernandes R, Halpern MJ, Homman P, Malmqvist K: **Nuclear microprobe applied to the study of coronary artery walls : a distinct look at atherogenesis.** *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1996, **42**:89-102.
5. Ortega R, Devès G, Bohic S, Simionovici A, Ménez B, Bonnin-Mosbah M: **Iron distribution in cancer cells following doxorubicin exposure using proton and X-ray synchrotron radiation microprobes.** *Nuclear Inst and Methods in Physics Research, B* 2001, **181**:480-484.
6. Berger P, Revel G: **Microsonde nucléaire : Principe et Appareillage.** *Techniques de l'ingénieur* 2005:1-16.
7. Guerquin-Kern JL, Wu TD, Quintana C, Croisy A: **Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy).** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1724**:228-238.
8. Clerc J, Fourre C, Fragu P: **SIMS microscopy: methodology, problems and perspectives in mapping drugs and nuclear medicine compounds.** *Cell Biol Int* 1997, **21**:619-633.
9. Guerquin-Kern JL, Hillion F, Madelmont JC, Labarre P, Papon J, Croisy A: **Ultra-structural cell distribution of the melanoma marker iodobenzamide: improved potentiality of SIMS imaging in life sciences.** *Biomed Eng Online* 2004, **3**:10.
10. Darque-Ceretti E, Migeon H-N, Aucouturier M: **Emission ionique secondaire SIMS : Principe et appareillages.** *Techniques de l'ingénieur* 1998, :1-16.
11. Quintana C, Wu TD, Delatour B, Dhenain M, Guerquin-Kern JL, Croisy A: **Morphological and Chemical Studies of Pathological Human and Mice Brain at the Subcellular Level: Correlation Between Light, Electron, and NanoSIMS Microscopies.** *Microsc Res Tech* 2007, **70**:281-295.
12. Ortega R, Moretto P, Fajac A, Benard J, Llabador Y, Simonoff M: **Quantitative mapping of platinum and essential trace metal in cisplatin resistant and sensitive human ovarian adenocarcinoma cells.** *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1996, **42**:77-88.
13. Campbell JL, Hopman TL, Maxwell JA, Nejedly Z: **The Guelph PIXE software package III: Alternative proton database.** *Nuclear Inst and Methods in Physics Research, B* 2000, **170**:193-204.
14. Mayer M: *SIMNRA user's guide.* Garching, Germany: Max-Planck-Institut, für Plasmaphysik; 1997.

15. Barbotteau Y: <http://biopixe.free.fr/SupaVISIO/download.htm>. 2004.
16. Ar Gall E, Küpper FC, Kloareg B: **A survey of iodine content in *Laminaria digitata***. *Botanica Marina* 2004, **47**:30-37.
17. Küpper FC, Schweigert N, Ar Gall E, Legendre J-M, Vilter H, Kloareg B: **Iodine uptake in Laminariales involves extracellular, haloperoxidase-mediated oxidation of iodide**. *Planta* 1998, **207**:163-171.
18. Hou X, Chai C, Qian Q, Yan X, Fan X: **Determination of chemical species of iodine in some seaweeds (I)**. *Sci Total Environ* 1997, **204**:215-221.
19. Roche J, Yagi Y: **Sur la fixation de l'iode radioactif par les algues et sur les constituants iodés des laminaires**. *Comptes rendus de la société biologique Paris* 1952, **146**:642-645.
20. Shah M, Wuilloud RG, Kannamkumaratha SS, Caruso JA: **Iodine speciation studies in commercially available seaweed by coupling different chromatographic techniques with UV and ICP-MS detection**. *J Anal At Spectrom* 2005, **20**:176-182.
21. Rasband WS: *ImageJ*, <http://rsbinfo.nih.gov/ij/>.
22. Saenko GN, Kravtsova YY, Ivanenko VV, Sheludko SI: **Concentration of iodine and bromine by plants in the seas of Japan and Okhotsk**. *Mar Biol* 1978, **47**:243-250.
23. Pedersen M, Roomans GM: **Ultrastructural localization of bromine and iodine in the stipes of *Laminaria digitata* (Huds.) Lamour., *Laminaria saccharina* (L.) Lamour. and *Laminaria hyperborea* (Gunn.) Fosl.** *Botanica Marina* 1983, **26**:113-118.
24. Colin C: **Caractérisation biochimique et moléculaire des halopéroxydases dépendantes du vanadate chez l'algue brune *Laminaria digitata***. PhD report, Ecole doctorale sciences de l'environnement d'Ile-de-France, Université Paris VI; 2004.
25. Almeida M, Filipe S, Humanes M, Maia MF, Melo R, Severino N, da Silva JA, Frausto da Silva JJ, Wever R: **Vanadium haloperoxidases from brown algae of the Laminariaceae family**. *Phytochemistry* 2001, **57**:633-642.
26. Jordan P, Kloareg B, Vilter H: **Detection of vanadate-dependent bromoperoxidases in protoplasts from the brown algae *Laminaria digitata* and *Laminaria saccharina***. *J Plant Physiol* 1991, **137**:520-524.
27. Carter-Franklin JN, Butler A: **Vanadium bromoperoxidase-catalyzed biosynthesis of halogenated marine natural products**. *J Am Chem Soc* 2004, **126**:15060-15066.
28. Scott R: **Observations on the iodo-amino-acids of marine algae using iodine-131**. *Nature* 1954, **173**:1098-1099.
29. Feiters MC, Leblanc C, Kupper FC, Meyer-Klaucke W, Michel G, Potin P: **Bromine is an endogenous component of a vanadium bromoperoxidase**. *J Am Chem Soc* 2005, **127**:15340-15341.
30. Larsen B, Haug A: **The distribution of Iodine and other constituents in stipe of *Laminaria hyperborea* (Gunn.) Foslie**. *Botanica Marina* 1960, **II**:250-254.
31. Shaw TI: **Mechanism of iodine accumulation by the brown seaweed *Laminaria digitata*: the uptake of iodine-131**. *Proc Roy Soc (London)* 1959, **B150**:356-371.
32. Küpper FC, Kloareg B, Guern J, Potin P: **Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitata***. *Plant Physiol* 2001, **125**:278-291.

33. Pedersen M, Collen J, Abrahamsson K, Ekdahl A: **Production of halocarbons from seaweeds: an oxidative stress reaction.** *Sci Mar* 1996, **60**:257-263.
34. Potin P, Bouarab K, Kupper F, Kloareg B: **Oligosaccharide recognition signals and defense reactions in marine plant-microbe interactions.** *Curr Opin Microbiol* 1999, **2**:276-283.
35. Kelly S, Baily NA: **The Uptake of Radioactive Iodine by *Ascophyllum*.** *Biol Bull* 1951, **100**:188-190.
36. Yu X, Houtman C, Atalla RH: **The complex of amylose and iodine.** *Carbohydr Res* 1996, **292**:129-141.
37. Schenck HU, Simak P, Haedicke E: **Structure of polyvinylpyrrolidone-iodine (povidone-iodine).** *J Pharm Sci* 1979, **68**:1505-1509.
38. Amat MA, Srivastava LM: **Translocation of iodine in *Laminaria saccharina* (Phaeophyta).** *J Phycol* 1985, **21**:330-333.



# **Partie 2**

## **Thématique Mammifère**

*Etude du mécanisme de captation de l'iodure par le symporteur  $\text{Na}^+/\text{I}$*



## **Introduction**

Cette partie est dédiée à la thématique Mammifère et concerne, plus précisément, le symporteur  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  (NIS). Comme mentionné dans la partie Objectifs et stratégies, nous avons poursuivi les travaux de thèse du Dr. Lecat-Guillet qui, à la suite d'un test de criblage à haut-débit, ont permis l'identification d'inhibiteurs de la captation d'iodure chez des modèles cellulaires exprimant la protéine hNIS. Nos objectifs principaux ont consisté à mettre au point la synthèse quantitative de ces inhibiteurs, à valider leur activité et à initier une stratégie d'identification de leurs protéines cibles par photomarquage d'affinité.

Dans ce qui suit, nous décrirons des méthodes d'identification des protéines cibles utilisées en génétique chimique directe ainsi que le contexte biologique de notre étude (Chapitre 1). Après avoir présenté l'avancement du projet de recherche sur le NIS par notre groupe, nous décrirons les voies de synthèse mises au point pour l'obtention des inhibiteurs et de leurs analogues photo-activables ainsi que leurs évaluations biologiques sur deux lignées cellulaires modèles (Chapitre 2).



# **Chapitre 1 : Introduction bibliographique**

## **1. Méthodes d'identification des protéines cibles en génétique chimique**

La première étape de la génétique chimique directe consiste à rechercher une molécule (ou hit) capable de générer un phénotype particulier sur un système cellulaire ou un organisme. La seconde étape consiste à identifier la protéine cible de cette molécule. Cette stratégie permet donc d'identifier les effecteurs protéiques du mécanisme biochimique, souvent complexe, responsable du phénotype étudié. Or, ce phénotype peut être représentatif d'une pathologie donnée. En recherche pharmaceutique exploratoire, la génétique chimique directe permet donc à la fois de mieux comprendre les mécanismes biochimiques impliqués dans une pathologie, de définir de nouvelles approches thérapeutiques et de valider le mécanisme d'action de la molécule étudiée qui devient ainsi une molécule candidate pour la mise au point d'un nouveau médicament.

Compte tenu de ces enjeux, de très nombreuses stratégies d'identification des protéines cibles de molécules d'intérêt biologique ont été développées ou sont en cours de validation. Il serait trop long de détailler l'ensemble de ces techniques qui font l'objet de différentes revues auxquelles nous renvoyons le lecteur [1-4]. Dans ce qui suit, nous présentons les approches les plus courantes ou du moins, les plus citées dans la littérature.

### **1.1. Approches par déduction**

L'identification de la protéine cible d'une molécule peut être obtenue grâce à une étude approfondie du phénotype qu'elle provoque et grâce aux données de la littérature. En effet, il est possible qu'une expérience de biochimie ou de génétique ait précédemment conduit à l'obtention d'un phénotype équivalent à celui induit par la molécule, ce qui peut aider à l'identification de sa protéine cible ou du gène correspondant.

La découverte du monastrol illustre parfaitement cette démarche. Cette molécule a été identifiée à la suite d'un test de criblage à haut-débit dédié à l'identification de molécules bloquant la division cellulaire. L'équipe de recherche qui a réalisé cette étude avait pour but d'identifier des molécules ayant un mécanisme d'action original. Le test de criblage à haut-débit a été suivi d'un test secondaire *in vitro* pour éliminer les molécules bloquant la polymérisation de la tubuline, car ce mécanisme était bien connu. L'effet des molécules restantes sur la distribution intracellulaire des microtubules, de l'actine et de la chromatine a

été étudié en détail, ce qui a permis d'identifier une molécule induisant un phénotype tout à fait original : le monastrol. Les cellules incubées en présence de monastrol sont bloquées en pré-métaphase et présentent un fuseau mitotique monoastral. Or, un tel phénotype avait été précédemment obtenu par des anti-corps dirigés contre la kinésine Eg5 [5]. Grâce à cette observation, il a été proposé puis démontré que le monastrol est un inhibiteur spécifique de la kinésine Eg5 [6, 7]. L'identification du monastrol et de sa protéine cible a permis à la fois de proposer une nouvelle orientation thérapeutique contre le cancer mais aussi un outil pharmacologique pour étudier les mécanismes liés à la formation du fuseau mitotique bipolaire.

Cependant, dans la plupart des cas, une telle approche par déduction ne peut pas être réalisée car aucune piste ne se dégage de manière évidente. Des approches plus systématiques et non biaisées ont donc été développées pour permettre l'identification des protéines cibles.

## **1.2. Approches non déductives**

Comme nous l'avons évoqué précédemment, ces méthodes sont multiples et il est difficile d'effectuer un inventaire exhaustif. Les approches peuvent être aussi bien génomiques que protéomiques : on peut citer, par exemple, les approches basées sur l'extinction de gène par interférence à ARN ou encore celles basées sur l'étude des profils de transcription ou du protéome induit par la molécule [2, 8]. On distingue, de plus, les approches dites d'affinité. Elles sont fondées sur la reconnaissance spécifique de la molécule d'étude (ou ligand) par sa protéine cible c'est-à-dire sur la formation du complexe ligand-protéine cible. Les approches d'affinité sont divisées en deux groupes : les approches d'affinité dites génomiques et les approches d'affinité dites biochimiques [9].

### ***1.2.1 Les approches d'affinité dites génomiques***

Ces approches consistent à identifier la protéine cible par l'identification de son gène. Elles s'appuient sur l'expression de banques d'ADNc. Les approches les plus représentatives sont les techniques « 3-hybrides » et « drug werstern » que nous présentons dans la figure suivante (Fig. 67) [2, 10]. Pour illustration, la technique « 3-hybride » a été récemment utilisée dans une vaste étude dédiée à la détermination du spectre des protéines cibles d'inhibiteurs de kinase cycline-dépendante tels que la Roscovitine ou le Purvalanol B [11]. La première étude utilisant la technique « Drug wersten » a concerné HMN-154, un anti-

cancéreux de la famille des benzenesulfonamides. Elle a permis de mettre en évidence que ses protéines cibles sont le facteur de transcription NF-YB et la thymosine  $\beta$ -10 [12].

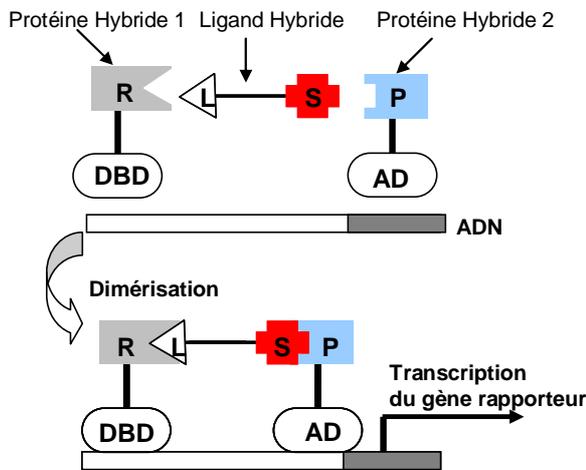
Ces approches d'affinité génomiques sont présentées comme efficaces, rapides à mettre en œuvre et surtout sensibles (grâce aux méthodes d'amplification de l'ADN par PCR). Elles sont particulièrement intéressantes pour l'identification de protéines faiblement exprimées telles que les facteurs de transcription. Cependant, elles présentent certaines limitations. Il est possible que la fusion ou un mauvais repliement – comme cela a été observé pour certaines protéines cytosoliques eucaryotes exprimées chez *Escherichia coli* – rendent la protéine cible incapable de se lier à son ligand. Une seconde limitation réside dans le fait qu'un seul ADNc et donc qu'une seule protéine est exprimée à la fois, ce qui rend impossible la mise en évidence de cibles correspondant à des complexes protéiques [2].

### ***1.2.2 Les approches d'affinité dites biochimiques***

Les approches d'affinité dites « biochimiques » consistent à séparer la protéine cible d'un milieu complexe en tirant profit de son affinité pour son ligand. On distingue deux méthodes : la chromatographie d'affinité et le photomarquage d'affinité. Elles nécessitent de modifier chimiquement le ligand pour pouvoir récupérer le complexe ligand-protéine cible. En comparaison avec les approches d'affinité dites génomiques (cf. paragraphe 1.2.1), ces techniques sont plus accessibles à des non-spécialistes, en particulier à des équipes de chimistes.

Dans ce qui suit, nous allons présenter plus en détail la chromatographie d'affinité et le photomarquage d'affinité que nous avons envisagés dans le cadre de notre projet de recherche.

## A : Approche 3 hybrides (Y3H)



Chaque clone de levure exprime deux protéines hybrides :

**Protéine Hybride 1** est la fusion d'une protéine se fixant à l'ADN (DBD) et d'un récepteur R.

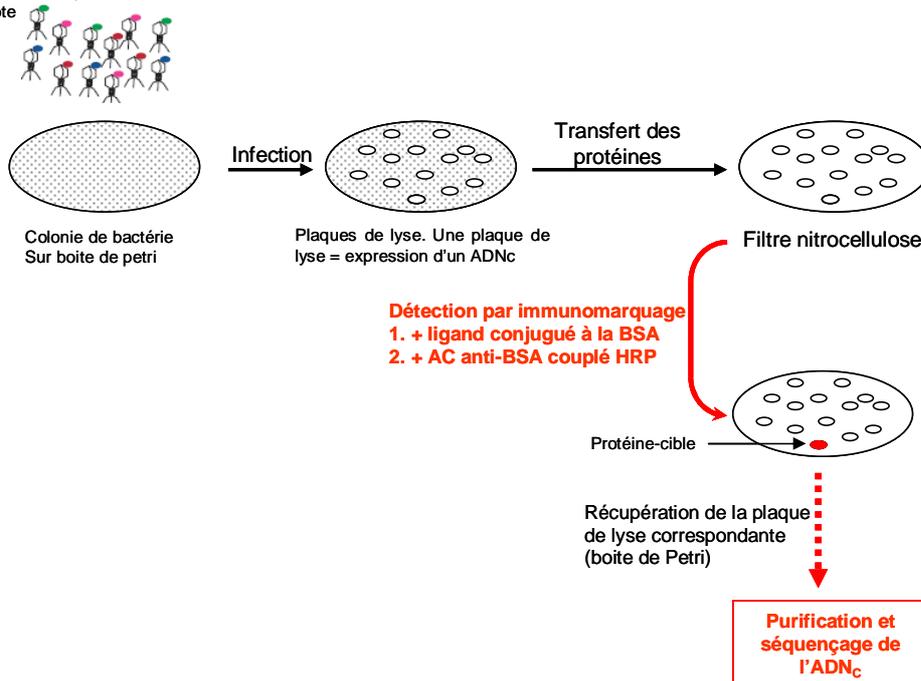
**Protéine Hybride 2** est constituée d'un domaine d'activation de la transcription (AD) fusionné à la protéine P codée par un ADNc de la banque.

On introduit le **ligand hybride** constitué d'une partie L se fixant au récepteur R accroché par un bras espaceur au ligand d'intérêt S.

Si la **protéine P** codée par l'ADNc est la protéine-cible du ligand S alors la formation du complexe permet l'activation du gène rapporteur par le domaine AD.

## B : Drug Western

Chaque bactériophage est vecteur d'un seul ADNc de la bibliothèque qui sera exprimé chez la bactérie hôte



**Fig. 67 : Méthodes d'identification de protéines cibles par des approches d'affinité dites génomiques**

A. Approche 3-hybrides d'après King [2].

B. Approche Drug Western d'après King [2] : Chaque plaque de lyse correspond à un seul bactériophage porteur d'un unique ADNc de la banque. Les protéines des plaques de lyse sont transférées sur filtre nitrocellulose. La protéine cible est détecté par immuno-marquage : le ligand est couplé à la BSA qui est reconnue par un anti-corps anti-BSA couplé à la HRP. Sur la boîte de petri, on repère la plaque de lyse ayant exprimé la protéine cible afin de récupérer le bactériophage correspondant. La protéine cible est identifiée par séquençage de l'ADNc porté par le bactériophage. HRP : Horseradish Peroxidase. BSA : Bovine Serum Albumin.

## 1.3. La chromatographie d'affinité

### 1.3.1 Principe et illustration

La chromatographie d'affinité est utilisée en routine pour la purification de protéines en particulier recombinantes. Dans le cadre de la génétique chimique, elle est utilisée pour l'identification des protéines cibles de molécules organiques d'intérêt biologique. Dans ce cas, le ligand est immobilisé sur une phase solide (la résine). L'extrait cellulaire (lysats ou fractions) d'intérêt est passé sur cette colonne d'affinité. La protéine cible est retenue par complexation avec son ligand. Après lavage de la colonne pour éliminer les protéines en interaction non spécifique (du moins en partie), la protéine cible est éluée. L'extrait protéique obtenu est purifié et analysé par gel d'électrophorèse. L'identification de la protéine s'effectue grâce à son empreinte peptidique massique déterminée par spectrométrie de masse (Fig. 68).

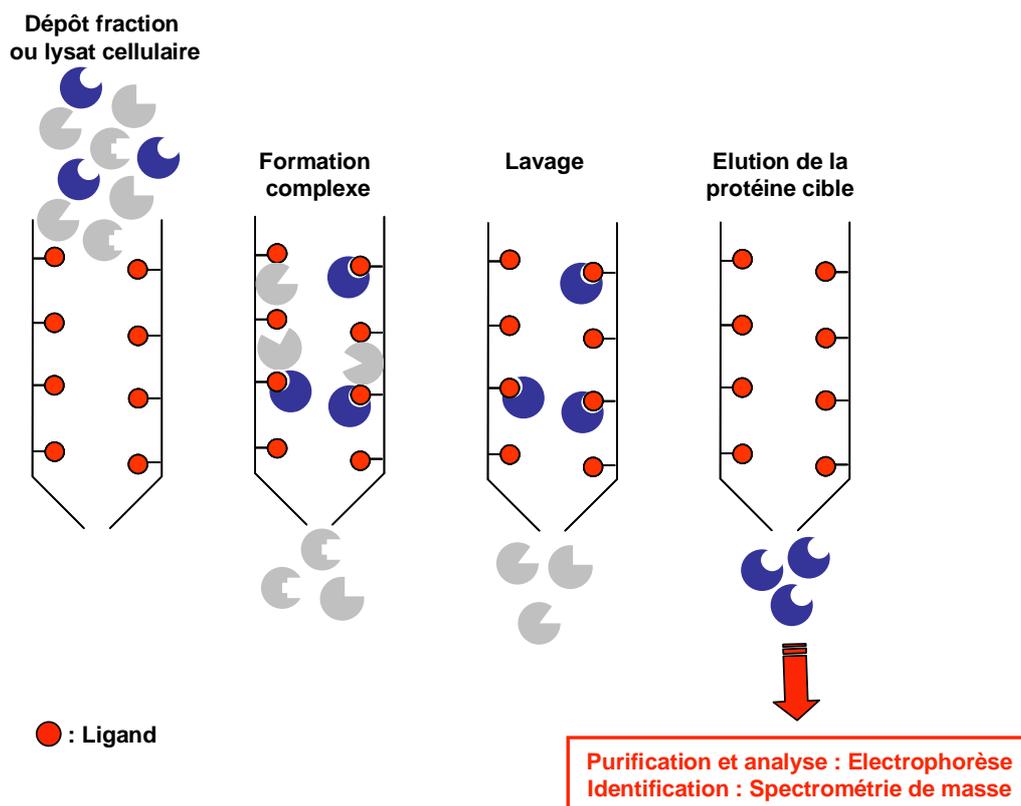


Fig. 68 : Principe de la chromatographie d'affinité

Pour illustration, on peut citer les travaux concernant le trapoxin, un peptide bactérien bloquant le cycle cellulaire chez les cellules mammifères et inhibant *in vivo* la déacétylation des histones. Une des deux protéines cibles isolées par chromatographie d'affinité à partir

d'extraits de thymocytes présentait une forte homologie de séquence avec le régulateur de transcription Rpd3 de la levure, dont l'activité histone déacétylase (HDAC) n'était pas connue. Ce résultat a donc permis de révéler l'importance des HDACs dans la régulation de la transcription chez les eucaryotes [13].

### ***1.3.2 Limitations***

Une des difficultés de cette technique est de réussir à fixer le ligand sur la résine sans diminuer son affinité pour sa protéine cible, ce qui peut nécessiter la mise en place d'une voie de synthèse chimique non triviale.

Par ailleurs, la chromatographie d'affinité est souvent décrite pour l'identification des protéines cibles de produits naturels. Les études les plus citées de la littérature présentent soit des constantes d'association protéine-ligand de l'ordre du nanomolaire (par exemple dans le cas de l'immunosuppresseur FK506 avec sa protéine cible FKBP12 [14]), soit la formation d'une liaison covalente entre le ligand et sa protéine cible, qui ne peut être clivée qu'en conditions dénaturantes (par exemple dans le cas du Trapoxin [13]). En revanche, la chromatographie d'affinité semble avoir été moins utilisée, jusqu'à présent, pour des molécules issues de tests de criblage à haut-débit. L'affinité de ces molécules pour leur cible protéique est, en général, de l'ordre du micromolaire. Or, avec une telle constante d'affinité, les complexes ligand-protéine peuvent être dissociés au cours des lavages de la résine. La nécessité d'une forte constante d'association du complexe ligand-protéine cible est liée à l'existence d'interactions non spécifiques entre les autres protéines (contenues dans l'extrait cellulaire) et la matrice hydrophobe. Des stratégies permettant de distinguer ces protéines de la protéine cible ont été mises au point. Certaines d'autres elles consistent à comparer quantitativement les protéines retenues par une résine greffée avec le ligand et celles retenues par une résine greffées avec une molécule inactive qui lui est proche structuralement (pour revue : [15]). Cependant, malgré ces améliorations, la constante d'affinité demeure toujours un critère limitant.

Par ailleurs, il est évoqué que cette méthode peut souffrir d'un manque de sensibilité, en particulier, dans le cas de protéines cibles faiblement exprimées telles que les facteurs de transcription. De plus, dans le cadre de certaines études, la chromatographie d'affinité peut nécessiter la production coûteuse et délicate de grandes quantités d'extraits cellulaires [3, 15].

## 1.4. Le photomarquage d'affinité

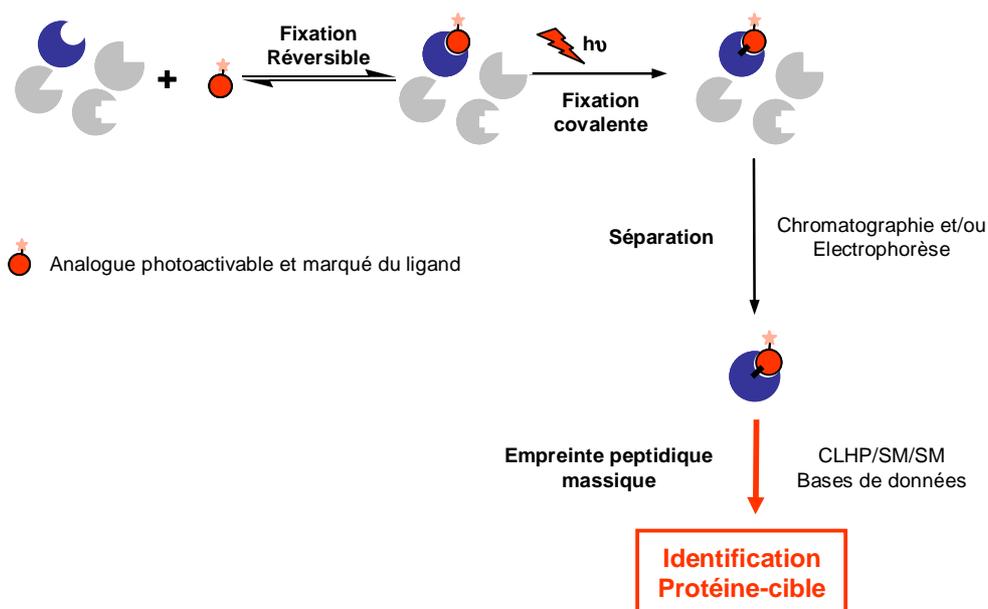
### 1.4.1 Principe et illustration

Le photomarquage d'affinité est basé sur l'utilisation d'un analogue photoactivable du ligand (ou sonde photoactivable). Sous irradiation lumineuse<sup>15</sup>, la sonde photo-activable génère un intermédiaire très réactif capable d'établir une liaison covalente avec un acide aminé d'une protéine [16]. Le photomarquage d'affinité est souvent utilisé pour l'identification des acides aminés d'intérêt du site de fixation des protéines. Il constitue alors une approche complémentaire à la mutagénèse dirigée et à la cristallographie aux rayons X [17]. En génétique chimique, il constitue une technique efficace pour l'identification des protéines cibles à partir de milieux complexes tels que des fractions cellulaires, des lysats cellulaires, des vésicules membranaires ou des cellules entières [18, 19]. Le principe de cette méthode est présenté dans le schéma ci-dessous (Fig. 69). La sonde photoactivable est incubée dans le milieu cellulaire et rentre en interaction réversible avec sa protéine cible. Consécutivement à l'irradiation lumineuse, le complexe protéine-sonde devient covalent. Ce complexe est ensuite isolé par des techniques chromatographiques et/ou d'électrophorèse, identifié grâce au marquage présent sur la sonde et finalement analysé par des techniques de spectrométrie de masse, pour déterminer la protéine cible [16].

En général, la sonde photoactivable est marquée par un isotope radioactif (<sup>3</sup>H, <sup>125</sup>I). Mais d'autres types de marquage sont possibles comme, par exemple, le couplage de la sonde à une molécule de biotine. L'affinité du complexe biotine-avidine (ou biotine-streptavidine) est alors mis à profit soit dans l'étape de séparation des protéines par chromatographie d'affinité [19, 20], soit pour la révélation des gels d'électrophorèse par chimiluminescence en utilisant la HRP fusionnée à l'avidine [21].

---

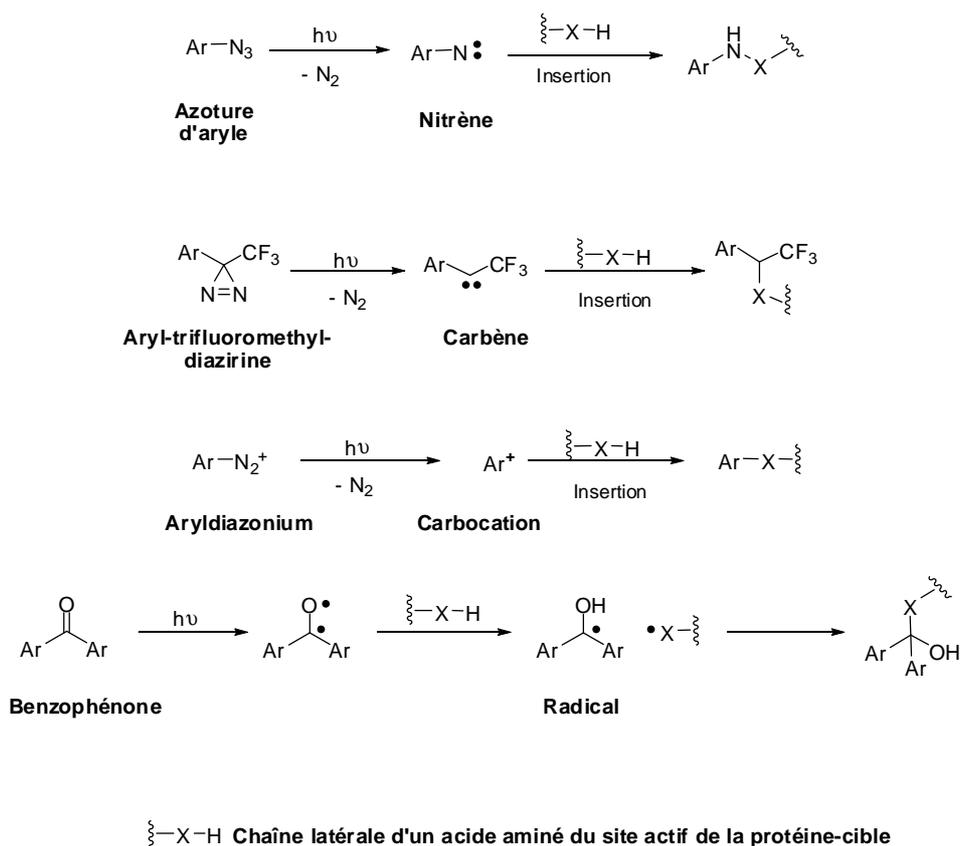
<sup>15</sup> En général, à une longueur d'onde comprise entre 250 et 350 nm environ, selon le photophore utilisé.



**Fig. 69 : Principe du photomarquage d'affinité pour l'identification des protéines cibles**

L'analogue photoactivable du ligand établit une liaison covalente avec la protéine cible qui est repéré grâce au marquage (biotine ou radioisotope). L'identification de la protéine cible s'effectue grâce à son empreinte peptidique massique par comparaison avec des bases de données telles que MASCOT.

Ils existent différents types de groupements photoactivables (ou photophores). Ils sont classés selon l'espèce réactive qu'ils génèrent : nitrène, carbène, carbocation arylique ou radical. Les photophores les plus utilisés en photomarquage d'affinité sont les azotures d'aryle, les trifluorométhyl diazirines, les sels d'aryldiazonium et les dérivés de la benzophénone (Fig. 70). Le rapport de Fleming dans la revue *Tetrahedron* décrit de manière très exhaustive ces différents photophores [22]. Pour des informations complémentaires, nous renvoyons le lecteur à cet article ainsi qu'à celui de Goeldner et coll. [17].



~X-H Chaîne latérale d'un acide aminé du site actif de la protéine-cible

**Fig. 70 : Photophores et principales espèces réactives générées sous irradiation. La photochimie est très simplifiée.**

Pour illustrer l'apport du photomarquage d'affinité dans l'identification des protéines cibles, nous pouvons citer les travaux effectués par Jessen *et al.*. A la suite d'un test de criblage à haut-débit, ils ont identifié un composé particulièrement intéressant, appartenant à la famille des 3,5-diaryl-oxadiazoles, qui induit l'apoptose et bloque sélectivement la croissance tumorale. L'identification de son mécanisme d'action a combiné différentes approches. Le photomarquage d'affinité, à partir de lysats cellulaires, a mis en évidence que sa protéine cible est TIP47 (tail-interacting protein 47), une protéine se liant à IGF-II (Insulin-like growth factor-II). Ce résultat a été ensuite validé grâce à une expérience d'extinction de l'expression de TIP47 par interférence à ARN. De même, nous pouvons citer les travaux de Cola *et al.*, qui, à partir de bactéries vivantes de *Staphylococcus aureus*, ont mis en évidence, grâce au photomarquage d'affinité, que l'antibiotique linezolid se lie à la sous-unité 23S ribosomale, très probablement à proximité du centre actif peptidyl-transférase [23].

La possibilité d'effectuer le photomarquage d'affinité sur des systèmes cellulaires est un avantage majeur. Une telle démarche permet le ciblage de protéines membranaires et assure le bon repliement des protéines et la présence des différents partenaires protéiques, ce

qui n'est pas nécessairement respecté par les autres méthodes d'affinité. A titre indicatif, le photomarquage d'affinité a été très récemment appliqué à l'étude des interactions protéine-protéine *in vivo* (pour revue : [19]).

#### **1.4.2 Limitations**

La difficulté majeure du photomarquage d'affinité est la synthèse d'un analogue photoactivable du ligand présentant une affinité élevée pour la protéine-cible. Grâce au développement de la chimie combinatoire et à l'émergence de photophores plus stables (diazirine, benzophénone), certains auteurs proposent de faciliter cette étape par la construction de chimiothèques photoactivables, à partir du squelette du ligand [20, 24].

Le photomarquage d'affinité peut être confronté à un manque de spécificité dû à une affinité trop faible de la sonde photoactivable et à la photochimie ou à un manque de stabilité du photophore [22]. Cependant, ce problème peut être résolu par modification chimique de la sonde et par modulation des conditions expérimentales.

### **1.5. Conclusion**

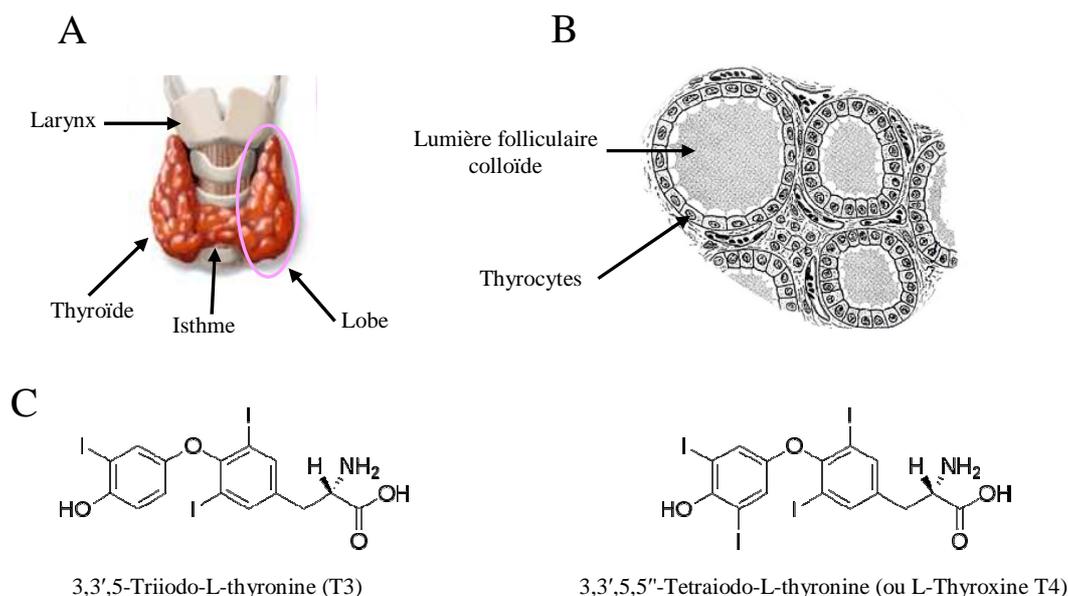
L'essor de la génétique chimique a motivé le développement des méthodes d'identification des protéines cibles de molécules bioactives identifiées lors des tests de criblage à haut-débit. Nous avons ainsi à disposition un panel de techniques protéomiques, génomiques et biochimiques. On distingue, en particulier, le photomarquage d'affinité et la chromatographie d'affinité. Ces approches nécessitent une modification chimique du ligand. Cependant, elles sont plus simples à mettre en œuvre pour des non-biochimistes que les approches génomiques. La chromatographie d'affinité nécessite des constantes d'affinité du ligand pour sa protéine cible de l'ordre du nanomolaire et souffre d'un manque de sélectivité lié aux interactions hydrophobes des protéines avec la résine. A l'inverse, le photomarquage d'affinité peut être utilisé pour des affinités plus faibles et présente l'avantage de pouvoir être effectué sur cellules entières, ce qui est particulièrement intéressant pour le ciblage de protéines cibles membranaires.

## **2. Transport et accumulation de l'iode au niveau de la thyroïde**

### **2.1. La glande thyroïde : généralités**

La thyroïde est une glande endocrine placée au niveau de la partie inférieure du cou, moulée sur l'axe trachéo-laryngé. Elle est constituée de deux lobes latéraux verticaux reliés par l'isthme thyroïdien et est richement vascularisée (Fig. 71.A) [25]. Elle est responsable de la synthèse des hormones iodées : la triiodothyronine (T3) et la thyroxine (T4) (Fig. 71.C). Elle se caractérise par sa capacité à capter sélectivement l'iodure alors que la concentration plasmatique de cet anion est très faible (0,01-0,1  $\mu\text{M}$ ) face à celle du chlorure (0,01-0,1 M). Une glande thyroïde humaine normale contient environ 10 mg d'iode ce qui correspond à une teneur 10 000 fois supérieure à celle du plasma [26]. Son unité morpho-fonctionnelle est le follicule thyroïdien. Il est composé d'un épithélium unistratifié de cellules folliculaires (ou thyrocytes) disposées autour d'une cavité creuse renfermant une substance visqueuse protéique : la colloïde (Fig. 71.B) [25]. La colloïde est le siège de séquestration de l'iode et est très largement constituée de thyroglobuline (Tg), glycoprotéine précurseur de T3 et T4. Les thyrocytes sont nettement polarisés : leur pôle basolatéral, en contact avec la circulation sanguine, est responsable de la captation des iodures alors que leur pôle apical, orienté vers la colloïde, est le siège de la synthèse des hormones thyroïdiennes. En dehors d'une majorité de cellules folliculaires, la glande thyroïdienne comporte, de plus, des cellules parafolliculaires C responsables de la synthèse de la calcitonine, une hormone impliquée dans l'homéostasie du calcium [25-27].

Les hormones thyroïdiennes (T3 et T4) jouent un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme cellulaire et dans le développement de la plupart des organes, en particulier du cerveau. Un déficit en iode et/ou en hormones thyroïdiennes pendant la grossesse entraîne des altérations irréversibles au niveau du développement cérébral du fœtus. Lorsque les besoins en iode ne sont pas couverts dans une population, on observe un ensemble de désordres physiologiques (hypothyroïdie, goitre endémique, retards de développement physique et mental sévères) que l'on regroupe sous le nom de « troubles dus à la carence en iode » (TDCI). La carence en iode constitue un facteur de risque accru d'irradiation en cas d'accidents nucléaires, comme cela a été observé à la suite de l'accident de Tchernobyl. Si le recours au sel iodé a permis un recul net du TDCI, il constitue toujours un problème de santé publique important dans certains pays du tiers monde mais aussi en Europe [28-30].



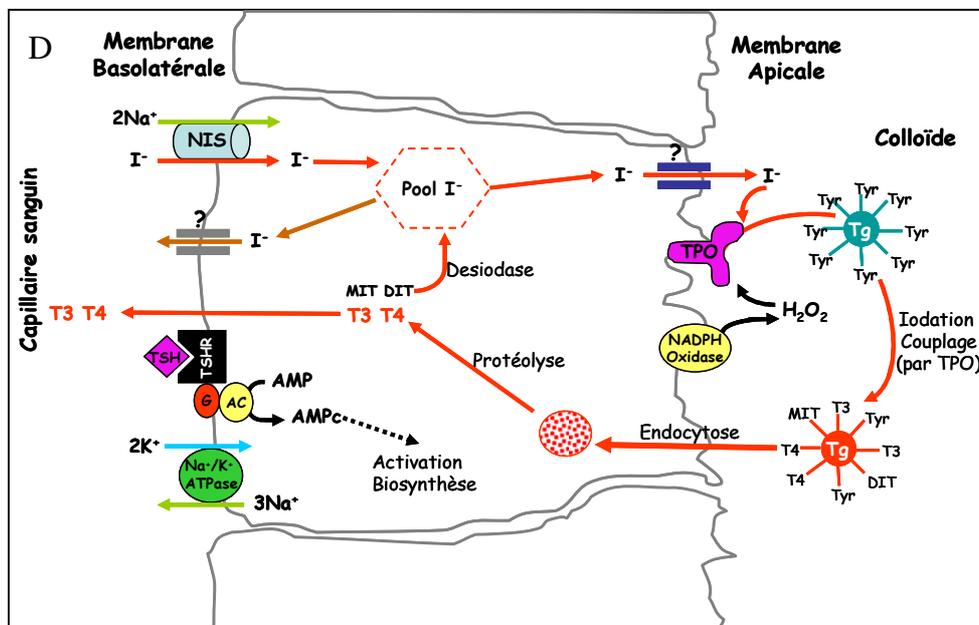
**Fig. 71 : Morphologie de la thyroïde et hormones thyroïdiennes**

- A. La glande thyroïde est moulée sur l'axe trachéo-laryngé.  
 B. Les follicules composés d'une monocouche de thyrocytes entourant la colloïde, siège de la séquestration de l'iode et de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes  
 C. Les hormones iodées T3 et T4 sont synthétisées au niveau du pôle apical des thyrocytes

## 2.2. Biosynthèse des hormones thyroïdiennes

La première étape de la biosynthèse des hormones thyroïdiennes (Fig. 72) est la captation des iodures plasmatiques par les cellules folliculaires. Cette étape se déroule à leur pôle basolatéral et met en jeu un transport actif assuré par le symporteur  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  (NIS). La force motrice de ce transport est fourni par le gradient électrochimique du sodium qui est maintenu par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. Dans le compartiment intra-cellulaire, les iodures rejoignent le pôle apical et atteignent la lumière folliculaire par un mécanisme appelé efflux d'iodure [27]. Cet efflux trans-apical pourrait être assuré par diffusion passive puisque la concentration intra-cellulaire en iodure est supérieure à celle du colloïde. Cependant, d'après certains auteurs, ce processus pourrait être pris en charge par deux transporteurs anioniques : la pendrine [31, 32] et l'AIT (Apical Iodide Transporter) [33]. Néanmoins, leur fonction réelle reste à ce jour controversée. Dans la lumière folliculaire, les iodures sont immédiatement oxydés par la thyropéroxydase (TPO), en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  qui est fourni par un système NADPH-oxydase. Cette oxydation permet l'insertion de l'iode sur les chaînes latérales de certaines tyrosines de la thyroglobuline (Tg), ce qui conduit à la formation de mono-iodotyrosines (MIT) et di-iodotyrosines (DIT). Par un mécanisme oxydatif aussi catalysé par la TPO, les noyaux aromatiques iodés sont couplés deux par deux pour former les précurseurs des hormones T4 et T3. Ces précurseurs, liés à la Tg, sont stockés dans la colloïde. Il est ainsi

important de noter qu'au sein de la colloïde, l'iode est séquestré essentiellement sous forme organifié sur la Tg. Les iodures ne représentent que 1% de la teneur totale en iode [26]. Selon les besoins, la Tg iodée est exportée dans le thyrocyte par endocytose où elle subit, par action d'enzymes lysosomiales, une protéolyse conduisant à la libération des hormones T3 et T4 ainsi qu'à celle des résidus MIT et DIT. MIT et DIT sont déhalogénés par une iodotyrosine déhalogénase. Une fraction de T4 est convertie en T3 par un mécanisme similaire. Les iodures libérés sont intégrés dans le pool d'iodures endogènes du thyrocyte pour participer à un nouveau cycle hormonal ou être éliminés. Les hormones T3 et T4 sont ensuite sécrétées au niveau du pôle basolatéral dans la circulation sanguine. Associées à des protéines-vecteurs TBG (Thyroxin binding protein) et TBPA (thyroxin binding prealbumin), elles sont acheminées vers leurs tissus périphériques cibles. L'ensemble du processus de biosynthèse des hormones thyroïdiennes – depuis l'expression du NIS en passant par l'organification de l'iode jusqu'à l'endocytose de la Tg – est régulé principalement par une hormone hypophysaire : la TSH (Thyroid Stimulation Hormone) et par la concentration plasmatique en iode. La sécrétion de TSH est stimulée par l'hormone hypothalamique TRH (Thyrotropin-Releasing Hormone) et réprimée rétroactivement par T3 et T4 [27].



**Fig. 72 : Biosynthèse des hormones thyroïdiennes**

G : protéine G, AC : Adénylate cyclase, Tg : Thyroglobuline,  
TPO : thyroperoxydase, TSHR : récepteur à la TSH

## 2.3. Le symporteur $\text{Na}^+/\text{I}^-$ : acteur-clé de la captation des iodures

### 2.3.1 Description générale

Le mécanisme de captation des iodures est un transport actif mettant en jeu le symporteur  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  (NIS) (pour revue : [34]). Ce symporteur, identifié par Carrasco et coll. en 1996 [35], est une glycoprotéine membranaire faisant parti de la famille 5 des transporteurs de solutés (SCL5A5 selon la classification de l'OMIM<sup>TM</sup>). Ces transporteurs assurent le transport couplé d'un soluté avec le sodium dans le même sens, le gradient électrochimique du sodium servant de force motrice. Dans le cas du NIS, le transport est séquentiel et ordonné : la fixation de deux  $\text{Na}^+$  rend la protéine apte à fixer un  $\text{I}^-$ . Après un changement de conformation, les ions  $\text{I}^-$  et  $\text{Na}^+$  sont libérés dans l'espace intra-cellulaire [36]. Carrasco et coll. proposent que le NIS soit constitué de 13 segments transmembranaires, la partie N-terminale étant dirigée vers l'espace extra-cellulaire et, par conséquent, la partie C-terminale se trouvant dans l'espace intra-cellulaire. Des sites de glycosylation ont été identifiés sur trois asparagines [37]. Au niveau du segment transmembranaire VII, quatre résidus leucine pourraient être impliqués dans un motif « Leucine Zipper » permettant l'oligomérisation du NIS dans la membrane [34]. Le NIS pourrait donc être dans sa forme fonctionnelle multimérique, hypothèse confortée par des observations en microscopie électronique par cryo fracture sur des ovocytes de *Xenopus laevis* exprimant le NIS [36]. Des études d'immunomarquage ont confirmé que la protéine NIS est principalement localisée sur le pôle basolatéral des thyrocytes. Elle n'est pas détectée sur leur pôle apical [38].

Le NIS est aussi exprimé dans d'autres tissus tels que les glandes salivaires, la muqueuse gastrique, le corps cilié de l'œil, les glandes mammaires (en période de gestation et de lactation). Cependant, la teneur en iode de ces tissus est beaucoup plus faible que celle du tissu thyroïdien en raison de l'absence d'un système de fixation de l'iode équivalent à la iodation de la Tg par la TPO. Au sein de ces tissus, le NIS assure aussi le transport des iodures dans le compartiment intra-cellulaire mais les mécanismes régulant son expression et son activité sont tissu-dépendants. Le rôle physiologique de l'expression du NIS et de l'iode dans certains de ces tissus n'a pas été encore élucidé.

### 2.3.2 Mécanismes de régulation du NIS au niveau thyroïdien

Au niveau thyroïdien, la TSH est un régulateur spécifique majeur de l'expression de la protéine NIS. Sa fixation à son récepteur (TSHR), couplé aux protéines G, entraîne l'activation de la voie de l'AMPc par l'intermédiaire de la sous-protéine  $G\alpha_s$  [39, 40]. Des études *in vivo* et *in vitro* ont clairement montré que l'expression de la protéine NIS et de son ARNm est augmentée quelques heures après une stimulation par la TSH, ce qui entraîne un influx d'iodure plus important [26]. La TSH est aussi impliquée dans des mécanismes de régulation post-traductionnels contrôlant l'adressage et/ou le maintien à la membrane du NIS. Chez la lignée FRTL-5 (Fisher Rat Thyroid Line Low serum 5%), la privation de TSH entraîne une redistribution sub-cellulaire de la protéine NIS depuis la membrane vers le compartiment intra-cellulaire. Or, le NIS présente plusieurs sites consensus des kinases. Il a été montré que l'état de phosphorylation de ces sites est différent en présence ou en absence de TSH. Puisque chez d'autres transporteurs l'état de phosphorylation régule leur distribution sub-cellulaire, il est actuellement proposé que la TSH contrôlerait aussi l'adressage du NIS *via* un mécanisme de phosphorylation dépendant de la PKA (phosphokinase A) [41].

La concentration plasmatique de l'iodure est, à l'instar de la TSH, un acteur principal de régulation de la captation des iodures par la thyroïde et, par là même, de l'activité du NIS. En 1948, Wolf et Chaikoff ont montré que l'organification de l'iode au niveau de la thyroïde de rat est bloquée *in vivo* par une forte élévation de la concentration plasmatique en iodure ( $> 30 \mu\text{M}$ ). Au bout de deux jours d'exposition à cette forte concentration, un phénomène d'adaptation est observé : l'organification de l'iode et la biosynthèse normale des hormones T3 et T4 sont restaurées. Ces phénomènes, appelés respectivement « Effet Wolf-Chaikoff » et « Echappement à l'effet Wolf-Chaikoff », constituent des mécanismes protecteurs et de maintien de l'activité physiologique de la thyroïde [42]. Ils ne sont pas, à l'heure actuelle, entièrement élucidés. Des composés organo-iodés intracellulaires de type iodolipide et/ou iodolactone, qui résulteraient de la réaction de l'acide arachidonique avec I<sup>-</sup> en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ont été proposés comme régulateurs de ces mécanismes. Ils inhibent, en particulier, l'adénylate cyclase ce qui devrait *a priori* impliquer une modulation de l'expression de la protéine NIS par contrôle négatif de la voie de l'AMPc [43-45]. Il a été ainsi montré que la quantité de ARNm du NIS et/ou la quantité de protéine NIS est diminuée en présence d'une forte concentration en iodure. Compte tenu des données disponibles, il est actuellement

impossible de conclure si la régulation par la concentration plasmatique de l'iodure s'effectue au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel [46, 47].

L'expression de la protéine NIS est modulée par un éventail d'autres facteurs. Il a été ainsi montré que la thyroglobuline exerce un rétrocontrôle négatif, qui contrebalance la stimulation exercée par la TSH, en diminuant fortement la quantité d'ARNm du NIS [48]. Ce mécanisme est concordant avec les observations immuno-histologiques qui mettent en évidence que les gros follicules thyroïdiens – donc avec une large colloïde – expriment à leur surface nettement moins de protéines NIS que les follicules en croissance.

Différentes cytokines pro-inflammatoires telles que les facteurs de nécrose tumorale TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , l'interféron IFN- $\gamma$  et certaines interleukines inhibent l'expression de l'ARNm du NIS ainsi que la captation des iodures chez des cellules FRTL-5 et des cellules folliculaires humaines. L'expression du NIS est aussi soumise à une régulation par des facteurs de croissance (Insulin like Growth Factor-1 (IGF-1), Epidermal Growth Factor (EGF)) ou par des hormones autres que la TSH (insuline, oestradiol) [26, 49]. De telles régulations impliquent l'intervention de différentes voies de transduction telle que celle des phosphatidyl inositols. Santisteban et coll. ont ainsi montré que IGF-1 inhibe l'expression du NIS par la voie PI3K (Phosphoinositide 3-kinases) [50].

Par ailleurs, l'étude de la structure et de la séquence protéique du NIS a mis en évidence des éléments structuraux pouvant être impliqués dans des mécanismes post-traductionnels de régulation. Carrasco et coll. ont montré que des positions de phosphorylation sur la protéine NIS pourraient contrôler son maintien à la membrane [41]. De plus, la partie C-terminale du NIS comporte plusieurs séquences caractéristiques, qui, chez d'autres protéines, sont impliquées dans leur adressage sub-cellulaire. Elle présente ainsi un motif di-leucine, permettant l'interaction avec le manteau de clathrine et trois motifs dipeptidiques acides pouvant correspondre à un peptide signal d'adressage. Son domaine PDZ, qui permet des interactions protéine-protéine, pourrait contrôler son maintien à la membrane. Un tel mécanisme a été démontré pour le récepteur GABA : la reconnaissance de son domaine PDZ par la protéine LIN-7 empêche son internalisation chez les cellules épithéliales [51].

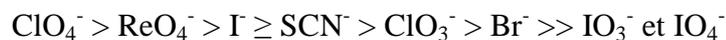
En conclusion, les mécanismes de régulation du NIS sont relativement complexes. Si les mécanismes de régulation d'expression sont relativement documentés, très peu de données

ont été établies sur les mécanismes de régulation post-traductionnelles du NIS (pour revues sur ces aspects : [26, 34, 49, 52]).

### 2.3.3 *Inhibiteurs du transport des iodures*

Au niveau du thyrocyte, l'influx d'iodure peut être bloqué par une perturbation du gradient de sodium induit grâce à des inhibiteurs métaboliques ou des inhibiteurs de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase tels que l'ouabaine [53]. La perturbation du gradient de sodium c'est-à-dire de la force motrice du transport implique une inhibition indirecte du symporteur  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ .

Il a été montré qu'une série d'anions monovalents sont compétitifs de l'iodure au niveau de son site de fixation sur le NIS. Des études d'électrophysiologie sur des ovocytes de *X. laevis* ont démontré que ces anions sont transportés et, par conséquent, constituent des substrats du NIS. Le perchlorate serait, quant à lui, un inhibiteur [36]. Cependant, Wolff et coll. ont mis en évidence que le perrhenate ( $\text{ReO}_4^-$ ) et le pertechnetate<sup>16</sup> ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) sont pris en charge par le NIS. Puisque ces anions sont homologues au perchlorate, ils déduisent que  $\text{ClO}_4^-$  est aussi transporté. Ils évoquent un transport neutre c'est-à-dire le transport d'un  $\text{ClO}_4^-$  avec un seul cation  $\text{Na}^+$ , pour expliquer les résultats obtenus par électrophysiologie [54]. A la suite de ces travaux, Wolff et coll. ont proposé l'ordre de sélectivité suivante pour ces anions :



L'ensemble de ces anions serait accumulé dans la thyroïde, à l'exception du  $\text{SCN}^-$  qui est métabolisé par réaction avec la TPO. Anbar *et al.* ont précédemment montré que l'ion tétrafluoroborate ( $\text{BF}_4^-$ ) est un anion compétitif de l'iodure et qu'il est transporté par le NIS [55].

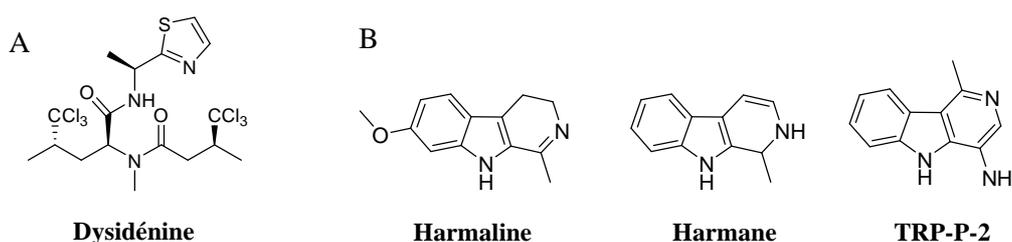
A l'heure actuelle, seules deux familles de molécules ont été décrites comme des inhibiteurs directs de la protéine NIS :

- La dysidénine : il s'agit d'un produit naturel hexachloré à quatre centres asymétriques et extrait de l'éponge *Dysidea herbacea* (Fig. 73). Van Sande et coll. ont montré sur des coupes thyroïdiennes de chien que cette molécule bloque la captation des iodures par un mécanisme pseudo-compétitif. A 5  $\mu\text{M}$ , l'influx de  $\text{I}^-$  est inhibé de 50 % [54, 56].

---

<sup>16</sup> Le pertechnetate est très utilisé en imagerie médicale pour évaluer *in vivo* le fonctionnement thyroïdien

- L'harmaline et ses analogues (Fig. 73) : Ces molécules, appartenant à la famille des  $\beta$ -carbolines, sont connues pour être des inhibiteurs compétitifs de la fixation de  $\text{Na}^+$  chez différents transporteurs tels que le transporteur rénal de glucose  $\text{Na}^+$ -dépendant [57], l'antiport  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  [58] ou l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  placentaire [59]. Le mécanisme mis en jeu pour le NIS serait identique. L'harmaline et TRP-P-2 sont les inhibiteurs connus les plus efficaces de la captation de l'iodure chez la lignée FRTL-5. [60].



**Fig. 73 : Inhibiteurs du NIS décrits dans la littérature**

L'activité de ces molécules sur l'influx d'iodure n'a été exploitée ni en recherche pharmacologique ni à des fins thérapeutiques. La dysidénine est très difficile à extraire ainsi qu'à synthétiser en raison de ces centres asymétriques. L'harmaline et ses analogues sont des inhibiteurs de faible affinité et sont, de plus, peu spécifiques puisqu'ils agissent sur d'autres transporteurs.

### **3. Conclusions**

Depuis la découverte de l'hormone T4 par Kendall en 1910, la biosynthèse des hormones thyroïdiennes a été largement étudiée. Le symporteur  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  y joue un rôle clé en permettant la captation des iodures plasmatiques par les thyrocytes. Ce transporteur a fait l'objet de nombreuses études qui ont permis sa caractérisation. Cependant, les mécanismes régulant son expression et son activité ne sont pas entièrement élucidés.

Actuellement, aucun inhibiteur spécifique et puissant de la protéine NIS n'a été identifié et valorisé. Or, une telle molécule constituerait un outil pharmacologique d'intérêt pour compléter les études physiologiques sur le transport d'iodure au niveau des thyrocytes. De plus, des inhibiteurs du NIS pourraient offrir une nouvelle alternative thérapeutique pour des pathologies thyroïdiennes telles que la maladie de Grave et les thyrocytoses (induites par

une surcharge plasmatique en iode) ou en cas d'exposition accidentelle à des isotopes radioactifs de l'iode.

Ce contexte a motivé notre groupe à découvrir des inhibiteurs de la captation des iodures chez des cellules exprimant le NIS. Notre objectif principal est l'identification d'inhibiteurs spécifiques du symporteur  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ . Cependant, des inhibiteurs agissant sur une autre cible pourrait également nous conduire à l'identification d'une protéine clé du mécanisme de régulation du NIS. Ils constituent donc un domaine d'étude intéressant qui nécessite le recours à des stratégies telles que le photomarquage ou la chromatographie d'affinité.

Dans ce qui suit, nous allons présenter les avancées de notre groupe concernant ce projet de recherche, les nouveaux objectifs que nous visons à court terme et les travaux que nous avons réalisés au cours de cette thèse.



## **Bibliographie**

1. Walsh DP, Chang YT: **Chemical genetics.** *Chem Rev* 2006, **106**:2476-2530.
2. King RW: **Chemistry or biology: which comes first after the genome is sequenced.** *Chem Biol* 1999, **6**:R327-333.
3. Tochtrop GP, King RW: **Target Identification Strategies in Chemical Genetics.** *Comb Chem High Throughput Screen* 2004, **7**:677-688.
4. Hart CP: **Finding the target after screening the phenotype.** *Drug Discov Today* 2005, **10**:513-519.
5. Sawin KE, LeGuellec K, Philippe M, Mitchison TJ: **Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor.** *Nature* 1992, **359**:540-543.
6. Mayer TU, Kappor TM, Haggarty SJ, King RW, Schreiber SL, Mitchison TJ: **Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen.** *Science* 1999, **286**:971-974.
7. Haggarty SJ, Mayer TU, Miyamoto DT, Fathi R, King RW, Mitchison TJ, Schreiber SL: **Dissecting cellular processes using small molecules: identification of colchicine-like, taxol-like and other small molecules that perturb mitosis.** *Chem Biol* 2000, **7**:275-286.
8. Janssen R: **Successful RNAi-based Target Discovery Programs in a Wide Range of Human Diseases.** In *43ème Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique Lille. 2007*
9. Maffrand J-P: **Medicinal Chemistry : a Support to Chemical Biology and a Necessity For Drug Discovery.** In *43ème Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique; Lille. MedChem; 2007: 26.*
10. Kley N: **Chemical Dimerizers and Three-Hybrid Systems: Scanning the Proteome for Targets of Organic Small Molecules.** *Chem Biol* 2004, **11**:599-608.
11. Becker F, Murthi K, Smith C, Come J, Costa-Roldán N, Kaufmann C, Hanke U, Degenhart C, Baumann S, Wallner W: **A Three-Hybrid Approach to Scanning the Proteome for Targets of Small Molecule Kinase Inhibitors.** *Chemistry and Biology* 2004, **11**:211-223.
12. Tanaka H, Ohshima N, Hidaka H: **Isolation of cDNAs Encoding Cellular Drug-Binding Proteins Using a Novel Expression Cloning Procedure: Drug-Western.** *Mol Pharmacol* 1999, **55**:356-363.
13. Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL: **A Mammalian Histone Deacetylase Related to the Yeast Transcriptional Regulator Rpd3p.** *Science* 1996, **272**:408-411.
14. Harding MW, Galat A, Uehling DE, Schreiber SL: **A receptor for the immunosuppressant FK 506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase.** *Nature* 1989, **341**:758-760.
15. Burdine L, Kodadek T: **Target Identification in Chemical Genetics: The (Often) Missing Link.** *Chem Biol* 2004, **11**:593-597.
16. Dormán G, Prestwich GD: **Using photolabile ligands in drug discovery and development.** *Trends Biotechnol* 2000, **18**:64-77.
17. Kotzyba-Hibert F, Kapfer I, Goeldner M: **Recent Trends in Photoaffinity Labeling.** *Angew Chem Int Ed* 1995, **34**:1296-1312.
18. Colca JR, Harrigan GG: **Photo-Affinity Labeling Strategies in Identifying the Protein Ligands of Bioactive Small Molecules: Examples of Targeted Synthesis of Drug Analog Photoprobes.** *Comb Chem High Throughput Screen* 2004, **7**:699-704.

19. Hatanaka Y, Sadakane Y: **Photoaffinity Labeling in Drug Discovery and Developments: Chemical Gateway for Entering Proteomic Frontier.** *Curr Top Med Chem* 2002, **2**:271-288.
20. Hatanaka Y, Kempin U, Jong-Jip P: **One-step synthesis of biotinyl photoprobes from unprotected carbohydrates.** *J Org Chem* 2000, **65**:5639-5643.
21. Hatanaka Y, Hashimoto M, Kanaoka Y: **A Rapid and Efficient Method for Identifying Photoaffinity Biotinylated Sites within Proteins.** *J Am Chem Soc* 1998, **120**:453-454.
22. Fleming SA: **Chemical Reagents in Photoaffinity Labeling.** *Tetrahedron* 1995, **51**:12479-12520.
23. Colca JR, McDonald WG, Waldon DJ, Thomasco LM, Gadwood RC, Lund ET, Cavey GS, Mathews WR, Adams LD, Cecil ET: **Cross-linking in the Living Cell Locates the Site of Action of Oxazolidinone Antibiotics.** *J Biol Chem* 2003, **278**:21972-21979.
24. Darvas F, Dorman G, Urge L, Szabo I, Ronai Z, Sasvari-Szekely M: **Combinatorial chemistry. Facing the challenge of chemical genomics.** *Pure Appl Chem* 2001, **73**:1487-1498.
25. Berger-Dutrieux N: **Histologie de la thyroïde.** In *La Thyroïde* 2nd edition. Edited by Elsevier. Paris; 2001: 11-14.[Elsevier Esem (Series Editor)
26. Wolff J: **Iodure, le Système de Transport Actif et les Flux d'Iodure dans la Thyroïde.** In *La Thyroïde*. Edited by Elsevier. Paris; 2001: 15-21
27. Massart C, Corbineau E: **Transporteurs d'iodures et fonction thyroïdienne Iodide transporters and thyroid function.** *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2006, **21**:138-143.
28. Walker SP, Wachs TD, Gardner JM, Lozoff B, Wasserman GA, Pollitt E, Carter JA: **Child development: risk factors for adverse outcomes in developing countries.** *Lancet* 2007, **369**:145-157.
29. Delange F: **Goitres : Les troubles dus à la carence en iode (TDCI).** In *La Thyroïde*. Edited by Elsevier. Paris; 2001: 355-363
30. Delange F: **Iodine deficiency in Europe and its consequences: an update.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002, **29 Suppl 2**:S404-416.
31. Scott DA, Wang R, Kremann TM, Sheffield VC, Karniski LP: **The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein.** *Nat Genet* 1999, **21**:440-443.
32. Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD, Green ED: **Pendrin, the Protein Encoded by the Pendred Syndrome Gene (PDS), Is an Apical Porter of Iodide in the Thyroid and Is Regulated by Thyroglobulin in FRTL-5 Cells.** *Endocrinology* 2000, **141**:839-845.
33. Rodriguez AM, Perron B, Lacroix L, Caillou B, Leblanc G, Schlumberger M, Bidart JM, Pourcher T: **Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes.** *J Clin Endocrinol Metab* 2002, **87**:3500-3503.
34. Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N: **The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance.** *Endocr Rev* 2003, **24**:48-77.
35. Dai G, Levy O, Carrasco N: **Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter.** *Nature* 1996, **379**:458-460.
36. Eskandari S, Loo DD, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N: **Thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity.** *J Biol Chem* 1997, **272**:27230-27238.

37. Levy O, De la Vieja A, Ginter CS, Riedel C, Dai G, Carrasco N: **N-linked glycosylation of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS). Implications for its secondary structure model.** *J Biol Chem* 1998, **273**:22657-22663.
38. Paire A, Bernier-Valentin F, Selmi-Ruby S, Rousset B: **Characterization of the rat thyroid iodide transporter using anti-peptide antibodies. Relationship between its expression and activity.** *J Biol Chem* 1997, **272**:18245-18249.
39. Nissim M, Lee KO, Petrick PA, Dahlberg PA, Weintraub BD: **A sensitive thyrotropin (TSH) bioassay based on iodide uptake in rat FRTL-5 thyroid cells: comparison with the adenosine 3',5'-monophosphate response to human serum TSH and enzymatically deglycosylated bovine and human TSH.** *Endocrinology* 1987, **121**:1278-1287.
40. Weiss SJ: **Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3', 5'-monophosphate and dependent on protein synthesis.** *Endocrinology* 1984, **114**:1099-1107.
41. Riedel C, Levy O, Carrasco N: **Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin.** *J Biol Chem* 2001, **276**:21458-21463.
42. Wolff J, Chaikoff IL: **Plasma Inorganic Iodide as a Homeostatic Regulator of Thyroid Function.** *J Biol Chem* 1948, **174**:555-564.
43. Grollman EF, Smolar A, Ommaya A, Tombaccini D, Santisteban P: **Iodine suppression of iodide uptake in FRTL-5 thyroid cells.** *Endocrinology* 1986, **118**:2477-2482.
44. Dugrillon A: **Iodolactones and iodoaldehydes--mediators of iodine in thyroid autoregulation.** *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996, **104**:41-45.
45. Panneels V, Van Sande J, Van den Bergen H, Jacoby C, Braekman JC, Dumont JE, Boeynaems JM: **Inhibition of human thyroid adenyl cyclase by 2-iodoaldehydes.** *Mol Cell Endocrinol* 1994, **106**:41-50.
46. Eng PHK, Cardona GR, Fang SL, Previti M, Alex S, Carrasco N, Chin WW, Braverman LE: **Escape from the Acute Wolff-Chaikoff Effect is Associated with a Decrease in Thyroid Sodium/Iodide Symporter Messenger Ribonucleic Acid and Protein 1.** *Endocrinology* 1999, **140**:3404-3410.
47. Spitzweg C, Joba W, Morris JC, Heufelder AE: **Regulation of sodium iodide symporter gene expression in FRTL-5 rat thyroid cells.** *Thyroid* 1999, **9**:821-830.
48. Suzuki K, Mori A, Saito J, Moriyama E, Ullianich L, Kohn LD: **Follicular Thyroglobulin Suppresses Iodide Uptake by Suppressing Expression of the Sodium/Iodide Symporter Gene.** *Endocrinology* 1999, **140**:5422-5430.
49. Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P: **A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications.** *Eur J Endocrinol* 2006, **155**:495-512.
50. Garcia B, Santisteban P: **PI3K Is Involved in the IGF-I Inhibition of TSH-Induced Sodium/Iodide Symporter Gene Expression.** *Mol Endocrinol* 2002, **16**:342-352.
51. Perego C, Vanoni C, Villa A, Longhi R, Kaech SM, Fröhli E, Hajnal A, Kim SK, Pietrini G: **PDZ-mediated interactions retain the epithelial GABA transporter on the basolateral surface of polarized epithelial cells.** *EMBO J* 1999, **18**:2384-2393.
52. Plantin-Carrenard E, Foglietti MJ, Beaudeau JL: **Sodium/iodide symporter: physiopathological aspects and therapeutic perspectives.** *Pathol Biol (Paris)* 2005, **53**:174-182.
53. Tyler DD, Gonze J, Lamy F, Dumont JE: **Influence of mitochondrial inhibitors on the respiration and energy-dependent uptake of iodide by thyroid slices.** *Biochem J* 1968, **106**:123-133.

54. Van Sande J, Massart C, Beauwens R, Schoutens A, Costagliola S, Dumont JE, Wolff J: **Anion Selectivity by the Sodium Iodide Symporter.** *Endocrinology* 2003, **144**:247-252.
55. Anbar M, Guttman S, Lewitus Z: **Effect of Monofluorosulphonate, Difluorophosphate and Fluoroborate Ions on the Iodine Uptake of the Thyroid Gland.** *Nature* 1959, **183**:1517-1518.
56. Van Sande J, Deneubourg F, Beauwens R, Braekman JC, Daloz D, Dumont JE: **Inhibition of iodide transport in thyroid cells by dysidenin, a marine toxin, and some of its analogs.** *Mol Pharmacol* 1990, **37**:583-589.
57. Aronson PS, Bounds SE: **Harmaline inhibition of Na-dependent transport in renal microvillus membrane vesicles.** *Am J Physiol* 1980, **238**:F210-217.
58. Suleiman MS, Reeves JP: **Inhibition of Na<sup>+</sup>-Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> exchange mechanism in cardiac sarcolemmal vesicles by harmaline.** *Comp Biochem Physiol C* 1987, **88**:197-200.
59. Kulanthaivel P, Leibach FH, Mahesh VB, Cragoe EJ, Jr., Ganapathy V: **The Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger of the placental brush-border membrane is pharmacologically distinct from that of the renal brush-border membrane.** *J Biol Chem* 1990, **265**:1249-1252.
60. Kaminsky SM, Levy O, Garry MT, Carrasco N: **Inhibition of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter by harmaline and 3-amino-1-methyl-5H-pyrido(4,3-b)indole acetate in thyroid cells and membrane vesicles.** *Eur J Biochem* 1991, **200**:203-207.

## Chapitre 2 : Synthèse d'inhibiteurs et d'analogues photoactivables

Ce chapitre traite des travaux menés autour des inhibiteurs du symporteur  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  identifiés par notre groupe. Dans un premier temps, nous présenterons l'avancement de ce projet de recherche ce qui permettra de définir les objectifs que nous nous sommes fixés et les stratégies que nous avons sélectionnées pour les réaliser. Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse seront ensuite présentés et discutés.

### 1. Avancées des travaux sur les inhibiteurs du NIS au sein de notre groupe

La recherche d'inhibiteurs spécifiques du symporteur  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  (NIS) a été initiée au laboratoire, lors des travaux de thèse de N. Lecat-Guillet, par la mise au point et la réalisation d'un test de criblage à haut-débit [1]. Ce test a consisté à suivre la captation des iodures par des cellules HEK-293 sur-exprimant hNIS, en utilisant comme traceur le radionucléide  $^{125}\text{I}^-$ . L'incubation des cellules avec une molécule inhibant le hNIS se traduit par une diminution de l'influx d'iodure et donc par une baisse de la radioactivité intra-cellulaire (Fig. 74) [2].

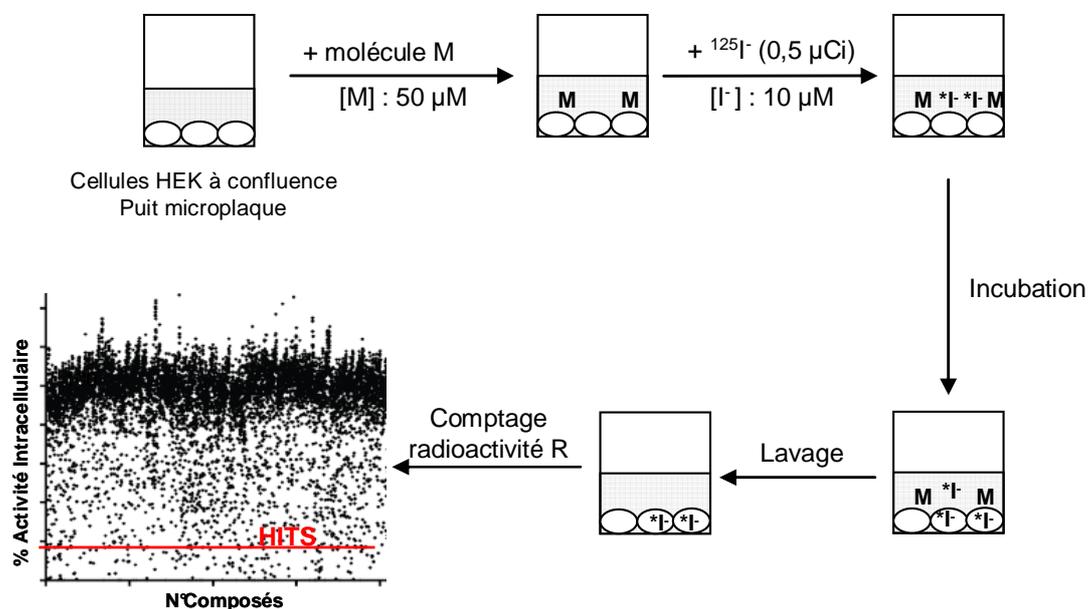


Fig. 74 : Principe du test de criblage.

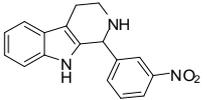
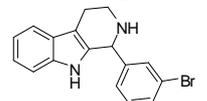
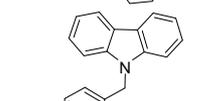
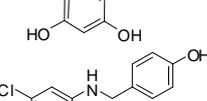
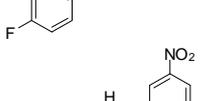
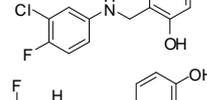
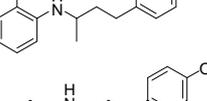
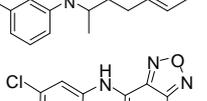
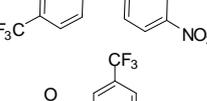
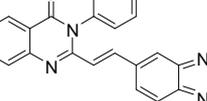
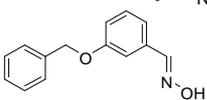
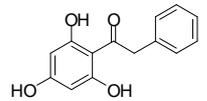
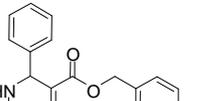
L'évaluation de la chimiothèque commerciale (Diverset, Chembridge) a conduit à la sélection de 413 hits. Les tests de confirmation, de validation et les études d'effet dose-réponse ont permis de sélectionner, parmi ces hits, 13 molécules présentant une IC<sub>50</sub> – définie comme la concentration induisant une diminution de 50% de la radioactivité intra-cellulaire – de l'ordre du  $\mu\text{M}$  pour les lignées hNIS-HEK-293 et FRTL-5<sup>17</sup> (Tab. 15).

Ces treize composés<sup>18</sup> ont fait l'objet d'études supplémentaires dans le but de caractériser leurs effets pharmacologiques. En particulier, des études d'électrophysiologie ont permis de distinguer deux catégories d'inhibiteurs : certains auraient une action spécifique sur le symporteur Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> alors que d'autres bloqueraient l'influx d'iodure indirectement, par interaction avec des protéines autre que le NIS (Tab. 15). Puisque l'inhibition de la captation des iodures est immédiate, nous pensons que ces protéines-cibles pourraient être impliquées soit dans l'homéostasie du sodium (par inhibition de la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, en particulier), soit dans des voies de régulation post-traductionnelles contrôlant l'activité du NIS. Comme présenté dans le chapitre précédent (cf. paragraphe 2.3.2.), il pourrait s'agir de protéines partenaires du NIS agissant par exemple, sur son oligomérisation, son maintien à la membrane ou son internalisation.

---

<sup>17</sup> FRTL-5 est une lignée cellulaire générée à partir de follicules thyroïdiens, exprimant donc le symporteur Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> murin.

<sup>18</sup> A partir de lots de produits (5 mg) fournis par Chembridge

Composés	IC <sub>50</sub> (μM)		Electrophysiologie*
	hNIS-HEK-293	FRTL-5	Nature de l'inhibition
	3	0,3	Indirecte, réversible
	2	0,4	Indirecte, réversible
	0,7	0,4	Directe, irréversible
	12	0,8	Directe, réversible
	3	0,04	Directe, réversible
	6	0,6	Directe, réversible
	4	0,5	Directe, réversible
	0,2	0,3	Directe, irréversible
	7	2	Indirecte, réversible
	3	0,7	Directe, réversible
	9	1	Directe, réversible
	0,4	0,5	Directe, irréversible
	2	Non reproductif	Directe, irréversible

**Tab. 15 : Structures des 13 inhibiteurs les plus actifs.**  
**Résultats d'IC<sub>50</sub> et d'électrophysiologie d'après Lecat-Guillet [1].**

\* Les expériences d'électrophysiologie ont été effectuées sur des ovocytes de *X. laevis* exprimant transitoirement hNIS par T. Pourcher (CEA/TIRO).

## 2. Objectifs et stratégies

### 2.1. Objectifs

Les composés de la chimiothèque sont commercialisés en lot de 5-10 mg. La synthèse de la plupart de ces molécules n'est pas décrite dans la littérature. Pour poursuivre l'étude des inhibiteurs de la captation des iodures, il nous est donc nécessaire de mettre au point leur synthèse. L'obtention de ces composés (purs) permettra de les caractériser chimiquement et de valider leur activité. Cette étape est primordiale compte tenu de la possibilité de dégradation [3] ou de la présence d'impuretés au sein des composés de la chimiothèque. Par ailleurs, ces voies de synthèse doivent permettre d'accéder à des quantités en composé de l'ordre du gramme pour pouvoir mener des études *in vivo* chez le petit animal. Nous souhaitons, en particulier, étudier leur influence sur la captation et la décharge des iodures, au niveau de la thyroïde du rat, par imagerie micro-SPECT *via* un traçage par le radionucléide  $^{131}\text{I}$ . Cette étude sera menée en collaboration avec l'équipe de T. Pourcher (CEA/TIRO).

Les treize inhibiteurs identifiés sont susceptibles d'inhiber l'influx d'iodure par des mécanismes d'action différents. Pour les molécules exerçant une inhibition considérée comme directe, les résultats d'électrophysiologie ne permettent pas de démontrer de manière irréfutable que le NIS est leur protéine-cible. Or, si on démontre qu'elles se fixent effectivement sur le NIS, ces molécules constitueront des outils pharmacologiques d'intérêt. Pour les molécules exerçant une inhibition considérée comme indirecte, les protéines avec lesquelles elles interagissent sont inconnues. Or, l'identification de ces protéines est un enjeu capital compte tenu des faibles données disponibles concernant les mécanismes de régulation de l'activité NIS (cf. Chapitre 1 paragraphe 2.3.2.)

Dans ce contexte, nous nous proposons d'identifier les protéines cibles (NIS ou autres protéines) par une des stratégies que nous avons présentées précédemment. Compte tenu des  $\text{IC}_{50}$  des inhibiteurs (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ) et de la probabilité que les protéines cibles soient membranaires, le photomarquage d'affinité nous semble plus adapté que la chromatographie d'affinité. Puisque les inhibiteurs sont actifs sur FRTL-5 et hNIS-HEK-293, nous envisageons d'effectuer les études de photomarquage d'affinité sur ces deux lignées, ce qui pourrait aider pour la discrimination des marquages non spécifiques ou dépendants de la lignée cellulaire.

Dans le cadre de ce travail de thèse, les objectifs principaux sont :

- la mise au point des voies de synthèse des inhibiteurs permettant d'accéder à des quantités de l'ordre du gramme
- l'obtention des sondes photoactivables 'froides' et radiomarquées des inhibiteurs
- l'évaluation de l'activité de l'ensemble de ces composés sur des lignées cellulaires exprimant la protéine NIS : hNIS-HEK-293 et FRTL-5.

## 2.2. Choix des inhibiteurs et stratégie de synthèse

Compte tenu du temps disponible, il nous était impossible d'effectuer ces études sur l'ensemble des inhibiteurs. Nous avons donc sélectionné quatre molécules à partir de la nature de leur inhibition (directe ou indirecte) et de leur accessibilité chimique. Nous avons choisi l'inhibiteur **4** qui est un analogue de l'harmaline et du TRP-P-2 décrits comme des inhibiteurs de faible affinité du NIS (cf. Chapitre 1 paragraphe 2.3.3.). Cette molécule se caractérise par une  $IC_{50}$  faible et par une inhibition qui serait indirecte. Les dérivés des N-benzyl-anilines nous ont paru intéressants compte tenu de leur faible  $IC_{50}$  et de leur inhibition directe. Nous avons ainsi choisi le composé **3** ainsi que son analogue **2** qui n'est pas présent dans la liste des inhibiteurs mais dont l' $IC_{50}$  a été déterminée à 50  $\mu$ M sur HEK-293 et la synthèse facile à réaliser. De plus, nous nous sommes intéressés au composé **1** qui induirait une inhibition directe et irréversible sur le hNIS (Fig. 75).

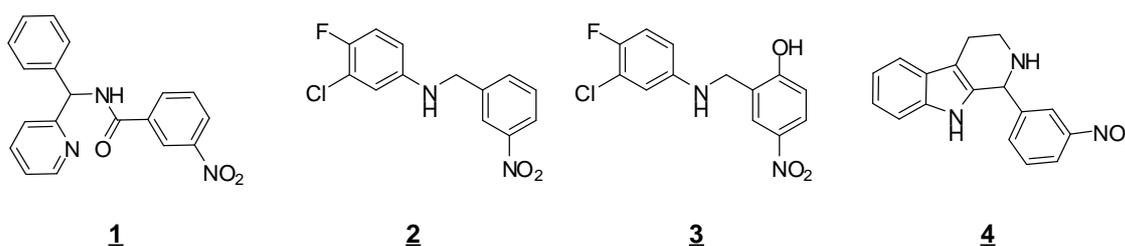


Fig. 75 : Inhibiteurs sélectionnés

Pour la synthèse des analogues photoactivables de ces inhibiteurs, nous avons choisi comme photophore l'azoture car il peut être facilement introduit à partir de la fonction nitro-aromatique. Ci-dessous sont présentés les analogues azotures des composés **1**, **2**, **3** et **4** que nous nous proposons de synthétiser.

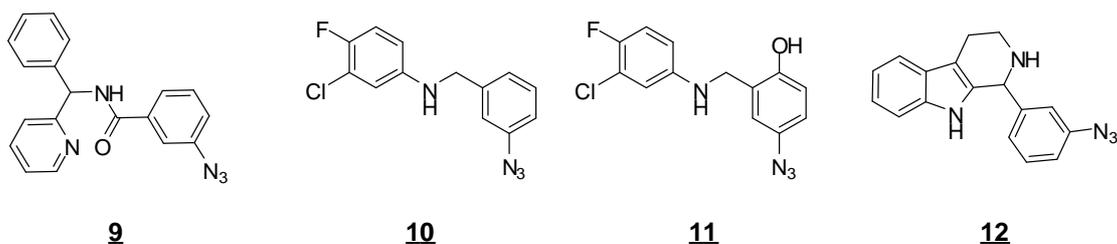
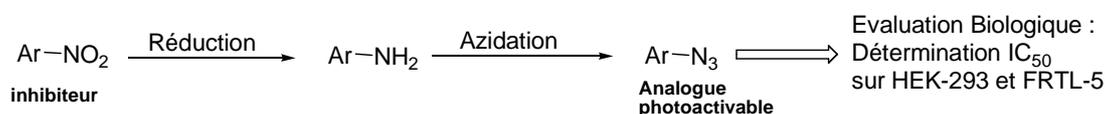


Fig. 76 : Analogues photo-activables des composés 1, 2, 3 et 4

Notre stratégie de synthèse des sondes photo-activables radio-marquées consiste à :

- Synthétiser l'analogue photo-activable : pour chaque inhibiteur, la fonction nitro aromatique est réduite en amine. Le groupement azoture est ensuite introduit par une des réactions classiques d'azidation décrites dans la littérature [4, 5].
- Evaluer les  $IC_{50}$  de l'analogue photo-activable sur les lignées HEK-293 et FRTL-5.
- Si les  $IC_{50}$  obtenues sont de l'ordre du  $\mu M$  alors le marquage radio-isotopique de la sonde est réalisé. Nous pensons introduire ce marquage en dernière étape à partir d'un précurseur iodé par tritiation en présence de palladium sur charbon (échange  $I^3H$ ) comme décrit par Faucher *et al.* [6].



Si  $ArN_3$  actif ( $IC_{50}$  de l'ordre du  $\mu M$ )  $\xrightarrow{\text{Marquage au } ^3H}$

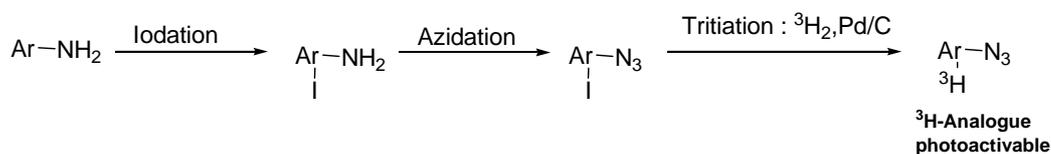


Fig. 77 : Stratégie de synthèse et de marquage des sondes photoactivables

### 3. Synthèses des inhibiteurs et de leurs analogues azotures

Dans ce qui suit, nous présentons les voies de synthèses que nous avons mises au point pour les inhibiteurs **1**, **2**, **3** et **4** ainsi que pour leurs analogues anilines et azotures. L'évaluation de l'activité de ces composés sera présentée dans le sous-chapitre 4.

#### 3.1. Synthèses des inhibiteurs **1**, **2**, **3** et **4**

Compte tenu de leur diversité structurale, nous avons mis au point une méthode de synthèse pour chacun de ces composés. Il est à noter que ces composés ne sont pas décrits dans la littérature, à l'exception du composé **4** pour lequel il est proposé une méthode de synthèse par micro-ondes que nous ne pouvons pas mettre en oeuvre au laboratoire [7].

##### 3.1.1 Synthèse du composé **1**

L'analyse rétro-synthétique du composé **1** suggère qu'il peut être synthétisé par couplage de l'acide 3-nitrobenzoïque (produit commercial) avec la phényl(pyridin-2-yl)méthanamine. La phényl(pyridin-2-yl)méthanamine peut être obtenue par réduction de l'oxime commerciale correspondante (Fig. 78).

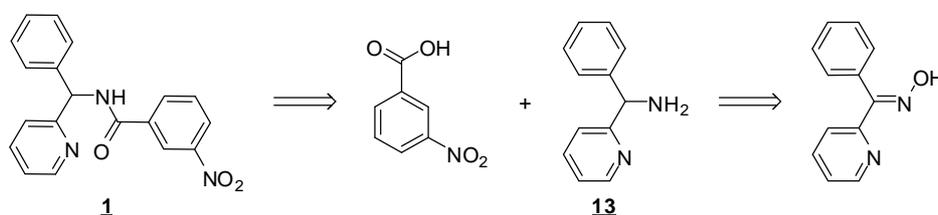
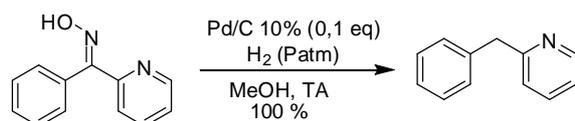


Fig. 78 : Analyse rétro-synthétique du composé **1**

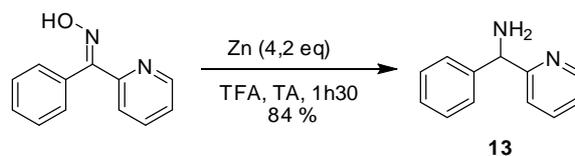
##### Réduction de l'oxime en amine primaire

La réduction des oximes en amines primaires est réalisable par un grand nombre d'agents réducteurs tels que  $\text{LiAlH}_4$ ,  $\text{BH}_3$ ,  $\text{Na/Alcool}$ , métal/acide ou par hydrogénation catalytique [8]. Nous avons essayé de réaliser la réduction de l'oxime de phényl(pyridin-2-yl)méthanone en amine par hydrogénation en présence de palladium sur charbon (Pd/C). Cette réaction a conduit exclusivement à la formation du produit de désamination c'est-à-dire à la 2-benzylpyridine, sans que l'on puisse isoler l'amine intermédiaire (Fig. 79).



**Fig. 79 : Réaction de désamination de l'oxime par hydrogénation**

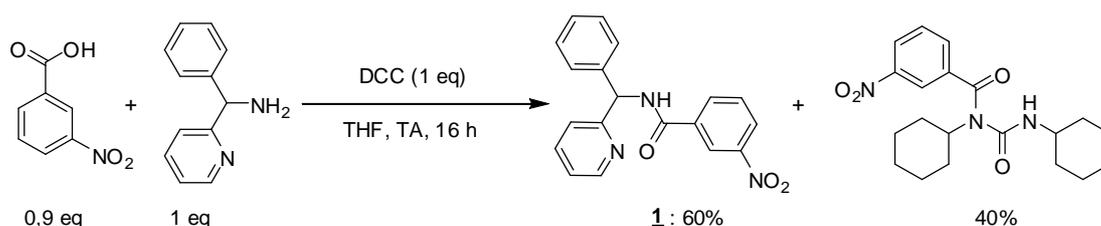
Nous avons finalement réalisé la conversion de l'oxime, à partir du protocole proposé par Negi *et al.* [9], en utilisant comme réducteur le système zinc/acide trifluoroacétique (Fig. 80). Le composé **13** a été obtenu avec un rendement de 84 %.



**Fig. 80 : Synthèse du composé **13****

### Formation de la liaison amidique

Nous avons réalisé la réaction entre l'acide 3-nitrobenzoïque et la phényl(pyridin-2-yl)méthanamine **13**, en utilisant comme agent de couplage le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). L'analyse des produits de réaction (CLHP-SM et <sup>1</sup>H-RMN) mettent en évidence la formation du composé **1** mais aussi celle d'un produit secondaire : N-cyclohexyl-N-(cyclohexylcarbamoyl)-3-nitrobenzamide, à hauteur de 40% (Fig. 81).



**Fig. 81 : Synthèse du composé **1** par couplage par le DCC**

La formation de ce produit secondaire N-acylurée est probablement facilitée par le substituant nitro électro-attracteur qui favorise le réarrangement intra-moléculaire de l'intermédiaire réactionnel résultant de la condensation de l'acide carboxylique et de la DCC (Fig. 82) [10].

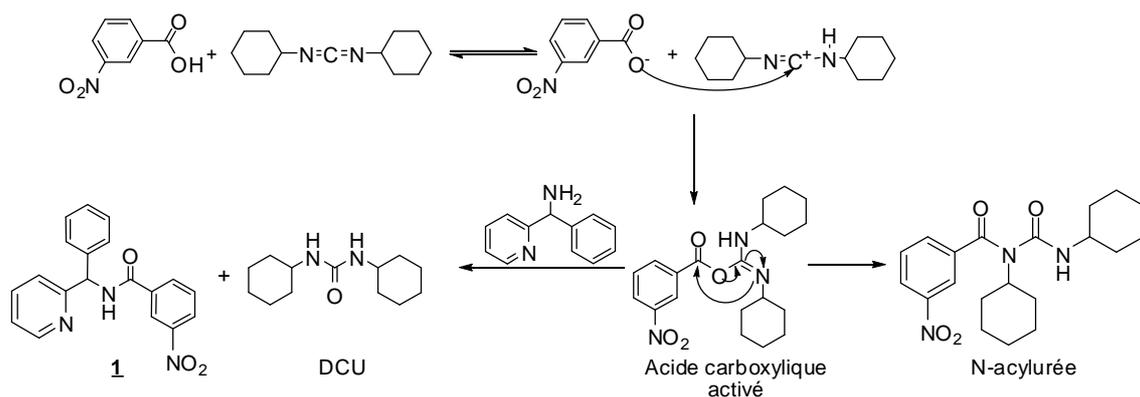


Fig. 82 : Réactions mises en jeu par activation de l'acide carboxylique par le DCC d'après Khorana [10]

Pour éviter la formation du produit secondaire, nous avons effectué la réaction en utilisant un uronium comme agent de couplage : le HBTU (N,N,N',N'-tetraméthyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uroniumhexafluorophosphate). Cette procédure nous a permis d'obtenir le composé **1** avec un rendement de 90% (Fig. 83).

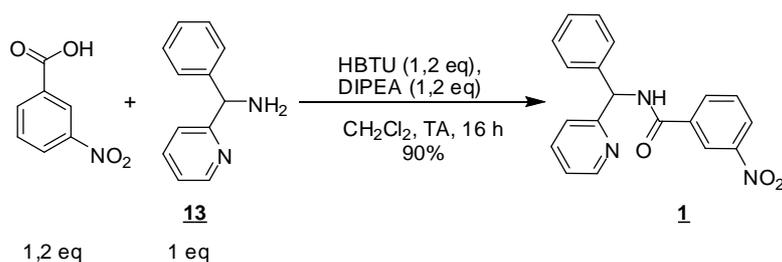


Fig. 83 : Synthèse du composé **1**

### 3.1.2 Synthèse des composés **2** et **3**

Les composés **2** et **3** peuvent être obtenus soit par alkylation d'un dérivé benzylique activé, soit par amination réductrice d'un aldéhyde. La réaction d'alkylation n'a pas été envisagée à cause d'un éventuel risque de poly-alkylation et des conditions expérimentales – temps de réaction long, reflux – décrites dans la littérature pour des structures analogues [11]. Les composés **2** et **3** ont donc été obtenus par amination réductrice, selon les conditions proposées par Abdel-Magid *et al.* pour une réaction mettant en jeu une amine faiblement basique [12]. L'agent réducteur, le triacétoxyborohydride de sodium, est ajouté en même temps que l'aldéhyde et l'amine, sans attendre la formation au préalable de l'imine. Les rendements sont de 64% et 78%, pour les composés **2** et **3**, respectivement (Fig. 84). Les composés ont été obtenus à l'échelle du gramme. En ce qui concerne le composé **3**, il est isolé en fin de réaction, par précipitation, à la suite de l'ajout d'une solution de NaOH 1N. Ce fait

nous laisse suggérer qu'une synthèse à plus large échelle ( $\approx$  dizaine de grammes) pourra être facilement réalisée si une méthode de purification par recristallisation est mise au point.



Fig. 84 : Synthèse des composés **2** et **3**

### 3.1.3 Synthèse du composé **4**

La voie de synthèse principale des tétrahydro- $\beta$ -carbolines repose sur la réaction de condensation de Pictet-Spengler mettant en jeu un dérivé de la tryptamine et un aldéhyde. Elle se déroule, en général, en présence d'un catalyseur acide qui, par protonation de l'imine intermédiaire, facilite la formation du cycle à 6. Le composé **4** a été synthétisé en utilisant comme catalyseur l'acide trifluoroacétique avec un rendement supérieur à 80% (Fig. 85) [13]. Ce composé a été synthétisé à l'échelle de la dizaine de grammes. Il est facilement isolable car il précipite en fin de réaction et peut être purifié par recristallisation.

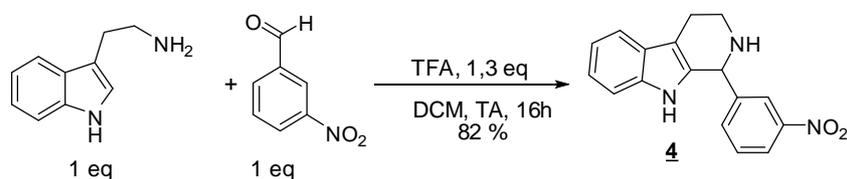


Fig. 85 : Synthèse du composé **4**

Puisque le composé **4** présente un centre asymétrique, nous avons souhaité évaluer l'activité de ses deux énantiomères **4a** et **4b**. A cette fin, une fraction du composé **4** (7 mg) a été purifiée par CLHP sur colonne chirale. Environ 3 mg de chaque énantiomère **4a** et **4b** ont été obtenus sous forme optiquement pure (e.e > 99%). En raison de la faible quantité de produit purifié, la configuration absolue des deux énantiomères n'a pas été déterminée.

### 3.2. Synthèses des dérivés anilines

Les dérivés anilines des composés **1** à **4** sont les intermédiaires de synthèse des analogues azotures. L'activité de ces molécules sera aussi évaluée sur les lignées hNIS-HEK-293 et FRTL-5.

#### 3.2.1 Synthèses des dérivés anilines de **1** et **4**

Les dérivés anilines **5** et **8** ont été synthétisés par hydrogénation sur Pd/C des composés nitro-aromatiques **1** et **4**, respectivement. Après filtration sur célite, ces composés ont été obtenus avec des rendements proches de 90 % et une pureté supérieure à 98 % (Fig. 86).

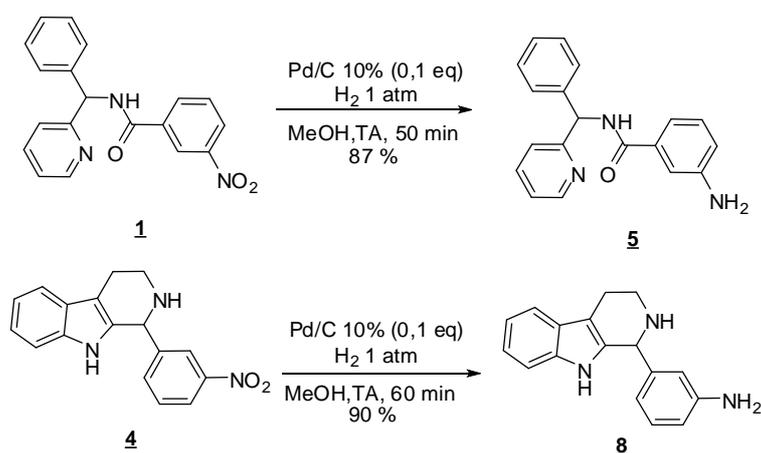
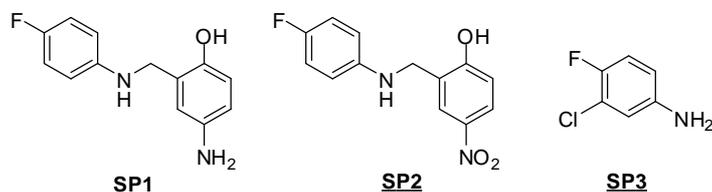


Fig. 86 : Synthèse des dérivés aniline **5** et **8**

#### 3.2.2 Synthèses des dérivés anilines de **2** et **3**

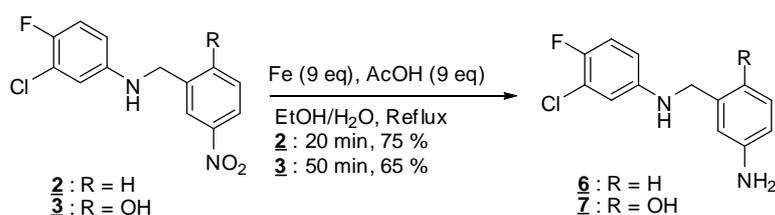
L'hydrogénation sur palladium sur charbon ne peut pas être utilisée pour l'obtention des dérivés anilines **6** et **7** à partir des composés **2** et **3**. Les composés **2** et **3** présentent deux groupements sensibles – la liaison C<sub>ar</sub>-Cl et le benzyle – qui peuvent être clivés dans ces conditions. Pour éviter ces réactions secondaires, des conditions réactionnelles plus douces ont été testées. Ainsi, pour la réduction du composé **3**, l'hydrogène a été remplacé par le formiate d'ammonium. Lorsque ce dernier est introduit à 6 eq ou à 4 eq, le produit majoritaire formé (> 80 %) correspond au produit **SP1** (réduction du nitro et clivage du Cl) (Fig. 87, Tab. 16). Pour 2 eq de formiate d'ammonium, l'avancement de la réaction est très faible (Tab. 16).

Ces résultats suggèrent que la réduction du groupement nitro et le clivage du Cl sont quasi concomitants.

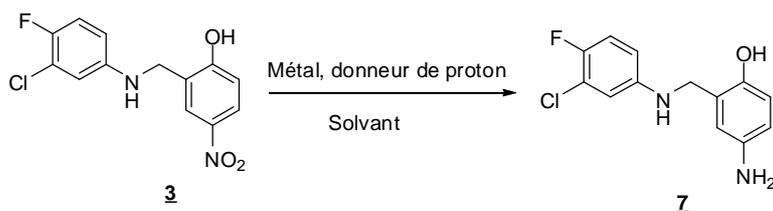


**Fig. 87 : Produits secondaires observés lors des tentatives de réduction du composé 3**

Nous avons ensuite envisagé la méthode de réduction mise au point par Moody *et al.*[14]. Elle repose sur l'utilisation de l'indium, en association avec le chlorure d'ammonium, en milieu méthanolique. Il a été montré que ce système peut réduire sélectivement le groupement nitro aromatique en présence de groupements sensibles. Cependant, l'application de cette méthode au composé 3 n'a pas donné de résultats satisfaisants (taux de conversion faible, apparition de **SP2** et **SP3**) (Fig. 87, Tab. 16). Finalement, le système réducteur Fer/acide acétique a conduit aux résultats les plus satisfaisants (Fig. 87, Tab. 16). Les conditions réactionnelles ont été mises au point à partir de protocoles de la littérature [15, 16]. La diminution du temps de réaction, nous a permis de diminuer la proportion du produit de débénylation (**SP3**) et d'augmenter significativement les rendements. Les analogues anilines des composés 2 et 3 ont finalement été obtenus par réduction par le système Fe/AcOH avec un rendement de 75 % et 65 %, respectivement (Fig. 88).



**Fig. 88 : Synthèse des dérivés anilines 6 et 7**



Métal	Donneur de proton	Conditions	CLHP-SM. Brut réactionnel Proportions UV(200-400 nm)
Pd/C 10% (0,1 eq)	NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> (6 eq)	MeOH, TA, 30 min	<b>7</b> : 19% <b>SP1</b> : 81%
Pd/C 10% (0,1 eq)	NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> (4 eq)	MeOH, TA, 20 min	<b>7</b> : 18% <b>SP1</b> : 82 %
Pd/C 10% (0,1 eq)	NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> (2 eq)	MeOH, TA, 80 min	<b>3</b> : 77 % <b>7</b> : 15 % <b>SP2</b> : 2 % <b>SP3</b> : 6 %
Indium (7 eq)	NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> (8 eq)	MeOH, reflux, 120 min	<b>3</b> : 81 % <b>7</b> : 15 % <b>SP3</b> : 4 %
Indium (7eq)	NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> (8 eq)	MeOH, TA, 16 h	Pas d'avancement
Fer (6 eq)	ACOH (6 eq)	EtOH/H <sub>2</sub> O, reflux, 60 min	<b>3</b> : 38% <b>7</b> : 62%
Fer (9 eq)	ACOH (9 eq)	EtOH/H <sub>2</sub> O, reflux, 70 min	<b>3</b> : 0,5 % <b>7</b> : 75 % <b>SP3</b> : 25 %

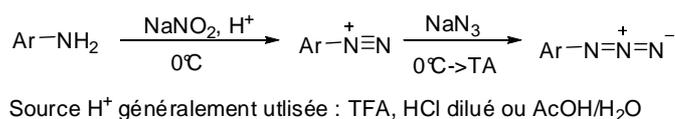
**Tab. 16 : Récapitulatif des conditions expérimentales testées  
pour la réduction du composé **3** et résultats obtenus**

### 3.3. Synthèses des azotures d'aryle

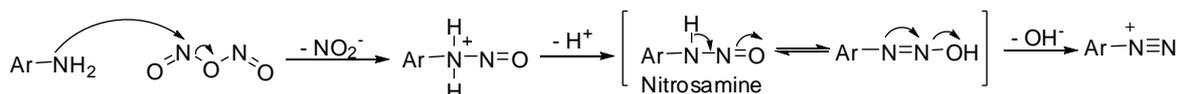
Dans ce qui suit, nous décrirons les méthodes d'obtention des azotures d'aryle les plus citées de la littérature puis nous présenterons les synthèses des composés **9**, **10**, **11** et **12** que nous avons effectuées à partir des précurseurs amino-aromatiques. L'objectif a été d'obtenir ces composés, le plus rapidement possible, avec une pureté suffisante (> 95 %) pour leur évaluation biologique. Par conséquent, à ce stade de l'étude, aucune tentative n'a été menée pour améliorer les rendements et les voies de synthèse de ces composés

### 3.3.1 Méthodes de synthèse décrites dans la littérature

Les azotures d'aryle sont généralement préparés à partir des amines aromatiques correspondantes [17]. La voie de synthèse la plus utilisée consiste à former le sel de diazonium que l'on fait réagir ensuite *in situ* avec l'anion azoture (Fig. 89). La formation du diazonium se déroule en condition acide, en présence de nitrite de sodium. Il est proposé que l'acide nitreux se dimériserait en  $N_2O_3$ . Cet intermédiaire transférerait ensuite le groupement nitroso ( $NO^+$ ) sur l'amine aromatique présente sous forme libre. Il se forme ainsi une espèce intermédiaire, la nitrosamine, qui, dans le cas des amines primaires, est très réactive et conduit, après déshydratation, au diazonium [5]. Contrairement à la réaction de Sandmeyer, la formation de l'azoture, à partir du diazonium, ne procède pas par un clivage de la liaison  $C_{ar}-N$ . L'ion azoture attaque sur l'azote  $\beta$  du diazonium induisant la formation de pentazènes et pentazole intermédiaires qui se réarrangent en perdant une molécule de  $N_2$  pour donner le composé azoture d'aryle [18] (Fig. 89).



#### Etape 1 : Diazotation



#### Etape 2 : Formation de l'azoture d'aryle

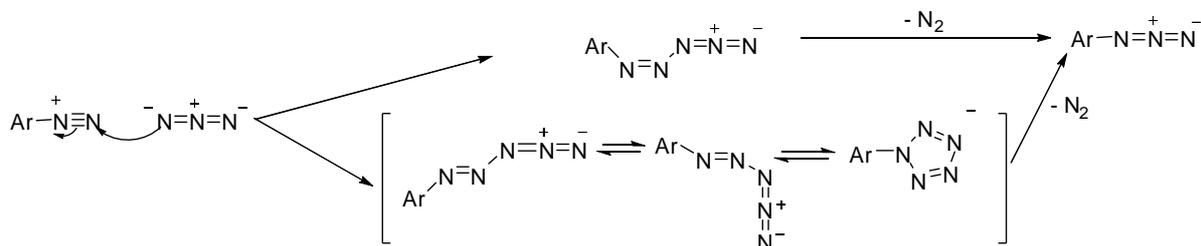


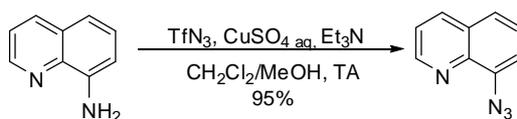
Fig. 89 : Mécanisme de diazotation et de formation de l'azoture d'après [5] et [18]

Pour réagir avec  $N_2O_3$ , il est nécessaire que l'amine soit sous forme libre ( $NH_2$ ). Le pH réactionnel pour la réaction de diazotation des amines aromatiques est généralement inférieur à 3. Or, à ce pH, les amines aliphatiques sont très majoritairement sous forme

protonée ( $pK_a \approx 9-11$ ) alors que les amines aromatiques sont, en proportions proches, sous forme protonée et déprotonée ( $pK_a \approx 4-5$ ). Il est donc théoriquement possible, d'observer sur une structure comportant ces deux types d'amine, la formation régiosélective du diazonium à partir de l'amine aromatique sans qu'interviennent des réactions secondaires sur l'amine aliphatique [5].

La formation des azotures d'aryle par diazotation nécessite des conditions réactionnelles drastiques (milieu oxydant et acide) qui sont incompatibles avec certains groupements. Des variantes de cette réaction ont donc été proposées. Das *et al.* ont montré la possibilité de générer le diazonium en pH neutre en remplaçant l'ion nitrite par le nitrite de *tert*-butyle [19]. La formation de l'azoture est ensuite réalisée par ajout de l'azoture de sodium [19] ou de l'azoture de trimethylsilane [20]. Cette méthode est particulièrement intéressante pour les amines aromatiques substituées par des groupements électro-attracteurs tels que les groupements cyano ou acide carboxylique. Pour de tels composés, des rendements atteignant 90 % sont rapportés.

Wong et coll. ont développé une méthode efficace de synthèse des azotures de sucre par transfert diazo [21]. Cette méthode a été très récemment adaptée aux amines aromatiques par Liu *et al.* [4]. Elle consiste à faire réagir l'azoture de triflyle sur l'amine, en présence d'un catalyseur métallique divalent et d'une base. L'azoture de triflyle est préalablement préparé par réaction entre l'azoture de sodium et l'anhydrique triflique.



**Fig. 90 : Synthèse du 8-azidoquinoline d'après Liu *et al.* [4].**

Le mécanisme de cette réaction est inconnu. Néanmoins, pour la synthèse d'azotures de sucre, Wong et coll. ont proposé un mécanisme basé sur la formation d'un intermédiaire tétrazène stabilisé par le métal divalent qui génèrerait l'azoture souhaité après réarrangement [22]. D'après ce mécanisme, une amine secondaire ne peut pas réagir, ce qui rend cette méthode particulièrement intéressante pour un composé présentant à la fois une amine aromatique primaire et secondaire. Dans le cas de la méthode via diazotation, il serait nécessaire de protéger l'amine secondaire pour éviter la formation de la nitrosamine (Fig. 89).

Liu *et al.* ont montré, sur des structures benzyliques simples, que cette réaction peut être réalisée en présence de groupements divers (acide carboxylique, alcool et amine secondaire benzyliques). Cependant, les rendements sont très faibles lorsque les anilines sont substituées par certains groupements très électro-attracteurs [4]. Cette méthode a été récemment utilisée pour la synthèse d'un analogue photo-activable d'un antibiotique : l'acide fusidique [23].

En marge de ces méthodes de synthèse à partir des amines aromatiques, les azotures d'aryle peuvent être obtenus à partir des halogénures d'aryle par formation des composés organométalliques correspondants (lithien et de grignard) puis par réaction avec l'azoture de para-toluènesulfonyle. De manière plus anecdotique, dans le cas de substrats aromatiques très pauvres en électrons – telle que la chloronitropyridine – l'azidation peut être effectuée par substitution nucléophile aromatique par l'anion azoture [17]. Très récemment, il a été montré que des iodures d'aryle peuvent être convertis en azoture, en présence d'azoture de sodium, de proline et d'iodure de cuivre (I) [24].

Dans le cadre de notre étude, compte tenu des données de la littérature, les synthèses des azotures d'aryle ont été envisagées, soit par la méthode *via* diazotation, soit par la méthode par transfert diazo. L'aniline **5** ne présente pas de fonctions sensibles. Par conséquent, ces deux méthodes de synthèse sont envisageables. A l'inverse, les composés **6**, **7** et **8** présentent une amine secondaire pouvant subir une réaction de nitrosation. Pour ces composés, compte tenu des mécanismes réactionnels putatifs, la méthode de transfert diazo semble être plus indiquée.

### 3.3.2 Synthèse de l'azoture **9**

L'aniline **5** ne présente pas de fonctions sensibles. L'introduction du groupement azoture ne présente donc pas de difficultés. Le composé **9** a été obtenu par la méthode *via* diazotation avec un rendement de 87 % (Fig. 91).

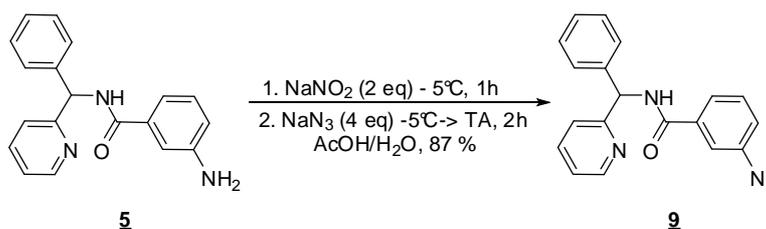


Fig. 91 : Synthèse de l'analogue azoture **9** de l'inhibiteur **1**

### 3.3.3 Synthèse des azotures d'aryle 10 et 11

Les composés 6 et 7 comportent deux fonctions amines aromatiques – l'une primaire et l'autre secondaire – possédant un caractère basique proche. Lors de la réaction de diazotation, il semble donc difficile d'empêcher la formation de la nitrosamine sur l'amine secondaire (cf. paragraphe 3.3.1). Par conséquent, compte tenu des mécanismes réactionnels putatifs, nous avons choisi la méthode de synthèse par transfert diazo.

L'azoture 10 a été obtenu avec un rendement de 60 % par cette méthode (Fig. 92). Ce rendement peut être amélioré puisque l'analyse CLHP-SM du brut réactionnel montre une conversion partielle du produit de départ. Cette conversion partielle du composé 6 est probablement due à une sur-évaluation de la quantité d'azoture de triflyle résultant d'une hydrolyse partielle de l'anhydride triflique commercial.

Ces conditions appliquées au composé 7 ne permettent pas d'obtenir, de manière quantitative, le composé 11 (Fig. 92). L'analyse CLHP-SM du milieu réactionnel met en évidence la formation de plusieurs produits secondaires et, en particulier, celle d'un produit de  $[M+1]^+ = 146$  pouvant correspondre à la 3-chloro-4-fluorobenzèneamine (**SP3**, Fig. 87) et celle d'un produit de masse  $[M+1]^+ = 295$  non identifié. L'azoture 11 est très minoritaire dans le milieu réactionnel (9% en absorbance UV) et n'a pas pu être isolé par chromatographie sur silice.

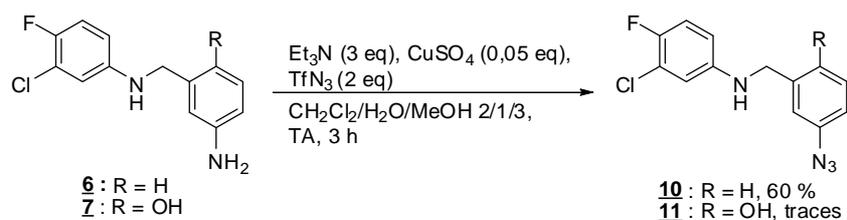
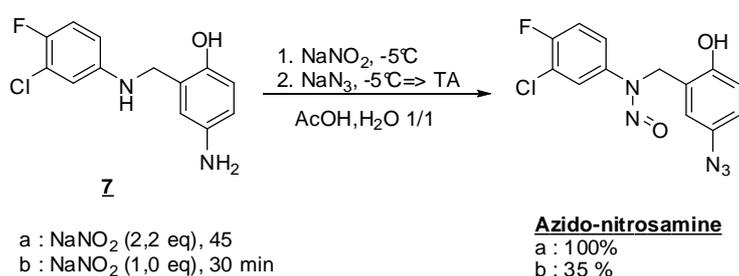


Fig. 92 : Réaction de transfert diazo sur les anilines 6 et 7

A notre connaissance, la formation d'un azoture aromatique par la méthode de transfert diazo, en présence d'un groupement phénol non protégé, n'a jamais été décrite. A l'inverse, des exemples de formation d'un azoture aliphatique en présence d'une fonction phénol non protégée (analogues de la tyrosine) sont décrits dans la littérature avec de bons rendements [25, 26]. Pour expliquer le résultat précédent, il peut être supposé que le groupement phénol entre en compétition avec le groupement aniline (moins nucléophile

qu'une amine aliphatique) pour la complexation du composé **7** sur le catalyseur métallique [22].

La méthode de synthèse la plus décrite pour l'obtention d'azoture de dérivés phénoliques est la réaction *via* diazotation [27]. Cependant dans le cadre de notre étude, cette méthode ne permet pas l'obtention du composé **11**. Même en diminuant le nombre d'équivalents de NaNO<sub>2</sub> et le temps de réaction, seul le composé azido-nitrosamine est observé (d'après les analyses CLHP-SM et <sup>1</sup>HRMN) ce qui confirme que les deux fonctions anilines ont une réactivité équivalente (Fig. 93).



**Fig. 93 : Tentatives d'azidation du composé **7** via la réaction de diazotation et résultats CLHP-SM**

Pour synthétiser du composé **11**, il est donc nécessaire de protéger la fonction aniline secondaire ou la fonction phénol du composé **7** avant de réaliser les réactions *via* diazotation ou par transfert diazo, respectivement. Ces voies de synthèse n'ont pas pu être explorées par manque de temps.

### 3.3.4 Synthèse de l'azoture d'aryle **12**

Compte tenu de la présence de l'amine secondaire aliphatique, la formation du composé **12** a été envisagée par réaction de transfert diazo. La mise en œuvre de cette réaction n'a pas été satisfaisante. L'analyse CLHP-SM du milieu réactionnel montre que la conversion du produit de départ est quasi-totale mais révèle la formation de plusieurs produits secondaires dont principalement le composé azido-imine **SP4** qui co-élue avec le composé **12** (Fig. 94). Ce résultat est corroboré par l'analyse <sup>1</sup>H RMN du brut réactionnel, après extraction, qui met en évidence que le composé **12** est présent à moins de 10 % (d'après l'intégration du pic correspondant à H<sub>10</sub>, δ = 5,2 ppm). La purification du brut réactionnel par chromatographie sur silice n'a pas permis d'isoler le produit **12**.

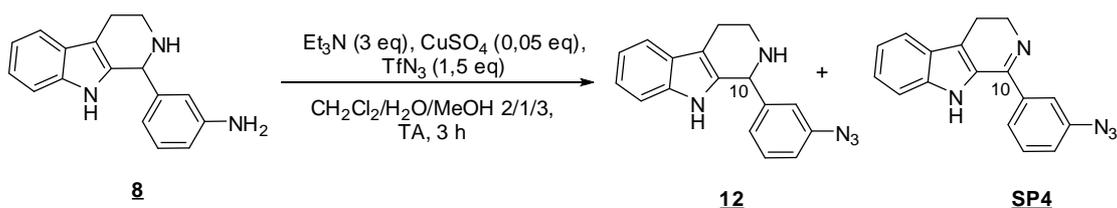


Fig. 94 : Essai d'azidation du composé **8** par transfert diazo

Nous avons alors tenté d'obtenir l'azoture **12** par la réaction *via* diazotation, sans protéger l'amine secondaire, au préalable. Comme prévu, on observe la formation du produit **12** souhaité ainsi que celle du produit secondaire **SP5** correspondant au dérivé azido-nitrosamine. L'analyse CLHP-SM du brut réactionnel suggère la présence très minoritaire du composé **SP4** co-éluant avec le composé **12** (Fig. 95).

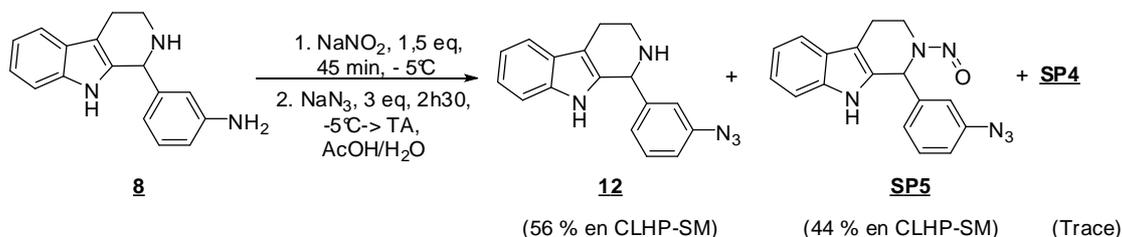


Fig. 95 : Synthèse de l'azoture **12** par réaction de diazotation et résultat d'analyse du brut réactionnel par LCHP-SM

Le produit **12** a été isolé à partir du brut réactionnel avec un rendement de 32 % et une pureté déterminée par  $^1\text{H}$  RMN de 93 %. L'impureté principale présente est le composé **SP4**. De ce lot, nous avons réussi à purifier par chromatographie sur silice une petite quantité de produit (6 mg) ne comportant pas l'impureté **SP4** et dont l'activité sera testée sur les deux lignées cellulaires.

### 3.4. Conclusion

Nous avons mis au point et réalisé les synthèses quantitatives des composés **1**, **2**, **3** et **4** à l'échelle du gramme. Par purification du composé **4** par CLHP sur colonne chirale, les énantiomères **4a** et **4b** ont été obtenus sous forme optiquement pure (e.e > 99%). Les dérivés anilines de chaque composé ont été obtenus avec de bon rendement soit par hydrogénation catalytique, soit par réduction par le système Fe/AcOH. Les méthodes mises au point pour l'obtention des azotures **9** et **10** sont satisfaisantes puisque les produits ont été facilement isolés par chromatographie sur colonne avec un rendement de 87 % et 60 %, respectivement.

L'analogue azoture **12** a été obtenu avec un rendement plus faible (32%) et une pureté  $^1\text{H}$  RMN de 93%. Une fraction du composé **12** a été obtenue avec une pureté suffisante pour son évaluation biologique (pureté > 98%). Si le composé **12** se révèle actif, il sera nécessaire d'améliorer la voie de synthèse pour éviter la formation des deux produits secondaires : la l'azido-nitrosamine (**SP5**) et l'azido-imine (**SP4**). A l'issue de cette étude, nous n'avons pas pu mettre au point la synthèse du composé **11**.

#### **4. Evaluation de l'activité des composés synthétisés**

Les activités des composés synthétisés – inhibiteurs, dérivés anilines et dérivés azotures – ont été déterminées par le test cellulaire mis au point par Lecat-Guillet [1]. Ce test consiste à évaluer, par traçage avec le radionucléide  $^{125}\text{I}$ , l'inhibition exercée par un composé sur la captation d'iodure chez des modèles cellulaires exprimant le NIS.

##### **4.1. Principe et conditions expérimentales**

L'évaluation des composés que nous avons synthétisés est effectuée dans les conditions utilisées par Lecat-Guillet pour pouvoir comparer les résultats obtenus à partir des composés synthétisés avec ceux précédemment obtenus à partir des composés commerciaux. Les tests ont été réalisés sur la lignée cellulaire hNIS-HEK-293 (lignée utilisée lors du criblage à haut-débit) et sur la lignée FRTL-5. La lignée FRTL-5, générée à partir de follicules de thyroïde de rats, constitue un très bon modèle d'étude *in vitro* des cellules thyroïdiennes. Elle exprime naturellement le symporteur  $\text{Na}^+/\text{I}$  murin (rNIS), qui présente une similitude de 93 % et une identité de 84% avec hNIS [28].

Chaque composé est testé sur une gamme de concentrations allant de  $10^{-3}$  à  $10^{-12}$  M. Les cellules sont incubées en présence du composé, de  $^{125}\text{I}$  et d'iodure froid (Fig. 96). Le temps d'incubation a été déduit des courbes cinétiques d'accumulation d'iodure (par traçage par  $^{125}\text{I}$ ) et correspond à un temps situé peu après l'atteinte du palier.

L' $\text{IC}_{50}$  du composé est définie comme la concentration (de ce composé) qui induit une diminution de 50 % de la radioactivité intracellulaire. Elle est déterminée à partir des données expérimentales, par régression non linéaire, en utilisant la relation de Hill.

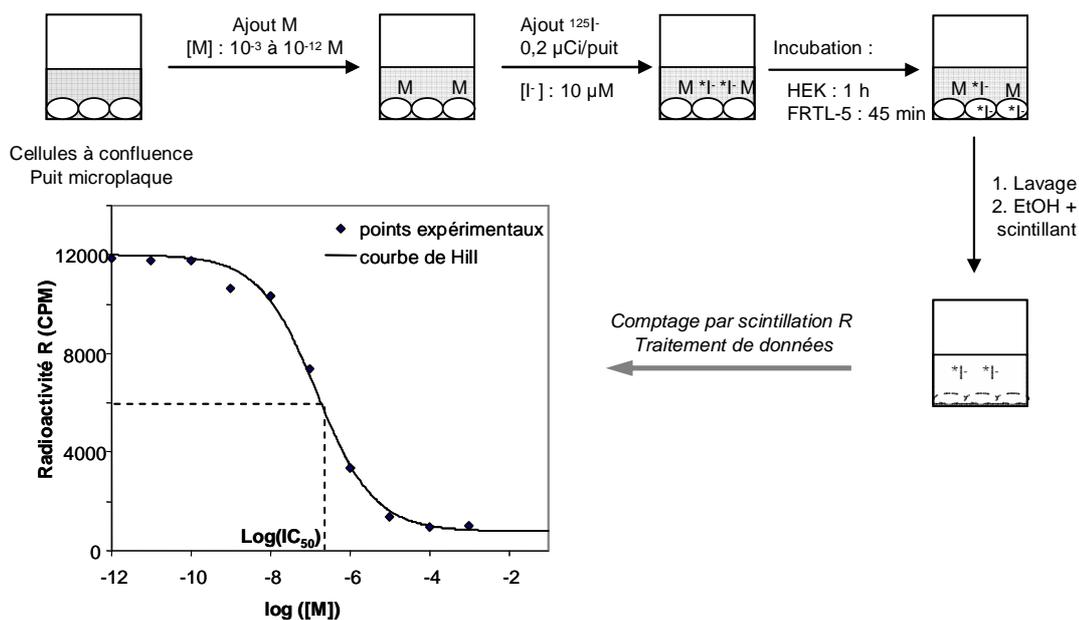
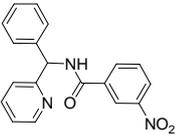
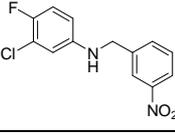
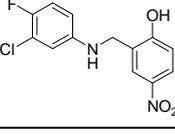
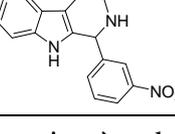


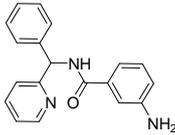
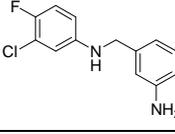
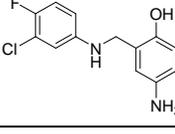
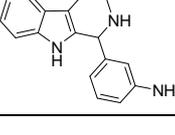
Fig. 96 : Principe du test d'évaluation des composés synthétisés

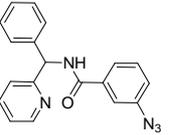
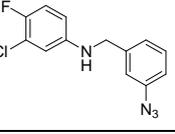
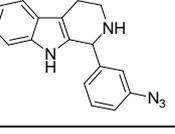
Chaque composé a été testé en duplicat, lors d'au moins deux séries d'évaluation indépendantes. La validité de chaque série de tests a été déterminée par les courbes dose-réponse obtenues pour le perchlorate ( $\text{ClO}_4^-$ ). Le perchlorate est considéré comme un substrat compétitif des iodures pour le symporteur  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  [29] et constitue le témoin positif de nos expériences.

#### 4.2. Résultats de l'évaluation biologique des composés synthétisés

Les courbes dose-réponse obtenues pour le perchlorate permettent de valider l'ensemble des expériences que nous avons effectuées : les  $\text{IC}_{50}$  obtenues pour ce composé sont de l'ordre de  $10^{-6}$  M et  $10^{-7}$  M pour les lignées HEK-293 et FRTL-5, respectivement, ce qui est cohérent avec les données de la littérature. Les valeurs d' $\text{IC}_{50}$  pour les différents composés synthétisés sont présentées dans les tableaux ci-après (Tab. 17).

N°	Hits	Produits synthétisés		Produits commerciaux <sup>a</sup>	
		IC <sub>50</sub> HEK-293	IC <sub>50</sub> FRTL-5	IC <sub>50</sub> HEK-293	IC <sub>50</sub> FRTL-5
<b><u>1</u></b>		Inactif	0,02 μM Mauvaise corrélation	2 μM	Non reproductible
<b><u>2b</u></b>		0,7 μM	0,3 μM	50 μM	n.t
<b><u>3</u></b>		0,1 μM	0,02 μM	3 μM	0,04 μM
<b><u>4</u></b>		1 μM	0,08 μM	3 μM	3 μM
<b><u>4a</u></b>	Enantiomère de <b><u>4</u></b>	5 μM	0,3 μM	n.t	n.t
<b><u>4b</u></b>	Enantiomère de <b><u>4</u></b>	750 μM	35 μM	n.t	n.t

N°	Anilines	IC <sub>50</sub> HEK	IC <sub>50</sub> FRTL-5
<b><u>5</u></b>		Inactif	Inactif
<b><u>6</u></b>		5 μM	0,8 μM
<b><u>7</u></b>		90 μM	1 μM
<b><u>8</u></b>		Inactif	10 μM

N°	Azotures d'aryle	IC <sub>50</sub> HEK	IC <sub>50</sub> FRTL-5
<b><u>9</u></b>		4 μM	0,02 μM Mauvaise corrélation
<b><u>10</u></b>		8 μM	0,9 μM
<b><u>12</u></b>		0,2 μM	0,03 μM

**Tab. 17 : IC<sub>50</sub> des composés synthétisés obtenues sur les lignées hNIS-HEK-293 et FRTL-5**

Chaque composé a été testé en duplicat lors d'au moins deux séries d'évaluation indépendantes.

<sup>a</sup> Pour comparaison, sont mentionnés les IC<sub>50</sub> des produits commerciaux évalués par Lecat-Guillet [1].

<sup>b</sup> Pour rappel, ce composé ne faisait pas parti des hits sélectionnés à la suite du criblage à haut-débit  
n.t : non testé. Mauvaise corrélation : nombre de Hill inférieur à 0,3

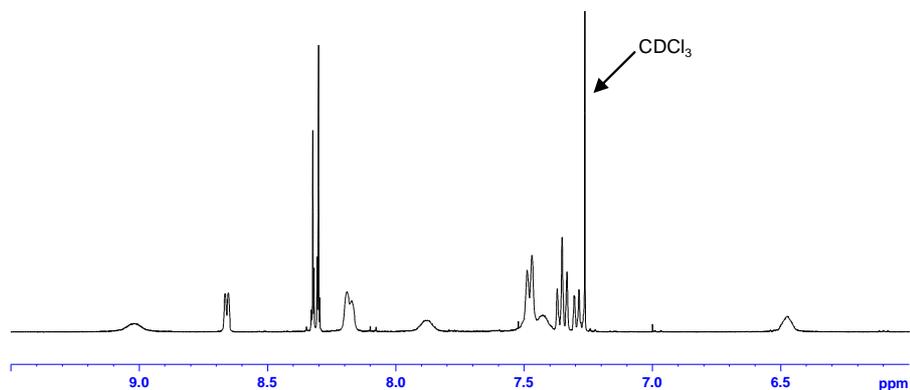
#### 4.2.1 Composé 1 et analogues

Le composés 1 et son analogue aniline 5 sont clairement inactifs sur la lignée HEK-293. Sur la lignée FRTL-5, le composé 5 n'a aucun effet alors que la réponse du composé 1 est ambiguë. Sur cette lignée cellulaire, l'IC<sub>50</sub> du composé 1 est faible (0,02 µM) mais les courbes expérimentales obtenues sont quasiment linéaires sur la gamme de concentrations étudiée, impliquant un nombre de Hill faible (0,2). Un tel résultat suggère un mécanisme d'action non spécifique c'est-à-dire l'intervention de plusieurs cibles protéiques ou plus certainement, une perturbation de l'homéostasie de la cellule. L'analogie azoture 9 a une réponse identique à celle du composé 1 sur la lignée FRTL-5. Cependant, il exerce une forte inhibition (IC<sub>50</sub> = 4 µM) sur la lignée HEK-293 que nous préférons occulter contenu de l'inactivité du composé 1 (Tab. 17). De tels résultats nous ont conduit à éliminer cette famille de composés.

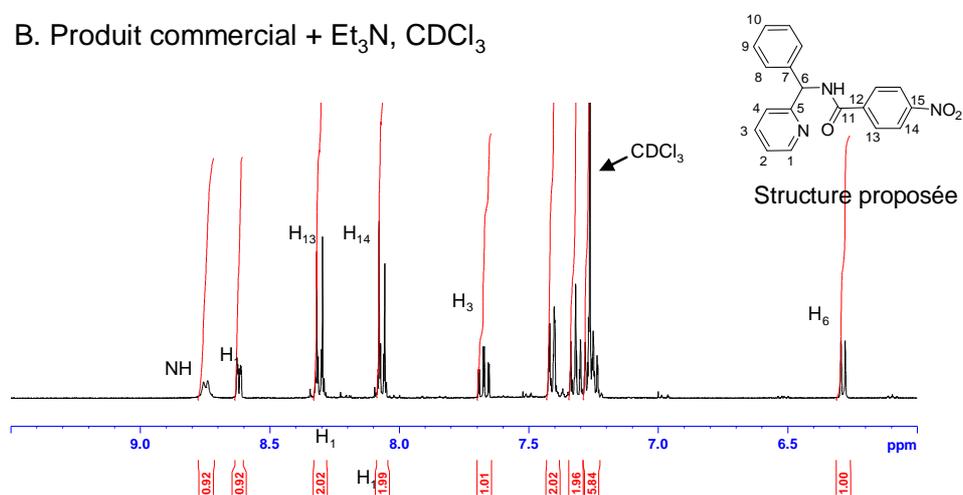
Le test d'activité n'a donc pas permis de valider le composé synthétisé 1. Or, le lot commercial correspondant exerce une réponse franche (IC<sub>50</sub> = 2 µM) sur la lignée HEK-293. Puisque l'analyse CLHP-SM de ce composé est correcte, une <sup>1</sup>H RMN a été effectuée. Le spectre obtenu présente des signaux élargis (Fig. 97.A). L'ajout de Et<sub>3</sub>N affine les signaux. Cependant, le nouveau spectre obtenu (Fig. 97.B) n'est pas compatible avec la structure du composé 1 (Fig. 97.C) mais pourrait correspondre à celle de son isomère 4-nitro-N-(phenyl(pyridin-2-yl)methyl)benzamide. L'absence d'activité sur la lignée HEK-293 du composé 1 synthétisé pourrait donc s'expliquer par la position meta du groupement nitro. Cependant, compte tenu de l'effet de l'ajout de Et<sub>3</sub>N sur le spectre <sup>1</sup>H RMN, nous pouvons raisonnablement conclure que le produit commercial est sous forme de sel. Puisque des anions monovalents inorganiques sont connus pour être compétitifs de l'iodure au niveau de son site de fixation sur NIS [29], nous pouvons proposer que l'inhibition de la captation d'iodure observée pour le lot commercial est due au contre-anion. Ce contre-anion serait de nature inorganique, d'après l'analyse <sup>1</sup>H RMN.

En raison de la faible quantité de produit commercial à notre disposition, des analyses complémentaires n'ont pas été effectuées pour déterminer la nature de ce contre-anion.

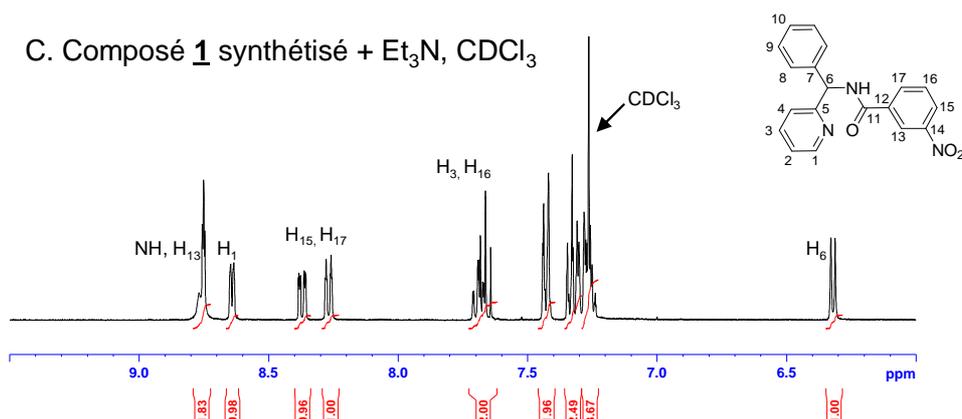
A. Produit commercial,  $\text{CDCl}_3$



B. Produit commercial +  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CDCl}_3$



C. Composé **1** synthétisé +  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CDCl}_3$



**Fig. 97 : Spectres  $^1\text{H}$  RMN (région aromatique) du composé commercial et du composé **1** synthétisé**

A. Le spectre du composé commercial présente des signaux élargis. On n'observe pas de signaux dans la partie aliphatique (données non montrées).

B. L'ajout de  $\text{Et}_3\text{N}$  affine les signaux ce qui suggère que le produit commercial est sous forme de sel. Le spectre ne correspond pas à la structure du composé **1** mais à celle d'un de ses isomères : la 4-nitro-N-(phenyl(pyridin-2-yl)méthyl)benzamide.

C. Spectre  $^1\text{H}$  RMN obtenu par l'analyse du composé synthétisé **1** en présence de  $\text{Et}_3\text{N}$ .

#### 4.2.2 Composés 2, 3 et analogues

Les tests d'évaluation confirment les activités des composés 2 et 3 synthétisés. Le composé 3 présente des  $IC_{50}$  – 0,1 et 0,02  $\mu$ M pour les lignées HEK-293 et FRTL-5, respectivement – équivalentes à celles obtenues pour le produit commercial. Il constitue l'inhibiteur le plus puissant parmi les molécules évaluées. On observe que le composé 3 est significativement plus actif que le lot correspondant de la chimiothèque, ce qui suggère un gain de pureté.

La conversion du groupement nitro aromatique en amine diminue de manière significative l'activité. Ceci est particulièrement vrai pour le composé 7 dont les  $IC_{50}$  ne sont plus que de 90  $\mu$ M et 1  $\mu$ M pour les lignées HEK-293 et FRTL-5, respectivement.

Les analogues aniline 6 et azoture 10 du composé 2 présentent des  $IC_{50}$  comprises entre 0,8 et 8  $\mu$ M et peuvent être considérés comme des inhibiteurs de moyenne activité. Nous pensons cependant, que l'activité du composé 10 est suffisante pour qu'il soit utilisé en photomarquage d'affinité, du moins sur la lignée FRTL-5 ( $IC_{50} = 0,9 \mu$ M).

#### 4.2.3 Composé 4 et analogues

Le composé 4 synthétisé présente des  $IC_{50}$  de 1  $\mu$ M et 0,08  $\mu$ M pour les lignées HEK-293 et FRTL-5, respectivement ce qui confirme son activité. Pour les deux lignées cellulaires, l'énantiomère 4a est significativement plus actif que l'énantiomère 4b. Les  $IC_{50}$  de 4a sont en effet, supérieures d'au moins un facteur 100 à celles de 4b. Par ailleurs, les courbes d' $IC_{50}$  du composé 4 et 4a présentent un nombre de Hill d'environ 1,1. Cette valeur et la forte différence d'activité entre les deux énantiomères suggèrent que l'effet d'inhibition sur la captation des iodures est dû à un mécanisme de reconnaissance spécifique du composé 4a par une protéine cible unique.

Il peut être remarqué que les  $IC_{50}$  du composé 4a sont légèrement supérieures à celles de 4. Cette perte d'activité pourrait s'expliquer par une pesée approximative du composé 4a compte tenu de la faible quantité de produit purifiée.

La conversion du groupement nitro en amine diminue clairement l'activité : le composé 8 est inactif sur la lignée HEK et son  $IC_{50}$  n'est plus que de 10  $\mu$ M pour la lignée FRTL-5. L'introduction du groupement azoture restitue l'activité : le dérivé 12 présente des  $IC_{50}$  du même ordre que le composé 4 et constitue le dérivé azoture le plus actif que nous ayons synthétisé.

#### 4.2.4 Observations générales

Les IC<sub>50</sub> obtenues sur la lignée FRTL-5 sont, en général, inférieures à celles obtenues pour la lignée HEK-293. Cette différence d'activité des inhibiteurs pour ces deux lignées cellulaires a déjà été observée par Lecat-Guillet [1]. De même, lors de l'évaluation de la série d'anions monovalents, Wolff et coll. ont mis en évidence que les IC<sub>50</sub> de Br<sup>-</sup> et ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> obtenues pour la lignée FRTL-5 sont supérieures à celles obtenues pour la lignée COS-7 exprimant hNIS. Pour expliquer ce phénomène, ils évoquent une différence d'affinité des anions résultant du fait que les cellules COS-7 expriment le NIS humain alors que FRTL-5 exprime le NIS murin [29]. Dans le cadre de notre étude, il peut être aussi proposé que le taux d'expression des protéines-cibles (NIS en particulier) soit plus faible chez FRTL-5 que chez HEK-293. Ce phénomène pourrait résulter de différences dans les mécanismes de régulation d'expression ou de transcription pour ces deux lignées cellulaires. Il peut être aussi évoqué l'existence d'un mécanisme de régulation contrôlant la concentration intra-cellulaire en iode chez la lignée thyroïdienne FRTL-5 qui n'existerait pas ou qui serait différent chez HEK-293.

#### 4.2.5 Conclusion

Les courbes dose-réponse du composé **1** et de ses analogues nous ont conduit à éliminer cette famille de molécules. Compte tenu des analyses <sup>1</sup>H RMN, nous pensons que l'activité du lot commercial est due à la présence d'un anion inorganique du type BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>... Ces anions sont connus pour être des substrats compétitifs de l'iodure pour la protéine NIS.

L'activité des inhibiteurs synthétisés **2**, **3**, et **4** a été validée. Ils présentent une activité comparable voire supérieure à celle des produits commerciaux fournis par Chembridge. Ce gain d'activité est lié à un gain de pureté pour les produits synthétisés. En ce qui concerne leurs analogues anilines, la conversion du groupement nitro- en groupement amino- se traduit par une diminution nette de l'activité (d'un facteur 10-10<sup>2</sup>). La délocalisation de charge et l'effet électro-attracteur du groupement nitro- sont donc essentiels à l'interaction des inhibiteurs avec leurs cibles protéiques.

Les dérivés azotures **10** et **12** sont actifs. Compte tenu des différences d'activités des composés **2** et **3**, il est probable que le composé **11** présente une activité supérieure à celle du composé **10**. La synthèse de ce composé devrait être effectuée prochainement. Le composé **12** présente une très bonne activité (en particulier pour la lignée FRTL-5) permettant son

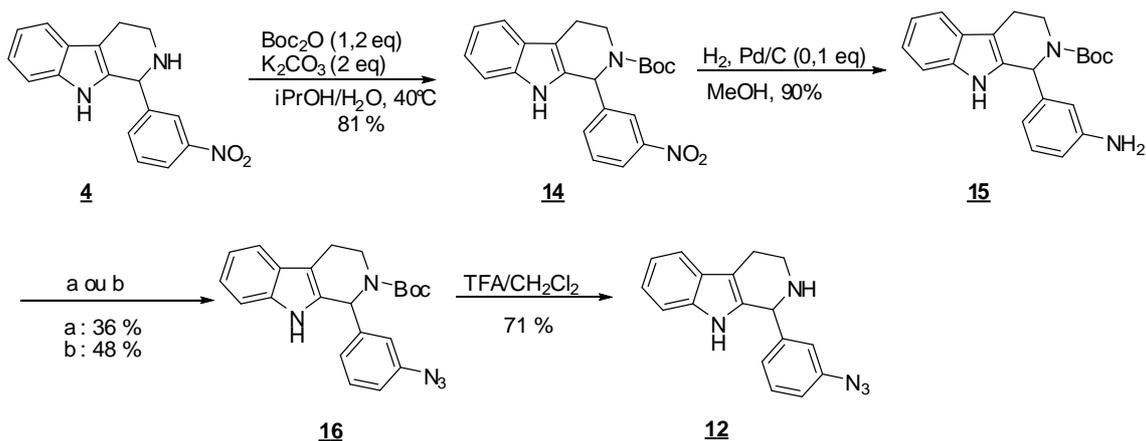
utilisation en photomarquage d'affinité. Il est donc nécessaire d'améliorer sa méthode de synthèse et de mettre au point une méthode d'obtention de son analogue marqué (au tritium).

## 5. Nouvelle voie de synthèse du composé 12

Nous avons précédemment obtenu le composé **12** par la méthode *via* diazotation à partir du composé **8** (cf. paragraphe 3.3.4). Or, cette méthode de synthèse souffre d'un rendement faible et d'un manque de reproductibilité dus à la formation du dérivé azido-nitrosamine **SP4**. En utilisant un mélange HCl/Dioxane 2,5/1 plutôt qu'un mélange AcOH/H<sub>2</sub>O 1/1, nous avons réussi, en abaissant le pH, à diminuer significativement la proportion du composé **SP4** (6% contre 44% d'après analyse CLHP-SM). Cependant, lors de la transposition de cette méthode à plus large échelle (à partir de 200 mg de composé **8**), nous avons observé la formation de divers produits secondaires et la présence du composé azido-imine **SP4**.

Compte tenu de ces résultats et de ceux obtenus pour la réaction de transfert diazo (cf. paragraphe 3.3.4), il s'est avéré nécessaire de protéger l'amine secondaire cyclique du composé **8** pour éviter la formation de ces produits secondaires.

Nous avons choisi comme groupement protecteur le *tert*-butyloxycarbonate (Boc). Il présente l'avantage de ne pas être clivé par hydrogénation, ce qui permet son introduction sur le composé **4**. Sa déprotection s'effectue en condition acide, ce qui est compatible avec le groupement azoture. De plus, elle ne génère pas de produits secondaires, (contrairement à un groupement Fmoc, par exemple). La voie de synthèse que nous avons réalisée est présentée ci-après (Fig. 98).



a : 1. NaNO<sub>2</sub> (1,5 eq), - 5°C, 45 min / 2. NaN<sub>3</sub> (3 eq), - 5 °C -> TA, 2h, AcOH/H<sub>2</sub>O  
 b : CuSO<sub>4</sub> (0,05 eq), Et<sub>3</sub>N (3 eq), TfN<sub>3</sub> (1,5 eq), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O/MeOH, TA, 16h

**Fig. 98 : Nouvelle voie de synthèse du composé 12**

Cette méthode a consisté à introduire le groupement protecteur Boc sur le composé 4. Cette réaction a été réalisée selon des conditions classiques, sans que l'on observe de substitution sur le NH indolique. Le composé 14 a été ainsi obtenu avec un rendement de 81 %. La réduction de sa fonction nitro-aromatique par H<sub>2</sub>-Pd/C, a permis ensuite d'obtenir le composé 15, précurseur du dérivé azoture, avec un rendement de 90%.

Nous avons observé que le composé 15 est stable dans un mélange AcOH/H<sub>2</sub>O 1/1 à température ambiante. Par conséquent, l'introduction du groupement azido a pu être envisagée par transfert diazo et *via* diazotation. La réaction *via* diazotation est relativement rapide. La conversion de 15 est totale et la formation de produits résultant du clivage du Boc n'est pas observée. Le rendement relativement moyen (36 %) est dû à la formation de produits de dégradation non identifiés (signatures CLHP-SM et <sup>1</sup>H RMN équivoques). La réaction par transfert diazo a permis, quant à elle, d'obtenir le composé 16 avec un rendement de l'ordre de 50%.

Nous n'avons pas mené assez d'expériences pour déterminer la meilleure méthode d'introduction de l'azoture. Cependant, nous pensons que la méthode par transfert diazo est la mieux adaptée car elle ne conduit pas à la formation de produits secondaires. Elle peut être certainement améliorée puisque la conversion du composé 15 n'est pas totale. De plus, elle devrait se révéler, en pratique, plus robuste que la réaction par diazotation.

La déprotection du composé 16 a ensuite été effectuée par l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane pour obtenir le produit final 12. Lors de cette étape, la formation de l'imine SP4 n'est pas significative puisqu'elle est présente à moins de 2% dans le produit

final, après purification par chromatographie sur colonne (évaluation  $^1\text{H}$  RMN). Le composé **12** est donc obtenu avec un rendement global de l'ordre de 25 % et une pureté de 98% à partir du composé **4**.

Le rendement global de cette nouvelle voie de synthèse du composé **12** est donc similaire à celui de la réaction *via* diazotation à partir de **8** présenté précédemment (cf. paragraphe 3.3.4). Nous pensons qu'il peut être amélioré en optimisant les conditions de l'étape par transfert diazo. Cependant, compte tenu du nombre d'étapes, il sera difficile d'obtenir un rendement global supérieur à 50%.

L'avantage principal de cette voie de synthèse (en utilisant la réaction par transfert diazo) est la faible proportion de produits secondaires formés, en particulier d'azido-imine **SP4** qui est difficilement séparable du composé **8** par chromatographie sur silice. Bien que nous n'ayons pas assez de recul sur les deux dernières étapes de cette voie de synthèse, nous pensons, qu'en pratique, cette méthode sera beaucoup plus robuste à mettre en œuvre que la réaction *via* diazotation du composé **8**. En effet, dans le cas de cette dernière réaction, nous avons rencontré des problèmes de répétabilité et de transposition à des quantités plus importantes de produit qui se sont traduits par une augmentation de la proportion des produits secondaires en particulier, de **SP4** et de **SP5**.

## **6. Perspective : vers la synthèse du composé [ $^3\text{H}$ ]-12.**

Parallèlement à l'amélioration de la voie de synthèse du composé **12**, nous avons initié la synthèse de son analogue marqué [ $^3\text{H}$ ]-**12**. L'introduction du marquage au tritium nécessite la synthèse du dérivé iodé **20** du composé **12**. La voie de synthèse que nous proposons est présentée ci-dessous.

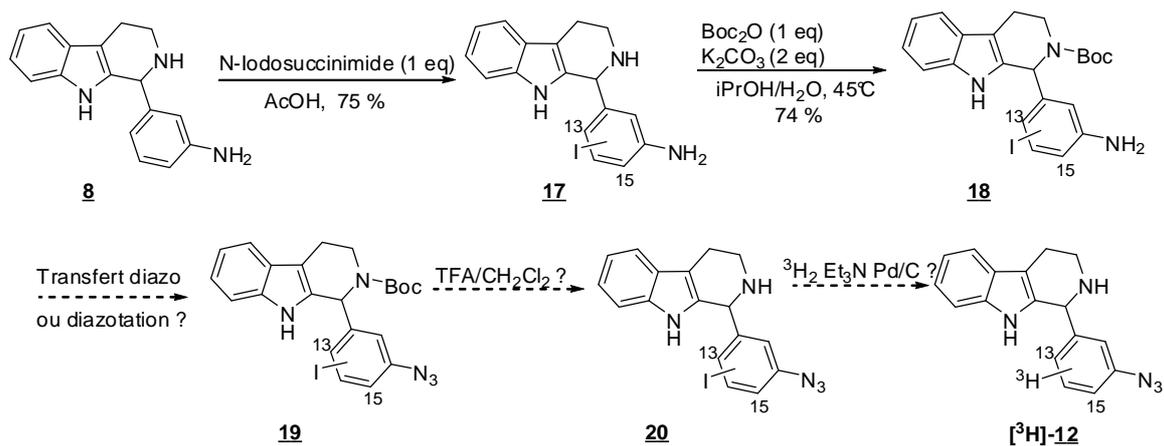


Fig. 99 : Perspective pour la synthèse du composé [<sup>3</sup>H]-12

A l'heure actuelle, seule les deux premières étapes ont été mises au point. A la suite d'essais infructueux d'iodation sur le composé 15, nous avons choisi d'introduire l'atome d'iode sur le composé 8. La iodation a été effectuée en milieu acide acétique, en présence de N-iodosuccinimide. L'utilisation d'un milieu acide plutôt que celle d'un milieu neutre permet de contrecarrer l'oxydation du composé 8 (c'est-à-dire la formation de l'imine). Cette réaction conduit à l'obtention majoritaire d'un composé mono-iodé 17 avec un rendement de 74 %. Comme le révèle l'analyse <sup>1</sup>H RMN, la substitution électrophile est régiosélective et s'effectue sur le cycle activé de l'aniline, au niveau du carbone C<sub>15</sub> ou C<sub>13</sub>. Compte tenu du fait que la régio-isomérisie n'a pas d'importance pour notre étude, aucune analyse supplémentaire n'a été entreprise pour déterminer la position exacte de l'atome d'iode. La détermination de cette position pourra être précisée ultérieurement grâce la <sup>3</sup>H RMN du composé [<sup>3</sup>H]-12.

En présence de base et d'une quantité stoechiométrique de Boc<sub>2</sub>O, l'introduction du groupement protecteur sur le composé 17 s'effectue de manière régiosélective sur l'amine secondaire avec un rendement de 74 %.

Par manque de temps, les étapes suivantes de cette synthèse n'ont pas été effectuées. Cependant, nous envisageons d'introduire le groupement azoture par la réaction par transfert diazo sur le composé 18. Le composé 19 obtenu sera ensuite déprotégé en présence d'acide trifluoroacétique pour donner le composé 20. Le composé [<sup>3</sup>H]-12 pourra être ensuite synthétisé, à partir du composé 20 par échange I<sup>3</sup>H, selon les conditions de Faucher *et al.* [6].

## 7. Conclusion et perspectives

Nous avons mis au point et réalisé les synthèses de quatre hits **1**, **2**, **3** et **4** issus du test de criblage à haut-débit réalisé par Lecat-Guillet. Ces composés ont été obtenus à l'échelle du gramme avec des puretés <sup>1</sup>H RMN et CLHP-SM supérieures à 98 %. L'évaluation biologique sur les lignées hNIS-HEK-293 et FRTL-5 a montré que le composé **1** est inactif, ce qui a conduit à son élimination de notre étude ainsi qu'à celle de ses analogues aniline **5** et azoture **9**. En revanche, nous avons validé l'activité des composés **2**, **3** et **4** : Ces trois composés bloquent effectivement l'accumulation de l'iodure chez la lignée FRTL-5 avec des IC<sub>50</sub> de 0,3 μM, 0,02 μM et 0,08 μM, respectivement. L'influence des composés **3** et **4** sur la captation et le relargage de l'iodure par la thyroïde est actuellement en cours d'évaluation, chez le rat, par imagerie micro-SPECT (collaboration T. Pourcher CEA/DSV/TIRO).

Nous avons, de plus, réalisé le dédoublement de la tetra-β-carboline chirale **4** et obtenu les deux énantiomères **4a** et **4b** optiquement purs (e.e > 99%). Les tests biologiques ont montré que l'énantiomère **4a** est 100 fois plus actif que l'énantiomère **4b**. Ce résultat suggère que l'effet d'inhibition sur la captation des iodures est dû à un mécanisme de reconnaissance spécifique du composé **4** par une protéine cible unique. En raison des faibles quantités obtenues pour chaque énantiomère (≈ 3 mg), la détermination de leur configuration absolue n'a pas pu être effectuée. Il est donc nécessaire de dédoubler à une plus large échelle ces deux énantiomères pour pouvoir effectuer leur analyse par cristallographie par rayons X. Ne disposant pas de colonne chirale préparative au laboratoire, une méthode de dédoublement cinétique des énantiomères est actuellement en cours de mise au point. Elle s'inspire des travaux de Liu *et al.* [30] et est basé sur la co-cristallisation du composé **4** avec l'acide (S)-mandélique.

Les dérivés amino-aromatiques des composés **2**, **3** et **4** ont été obtenus avec de bons rendements (> 60%) soit par hydrogénation catalytique sur Pd/C, soit par réduction par le système Fer/AcOH. Ces composés ont été testés sur les deux lignées cellulaires modèles. Les résultats obtenus mettent en évidence que la réduction du groupement nitro- en amine diminue de manière significative la capacité d'inhibition des hits.

A partir des précurseurs amino-aromatiques **6** et **8**, nous avons obtenu les dérivés azotures de **2** et **4** par réaction par transfert diazo et via diazotation respectivement, avec une pureté supérieure à 98 %. Ces composés **10** et **12** bloquent l'accumulation de l'iodure chez la

lignée hNIS-HEK-293 ( $IC_{50} = 8 \mu M$  et  $0,2 \mu M$ , respectivement) et chez la lignée FRTL-5 ( $IC_{50} = 0,9 \mu M$  et  $0,03 \mu M$ , respectivement).

Compte tenu de la différence d'activité des énantiomères de **4** et de ses valeurs d' $IC_{50}$ , le composé **12** est actuellement privilégié pour une application en photomarquage d'affinité. A cette fin, nous avons mis au point une méthode de synthèse de **12** en protégeant l'amine cyclique secondaire par groupement Boc, ce qui permet d'introduire le groupement azido par transfert diazo. Nous pensons que cette méthode sera en pratique plus robuste et permettra un gain significativement de pureté. La méthode de synthèse de l'analogue iodé **20** est actuellement en cours de réalisation et permettra très prochainement d'accéder à la sonde marquée [ $^3H$ ]-**12**.

La synthèse du composé **11** (analogue azoture de **3**) n'a pas pu être mise au point jusqu'à présent mais devrait être réalisée grâce à l'introduction d'un groupement protecteur sur la fonction hydroxyle ou sur la fonction amine. S'il se révèle plus actif que le composé **10**, il sera privilégié pour l'étude de photomarquage par affinité.

Compte tenu des réponses obtenues en électrophysiologie pour les composés **4** et **3**, nous pensons que ces composés agissent sur des cibles protéiques différentes. Nous souhaitons donc effectuer une double étude de photomarquage d'affinité en utilisant leurs analogues azotures [ $^3H$ ]-**12** et [ $^3H$ ]-**11** (ou à défaut [ $^3H$ ]-**10**).

## **Bibliographie**

1. Lecat-Guillet N: **Identification d'inhibiteurs du Symporteur Sodium-Iode par criblage à haut-débit.** Université Paris XI, Service de Chimie Bioorganique et de Marquage Moléculaire, CEA-Saclay; 2006.
2. Lecat-Guillet N, Merer G, Lopez R, Pourcher T, Rousseau B, Ambroise Y: **A 96-Well Automated Radioiodide Uptake Assay for Sodium/Iodide Symporter Inhibitors.** *Assay Drug Dev Technol* 2007, **5**:535-540.
3. Ilouga PE, Winkler D, Kirchoff C, Schierholz B, Wolcke J: **Investigation of 3 Industry-Wide Applied Storage Conditions for Compound Libraries.** *J Biomol Screen* 2007, **12**:21-32.
4. Liu Q, Tor Y: **Simple Conversion of Aromatic Amines into Azides.** *Org Lett* 2003, **5**:2571-2572.
5. Smith M, March J: *March's Advanced Organic Chemistry. Reaction, Mechanism and Structure p. 816-817.* John Wiley & Sons Inc; 2001.
6. Faucher N, Ambroise Y, Cintrat JC, Doris E, Pillon F, Rousseau B: **Highly Chemoselective Hydrogenolysis of Iodoarenes.** *J Org Chem* 2002, **67**:932-934.
7. Pal B, Jaisankar P, Giri VS: **Microwave Assisted Pictet–Spengler and Bischler–Napieralski Reactions.** *Synth Commun* 2003, **33**:2339-2348.
8. Smith M, March J: *March's Advanced Organic Chemistry. Reaction, Mechanism and Structure p. 1552-1554.* 5th edn: John Wiley & Sons Inc; 2001.
9. Negi S, Matsukura M, Mizuno M, Miyake K, Minami N: **Synthesis of (2 R)-1-(4-Chloro-2-pyridyl)-2-(2-pyridyl) ethylamine: A Selective Oxime Reduction and Crystallization-Induced Asymmetric Transformation.** *Synthesis* 1996, **1996**:991-996.
10. Khorana HG: **The Chemistry of Carbodiimides.** *Chem Rev* 1953, **53**:145-166.
11. Durley RC, Grapperhaus ML, Hickory BS, Massa MA, Wang JL, Spangler DP, Mischke DA, Parnas BL, Fobian YM, Rath NP: **Chiral N, N-Disubstituted Trifluoro-3-Amino-2-Propanols Are Potent Inhibitors of Cholesteryl Ester Transfer Protein.** *J Med Chem* 2002, **45**:3891-3904.
12. Abdel-Magid AF, Carson KG, Harris BD, Maryanoff CA, Shah RD: **Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures.** *J Org Chem* 1996, **61**:3849-3862.
13. Jiang W, Guan J, Macielag MJ, Sui Z, Qiu Y, Kraft P: **Pyrroloquinolone PDE5 inhibitors with improved pharmaceutical profiles for clinical studies on erectile dysfunction.** *J Med Chem* 2005, **48**:2126-2133.
14. Moody CJ, Pitts MR: **Indium as a Reducing Agent: Reduction of Aromatic Nitro Groups.** *Synlett* 1998, **9**:1028.
15. Smaill JB, Palmer BD, Rewcastle GW, Denny WA, McNamara DJ, Dobrusin EM, Bridges AJ, Zhou H, Showalter HD, Winters RT: **Tyrosine kinase inhibitors. 15. 4-(Phenylamino) quinazoline and 4-(phenylamino) pyrido [d] pyrimidine**

- acrylamides as irreversible inhibitors of the ATP binding site of the epidermal growth factor receptor. *J Med Chem* 1999, **42**:1803-1815.
16. Booth RG, Selassie CD, Hansch C, Santi DV: **Quantitative structure-activity relationship of triazine-antifolate inhibition of *Leishmania* dihydrofolate reductase and cell growth.** *J Med Chem* 1987, **30**:1218-1224.
  17. Bräse S, Gil C, Knepper K, Zimmermann V: **Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds.** *Angew Chem Int Ed* 2005, **44**:5188-5240.
  18. Butler R, Fox A, Collier S, Burke L: **Pentazole chemistry: the mechanism of the reaction of aryldiazonium chlorides with azide ion at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ : concerted versus stepwise formation of arylpentazoles, detection of a pentazene intermediate, a combined  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR experimental and *ab initio* theoretical study.** *J Chem Soc, Perkin Trans 2* 1998:2243-2248.
  19. Das J, Patil SN, Awasthi R, Narasimhulu CP, Trehan S: **An Easy Access to Aryl Azides from Aryl Amines under Neutral Conditions.** *Synthesis* 2005, **1801**:1801-1806.
  20. Barral K, Moorhouse AD, Moses JE: **Efficient Conversion of Aromatic Amines into Azides: A One-Pot Synthesis of Triazole Linkages.** *Org Lett* 2007, **9**:1809-1811.
  21. Alper PB, Hung S-C, Wong C-H: **Metal Catalyzed Diazo Transfer for the Synthesis of Azides From Amines.** *Tetrahedron Lett* 1996, **37**:6029-6032.
  22. Nyffeler PT, Liang CH, Koeller KM, Wong CH: **The Chemistry of Amine-Azide Interconversion: Catalytic Diazotransfer and Regioselective Azide Reduction.** *J Am Chem Soc* 2002, **124**:10773-10778.
  23. Riber D, Venkataramana M, Sanyal S, Duvold T: **Synthesis and Biological Evaluation of Photoaffinity Labeled Fusidic Acid Analogues.** *J Med Chem* 2006, **49**:1503-1505.
  24. Cai Q, Zhu W, Zhang H, Zhang Y, Ma D: **Preparation of Aryl Compounds by Amino Acid-Promoted Ullmann-Type Coupling Reactions.** *Synthesis* 2005, **2005**:496-499.
  25. Bock VD, Speijer D, Hiemstra H, van Maarseveen JH: **1, 2, 3-Triazoles as peptide bond isosteres: synthesis and biological evaluation of cyclotetrapeptide mimics.**
  26. Fan QH, Ni NT, Li Q, Zhang LH, Ye XS: **New one-carbon degradative transformation of beta-alkyl-beta-azido alcohols.** *Org Lett* 2006, **8**:1007-1009.
  27. Sun P, Wang GX, Furuta K, Suzuki M: **Synthesis of a bis-azido analogue of acromelic acid for radioisotope-free photoaffinity labeling and biochemical studies.** *Bioorg Med Chem Lett* 2006.
  28. Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N: **The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance.** *Endocr Rev* 2003, **24**:48-77.
  29. Van Sande J, Massart C, Beauwens R, Schoutens A, Costagliola S, Dumont JE, Wolff J: **Anion Selectivity by the Sodium Iodide Symporter.** *Endocrinology* 2003, **144**:247-252.

30. Li X, Branum S, Russell RK, Jiang W, Sui Z: **An Efficient Process for Synthesis of 3-(R)-3-(2,3-Dihydrobenzofuran-5-yl)- 1,2,3,4-tetrahydropyrrolo[3,4-b]quinolin-9-one.** *Org Process Res Dev* 2005, **9**:640-645.



## **Conclusion Générale**

Dans le contexte du projet iode du programme inter-organisme TOXNUC-E, nous nous sommes intéressés à deux modèles biologiques: les algues brunes et les mammifères. Ces modèles présentent des mécanismes de captation et d'accumulation de l'iode très différents qui ne sont pas entièrement élucidés. Pour apporter des éléments de compréhension à ces mécanismes, nous avons mis en place des stratégies de génétique chimique ainsi qu'une approche originale utilisant des techniques d'imagerie chimique.

Chez les algues brunes, les halopéroxydases à vanadate (vHPOs) sont supposées être des acteurs-clés de la biosynthèse des composés volatils iodés (CVIs). Chez les espèces du genre *Laminaria*, elles pourraient être aussi impliquées dans un mécanisme de captation très sélectif et très efficace des iodures. Pour vérifier ces hypothèses, nous avons mis en place une stratégie de génétique chimique inverse consistant à identifier des inhibiteurs d'une vHPO purifiée puis à étudier le phénotype induit par l'invalidation *in vivo* de cette vHPO par ces inhibiteurs.

Dans le cadre de cette étude, nous avons mis au point, caractérisé et validé une méthode spectrophotométrique de suivi des activités iodo- et bromo-péroxydases par le bleu de thymol. Cette méthode s'est révélée robuste ( $Z' > 0,8$ ), sensible et plus adaptée que les méthodes décrites dans la littérature pour la réalisation d'un test de criblage à haut-débit. Elle consiste à suivre au cours du temps l'absorbance à 620 nm qui rend compte de l'apparition des produits d'halogénéation du bleu de thymol par les systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup>.

A partir de cette méthode de suivi au bleu de thymol, un double test de criblage à haut-débit a été effectué en activité iodo- et bromo-péroxydase sur la vBPO native d'*A. nodosum*, à partir d'une chimiothèque commerciale de 16480 composés. A la suite de ces criblages primaires et des tests secondaires, nous avons identifié 20 hits inhibant fortement l'halogénéation du bleu de thymol. Grâce à des études d'effet dose-réponse, à une expérience de perturbation de la iodation chimique du bleu de thymol et à des études CLHP-SM, nous avons pu démontrer que ces molécules réagissent avec les espèces X<sup>+</sup> (et en particulier I<sup>+</sup>) générées dans le milieu par le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup> et n'ont donc pas d'action directe sur l'enzyme.

Cette stratégie de génétique chimique n'a donc pas permis d'identifier des inhibiteurs de la vBPO. Cependant, les études de flux unidirectionnel ont montré que les hits identifiés à la suite des tests de criblage bloquent la captation des iodures chez *L. digitata*. Ce résultat

permet de conforter l'intervention d'une espèce  $I^+$  dans ce mécanisme et donc indirectement l'implication d'une vHPO.

Pour l'algue brune *L. digitata*, l'utilisation conjointe de la microsonde nucléaire et de la microsonde SIMS a permis de déterminer les distributions tissulaires et sub-cellulaires de l'iode, à partir de coupes cryofixées de lame et de stipe. L'iode est principalement stocké au niveau du tissu périphérique constitué par le méristoderme et par les premières couches cellulaires du cortex externe. La teneur en iode peut y atteindre jusqu'à 20 % du poids sec. Au niveau subcellulaire, nous avons montré que l'iode est très majoritairement séquestré, sous une forme labile, dans l'apoplasme. Compte tenu des études de spéciation, nous pensons que le mécanisme mis en jeu repose sur la complexation d'une espèce inorganique de l'iode par un édifice macromoléculaire composé de polysaccharides et/ou de protéines. Ce mécanisme de stockage est tout à fait original à notre connaissance. Au niveau de la glande thyroïde, l'iode est accumulé dans un compartiment extra-cellulaire (la colloïde) mais sous une forme très peu labile par liaison covalente à la Tg. Certaines algues rouges ont développé des cellules glandulaires spécialisées dans le stockage vacuolaires de composés organiques iodés labiles.

Cette distribution sub-cellulaire inattendue est compatible avec les rôles physiologiques attribués à l'iode chez *L. digitata* (mécanisme de défense et régulation du stress oxydant). Cependant, elle remet en question le mécanisme de captation proposé par Shaw et affiné par Küpper *et al.* Cette étude d'imagerie chimique marque donc une étape décisive dans notre projet de recherche et permet de dégager de nouveaux axes d'investigation. La compréhension des mécanismes de transfert de l'iode chez *L. digitata* constitue toujours, à l'heure actuelle, un défi ambitieux qui nécessitera la combinaison d'approches multi-disciplinaires. Nous pensons que les efforts doivent se concentrer sur :

L'identification de la spéciation de l'iode *in vivo*

L'identification du mode de séquestration de l'iode (nature des agents complexants)

L'élucidation du rôle des vHPO dans la captation et l'efflux d'iode

La compréhension des mécanismes de régulation contrôlant l'influx et l'efflux d'iode

Démontrer le rôle des vHPO sera difficile à réaliser puisque nous n'avons pas été en mesure d'identifier des inhibiteurs qui leur soient spécifiques. On pourrait imaginer d'évaluer d'autres chimiothèques, en particulier celles comportant des produits naturels, mais nous pensons qu'il est nécessaire d'envisager de nouvelles stratégies.

Des anti-corps dirigés contre les vBPO et les vIPO constitueront des outils puissants pour déterminer leur localisation sub-cellulaire par immuno-localisation et prouver leur localisation apoplastique (du moins pour les vIPO). On pourrait imaginer aussi d'utiliser ces anti-corps *in vivo* pour inhiber les vHPO.

Des stratégies génomiques (par exemple par extinction de gène) sont à envisager mais nous ne sommes pas en mesure d'en évaluer la faisabilité.

Pour démontrer l'intervention des vBPO et vIPO dans la biosynthèse des CVI, nous pouvons imaginer des expériences *in vitro* consistant à cribler des extraits cellulaires sur les systèmes vHPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> et à déterminer les CVI produits par des techniques d'analyse par spectrométrie de masse.

En ce qui concerne la thématique mammifère, nous avons poursuivi les travaux initiés par N. Lecat-Guillet. Nos objectifs principaux ont été de valider l'activité des hits identifiés par le test de criblage à haut-débit sur hNIS-HEK-293 et d'initier une stratégie de photomarquage d'affinité pour identifier leur protéine cible.

Dans ce contexte, nous avons mis au point et réalisé la synthèse de quatre inhibiteurs **1**, **2**, **3** et **4** à l'échelle du gramme. Les tests biologiques ont permis de valider l'activité des composés **2**, **3** et **4** : Ces trois composés bloquent effectivement l'accumulation de l'iodure chez la lignée FRTL-5 avec des IC<sub>50</sub> de 0,3 μM, 0,02 μM et 0,08 μM, respectivement. L'influence des composés **3** et **4** sur la captation et le relargage de l'iodure par la thyroïde est actuellement en cours d'évaluation chez le rat par imagerie micro-SPECT (collaboration T. Pourcher CEA/DSV/TIRO).

En ce qui concerne la tétra-β-carboline **4**, nous avons effectué son dédoublement racémique, ce qui nous a permis d'isoler ses énantiomères **4a** et **4b** avec un excès énantiomérique supérieur à 99%. Les tests biologiques ont montré que l'énantiomère **4a** est 100 fois plus actif que l'énantiomère **4b**, ce qui laisse suggérer que l'inhibition du composé **4** sur la captation d'iodure repose sur sa reconnaissance spécifique par une protéine cible unique.

A partir des précurseurs amino-aromatiques de **2** et **4**, nous avons obtenu les dérivés azotures **10** et **12** avec une pureté supérieure à 98 %. Ces composés **10** et **12** bloquent l'accumulation de l'iodure chez la lignée hNIS-HEK-293 (IC<sub>50</sub> = 8 μM et 0,2 μM, respectivement) et chez la lignée FRTL-5 (IC<sub>50</sub> = 0,9 μM et 0,03 μM, respectivement).

Compte tenu de la différence d'activité des énantiomères de **4** et de ses valeurs d'IC<sub>50</sub>, la synthèse de la sonde marquée [<sup>3</sup>H]-**12** est en cours de réalisation par la nouvelle voie de synthèse consistant à protéger l'amine secondaire par un groupement Boc pour pouvoir introduire le groupement azoture par transfert diazo.

La synthèse du composé **11** (analogue azoture de **3**) n'a pas pu être mise au point jusqu'à présent mais devrait être réalisée grâce à l'introduction d'un groupement protecteur sur la fonction hydroxyle ou sur la fonction amine. S'il se révèle plus actif que le composé **10**, il sera privilégié pour l'étude de photomarquage par affinité.

Compte tenu des réponses obtenues en électrophysiologie pour les composés **4** et **3**, nous souhaitons effectuer une double étude de photomarquage d'affinité en utilisant leurs analogues azotures [<sup>3</sup>H]-**12** et [<sup>3</sup>H]-**11** (ou à défaut [<sup>3</sup>H]-**10**). Nous pensons que, grâce à ces sondes, nous pouvons cibler la protéine NIS ou une/des protéine(s) impliquée(s) dans sa régulation post-traductionnelle.



# **Partie 3**

## **Partie Expérimentale**

*Thématiques Algues et Mammifère*



# **Chapitre 1 : Recherche d'inhibiteurs de la vBPO d'*A. nodosum***

## **1. Généralités sur le matériel et les produits utilisés**

### Produits chimiques

Les produits chimiques (Sigma-Aldrich) présentent une pureté supérieure à 98 %. En ce qui concerne les colorants et les indicateurs pH, la référence-produit comportant la plus haute pureté a été systématiquement commandée. L'éthanol utilisé est de qualité HPLC (Merck) et le diméthylsulfoxyde (DMSO) de qualité spectrophotométrique (99,9 %, Sigma-Aldrich).

### Solutions

Les solutions aqueuses sont réalisées à partir d'eau ultra-pure obtenue par le système de purification Synergy 185UV Ultrapure Water System (Millipore) à partir d'eau distillée. Les solutions tampons MES sont obtenues par dissolution de la masse adéquate d'acide 4-2-(N-Morpholino)ethanesulfonique. Leur pH est ajusté par ajout d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 2N. Les solutions tampons phosphates sont obtenues par dissolution des masses adéquates de dihydrogénophosphate de sodium monohydrate et d'hydrogénophosphate de sodium. Les solutions tampons et d'halogénure sont conservées deux semaines à + 4°C. Les solutions d'enzyme, de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de bleu de thymol sont préparées le jour de leur utilisation.

### Matériel divers

La mesure des pH des solutions est effectuée grâce au pHmètre Inolab (WTW) préalablement étalonné par des solutions tampons de pH = 7,00 et pH = 4,01 ou pH = 10,00 (WTW). La distribution des solutions dans les puits des plaques 96 puits est effectuée essentiellement à la micropipette multi-canaux (Finnpipette). Les études d'absorbance (spectre et cinétique) sont effectuées dans des microplaques 96 puits transparentes en polystyrène (Costar#9017, Corning) utilisables pour des longueurs d'onde supérieures à 300 nm. Des microplaques transparentes aux UV (Falcon) sont utilisées pour les longueurs d'onde comprises entre 250 et 350 nm.

### Spectrophotomètre SpectraMax Plus<sup>384</sup> (Molecular Device)

Les études d'absorbance – mesure ponctuelle, cinétique ou spectre – sont réalisées avec le spectrophotomètre SpectraMax Plus<sup>384</sup>. Les expériences peuvent être menées soit en cuvette soit en microplaque 96 ou 384 puits, sur une gamme de longueurs d'onde allant de 190 à 1000 nm, avec un incrément de 1 nm et pour des valeurs d'absorbance inférieures à 4. La source lumineuse est une lampe Xénon. La longueur d'onde d'intérêt est sélectionnée par un monochromateur avec une précision de 0,2 nm. Le lecteur est piloté grâce au logiciel SoftMax Pro. Les résultats peuvent être traités sous ce logiciel ou sous Excel grâce à la génération d'un fichier .txt.

### Matériel enzymatique

Le modèle choisi est la bromopéroxydase à co-facteur vanadate (vBPO) native d'*Ascophyllum nodosum* fournie gracieusement par Dr. P. Potin (UMR 7139 CNRS-UPMC, Station Biologique de Roscoff). L'enzyme a été extraite à partir de sporophytes adultes d'*Ascophyllum nodosum* récoltés dans les environs de Roscoff (Bretagne), d'après le protocole de séparation par partition de phase mis au point par Vilter [1]. La solution-mère de vBPO est à 8,0 mg/ml dans le tampon Tris à 50 mM et à pH = 9. Elle est conservée à - 18°C. A la veille d'une série de test, un aliquot est décongelé à + 4°C pendant une nuit. Cette solution peut être conservée à + 4°C pendant plusieurs semaines sans perte d'activité. Le dosage protéique a été effectué selon la méthode de Bradford [2] et les mesures des activités bromo- et iodo-péroxydases ont été réalisées par les tests spectrophotométriques au monochlorodimédone (MCD) et au triiodure, respectivement [3].

## **2. Mise au point d'une méthode de suivi des activités de la vBPO**

### **2.1. Identification d'une nouvelle molécule sonde**

#### *2.1.1 Etudes préliminaires*

#### Détermination des modifications du spectre d'absorbance après réaction avec vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X

Les molécules testées sont présentées en Annexe 1. On évalue si les produits formés par réaction avec les systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> et vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Br<sup>-</sup> ont des propriétés d'absorbance ( $\epsilon$  et/ou  $\lambda_{\max}$ ) différentes de celles des réactifs de départ. Pour chaque molécule

à tester, 200  $\mu\text{l}$  de milieu sont préparés par ajouts successifs dans un puit d'une microplaque de :

- 100  $\mu\text{l}$  de tampon MES à 200 mM et à  $\text{pH} = 6,5$
- 20  $\mu\text{l}$  d'une solution d'iodure de potassium (KI) à 10 mM ou de bromure de potassium (KBr) à 100 mM
- 20  $\mu\text{l}$  d'une solution de la molécule à tester à 500  $\mu\text{M}$  dans l'éthanol
- 20  $\mu\text{l}$  d'une solution de vBPO à 10  $\mu\text{g/ml}$  dans le tampon MES à 100 mM et à  $\text{pH} = 6,5$ .

La réaction est initiée par l'ajout de 20  $\mu\text{l}$  d'une solution de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à 5 mM. Le spectre d'absorbance entre 300 et 800 nm est mesuré avant l'ajout et une heure après l'ajout de la solution de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La longueur d'onde d'intérêt ( $\lambda_{\text{int}}$ ) c'est-à-dire la longueur d'onde dont l'absorbance est fortement modifiée après réaction, est déterminée, si possible.

#### Suivi de la $DO(\lambda_{\text{int}})$ en fonction du temps

Même protocole que précédemment. Pour les expériences témoins, 20  $\mu\text{l}$  de la solution de tampon MES à 100 mM sont rajoutés à la place des 20  $\mu\text{l}$  de la solution de vBPO. Après ajout de la solution de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et homogénéisation du milieu, la  $DO(\lambda_{\text{int}})$  est suivie pendant 30 min à raison d'une mesure toutes les 30 s. Les courbes  $DO(\lambda_{\text{int}}) = f(t)$  obtenues pour les différentes molécules sont comparées en fonction de leur allure (régularité de la courbe, existence d'un palier final), de leur pente initiale ainsi que de leur absorbance finale.

#### ***2.1.2 Etude approfondie de la famille des sulfone-phthaléines***

##### Sélection de la longueur d'onde et du pH d'étude optimaux

Pour chaque molécule à évaluer, 200  $\mu\text{l}$  de milieu sont préparés par ajouts successifs dans un puit d'une microplaque de :

- 100  $\mu\text{l}$  de tampon phosphate à 200 mM
- 20  $\mu\text{l}$  d'une solution de KI à 10 mM ou de KBr à 100 mM
- 10  $\mu\text{l}$  d'une solution de la molécule à tester à 1 mM dans l'éthanol

- 20 µl d'une solution de vBPO à 5 µg/ml (IPO) ou à 10 µg/ml (BPO) dans le tampon phosphate à 100 mM et à pH = 7,2

Pour chaque molécule et pour chaque activité, l'expérience est menée à cinq pH différents : 5,5 / 6,2 / 6,8 / 7,1 et 7,6. La réaction est initiée par l'ajout de 20 µl d'une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 5 mM sauf pour le bleu de xylenol et le bleu de thymol, en activité bromopéroxydase, pour lesquels 20 µl d'une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 1 mM sont ajoutés. Le spectre d'absorbance entre 300 nm et 800 nm est réalisé avant et vingt minutes après l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le but de déterminer  $\lambda_{opt}$ . Pour chaque molécule, les suivis cinétiques de la DO( $\lambda_{opt}$ ) sont ensuite réalisés pour déterminer le pH<sub>opt</sub>.

### Comparaison des cinétiques de suivi des activités iodo- et bromo-péroxydases

Pour chaque molécule étudiée et pour chaque activité, la DO( $\lambda_{opt}$ ) est suivie pendant 20 min à raison d'une mesure toutes les 20 s, au pH<sub>opt</sub>. Les conditions sont identiques à celles mentionnées précédemment. Les paramètres de la courbe DO( $\lambda_{opt}$ )<sub>pH<sub>opt</sub></sub> = f(t) c'est-à-dire la vitesse initiale (Vi) et la durée d'atteinte du palier sont déterminés afin de sélectionner la molécule la plus efficace.

## 2.2. Optimisation de la méthode de suivi par le bleu de thymol

Les différents paramètres – pH, concentrations des réactifs et pourcentage de DMSO – sont modifiés comme mentionné dans le paragraphe 2.3 du Chapitre 2 de la partie 1. Pour rappel, les conditions optimales déterminées sont :

	Iodopéroxydase	Bromopéroxydase
Tampon phosphate	110 mM, pH = 7,2	110 mM, pH = 7,8
Halogénure KX	1,5 mM (KI)	10 mM (KBr)
Bleu de thymol	100 µM	100 µM
Enzyme	0,25 µg/ml	0,6 µg/ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,35 mM	0,1 mM
DMSO	4 % en volume	4 % en volume

**Tab. 18 : Conditions optimales pour le suivi des activités iodo- et bromo-péroxydases**

### 2.2.1 *Suivi de l'activité iodo-péroxydase de la vBPO par le bleu de thymol*

#### Préparation des solutions

**Tampon phosphate à 200 mM et à pH = 7,2 :** Le dihydrogénophosphate de sodium monohydrate (0,772 g, 5,6 mmol) puis l'hydrogénophosphate de sodium (2,040 g, 14,4 mmol) sont dissous dans l'eau ultra-pure (100 ml).

**Solution de KI à 15 mM :** L'iodure de potassium (24,9 mg, 150 µmol) est dissous dans l'eau ultra-pure (10 ml).

**Solution de bleu de thymol à 1 mM dans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/DMSO 4/1 :** Le bleu de thymol (9,33 mg, 20 µmol) est dissous dans le DMSO (4 ml). L'eau ultra-pure est ensuite ajoutée (16 ml).

**Solution de molécule à tester dans H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1 :** Une quantité donnée de la molécule à tester est dissoute dans le DMSO. De l'eau ultrapure est rajoutée de telle sorte à obtenir un mélange H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1 et la concentration souhaitée.

**Solution de vBPO à 2,5 µg/ml dans tampon phosphate 100 mM et à pH = 7,2 :** A 5 ml de tampon phosphate à 200 mM et à pH = 7,2 sont ajoutés 5 ml d'eau ultra-pure puis 3,13 µl de la solution mère de vBPO à 8,0 mg/ml.

**Solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3,5 mM :** A 20 ml d'eau ultra-pure, sont rajoutées 7,93 µl d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 30% en poids (70 µmol, 2,38 mg).

#### Protocole

Dans un puit d'une microplaque, sont ajoutés successivement :

- 100 µl de la solution de tampon phosphate à 200 mM et à pH 7,8
- 20 µl de la solution de KI à 15 mM
- 20 µl de la solution de bleu de thymol à 1 mM dans H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1
- 20 µl de la solution de la molécule à tester dans H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1
- 20 µl de la solution de vBPO à 2,5 µg/ml dans le tampon phosphate à 100 mM

Après l'ajout de 20 µl de la solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3,5 mM, le milieu réactionnel est homogénéisé et l'absorbance à 620 nm est mesurée toutes les 20 s pendant 20 min. Les caractéristiques de la courbe DO(620 nm) = f(t) c'est-à-dire le retard (R), la vitesse maximale (V) et l'absorbance finale (A<sub>fin</sub>) sont déterminées.

## 2.2.2 Suivi de l'activité bromopéroxydase de la vBPO par le bleu de thymol

### Préparation des solutions

**Tampon phosphate à 200 mM et à pH = 7,8 :** Le dihydrogénophosphate de sodium monohydrate (0,239 g, 1,73 mmol) puis l'hydrogénophosphate de sodium (2,593 g, 18,27 mmol) sont dissous dans l'eau ultra-pure (100 ml).

**Solution de KBr à 100 mM :** Le bromure de potassium (119 mg, 1,0 mmol) est dissous dans l'eau ultra-pure (10 ml).

**Solution de bleu de thymol à 1 mM dans H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1 :** Le bleu de thymol (9,33 mg, 20 µmol) est dissous dans le DMSO (4 ml). L'eau ultra-pure (16 ml) est ensuite ajoutée.

**Solution de molécule à tester dans H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1 :** Une quantité donnée de la molécule à tester est dissoute dans le DMSO. De l'eau ultrapure est rajoutée de telle sorte à obtenir un mélange H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1 et la concentration souhaitée.

**Solution de vBPO à 6,0 µg/ml dans tampon phosphate 100 mM et à pH = 7,8 :** A 5 ml de tampon phosphate à 200 mM et à pH = 7,8 sont ajoutés 5 ml d'eau ultra-pure puis 7,50 µl de la solution mère de vBPO à 8,0 mg/ml.

**Solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 1,0 mM :** A 20 ml d'eau ultra-pure, sont rajoutées 2,27 µl d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 30% en poids (20 µmol, 0,68 mg).

### Protocole

Dans un puit d'une microplaque, sont ajoutés successivement :

- 100 µl de la solution de tampon phosphate à 200 mM et à pH 7,8
- 20 µl de la solution de KBr à 100 mM
- 20 µl de la solution de bleu de thymol à 1 mM dans H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1
- 20 µl de la solution de la molécule à tester dans H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1
- 20 µl de la solution de vBPO à 6,0 µg/ml dans le tampon phosphate à 100 mM

Après l'ajout de 20 µl de la solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3,5 mM, le milieu réactionnel est homogénéisé et l'absorbance à 620 nm est mesurée toutes les 20 s pendant 20 min. Les caractéristiques de la courbe  $DO(620 \text{ nm}) = f(t)$  c'est-à-dire le retard (R), la vitesse maximale (V) et l'absorbance finale ( $A_{\text{fin}}$ ) sont déterminées.

## 2.3. Validation de la méthode de suivi des activités de la vBPO par le bleu de thymol

### 2.3.1 Identification des produits responsables de la DO(620 nm)

#### Conditions CLHP/SM pour les solutions contenant le bleu de thymol et ses dérivés halogénés

Les analyses ont été effectuées sur une chaîne CLHP/SM possédant les caractéristiques suivantes :

- Pompe : LC-20AB (Shimadzu)
- Détecteurs : Détecteur UV-Visible SPD-10 AV vp (Shimadzu) et spectromètre de masse à électrospray positif (ESI<sup>+</sup>) et négatif (ESI<sup>-</sup>) Mariner ESI-TOF (Perspective Biosystems).
- Colonne : Hypurity C18

Le débit est fixé à 0,8 ml/min et le volume injecté à analyser est de 20 µl. L'élution se fait en mode isocratique : acétonitrile/eau 45/55 contenant 0,1% d'acide formique. La longueur d'onde de détection est fixée à 220 nm.

Produits	Temps de rétention (min)
Bleu de thymol	8,6
Mono-bromé	14,4
Dibromé	29,7
Mono-iodé	17,1
Di-iodé	42,3

**Tab. 19 : Temps de rétention du bleu de thymol et de ses dérivés halogénés**

#### Suivi de la cinétique de bromation du bleu de thymol par la vBPO par CLHP/SM

La cinétique de bromation du bleu de thymol par le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Br<sup>-</sup> est étudiée par analyse CLHP-SM. Pour cette expérience, 1500 µl de milieu sont préparés par ajouts successifs :

- 700 µl de la solution de tampon phosphate à 200 mM, pH = 7,8
- 150 µl de la solution de KBr à 100 mM

- 75 µl de la solution de bleu de thymol à 2 mM dans H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1
- 275 µl d'eau ultra-pure
- 150 µl de la solution d'enzyme à 6,0 µg/ml dans le tampon phosphate 100 mM et à pH = 7,8

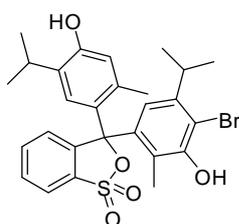
Pour chaque point de la cinétique, à 180 µl de ce mélange sont ajoutés 20 µl d'une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 1 mM. Au temps pré-défini, 20 µl du milieu réactionnel sont prélevés et analysés par CLHP/SM. Pour le temps initial de la cinétique, la solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est remplacée par 20 µl d'eau ultra-pure. Un suivi cinétique de la DO(620 nm) est effectué parallèlement. L'aire du pic correspondant au bleu de thymol ainsi que les aires des pics correspondant aux produits d'halogénéation sont reportées en fonction du temps. Ces courbes sont comparées à celle correspondant à DO(620 nm) = f(t).

#### Suivi de la cinétique de la iodation du bleu de thymol par la vBPO par CLHP/SM

Même protocole que précédemment mais selon les conditions décrites dans le paragraphe 2.2.1 concernant le suivi de l'activité iodopéroxydase. La cinétique est étudiée pour une concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0,35 mM dans le milieu.

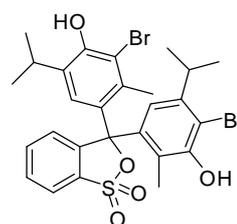
### 2.3.2 Synthèse des produits d'halogénéation du bleu de thymol par vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup>

#### Synthèse des dérivés mono- et di-bromé du bleu de thymol



**PM** : 545,49 g.mol<sup>-1</sup>

**Formule brute** : C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>BrO<sub>5</sub>S

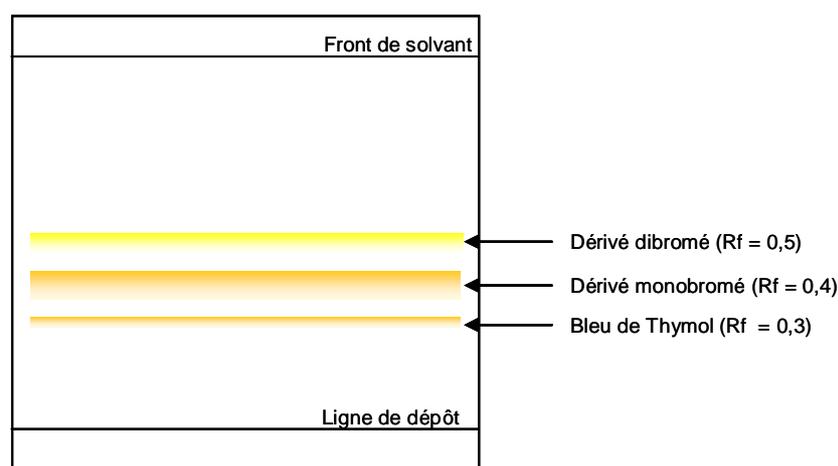


**PM** : 624,38 g.mol<sup>-1</sup>

**Formule brute** : C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S

Le bromure de potassium (238 mg, 2 mmol) est dissous dans 120 ml de tampon phosphate à 167 mM et à pH = 7,8. 20 ml d'une solution de bleu de thymol à 1 mM dans DMSO/H<sub>2</sub>O 1/4 (9,32 mg, 20 µmol), 20 ml d'un mélange H<sub>2</sub>O/DMSO 1/4 et 20 ml d'une solution de vBPO à 0,68 µg/ml en tampon phosphate à 100 mM et à pH = 7,8 sont ajoutés successivement. Après homogénéisation, 20 ml d'une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,75 mM (0,51 mg,

15  $\mu\text{mol}$ ) sont ajoutés et le milieu réactionnel est agité pendant 3 heures. Une analyse CLHP révèle la présence des produits mono-bromé et dibromé (36% et 33% en UV, respectivement). Le milieu réactionnel est alors acidifié par une solution de HCl 1N jusqu'à  $\text{pH} = 2$ . Cette phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (2 x 100 ml). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et concentrées sous vide. Une huile brune violette est obtenue. Cette huile est purifiée sur plaque chromatographique préparative (éluant : acétate d'éthyle/méthanol 8/1). Cinq éluations successives sont effectuées (Fig. 100). Après séchage de la plaque à l'air ambiant, la silice correspondant aux bandes de migration des produits mono-bromé ( $R_f = 0,4$ ) et di-bromé ( $R_f = 0,5$ ) est retirée et lavée deux fois par un mélange dichlorométhane/éthanol 5/2. Après évaporation des filtrats, deux solides sont obtenus : dérivé monobromé (vert, 3,12 mg, 5,73  $\mu\text{mol}$ ) et dérivé dibromé (orange, 3,61 mg, 5,78  $\mu\text{mol}$ ).



**Fig. 100 : Purification sur plaque chromatographique préparative. Rétention frontale du bleu de thymol et de ses dérivés bromés.**

Conditions : AcOEt/MeOH 8/1, 5 éluations successives

#### Dérivé monobromé

**Rendement :** 29 %

**CLHP-SM :** 100 % pureté UV

**SMHR :** calculée pour  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}^{79}\text{BrO}_5\text{S}$  ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) : 543,0841 ; mesurée : 543,0846  
calculée pour  $\text{C}_{27}\text{H}_{28}^{81}\text{BrO}_5\text{S}$  ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) : 545,0820 ; mesurée : 545,0853

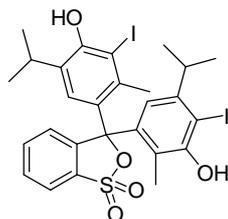
#### Dérivé dibromé

**Rendement :** 29 %

**CLHP-SM :** 100 % pureté UV

**SMHR :** calculée pour  $\text{C}_{27}\text{H}_{27}^{79}\text{Br}^{81}\text{BrO}_5\text{S}$  ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) : 622,9925 ; mesurée : 622,9902

### Synthèse du dérivé di-iodé du bleu de thymol



**PM :** 717,97 g.mol<sup>-1</sup>

**Formule brute :** C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>I<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S

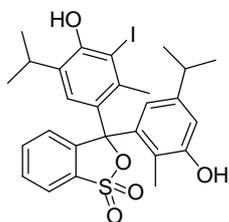
A 100 ml de tampon phosphate à 200 mM et à pH = 7,2, sont rajoutés successivement 20 ml d'une solution d'iodure de potassium à 15 mM (49,8 mg, 300 µmol), 20 ml d'une solution de bleu de thymol à 2 mM (18,6 mg, 40 µmol) dans H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1 et 20 ml d'une solution de vBPO à 2,5 µg/ml dans le tampon phosphate à 100 mM. Le volume est ajusté à 198 ml par ajout de 38 ml d'eau ultra-pure. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et 2 ml d'une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 35 mM (2,38 mg, 70 µmol) sont additionnés. Au bout d'une heure, l'avancement n'étant pas conséquent (≈ 60% en absorbance UV par analyse CLHP), 2 ml supplémentaires de la solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 35 mM sont rajoutés et le milieu réactionnel est agité pendant 30 min supplémentaires. Le milieu réactionnel est alors acidifié par une solution de HCl 2N (10 ml) jusqu'à jaunissement. Cette phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (3 x 100 ml). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, et concentrées sous vide. Un solide brun violet (26 mg, 36 µmol) est obtenu.

**Rendement :** 90 %

**CLHP-SM :** 100 % pureté UV

**SMHR :** calculée pour C<sub>27</sub>H<sub>27</sub> I<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>) : 716,9669 ; mesurée : 716,9639

Synthèse du dérivé mono-iodé du bleu de thymol



**PM :** 592,49 g.mol<sup>-1</sup>

**Formule brute :** C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>IO<sub>5</sub>S

A 150 ml de tampon phosphate à 200 mM et à pH = 7,2, sont rajoutés successivement, 30 ml d'une solution d'iodure de potassium à 15 mM (74,7 mg, 450 µmol), 15 ml d'une solution de bleu de thymol à 2 mM dans H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1 (14,0 mg, 30 µmol) et 30 ml d'une solution de vBPO à 2,5 µg/ml dans le tampon phosphate à 100 mM. Le volume est ajusté à 300 ml par ajout de 65 ml d'eau ultra-pure. Le milieu réactionnel est mis sous agitation et 0,9 ml d'une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 35 mM (1,07 mg, 31,5 µmol) sont additionnés. Au bout d'1h20, une analyse CLHP révèle la présence majoritaire du produit mono-iodé (47 % en absorbance UV). Le milieu réactionnel est alors acidifié par une solution de HCl 1N jusqu'à pH = 2. Cette phase aqueuse est extraite au dichlorométhane (3 x 100 ml). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrées sous vide. Une huile brune violette est obtenue. Cette huile est purifiée sur plaque chromatographique préparative (éluant : acétate d'éthyle/méthanol 8/1). Cinq éluations successives sont effectuées. Après séchage de la plaque à l'air ambiant, la silice correspondant à la bande de migration du produit mono-iodé (R<sub>f</sub> = 0,4) est retirée et lavée deux fois par un mélange dichlorométhane/éthanol 5/2. Après évaporation du filtrat, un solide brun violet est obtenu (1,7 mg, 2,87 µmol).

**Rendement :** 9,6 %

**CLHP/SM :** Pureté UV 98%,

**SMHR :** calculée pour C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>IO<sub>5</sub>S ([M+H]<sup>+</sup>) : 593,0859 ; mesurée : 593,0871

### 2.3.3 Détermination du pka du bleu de thymol et de ses dérivés halogénés.

#### Préparation des solutions

**Gamme de tampons phosphates à 100 mM de pH = 6 à pH = 8 :** Une première solution est préparée par dissolution de dihydrogénophosphate de potassium (2,728 g, 20 mmol) dans 200 ml d'eau. Une seconde solution est préparée par dissolution d'hydrogénophosphate de potassium (3,484 g, 20 mmol) dans 200 ml d'eau. Ces deux solutions sont ensuite mélangées dans des proportions différentes de telle sorte à obtenir une gamme de 8 solutions de tampon phosphate.

**Gamme de tampons phosphate/acide borique à 10 mM de pH = 6 à pH = 10 :** L'acide borique (123,7 mg, 2 mM) et le dihydrogénophosphate de potassium (272,8 mg, 2 mM) sont dissous dans 200 ml d'eau. La gamme de 10 solutions tampons est obtenue par ajouts successifs d'aliquote d'une solution d'hydroxyde de sodium à 4 M, avec un suivi simultané de l'évolution du pH.

Pour les deux gammes de solutions tampons, les solutions de pH extrêmes (pH = 1 et pH = 13) sont obtenues par dilution dans l'eau d'une solution d'acide chlorhydrique 4N et d'une solution de NaOH 2N, respectivement.

**Solutions de bleu de thymol et de ses dérivés à 4 mM :** Les solutions de bleu de thymol, de bleu de thymol mono-iodé, mono-bromé, di-iodé et di-bromé à 4 mM sont préparées par dissolution dans le volume adéquat d'éthanol.

#### Protocole

Pour chaque composé, les deux gammes de solutions tampons sont distribuées sur une microplaque à raison de 195  $\mu$ l de solution tampon par puit. Dans chaque puit, 5  $\mu$ l de la solution de composé à 4 mM sont ajoutés. La concentration finale en composé est de 100  $\mu$ M et le pourcentage d'éthanol de 2,5 %. Après homogénéisation du milieu, le spectre d'absorbance entre 300 et 800 nm est enregistré pour chaque condition de pH. La longueur d'onde maximale d'absorbance ( $\lambda_{\max}$ ) – toutes conditions de pH confondues – du composé étudié est déterminé. Dans le cas présent,  $\lambda_{\max}$  est située entre 600 et 620 nm.

### Traitement des résultats

Pour chaque composé et pour chaque gamme de solutions tampons, la courbe  $DO(\lambda_{\max}) = f(\text{pH})$  est tracée. Une régression est effectuée sur sa partie linéaire (encadrant le pKa du composé) pour déterminer les termes a et b de la relation :  $DO(\lambda_{\max}) = a \cdot \text{pH} + b$ . Pour  $\text{pH} = \text{pKa}$ , les concentrations de composé sous forme acide (AH) et sous forme basique ( $A^-$ ) sont égales. Ainsi, pour  $\text{pH} = \text{pKa}$  :

$$DO(\lambda_{\max})_{\text{pKa}} = \frac{DO_{\text{AH}} + DO_{\text{A}^-}}{2}$$

avec  $DO_{\text{AH}}$  : absorbance à  $\lambda_{\max}$  d'une solution de composé entièrement sous forme acide à 50  $\mu\text{m}$  et  $DO_{\text{A}^-}$  : absorbance à  $\lambda_{\max}$  d'une solution de composé entièrement sous forme basique à 50  $\mu\text{m}$ .

Dans le cas présent,  $DO_{\text{AH}}$  et  $DO_{\text{A}^-}$  correspondent aux absorbances à  $\lambda_{\max}$  des solutions de pH extrêmes  $\text{pH} = 1^{19}$  et  $\text{pH} = 13$ .  $DO(\lambda_{\max})_{\text{pKa}}$  est ainsi calculée et reportée dans la relation linéaire  $DO(\lambda_{\max}) = f(\text{pH})$  pour déterminer le pKa du composé.

---

<sup>19</sup> Sauf dans le cas du bleu de thymol à cause de sa première constante d'acidité  $\text{pKa}_1 = 1,6$

### **3. Tests de criblage à haut-débit sur la vBPO d'*A. nodosum***

La recherche d'inhibiteurs de la vBPO d'*A. nodosum* a été effectuée par deux tests de criblage à haut débit, le premier en activité iodo- et le second en activité bromo-péroxydase. Les activités enzymatiques ont été suivies par la méthode colorimétrique au bleu de thymol mise au point précédemment. Ces tests ont été réalisés sur la plateforme de criblage du Service de Chimie Bioorganique et de Marquage du CEA-Saclay en collaboration avec Dr R. Lopez et G. Merer. Les déroulements des deux tests de criblage sont identiques.

#### **3.1. Plateforme de criblage à haut-débit et chimiothèque**

La plateforme de criblage comprend une station de travail Genesis Workstation 200 (Tecan) munie d'un plan de travail, d'un bras pipeteur/diluteur de 8 canaux (bras Gemini), d'un bras manipulateur de microplaque (bras RoMa), d'un carroussel de stockage de microplaques et d'un lecteur de code à barres. Selon le test de criblage à haut-débit effectué, différents modules supplémentaires peuvent être connectés à la station de travail :

- Un lecteur de plaque : détecteur de fluorescence-luminescence-TRF GEMINI XPS (Molecular Devices), détecteur UV-VIS à monochromateur de gamme 190-1000 nm SpectraMax Plus<sup>384</sup> (Molecular Device) ou détecteur radioactif MicroBeta TriLux (Perkin Elmer)
- Un laveur de microplaques Power Washer (Tecan)
- Un incubateur pour la culture cellulaire Hera® cell (Heraeus)
- Un hôtel de transit pour stocker temporairement les microplaques

La plateforme de criblage est pilotée à l'aide de deux logiciels : Gemini<sup>TM</sup> et FACTS<sup>TM</sup> (Tecan). Le logiciel Gemini<sup>TM</sup> permet de gérer la configuration de la station de travail et des différents modules, de générer les procédures d'action et de commander les deux bras robotisés. Le logiciel FACTS<sup>TM</sup> (Flexible Assay Composer and Task Scheduler) permet de définir la séquence des tâches à réaliser et de générer leur planification. Durant le déroulement du processus, FACTS<sup>TM</sup> re-planifie les tâches en temps réel compte tenu de la situation du système. L'avancement du processus est visualisable à tout moment, sous la forme d'un diagramme de Gantt.

Dans le cadre de notre étude, nous n'avons utilisé qu'un seul module supplémentaire : le spectrophotomètre SpectraMax Plus<sup>384</sup>.

La chimiothèque du laboratoire est une chimiothèque commerciale de 16480 composés extraite de la banque DIVERSet<sup>TM</sup> commercialisée par Chembridge (San Diego). Cette banque est constituée de composés sélectionnés *via* les descripteurs consensuels (règles de Lipinski) mais aussi par confrontation avec une base de données de pharmacophores 3D. Les produits sont garantis avec une pureté <sup>1</sup>H RMN supérieure à 90%. La chimiothèque est initialement conditionnée dans 206 microplaques 96 puits contenant chacune 80 composés répartis sur les colonnes de n°2 à n°11. Chaque puit d'une de ces colonnes comporte 500 µl d'une solution à 10 mM dans le DMSO d'un composé donné. Dès réception, la chimiothèque a été dupliquée en 20 jeux de 206 microplaques-filles 96 puits contenant 5 µl de solution de composés par puits sur les colonnes n°2 à n°11. Les colonnes n°1 à n°12 contiennent 5 µl de DMSO par puit. Pour permettre leur identification, chaque plaque fille a été affectée d'un code à barres identique à celui de sa plaque mère. Les microplaques sont conservées à - 18°C.

La chimiothèque est fournie avec une base de données consultable sur IsisBase, répertoriant l'ensemble des composés. Pour chaque composé, sont mentionnés son numéro d'identification, ses coordonnées (N° de plaque, de colonne et de ligne), sa structure ainsi que diverses caractéristiques physico-chimiques (poids moléculaire, logP, nombre d'accepteurs de proton, nombre de donneurs de proton...).

### 3.2. Préparation des solutions nécessaires à une journée de criblage

Les solutions d'enzyme, de bleu de thymol et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont préparées le jour-même de l'évaluation alors que les solutions de tampons peuvent être préparées deux jours à l'avance. Les produits commerciaux utilisés sont mentionnés ci-dessous :

- Solution de peroxyde d'hydrogène 30% wt dans H<sub>2</sub>O, ACS Reagent (21,676-3, Aldrich)
- Dihydrogénophosphate de sodium monohydrate, ACS Reagent 98-102% (S9638-500G, Sigma-Aldrich)
- Hydrogénophosphate de sodium, ReagentPlus > 99% (S0876-1KG, Sigma-Aldrich)
- Iodure de potassium, ReagentPlus 99% ( 20,796-9, Aldrich)
- Bromure de potassium, ACS Reagent > 99% (24,341-8, Aldrich)

- Bleu de thymol, ACS Reagent 95% (114545-5G, Sigma-Aldrich,)
- Diméthylsulfoxyde, ACS spectrométric grade > 99,9% (154938-500ML, Sigma-Aldrich)

Les solutions nécessaires à une journée de test de criblage – ce qui correspond à l'évaluation d'environ 50 microplaques de la chimiothèque – sont décrites ci-dessous.

### 3.2.1 Test en activité iodopéroxydase

**Tampon phosphate-KX :** 5,156 g de dihydrogénophosphate de sodium monohydrate et 13,632 g d'hydrogénophosphate de sodium sont dissous dans 800 ml d'eau ultra-pure. Après réajustement si nécessaire du pH, 0,332 g d'iodure de potassium sont ajoutés. Une solution de tampon phosphate à 167 mM et à pH = 7,2 comportant 2,5 mM de KI est obtenue.

**Solution de bleu de thymol :** A 56 mg de bleu de thymol sont ajoutés 24 ml de DMSO. Après solubilisation totale, 96 ml d'eau ultra-pure sont ajoutés pour donner une solution de bleu de thymol à 1 mM dans H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1

**Tampon chimiothèque :** Un mélange H<sub>2</sub>O/DMSO 80/15 est obtenu par ajout à 80 ml d'eau ultra-pure de 15 ml de DMSO.

**Solution vBPO :** 0,425 g de dihydrogénophosphate de sodium monohydrate et 1,122 g de hydrogénophosphate de sodium sont dissous dans 110 ml d'eau ultra-pure. Après réajustement du pH si nécessaire, 34,4 µl de la solution mère de vBPO à 8 mg/ml sont ajoutés. Une solution à 2,5 µg/ml de vBPO en tampon phosphate à pH = 7,2 et à 100 mM est obtenue.

**Tampon phosphate 100 mM :** Idem à **Solution vBPO** mais sans l'ajout d'enzyme

**Solution H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :** A 120 ml d'eau ultra-pure, sont rajoutées 47,6 µl d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 30% en poids pour obtenir une solution aqueuse de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3,5 mM.

### 3.2.2 Test en activité bromopéroxydase

**Tampon phosphate-KX :** 1,568 g de dihydrogénophosphate de sodium monohydrate et 17,324 g d'hydrogénophosphate de sodium sont dissous dans 800 ml d'eau ultra-pure. Après réajustement si nécessaire du pH, 1,590 g de bromure de potassium sont ajoutés. Une solution de tampon phosphate à 167 mM et à pH = 7,8 comportant 16,7 mM de KBr est obtenue.

**Solution bleu de thymol :** A 56 mg de bleu de thymol sont ajoutés 24 ml de DMSO. Après solubilisation totale, 96 ml d'eau ultra-pure sont ajoutés pour donner une solution de bleu de thymol à 1mM dans H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1

**Tampon chimiothèque :** Un mélange H<sub>2</sub>O/DMSO 80/15 est obtenu par ajout à 80 ml d'eau ultra-pure de 15 ml de DMSO.

**Solution vBPO :** 0,129 g de dihydrogénophosphate de sodium monohydrate et 1,426 g d'hydrogénophosphate de sodium sont dissous dans 110 ml d'eau ultra-pure. Après réajustement si nécessaire du pH, 82,5 µl de la solution mère de vBPO à 8 mg/ml sont ajoutés. Une solution à 6,0 µg/ml de vBPO en tampon phosphate à pH = 7,8 et à 100 mM est obtenue.

**Tampon phosphate 100 mM :** Idem à **Solution vBPO** mais sans l'ajout d'enzyme.

**Solution H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :** A 120 ml d'eau ultra-pure, sont rajoutées 13,6 µl d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 30% en poids pour obtenir une solution aqueuse de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 1 mM.

Pour s'assurer de la conformité des solutions, avant chaque journée de criblage, au moins huit expériences de suivi cinétique sont réalisées sur une microplaque. Les paramètres moyens (vitesse initiale, absorbance finale) des courbes DO(620 nm) = f(t) sont déterminés et comparés aux valeurs attendues.

	Activité bromopéroxydase	Activité iodopéroxydase
Vitesse initiale (s <sup>-1</sup> )	1,5.10 <sup>-3</sup> ± 0,1.10 <sup>-3</sup>	1,4.10 <sup>-3</sup> ± 0,1.10 <sup>-3</sup>
Absorbance finale	1,11 ± 0,02	1,03 ± 0,02

**Tab. 20 : Paramètres cinétiques moyens calculés sur 80 expériences**

### 3.2.3 Résumé des conditions de suivi cinétique

Les compositions finales dans les puits en activité iodo- et bromo-péroxydases sont mentionnées dans le tableau ci-dessous. Ces conditions seront aussi utilisées lors des tests de confirmation des hits.

	Activité IPO	Activité BPO
Volume total	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Tampon phosphate	110 mM, pH = 7,2	110 mM, pH = 7,8
Halogénure KX	1,5 mM (KI)	10 mM (KBr)
Bleu de thymol	100 $\mu$ M	100 $\mu$ M
Molécule chimiothèque	50 $\mu$ M	50 $\mu$ M
Enzyme	0,25 $\mu$ g/ml	0,60 $\mu$ g/ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,35 mM	0,10 mM
DMSO	4 % en volume	4 % en volume

Tab. 21 : Rappels des conditions pour le suivi des activités de la vBPO par le bleu de thymol

### 3.3. Eléments concernant l'exécution du test de criblage à haut-débit

#### 3.3.1 Plan de la microplaque de lecture

La microplaque de lecture est une plaque 96 puits transparente en polystyrène (Costar#9017, Corning). Le schéma adopté est présenté ci-dessous (Fig. 101). Les colonnes n°1 et n°12 correspondent aux expériences témoins. L'expérience témoin positif correspond à la réaction non catalysée d'halogénéation du bleu de thymol par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup> c'est-à-dire en l'absence de vBPO. L'expérience témoin négatif correspond à la réaction d'halogénéation du bleu de thymol par le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/X<sup>-</sup>, en l'absence d'inhibiteur.

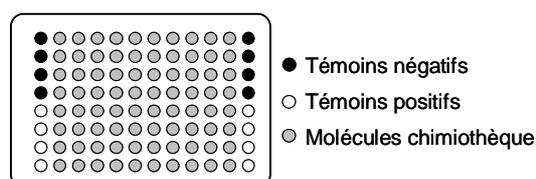
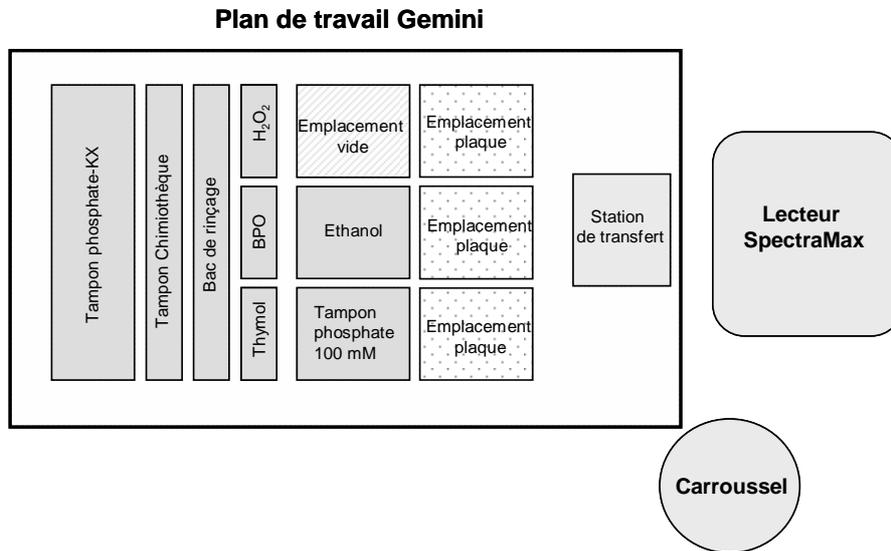


Fig. 101 : Schéma de la microplaque de lecture

#### 3.3.2 Configuration du plan de travail

L'agencement du plan de travail est présenté sur le schéma ci-dessous (Fig. 102). Il y est mentionné l'emplacement des réservoirs des différentes solutions ainsi que les stationnements possibles des plaques de la chimiothèque et des plaques de lecture. L'acheminement d'une plaque entre les différents modules (plan de travail Gemini, carroussel

et lecteur) nécessite le passage par la station de transfert qui permet au bras RoMa de la positionner et de la saisir correctement en vue de la destination finale.



**Fig. 102 : Organisation du plan de travail sur la plateforme de criblage**

### ***3.3.3 Séquence et planification des tâches***

Les protocoles des différentes actions et la configuration du plan de travail ont été programmés sous le logiciel GEMINI<sup>TM</sup>. La séquence des tâches a été définie sous FACTS<sup>TM</sup>. Le processus est linéaire. Aucun temps d'incubation n'est nécessaire. Le diagramme ci-dessous présente la séquence des actions (Fig. 103). Les microplaques de la chimiothèque (MP\_AB1300) et celles de lecture (MP\_Costar) sont disposées manuellement dans le carroussel de la plateforme. Avant de lancer le processus, la lecture des codes à barres des plaques est effectuée pour contrôler leur bon agencement.

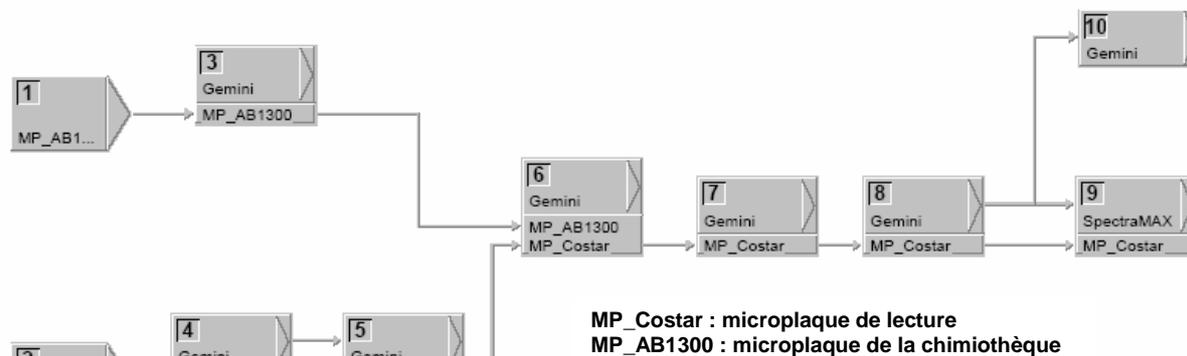


Fig. 103 : Séquence des tâches réalisées sous FACTS™

Liste des actions :

**Action 1 :** Déplacement de la microplaque chimiothèque (MP\_AB1300) depuis le carrousel sur le plan de travail Gemini.

**Action 2 :** Déplacement de la microplaque de lecture (MP\_Costar) depuis le carrousel sur le plan de travail Gemini.

**Action 3 :** Ajout de 95 µl de *Tampon chimiothèque* dans chaque puit de MP\_AB1300.

**Action 4 :** Ajout de 120 µl de *Tampon phosphate-KX* dans chaque puit de MP\_Costar.

**Action 5 :** Ajout de 20 µl de *Solution Thymol* dans chaque puit de MP\_Costar.

**Action 6 :** Transfert de 20 µl de chaque puit de la plaque MP\_AB1300 vers le puit correspondant de MP\_Costar.

**Action 7 :** Ajout de 20 µl de *Solution vBPO* dans chaque puit de MP\_Costar à l'exception de ceux correspondants aux témoins positifs. Pour ces derniers puits, ajout de 20 µl de *Tampon phosphate 100 mM* au lieu de la *Solution vBPO*.

**Action 8 :** Ajout de 20 µl de *Solution H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>* dans chaque puit de MP\_Costar.

**Action 9 :** Déplacement de MP\_Costar vers le lecteur SpectraMax. Suivi de la DO(620 nm) pendant 20 min à raison d'une mesure toutes les 20 s.

**Action 10 :** Cycle de lavage de la tête Gemini (éthanol/H<sub>2</sub>O).

A partir de cette séquence, FACTS™ génère un diagramme de Gantt présentant la planification des tâches pour un nombre de plaques défini. Deux contraintes ont été imposées :

- l'ordre des ajouts dans la plaque de lecture ne peut pas être modifié.
- l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, qui initie la réaction enzymatique, doit être immédiatement suivi par le transfert de la plaque vers le SpectraMax pour le suivi de la DO.

Le suivi de la DO(620 nm) de la plaque N se déroule pendant la préparation de la plaque N+1. L'étape limitante du processus est la préparation de la plaque de lecture (ajout des différentes solutions) qui dure 23 min. Après la lecture de chaque plaque, un fichier de format .txt est généré comportant le nom IPOx ou BPOx où x représente le numéro de la plaque de la chimiothèque allant de 001 à 206. Ces fichiers sont pris ultérieurement en charge par le programme codé en Matlab, mis au point par Dr J. Bect (Département Signaux et Systèmes Electroniques, Supélec), pour le traitement des données. Ci-dessous est présenté, à titre illustratif, le diagramme de Gantt généré pour l'évaluation d'un jeu de deux plaques de la chimiothèque.

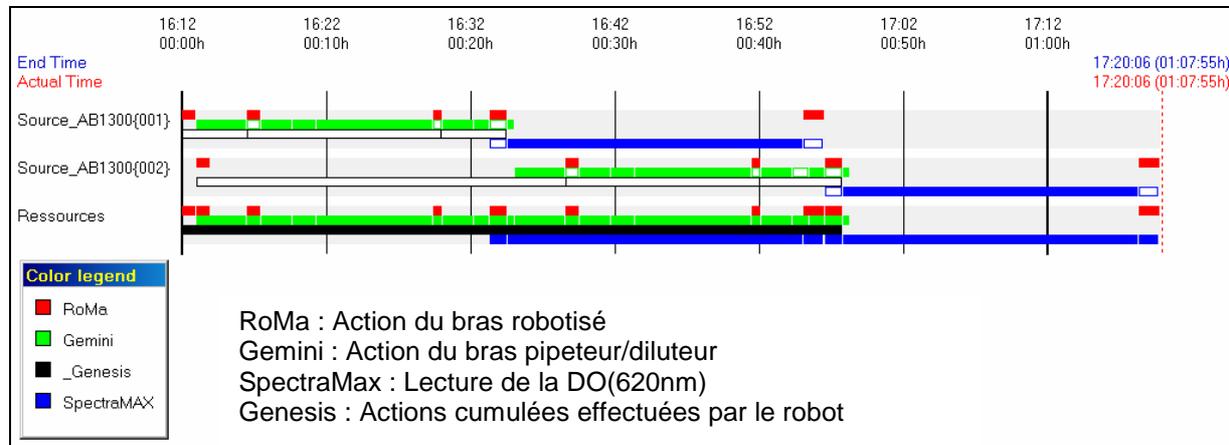


Fig. 104 : Diagramme de Gantt

### 3.4. Déroulement du test de criblage à haut-débit

Compte tenu de la baisse d'activité des solutions d'enzyme et de peroxyde d'hydrogène au bout d'une journée, il a été choisi d'effectuer la campagne de criblage en semi-continu c'est-à-dire d'évaluer la chimiothèque par lot d'une cinquantaine de plaques (ce qui correspond à un processus d'environ 21 h). Ainsi, chaque matin, les solutions d'enzyme et de peroxyde d'hydrogène sont préparées. Après vérification de la conformité des solutions,

les réservoirs sont nettoyés et remplis de solutions fraîches, le carroussel est alimenté en plaques de lecture et en plaques de la chimiothèque. Une nouvelle planification des tâches est générée et le processus de criblage est relancé. L'évaluation de la totalité de la chimiothèque pour une activité se déroule en 5 jours.

### **3.5. Tests secondaires**

#### ***3.5.1 Hit Picking (ou récolte des hits)***

A l'issue des deux tests de criblage primaire, un total de 400 hits a été sélectionné. Ces hits doivent être ré-évalués dans le but de confirmer leur activité et d'identifier les molécules les plus actives. Un jeu de cinq plaques filles nommées PO, comportant ces 400 hits, est réalisé à partir des plaques mères de la chimiothèque. Le volume disposé dans chaque puit des colonnes centrales des plaques filles est de 5 µl de la solution initiale à 10 mM de composé dans le DMSO. Les colonnes 1 et 12 comportent 5 µl de DMSO. Un programme comportant les coordonnées des produits à prélever sur les plaques-mères et leur emplacement sur les plaques-filles est généré grâce au logiciel Gemini<sup>TM</sup>. Le Hit Picking est effectué sur la station de travail selon un mode semi-automatique. Les plaques mères sont disposées manuellement sur le plan de travail ainsi que la plaque fille de destination. Le prélèvement et la distribution des composés sont effectués par le bras pipeteur/diluteur.

#### ***3.5.2 Principe et mise en œuvre des tests secondaires***

Les tests secondaires sur les 400 hits sont effectués à partir des plaques filles PO pour les deux activités iodo- et bromo-péroxydases. Les expériences sont effectuées selon un mode semi-automatique : la distribution des différentes solutions dans les puits des plaques filles PO et des plaques de lecture est réalisée avec le bras pipeteur/diluteur. Par contre, le déplacement des plaques et le déclenchement de la lecture de la DO(620nm) par le SpectraMax Plus<sup>384</sup> sont effectués manuellement. Le schéma de la plaque de lecture reste conservé.

#### ***3.5.3 Test de confirmation (test de criblage secondaire)***

Le test de validation se déroule selon les conditions et la séquence utilisées lors du test de criblage primaire. Cependant, la DO(620 nm) est mesurée toutes les 30 s pendant 20 minutes.

### 3.5.4 Effet de l'ajout de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A l'issue du test de validation, immédiatement après l'arrêt de la lecture de la DO(620 nm), 2 µl d'une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 35 mM pour l'activité iodopéroxydase et à 10 mM pour l'activité bromopéroxydase sont rajoutés dans chaque puit de la plaque évaluée. L'évolution de la DO(620nm) est ensuite suivie pendant 20 min à raison d'une mesure toutes les 30 s.

## 3.6. Etude du mécanisme d'action des hits

A l'issue des tests secondaires, 20 molécules perturbant fortement les cinétiques d'halogénéation du bleu de thymol par la vBPO ont été sélectionnées (cf. Annexe 4). Pour effectuer des tests supplémentaires en vue d'identifier leur mécanisme d'action, 5 mg de chaque composé ont été fournis par Chembridge, à l'exception du composé ID 5650837 qui n'était plus disponible.

### Solutions mères EVx

A partir des 5 mg de produits, des solutions mères à 15 mM sont préparées par dissolution dans le volume adéquate de DMSO. Ces solutions sont conservées à -18 °C. Le jour des tests, elles sont décongelées à l'étuve à 25°C sous agitation pendant 2h à 3h. Dès leur réception, la pureté des composés a été évaluée par CLHP/SM à partir de solutions (fraîchement préparées) à 0,5 mg/ml de composé dans un mélange MeCN/DMSO.

### Préparation des solutions nécessaires aux tests

**Solution de triiodure à 4 mM :** Cette solution est obtenue par dissolution de diiode (15,24 mg, 60 µmol) dans 15 ml d'une solution d'iodure de potassium à 16 mM (39,8 mg, 240 µmol).

**Solutions d'EVx à 1 mM :** A 20 µl de la solution mère EVx à 10 mM sont rajoutés 40 µl de DMSO puis 240 µl d'eau ultra-pure.

Pour les solutions d'iodure de potassium à 15 mM, de tampon phosphate à 200 mM et pH = 7,2, de bleu de thymol à 1mM, de vBPO à 2,5 µg/ml à pH = 7,2 et de peroxyde d'hydrogène à 3,5 mM, se référer aux solutions décrites dans la paragraphe 2.2.1.

### **3.6.1 Effet dose-réponse**

Pour chaque EVx, des solutions à 1 mM, 0,8 mM, 0,5 mM, 0,3 mM et 0,1 mM dans DMSO/H<sub>2</sub>O 1/4 sont obtenues par dilution de la solution mère à 15 mM. Chaque molécule EVx est testée à cinq concentrations (100 μM, 80 μM, 50 μM, 30 μM et 10 μM) en activités iodo- et bromo-péroxydases. Chaque expérience est renouvelée quatre fois.

### **3.6.2 Influence sur la cinétique de iodation chimique de bleu de thymol**

Dans une cuve de quartz, sont ajoutés successivement 1 ml de tampon phosphate (200 mM, pH = 7,2), 200 μl de solution de bleu de thymol à 1 mM, 200 μl de la solution d'iode de potassium à 15 mM, 100 μl d'une solution EVx à 1 mM et 500 μl d'eau ultrapure. Après homogénéisation, le spectre d'absorbance de ce mélange est enregistré entre 250 nm et 750 nm.

Toutes les minutes, 10 μl de la solution de triiodures à 4 mM (0,2 eq) sont rajoutés au mélange. Les DO à 350 nm (I<sub>3</sub><sup>-</sup>) et à 620 nm (bleu de thymol iodé) sont mesurées avant chaque ajout d'I<sub>3</sub><sup>-</sup>. Les ajouts sont poursuivis jusqu'à l'obtention d'un palier pour la DO(620 nm). Le spectre d'absorbance du milieu réactionnel est de nouveau enregistré entre 250 nm et 750 nm.

### **3.6.3 Suivis cinétiques des réactions de EVx avec les systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I<sub>3</sub><sup>-</sup>, vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et I<sub>3</sub><sup>-</sup> par CLHP**

#### Conditions utilisées en chromatographie liquide haute performance

Les suivis cinétiques sont effectués sur le système CLHP de caractéristiques suivantes :

- Pompe : LC-20AB (Shimadzu)
- Détecteurs : UV-Visible SPD-10A (Shimadzu), 190-600 nm
- Colonne : Zorbax SB C18, 4,6 mm x 25 cm

Le gradient d'élution est réalisé par mélange de deux solutions :

- A : H<sub>2</sub>O ultrapure contenant 0,1 % de TFA
- B : MeCN (HPLC Grade) contenant 0,1 % de TFA.

Le débit est fixé à 1ml/min et le volume injecté de l'échantillon à analyser est de 20 µl. Le tableau ci-dessous présente les conditions d'élution mise au point pour chaque molécule EVx étudiée.

N° Gradient	Gradient d'élution	Molécules ( $\lambda$ de détection)
1	0 min : 30% B 2 min : 30% B 12 min : 95% B 15 min : 95% B	EV06 (350 nm)
2	0 min : 10% B 1 min : 10% B 11 min : 95% B	EV03 (250) EV10 (250 nm) EV15 (250 nm) EV18 (250 nm) Hydrazine naphthoïque (250 nm)
3	0 min : 5 % B 3 min : 5% B 13 min : 95% B 15 min : 95% B	EV08 (250 nm)
4	0 min : 30% B 10 min : 95% B	EV19 (270 nm)

**Tab. 22 : Conditions CLHP pour les suivis cinétiques**

Les chromatogrammes sont traités à l'aide du logiciel Borwin.

#### Suivi cinétique de la réaction des hits EVx avec le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I

Pour chaque molécule, 540 µl de milieu sont préparés dans un eppendorf par ajouts successifs de :

- 300 µl de la solution de tampon phosphate à 200 mM et à pH = 7,2
- 60 µl de la solution de KI à 15 mM
- 30 µl de la solution de EVx à 1 mM dans H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1
- 60 µl de la solution de vBPO à 2,5 µg/ml dans le tampon phosphate à 100 mM et à pH = 7,2
- 90 µl d'eau ultra pure

Pour chaque point de la cinétique, 45 µl de cette solution sont prélevés. 5 µl de la solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3,5 mM sont rajoutés et le milieu réactionnel est homogénéisé au vortex.

Au temps pré-défini, 25 µl du milieu réactionnel sont prélevés et analysés par CLHP. Pour le temps initial de la cinétique, 5 µl d'eau sont additionnés à la place de la solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Les aires sous le pic de la molécule de départ et des produits formés sont reportées en fonction du temps.

#### Suivi cinétique de la réaction des hits EVx avec le système vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Pour chaque molécule EVx, 240 µl de milieu sont préparés dans un eppendorf par ajouts successifs de :

- 150 µl de la solution de tampon phosphate à 200 mM et à pH = 7,2
- 15 µl de la solution de EVx à 1 mM dans H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1
- 75 µl d'eau ultra pure

A 180 µl de ce mélange, 10 µl de la solution de vBPO à 2,5 µg/ml et de 10 µl de la solution H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 3,5 mM sont ajoutés. Le milieu réactionnel est homogénéisé au vortex. Toutes les heures, 20 µl du milieu réactionnel sont prélevés et analysés par CLHP.

A 40 µl du milieu initial, 5 µl de la solution de vBPO à 2,5 µg/ml et 10 µl d'eau sont ajoutés. Le milieu est homogénéisé au vortex. 20 µl sont immédiatement prélevés et analysés par CLHP pour obtenir l'état du système au temps initial. Une analyse supplémentaire est réalisée au bout de 4 heures pour évaluer la stabilité de EVx dans le tampon phosphate.

Les aires sous le pic de la molécule de départ et des produits formés sont reportées en fonction du temps.

#### Suivi des produits formés par réaction des hits EVx avec le triiodure

Pour chaque molécule EVx, 200 µl de milieu sont préparés par ajouts successifs de :

- 100 µl de la solution de tampon phosphate à 200 mM et à pH = 7,2
- 20 µl de la solution de KI à 15 mM
- 10 µl de la solution de molécule à 1 mM dans H<sub>2</sub>O/DMSO 4/1
- 70 µl d'eau ultra pure

Après homogénéisation, 25 µl de ce mélange sont prélevés et analysés par CLHP.

1,1 µl de la solution de triiodure à 4 mM (0,4 eq) sont ajoutés au milieu réactionnel restant. Deux minutes après l'ajout, 25 µl sont prélevés et analysés par CLHP. L'opération est

renouvelée jusqu'à consommation totale du produit de départ. 20 µl supplémentaires de la solution de triiodure sont alors additionnés au reste du milieu réactionnel. Au bout de quelques minutes, le milieu est analysé par CLHP. Une nouvelle analyse est effectuée au bout de quelques heures pour vérifier la stabilité des produits formés.

#### 3.6.4 Produits formés par réaction de EVx et des systèmes vBPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/I et I<sub>3</sub><sup>-</sup>

En raison de la faible quantité de produits EVx disponible, l'identification des produits formés est effectuée par analyse CLHP/SM des bruts réactionnels.

##### Conditions CLHP-SM

Les analyses ont été effectuées sur une chaîne CL-ESI-QUAD possédant les caractéristiques suivantes :

- Pompe : Waters 2525
- Détecteurs : Barrette de diodes (UV 210-400 nm), détecteur évaporatif à diffusion de lumière, spectromètre de masse à électrospray positif (ESI<sup>+</sup>) et négatif (ESI<sup>-</sup>)
- Colonne : CX-Bridge C18 (3,5 µm x 4,6 mm x 10 cm)

Le débit est fixé à 1ml/min et le volume injecté est 20 µl. L'éluant est obtenu par mélange de deux solutions :

- A : H<sub>2</sub>O + 0,1 % d'acide formique
- B : Acétonitrile + 0,1 % d'acide formique

Profil d'élution :

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

##### Protocole

Les conditions expérimentales sont identiques à celles présentées précédemment (cf. paragraphe 3.6.3) à part que la concentration de EVx est de 200 ou de 300 µM. Selon l'expérience, des ajouts successifs d'une solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 35 mM ou de la solution de triiodure sont effectués jusqu'à ce que le taux de conversion du produit de départ soit satisfaisant. Le milieu réactionnel est alors analysé par CLHP-SM.



## **Bibliographie**

1. Vilter H: **Aqueous Two-Phase Systems** *Methods Enzym* 1994, **228**:665-672.
2. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
3. Colin C: **Caractérisation biochimique et moléculaire des halopéroxydases dépendantes du vanadate chez l'algue brune *Laminaria digitata*.** PhD report, Ecole doctorale sciences de l'environnement d'Ile-de-France, Université Paris VI; 2004.



## **Chapitre 2 : Expériences de suivi de l'influx des iodures par traceur $^{125}\text{I}^-$**

Des expériences de suivi de l'influx ou d'accumulation des iodures par traçage par le radionucléide  $^{125}\text{I}$  ont été effectuées pour les deux thématiques présentées dans le présent mémoire. Pour la thématique algue, nous avons évalué si les hits identifiés par les tests de criblage à haut-débit sur la vBPO d'*A. nodosum* sont capables d'inhiber la captation d'iodure chez *L. digitata*. Pour la thématique mammifère, nous avons évalué la capacité des molécules synthétisées à inhiber l'accumulation des iodures chez les lignées cellulaires hNIS-HEK-293 et FRTL-5.

### **1. Matériels et procédures communs aux deux séries d'expériences**

Les manipulations mettant en jeu  $\text{Na}^{125}\text{I}$  s'effectuent dans une pièce dédiée à cet effet, sous sorbonne, pour éviter toute contamination par voie respiratoire.

#### **Solution mère de $\text{Na}^{125}\text{I}$ (initialement à 5 mCi/ml) :**

Elle est préparée à partir de la solution de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  à 100 mCi /ml, dans NaOH à 0,01M et à pH 8-10 (ISM-30-5 mCi, Amersham Bioscience). Elle est obtenue par dilution, dès réception, des 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  à 5 mCi dans 950  $\mu\text{l}$  d'eau ultra-pure. Elle est conservée à température ambiante dans un pilulier serti, au sein d'une boîte de plomb. Son activité est ré-évaluée au cours du temps grâce à la table de décroissance de l'activité. La demi-période de  $^{125}\text{I}$  est de 59,4 jours.

#### **Microplaques de lecture et scintillant :**

Les microplaques utilisées sont des Isoplate-96 TC (Perkin Elmer) stériles à fonds transparents et à parois opaques. Elles sont adaptées au comptage de la radioactivité par scintillation liquide. Le scintillant utilisé est Analytic Unisafe 1 (Zinsser).

#### **Lecteur radioactif MicroBéta trilux (Perkin Elmer) :**

MicroBeta triLux est un lecteur de microplaque (96 ou 24 puits) adapté au comptage par scintillation des radioéléments :  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{51}\text{Cr}$  et  $^{125}\text{I}$ . Le comptage est effectué simultanément pour 6 puits grâce à six détecteurs. Chaque détecteur possède deux tubes photo-multiplicateurs, un placé au-dessus, l'autre au-dessous de l'échantillon, pour optimiser

la détection. Le lecteur est piloté par le logiciel MicroBeta Workstation qui permet de déterminer les paramètres de lecture et de générer un fichier de résultats (.txt) exploitable par Microsoft Excel.

## **2. Test de suivi de l'influx des iodures chez *L. digitata***

L'influence des hits issus du test de criblage à haut-débit sur le mécanisme de captation d'iodure par *L. digitata* a été évaluée par un test de suivi de l'influx d'iodure (flux unidirectionnel), en utilisant comme traceur  $^{125}\text{I}$ . Le principe de l'expérience consiste à suivre la cinétique d'appauvrissement du surnageant en  $^{125}\text{I}$ .

### **2.1. Matériel biologique**

#### ***2.1.1 Provenance des algues***

Les sporophytes sauvages de *L. digitata* sont récoltés à marée basse aux alentours de Roscoff (Bretagne). Selon la saison et la zone de récolte, l'âge des sporophytes varie. Leur taille est en général supérieure à 80 cm. Pour les grands individus, le stipe est coupé au ras de la zone méristématique et l'extrémité des frondes est retirée. Le jour-même de la récolte, les sporophytes sont conditionnés dans des sacs plastiques contenant de l'eau de mer. Les sacs plastiques sont disposés dans des boîtes isothermes contenant des blocs congélation et envoyés par transporteur. La réception au laboratoire se fait dans les 24 h.

#### ***2.1.2 Conservation***

Au laboratoire, les sporophytes sont conservés dans un aquarium de 57 litres (Aquarium Tetra 57 L) contenant 40 litres d'eau de mer artificielle thermostatée à 12-14°C grâce à un tube échangeur alimenté par un mélange eau/éthanol 2/1 grâce à un bain cryothermostat (Julabo F10). L'eau de mer artificielle est obtenue par dilution de 1,32 kg de sel marin synthétique (Reef Crystals enriched blend, Aquarium Systems) dans 40 litres d'eau ultra pure. Toutes les semaines, la moitié de l'eau de l'aquarium est changée pour éviter l'appauvrissement du milieu, en particulier, en iode. L'aquarium est muni d'un filtre intérieur (Tetraec IN 400 plus) réglé à un débit de 400 L/h et de deux pompes, une à air (Rena Air 100) réglée à 120 L/h et une à eau (Eheim 1000 station 220 V), pour permettre une bonne oxygénation et un brassage important du milieu. Les sporophytes sont exposés à un cycle lumière/obscurité 12h/12h grâce à un néon fluorescent de 15 W. Les sporophytes peuvent être

conservés jusqu'à un mois sans diminution de leur capacité d'accumulation de l'iode. Au-delà de cette période, des taches se transformant en plaques de lyse sont observables à la surface des frondes. La fréquence de ces lésions est plus élevée en période estivale. Entre chaque lot d'algues, l'aquarium est entièrement nettoyé et désinfecté.

### 2.1.3 Préparation des solutions

**Solution de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  à 0,7 mCi/ml :** Cette solution est préparée le jour même de l'expérimentation par dilution du volume adéquate de la solution mère de  $\text{Na}^{125}\text{I}$  dans de l'eau ultra-pure, en tenant compte de la décroissance de l'activité de  $^{125}\text{I}$ .

**Solution d'eau de mer artificielle (Emer) :** Cette solution est préparée par dissolution de 33 g de sel artificiel (Crystal Reef) dans un litre d'eau ultra pure.

**Solution de EVx à 15 mM dans le DMSO :** Ces solutions sont obtenues par dilution 5 mg de composés (Chembridge) dans le volume adéquate de DMSO (ACS spectrométric grade > 99,9%)

## 2.2. Protocole expérimental

Des pastilles de 0,5 cm de diamètre ( $\approx 20$  mg) sont découpées dans la partie centrale de la lame exempte d'épiphytes et de lésions d'un thalle de *L. digitata* à l'aide d'un emporte-pièce. Chaque pastille est disposée dans un puit d'une plaque polystyrène 12 puits (Corning Costar cell culture plates) contenant 2 ml d'eau de mer artificielle. La plaque est laissée à équilibrer à température ambiante, sous agitation, pendant 30 min. Le surnageant est alors retiré et 2 ml d'eau de mer artificielle sont rajoutés. Après 20 min d'équilibration sous agitation, 20  $\mu\text{l}$  d'une solution de  $^{125}\text{I}$  à 0,7 mCi/ml puis 13,3  $\mu\text{l}$  d'une solution de EVx à 15 mM dans le DMSO sont rajoutés. Cette dernière solution est remplacée par du DMSO pour les expériences témoins négatifs. La plaque est ensuite fermée par un couvercle en plastique et laissée sous agitation à température ambiante. A chaque temps d'intérêt, 20  $\mu\text{l}$  de surnageant sont prélevés et disposés dans le puit adéquat d'une microplaque de lecture 96 puits (isoplate, Wallac) contenant 180  $\mu\text{l}$  de scintillant (Unisafe1, Zinsser Analytic). L'influx de  $^{125}\text{I}$  est suivie pendant 6 h ce qui donne lieu à 11 points de mesures environ. Le volume de surnageant est diminué d'environ 10 % à la fin de l'expérience. Chaque expérience est menée en triplicat. Une fois la cinétique terminée, la microplaque de lecture est scellée avec un film adhésif, mise à agiter pendant une nuit puis comptée (MicroBeta Trilux, Perkin Elmer).

Pour chaque expérience, à partir de la courbe moyenne de la radioactivité au sein du surnageant au cours du temps, la vitesse d'influx est déterminée par régression linéaire sur les premiers points de la cinétique. Les résultats sont normalisés par rapport aux valeurs obtenues pour les expériences témoins.

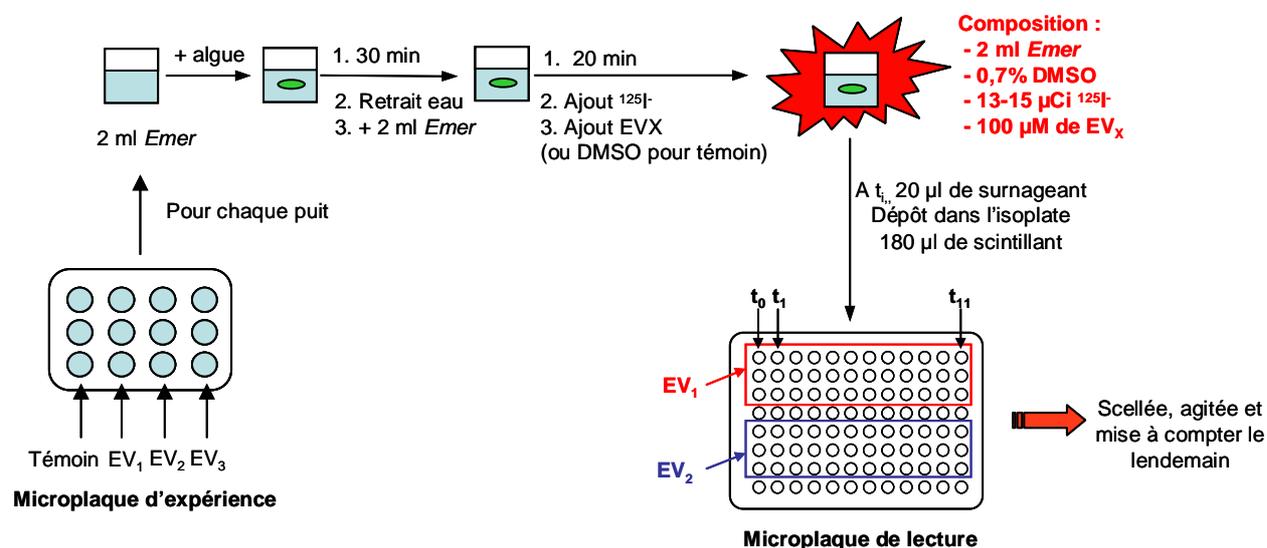


Fig. 105 : Protocole du suivi de l'influx de  $^{125}\text{I}$  chez *L. digitata*

### 3. Evaluation de l'activité des molécules synthétisées

#### 3.1. Matériels et produits utilisés en culture cellulaire

Les manipulations – hors celles impliquant  $^{125}\text{I}$  – sont réalisées dans une pièce dédiée à la culture cellulaire. Cette pièce est équipée d'une hotte à flux laminaire (HERAsafe, Heraeus), d'un microscope inversé (DMIL, Leica), d'une centrifugeuse (5810R, Eppendorf), d'un incubateur à CO<sub>2</sub> (HERAcell, Heraeus), d'une autoclave (Prater, Subtil Crépieux) et d'un bain marie. Sous la hotte à flux laminaire, sont laissés en permanence le distributeur de cellules (Multidrop 384, ThermoLabsystems), un agitateur magnétique et un jeu de micropipettes (Eppendorf).

#### Distributeur de cellules Multidrop 384 (Thermo labsystems)

Le distributeur de cellules permet de distribuer rapidement, avec une grande précision, un micro-volume de suspension cellulaire dans les puits d'une microplaque. Il est muni d'une pompe péristaltique raccordée à une canule de 8 canaux d'aspiration en silicone qui est

plongée dans le milieu cellulaire. Cette canule est intégrée à une cassette de distribution détachable et auto-clavable pour assurer la stérilité du système et éviter les contaminations croisées.

#### Laveur de plaque Power Washer 384 (Tecan)

Cet appareil permet un lavage très rapide (2-3 secondes) de microplaques 96 ou 384 puits et peut être intégré à une plateforme de criblage. Sa tête de lavage comporte 96 couples d'aiguille aspiration/distribution de liquide. Les différents paramètres de lavage – vitesses d'aspiration et de distribution et hauteur de l'aiguille d'aspiration – peuvent être modulés pour fournir le cycle de lavage le mieux adapté. Ces paramètres peuvent être définis directement sur l'appareil manuellement ou par l'intermédiaire du logiciel WinWashPlus™. Dans le cadre de notre étude, le programme de lavage utilise la fonction « Overflow » qui permet l'ajout de 600 µl de liquide de lavage (tampon HBSS à 10 mM d'HEPES) simultanément à l'aspiration. Les vitesses de distribution et d'aspiration ont été fixées au minimum pour éviter le décrochage des cellules. L'aiguille d'aspiration est légèrement décentrée sur la gauche et située à 73 mm du fond du puit. A la fin du cycle de lavage, un volume résiduel de 100 µl de solution est présent dans chaque puit.

#### Liste des produits utilisés et références :

- Acétate de L-Glycine-L-Histidine-L-Lysine (G7387, Sigma)
- Bleu de trypan 0,4% (T8154, Sigma)
- Coon's modified Ham's F12 medium (F0855, Biochrom)
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) stérile >99,7% (D2650, Sigma).
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium ou DMEM (D6429, Sigma)
- Dubelcco's Phosphate Buffered Saline ou PBS (D8537, Sigma)
- Hanks' balanced salt solution ou HBSS (H9269, Sigma)
- HEPES Buffer 1M (H0887, Aldrich)
- Hydrocortisone à 98%( H0888, Sigma)
- Insuline du pancréas de veau >27 unités/mg (I5500, Sigma)
- L-Glutamine 200 mM (G7513, Sigma)
- Iodure de sodium à 99,999% (409286-1G, Aldrich)

- Pénicilline/streptomycine 100x (P4333, Sigma)
- Poly-L-lysine 0,01% (P4707, Sigma)
- Sérum de veau fœtal inactivé (10500-064, GIBCO)
- Thyroid-Stimulating Hormone ou TSH 2UI/mg en protéine (T8931, Sigma)
- Transferrine humaine à 98% (T8158, Sigma)
- Trypsine-EDTA 0,25% (T4049, Sigma)
- Trypsine-EDTA 1x (0,05%) (T3924, Sigma)

### **3.2. Lignée HEK-293**

#### ***3.2.1 Description***

Human Embryonic Kidney cells ou HEK-293, est une lignée de cellules épithéliales dérivant de cellules embryonnaires humaines de rein. Cette lignée a été générée par le Professeur Frank Graham [1] par transformation des cellules HEK normales avec des fragments linéaires d'ADN d'adénovirus de type 5. Cette lignée cellulaire est très utilisée en biologie cellulaire à cause de sa stabilité, de sa facilité à être cultivée et à être transfectée. En contre-partie, cette lignée ne constitue pas un modèle mimant de manière satisfaisante le comportement de cellules normales et cancéreuses. Les cellules HEK-293 sont donc utilisées essentiellement pour étudier une fonction biochimique particulière. Les expériences consistent, en général, à transfecter un gène (ou une combinaison de gènes) d'intérêt et à étudier la protéine exprimée et le phénotype associé.

Les expériences décrites dans le présent mémoire ont été réalisées sur une lignée stable de cellules HEK-293 exprimant la protéine NIS humaine. Cette lignée a été fournie gracieusement par le Dr T. Pourcher (CEA/TIRO). Elle a été générée par transfection à l'aide d'un plasmide contenant un ADNc codant pour la protéine NIS humaine. Le plasmide utilisé est pcDNA3-mNIS (CEA/TIRO), dérivé du vecteur d'expression pcDNA3.1 (Invitrogen).

#### ***3.2.2 Milieu de culture HEK***

A 450 ml de milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sont ajoutés 5 ml d'une solution de L-Glutamine à 200 mM, 5 ml d'une solution de pénicilline/streptomycine à 100 mg/ml et 50 ml de sérum de veau fœtal inactivé. Le milieu de culture contient donc 2 mM

de L-Glutamine, 1 mg/ml de pénicilline/streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal inactivé. Des ajouts supplémentaires de L-Glutamine sont effectués ensuite tous les 2 à 3 jours. Le milieu est conservé jusqu'à 15 jours à + 4°C.

### **3.2.3 Culture des cellules HEK**

Les cellules HEK sont cultivées dans des flasques stériles de 150 cm<sup>2</sup> (Falcon) dans 25 ml de milieu de culture présenté ci-dessus, en enceinte stérile, en présence d'une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C. Tous les deux jours, le surnageant est retiré, le tapis cellulaire est lavé par 10 ml de tampon HBSS à 37°C et 25 ml de milieu de culture à 37°C sont ajoutés. Ces opérations sont renouvelées jusqu'à confluence. Pour un ensemencement initial de 1.10<sup>6</sup> cellules, la confluence est atteinte au bout d'une semaine. Un passage est alors effectué en utilisant une solution de trypsine-EDTA à 0,05% (cf. paragraphe 3.4)

## **3.3. Lignée FRTL-5**

### **3.3.1 Description**

La lignée FRTL-5 a été générée à partir de follicules thyroïdiens de rat (de 5-6 semaines) par isolement de clones successifs [2]. Elle se caractérise par le très bon maintien des caractéristiques biochimiques et morphologiques des cellules folliculaires primaires en particulier, par sa capacité à sécréter la thyroglobuline en quantité physiologique et à accumuler les iodures. Cependant, elle présente une très faible activité peroxydase. Cette lignée reste dépendante à la TSH (Thyroid-Stimulating Hormone) et nécessite, la présence de différentes hormones ou facteurs de croissance dans le milieu de culture [2]. Cette lignée nous a été gracieusement fournie par Pr. B. Rousset (INSERM U664/IFR 62 Lyon Est).

### **3.3.2 Cocktail d'hormones nécessaire à la culture de FRTL-5**

**Solution de TSH 1000 X:** A un flacon de TSH lyophilisée à 10 U.I sont ajoutés 10 ml de tampon HBSS. Cette solution est divisée en fractions de 3 ml stockées à - 18°C.

**Solution d'insuline 1000 X :** 500 mg d'insuline sont dissous dans 50 ml de tampon HBSS. Pour aider à la solubilisation, quelques gouttes d'une solution de NaOH 1N sont ajoutées avant ajustement du volume. Cette solution est divisée en fractions de 3 ml stockées à - 18°C.

**Solution de Transferrine humaine 1000 X :** 500 mg de transferrine humaine sont dissous dans 100 ml de tampon HBSS. Cette solution est divisée en fractions de 3 ml stockées à - 18°C.

**Solution d'hydrocortisone 1000 X :** A 3,62 mg d'hydrocortisone sont ajoutés dans 2 ml d'éthanol absolu puis 8 ml de tampon HBSS. Après homogénéisation du milieu, 50 µl de ce mélange sont dilués dans 50 ml de tampon HBSS. Cette dernière solution est divisée en fractions de 3 ml qui sont stockées à - 18°C.

**Solution d'acétate de L-Glycine-L-Histidine-L-Lysine 1000 X :** Une solution à 1 mg/ml est préparée en tampon HBSS. 100 µl de cette solution est re-diluée dans 50 ml de tampon HBSS. Cette dernière solution est divisée en fractions de 3 ml qui sont stockées à - 18°C.

**Cocktail d'hormones 5H (100 X) :** Dans 15 ml de tampon HBSS sont ajoutés successivement 3 ml de solution 1000 X de TSH, 3 ml de solution 1000 X d'insuline, 3 ml de solution 1000 X de transferrine humaine, 3 ml de solution 1000 X d'hydrocortisone et 3 ml de solution 1000 X d'acétate de Glycine-L-Histidine-L-Lysine. Après homogénéisation, cette solution est divisée en fractions de 5 ml qui sont stockées à - 18°C.

### **3.3.3 Milieu de culture FRTL-5:**

Dans 500 ml de milieu Coon's modified Ham's F12, sont ajoutés 5 ml d'une solution de L-Glutamine à 200 mM , 5 ml d'une solution de pénicilline/streptomycine à 100 mg/ml, 25 ml de sérum de veau fœtal inactivé et 5 ml du cocktail d'hormones 5H à 100 X. Le milieu de culture contient donc 2 mM de L-Glutamine, 1mg/ml de penicilline/streptomycine, 4,6% de sérum de bœuf inactivé, 10 µg/ml d'insuline, 10 nM d'hydrocortisone, 10 ng/ml d'acétate de L-Glycyl-L-Histidine-L-Lysine, 1 mU/ml de TSH et 5 µg/ml de transferrine. Les ajouts de 5 ml de cocktail d'hormones 5H et de 5 ml de L-Glutamine sont renouvelés tous les 2 à 3 jours. Le milieu est conservé jusqu'à 15 jours à + 4°C.

### **3.3.4 Culture des cellules FRTL-5:**

Les cellules FRTL-5 sont cultivées dans des flasques stériles de 150 cm<sup>2</sup> (Falcon) dans 25 ml de milieu de culture présenté ci-dessus, en enceinte stérile, en présence d'une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C. Tous les deux jours, le surnageant est retiré, le tapis cellulaire est lavé par 10 ml de tampon HBSS à 37°C et 25 ml de milieu de culture à 37°C sont ajoutés. Ces opérations sont renouvelées jusqu'à confluence. Pour un

ensemencement initialement de  $2.10^6$  cellules, la confluence est atteinte au bout d'une semaine. Un passage est alors effectué par une solution de trypsine-EDTA à 0,25 % (cf. paragraphe 3.4).

### **3.4. Protocole de passage**

Le milieu de culture complet (approprié à la lignée), le tampon HBSS et la solution de trypsine-EDTA (0,25 % pour FRTL-5 et à 0,05 % pour HEK-293) sont amenés à 37°C par bain-marie. Dès la sortie de la flasque de culture (à confluence) de l'incubateur, le surnageant est retiré et 10 ml de tampon HBSS à 37°C sont rajoutés pour laver le tapis cellulaire. Au bout de quelques secondes, le surnageant est retiré et 3 ml de trypsine-EDTA sont rajoutés directement sur le tapis cellulaire. La flasque est alors placée dans l'incubateur pendant 2 min pour les cellules HEK-293 et 8-10 min pour les cellules FRTL-5. Une fois les cellules décollées et bien désolidarisées, 10 ml de tampon de culture sont rajoutées dans la flasque. La suspension cellulaire est homogénéisée rapidement et centrifugée pendant 5 min à 1500 RPM. Le surnageant est ensuite retiré par aspiration et le culot cellulaire est re-suspendu dans exactement 10 ml de milieu de culture.

Le nombre de cellules par ml de cette solution est évalué par comptage sur cellule de Malassez à partir d'une solution comportant 20  $\mu$ l de la suspension cellulaire, 160  $\mu$ l de tampon PBS et 20  $\mu$ l de Bleu de Trypan à 0,4%. Le volume de suspension cellulaire adéquat est introduit dans une flasque stérile comportant 25 ml de milieu de culture à 37°C. Après homogénéisation, la flasque est placée dans l'incubateur.

### **3.5. Evaluation des IC<sub>50</sub>**

#### ***3.5.1 Ensemencement des cellules dans les microplaques***

L'ensemencement des cellules HEK-293 ou FRTL-5 dans les microplaques Isoplate-96 TC (Perkin-Elmer) s'effectue trois jours avant le test. Pour éviter que les cellules HEK-293 ne se décollent lors des lavages des microplaques, les puits subissent un coating avant l'ensemencement. A cette fin, 30  $\mu$ l de poly-L-Lysine sont disposés dans chaque puit de telle manière à bien recouvrir le fond puis sont retirés. 200  $\mu$ l de tampon PBS sont ensuite ajoutés et retirés par aspiration, pour éliminer la poly-L-Lysine excédentaire. Les plaques sont laissées à sécher au sein de la hotte à flux laminaire.

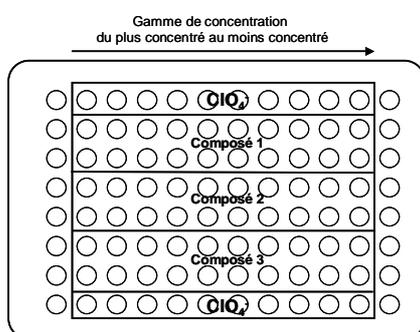
Pour atteindre la confluence le jour de l'évaluation, il est nécessaire d'ensemencer 35 000 cellules/puit pour HEK-293 ou 40 000 cellules/puit pour FRTL-5. La solution à ensemencer est obtenue par dilution de la suspension cellulaire obtenue lors du passage, dans un volume donné de tampon de culture à 37°C. Dès préparation, cette solution est distribuée dans les puits des colonnes n°2 à n°11 des microplaques par le dispenseur de cellules (Multidrop 384), à raison de 200 µl/puit. Les microplaques sont ensuite disposées dans l'incubateur (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) pendant trois jours.

### 3.5.2 Préparation des solutions

**Tampons HBSS à 10 mM de HEPES :** A 500 ml de tampon HBSS sont ajoutés 5 ml de tampon HEPES à 1 M. Un lot de tampon est laissé à température ambiante et un second à 4°C (pour le lavage final des plaques).

**Solution de NaI à 100 µM et à 20 µCi/ml :** A 2 ml de tampon HBSS à 10 mM d'HEPES, sont ajoutés 2 µl d'une solution de NaI à 1 mM et le volume adéquate de la solution mère de Na<sup>125</sup>I initialement à 5 mCi/ml compte tenu de la décroissance d'activité.

**Solutions des composés à tester :** Le jour de l'évaluation, pour chaque composé, une solution mère à 10 mM est préparée par dissolution dans du DMSO stérile. Une gamme de concentrations  $1,1 \cdot 10^{-3}$  M à  $1,1 \cdot 10^{-12}$  M est préparée par dilutions successives (facteur 10) de la solution mère dans une solution de HBSS à 1 mM de HEPES, dans une microplaque de stockage. Chaque gamme est dupliquée. Sur les lignes n°1 et n°12 est disposée une gamme de concentrations du perchlorate de sodium obtenue aussi par dilution successive d'une solution mère à 10 mM. Ci-dessous est présenté le schéma de plaque :



Colonne 2 : Ajout de 22,2 µl de la solution mère de composé à 10 mM dans 178,8 de tampon HBSS à 1 mM d'HEPES

Colonne 3 : Ajout de 20 µl de la colonne 2 dans 180 µl de tampon HBSS à 10 mM d'HEPES.

Et ainsi de suite pour les autres colonnes ...

**Fig. 106 : Microplaque de stockage**

### 3.5.3 Protocole

Une fois sortie de l'incubateur, la microplaque est lavée (Power Washer 384, Tecan) avec le tampon HBSS à 10 mM HEPES à température ambiante. La microplaque est laissée à équilibrer à température ambiante pendant 30 min. Le surnageant est ensuite retiré. 90 µl des solutions de la microplaque de stockage (contenant les composés) sont immédiatement ajoutés dans chaque puit. 10 µl de la solution Na<sup>125</sup>I à 20 µCi/ml sont additionnés. La microplaque est fermée par un couvercle et laissée sous faible agitation à température ambiante, pendant 1 heure pour les cellules HEK-293 ou 45 minutes pour les cellules FRTL-5. La microplaque est ensuite lavée (Power Washer 384, Tecan) avec le tampon HBSS à 4°C et le surnageant résiduel est retiré. Dans chaque puit, 30 µl d'éthanol puis 160 µl de scintillant (Analytic Unisafe 1, Zinsser) sont ajoutés. La microplaque est scellée par un film adhésif (Sealing tape, Perkin Elmer), agitée une nuit et analysée avec le détecteur de radioactivité (MicroBeta Trilux).

La courbe d'IC<sub>50</sub> est obtenue par une méthode de régression non linéaire consistant à faire corrélérer les données expérimentales à la courbe théorique de Hill par la méthode des moindres carrés.

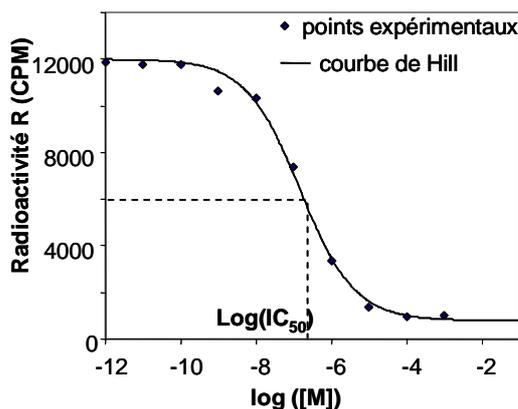


Fig. 107 : Courbe d'effet-dose réponse et régression non linéaire

Equation de Hill reliant la valeur de radioactivité comptée (R) en fonction de la concentration en composé C :

$$R = R_{\min} + \frac{R_{\max} - R_{\min}}{1 + \left[ \frac{10^{\log(IC_{50})}}{10^{\log(C)}} \right]^n}$$

où R<sub>max</sub> et R<sub>min</sub> correspondent respectivement aux valeurs maximale et minimale de la variable R, IC<sub>50</sub> à la concentration en composé pour laquelle on observe un effet d'inhibition de 50% et n au nombre de Hill.



## **Bibliographie**

1. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R: **Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5.** *J Gen Virol* 1977, **36**:59-72.
2. Ambesi-Impiombato FS, Parks LAM, Coon HG: **Culture of Hormone-Dependent Functional Epithelial Cells from Rat Thyroids.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, **77**:3455-3459.



## **Chapitre 3 : Synthèses des hits et de leurs dérivés anilines et azotures**

### **Méthodes analytiques et solvants**

#### *Chromatographie sur couche mince (CCM)*

Les plaques utilisées sont de type Silice Merck 60 F-254 d'épaisseur 0,25 mm sur support de verre. Les produits sont révélés à la lampe UV (254 nm) et/ou avec un révélateur chimique (solution éthanolique à 5% d'acide phosphomolybdique).

#### *Chromatographie sur colonne de gel de silice*

Les chromatographies sur colonne sont effectuées sous pression, à l'aide d'une poire, sur gel de silice Merck (granulométrie 40-63  $\mu\text{m}$ ). Les éluants utilisés sont indiqués dans les modes opératoires.

#### *Spectre d'absorption infrarouge (IR)*

Les spectres sont effectués sur un spectromètre Perkin Elmer System 2000 FT-IR. Les échantillons liquides sont placés entre deux pastilles de NaCl. Une pastille de KBr est préparée pour les échantillons solides. Les nombres d'onde des bandes IR sont exprimés en  $\text{cm}^{-1}$  à leur maximum d'intensité.

#### *Spectrométrie de masse (SM)*

Les spectres ont été effectués sur un spectromètre MARINER ESI-TOF (Perspectives Biosystems) en mode electrospray couplé au temps de vol.

#### *Spectrométrie de Masse Haute Résolution (SMHR)*

Ces analyses sont effectuées par le Service de Microanalyse de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS à Gif-sur-Yvette en ESI-TOF.

#### *Chromatographie liquide haute performance couplée à la masse (LC/SM)*

Les analyses sont effectuées sur une chaîne CL-ESI-QUAD (Waters) munie d'un détecteur à barrette de diodes (UV 210-400 nm, Waters), d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (PL-ELS 1000, Polymer Laboratory) et d'un spectromètre de masse à électrospray positif ( $\text{ESI}^+$ ) et négatif ( $\text{ESI}^-$ ). La colonne utilisée est une CX-Bridge C18 3,5  $\mu\text{m}$  x 4,6 mm x

100 mm). Le débit de la phase mobile est fixé à 1ml/min et le volume injecté est 20 µl. L'éluant est obtenu par mélange de deux solutions :

A : H<sub>2</sub>O + 0,1 % d'acide formique

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

Profil d'élution :

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

### Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN <sup>1</sup>H et RMN <sup>13</sup>C ont été obtenus sur un spectromètre BRUKER ADVANCED 400. Les fréquences de résonance du carbone et du proton sont 400,13 MHz et 100,624 MHz, respectivement. Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au déplacement des solvants de référence :

Solvant	δ ( <sup>1</sup> H)	δ ( <sup>13</sup> C)
Chloroforme	7,26 ppm	77,2 ppm
Diméthylsulfoxyde	2,50 ppm	39,5 ppm
Dichlorométhane	5,32 ppm	54,0 ppm

Les déplacements chimiques sont présentés par ordre croissant. L'attribution des différents signaux correspond à la numérotation indiquée sur la structure du produit. Cette numérotation ne suit pas les règles de nomenclature de l'IUPAC. A la suite du déplacement chimique sont précisés entre parenthèses : la multiplicité du signal, les valeurs des constantes de couplage (J) en Hertz, si elles sont mesurables, la valeur de l'intégration du signal et enfin, son attribution. Les multiplicités des différents signaux sont indiquées à l'aide des abréviations précisées dans le tableau ci-dessous :

s : singulet	dd : doublet de doublet
d : doublet	td : triplet de doublet
t : triplet	ddd : doublet de doublet de doublet
m : multiplet	s.e : signal élargi

Pour faciliter l'attribution des signaux <sup>13</sup>C, dans le cas de certaines structures, une expérience Dept135 est effectuée. Les spectres sont traités avec le logiciel Xwin NMR.

### Point de fusion

Les points de fusion sont effectués sur l'appareil BUCHI 535.

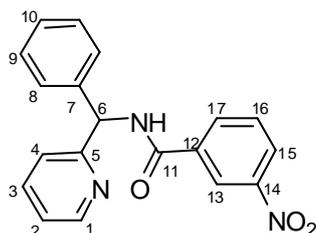
### Spectre Ultra-Violet

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

### Solvants anhydres et conditions expérimentales :

Les expériences sensibles à l'humidité et/ou à l'air ont été effectuées dans des montages secs (flambés sous vide) sous atmosphère d'argon. Les solvants anhydres courants ont été préparés par distillation sous argon en présence de leurs agents de dessiccation respectifs (sodium/benzophénone pour le tétrahydrofurane et l'éther diéthylique, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> pour le dichlorométhane). Les autres solvants ont été achetés anhydres. Les expériences mettant en jeu des réactifs ou des produits comportant un groupement photo-activable sont effectuées à l'abri de la lumière.

### 3-nitro-N-(phényl(pyridin-2-yl)méthyl)benzamide 1



**Formule brute :** C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**PM :** 333,34 g.mol<sup>-1</sup>

**Point de fusion :** 137 °C

A une solution de phényl(pyridin-2-yl)méthanamine 13 (0,72 g, 3,90 mmol) dans le dichlorométhane (35 ml) sont ajoutés successivement l'acide 3-nitrobenzoïque (0,77 g, 4,61 mmol), la *N,N*-diisopropyléthylamine (0,85 ml, 4,89 mmol) et *N,N,N',N'*-tetraméthyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU, 1,73 g, 4,56 mmol) à 0°C. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit. Une solution de LiOH à 1M est ensuite additionnée (6 ml). Au bout de 30 min d'agitation, du dichlorométhane (500 ml) est ajouté. La phase organique est lavée par une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10% (2 x 200 ml) et par une solution saturée de NaCl (50 ml), séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puis concentrée sous vide. Le résidu solide obtenu est purifié par chromatographie sur silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH : 100/1). Un solide blanc est isolé (1,17g, 3,51 mmol).

**Rendement :** 90%

**RMN <sup>1</sup>H (DMSO, δ en ppm) :** δ = 6,50 (d, <sup>3</sup>J = 8,0 Hz, 1H, H<sub>6</sub>) ; 7,34 (m, 4H, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>2</sub>) ; 7,46 (m, 2H, H<sub>8</sub>) ; 7,54 (d, <sup>3</sup>J = 8,0 Hz, 1H, H<sub>4</sub>) ; 7,83 (m, 2H, H<sub>3</sub>, H<sub>16</sub>) ; 8,43 (m, 2H, H<sub>15</sub>, H<sub>17</sub>) ; 8,60 (d, <sup>3</sup>J = 4,8 Hz, 1H, H<sub>1</sub>) ; 8,82 (m, 1H, H<sub>13</sub>) ; 9,74 (d, <sup>3</sup>J = 8,0 Hz, 1H, NH)

**RMN <sup>13</sup>C (DMSO, δ en ppm) :** δ = 59,0 (C<sub>6</sub>) ; 122,3 (C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub> ou C<sub>13</sub> ou C<sub>15</sub>) ; 122,8 (C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub> ou C<sub>13</sub> ou C<sub>15</sub>) ; 122,9 (C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub> ou C<sub>13</sub> ou C<sub>15</sub>) ; 126,4 (C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub> ou C<sub>13</sub> ou C<sub>15</sub>) ; 127,7 (C<sub>10</sub>) ; 128,2 (C<sub>8</sub> ou C<sub>9</sub>) ; 128,8 (C<sub>8</sub> ou C<sub>9</sub>) ; 130,4 (C<sub>16</sub>) ; 134,6 (C<sub>3</sub> ou C<sub>12</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 135,9 (C<sub>3</sub> ou C<sub>12</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 137,4 (C<sub>3</sub> ou C<sub>12</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 141,5 (C<sub>7</sub>) ; 148,1 (C<sub>1</sub> ou C<sub>14</sub>) ; 149,4 (C<sub>1</sub> ou C<sub>14</sub>) ; 160,6 (C<sub>11</sub> ou C<sub>5</sub>) ; 164,4 (C<sub>11</sub> ou C<sub>5</sub>)

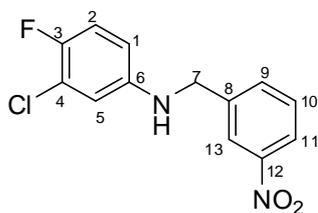
**CLHP/SM :** t = 9,6 min, m/z : 334 ([M+1]<sup>+</sup>)

**Spectrométrie de masse (ESI/TOF) :** 334 ([M+1]<sup>+</sup>, 100)

**IR (KBr, ν cm<sup>-1</sup>) :** ν = 3313 (N-H st) ; 3083 (=C-H st) ; 1644 (C=O st) ; 1588 (N-H δ) ; 1530, 1348 (NO<sub>2</sub> st) ; 1472, 1434 (C=C st) ; 1323 (C-N st) ; 767, 754, 702 (=C-H δ)

**SMHR :** calculée pour C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>Na ([M+Na]<sup>+</sup>) : 356,1011  
mesurée : 356,1015

## 3-chloro-4-fluoro-N-(3-nitrobenzyl)benzèneamine 2



**Formule brute :** C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**PM :** 280,68 g.mol<sup>-1</sup>

**Point de fusion :** 66°C

A une solution de 3-nitrobenzaldéhyde (1,2 g, 7,6 mmol) dans le dichloroéthane anhydre (25 ml) sont ajoutés successivement la 3-chloro-4-fluoroaniline (1,0 g, 6,9 mmol) l'acide acétique (0,4 ml, 6,9 mmol) et le triacétoxyborohydride de sodium (2,1 g, 9,7 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante, pendant trois heures. Une solution de NaOH 2N (10 ml, 20 mmol) est ensuite additionnée lentement. Cette phase aqueuse est extraite par l'acétate d'éthyle (2 x 200 ml). Les phases organiques sont regroupées, lavées par une solution saturée de NaCl (30 ml), séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrées sous vide. L'huile jaune obtenue est purifiée par chromatographie sur silice (hexane/AcOEt : 5/1). Une poudre jaune vif est obtenue (1,2 g, 4,4 mmol).

**Rendement :** 64 %

**RMN <sup>1</sup>H (DMSO, δ en ppm) :** δ = 4,46 (d, <sup>3</sup>J = 6,0 Hz, 2H, H<sub>7</sub>) ; 6,58 (m, 1H, H<sub>1</sub>) ; 6,68 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 6,0 Hz, NH) ; 6,73 (dd, <sup>4</sup>J = 6,0 Hz, <sup>4</sup>J = 2,8 Hz, 1H, H<sub>5</sub>) ; 7,12 (t, <sup>3</sup>J = 8,8 Hz, 1H, H<sub>2</sub>) ; 7,67 (t, <sup>3</sup>J = 8,0 Hz, 1H, H<sub>10</sub>) ; 7,85 (m, 1H, H<sub>9</sub>) ; 8,14 (d, <sup>3</sup>J = 8,0 Hz, 1H, H<sub>11</sub>) ; 8,26 (m, 1H, H<sub>13</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C (DMSO, δ en ppm) :** δ = 46,80 (C<sub>7</sub>) ; 113,2 (d, <sup>3</sup>J = 8 Hz, C<sub>1</sub> ou C<sub>5</sub>) ; 113,8 (s.e, C<sub>5</sub> ou C<sub>1</sub>) ; 118,1 (d, <sup>2</sup>J = 22 Hz, C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub>) ; 120,6 (d, <sup>2</sup>J = 18 Hz, C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub>) ; 122,8 (C<sub>11</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 123,0 (C<sub>13</sub> ou C<sub>11</sub>) ; 131,1 (C<sub>9</sub>) ; 135,1 (C<sub>10</sub>) ; 143,6 (C<sub>8</sub>) ; 146,9 (d, <sup>4</sup>J = 3 Hz, C<sub>6</sub>) ; 149,1 (C<sub>12</sub>) ; 150,4 (d, <sup>1</sup>J = 233 Hz, C<sub>3</sub>)

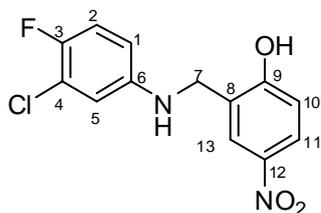
**CLHP/SM :** t = 7,9 min, m/z : 281 ([M+1]<sup>+</sup>), 283 ([M+3]<sup>+</sup>)

**Spectrométrie de masse (ESI/TOF) :** 281 ([M+1]<sup>+</sup>, 100), 283 ([M+3]<sup>+</sup>, 45)

**IR (KBr, ν cm<sup>-1</sup>) :** ν = 3429 (N-H st) ; 3065, 2942, 2862 (=C-H st) ; 1611 (N-H δ) ; 1507 (NO<sub>2</sub> st, C-F st) ; 1445, 1324 (C=C st), 1346 (NO<sub>2</sub> st) ; 1227 (C-N st) ; 893, 801, 729 (=C-H δ)

**SMHR :** calculée pour C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>FCl ([M+H]<sup>+</sup>) : 281,0493  
mesurée : 281,0503

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



**Formule brute :** C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**PM :** 296,68 g.mol<sup>-1</sup>

**Point de fusion :** 141 °C

A une solution de 2-hydroxy-5-nitrobenzaldéhyde (1,3 g, 7,6 mmol) dans le dichloroéthane anhydre (40 ml) sont ajoutés successivement la 3-chloro-4-fluoroaniline (1,0 g, 6,9 mmol), l'acide acétique (0,4 ml, 6,9 mmol) et le triacétoxyborohydride de sodium (2,1 g, 9,7 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante, pendant trois heures. Une solution de NaOH 2N (25 ml, 50 mmol) est ensuite additionnée lentement. Le précipité jaune vif formé est filtré et lavé par une solution glacée de dichloroéthane/NaOH 2N : 1/1. Le précipité est ensuite repris dans l'eau (15 ml) et additionné d'une solution de HCl 1N (35 ml). La phase aqueuse obtenue est extraite par le dichlorométhane (2 x 200 ml). Les phases organiques sont regroupées, lavées par une solution de NaCl saturée (40 ml), séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrées sous vide. Une poudre jaune est obtenue (1,6 g, 5,4 mmol). Pour les évaluations biologiques, une fraction de cette poudre a été purifiée par chromatographie sur silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH : 98/2).

**Rendement :** 78%

**RMN <sup>1</sup>H (DMSO, δ en ppm) :** δ = 4,27 (s, 2H, H<sub>7</sub>) ; 6,49 (s.e, 1H, NH) ; 6,56 (m, 1H, H<sub>1</sub>) ; 6,71 (dd, 1H, <sup>4</sup>J = 2,8 Hz, <sup>4</sup>J = 6,0 Hz, H<sub>5</sub>) ; 7,05 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 8,8 Hz, H<sub>10</sub>) ; 7,13 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 9,2 Hz, H<sub>2</sub>) ; 8,07 (dd, <sup>3</sup>J = 8,8 Hz, <sup>4</sup>J = 2,8 Hz, 1H, H<sub>11</sub>) ; 8,12 (d, 1H, <sup>4</sup>J = 2,8 Hz, H<sub>13</sub>) ; 11,38 (s.e, 1H, OH)

**RMN <sup>13</sup>C (DMSO, δ en ppm) :** δ = 49,0 (C<sub>7</sub>) ; 112,2 (d, <sup>3</sup>J = 6 Hz, C<sub>5</sub> ou C<sub>1</sub>) ; 112,8 (C<sub>5</sub> ou C<sub>1</sub>) ; 115,6 (C<sub>8</sub>) ; 117,4 (d, <sup>2</sup>J = 21 Hz, C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub>) ; 119,8 (d, <sup>2</sup>J = 18 Hz, C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub>) ; 124,2 (C<sub>10</sub> ou C<sub>11</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 124,8 (C<sub>10</sub> ou C<sub>11</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 127,2 (C<sub>10</sub> ou C<sub>11</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 140,0 (C<sub>12</sub>) ; 146,2 (<sup>4</sup>J = 2 Hz, C<sub>6</sub>) ; 149,6 (d, <sup>1</sup>J = 234 Hz, C<sub>3</sub>) ; 162 (C<sub>9</sub>)

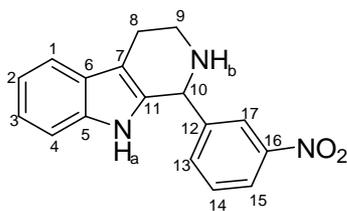
**CLHP/SM :** t = 7,8 min, m/z : 297 ([M+1]<sup>+</sup>), 299 ([M+3]<sup>+</sup>)

**Spectrométrie de masse (ESI/TOF) :** 297 ([M+1]<sup>+</sup>, 100) ; 299 ([M+3]<sup>+</sup>, 36)

**IR (KBr, ν cm<sup>-1</sup>) :** ν = 3270 (N-H st) ; 3077-2562 (O-H st) ; 1616 (N-H δ) ; 1592, 1342 (NO<sub>2</sub> st) ; 1525 (C-F st) ; 1456, 1402 (C=C st) ; 1269 (C-N st) ; 872, 842, 821, 753 (=C-H δ)

**SMHR :** calculée pour C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>FCl ([M+H]<sup>+</sup>) : 297,0442  
mesurée : 297,0445

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



**Formule brute :** C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**PM :** 293,32 g.mol<sup>-1</sup>

**Point de fusion :** 161°C

A une solution de tryptamine (2,03 g, 12,7 mmol) dans le dichlorométhane (50 ml) sont additionnés le 3-nitrobenzaldéhyde (1,92 g, 12,7 mmol) puis goutte à goutte l'acide trifluoroacétique (1,2 ml, 16,2 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante, pendant 16 h. La formation d'un précipité jaune et un brunissement du surnageant sont observés. Le milieu réactionnel est filtré. Le précipité est lavé par du dichlorométhane à 0°C (3 x 10 ml). Le précipité est ensuite repris dans une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10% (300 ml). Cette phase aqueuse est extraite par le dichlorométhane (2 x 500 ml). Les phases organiques sont rassemblées, lavées par une solution saturée de NaCl (200 ml), séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrées sous vide. Un solide jaune vif est obtenu (3,06 g, 10,4 mmol). Pour les évaluations biologiques, une fraction de ce produit a été purifiée par chromatographie sur silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 100/1).

**Rendement :** 82 %

**RMN <sup>1</sup>H (DMSO, δ en ppm) :** δ = 2,75 (m, 2H, H<sub>8</sub>) ; 3,06 (m, 3H, H<sub>9</sub>, NH<sub>b</sub>) ; 5,30 (s, 1H, H<sub>10</sub>) ; 7,03 (m, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>) ; 7,26 (d, <sup>3</sup>J = 7,6 Hz, 1H, H<sub>4</sub>) ; 7,47 (d, <sup>3</sup>J = 7,6 Hz, 1H, H<sub>1</sub>) ; 7,66 (m, 1H, H<sub>14</sub>) ; 7,81 (d, <sup>3</sup>J = 7,6 Hz, 1H, H<sub>13</sub>) ; 8,19 (m, 2H, H<sub>15</sub>, H<sub>17</sub>) ; 10,56 (s, 1H, NH<sub>a</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C (DMSO, δ en ppm) :** δ = 22,0 (C<sub>8</sub>) ; 41,6 (C<sub>9</sub>) ; 56,1 (C<sub>10</sub>) ; 109,0 (C<sub>7</sub>) ; 111,5 (C<sub>4</sub>) ; 118,1 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 118,8 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 121,2 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 122,6 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 123,3 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 127,2 (C<sub>6</sub>) ; 130,0 (C<sub>14</sub>) ; 134,7 (C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>) ; 135,7 (C<sub>13</sub>) ; 136,4 (C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>) ; 146,0 (C<sub>12</sub>) ; 148,0 (C<sub>16</sub>) (d'après expériences <sup>13</sup>C et Dept 135)

**CLHP/SM :** t = 5,4 min, m/z : 294 ([M+1]<sup>+</sup>)

**Spectrométrie de masse (ESI/TOF) :** 294 ([M+1]<sup>+</sup>, 100)

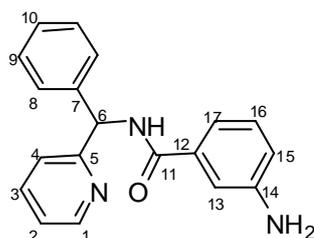
**IR (KBr, ν cm<sup>-1</sup>) :** ν = 3398 (N-H st) ; 3057, 2917, 2843 (=C-H st) ; 1527, 1349 (NO<sub>2</sub> st) ; 1450 (C=C st) ; 807, 737 (=C-H δ)

**SMHR :** calculée pour C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) : 294,1243, mesurée : 294,1240

**Purification par CLHP chirale des énantiomères 4a et 4b à partir de 4 (7 mg, 0,02 mmol)**

Colonne :	Chiralcel OD (OD00CE-BH031)	Enantiomère <u>4a</u> :	3 mg (e.e > 99%)
Eluant :	Hexane/Ethanol 9/1	Temps de rétention :	31,2 min
Débit :	1 ml/min	Enantiomère <u>4b</u> :	2,5 mg (e.e > 99%)
Détection :	UV, λ = 225 nm	Temps de rétention :	48,2 min

### 3-amino-N-(phényl(pyridin-2-yl)méthyl)benzamide 5



**Formule brute :** C<sub>19</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O

**PM :** 303,36 g.mol<sup>-1</sup>

A une solution de 3-nitro-N-(phényl(pyridin-2-yl)méthyl)benzamide 1 (300 mg, 0,90 mmol) dans le méthanol (40 ml) est ajouté du palladium sur charbon activé à 10% (100 mg, 0,094 mmol). Après trois cycles de dégazage, le milieu réactionnel est placé sous atmosphère d'hydrogène, à pression atmosphérique, sous vive agitation et à température ambiante. Au bout de 50 min, le milieu réactionnel est filtré sur célite. La célite est lavée par l'éthanol (3 x 10 ml). Le filtrat est concentré sous vide pour donner un solide blanc (235 mg, 0,78 mmol).

**Rendement :** 87%

**RMN <sup>1</sup>H (DMSO, δ en ppm) :** δ = 5,32 (s.e, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 6,41 (d, <sup>3</sup>J = 8,4 Hz, 1H, H<sub>6</sub>) ; 6,76 (m, 1H, H<sub>15</sub>) ; 7,15 (m, 3H, H<sub>13</sub>, H<sub>16</sub>, H<sub>17</sub>) ; 7,32 (m, 4H, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>, H<sub>2</sub>) ; 7,44 (m, 2H, H<sub>8</sub>) ; 7,57 (m, 1H, H<sub>4</sub>) ; 7,83 (td, <sup>3</sup>J = 7,6 Hz, <sup>4</sup>J = 1,6 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ; 8,59 (d, <sup>3</sup>J = 4,8 Hz, 1H, H<sub>1</sub>) ; 8,98 (d, <sup>3</sup>J = 8,4 Hz, 1H, NH)

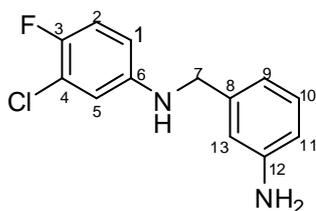
**RMN <sup>13</sup>C (DMSO, δ en ppm) :** δ = 58,2 (C<sub>6</sub>) ; 113,2 (C<sub>13</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 115,0 (C<sub>13</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 117,0 (C<sub>13</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 122,3 (C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub>) ; 122,8 (C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub>) ; 127,4 (C<sub>10</sub>) ; 127,9 (C<sub>8</sub> ou C<sub>9</sub>) ; 128,7 (C<sub>8</sub> ou C<sub>9</sub>) ; 129,1 (C<sub>16</sub>) ; 135,6 (C<sub>3</sub> ou C<sub>12</sub>) ; 137,4 (C<sub>3</sub> ou C<sub>12</sub>) ; 142,3 (C<sub>7</sub>) ; 149,1 (C<sub>1</sub> ou C<sub>14</sub>) ; 149,2 (C<sub>1</sub> ou C<sub>14</sub>) ; 160,8 (C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>) ; 166,7 (C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>)

**CLHP/SM :** t = 8,1 min, m/z : 304,19 ([M+1]<sup>+</sup>)

**Spectrométrie de masse (ESI/TOF) :** 304 ([M+1]<sup>+</sup>, 100)

**IR (KBr, ν cm<sup>-1</sup>) :** ν = 3346, 3324 (N-H st) ; 3055 (=C-H st) ; 1649 (C=O st) ; 1585 (N-H δ) ; 1509, 1483, 1433 (C=C st) ; 1323 (C-N st) ; 752, 699 (=C-H δ)

## N-(3-aminobenzyl)-3-chloro-4-fluorobenzèneamine 6



**Formule brute :** C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>ClFN<sub>2</sub>

**PM :** 250,70 g.mol<sup>-1</sup>

**Point de fusion :** 61°C

A une solution de 3-chloro-4-fluoro-N-(3-nitrobenzyl)benzèneamine **2** (0,50 g, 1,78 mmol) dans un mélange éthanol/eau 2/1 (35 ml) sont ajoutés successivement l'acide acétique (0,92 ml, 16,0 mmol) et la poudre de fer (0,90 g, 16,1 mmol). La poudre de fer est préalablement activée par une solution de HCl 1N (2 x 1 ml), lavée par de l'eau distillée (2 x 1 ml), de l'éthanol (2 x 1 ml) et de l'éther diéthylique (2 x 1 ml) puis séchée sous vide. Le milieu réactionnel est porté à reflux, sous vive agitation, pendant 20 min. Un brunissement puis un noircissement du milieu réactionnel sont observés pendant le reflux. Après refroidissement, une solution d'ammoniaque à 30% est rajoutée (10 ml). Le milieu réactionnel est filtré sur célite. Le résidu obtenu par concentration du filtrat est repris dans l'acétate d'éthyle (150 ml). Cette phase organique est lavée par une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10% (2 x 50 ml) et par une solution saturée de NaCl (20 ml), séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puis concentrée sous vide. L'huile orange obtenue est purifiée par chromatographie sur silice (hexane/AcOEt 5/2) pour donner un solide beige pâle (330 mg, 1,32 mmol).

**Rendement :** 74 %

**RMN <sup>1</sup>H (DMSO, δ en ppm) :** δ = 4,12 (d, <sup>3</sup>J = 5,6 Hz, 2H, H<sub>7</sub>) ; 5,07 (s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 6,39 (t, <sup>3</sup>J = 5,6 Hz, 1H, NH) ; 6,55 (m, 4H, H<sub>1</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>11</sub>, H<sub>13</sub>) ; 6,66 (dd, <sup>4</sup>J = 6,4 Hz, <sup>4</sup>J = 2,8 Hz, 1H, H<sub>5</sub>) ; 7,00 (t, <sup>3</sup>J = 7,6 Hz, 1H, H<sub>10</sub>) ; 7,11 (t, <sup>3</sup>J = 9,2 Hz, 1H, H<sub>2</sub>)

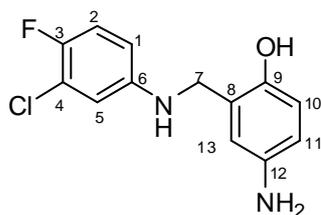
**RMN <sup>13</sup>C (DMSO, δ en ppm) :** δ = 47,4 (C<sub>7</sub>) ; 112,1 (d, <sup>3</sup>J = 6 Hz, C<sub>1</sub> ou C<sub>5</sub>) ; 112,6 (s.e, C<sub>1</sub> ou C<sub>5</sub>) ; 112,8 (C<sub>9</sub> ou C<sub>11</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 112,9 (C<sub>9</sub> ou C<sub>11</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 115,0 (C<sub>9</sub> ou C<sub>11</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 117,2 (d, <sup>2</sup>J = 21 Hz, C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub>) ; 119,6 (d, <sup>2</sup>J = 18 Hz, C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub>) ; 129,2 (C<sub>10</sub>) ; 140,4 (C<sub>8</sub>) ; 146,8 (d, <sup>4</sup>J = 2 Hz, C<sub>6</sub>) ; 149,1 (C<sub>12</sub>) ; 149,3 (d, <sup>1</sup>J = 233 Hz, C<sub>3</sub>)

**CLHP/SM :** t = 6,4 min, m/z : 251 ([M+1]<sup>+</sup>), 253 ([M+3]<sup>+</sup>)

**Spectrométrie de masse (ESI/TOF) :** 251 ([M+1]<sup>+</sup>, 100), 253 ([M+3]<sup>+</sup>, 34)

**IR (KBr, ν cm<sup>-1</sup>) :** ν = 3438, 3351, 3289 (N-H st) ; 3108, 3019, 2891 (=C-H st) ; 1619 (N-H δ) ; 1503 (C-F st) ; 1460, 1330 (C=C st) ; 1218 (C-N st) ; 867, 856, 811, 787 (=C-H δ)

## 4-amino-2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)phénol 7



**Formule brute :** C<sub>13</sub>H<sub>12</sub>ClFN<sub>2</sub>O

**PM :** 266,70 g.mol<sup>-1</sup>

**Point de fusion :** 163°C

A une solution de 2-((3-chloro-4-fluorophénylamino)méthyl)-4-nitrophénol **3** (0,50 g, 1,67 mmol) dans un mélange éthanol/eau 2/1 (35 ml) sont ajoutés successivement l'acide acétique (1,8 ml, 31,5 mmol) et la poudre de fer (0,90 g, 16,1 mmol). La poudre de fer est préalablement activée par une solution de HCl 1N (2 x 1 ml), lavée par de l'eau distillée (2 x 1 ml), de l'éthanol (2 x 1 ml) et de l'éther diéthylique (2 x 1 ml) puis séchée sous vide. Le milieu réactionnel est porté à reflux, sous vive agitation, pendant 50 min. La formation d'un précipité roux est observée pendant le reflux. Après refroidissement, une solution aqueuse d'ammoniaque à 30% (5 ml) est rajoutée. Le milieu réactionnel est filtré sur célite. Le résidu obtenu par concentration du filtrat est repris dans le dichlorométhane (150 ml). Cette phase organique est lavée par une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10% (2 x 50 ml), séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrée sous vide. Le résidu orange obtenu est purifié par chromatographie sur silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 100/1) pour donner un solide blanc (0,29 g, 1,09 mmol).

**Rendement :** 65%

**RMN <sup>1</sup>H (DMSO, δ en ppm) :** δ = 4,07 (d, <sup>3</sup>J = 6,0 Hz, 2H, H<sub>7</sub>) ; 4,42 (s.e, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 6,22 (t, <sup>3</sup>J = 6,0 Hz, 1H, NH) ; 6,35 (dd, <sup>3</sup>J = 8,4 Hz, <sup>4</sup>J = 2,8 Hz, 1H, H<sub>11</sub>) ; 6,49 (d, <sup>4</sup>J = 2,8 Hz, 1H, H<sub>13</sub>) ; 6,54 (m, 1H, H<sub>1</sub>) ; 6,58 (d, <sup>3</sup>J = 8,4 Hz, 1H, H<sub>10</sub>) ; 6,66 (dd, <sup>4</sup>J = 6,4 Hz, <sup>4</sup>J = 2,8 Hz, 1H, H<sub>5</sub>) ; 7,11 (t, <sup>3</sup>J = 9,2 Hz, 1H, H<sub>2</sub>) ; 8,54 (s, 1H, OH)

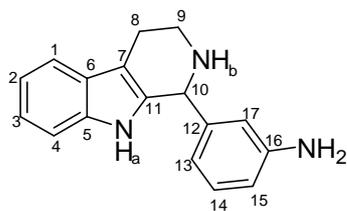
**RMN <sup>13</sup>C (DMSO, δ en ppm) :** δ = 42,1 (C<sub>7</sub>) ; 112,0 (d, <sup>3</sup>J = 6,1 Hz, C<sub>1</sub> ou C<sub>5</sub>) ; 112,4 (s.e, C<sub>1</sub> ou C<sub>5</sub>) ; 113,9 (C<sub>10</sub> ou C<sub>11</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 114,7 (C<sub>10</sub> ou C<sub>11</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 116,0 (C<sub>10</sub> ou C<sub>11</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 117,2 (d, <sup>2</sup>J = 21 Hz, C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub>) ; 119,6 (d, <sup>2</sup>J = 20 Hz, C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub>) ; 125,7 (C<sub>8</sub>) ; 141,2 (C<sub>12</sub>) ; 146,2 (C<sub>9</sub>) ; 146,9 (d, <sup>4</sup>J = 2 Hz, C<sub>6</sub>) ; 149,2 (d, <sup>1</sup>J = 241 Hz, C<sub>3</sub>)

**CLHP/SM :** t = 5,2 min, m/z : 267 ([M+1]<sup>+</sup>) ; 269 ([M+3]<sup>+</sup>)

**Spectrométrie de masse (ESI/TOF) :** 267 ([M+1]<sup>+</sup>, 100) ; 269 ([M+3]<sup>+</sup>, 36)

**IR (KBr, ν cm<sup>-1</sup>) :** ν = 3382, 3319 (N-H st) ; 2958-2607 (O-H, st), 1612 (N-H δ) ; 1515 (C-F st) ; 1461, 1399 (C=C st) ; 1219 (C-N st) ; 895, 820, 797 (=C-H δ)

### 3-(2,3,4,9-tétrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)benzèneamine 8



**Formule brute :** C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>

**PM :** 263,34 g.mol<sup>-1</sup>

**Point de fusion :** 173°C

A une solution de 1-(3-nitrophényl)-2,3,4,9-tétrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole **4** (786 mg, 2,68 mmol) dans le méthanol (50 ml) est ajoutée une quantité catalytique de palladium sur charbon activé à 10% (290 mg, 0,27 mmol). Après trois cycles de dégazage, le milieu réactionnel est placé sous atmosphère d'hydrogène, à pression atmosphérique, sous vive agitation et à température ambiante. Au bout d'une heure, le milieu réactionnel est filtré sur célite. La célite est lavée à l'éthanol (3 x 10 ml). Le filtrat est concentré sous vide pour donner un solide blanc (636 mg, 2,42 mmol).

**Rendement :** 90 %

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) :** δ = 2,73 (m, 2H, H<sub>8</sub>) ; 2,96 (m, 1H, H<sub>9</sub>) ; 3,15 (m, 1H, H<sub>9'</sub>) ; 3,40 (s.e, 1H, NH<sub>b</sub>) ; 4,96 (s, 1H, H<sub>10</sub>) ; 5,04 (s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 6,02 (m, 3H, H<sub>13</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>17</sub>) ; 7,02 (m, 3H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>14</sub>) ; 7,29 (d, <sup>3</sup>J = 8,0 Hz, 1H, H<sub>4</sub>) ; 7,45 (d, <sup>3</sup>J = 7,6 Hz, 1H, H<sub>1</sub>) ; 10,43 (s, 1H, NH<sub>a</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm)\* :** δ = 22,8 (C<sub>8</sub>) ; 41,8 (C<sub>9</sub>) ; 57,4(C<sub>10</sub>) ; 109,0 (C<sub>7</sub>) ; 112,0 (C<sub>4</sub>) ; 113,8 (C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 114,8 (C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 117,2 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 118,3 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 119,0 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 121,3 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 127,8 (C<sub>6</sub>) ; 129,5 (C<sub>14</sub>) ; 136,7 (C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>) ; 136,9 (C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>) ; 144,7 (C<sub>12</sub>) ; 149,5 (C<sub>16</sub>)

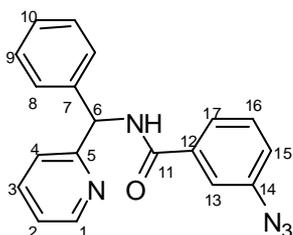
**CLHP/SM :** t = 4,7 min, m/z : 264 ([M+1]<sup>+</sup>)

**Spectrométrie de masse (ESI/TOF) :** 264 ([M+1]<sup>+</sup>, 100)

**IR (KBr, ν cm<sup>-1</sup>) :** ν = 3472, 3374, 3313 (N-H st) ; 3137, 3050, 2842 (=C-H st) ; 1620, 1455 (C=C st et N-H δ) ; 1299 (C-N st), 862, 763, 751 (=C-H δ)

\* L'attribution des déplacements chimiques a été effectuée à partir des spectres issus des expériences <sup>13</sup>C et Dept 135.

### 3-azido-N-(phényl(pyridin-2-yl)méthyl)benzamide 9



**Formule brute :** C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O

**PM :** 329,36 g.mol<sup>-1</sup>

A une solution de 3-amino-N-(phényl(pyridin-2-yl)méthyl)benzamide **5** (20 mg, 0,066 mmol) dans un mélange eau/acide acétique 1/2 (1,5 ml) refroidie à -5°C est additionnée une solution de NaNO<sub>2</sub> fraîchement préparée à 20 mg/ml (0,46 ml, 0,133 mmol). Le milieu réactionnel est agité à -5°C pendant une heure. Une solution de NaN<sub>3</sub> fraîchement préparée à 30 mg/ml (0,57 ml, 0,263 mmol) est ensuite ajoutée. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant deux heures supplémentaires. Le milieu réactionnel est amené à pH basique par ajout d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10%. Cette phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane (2 x 15 ml). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrées sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH :100/0,5) pour donner un solide jaune pâle (19 mg, 0,058 mmol)

**Rendement :** 87%

**RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, δ en ppm) :** δ = 6,23 (d, <sup>3</sup>J = 6,8 Hz, 1H, H<sub>6</sub>) ; 7,17 (m, 1H, H<sub>2</sub>) ; 7,27 (m, 5H, H<sub>8</sub>, H<sub>9</sub>, H<sub>10</sub>) ; 7,43 (m, 3H, H<sub>4</sub>, H<sub>15</sub> ou H<sub>17</sub>, H<sub>16</sub>) ; 7,55 (m, 1H, H<sub>13</sub>) ; 7,65 (m, 2H, H<sub>3</sub>, H<sub>15</sub> ou H<sub>17</sub>) ; 8,53 (s.e, 1H, NH) ; 8,59 (m, 1H, H<sub>1</sub>)

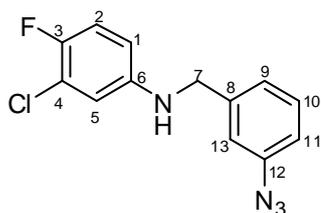
**RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, δ en ppm) :** δ = 58,2 (C<sub>6</sub>) ; 118,4 (C<sub>13</sub>) ; 122,1 (C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 123,0 (C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 123,1 (C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 123,6 (C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 127,7 (C<sub>8</sub> ou C<sub>9</sub>) ; 127,9 (C<sub>10</sub>) ; 129,0 (C<sub>8</sub> ou C<sub>9</sub>) ; 130,3 (C<sub>16</sub>) ; 136,8 (C<sub>3</sub> ou C<sub>12</sub>) ; 137,4 (C<sub>3</sub> ou C<sub>12</sub>) ; 142,1 (C<sub>7</sub> ou C<sub>14</sub>) ; 142,6 (C<sub>7</sub> ou C<sub>14</sub>) ; 149,2 (C<sub>1</sub>) ; 158,9 (C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>) ; 165,4 (C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>)

**CLHP/SM :** t = 8,5 min, m/z : 330 ([M+1]<sup>+</sup>)

**Spectrométrie de masse (ESI/TOF) :** 330 ([M+1]<sup>+</sup>, 100)

**IR (KBr, ν cm<sup>-1</sup>) :** ν = 3342 (N-H st) ; 3055, 2922 (=C-H st) ; 2112 (N<sub>3</sub> δ) ; 1637, 1528 (C=O st ou N-H δ) ; 1474, 1431 (C=C st) ; 1278 (C-N st) ; 756, 697 (=C-H δ)

## N-(3-azidobenzyl)-3-chloro-4-fluorobenzèneamine 10



**Formule brute :** C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>ClFN<sub>4</sub>

**PM :** 276,70 g.mol<sup>-1</sup>

A une solution d'azoture de sodium (650 mg, 10 mmol) dans un mélange eau/dichlorométhane 2/1 (3 ml), sous vigoureuse agitation et à 0°C, est ajoutée goutte à goutte une solution d'anhydride triflique (280 µl, 1,67 mmol) dans le dichlorométhane (1 ml). Le milieu réactionnel est vigoureusement agité à 0°C pendant deux heures. Une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10% (1 ml) est ajoutée et les phases aqueuse et organique sont séparées. La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane (2 x 1 ml). Les phases organiques sont regroupées et lavées par une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturée (1ml). Une solution de triflylazide (4 ml, 0,835 mmol si rendement de 100%) est obtenue.

A une solution de N-(3-aminobenzyl)-3-chloro-4-fluorobenzèneamine **6** (45 mg, 0,179 mmol) dans le dichlorométhane (0,5 ml) sont ajoutés successivement la triéthylamine (75 µl, 0,537 mmol), une solution de sulfate de cuivre à 9 mM (1 ml, 9 µmol) et la solution de triflylazide fraîchement préparée (1,2 ml, théoriquement 0,251 mmol). Le méthanol (2 ml) est ajouté goutte à goutte jusqu'à ce que le milieu réactionnel devienne monophasique. Le milieu réactionnel est agité vigoureusement pendant 3 heures, à température ambiante. Une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10% est ensuite ajoutée jusqu'à obtenir un pH basique (pH = 10). La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane (3 x 15 ml). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrées sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie (Heptane/AcOEt 9/1). Une huile légèrement violette est obtenue (30 mg, 0,110 mmol).

**Rendement :** 60 %

**RMN <sup>1</sup>H (DMSO, δ en ppm) :** δ = 4,31 (d, <sup>3</sup>J = 6,4 Hz, 2H, H<sub>7</sub>) ; 6,52 (s.e, 1H, NH) ; 6,57 (m, 1H, H<sub>1</sub>) ; 6,70 (dd, <sup>4</sup>J = 6,0 Hz, <sup>4</sup>J = 2,8 Hz, 1H, H<sub>5</sub>) ; 7,03 (dd, <sup>3</sup>J = 8,0 Hz, <sup>4</sup>J = 1,6 Hz, 1H, H<sub>9</sub> ou H<sub>11</sub>) ; 7,12 (m, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>13</sub>) ; 7,22 (d, <sup>3</sup>J = 7,6 Hz, 1H, H<sub>9</sub> ou H<sub>11</sub>) ; 7,41 (t, <sup>3</sup>J = 8,0 Hz, 1H, H<sub>10</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) :** δ = 49,2 (C<sub>7</sub>) ; 113,2 (d, <sup>3</sup>J = 6 Hz, C<sub>1</sub> ou C<sub>5</sub>) ; 115,0 (s.e, C<sub>1</sub> ou C<sub>5</sub>) ; 117,7 (d, <sup>2</sup>J = 22 Hz, C<sub>2</sub>) ; 118,7 (C<sub>9</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 118,9 (C<sub>9</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 122,1 (d, <sup>2</sup>J = 18 Hz, C<sub>4</sub>) ; 124,7 (C<sub>11</sub>) ; 131,0 (C<sub>10</sub>) ; 141,4 (C<sub>8</sub> ou C<sub>12</sub>) ; 141,5 (C<sub>8</sub> ou C<sub>12</sub>) ; 145,3 (s.e, C<sub>6</sub>) ; 152,1 (d, <sup>1</sup>J = 238 Hz, C<sub>3</sub>)

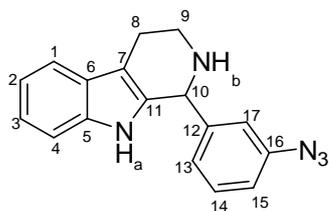
**CLHP/SM** :  $t = 9,3$  min ;  $m/z$  : 277 ( $[M+1]^+$ ) ; 279 ( $[M+3]^+$ )

**Spectrométrie de masse (ESI/TOF)** : 277 ( $[M+1]^+$ , 100) ; 279 ( $[M+3]^+$ , 42,5)

**IR (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ )** :  $\nu = 3432$  (N-H st) ; 3040, 2925, 2854 (=C-H st) ; 2115 ( $\text{N}_3$   $\delta$ ) ; 1607 (N-H  $\delta$ ) ; 1507 (C-F st) ; 1447, 1293 (C=C st) ; 1224 (C-N st) ; 836, 803, 780, (=C-H  $\delta$ )

**SMHR** : calculée pour  $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{N}_4\text{FCl}$  ( $[M-H]^-$ ) : 275,0500  
mesurée : 275,0505

## 1-(3-azidophényl)-2,3,4,9-tétrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole 12



**Formule brute :** C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>

**PM :** 289,13 g.mol<sup>-1</sup>

### Méthode 1 :

A une solution de 3-(2,3,4,9-tétrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)benzèneamine **8** (200 mg, 0,76 mmol) dans un mélange eau/acide acétique 1/2 (15 ml) refroidie à -5°C est additionnée une solution de NaNO<sub>2</sub> fraîchement préparée à 30 mg/ml (2,5 ml, 1,14 mmol). Le milieu réactionnel est agité à -5°C pendant 45 min. Une solution de NaN<sub>3</sub> fraîchement préparée à 60 mg/ml (2,5 ml, 2,28 mmol) est ensuite ajoutée. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante 2h30 supplémentaires. Le milieu réactionnel est amené à pH basique par ajout d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10%. Cette phase aqueuse est extraite par le dichlorométhane (2 x 15 ml). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrées sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH : 100/1) pour donner un solide jaune pâle (70 mg, 0,24 mmol) présentant une pureté <sup>1</sup>H RMN de 93 %. Une seconde purification par chromatographie sur silice permet d'isoler une fraction de produit (6 mg, 0,021 mmol) présentant une pureté supérieure à 99 %.

### Méthode 2 :

A une solution 1-(3-azidophényl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-2(9H)-carboxylate de *tert*-butyle **15** (67 mg, 0,17 mmol) dans le dichlorométhane (2 ml) refroidie par un bain de glace est ajouté goutte à goutte l'acide trifluoroacétique (0,4 ml, 5,3 mmol). Le milieu réactionnel est laissé à température ambiante et sous agitation pendant deux heures. Du dichlorométhane est ajouté (25 ml). La phase organique est lavée par une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10% (2 x 10 ml), séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH : 100/1) pour donner un solide jaune pâle (35 mg, 0,12 mmol) avec un rendement de 71 %.

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) :** δ = 2,82 (m, 1H, H<sub>8</sub>) ; 2,94 (m, 1H, H<sub>8'</sub>) ; 3,15 (m, 1H, H<sub>9</sub>) ; 3,37 (m, 1H, H<sub>9'</sub>) ; 5,16 (s, 1H, H<sub>10</sub>) ; 7,01 (m, 2H, H<sub>13</sub> ou H<sub>15</sub>, H<sub>17</sub>) ; 7,13 (m, 3H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>13</sub> ou H<sub>15</sub>) ; 7,22 (m, 1H, H<sub>4</sub>) ; 7,36 (m, 1H, H<sub>14</sub>) ; 7,55 (m, 2H, H<sub>1</sub>, NH<sub>a</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) :** δ = 22,8 (C<sub>8</sub>) ; 43,4 (C<sub>9</sub>) ; 58,1 (C<sub>10</sub>) ; 110,7 (C<sub>4</sub> ou C<sub>7</sub>) ; 111,2 (C<sub>4</sub> ou C<sub>7</sub>) ; 118,66 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 119,1 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 119,5 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 119,9 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 122,3 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 125,3 (C<sub>14</sub>) ; 127,7 (C<sub>6</sub>) ; 130,5 (C<sub>13</sub>) ; 134,0 (C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>) ; 136,2 (C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>) ; 141,0 (C<sub>12</sub>) ; 144,3 (C<sub>16</sub>)

**CLHP/SM :** t = 5,6 min, m/z: 290 ([M+1]<sup>+</sup>)

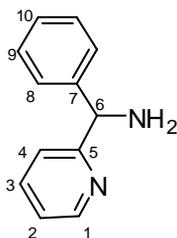
**Spectrométrie de masse (ESI/TOF) :** 290 ([M+1]<sup>+</sup>, 100).

**IR (KBr, ν cm<sup>-1</sup>) :** ν = 3394 (N-H st) ; 3052, 2920, 2846 (=C-H st) ; 2119(N<sub>3</sub> δ) ; 1600 ; 1451 (C=C st) ; 1286 (C-N st) ; 743 (=C-H δ)

**Spectre UV :** ε(280 nm) = 1,07.10<sup>4</sup> cm<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup> ; ε(250 nm) = 1,53.10<sup>4</sup> cm<sup>-1</sup>.mol<sup>-1</sup>

**SMHR :** calculée pour C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) : 290,1406  
mesurée : 290,1392

## Phényl(pyridin-2-yl)méthanamine 13



**Formule brute :** C<sub>12</sub> H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>

**PM :** 184,24 g.mol<sup>-1</sup>

A une solution d'oxime de phényl(pyridin-2-yl)méthanone (0,50 g, 2,52 mmol) dans l'acide trifluoroacétique (6 ml) refroidie à 0°C est rajoutée, par petites portions, la poudre de zinc (0,70 g, 10,70 mmol). La poudre de zinc est préalablement activée par une solution de HCl à 2% (2 x 1 ml), lavée successivement par de l'eau distillée (2 x 1 ml), de l'éthanol (2 x 1 ml) et de l'éther diéthylique (2 x 1 ml) puis séchée sous vide. Le milieu réactionnel est ramené à température ambiante, agité pendant 1h30min puis filtré. Après avoir été refroidi à 0°C, le filtrat est amené à pH basique (pH = 10) par ajout d'une solution aqueuse de NaOH 2N (40 ml). La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane (2 x 30 ml). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO<sub>4</sub> et concentrées sous vide. Une huile jaune est obtenue (0,39 g, 2,12 mmol).

**Rendement :** 84%

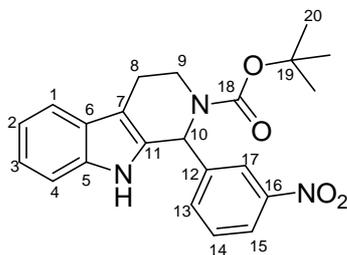
**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) :** δ = 2,26 (s.e, 2H, NH) ; 5,19 (s, 1H, H<sub>6</sub>) ; 7,05 (ddd, <sup>3</sup>J = 7,6 Hz, <sup>3</sup>J = 4,8 Hz, <sup>4</sup>J = 1,2 Hz, 1H, H<sub>2</sub>) ; 7,19 (m, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>10</sub>) ; 7,26 (m, 2H, H<sub>9</sub>) ; 7,35 (m, 2H, H<sub>8</sub>) ; 7,51 (td, <sup>3</sup>J = 7,6 Hz, <sup>4</sup>J = 2,0 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ; 8,50 (d, <sup>3</sup>J = 4,8 Hz, 1H, H<sub>1</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) :** δ = 61,2 (C<sub>6</sub>) ; 121,8 (C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub>) ; 122,1 (C<sub>2</sub> ou C<sub>4</sub>) ; 127,1 (C<sub>8</sub> ou C<sub>9</sub>) ; 127,4 (C<sub>10</sub>) ; 128,8 (C<sub>8</sub> ou C<sub>9</sub>) ; 136,7 (C<sub>3</sub>) ; 144,9 (C<sub>7</sub>) ; 149,2 (C<sub>1</sub>) ; 163,5 (C<sub>5</sub>)

**Spectrométrie de masse (ESI/TOF) :** 185 ([M+1]<sup>+</sup>, 100)

**IR (KCl, ν cm<sup>-1</sup>) :** ν = 3368, 3292 (N-H st) ; 3060, 3027 (=C-H st) ; 1588 (N-H δ) ; 1570 (C=N st) ; 1493, 1471, 1452 (C=C st) ; 1433 (C-N st) ; 748, 700 (=C-H δ)

## 1-(3-nitrophényl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-2(9H)-carboxylate de tert-butyle 14



**Formule brute :** C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

**PM :** 393,44 g.mol<sup>-1</sup>

**Point de fusion :** 221°C

A une solution de 1-(3-nitrophényl)-2,3,4,9-tétrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole **4** (0,45 g, 1,55 mmol) dans l'isopropanol (17 ml) sont ajoutés une solution aqueuse de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 1M (3 ml) et le dicarbonate de di-*tert*-butyle (0,41 g, 1,86 mmol). Le milieu réactionnel est agité à 40°C, pendant trois heures. Le résidu obtenu après concentration du milieu réactionnel est repris dans le dichlorométhane (200 ml). Cette phase organique est lavée par une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl (3 x 50 ml), séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié par filtration sur silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) pour donner un solide jaune (0,49 g, 1,25 mmol).

**Rendement :** 81 %

**RMN <sup>1</sup>H (DMSO, δ en ppm)\* :** δ = 1,56 (s, 9H, H<sub>20</sub>) ; 2,78 (m, 2H, H<sub>8</sub>) ; 3,30 (m, 1H, H<sub>9</sub>) ; 4,22 (s.e, 1H, H<sub>9</sub>) ; 6,41 (s, 1H, H<sub>10</sub>) ; 7,02 (m, 1H, H<sub>2</sub> ou H<sub>3</sub>) ; 7,09 (m, 1H, H<sub>2</sub> ou H<sub>3</sub>) ; 7,31 (d, <sup>3</sup>J = 8,0 Hz, 1H, H<sub>4</sub>) ; 7,54 (d, <sup>3</sup>J = 8,0 Hz, 1H, H<sub>1</sub>) ; 7,73 (m, 2H, H<sub>14</sub>, H<sub>13</sub>) ; 8,11 (s, 1H, H<sub>17</sub>) ; 8,17 (m, 1H, H<sub>15</sub>) ; 10,75 (s, 1H, NH)

**RMN <sup>13</sup>C (DMSO, δ en ppm)\* :** δ = 21,2 (C<sub>8</sub>) ; 28,5 (C<sub>20</sub>) ; 38,5 (C<sub>9</sub>) ; 53,8 (C<sub>10</sub>) ; 80,4 (C<sub>19</sub>) ; 109,4 (C<sub>7</sub>) ; 111,7 (C<sub>4</sub>) ; 118,4 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 119,2 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 121,9 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 122,6 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 123,0 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 126,6 (C<sub>6</sub>) ; 130,5 (C<sub>14</sub>) ; 131,3 (C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>) ; 134,4 (C<sub>13</sub>) ; 136,9 (C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>) ; 143,5 (C<sub>12</sub>) ; 148,4 (C<sub>16</sub>) ; 154,4 (C<sub>18</sub>)

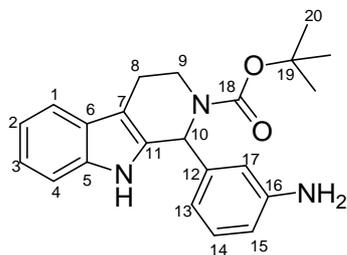
**CLHP/SM :** t = 9,7 min, 392 ([M-1]<sup>-</sup>, 100)

**Spectrométrie de masse (ESI/TOF) :** 392 ([M-1]<sup>-</sup>, 100)

**IR (KBr, ν cm<sup>-1</sup>) :** ν = 3315 (N-H st) ; 2977, 2917 (=C-H st) ; 1665 (C=O st) ; 1531, 1351 (NO<sub>2</sub> st), 1422 (C=C st ou N-H δ) ; 1351, 1167 (C-N st et C-O st) ; 739 (=C-H st)

\* En raison de rotamères conformationnels entraînant un défaut de relaxation, aussi bien en <sup>1</sup>H RMN qu'en <sup>13</sup>C RMN, les expériences ont été conduites à 60°C dans le DMSO. L'attribution des déplacements chimiques pour le spectre <sup>13</sup>C a été réalisée en tenant compte du spectre obtenu par l'expérience Dept 135.

## 1-(3-aminophényl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-2(9H)-carboxylate de tert-butyle 15



**Formule brute :** C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**PM :** 363,45 g.mol<sup>-1</sup>

**Point de fusion :** 231 °C

A une solution de 1-(3-nitrophényl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-2(9H)-carboxylate de *tert*-butyle **14** (340 mg, 0,86 mmol) dans le méthanol (100 ml) est ajoutée une quantité catalytique de palladium sur charbon activé à 10% (92 mg, 0,086 mmol). Après trois cycles de dégazage, le milieu réactionnel est placé sous atmosphère d'hydrogène, à pression atmosphérique, sous vive agitation et à température ambiante. Au bout d'une heure, le milieu réactionnel est filtré sur célite. La célite est lavée par plusieurs l'éthanol (2 x 10 ml). Le filtrat obtenu est concentré sous vide pour donner un solide blanc (280 mg, 0,77 mmol).

**Rendement :** 90 %

**RMN <sup>1</sup>H (DMSO, δ en ppm) :** δ = 1,50 (s, 9H, H<sub>20</sub>) ; 2,84 (m, 2H, H<sub>8</sub>) ; 3,04 (m, 1H, H<sub>9</sub>) ; 4,22 (s.e, 1H, H<sub>9</sub>) ; 5,10 (s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 6,22 (s.e, 1H, H<sub>10</sub>) ; 6,49 (m, 3H, H<sub>13</sub>, H<sub>15</sub>, H<sub>17</sub>) ; 7,06 (m, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>14</sub>) ; 7,31 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H<sub>4</sub>) ; 7,48 (d, J = 7,6 Hz, 1H, H<sub>1</sub>) ; 10,93 (s.e, 1H, NH)

**RMN <sup>13</sup>C (DMSO, δ en ppm)\* :** δ = 20,0 (C<sub>8</sub>) ; 28,5 (C<sub>20</sub>) ; 37,0 (s.e, C<sub>9</sub>) ; 55,5 (s.e, C<sub>10</sub>) ; 79,0 (s.e, C<sub>19</sub>) ; 108,5 (C<sub>7</sub>) ; 111,5 (C<sub>4</sub>) ; 113,6 (C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 113,7 (C<sub>15</sub> ou C<sub>17</sub>) ; 115,9 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 118,2 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 118,8 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 121,4 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub> ou C<sub>13</sub>) ; 126,6 (C<sub>6</sub>) ; 129,2 (C<sub>14</sub>) ; 132,9 (s.e, C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>) ; 136,6 (s.e, C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>) ; 141,7 (C<sub>12</sub>) ; 149,1 (C<sub>16</sub>). C<sub>18</sub> non détecté.

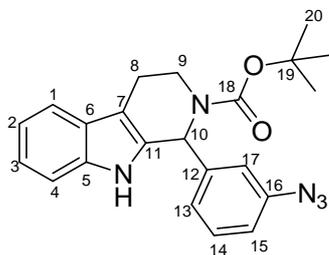
**CLHP/SM :** t = 8,0 min, m/z : 364 ([M+1]<sup>+</sup>, 100)

**Spectrométrie de masse (ESI/TOF) :** 364 ([M+1]<sup>+</sup>, 100)

**IR (KBr, ν cm<sup>-1</sup>) :** ν = 3453, 3314 (N-H st) ; 2974, 2919 (=C-H st) ; 1659 (C=O st) ; 1615, 1467, 1422 (C=C st et N-H δ) ; 1163 (C-N st ou C-O st) ; 744 (=C-H st)

\* L'attribution des déplacements chimiques a été effectuée à partir des spectres issus des expériences <sup>13</sup>C et Dept 135. L'expérience en température n'a pas pu être effectuée pour des raisons techniques.

## 1-(3-azidophényl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-2(9H)-carboxylate de tert-butyle 16



**Formule brute :** C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>

**PM :** 389,45 g.mol<sup>-1</sup>

### Méthode 1

A une solution de 1-(3-aminophényl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-2(9H)-carboxylate de *tert*-butyle **15** (40 mg, 0,11 mmol) dans un mélange eau/acide acétique 1/1 (2 ml) refroidie à -5°C est additionnée une solution de NaNO<sub>2</sub> fraîchement préparée à 60 mg/ml (190 µl, 0,17 mmol). Au bout d'une heure, une solution de NaN<sub>3</sub> fraîchement préparée à 60 mg/ml (360 µl, 0,33 mmol) est ensuite ajoutée. Le milieu réactionnel est agité à -5°C pendant 30 min puis à température ambiante pendant deux heures et demi. Le milieu réactionnel est ensuite amené à pH basique par ajout d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10%. Cette phase aqueuse est extraite par le dichlorométhane. Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrées sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (dichlorométhane) pour donner un solide jaune clair (15,4 mg, 0,04 mmol).

### Méthode 2

A une solution d'azoture de sodium (650 mg, 10 mmol) dans un mélange eau/dichlorométhane 2/1 (3 ml), sous vigoureuse agitation et à 0°C, est ajoutée goutte à goutte une solution d'anhydride triflique (280 µl, 1,67 mmol) dans le dichlorométhane (1 ml). Le milieu réactionnel est vigoureusement agité à 0°C pendant deux heures. Une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10% (1 ml) est ajoutée et les phases aqueuse et organique sont séparées. La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane (2 x 1 ml). Les phases organiques sont regroupées et lavées par une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturée (1ml). Une solution de triflylazide (4 ml, 0,84 mmol si rendement de 100%) est obtenue.

A une solution de 1-(3-aminophényl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-2(9H)-carboxylate de *tert*-butyle **14** (40 mg, 0,11 mmol) dans le dichlorométhane (1 ml) sont ajoutés successivement la triéthylamine (46 µl, 0,33 mmol), une solution de sulfate de cuivre à 9 mM (1 ml, 9 µmol) et la solution de triflylazide fraîchement préparée (0,8 ml, théoriquement 0,17

mmol). Le méthanol (2 ml) est ajouté goutte à goutte jusqu'à ce que le milieu réactionnel devienne monophasique. Le milieu réactionnel est agité vigoureusement pendant 3 heures, à température ambiante. Une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10% est ensuite ajoutée jusqu'à obtenir un pH basique (pH = 10). La phase aqueuse est extraite par du dichlorométhane (3 x 15 ml). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrées sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie (Dichlorométhane). Un solide blanc est obtenu (20,5 mg, 0,05 mmol).

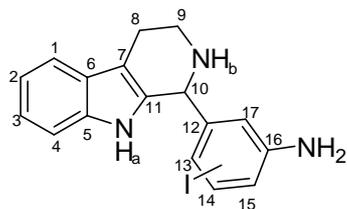
**Rendement** : 48 %

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm)** : δ = 1,54 (s, 9H, H<sub>20</sub>) ; 2,88 (m, 2H, H<sub>8</sub>) ; 3,10 (m, 1H, H<sub>9</sub>) ; 4,34 (s.e, 1H, H<sub>9</sub>) ; 6,37 (s.e, 1H, H<sub>10</sub>) ; 6,97 (m, 1H, H<sub>13</sub> ou H<sub>15</sub>) ; 7,00 (s.e, 2H, H<sub>13</sub> ou H<sub>15</sub>, H<sub>17</sub>) ; 7,18 (m, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>) ; 7,29 (m, 2H, H<sub>4</sub>, H<sub>14</sub>) ; 7,55 (d, *J* = 7,6 Hz, 1H, H<sub>1</sub>) ; 7,75 (s.e, 1H, NH)

**CLHP/SM** : t = 10,25 min, m/z : 388 ([M-1])

**IR (KBr, ν cm<sup>-1</sup>)** : ν = 3312 (N-H st) ; 2977, 2930 (=C-H st) ; 2115 (N<sub>3</sub> δ) ; 1678 (C=O st) ; 1414 (C=C st ou N-H δ) ; 1303, 1161 (C-N st et C-O st) ; 742 (=C-H st)

## 2-iodo-5-(2,3,4,9-tétrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl)benzèneamine 17



**Formule brute :** C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>

**PM :** 389,23 g.mol<sup>-1</sup>

**Point de fusion :** 118°C

A une solution de 1-(3-nitrophényl)-2,3,4,9-tétrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indole **8** (360 mg, 1,37 mmol) dans l'acide acétique (10 ml) est ajouté le N-iodosuccinimide (308 mg, 1,37 mmol). Le milieu réactionnel est agité à température ambiante, pendant une nuit. Une solution de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> à 10% est ajoutée jusqu'à décoloration du milieu. Cette phase aqueuse est amenée à pH basique (pH = 10) par ajout d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10% puis extraite par l'éther diéthylique (2 x 150 ml). Les phases organiques sont regroupées, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et concentrées sous vide. Le résidu jaune obtenu est purifié par chromatographie sur silice (Et<sub>2</sub>O/hexane : 4/6). Une poudre blanche est obtenue (400 mg, 1,03 mmol).

**Rendement :** 75 %

**RMN <sup>1</sup>H (DMSO, δ en ppm) :** δ = 2,72 (m, 2H, H<sub>8</sub>) ; 2,95 (m, 1H, H<sub>9</sub>) ; 3,05 (m, 1H, H<sub>9'</sub>) ; 3,35 (s, 1H, NH<sub>b</sub>) ; 5,18 (s, 1H, H<sub>10</sub>) ; 5,22 (s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 6,24 (d, <sup>4</sup>J = 2,8 Hz, 1H, H<sub>17</sub>) ; 6,34 (dd, <sup>3</sup>J = 8,4 Hz, <sup>4</sup>J = 2,8 Hz, 1H, H<sub>15</sub> ou H<sub>13</sub><sup>\*</sup>) ; 7,02 (m, 2H, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>) ; 7,27 (m, <sup>3</sup>J = 8,0 Hz, 1H, H<sub>4</sub>) ; 7,45 (d, <sup>3</sup>J = 7,6 Hz, 1H, H<sub>1</sub>) ; 7,49 (d, <sup>3</sup>J = 8,4 Hz, 1H, H<sub>14</sub>) ; 10,55 (s, 1H, NH<sub>a</sub>)

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, δ en ppm) :** δ = 22,7 (C<sub>8</sub>) ; 40,7 (C<sub>9</sub>) ; 60,4 (C<sub>10</sub>) ; 83 (C<sub>13</sub> ou C<sub>15</sub><sup>\*</sup>) ; 109,3 (C<sub>7</sub>) ; 111,5 (C<sub>4</sub>) ; 116,0 (C<sub>15</sub> ou C<sub>13</sub><sup>\*</sup> et C<sub>17</sub>) ; 117,9 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub>) ; 118,5 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub>) ; 120,9 (C<sub>1</sub> ou C<sub>2</sub> ou C<sub>3</sub>) ; 127,2 (C<sub>6</sub>) ; 135,0 (C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>) ; 136,4 (C<sub>5</sub> ou C<sub>11</sub>) ; 139,4 (C<sub>14</sub>) ; 144,6 (C<sub>12</sub>) ; 149,6 (C<sub>16</sub>).

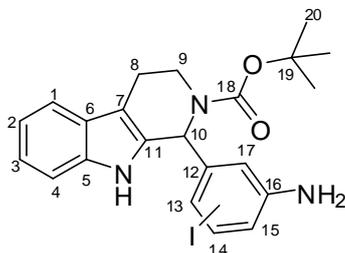
**CLHP/SM :** t = 5,2 min, m/z : 390 ([M+1]<sup>+</sup>, 100)

**Spectrométrie de masse (ESI/TOF) :** 390 ([M+1]<sup>+</sup>, 100)

**IR (KBr, ν cm<sup>-1</sup>) :** ν = 3381, 3205, 3052 (N-H st) ; 2970, 2920, 2842 (=C-H st) ; 1619, 1591 1466 (C=C st et N-H δ) ; 1300 (C-N st) ; 812, 749 (=C-H st)

\* Selon que I soit positionné sur le C<sub>13</sub> ou le C<sub>15</sub> respectivement. L'attribution des déplacements chimiques a été effectuée à partir des spectres issus des expériences <sup>13</sup>C et Dept 135.

**1-(3-amino-4-iodophényl)-3,4-dihydro-1H-pyrido[3,4-b]indole-2(9H)-carboxylate de tert-butyle 18**



**Formule brute :** C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

**PM :** 489,35 g.mol<sup>-1</sup>

**Point de fusion :** 213°C

A une solution de 2-iodo-5-(2,3,4,9-tétrahydro-1H-pyrido[3,4-b]indol-1-yl) benzénamine **17** (0,47 g, 1,21 mmol) dans l'isopropanol (13 ml) sont ajoutés une solution aqueuse de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 0,6M (4 ml, 2,4 mmol) et le dicarbonate de di-*tert*-butyle (0,26 g, 1,21 mmol). Le milieu réactionnel est laissé à 45°C, sous agitation, pendant une heure. Il est ensuite concentré sous vide. Le résidu obtenu est repris dans le dichlorométhane (200 ml). Cette phase organique est lavée par une solution saturée de NH<sub>4</sub>Cl (2 x 50 ml), séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puis concentrée sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur silice (pentane/éther 60/40) pour donner un solide blanc (0,44 g, 0,90 mmol).

**Rendement :** 74 %

**RMN <sup>1</sup>H (DMSO, δ en ppm) :** δ = 1,45 (s, 9H, H<sub>20</sub>) ; 2,81 (m, 2H, H<sub>8</sub>) ; 3,16 (s.e, 1H, H<sub>9</sub>) ; 4,07 (s.e, 1H, H<sub>9</sub>) ; 5,27 (s, 2H, NH<sub>2</sub>) ; 6,20 (d.e, 2H, H<sub>10</sub>, H<sub>13</sub>) ; 6,35 (dd, *J* = 7,2 Hz, *J* = 2,8 Hz, 1H, H<sub>13</sub> ou H<sub>15\*</sub>) ; 7,03 (m, 1H, H<sub>2</sub> ou H<sub>3</sub>) ; 7,11 (m, 1H, H<sub>2</sub> ou H<sub>3</sub>) ; 7,34 (d, *J* = 8,0 Hz, H<sub>4</sub>) ; 7,50 (d, *J* = 7,6 Hz, H<sub>1</sub> ou H<sub>14</sub>) ; 7,59 (d, *J* = 8,0 Hz, H<sub>1</sub> ou H<sub>14</sub>) ; 10,82 (s.e, 1H, NH)

**CLHP/SM :** t = 9,40 min, m/z : 488 ([M-1]<sup>-</sup>, 100)

**Spectrométrie de masse (ESI/TOF) :** 490 ([M+1]<sup>+</sup>, 100)

**IR (KBr, ν cm<sup>-1</sup>) :** ν = 3453, 3357, (N-H st) ; 2974, 2919 (=C-H st) ; 1675 (C=O st) ; 1625, 1596, 1468 (C=C st et N-H δ) ; 1300, 1397, 1159 (C-N st et C-O st) ; 743 (=C-H st)

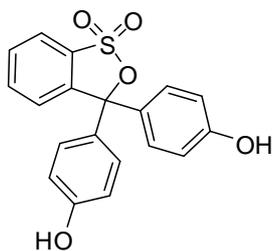
\* Selon que I soit positionné sur le C<sub>13</sub> ou le C<sub>15</sub> respectivement.



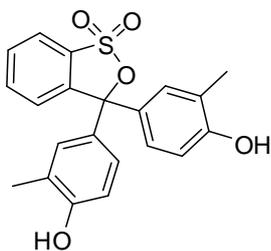
# **Annexes**



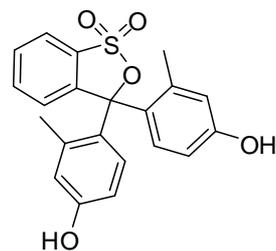
## 1. Molécules testées pour l'identification de la sonde



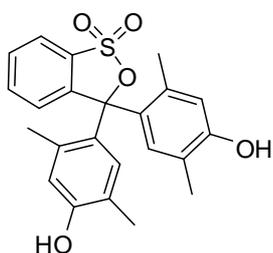
Rouge de phénol



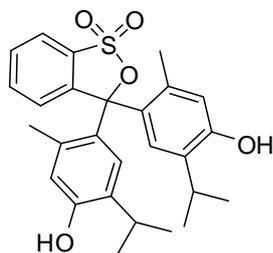
Rouge de crésol



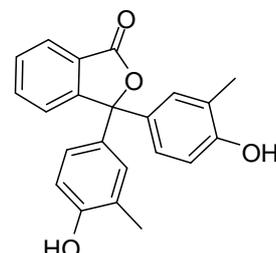
Violet de m-crésol



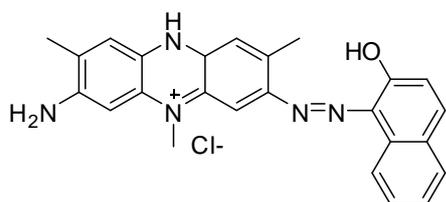
Bleu de xylenol



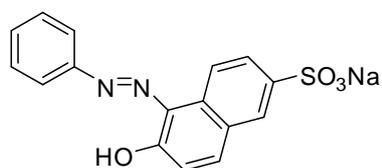
Bleu de thymol



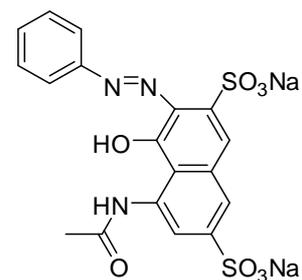
phtaléine de o-crésol



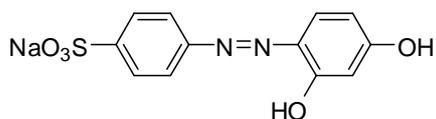
Bleu d'indoïne



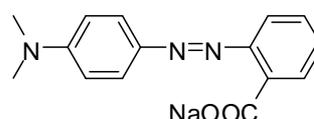
Crocein Orange G



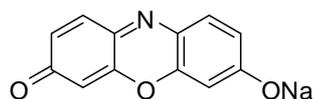
Acid red 4



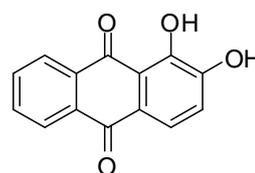
Tropaeolin O



Rouge de méthyl



Résorufine

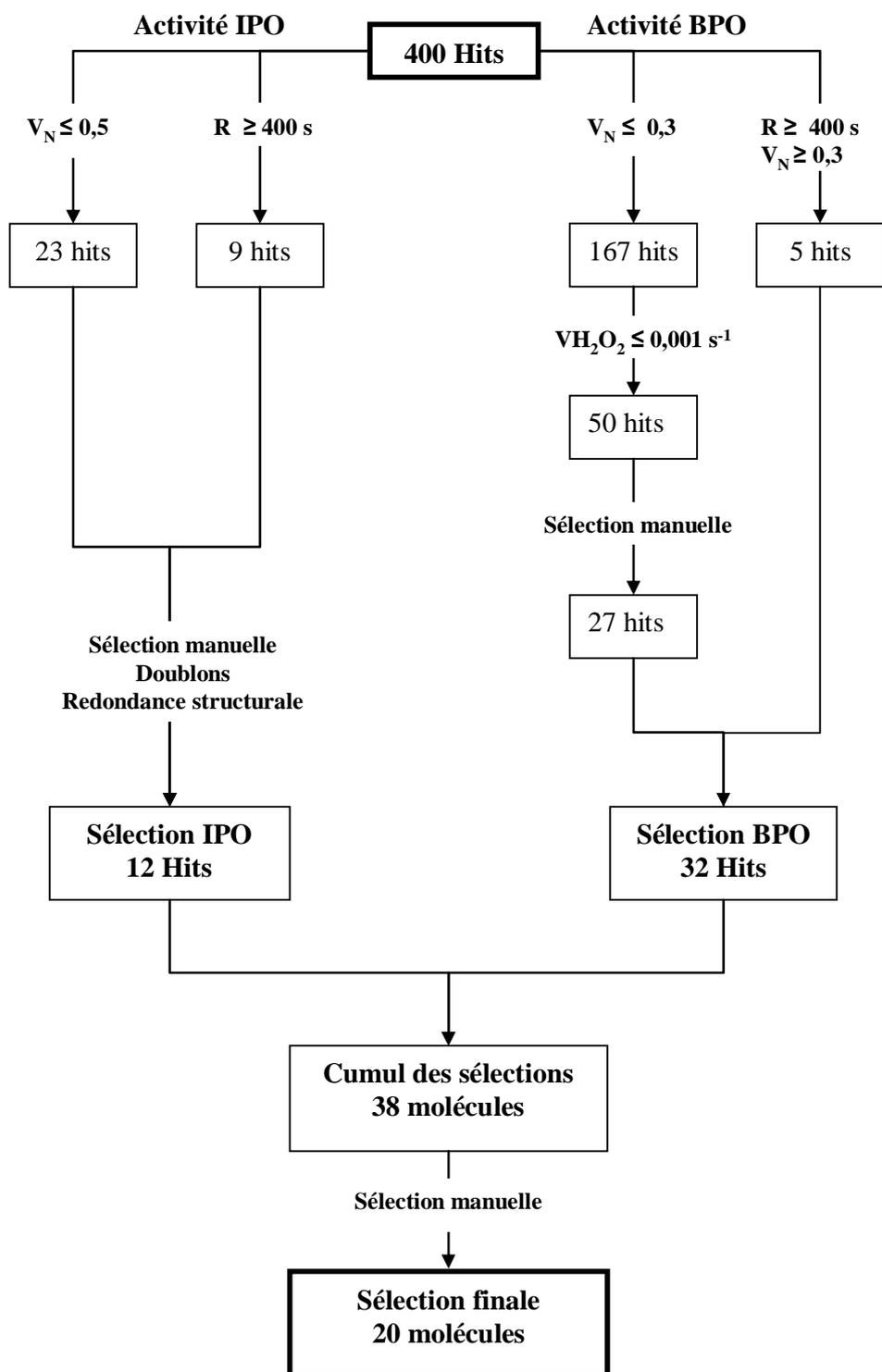


Alizarine

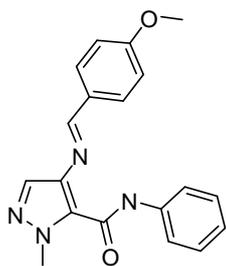
## 2. Tableau récapitulatif concernant le test de criblage à haut-débit

Catégorie	Paramètres	Données
<b>Méthode</b>	Nature du test	Test enzymatique par suivi spectrophotométrique
	Stratégie	Suivi par mesure de la DO(620 nm) de la formation des dérivés halogénés du bleu de thymol par les activités iodo- et bromo-péroxydases de la vBPO. Double test de criblages
	Objectif	Identification d'inhibiteurs spécifiques de chaque activité de la vBPO à partir de molécules perturbant l'halogénéation du bleu de thymol
	Provenance des Réactifs	vBPO purifié d' <i>A. nodosum</i> Autres réactifs : Sigma-Aldrich
<b>Chimiothèque</b>	Nature et provenance	Drug-like, DIVERSet (Chembridge, San Diego)
	Taille et conditionnement	16480 composés sur plaque 96 puits à 10 mM dans le DMSO
	Contrôle qualité	Pureté <sup>1</sup> H RMN > 90 %
	Concentration testée	50 μM, 4 % de DMSO
<b>Processus du HTS</b>	Format	Plaque 96 puits (Costar#9017, Corning)
	Contrôles	Sans vBPO : Contrôle positif Avec vBPO, sans molécule : Contrôle négatif 8 témoins positifs et négatifs par plaque disposés sur les colonnes 1 et 12
	Nombre de plaques	206 microplaques sur 5 jours, pour chaque activité
	Plateforme	Genesis Workstation 200 (Tecan)
	Mesure, Lecteur, analyse de données	Suivi cinétique de la DO(620 nm) : mesure toutes les 20 s sur 20 min SpectraMax Plus384 (Molecular Device) Analyse des données par un programme « Maison » codé en Matlab.
	Paramètres d'études	Vitesse maximale (V), Vitesse normalisée (V <sub>N</sub> ) Retard (R) et Absorbance finale (A <sub>fin</sub> )
	Validation	Paramètres Z et Z' calculés avec le paramètre V
	Normalisation	Intra-plaque à partir des données des témoins négatifs
<b>Analyses post-HTS</b>	Sélection des hits	Molécule diminuant la vitesse d'halogénéation (V <sub>N</sub> ) du bleu de thymol par la vBPO Seuil sur V <sub>N</sub> déterminé par statistique
	Validation des structures	Analyse CLHP/SM. Demande de confirmation au fournisseur
	Test secondaire	Test de confirmation : même conditions que le test de criblage
	Mode d'action des hits Identification des inhibiteurs	Effet-dose réponse Effet des hits sur la iodation chimique du bleu de thymol Suivi CLHP-SM de la réaction des hits avec les systèmes vBPO/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /I <sup>-</sup> , H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /I <sup>-</sup> et I <sub>3</sub> <sup>-</sup>

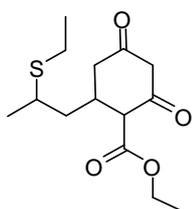
### 3. Protocole de sélection des 20 hits les plus actifs



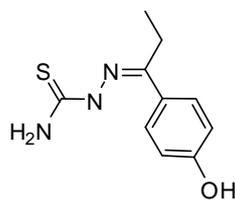
#### 4. Liste des 20 hits sélectionnés



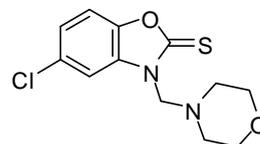
EV01



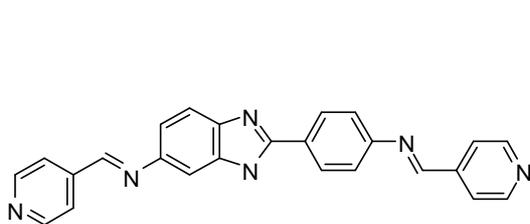
EV02



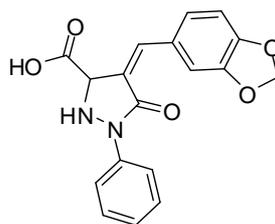
EV03



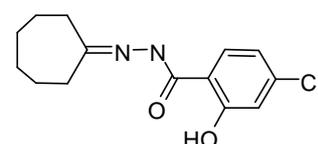
EV04



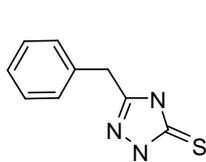
EV05



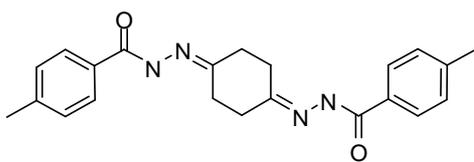
EV06



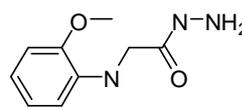
EV07



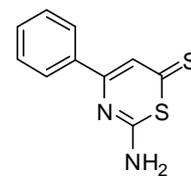
EV08



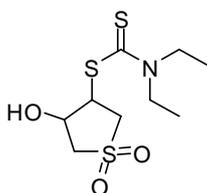
EV09



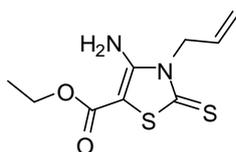
EV10



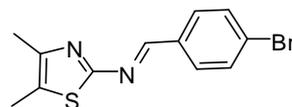
EV11



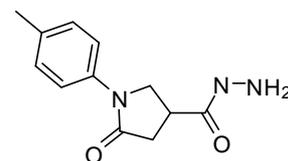
EV12



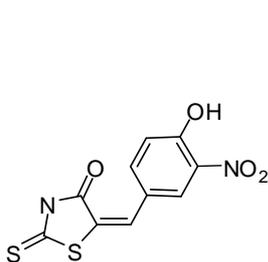
EV13



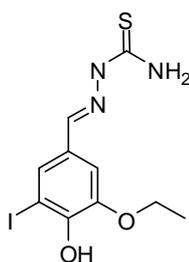
EV14



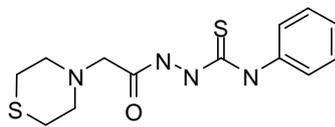
EV15



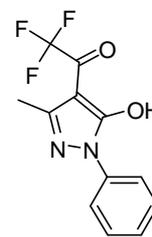
EV16



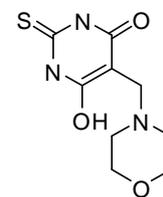
EV17



EV18



EV19



EV20

