



Substances naturelles se fixant sur la tubuline : mise en oeuvre d'un criblage par spectrométrie de masse

Paul Hannewald

► To cite this version:

Paul Hannewald. Substances naturelles se fixant sur la tubuline : mise en oeuvre d'un criblage par spectrométrie de masse. Sciences pharmaceutiques. 2009. hal-01731898

HAL Id: hal-01731898

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01731898>

Submitted on 14 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

2009

FACULTE DE PHARMACIE

Substances naturelles se fixant sur la tubuline –
mise en œuvre d'un criblage par spectrométrie de masse

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement

Le 28 avril 2009

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **Paul HANNEWALD**
né le 10 juin 1980 à Saint-Avold (57)

Membres du Jury

Président : Mme Dominique LAURAIN-MATTAR, Professeur, Faculté de Pharmacie de Nancy

Juges : M. Jean-François MULLER, Professeur Emerite, Université Paul Verlaine de Metz
M. Max HENRY, Professeur, Faculté de Pharmacie de Nancy

Chapitre 1 : Bibliographie

Chapitre 2 :

Matériel et Méthodes

Chapitre 3 :

Résultats expérimentaux

N° d'identification :

TITRE

**Substances naturelles se fixant sur la tubuline –
mise en œuvre d'un criblage par spectrométrie de masse**

Thèse soutenue le 28/04/2009

Par Paul Hannewald

RESUME :

La découverte de nouveaux médicaments par le criblage biomoléculaire est au centre de la recherche pharmaceutique actuelle. La spectrométrie de masse, en tant que technique d'analyse fiable, reproductible, sensible, spécifique, compatible avec de nombreux types d'échantillons et permettant un débit d'analyse conséquent, trouve ainsi sa place dans les stratégies de recherche et développement de nouveaux médicaments. Le but de ce travail était de caractériser finement des extraits de plantes à activité anti-tubuline et de mettre en place et de valider une stratégie de criblage originale, impliquant la spectrométrie de masse comme technique de détection. Son potentiel devait être mis en évidence en l'appliquant à différents échantillons complexes tels que des extraits de plantes. Le protocole que nous avons développé s'articule en trois étapes successives qui sont l'incubation des molécules à tester avec la cible moléculaire choisie (la tubuline), l'élimination des composés non liés et enfin l'analyse par MALDI-TOFMS des composés liés. Notre protocole a fait l'objet d'une démarche de validation et les résultats pouvant être obtenus ont été discutés. L'application de notre approche à des extraits bruts de plantes (Colchique d'Automne et Pervenche de Madagascar) a permis de mettre en évidence 19 molécules actives se liant à la tubuline.

MOTS CLES : criblage moléculaire ; spectrométrie de masse ; MALDI ; TOFMS ; FTICRMS ; extraits de plantes ; Colchique d'Automne ; Pervenche de Madagascar

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Pr. Dominique Laurain-Mattar	Pharmacognosie	Expérimentale ☒
		Bibliographique ☐
		Thème ☐

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle

Au Professeur Dominique Laurain-Mattar, Directeur de Thèse et Président du Jury,

Je vous remercie d'avoir accepté la charge de ce travail ainsi que les délais parfois peu règlementaires que je me suis imposé. Je vous remercie pour votre patience et votre disponibilité. Vous m'avez par ailleurs fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse et j'espère que ce travail sera digne de la confiance que vous m'avez témoignée. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

Au Professeur Jean-François Muller,

Vous m'avez fait le grand honneur et le plaisir d'accepter de juger ce travail de thèse d'exercice. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre ingéniosité et votre vibrante passion si communicative de la spectrométrie de masse. Nous voici au bout de ce chemin et c'est toujours avec le même plaisir que j'ai traversé à vos côtés cette aventure tant scientifique qu'humaine. Je vous remercie de tout ce que vous m'avez transmis et je vous prie de croire en mon estime et ma profonde reconnaissance.

Au professeur Max Henry,

Je suis honoré de vous compter parmi mes juges. Nous avons à plusieurs reprises eu l'occasion de collaborer et je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Votre intervention pour cette thèse est presque naturelle puisque c'est vous même qui m'avez initié à la recherche en laboratoire. Veuillez trouver dans l'aboutissement de ce travail la preuve de ma reconnaissance.

A ma famille et mes amis,

Merci à vous de m'avoir soutenu tout au long des épreuves que j'ai traversé. La vie d'un chercheur, et plus particulièrement quand il passe deux thèses, n'est définitivement pas un long fleuve tranquille ! Après tout... c'est aussi pour cela qu'elle est si palpitante ! Merci à vous !

A mon Epouse Alexia,

Ce sont sur les bancs de la faculté que nous nous sommes rencontrés et nous voici à présent mariés. Je te remercie pour ton soutien sans failles tout au long de ces thèses. Nous voici au bout des « études » et ton amour et ta patience ont été de formidables moteurs. Ne change rien !

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT
ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR
AUTEUR ».

Table des matières

Introduction générale	3
Chapitre 1 : Bibliographie.....	5
1. Plantes et cancer	5
2. Plantes étudiées.....	6
a. Le Colchique d'Automne	6
b. La Pervenche de Madagascar	13
3. Pourquoi le criblage ?.....	21
a. Les besoins en santé publique et le développement de nouveaux médicaments	21
b. Notion de cible moléculaire thérapeutique : la tubuline	23
c. Notion de banques moléculaires.....	32
d. Organisation des campagnes de criblage d'extraits de plantes	33
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	35
1. La spectrométrie de masse	35
a. Grandeurs utilisées en spectrométrie de masse	36
b. Mode d'ionisation MALDI.....	36
c. Analyse des ions formés.....	43
d. Analyseur en temps de vol	45
e. Analyseur à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier	50
2. Le criblage moléculaire par spectrométrie de masse.....	57
a. Mise en place des tests de criblage.....	57
b. Organisation générale de nos tests de criblage par MALDI-TOFMS.....	61
Chapitre 3 : Résultats expérimentaux	69
1. Caractérisation des extraits de Colchique d'Automne	70
a. Matériel végétal et préparation d'extraits de Colchique	70
b. Caractérisation par spectrométrie de masse des extraits de Colchique	71
2. Caractérisation des extraits de Pervenche de Madagascar.....	74
a. Matériel végétal et préparation d'extraits de Pervenche de Madagascar	74
b. Caractérisation par spectrométrie de masse des extraits de Pervenche de Madagascar	75
3. Test de criblage primaire.....	94
a. Criblage primaire par MALDI-TOFMS de témoins liant la tubuline	94
b. Validation des protocoles de criblage primaire.....	102

4. Criblage primaire des extraits de plantes.....	115
a. Criblage primaire des extraits de Colchique d'Automne.....	115
b. Criblage primaire des extraits de Pervenche de Madagascar	118
Conclusion générale.....	124
Bibliographie	127
Index des figures et des tableaux.....	130
Annexes.....	134
Résumé	1

Introduction générale

Pour faire face aux problèmes de santé publique rencontrés actuellement, tels que les cancers par exemple, l'industrie pharmaceutique est continuellement à la recherche de nouveaux médicaments.

Les stratégies actuelles de développement de nouveaux médicaments mettent en jeu des approches à haut débit pour accélérer la découverte et l'évaluation de nouveaux composés. Ces nouvelles molécules peuvent ainsi devenir des têtes de séries sur lesquels sera basé le développement des médicaments de demain.

Cet aspect de découverte de nouvelles molécules actives met en évidence l'importance du règne végétal, notamment dans le cadre de la lutte contre le cancer. En effet, les plantes ont montré être une source majeure d'agents anticancéreux originaux dont beaucoup trouvent leur place dans les traitements actuels. C'est le cas par exemple du taxol extrait de l'If et des vinca-alcaloïdes extraits de la Pervenche de Madagascar. Ainsi, il est naturel d'espérer découvrir de nouvelles molécules actives par le criblage d'extraits de plantes.

Les technologies de découverte de nouveaux médicaments par le criblage biomoléculaire et la chimie combinatoire ont ouvert la voie, et de leur usage résulte un raccourcissement du temps de développement et une meilleure connaissance des molécules candidates. L'impact de ces technologies sur **la stratégie globale de découverte de nouveaux médicaments** est non négligeable et **implique la mise en place de nouveaux tests couplés à des techniques d'analyses perfectionnées**. En effet, lors de ce processus de découverte et de développement il y a apparition de besoins analytiques importants. Les techniques d'analyse utilisées doivent être rapides, sensibles et spécifiques et elles doivent de plus offrir un débit d'échantillons assez important. Un autre aspect émergeant est la nécessité de pouvoir travailler sur des molécules présentes à l'état de traces du fait de la miniaturisation des tests et la forte diminution des volumes disponibles.

La spectrométrie de masse, en tant que technique d'analyse fiable, reproductible, sensible, spécifique, compatible avec de nombreux types d'échantillons et permettant un débit d'analyse conséquent, trouve ainsi sa place dans les stratégies de recherche et développement de nouveaux médicaments, notamment à partir d'extraits bruts de plantes, non fractionnés.

Ce travail de thèse a été encadré par Monsieur le Professeur Jean-François Muller au sein du Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser (LSMCL) de l'Université Paul Verlaine de Metz sous la Direction de Madame le Professeur Dominique Laurain-Mattar du Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré Nancy 1.

Ce travail avait pour but de **caractériser finement des extraits de plantes à activité anti-tubuline et de mettre en place et de valider une stratégie de criblage originale, impliquant la spectrométrie de masse comme technique de détection. Son potentiel devait être mis en évidence en l'appliquant à différents échantillons complexes tels que des extraits de plantes.**

Ainsi, le **chapitre 1** présentera l'intérêt du criblage d'extraits de plantes dans le cadre de la recherche pharmaceutique pour répondre aux besoins de santé publique actuels. Nous donnerons ainsi les descriptions précises des deux plantes à activité antitubuline utilisées au cours de ces travaux : le Colchique d'automne et la Pervenche de Madagascar. Nous nous attacherons également à présenter la tubuline, la cible moléculaire sur laquelle a porté cette étude. Enfin, nous présenterons les différentes stratégies de criblages mises en jeu pour l'étude de matériel végétal.

Le **chapitre 2** regroupera les données relatives aux matériels et aux méthodes utilisés au cours de ces travaux. Nous présenterons dans un premier temps la spectrométrie de masse et les techniques que nous avons utilisées au cours de ces travaux, puis nous décrirons en détails la stratégie que nous avons développée pour proposer un test de criblage pertinent, fiable et économiquement viable en vue de son utilisation industrielle.

Le **chapitre 3** décrira les résultats expérimentaux obtenus lors de ces études. Ainsi, nous présenterons la caractérisation fine par spectrométrie de masse des extraits de Colchique d'Automne et de Pervenche de Madagascar. Puis nous discuterons des résultats obtenus lors du criblage de molécules témoins se liant à la tubuline et lors de la validation de notre test de criblage. Enfin nous nous intéresserons à l'application des protocoles que nous avons mis en place en criblant les extraits des différentes plantes à la recherche de molécules montrant une activité intéressante pouvant conduire à de nouveaux médicaments contre le cancer.

Chapitre 1 : Bibliographie

INTRODUCTION

Notre travail a été de mettre en place une nouvelle stratégie de criblage de la liaison de composés à la tubuline mettant en jeu la spectrométrie de masse comme technique de détection. Cette étude a été appliquée au criblage d'extraits de plantes à activité anti tubuline, dans le but de mener à la découverte de nouveaux composés actifs contre le cancer.

Ce chapitre va tout d'abord présenter l'intérêt des plantes dans le cadre du traitement des cancers.

Nous nous intéresserons ensuite plus spécifiquement aux deux plantes à activité anti-tubuline utilisées au cours de ces travaux : le Colchique d'automne et la Pervenche de Madagascar. Ces deux plantes contiennent des alcaloïdes capables de se fixer à la tubuline et d'en bloquer la polymérisation en microtubules.

Nous nous attacherons enfin à décrire le criblage pour la recherche pharmaceutique en définissant les besoins actuels en santé publique et les notions de cible thérapeutique et de banques moléculaires. Nous décrirons ainsi la tubuline, cible moléculaire sur laquelle nous avons basé notre étude, ses propriétés biologiques et sa place en thérapeutique. Nous exposerons également les différentes stratégies de criblage utilisées pour les extraits de plantes et leur organisation en campagnes de criblage à plus grande échelle. Nous décrirons enfin les molécules, dont la liaison à la tubuline est connue, que nous avons utilisées comme témoins positifs au cours de nos travaux.

1. Plantes et cancer

A mesure que la technologie évolue, il est aisé d'oublier que les plantes ont été à l'origine de nombreuses thérapies¹. Ainsi, dans les pays industrialisés, 50% de tous les médicaments prescrits sont extraits ou dérivés de plantes ou d'autres sources naturelles. Il faut

¹ (1) Gwynn, J.; Hylands, P. J. *drug discovery world summer 2000* **2000**, 54.

rajouter à cela que seuls 5 à 15% des quelques 250000 espèces végétales de la planète ont été étudiés à l'heure actuelle².

Depuis des millénaires, le cancer dans toutes ses formes, a été peu compris, craint et souvent fatal. De ce constat et du fait de la nature très hétérogène présentée par cette maladie, l'homme a de tout temps cherché à utiliser des plantes pour essayer d'y remédier³. Ainsi, plus de 3500 espèces végétales ont été référencées jusqu'à ce jour comme permettant de traiter des atteintes pouvant être reliées au cancer⁴.

Dans l'histoire médicale moderne les plantes ont également montré être des sources importantes d'agents anticancéreux. Les exemples sont nombreux dont les *vinca*-alcaloïdes, les taxanes et les camptotécines issus respectivement de *Catharanthus roseus*, *Taxus brevifolia* et *Camptotheca acuminata*. Pour ces raisons, le criblage des plantes à la recherche de molécules actives contre le cancer continue d'être une priorité pour les industries pharmaceutiques⁵.

2. Plantes étudiées

a. Le Colchique d'Automne

Nous donnerons une description botanique de cette plante et de ses utilisations traditionnelles et médicinales. Nous décrirons ensuite le matériel végétal utilisé au cours de nos travaux et nous présenterons les molécules référencées contenues dans les extraits de cette plante. Enfin, nous présenterons la caractérisation par spectrométrie de masse que nous avons menée à bien sur les extraits que nous avons préparés.

i. Description botanique du Colchique d'automne

Le nom latin du Colchique d'automne est *Colchicum autumnale* L. de la famille des Liliacées. Les autres noms populaires de cette plante sont : safran bâtard, safran des prés, tue-

² (2) Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Prawat, H.; Pisutjaroenpong, S.; Engprasert, S.; Chumsri, P.; Tengchaisri, T.; Sirisinha, S.; Picha, P. *pure & appl. Chem.* **1998**, 70, 2065.

³ (3) Mukherjee, A. K.; Basu, S.; Sarkar, N.; Ghosh, A. C. *Current Medicinal Chemistry* **2001**, 8, 1467.

⁴ (4) Graham, J. G.; Quinn, M. L.; Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R. *Journal of Ethnopharmacology* **2000**, 73, 347.

⁵ (5) Mans, D. R. A.; Rocha, A. B. D.; Schwartzmann, G. *The Oncologist* **2000**, 5, 185.

chien, mort-chien, chenarde, ail des prés, oignon de loup, tue-loup, femme nue, dame nue, dame sans chemise, veilleuse, veillote^{6,7}.

Cette plante est toxique du fait des alcaloïdes qu'elle contient. Certains de ces alcaloïdes, présents majoritairement dans les graines, sont utilisés comme médicaments. Par exemple la colchicine est traditionnellement utilisée dans le traitement des crises de goutte et le colchicoside (après transformation en thiocolchicoside) a des propriétés myorelaxantes^{8,9}. Un troisième alcaloïde important, le 3-déméthylcolchicine, n'a pas encore été exploité par l'industrie pharmaceutique¹⁰. La concentration de ces différents alcaloïdes est de l'ordre de 0,7% en poids de matière sèche. Ces molécules sont des métabolites secondaires dont le rôle dans la plante n'est pas encore totalement élucidé mais qui doivent lui permettre de se protéger des prédateurs et des parasites¹¹.

Cette plante n'est pas cultivée à grande échelle du fait de sa biologie particulière. En effet, le pourcentage de germination est faible et le délai entre la plantation et la première floraison varie de 3 à 7 ans.

Le colchique d'automne est présenté en Figure 1.

-
- ⁶ (6) Boullard, B. *Plantes médicinales du monde réalités & croyances*, 2001; pp 636 pages
- ⁷ (7) Bernard, B. *l'herbier oublié, secrets de plantes retrouvés*, éditions plumes de carottes ed., 2003.
- ⁸ (8) Bellet, P.; Delaveau, P.; Delourme-Houdé, J.; Fourneau, J. P.; Gagnault, J. C.; Gorget, C.; Gueunier, C.; Potier, P. *pérennité des alcaloïdes* **1985**, 119.
- ⁹ (9) Bruneton, J. *pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, Lavoisier ed.Paris, 1995.
- ¹⁰ (10) Gagnault, J. C. *l'actualité chimique* **1981**, 9, 13.
- ¹¹ (11) Robinson, T. *Alkaloids - The organic constituents of higher plants*; Cordus press: Amherst, 1991.



Figure 1 : représentation schématique et photographie du Colchique d'automne ; (a) coupe transversale du fruit ; (b) fruit ; (c) graine ; (d) bulbe (cormus) ; (e) plante entière (feuilles et jeune fruit ou fleur) ; (f) fleur ; (g) style ; (h) étamine ; (i) coupe transversale du bulbe (cormus) et de l'embryon¹²

Le Colchique est une plante herbacée vivace de 10 à 40 cm de haut, glabre, donnant ses jolies fleurs en automne, ses feuilles et ses fruits au printemps de l'année suivante¹³.

Les feuilles sont dressées, larges et lancéolées, longues (15-35 cm de long sur 2 à 7 cm de large), groupés par 4 ou plus autour du fruit (Figure 1e). Elles apparaissent au printemps et fanent bien avant l'apparition des fleurs à l'automne suivant¹⁴. Les feuilles de colchique sont parfaitement inodores ce qui permet le différencier de l'ail ou des poireaux sauvages¹⁵.

Les fleurs (Figure 1f), rose lilas ou violet à blanc, poussent en groupe de 1 à 6 à partir d'un bulbe souterrain (cormus). Les fleurs sont grandes, à divisions oblongues, chaque pétale faisant de 3 à 4,5 cm, fusionnant en un tube allongé, rose lilas-blanc de 5 à 20 cm de haut. Chaque fleur contient 6 étamines de forme ovale (Figure 1h), 3 longues et 3 courtes et le pistil de 3 styles à stigmates fortement courbés en crochet dépassant longuement les étamines (Figure 1g). La floraison a lieu d'août à octobre¹⁴. Après fécondation, l'embryon reste en

¹² (12) Köhler, F. E. *Köhler's Medizinal Pflanzen*, 1887.

¹³ (13) Jaeger, A.; Flesch, F. *Colchicum autumnale*, 1990.

¹⁴ (14) Huxley, A. H. *The new Royal Horticultural Society dictionary of Gardening*, MacMillan ed. London, 1992; Vol. 1.

¹⁵ (15) Thies, P. W. *Pharm Unserer Zeit* **1985**, 14, 149.

l'état au niveau du bulbe (Figure 1i). La fleur se flétrit et l'ovaire et le tubercule passent l'hiver sous terre. Au printemps suivant, les feuilles nouvelles se développent et emportent le jeune fruit.

Les fruits sont des capsules à 3 loges, oblongues à ovoïdes de la taille d'une noix, d'abord vertes, puis brunes (Figure 1a et b). Ils apparaissent avec les feuilles en avril-juin de l'année suivant la floraison. Chaque capsule contient entre 60 et 200 graines noires et irrégulières (Figure 1c) qui sont dispersées en juin-juillet par la déhiscence des 4 valves du fruit¹⁴.

La partie souterraine du colchique d'automne est un bulbe solide et vertical (ou cormus) de 2,5 à 6 cm de haut et 2 à 4 cm de large, entouré de tuniques minces et brunâtres (Figure 1d). Il est enterré très profondément (de 15 à 20 cm)¹⁴.

Ainsi, différents aspects du colchique peuvent être observés durant l'année : au printemps des feuilles avec le fruit (d'avril à juillet) et en automne les fleurs (de fin août à octobre).

Cette espèce se retrouve majoritairement dans les prés humides de toute la France ainsi que du sud et du centre de l'Europe.

Toutes les parties du colchique d'automne sont violemment toxiques. L'ingestion de la plante produit des troubles généralement très graves et fréquemment mortels. Le bétail est souvent intoxiqué et une quantité de feuilles égale à 0,1% du poids de l'animal suffit à le tuer (soit 70 g de feuilles pour un homme de 70 kg). Chez l'homme l'intoxication donne des symptômes digestifs (hyper salivation, soif intense, coliques violentes, diarrhée, vomissements, constriction laryngopharyngée), cardiaques (hypotension), nerveux (paralysie) et respiratoires avec cyanose qui peuvent entraîner une mort par anoxie le lendemain ou le surlendemain, voir même 10 jours après l'intoxication^{16,17}.

Il n'y a pas d'antidote de la colchicine commercialisé jusqu'à présent mais un anticorps anticolchicine a donné de bons résultats au cours des intoxications¹⁷.

¹⁶ (16) Dehon, B.; Chagnon, J. L.; Vinner, E.; Pommery, J.; Mathieu, D.; Lhermitte, M. *Biomed. Chromatogr.* **1999**, *13*, 235.

¹⁷ (17) Brvar, M.; Kozelj, G.; Mozina, M.; Bunc, M. *Wien Klin Wochenschr* **2004**, *116*, 205.

ii. Utilisations traditionnelles et médicales du Colchique

Le nom de colchique vient du pays de Colchide, région célèbre pour ses plantes vénéneuses, aujourd'hui située en Géorgie. La célèbre Médée, fille du roi de Colchide prépara des filtres à base de Colchique pour aider Jason à conquérir la toison d'or⁷.

Le bulbe de colchique était porté autrefois en amulette autour du cou pour éloigner les microbes et les virus. En Belgique, une racine portée autour du cou chassait les « sueurs nocturnes », une feuille de colchique placée dans une chaussure servait à soigner les cors au pied⁷.

De plus, son usage médical actuel découle d'un usage traditionnel dans le traitement de la goutte. En effet, selon la « théorie des signatures », selon laquelle les propriétés des plantes sont « visibles » extérieurement, le bulbe de colchique ressemblant à un orteil déformé par la goutte (un tophus), il lui a été attribué la propriété de guérir ce mal.

D'autres voies de traitements médicaux par la colchicine sont en développement. Ainsi, le premier essai au monde de traitement de la mucoviscidose à l'aide de la colchicine a été lancé en France par l'équipe du Professeur Gérard Lenoir (hôpital Necker-Enfants malades, Paris). En effet, des patients cancéreux ayant une mucoviscidose et traités dans le cadre de leur chimiothérapie par la colchicine ont vu leur capacité respiratoire s'améliorer de manière persistante. L'essai clinique a concerné 85 enfants de plus de 5 ans atteints de formes moyenne ou modérée de la maladie. Contrôlé contre placebo, il était destiné à évaluer l'efficacité clinique de la posologie de 1 mg de colchicine¹⁸.

Dans le cadre de ces usages médicaux actuels, la colchicine montre différents modes d'action passant tous par sa liaison à la tubuline. En effet, cette molécule en s'y fixant empêche la polymérisation en microtubules. L'absence ou l'insuffisance de microtubules se traduit par un blocage de la division cellulaire au stade de la métaphase, une inhibition de la mobilité des granulocytes (qui normalement convergent vers les cristaux d'acide urique et participent à la réaction inflammatoire ayant lieu lors de la crise de goutte) ainsi qu'une inhibition de la migration intracellulaire notamment des granules d'histamine (mis en jeu dans la réaction inflammatoire).

¹⁸ (18) Lenoir, G.; Sermet, I.; Duhamel, J. F. *Journal de pédiatrie et de puériculture* **2001**, 14, 437.

Ainsi, la colchicine est efficace dans le traitement de la goutte par le biais de son activité antitubuline et des essais ont été menés à bien pour en permettre son utilisation dans le cadre de la thérapie des cancers^{19,20}. Cependant, la colchicine n'a pas un large spectre d'action antitumorale contrairement aux alcaloïdes extraits de la pervenche. Son usage chez l'homme n'est approuvé par la FDA (Food And Drug Administration) que dans le cadre du traitement de la goutte. Elle est néanmoins utilisée comme agent anticancéreux en recherche sur des cultures cellulaires et en usage vétérinaire.

iii. Composition des extraits de Colchique

Les extraits de colchique d'automne contiennent notamment différentes molécules appartenant à la classe des alcaloïdes tricycliques. Ce sont ces molécules qui vont nous intéresser dans ce travail car c'est dans cette famille que se retrouve la colchicine, molécule antimitotique se liant à la tubuline. Une trentaine de molécules de ce type ont été isolées mais seulement 2 ont été plus particulièrement étudiées : le **colchicoside** et surtout la **colchicine**^{9,21,22,23,24,25,26}. Les graines peuvent ainsi contenir jusqu'à 1,06% de colchicine. Les autres alcaloïdes mineurs sont l'**androcymbine**, l'**autumnaline**, la **colchicilline**, la **colchifoline**, la **cornigerine**, la **démecolcine**, la **colchiceine** et la **N-deacetyl-N-formylcolchicine** ainsi que leurs dérivés déméthylés : **2-déméthyl-démecolcine**, **3-déméthyl-démecolcine**, **2-déméthylcolchicine**, **3-déméthylcolchicine** ou acétylés : **O-acétylcolchiceine**, **N-acétyl-démecolcine**, **2-acétyl-2-déméthyl-démecolcine** et **3-acétyl-3-déméthyl-démecolcine**. Ces molécules sont présentées dans la Figure 2 et le Tableau 1 ci-après.

-
- | | | |
|---------------|------|---|
| ¹⁹ | (19) | Seliger, H. <i>Ther Umsch</i> 1958 , 15, 158. |
| ²⁰ | (20) | Dustin, P. <i>Rev Med Brux</i> 1989 , 10, 385. |
| ²¹ | (21) | Ondra, P.; Vfilka, I.; ViCar, J.; Sfitltipinar, N.; gimfinek, V. <i>Journal of Chromatography A</i> 1995 , 704, 351. |
| ²² | (22) | Ellington, E.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. <i>phytochem. Anal.</i> 2003 , 14, 164. |
| ²³ | (23) | Santavy; Reichstein. <i>Helv. Chim. Acta.</i> 1950 , 33, 1606. |
| ²⁴ | (24) | Potessilova. <i>Collect. Czech Chem Commun</i> 1967 , 32, 141. |
| ²⁵ | (25) | Gaillard, Y.; Pepin, G. <i>Journal of Chromatography B</i> 1999 , 733, 181–229. |
| ²⁶ | (26) | Yoshida, K.; Hayashi, T.; Sano, K. <i>Agric. Biol. Chem.</i> 1988 , 52, 593. |

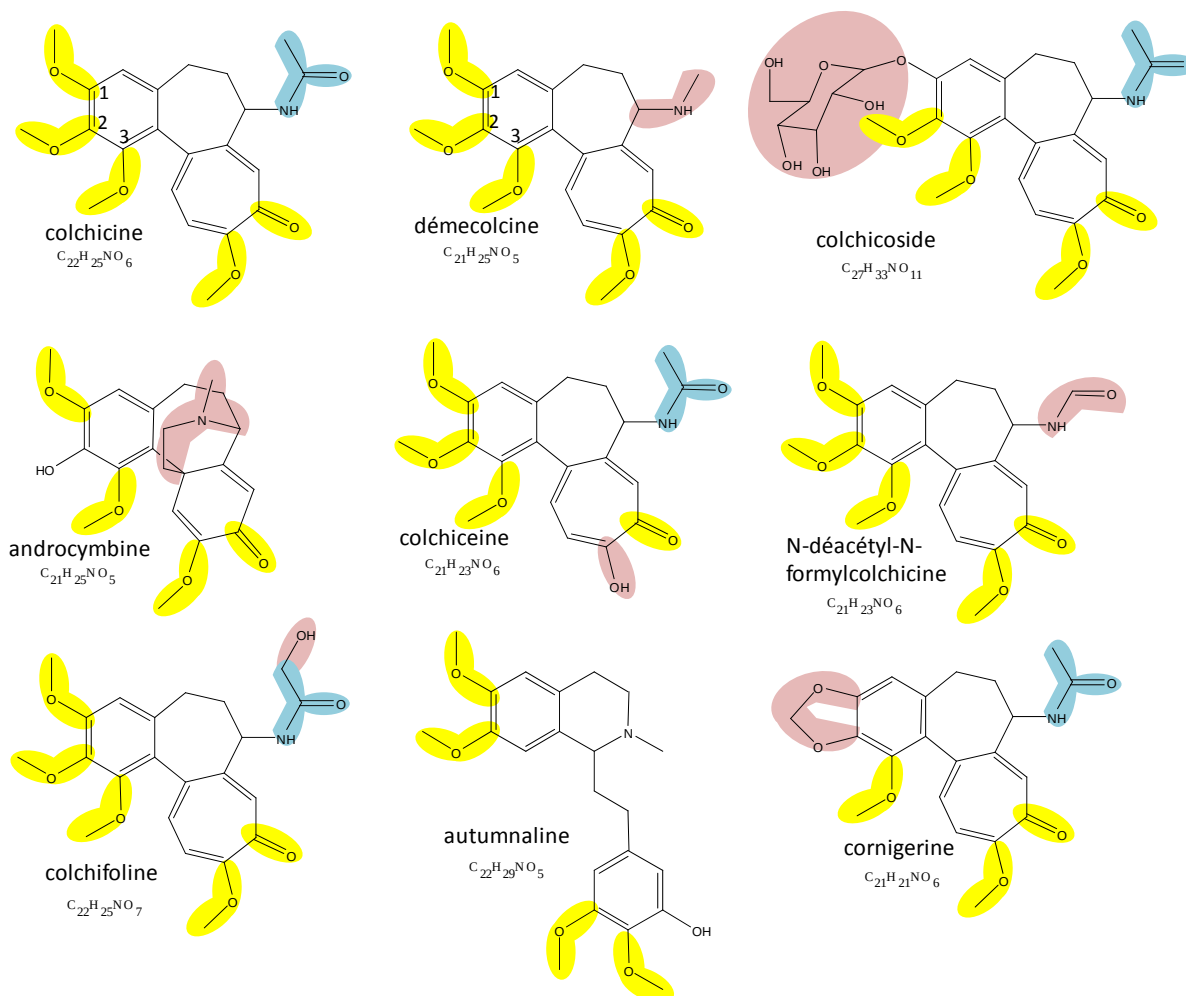


Figure 2 : structures des différents alcaloïdes du colchique d'automne

Tableau 1 : formules brutes, masses molaires et ions pseudomoléculaires $[M+H]^+$ théoriques des principaux alcaloïdes du Colchique d'automne

molécule	Formule brute	Masse molaire ($g \cdot mol^{-1}$)	$[M+H]^+$ théorique
2-déméthyl-démecolcine	$C_{20}H_{23}NO_5$	357,15762	358,16490
3-déméthyl-démecolcine	$C_{20}H_{23}NO_5$	357,15762	358,16490
démecolcine	$C_{21}H_{25}NO_5$	371,17327	372,18055
androcymbine	$C_{21}H_{25}NO_5$	371,17327	372,18055
cornigérine	$C_{21}H_{21}NO_6$	383,13689	384,14416
2-déméthylcolchicine	$C_{21}H_{23}NO_6$	385,15254	386,15981
3-déméthylcolchicine	$C_{21}H_{23}NO_6$	385,15254	386,15981
N-déacétyl-N-formylcolchicine	$C_{21}H_{23}NO_6$	385,15254	386,15981
colchicineine	$C_{21}H_{23}NO_6$	385,15254	386,15981
autumnaline	$C_{22}H_{29}NO_5$	387,20457	388,21185
colchicine	$C_{22}H_{25}NO_6$	399,16819	400,17546
2-acétyl-2-déméthyl-démecolcine	$C_{22}H_{25}NO_6$	399,16819	400,17546
3-acétyl-3-déméthyl-démecolcine	$C_{22}H_{25}NO_6$	399,16819	400,17546
N-acétyl-démecolcine	$C_{23}H_{27}NO_6$	413,18384	414,19111
colchifoline	$C_{22}H_{25}NO_7$	415,16310	416,17038
O-acétylcolchicineine	$C_{23}H_{25}NO_7$	427,16310	428,17038
colchicoside	$C_{27}H_{33}NO_{11}$	547,20536	548,21264

La présence de ces différents alcaloïdes dans les extraits de Colchique d'automne est dépendante de la phase du cycle au cours de laquelle a lieu la récolte. Ainsi, un des changements notables concerne la teneur du matériel végétal frais en colchicine et démecolcine au cours du cycle²⁷. Un autre point important à mettre en avant est que ces différentes molécules, présentes dans la plante fraîche, peuvent être relativement altérées lors des processus de séchage, de broyage et de stockage. C'est notamment le cas de la colchicine, de la N-déacétyl-N-formylcolchicine et de la démecolcine qui peuvent subir des dégradations enzymatiques telles que des O-déméthylations, provoquant une baisse significative de leurs teneurs lors du vieillissement²⁸. Ces différents éléments font qu'une grande variabilité de la composition des extraits obtenus à partir de matériel végétal sec et broyé peut être observée.

Enfin, parmi ces différentes molécules, certaines, outre la **colchicine**, ont montré une affinité pour la tubuline : c'est le cas de la **démecolcine**²⁹ et de la **cornigérine**³⁰ (majoritairement extraite de *Colchicum cornigerum*) qui se lient toutes deux au même site de liaison que la colchicine sur la tubuline. Leur interaction avec cette protéine est cependant très lente (plus d'une heure) bien que leurs affinités pour cette cible soient du même ordre que celle de la colchicine. Une autre molécule, la **colchicine**, se lie quand à elle au dimère de tubuline³¹. Ces trois alcaloïdes sont cependant très minoritaires dans les extraits de colchique d'automne du fait d'une très faible teneur dans cette plante.

b. La Pervenche de Madagascar

L'étude d'extraits de Pervenche de Madagascar à la recherche de molécules liant la tubuline suit directement la précédente étude. Ainsi, après une description botanique de cette plante, nous nous intéresserons à ses utilisations traditionnelles et thérapeutiques ainsi qu'à la composition des extraits pouvant en être réalisés puis à la biosynthèse des espèces qui y sont retrouvées. Nous présenterons ensuite le matériel végétal et la technique d'extraction que nous avons utilisés au cours de nos travaux. Nous nous attacherons à caractériser les extraits par spectrométrie de masse et dans un dernier temps nous présenterons les résultats obtenus lors de leur criblage primaire à la recherche d'agents liant la tubuline.

²⁷ (27) Vicar, J.; Klusakova, L.; Simanek, V. *Acta. Univ. Palacki. Olomuc Fac. Med.* **1993**, 136, 5.

²⁸ (28) Santavy, F.; Preiminger, V.; Simanek, V.; Potesilova, H. *Planta Med* **1981**, 43, 153.

²⁹ (29) Ueno, Y. *Proceeding of the Japan Academy* **1953**, 6, 264.

³⁰ (30) Hamel, E.; Ho, H. H.; Gil-Jong, K.; Lin, C. M. *Biochemical pharmacology* **1988**, 37, 2445.

³¹ (31) Hostie, S. B.; MacDonald, T. L. *biochemical pharmacology* **1990**, 39, 1271.

i. Description botanique de la Pervenche de Madagascar

La Pervenche de Madagascar est une plante endémique à l'île de Madagascar où elle pousse jusqu'à une altitude de 1600-1800 m. Du fait de sa résistance et de sa facilité de culture, elle a été vite disséminée par l'homme sur toutes les régions chaudes du globe³².

Son nom scientifique actuellement utilisé est *Catharanthus roseus* (L.) G. Don mais du fait de multiples classifications contradictoires, elle est également appelée *Vinca rosea* ou *Vinca madagascarensis*. Cette plante est aussi connue sous les noms de Pervenche rose, catharanthe, rose amère ou encore en anglais old maid ou bright eyes³².

La Pervenche de Madagascar appartient à la famille botanique des Apocynacées qui fournit nombre de plantes dont les activités toxiques et pharmacologiques sont marquées.

La Pervenche de Madagascar est une plante vivace qui fleurit constamment pour peu qu'elle pousse dans un endroit ensoleillé. Elle est présentée en Figure 3.



Figure 3 : représentation schématique et photographie de la Pervenche de Madagascar *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. ; (a) partie aérienne de la plante ; (b) fruit ; (c) graine¹²

³² (32) VanDerHeijden, R.; Jacobs, D. I.; Snoeijer, W.; Hallard, D.; Verpoorte, R. *curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 607.

La partie aérienne de cette plante consiste en un buisson de 20 à 60 cm généralement mais pouvant aller jusqu'à 90 cm de haut. Les tiges sont semi ligneuses rougeâtres et contiennent un latex (Figure 3a)³².

Les feuilles sont persistantes, simples, spiralées et opposées. Elles sont ovales à lancéolées de 5 à 7 cm de long, à marge ondulée et avec un pétiole court. Elles sont glabres des deux côtés et leur face supérieure est brillante, vert moyen à sombre³³.

Les fleurs de 3 à 4 cm sont roses ou blanches ou blanches avec un œil rose au centre. Elles sont présentes toute l'année si le climat est approprié. Elles sont axillaires, tubulaires à corolle à 5 pétales spatulés³³.

Les fruits sont deux follicules cylindriques déhiscentes (Figure 3b) contenant chacun 12 à 20 graines brunâtres et arrondies (Figure 3c)³³.

ii. Utilisations traditionnelles et médicales de la Pervenche de Madagascar

La Pervenche de Madagascar a été utilisée traditionnellement pour traiter de nombreuses maladies selon l'endroit de culture³².

Ainsi, elle était utilisée traditionnellement comme remède contre l'hypertension, l'oligurie et les troubles menstruels. Aux Antilles une décoction de cette plante est prescrite en gargarisme pour lutter contre les angines et les feuilles broyées servent d'emplâtre sur les contusions avec ecchymoses. En Inde elle a été utilisée pour traiter les piqûres de guêpes (par décoction ou infusion de feuilles), à Hawaii elle était utilisée comme hémostatique (la plante est bouillie puis appliquée en cataplasme), pour arrêter les saignements, en Chine elle trouvait sa place comme diurétique et comme remède contre la toux (en tisanes). En Europe on lui prêtait des propriétés magiques, d'où son surnom de « violette des sorciers », et les Jamaïcains l'utilisaient comme remède contre le diabète (en tisanes).

C'est cet aspect qui intéressa les chercheurs en 1950 qui s'attachèrent à démontrer l'activité hypoglycémiant de la plante à la recherche d'une éventuelle insuline végétale³⁴. Cette étude s'avéra cependant peu fructueuse malgré une augmentation de la sécrétion

³³ (33) Stearn, T. *The Catharanthus alkaloids*; Taylor and Farnsworth, 1975.

³⁴ (34) Nammi, S.; Boini, M. K.; Lodagala, S. D.; Behara, R. B. S. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2003**, 3.

d'insuline par le pancréas suite à la prise de préparations à base de Pervenche. Les patients traités montrèrent cependant une leucopénie importante (leur nombre de globules blancs était très diminué, ce qui est le signe majeur d'une activité antimitotique d'une substance : en effet, les globules blancs sont les cellules du corps humain qui subissent le plus de renouvellement, par divisions cellulaires, ou mitoses, et donc sont les cellules les plus sensibles aux cytotoxiques).

De là, les extraits de Pervenche de Madagascar ont été étudiés en vue d'une possible activité anticancéreuse, menant à la découverte majeure des alcaloïdes de la pervenche que sont la vinblastine et la vincristine. Ces deux molécules sont deux antimitotiques puissants utilisés seuls ou en association avec d'autres agents anticancéreux dans le cadre des traitements de la maladie de hodgkin, des lymphomes, sarcomes et carcinomes mammaires (entre autres)³⁵. Ces molécules sont d'ailleurs devenues un dénominateur commun de nombreux protocoles de chimiothérapie en servant notamment d'agents « synchronisateurs », permettant de renforcer l'activité des autres molécules anticancéreuses associées³⁶.

D'autres molécules retrouvées dans les extraits de Pervenche ont trouvé des applications en thérapeutique. C'est le cas de la réserpine pour ses propriétés sédatives et hypotensives, et de la vincamine et de l'ajmalicine ou raubasine qui entrent dans la composition de médicaments destinés à améliorer la fonction cérébrale du sujet âgé notamment dans le cadre des troubles psychiques de la sénescence ou des suites d'accidents vasculaires-cérébraux. Les troubles sensoriels tels que les rétinopathies d'origine vasculaire ou les troubles de l'oreille interne (vertiges et acouphènes) en sont également des bonnes indications³⁷.

iii. Composition des extraits de Pervenche de Madagascar et biosynthèse des alcaloïdes

Les extraits de Pervenche ont été très étudiés du fait de la découverte de leurs activités biologiques importantes. La Pervenche de Madagascar est ainsi considérée comme la plante

³⁵ (35) Johnson, I. S.; Armstrong, J. G.; Gorman, M.; Jr, J. P. B. *cancer research* **1963**, 23, 1390.

³⁶ (36) Svoboda, G. H. "the role of the alkaloids of catharanthus roseus (L.) G. Don (vinca rosea) and their derivatives in cancer chemotherapy"; plants: the potentials for extracting protein, medicines, and other useful chemicals, 1977, indianapolis.

³⁷ (37) Shanks, J. V.; Bhadra, R.; Morgan, J.; Rijhwani, S.; Vani, S. *biotechnology and bioengineering* **1998**, 58, 333.

médicinale la plus étudiée à l'heure actuelle. Elle présente un métabolisme complexe et plus de 150 alcaloïdes différents ont été référencés jusqu'ici³⁸.

Les alcaloïdes sont des molécules qui induisent généralement des effets biologiques importants et nombre d'entre eux a trouvé une application en médecine³⁹.

Les alcaloïdes extraits de la Pervenche de Madagascar appartiennent à la classe des alcaloïdes terpenoides indoliques. Les alcaloïdes majoritaires des extraits de Pervenche de Madagascar sont ainsi la **serpentine**, l'**ajmalicine**, la **catharanthine**, la **vindoline**, l'**anhydrovinblastine**, la **vinblastine** et dans une moindre mesure la **leurosine** et la **vincristine** (dont le rendement d'extraction est de 0,0003% dans la matière végétale sèche, l'un des plus faible rendements d'extraction pour une molécule utilisée en médecine³⁶). Les alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar référencés sont présentés, de manière non exhaustive, dans le Tableau 2.

Tableau 2 : formules brutes, masses molaires et ions pseudomoléculaires [M+H]⁺ théoriques des principaux alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar^{32,35,36,37,38,39,40,41,42}

nom du composé	formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	[M+H] ⁺ théorique
tryptamine	C₁₀H₁₂N₂	160.10005	161.10733
B-carboline	C ₁₁ H ₈ N ₂	168.06875	169.07603
N,N-diméthyl-tryptamine	C ₁₂ H ₁₆ N ₂	188.13135	189.13863
Nb-acetyl-tryptamine	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O	202.11061	203.11789
apparicine	C ₁₈ H ₂₀ N ₂	264.16265	265.16993
pericalline	C ₁₈ H ₂₀ N ₂	264.16265	265.16993
ammocalline	C ₁₉ H ₂₂ N ₂	278.17830	279.18558
secodine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂	292.19395	293.20123
decussine	C ₂₀ H ₁₉ N ₃	301.15790	302.16518
malindine	C ₂₀ H ₂₂ N ₃	304.18137	305.18865
akuammicine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	322.16813	323.17541
pericyclivine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	322.16813	323.17541
pleiocarpamine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	322.16813	323.17541
rosicine	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃	324.14739	325.15467
akagerine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.18378	325.19106
cavincine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.18378	325.19106
kibine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.18378	325.19106
lochnerine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.18378	325.19106
tubotaiwine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.18378	325.19106
ajmaline	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₂	326.19943	327.20671
lochneridine	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₃	328.17869	329.18597
19-epi-vindolinine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₂	336.18378	337.19106
catharanthine	C₂₁H₂₄N₂O₂	336.18378	337.19106
tabersonine ou vincamine	C₂₁H₂₄N₂O₂	336.18378	337.19106
venalstonine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₂	336.18378	337.19106
vindolinine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₂	336.18378	337.19106

³⁸ (38) McCoy, E.; O'Connor, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14276.

³⁹ (39) Irshad, A. isolation and structural studies on the alkaloids of *Catharanthus roseus* (thèse de Doctorat Université de Karachi) Karachi, 1985.

⁴⁰ (40) Tikhomiroff, C.; Allais, S.; Klvana, M.; Hisiger, S.; Jolicoeur, M. *biotechnol Prog.* **2002**, *18*, 1003.

⁴¹ (41) Johnson, I. S.; Wright, H. F.; Svoboda, G. H.; Vlantis, J. *cancer research* **1960**, *20*, 1016.

⁴² (42) Jossang, A.; Fodor, P.; Bodo, B. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7162.

12-hydroxy-akuammicine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₃	338.16304	339.17032
fluorocarpamine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₃	338.16304	339.17032
lochrovicine	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₃	338.16304	339.17032
vinervine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₃	338.16304	339.17032
coronaridine	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₂	338.19943	339.20671
vincadifformine	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₂	338.19943	339.20671
21-hydroxy-cyclolochnerine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₃	340.17869	341.18597
perivine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₃	340.17869	341.18597
alstonine	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	348.14739	349.15467
serpentine	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	348.14739	349.15467
cathenamine	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	350.16304	351.17032
isovallesiachotamine	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	350.16304	351.17032
vallesiachotamine	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	350.16304	351.17032
19-epi Nb-oxide-vindolinine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
19-hydroxy-tabersonine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
ajmalicine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
akuammidine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
akuammigine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
epiajmalicine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
lochnericine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
minovincine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
Nb-oxide-vindolinine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
N-oxide-vindolinine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
O-deacetyl-akkuammiline	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
preakuammicine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
rauniticine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
rosamine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
tetrahydroalstonine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
vobasine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
N-oxide-fluorocarpamine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₄	354.15796	355.16524
perividine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₄	354.15796	355.16524
isositsirikine	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	354.19434	355.20162
minovincinine	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	354.19434	355.20162
sitsirikine	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	354.19434	355.20162
yohimbine	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	354.19434	355.20162
dihydrositsirikine	C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₃	356.20999	357.21727
dihydro-sitsirikine	C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₃	356.20999	357.21727
perimivine	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₄	366.15796	367.16524
11-methoxy-tabersonine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₃	366.19434	367.20162
11-methoxy-tabersosine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₃	366.19434	367.20162
stemmadenine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₃	366.19434	367.20162
10-hydroxy-deacetyl-akuammiline	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	368.17361	369.18089
7-hydroxyindolenine-ajmalicine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	368.17361	369.18089
epimisiline	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	368.17361	369.18089
hörhammericine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	368.17361	369.18089
mitraphylline	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	368.17361	369.18089
pseudo-indoxyl-ajmalicine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	368.17361	369.18089
vincoline	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	368.17361	369.18089
vincolidine	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₃	378.19434	379.20162
19-hydroxy-11-methoxy-tabersosine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	382.18926	383.19654
akuammine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	382.18926	383.19654
lochnerinine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	382.18926	383.19654
lochnerinine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	382.18926	383.19654
lochroidine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	382.18926	383.19654
virosine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	382.18926	383.19654
lochrovine	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₃	382.22564	383.23292
catharosine	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄	384.20491	385.21219
O-deacetyl-vindolidine	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄	384.20491	385.21219
secologanine	C ₁₇ H ₂₃ O ₁₀	387.12912	388.13640
akuammiline	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄	394.18926	395.19654
11-methoxy-hörhammericine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₅	398.18417	399.19145
vincarodine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₅	398.18417	399.19145
vinosidine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₅	398.18417	399.19145
deacetoxo-vindoline	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₄	398.22056	399.22784
19-acetoxo-11-hydroxy-tabersosine	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₅	410.18417	411.19145
deacetyl-vindoline	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₅	414.21547	415.22275
19-acetoxo-11-methoxy-tabersosine	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₅	424.19982	425.20710
lochnerivine	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₅	424.19982	425.20710

cathovaline	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₅	426.21547	427.22275
vindolidine	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₅	426.21547	427.22275
vindorosine	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₅	426.21547	427.22275
vindolicine	C ₂₅ H ₃₂ N ₂ O ₆	456.22604	457.23332
vindoline	C₂₅H₃₂N₂O₆	456.22604	457.23332
strictosidine	C ₂₇ H ₃₃ O ₇ N ₂	497.22878	498.23606
isovincoside	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₉	530.22643	531.23371
bannucine	C ₂₉ H ₃₆ N ₃ O ₇	538.25533	539.26261
reserpine	C ₃₃ H ₄₀ N ₂ O ₉	608.27338	609.28066
leurosivine	C ₄₁ H ₅₄ N ₃ O ₉	732.38601	733.39329
17-deacetoxy-leurosine	C ₄₄ H ₅₄ N ₄ O ₇	750.39925	751.40653
4-deacetoxy-vinblastine	C ₄₄ H ₅₆ N ₄ O ₇	752.41490	753.42218
deacetyl-vinblastine	C ₄₄ H ₅₆ N ₄ O ₈	768.40981	769.41709
pseudovinblastine-diol	C ₄₄ H ₅₆ N ₄ O ₈	768.40981	769.41709
3', 4'-anhydro-vinblastine	C₄₆H₅₆N₄O₈	792.40981	793.41709
vingramine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₈	792.40981	793.41709
4'-deoxy-vinblastine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₈	794.42546	795.43274
isoleurosine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₈	794.42546	795.43274
vinosidine	C ₄₄ H ₅₂ N ₄ O ₁₀	796.36384	797.37112
N-deformyl-vincristine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₉	796.40473	797.41201
N-demethyl-vinblastine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₉	796.40473	797.41201
vincamidine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₉	796.40473	797.41201
methylvingramine	C ₄₇ H ₅₈ N ₄ O ₈	806.42546	807.43274
catharanthamine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₉	808.40473	809.41201
leurosine	C₄₆H₅₆N₄O₉	808.40473	809.41201
vincathicine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₉	808.40473	809.41201
20'-epivinblastine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₉	810.42038	811.42766
leurosidine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₉	810.42038	811.42766
roseamine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₉	810.42038	811.42766
vinblastine	C₄₆H₅₈N₄O₉	810.42038	811.42766
vincovaline	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₉	810.42038	811.42766
catharicine	C ₄₆ H ₅₂ N ₄ O ₁₀	820.36834	821.37562
5'-oxo-leurosine	C ₄₆ H ₅₄ N ₄ O ₁₀	822.38399	823.39127
catharine	C ₄₆ H ₅₂ N ₄ O ₁₀	822.38399	823.39127
roseadine	C ₄₇ H ₅₈ N ₄ O ₉	822.42038	823.42766
carosine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀	824.39964	825.40692
Nb-oxide-leurosine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀	824.39964	825.40692
pleurosine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀	824.39964	825.40692
vinamidine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀	824.39964	825.40692
vincristine	C₄₆H₅₆N₄O₁₀	824.39964	825.40692
14'-hydroxy-vinblastine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₁₀	826.41529	827.42257
15'-hydroxy-vinblastine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₁₀	826.41529	827.42257
leurocolombine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₁₀	826.41529	827.42257
Nb-oxide-leurosidine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₁₀	826.41529	827.42257
vincadioline	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₁₀	826.41529	827.42257
neoleurocristine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₂	856.38947	857.39675
leurosinone	C ₄₉ H ₆₀ N ₄ O ₁₀	864.43094	865.43822
neoleurosidine	C ₄₈ H ₆₂ N ₄ O ₁₁	870.44151	871.44879
Nb-oxide-neoleurosidine	C ₄₈ H ₆₂ N ₄ O ₁₂	886.43642	887.44370

Ces nombreux alcaloïdes indoliques font partie intégrante du métabolisme secondaire de la plante et leur rôle en son sein est notamment de la protéger des prédateurs par le goût amer et la toxicité qu'ils apportent³⁹. De nombreuses voies de biosynthèse de ces différents alcaloïdes ont été élucidées et sont représentées schématiquement ci-après ainsi que les structures des principales molécules (Figure 4).

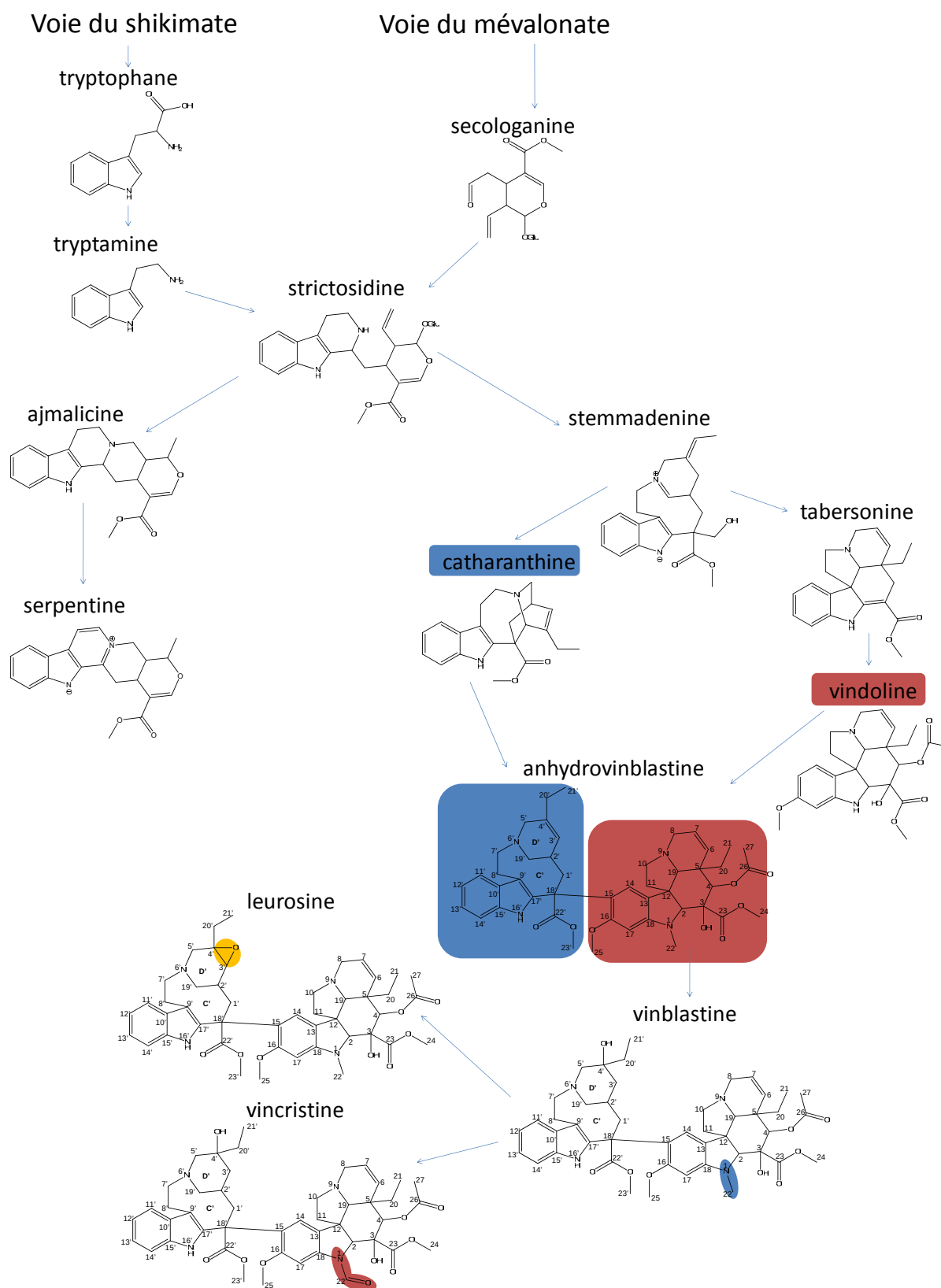


Figure 4 : représentation schématique de la biosynthèse et structures des principaux alcaloïdes indoliques de la Pervenche de Madagascar (avec numérotation IUPAC)^{43,43}

⁴³

(44) Tikhomiroff, C.; Jolicoeur, M. *journal of chromatography A* **2002**, 955, 87.

Ainsi, plus de 30 étapes sont nécessaires pour la synthèse des divers alcaloïdes d'intérêt (ajmalicine, serpentine, vinblastine, vincristine, vindoline et catharanthine). La **tryptamine** et la **secologanine** (issues respectivement de la voie de biosynthèse du shikimate et du mevalonate) sont condensées en **strictosidine** qui constitue la véritable plaque tournante de la biosynthèse de ces alcaloïdes. Cette espèce peut ensuite suivre deux voies biosynthétiques différentes et mener à l'**ajmalicine** puis à la **serpentine** d'une part, ou la **stemmadenine** d'autre part. Cette dernière est quand à elle métabolisée en **tabersonine** puis en **vindoline** ainsi qu'en **catharanthine**. C'est la condensation de ces deux dernières molécules qui permet de former l'**anhydrovinblastine** donnant par la suite accès à la **vinblastine**. De nombreux dérivés sont ensuite formés à partir de cette espèce dont la **leurosine** et la **vincristine**^{37,44}.

3. Pourquoi le criblage ?

a. Les besoins en santé publique et le développement de nouveaux médicaments

La recherche médicale doit faire face actuellement à de grands problèmes de santé publique, au nombre desquels se trouvent les pathologies cancéreuses. En effet, le cancer représente, en Europe, la deuxième cause de mortalité, juste derrière les maladies cardiovasculaires⁴⁴.

Il existe, du fait de la gravité des atteintes cancéreuses, toute une gamme de thérapeutiques dont la place de choix est réservée à la chimiothérapie⁴⁵.

Différentes classes d'agents chimiothérapeutiques, ou cytotoxiques, substances surtout actives sur les cellules en division intense comme le sont les cellules cancéreuses, sont disponibles.

Les agents thérapeutiques sur lesquels va porter notre étude appartiennent à la classe des **poisons du fuseau mitotique** qui constituent la base des protocoles chimiothérapeutiques actuels à côté des agents antimétabolites, alkylants et intercalants dont l'activité porte sur la structure de l'ADN cellulaire.

⁴⁴ (45) Boyle, P.; Ferlay, J. *ann. oncol.* **2005**, *16*, 481.

⁴⁵ (46) Hannun, Y. A. *blood* **1997**, *89*, 1945.

Le développement de nouveaux médicaments est une suite d'évènements très spécialisés qui répondent à certains critères validés par ailleurs⁴⁶, pouvant prendre de 9 à 12 ans⁴⁷. Nous allons à présent présenter brièvement ces différentes étapes.

Au fil des années le processus de développement de nouveaux médicaments est devenu de plus en plus complexe et la place des analyses de plus en plus importante. En effet, à présent, la prise de décision quand à l'arrêt ou la poursuite des études sur une molécule se fait à partir des informations obtenues par un nombre limité de tests ayant lieu tout au long des différentes étapes.

Ainsi le développement de nouveaux médicaments peut être divisé en quatre étapes que sont la découverte du médicament, le développement préclinique, le développement clinique et la phase de mise à l'échelle de la production⁴⁷.

Le but de cette étape est de générer une **nouvelle molécule candidate** pouvant devenir une tête de série ayant des propriétés pharmaceutiques compatibles avec une évaluation préclinique (efficacité, biodisponibilité et toxicité par exemple). La stratégie globale mise en jeu lors de la découverte de nouveaux médicaments est représentée dans la Figure 5 ci-après.

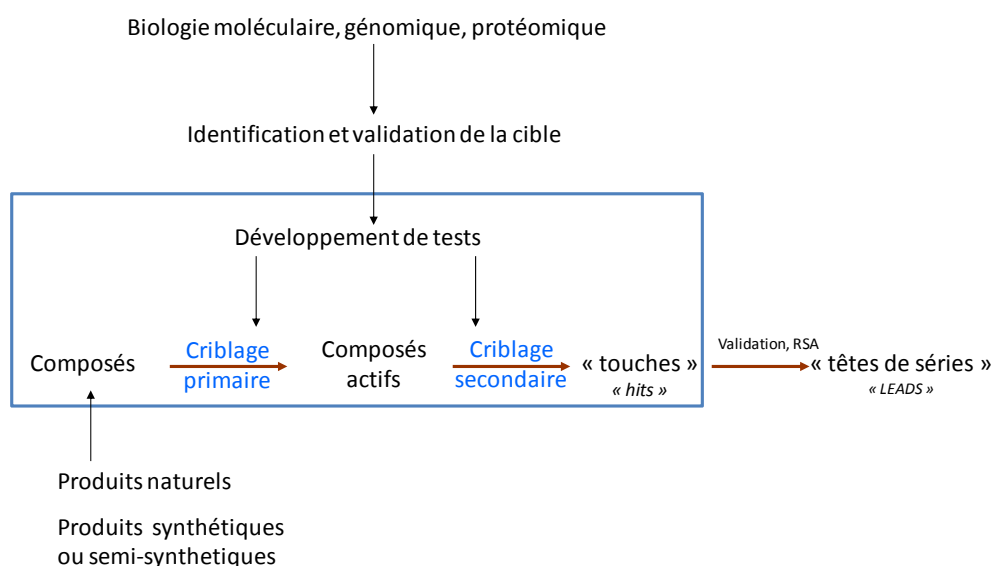


Figure 5 : stratégie de découverte de nouveaux médicaments

La découverte de nouveaux médicaments commence généralement par la recherche et l'identification d'une nouvelle **cible biologique**. Une fois la cible caractérisée et la réponse

⁴⁶ (47) Lee, M. S.; Kerns, E. H. *mass spectrometry reviews* **1999**, 18, 187.

⁴⁷ (48) Tammela, P. screening methods for the evaluation of biological activity in drug discovery, University of Helsinki, 2004.

thérapeutique évaluée, il convient de mettre en place des **tests de criblage** permettant de caractériser l'activité de molécules (de **banques moléculaires**) par rapport à cette cible (dans notre cas une liaison induisant une perte de fonction biologique). Une fois ces tests développés et validés, de nombreuses molécules sont évaluées, c'est ce que l'on appelle le criblage primaire. Ces molécules peuvent être aussi bien d'origine naturelle (dans un grand nombre de cas et majoritairement extraites des plantes) que synthétiques. Les composés montrant une activité sont appelés « touches » (« hits »). Leurs affinités pour la cible biologique, leurs activités, leurs toxicités et leurs biodisponibilités et métabolismes sont alors évalués lors d'un criblage secondaire. Ensuite les données obtenues sont validées et les relations structures-activités (RSA) étudiées et l'ensemble permettra de prendre la décision quand à la poursuite des investigations au stade préclinique⁴⁷.

Par l'essor et l'évolution des techniques d'analyses, le temps d'identification de nouveaux composés tête de série, fruit de la **rencontre d'une cible moléculaire et d'une banque de molécules** est passé de 15 mois en moyenne en 1996 à environ 6 mois actuellement^{48,49}.

b. Notion de cible moléculaire thérapeutique : la tubuline

La découverte de nouveaux médicaments s'appuie sur l'étude de l'activité de molécules, évaluées lors de campagnes de criblage. Dans ce manuscrit nous allons nous intéresser plus particulièrement au criblage visant à découvrir de nouveaux traitements contre le cancer, mais l'approche reste la même pour ce qui concerne d'autres champs thérapeutiques.

La recherche de médicaments contre le cancer a été décrétée comme une priorité par le congrès américain au milieu des années 1950. A cette époque le criblage se faisait *in vivo* en injectant les molécules à tester à des **modèles animaux** représentatifs de tumeurs humaines⁵⁰. Ces premières études, bien que laborieuses et coûteuses (en temps et en animaux) ont tout de même mené à quelques succès notamment dans le traitement des leucémies. Par contre aucun résultat n'a été obtenu dans le cadre du traitement des tumeurs solides. Cette conclusion a

⁴⁸ (49) Banerjee, P. K.; Rosofsky, M. *script magazine* **1997**, 35.

⁴⁹ (50) Vistoli, G.; Pedretti, A.; Testa, B. *Drug discovery today* **2008**, 13, 285.

⁵⁰ (51) Shoemaker, R. H.; Scudiero, D. A.; Melillo, G.; Currens, M. J.; Monks, A. P.; Rabow, A. A.; Covell, D. G.; Sausville, E. A. *current topics in medicinal chemistry* **2002**, 2, 229.

amené les scientifiques à développer des tests *in vitro*, basés sur des **lignées cellulaires** tumorales.

L'essor de certaines classes médicamenteuses agissant sur des cibles bien identifiées (certains antibiotiques et anti-inflammatoires) et aujourd'hui l'aboutissement de l'étude du génome humain tendent à favoriser une simplification des modèles de criblage, mettant à profit la notion de cible moléculaire thérapeutique. Le potentiel d'une telle approche, dite de « **criblage moléculaire ciblé** »⁵¹, est énorme sachant que sur les quelque 500 000 protéines différentes recensées récemment, seules 120 sont ciblées par les principes actifs actuels⁴⁸.

Une cible moléculaire thérapeutique peut être définie comme un « récepteur » sur lequel porte spécifiquement l'activité de certains médicaments. De manière simplifiée, cette cible thérapeutique peut être considérée comme une protéine reliée à une pathologie (en étant l'origine, l'expression ou l'intermédiaire)⁴⁸. Son identification repose sur des données génomiques et sa modulation est supposée produire un effet biologique. La validation repose sur la démonstration d'un effet pharmacologique fruit de l'interaction d'un médicament avec la cible et requiert l'usage de souches cellulaires modifiées surexprimant ou non la protéine en question⁴⁸. Ainsi la seule interaction d'une molécule avec cette cible permet d'obtenir de façon quasi assurée une activité biologique⁵¹.

La tendance actuelle est l'utilisation de cibles thérapeutiques propres aux cellules cancéreuses, permettant d'obtenir une sélectivité des traitements très intéressante⁵¹. Des succès récents dans ce cadre ont amené à la mise sur le marché de médicaments innovants sélectifs de certains types de tumeurs comme par exemple le Gleevec® (Imatinib mesilate) ciblant la kinase Bcr-Abl uniquement exprimée lors des leucémies myéloïdes chroniques ou encore l'Iressa® (Gefitinib) ciblant spécifiquement le récepteur au facteur de croissance épithelial EGFR⁵¹.

Cependant, un point limitant relativement l'essor de tests basés sur ces cibles thérapeutiques est le coût d'obtention de quantités suffisantes de ces dernières pour l'usage intense des protocoles y faisant appel. Là encore, une tendance à la miniaturisation des essais, avec recours à des microvolumes permet de limiter ce problème.

⁵¹ (52) Santoro, A.; Cavina, R.; Latteri, F.; Zucali, P. A.; Ginanni, V.; Campagnoli, E.; Ferrari, B.; Morengi, E.; Pedicini, V.; Roncalli, M.; Alloisio, M.; Ravasi, G.; Parra, H. J. S. *Annals of Oncology* **2004**, 15, 33–37.

Notre étude a porté sur une des cibles protéiques les plus importantes dans le cadre de la thérapie des cancers : la **tubuline**⁵². Cette protéine, son intérêt biologique et sa place thérapeutique vont être présentés plus avant dans ce document. La tubuline a été très étudiée et a amené de grands succès cliniques surtout grâce à la mise en place du « test à la tubuline » par l'équipe de Pierre Potier en 1968⁵³. Cependant, ce test présente des problèmes qui seront décrit plus avant dans ce manuscrit. C'est pourquoi nous avons choisi d'organiser notre recherche autour de ces deux cibles, avec l'objectif de pouvoir fournir, à terme, une alternative robuste.

Les microtubules sont les constituants majeurs du cytosquelette des cellules eucaryotes. Ils sont constitués d'hétérodimères de tubuline et de protéines associées (Microtubules Associated Proteins). La tubuline existe sous différentes sous unités de masses moléculaires de l'ordre de 50 kDa (surtout α et β , mais également γ , δ et ϵ), chacune étant déclinée sous différents isotypes de compositions légèrement différentes (au moins 6 différents pour les sous unités α et β). Tout cela conduit à en faire une famille de protéines très variée⁵⁴.

Quoiqu'il en soit, les études phylogéniques menées sur les sous unités majoritaires α et β , ont montré une très forte homologie des ces protéines au sein du règne des mammifères⁵⁵. Les résultats obtenus lors d'une étude utilisant de la tubuline bovine sont donc parfaitement transposables à l'homme.

La Figure 6 ci-dessous décrit l'arrangement de la tubuline au sein des cellules.

⁵² (53) Malpas, J. S.; Rohatiner, A. *advances in oncobiology* **1996**, 1, 317.
⁵³ (54) CNRS, C. d. p. d. Pierre Potier, médaille d'or du CNRS, 2005.
⁵⁴ (55) Dumontet, C.; Sikic, B. I. *J. Clin. Oncol.* **1999**, 17, 1061.

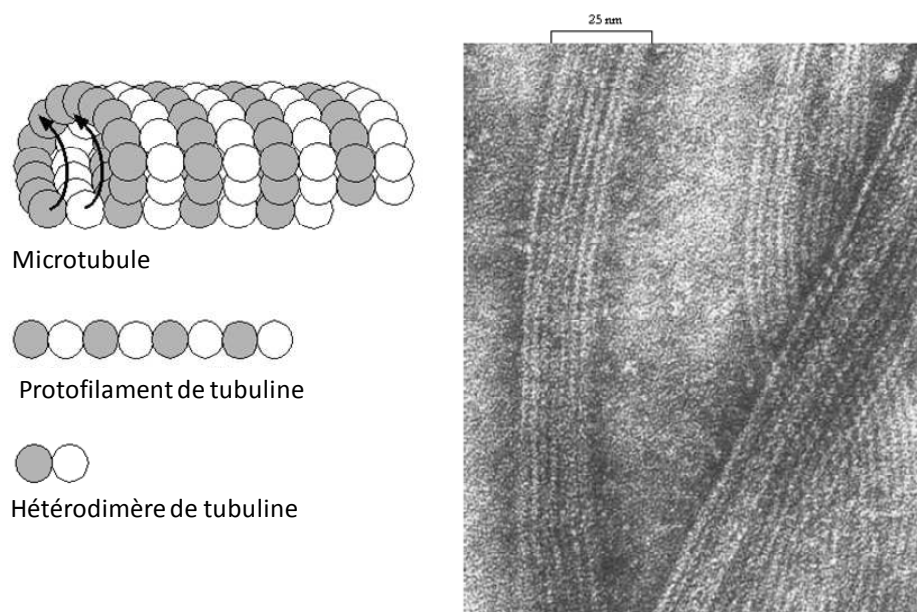


Figure 6 : Arrangement des sous unités de tubuline en microtubules au sein des cellules eucaryotes et image de microscopie électronique de microtubules⁵⁵

Comme le montre la Figure 6, les hétérodimères de tubuline α et β sont alignés en 13 protofilaments, arrangés parallèlement en un cylindre creux et rigide de 25 nm de diamètre⁵⁶. Les microtubules sont en équilibre dynamique avec une extrémité en croissance et l'autre en décroissance, et c'est la stabilisation de l'une ou l'autre de ces extrémités qui permet au microtubule de croître ou de décroître⁵⁵.

Ces structures jouent un rôle crucial dans la mitose cellulaire, mais elles participent également au transport intracellulaire des molécules et aux mobilités axonales et cellulaires (Figure 7)⁵⁵.

⁵⁵ (56) Vinh, J. étude et caractérisation structurale des modifications post-traductionnelles de la tubuline par spectrométrie de masse (Thèse présentée pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie- Paris 6), université Pierre et Marie Curie, 1999.

⁵⁶ (57) Jordan, M. A. *Curr. Med. Chem. - Anti-cancer agents* **2002**, 2, 1.

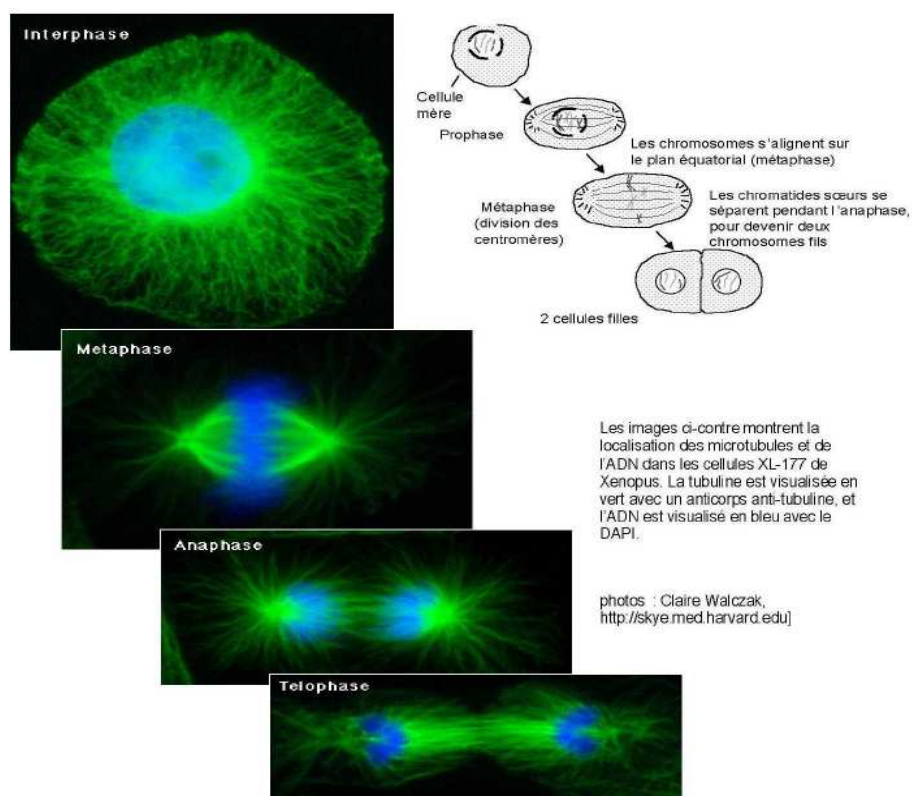


Figure 7 : La mitose et la tubuline constituant le fuseau mitotique (en vert)⁵⁶

Durant l'interphase, la tubuline est un des constituants majeur du cytosquelette et permet à la cellule d'avoir une certaine mobilité. Durant la mitose (métaphase, anaphase et télophase), par son organisation en fuseau mitotique, elle est responsable de la ségrégation des chromosomes en deux lots identiques répartis entre les cellules filles.

La tubuline utilisée au cours de cette étude provient de cerveaux de bovins. Sa pureté est de 90%. Cette tubuline a vocation à être utilisée pour les campagnes de criblage et est commercialisée par Cytoskeleton (Denver, Colorado) sous la référence cytoDINAMIX Screen 01. Elle est conditionnée et stockée sous forme lyophilisée. Cette tubuline n'est pas destinée à caractériser finement les isotypes présents mais plus à servir de cible pour découvrir des composés ayant une activité « antitubuline ». Comme nous l'avons vu précédemment, les résultats obtenus avec une tubuline d'origine bovine sont tout à fait transposables à l'homme du fait de la conservation d'une grande homologie dans tout le règne des mammifères pour cette protéine.

L'activité anticancéreuse des molécules de la classe des poisons du fuseau mitotique porte sur la tubuline. La molécule active, en s'attaquant à la tubuline, bloque le cycle mitotique et empêche ainsi la division cellulaire.

A l'heure actuelle, aucun traitement du cancer, notamment en chimiothérapie, n'est totalement satisfaisant du point de vue de sa tolérance et de ses effets secondaires. La découverte de produits à activité spécifique, telle que la liaison à la tubuline, est donc au centre du développement médical⁵⁷. De cela découle le besoin de pouvoir s'appuyer sur des techniques simples, rapides et fiables pour tester l'activité anti-tubuline de nombreuses molécules⁵⁸.

Le test utilisé actuellement pour la découverte et la caractérisation de molécules appartenant à la classe des poisons du fuseau mitotique est le « test de polymérisation de la tubuline ». Il a été mis au point en 1968 par l'équipe de Pierre Potier et prône l'utilisation de la tubuline pour évaluer l'activité antiméiotique potentielle de différentes drogues⁵⁹.

Pour cela, un cycle mitotique artificiel est recréé expérimentalement à l'intérieur d'une cuve de spectrophotométrie UV par l'introduction de tubuline, d'adjuvants à la polymérisation, et de la molécule à étudier. Il est alors possible de suivre la cinétique d'assemblage et de désassemblage de la tubuline en mesurant l'absorbance de la solution à 340 nm. En effet, lorsque la tubuline polymérise en microtubules à 37°C, l'absorbance du milieu augmente et lorsque les microtubules se dépolymérisent, à 0°C, l'absorbance du milieu diminue, comme le montre la **Figure 8**.

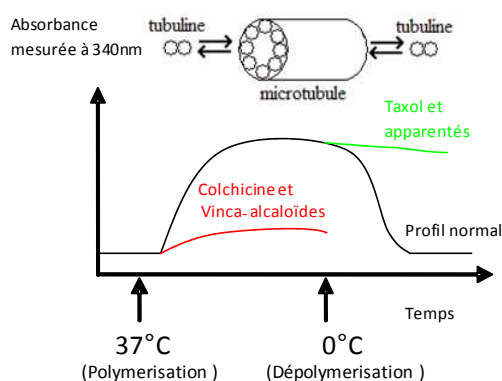


Figure 8 : Exemple de résultats du « test à la tubuline » en présence de deux types de molécules actives

Ainsi, dans le cas de poisons du fuseau mitotique inhibant la polymérisation de la tubuline (colchicine et vinca-alcaloïdes) il n'y aura pas d'augmentation de l'absorbance lors

⁵⁷ (58) Hu, W.; Dong, H.; Li, Y. Z.; Hu, X. T.; Han, G. J.; Qu, Y. B. *Acto Pharmacol Sin* **2004**, 25, 775.

⁵⁸ (59) Barron, D. M.; Chatterjee, S. K.; Ravindra, R.; Roof, R.; Baloglu, E.; Kingston, D. G. I.; Bane, S. *analytical biochemistry* **2003**, 315, 49.

⁵⁹ (60) Potier, P.

du passage à 37°C et à l'inverse, dans le cas des dérivés du taxol et apparentés, il n'y aura pas de décroissance de ce signal lors du passage à 0°C.

Cependant, ce test présente des écueils. En premier lieu, il ne peut pas être utilisé avec des produits absorbants dans le domaine de l'UV (entre 340 et 350nm), ou encore avec des mélanges complexes chargés en sels (tels que des extraits de plantes). En effet, les sels, et notamment le calcium, induisent une dépolymérisation des microtubules. Un autre problème est le changement de solubilité des produits lors du passage à 0°C qui peut induire la précipitation de certains composés à tester. De plus ce test souffre d'un manque de spécificité. Il a en effet été prouvé que certains composés, dont la liaison à la tubuline et l'activité antimitotique sont avérées, donnent des réponses négatives, voire paradoxales à ce test. C'est le cas par exemple de la Curacin A, lipide majoritaire de la membrane de *Lyngbya majuscula*, une cyanobactérie. Cet agent antimitotique puissant se lie à la tubuline au même site que la colchicine⁶⁰. Lorsque soumise au test à la tubuline cette molécule ne donne aucune réponse même à de très fortes concentrations (40 mM) et dans certains cas sa présence entraîne même une augmentation de l'absorbance par la formation d'édifices microtubulaires anormaux⁶¹.

Ainsi, de nombreuses substances de nature chimique très diverse se lient à la tubuline et/ou aux microtubules⁵⁷. Comme nous l'avons vu précédemment, leur liaison à leurs sites actifs protéiques modifie la conformation de la tubuline en altérant sa possibilité de polymérisation. Cela induit une rupture de l'équilibre dynamique des microtubules et un arrêt du cycle mitotique.

Parmi les agents liant la tubuline, le premier mis en évidence fut la **colchicine**, si bien que la tubuline fut d'abord appelée « protéine liée par la colchicine » (colchicine binding protein)⁵⁵. Cette molécule, dont la structure est donnée ci-après en **Figure 9**, est extraite du Colchique d'automne (*Colchicum autumnale*).

⁶⁰ (61) Verdier-Pinard, P.; Lai, J. Y.; Yoo, H. D.; Yu, J.; Marquez, B.; Nagle, D. G.; Nambu, M.; White, J. D.; Falk, J. R.; Gerwick, W. H.; Day, B. W.; Hamel, E. *molecular pharmacology* **1998**, 53, 53.

⁶¹ (62) Hamel, E.; Blokhin, A. V.; Nagle, D. G.; Yoo, H. D.; Gerwick, W. H. *drug development research* **1995**, 34, 110.

Colchicine ($C_{22}H_{25}NO_6$)
 MM = 399,16819 g.mol⁻¹

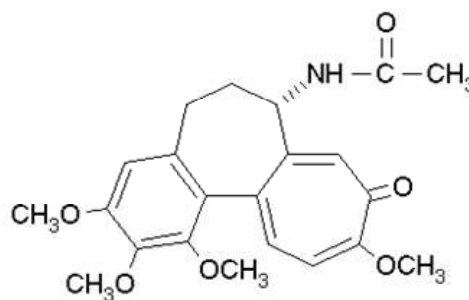


Figure 9 : structure de la colchicine

Comme le montre sa structure, la colchicine est une molécule avec peu de sites basiques, elle semble donc avoir une affinité protonique moyenne pouvant de ce fait nécessiter l'emploi de matrices de moyenne à faible affinité protonique en vue de son analyse optimale en MALDI-MS.

Elle n'est pas utilisée chez l'homme en chimiothérapie à l'heure actuelle du fait de sa forte toxicité se traduisant notamment dans le cas de surdosage par diarrhée, nausée, vomissements suivis de troubles neuromusculaires, rénaux et hématologiques. Cependant, des dérivés synthétiques de cette molécule sont en étude clinique⁵⁷. La colchicine trouve néanmoins une utilité en thérapeutique humaine dans le traitement des crises de goutte où son activité inhibitrice de la mobilisation des macrophages (par blocage de leur mobilité cellulaire) est mise à profit pour limiter l'inflammation. Quand à l'activité antimitotique de la colchicine, elle est utilisée *in vitro* comme sonde de la tubuline et pour l'étude des chromosomes⁵⁵.

La colchicine se lie à la tubuline soluble et aux microtubules au sein de sites à haute affinité par l'intermédiaire de liaisons non covalentes. Cette liaison relativement lente (un temps de contact de l'ordre d'une heure est nécessaire pour l'observer⁵⁵) sur un site à haute affinité des monomères de tubuline⁶², induit un changement conformationnel (de la structure spatiale) de la protéine, qui ne sera plus intégrée à l'extrémité en croissance des microtubules⁶³. Cela aura pour effet d'en favoriser la dépolymérisation par l'autre extrémité, et donc l'arrêt de la mitose⁶⁴.

La **vinblastine** et la **vincristine** sont les premiers poisons du fuseau mitotique utilisés en thérapeutique humaine. Ces molécules sont extraites de la Pervenche de Madagascar

⁶² (63) Banerjee, S.; Chakrabarti, G.; Bhattacharyya, B. *biochemistry* **1997**, 36, 5600.

⁶³ (64) Vandecandelaere, A.; Martin, S. R.; Engelborghs, Y. *Biochem. J.* **1997**, 323, 189.

⁶⁴ (65) Jordan, M. A.; Wilson, L. *nature reviews, cancer* **2004**, 4, 253.

(*Catharanthus roseus*). Les études cliniques organisées alors ont surtout mis en évidence un effet antimitotique important des extraits de cette plante⁶⁵. Les structures des molécules sont présentées en **Figure 10** ci après.

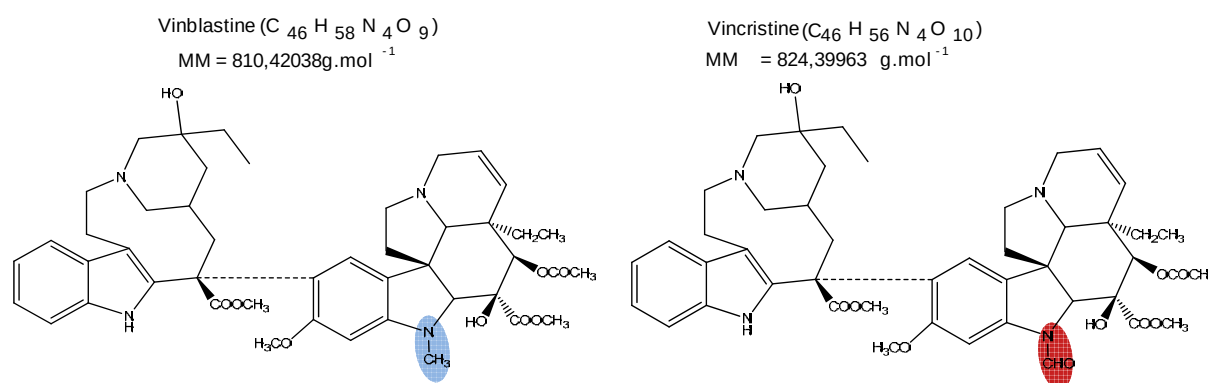


Figure 10 : structures de la vinblastine et de la vincristine

Leurs structures montrent de nombreux sites basiques. Ces molécules semblent donc avoir une forte affinité protonique, compatible avec l'utilisation d'une large gamme de matrice en vue de leur détection optimale en MALDI-MS.

La vincristine et la vinblastine sont des alcaloïdes naturels qui se fixent de manière très spécifique sur le même site (dénommé « vinca domain ») de la sous unité β de la tubuline⁶⁶. Les deux molécules peuvent donc entrer en compétition pour le même site de liaison. Leur liaison à la tubuline soluble et aux extrémités des microtubules par des interactions non covalentes, est rapide et indépendante de la température^{57,65}. Là encore, leur liaison induira un changement de conformation de la protéine, bloquant le processus de polymérisation.

Les différentes molécules liant la tubuline utilisées au cours de cette étude sont regroupées dans le Tableau 3 ci-après. Ce tableau présente les formules brutes, les masses moléculaires exactes et les rapport m/z théoriques des ions pseudomoléculaires $[M+H]^+$ correspondants.

Tableau 3 : Molécules liant la tubuline sur lesquelles a porté cette étude (avec présentation des formules brutes, des masses moléculaires et des m/z correspondants aux ions $[M+H]^+$ des différentes espèces)

Molécule	Formule brute	MM (g/mol)	$[M+H]^+$ théorique (Da)
Colchicine	$C_{22}H_{25}NO_6$	399,16819	400,17546
Vinblastine	$C_{46}H_{58}N_4O_9$	810,42038	811,42766
Vincristine	$C_{46}H_{56}N_4O_{10}$	824,39963	825,40692

⁶⁵ (43) Duflos, A.; Kruczynski, A.; Barret, J. M. *Curr. Med. Chem. - Anti-cancer agents* **2002**, 2, 55.
⁶⁶ (66) Rai, S. S.; Wolff, J. *the journal of biological chemistry* **1996**, 271, 14707.

La colchicine, la vinblastine, et la vincristine utilisées comme témoins positifs au cours de ces études ont une pureté de 99% (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

c. Notion de banques moléculaires

De nouveaux médicaments sont recherchés en testant un très grand nombre de composés répartis en banques moléculaires ou librairies. Il existe à l'heure actuelle deux sources majeures pour créer et enrichir les librairies : la **chimie combinatoire** et les **sources naturelles**. Le but visé lors de la création de ces banques de molécules est d'obtenir une diversité structurale très importante. L'usage de la chimie combinatoire et des techniques de synthèse automatisées actuelles permettent d'obtenir un très grand nombre de composés, en peu de temps⁴⁷. Cependant, de telles techniques ne permettent pas d'atteindre facilement la variété structurale nécessaire à la pertinence des recherches de nouveaux médicaments, et en réalité, le pouvoir de la chimie combinatoire est plutôt mis à profit lors de l'optimisation des médicaments (études de relations structure-activité par exemple)⁴⁸.

Au contraire, les sources naturelles offrent une très grande gamme de diversité structurale et bien que généralement considérées comme plus difficiles à utiliser, les banques moléculaires d'origines naturelles ont permis d'aboutir à de grand succès thérapeutiques^{48,51}. Les sources naturelles de molécules regroupent les plantes, les organismes marins et terrestres aussi bien que les cultures microbiennes et les champignons. Historiquement, la plus exploitée de ces sources est sans conteste le règne végétal et cette dernière continue d'offrir des opportunités majeures. En effet, à l'heure actuelle seuls 5% des espèces de plantes ont été étudiées chimiquement. Cependant, l'usage de sources naturelles de molécules présente d'importants challenges tels que la caractérisation des molécules extraites ainsi que le problème récurrent de « dédoublement » (dereplication), dans lequel une même molécule est testée plusieurs fois et parfois même considérée plusieurs fois comme une touche, car contenue dans plusieurs plantes^{47,48,51}. Ces différents problèmes sont actuellement nettement atténués par l'essor des techniques d'analyses telles que la spectrométrie de masse ou la résonance magnétique nucléaire couplées ou non à des techniques séparatives⁵¹.

Les plantes offrent un panel sans égal de molécules à tester et c'est donc naturellement que nous avons choisi d'y avoir recours. Au cours de nos études, les tests ont ainsi été

appliqués pour le criblage d'extraits de différentes plantes (*Colchicum autumnale* et *Catharanthus roseus*), lesquelles seront décrites en détail dans les chapitres 3 et 4.

d. Organisation des campagnes de criblage d'extraits de plantes

Comme nous l'avons vu précédemment, le criblage de plantes à la recherche de molécules actives est au centre des préoccupations de l'industrie pharmaceutique. Cependant, deux démarches parallèles existent⁶⁷, comme présentées dans la Figure 11.

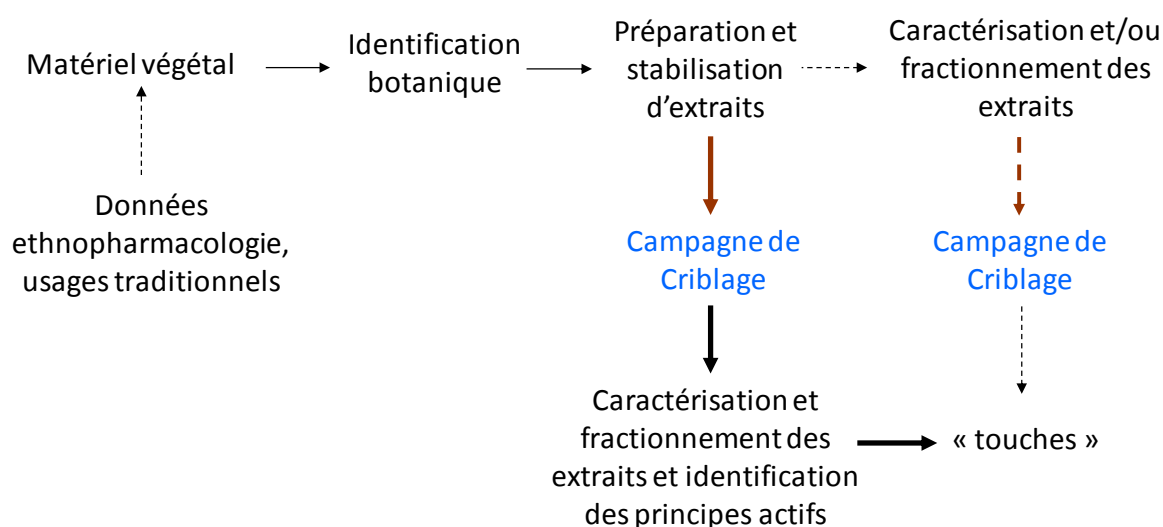


Figure 11 : Démarches parallèles de criblage d'extraits de plantes

Ainsi, le matériel végétal, qu'il soit sélectionné au hasard ou à l'aide de données issues de l'ethnopharmacologie ou d'usages traditionnels, est tout d'abord identifié et extrait à l'aide de différents solvants (notamment organiques). A partir de ces extraits, deux approches parallèles sont possibles. La première, et la plus répandue au sein de l'industrie pharmaceutique, consiste au criblage direct des extraits. Si l'extrait montre une activité, il est alors caractérisé et fractionné à la recherche de la touche, la molécule responsable de l'activité. La deuxième approche consiste à caractériser l'extrait et identifier les différentes molécules qu'il contient avant tout criblage. L'extrait de composition connue ou les différentes molécules ayant pu en être isolées sont alors criblés et les touches mises en évidence directement. Cette deuxième démarche est souvent laissée de côté au profit de

⁶⁷ (67) Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R. *Environmental Health Perspectives* **2001**, 109, 69.

l'autre, n'impliquant la caractérisation des molécules extraites que dans le cas où une activité est avérée. Cela va de paire avec une réduction des coûts et des temps d'analyse⁶⁷.

Une fois la démarche choisie, la campagne de criblage se déroule en au moins **deux étapes** comme le montre la Figure 5. La première vise à faire passer les molécules à tester sur un premier test dit de « **criblage primaire** » qui permet d'obtenir des informations qualitatives sur les composés testés. Dans le cas du criblage par rapport à une cible moléculaire, la première étape peut se résumer à discriminer les molécules testées entre celles interagissant et celles n'interagissant pas avec la cible. En d'autres termes cette première étape de criblage permet de déterminer si oui ou non une molécule interagit avec une cible moléculaire définie⁵¹.

Une fois cette première étape effectuée, les molécules montrant une activité sont ensuite soumises à un deuxième test de « **criblage secondaire** » visant à quantifier leur activité. En effet, une interaction avec une cible ne se traduit pas nécessairement par l'effet escompté et il convient de caractériser plus finement l'activité des composés issus du criblage primaire. Les molécules répondant aux critères désirés en termes d'activité sont appelés des touches⁵¹.

Ainsi, une stratégie globale de criblage passe par une étape de criblage primaire, « qualitative », suivie d'une étape de criblage secondaire « quantitative ». Il peut également convenir d'étudier la spécificité d'un effet en testant les touches sur d'autres cibles proches ou présentant une affinité croisée pouvant amener à des effets secondaires rédhibitoires⁵¹.

CONCLUSION

Ainsi, nous avons présenté l'intérêt d'utiliser des plantes dans le cadre du traitement des cancers et nous avons vu que le criblage et la mise en place de nouveaux tests pour la recherche de nouveaux médicaments est légitime du fait de la gravité des atteintes auxquelles la santé publique doit faire face. Nous nous sommes attachés à faire une description botanique précise du Colchique d'Automne et de la Pervenche de Madagascar ainsi qu'à établir une liste des produits ayant été référencés dans leurs différents extraits. Nous avons présenté la cible moléculaire sur laquelle va être basée notre étude, la tubuline, ainsi que les molécules étalon utilisées comme banque moléculaire. Nous avons décrit l'organisation des campagnes de criblage, notamment à partir d'extraits de plantes.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

INTRODUCTION

Dans ce deuxième chapitre nous présenterons la spectrométrie de masse et les analyseurs utilisés au cours de cette étude pour la mise au point des nos protocoles de criblage et la caractérisation des extraits de plantes.

Dans un deuxième point, nous allons nous attacher à décrire en détails la stratégie de criblage que nous avons mis en place. Ainsi, dans un premier point nous présenterons la démarche générale suivie pour mettre en place des tests de criblage. Nous nous intéresserons ensuite à l'organisation générale du test que nous avons développé pour le criblage de la liaison de composés à la tubuline. Nous présenterons ainsi chaque étape du protocole que nous avons mis en place : l'incubation des molécules à tester avec la cible, l'élimination des composés non liés et enfin l'analyse des composés liés aux cibles moléculaires.

1. La spectrométrie de masse

Nous avons décidé d'utiliser la spectrométrie de masse comme technique de détection dans le cadre de nos tests de criblage. La spectrométrie de masse est une technique d'analyse de pointe permettant de déterminer les analytes en fonction de leurs masses moléculaires. Le fonctionnement d'un spectromètre de masse repose sur l'action d'un champ électromagnétique sur une particule chargée. L'analyse par spectrométrie de masse nécessite par conséquent la formation initiale d'ions, en phase gazeuse, à partir de l'échantillon.

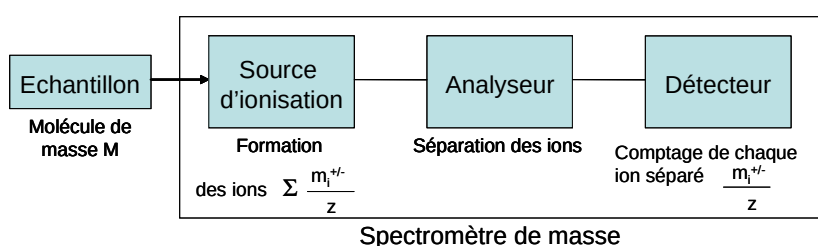


Figure 12 : Éléments constitutifs d'un spectromètre de masse

Lorsqu'un échantillon est introduit dans un spectromètre de masse (**Figure 12**), il est éventuellement vaporisé, avant d'être transformé en ions de masses distinctes. L'analyseur permet ensuite de trier cet ensemble d'ions, de mesurer leurs masses, de déterminer leurs abondances et, éventuellement, de les fragmenter pour produire d'autres ions de plus faible masse. Nous allons ainsi présenter dans un premier temps les grandeurs utilisées en spectrométrie de masse, puis nous nous intéresserons aux différentes étapes mises en jeu lors d'une telle analyse : le mode d'ionisation MALDI, l'analyse des ions formés (par TOFMS et FTICRMS) et l'éventuel couplage à des techniques séparatives (HPLC). A chaque étape nous nous attacherons à présenter les méthodes et les appareils utilisés au cours de nos travaux.

a. Grandeurs utilisées en spectrométrie de masse

Les deux caractéristiques essentielles d'un ion sont sa masse (m) et sa charge (z). Le spectre de masse est le relevé graphique des abondances des rapports m/z des différents ions.

- La **masse d'un ion** peut s'exprimer en masse exacte et en masse nominale. La masse exacte d'un ion s'exprime en unité de masse atomique, notée u ou uma , et dont la valeur ($1,66054 \cdot 10^{-27}$ kg) est par définition égale à $1/12$ de la masse de l'isotope ^{12}C du carbone. Cette unité est également dénommée dalton (symbole Da) bien que cette dénomination n'ait pas été adoptée par l'IUPAC. La masse nominale est égale à la somme des masses unitaires des atomes constituant la molécule ou l'ion.

- La **charge** s'exprimera toujours en fonction de la charge élémentaire e ($e = 1,6 \cdot 10^{-19}$ C) sous la forme $\text{charge} = z \cdot e$ où z est un nombre entier. Le tri des ions est effectué en fonction du rapport masse sur charge, $m/z \cdot e$, exprimé alors en thomson (Th).

b. Mode d'ionisation MALDI

Il existe un large éventail de méthodes qui permettent d'ioniser des échantillons. Le choix de la technique à utiliser dépend de la nature de l'échantillon (minéral, organique ou bio-organique), de leur état physique (gazeux, liquide ou solide). Selon l'information recherchée (ion moléculaire, pseudo-moléculaire, fragmentation plus ou moins intense), il

sera possible d'utiliser une méthode plus ou moins douce. Une des principales techniques d'ionisation utilisée dans le cadre de l'analyse de composés biologiques est la désorption/ionisation laser assistée par matrice (**MALDI**).

La technique MALDI (matrix assisted laser desorption/ionisation) va être décrite dans un premier temps, ainsi que les modes d'échantillonnages et les paramètres influençant la réponse obtenue. Dans un deuxième temps nous décrirons plus précisément les matrices et échantillonnages utilisés au cours de nos travaux.

La technique MALDI consiste en la co-cristallisation de la molécule à analyser avec une matrice constituée de petites molécules organiques. Ces dernières vont absorber l'énergie apportée par un impact laser et la retransmettre à l'échantillon sous forme de protons labiles, impliquant la formation d'adduits protonés chargés⁵⁶.

Cette technique repose sur le principe de la désorption/ionisation dont l'énergie est apportée par des photons émis par un laser (de longueur d'onde généralement dans l'UV de 180 à 450 nm). Ces photons viennent frapper l'échantillon sous forme condensée (un dépôt solidifié constitué de cristaux de matrice dans lesquels sont contenus les échantillons) et entraînent la vaporisation et l'ionisation de molécules présentes dans le dépôt. La matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie du faisceau laser incident. L'énergie transmise par le laser est absorbée par la matrice, et cet apport d'énergie provoque son expansion en phase gazeuse en entraînant les molécules d'échantillon. Ce phénomène ne mène à un processus d'ionisation que dans certaines conditions d'irradiance du laser incident, dites « **fenêtre MALDI** » comme le montre la **Figure 13** ci après.

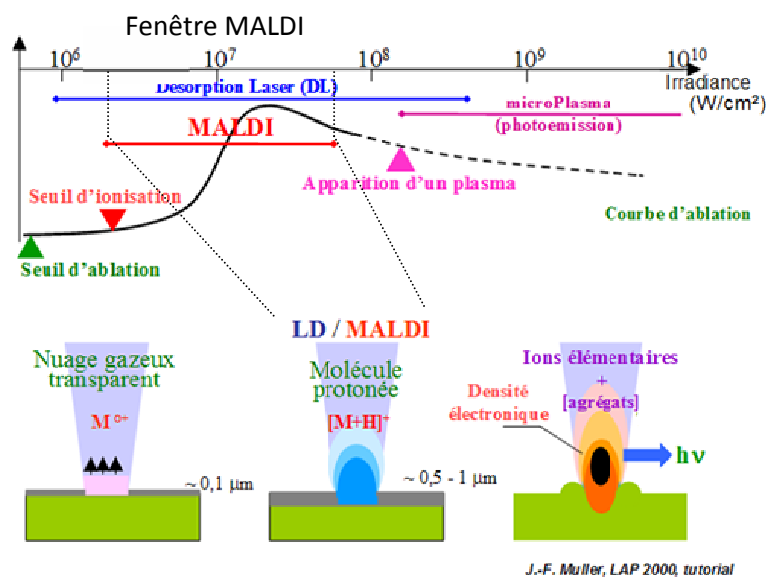


Figure 13 : illustration de la courbe d'ablation et de la "fenêtre MALDI" en fonction de l'énergie du laser incident

Lorsque l'on se place dans la gamme d'irradiance laser correspondante à la fenêtre MALDI, l'échantillon est ionisé majoritairement par transfert de protons, soit avant désorption dans la phase solide, soit par collision après désorption avec la matrice excitée ou avec d'autres molécules pour former des ions mono- ou plus rarement multichargés de type $[M+nH]^{n+}$. Les ions monochargés $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$ sont majoritaires dans la plupart des spectres MALDI. L'origine des protons a été étudiée : les protons labiles (des groupes carboxyliques ou hydroxyliques) de la matrice, du solvant, voire de l'échantillon lui-même, ainsi que les protons non labiles de la matrice semblent être impliqués⁶⁸.

Par ailleurs, la qualité du transfert de ces protons conditionne l'effet MALDI et si le transfert de proton est très énergétique (dans le cas d'une différence d'affinités protoniques importante entre l'échantillon et la matrice), la fixation d'un proton sur l'échantillon va lui apporter suffisamment d'énergie pour que des fragments soient observés. A l'inverse, si la différence d'affinités protoniques entre l'échantillon et la matrice est trop faible alors l'ionisation de l'analyte ne sera pas de bonne qualité. La différence d'affinité protonique entre l'analyte étudié et la matrice est donc un paramètre clé à considérer lors d'une analyse MALDI. Il convient donc de choisir la matrice adaptée à l'échantillon que l'on souhaite analyser. Les matrices les plus répandues dans le cadre de l'analyse de composés biologiques sont présentées ci-après.

⁶⁸ (68) Wong, C. K. L.; So, M. A.; Chan, T. W. D. *Eur. J. Mass Spectrom.* **1998**, 223.

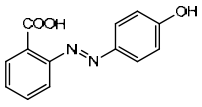
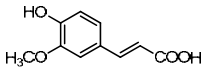
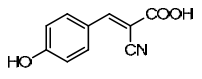
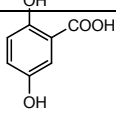
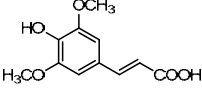
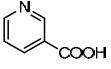
Pour être efficace, la matrice doit répondre à certains critères, notamment :

- Avoir une masse moléculaire faible afin que ses adduits ou/et ses fragmentations soient les plus faibles possibles.
- Favoriser la séparation et une distribution homogène des molécules de l'échantillon pour réduire les forces intermoléculaires entre celles-ci. En entourant les molécules de l'échantillon, la matrice préserve l'échantillon d'une dégradation photochimique d'une part lors des impulsions laser, tout en étant inerte chimiquement vis-à-vis du composé étudié et d'une dégradation thermique d'autre part grâce à des interactions spécifiques comme des liaisons hydrogènes.
- Être compatible avec un milieu de solvation identique à celui de l'échantillon, pour un bon transfert d'énergie et pour une cocrystallisation homogène et complète.
- Absorber préférentiellement la longueur d'onde du laser d'ionisation et ainsi limiter les phénomènes d'adduits. Elle constitue ainsi, un centre de transfert d'énergie entre le rayonnement laser et le composé analysé. Elle favorise ainsi l'ionisation en induisant notamment des transferts de protons de la matrice vers l'échantillon.
- Présenter une faible enthalpie de sublimation avec toutefois une vitesse d'ablation relativement importante, afin de créer un jet supersonique permettant la codésorption des molécules cibles.

À la vue de tous ces critères, il est évident qu'une matrice universelle n'est pas envisageable et parmi les nombreux composés possédant ses caractéristiques, seul un nombre restreint donne de bons résultats. Un exemple des matrices MALDI les plus utilisées est présenté en

Tableau 4 ci-après. Ce tableau regroupe les abréviations, noms, structures, affinités protoniques et applications majoritaires de différentes matrices.

Tableau 4 : matrices MALDI couramment utilisées⁵⁶

Abréviation	Nom(s)	Structure	Affinité protonique (Kcal.mol ⁻¹)	Longueur d'onde optimale	Applications
HABA	Acide 2-(4-hydroxyphenylazo)-benzoïque		183±2	337/355	Peptides, protéines, glycoprotéines, polymères synthétiques, glycolipides perméthylés
FA	Acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique, ou acide férulique		183±2	337	Protéines, peptides
α-CHCA	α-cyano-4-hydroxycinnamique		183±2	337	Peptides, protéines, lipides, oligonucléotides, PSD
2,5-DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque, ou acide gentisique		202,9	337	Peptides, protéines, lipides, glycoprotéines, oligosaccharides
SA	Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique, ou acide sinapinique		204±4	337	Peptides, protéines, glycoprotéines
NA	Acide 3-pyridinecarboxylique, ou acide nicotinique		215±4	266	Oligonucléotides, glycopeptides

Une fois le choix de la matrice préférentielle pour l'échantillon effectué, il convient d'arrêter un mode de dépôt. En effet, chacun des modes de dépôt entraîne une cristallisation différente et de ce fait une réponse MALDI différente. Les trois dépôts les plus fréquemment employés peuvent être résumés comme suit :

a) La **goutte sèche** (dried droplet) ou encore dépôt en **mélange intime** est la méthode la plus fréquemment employée. La matrice et l'échantillon sont mélangés le plus souvent à volume équivalent. Cependant, la matrice et l'échantillon doivent être préférentiellement solubles dans des solvants identiques, afin d'éviter la migration de l'échantillon lors du séchage, ce qui entraînerait l'hétérogénéité du dépôt. Une variante de ce mode de dépôt consiste à déposer dans un premier temps l'échantillon sur le porte-échantillon, puis à le reprendre par le même volume de la solution de matrice par quelques cycles d'aspiration/refoulement à l'aide d'une propipette.

b) La **couche mince** (thin layer) se fait en deux étapes. La matrice et l'échantillon sont déposés indépendamment au même endroit après cristallisation de la première couche. Deux variantes sont exploitées : soit l'échantillon est recouvert de la matrice après évaporation du solvant, soit l'échantillon est déposé sur la fine pellicule de matrice cristallisée. Le recours à ce mode de dépôt se fait dans le cas où les milieux de solvation de la matrice et de l'échantillon ne sont pas miscibles.

c) La méthode dite "**sandwich**" est une variante de la couche mince. En effet, une première couche de matrice est déposée, puis une goutte d'échantillon et enfin à nouveau d'une goutte de matrice. Chaque dépôt est effectué après la cristallisation de la couche précédente.

Ainsi, le choix du solvant de la matrice organique conditionne le mode de dépôt mais également la cristallisation de l'échantillon.

En dernier lieu, il faut également trouver le rapport de concentration le plus adéquat entre l'échantillon et la matrice. On parle alors de rapport analyte/matrice et celui-ci évolue de 1/100 à 1/10000 en règle générale.

Le mécanisme MALDI n'étant pas entièrement élucidé à l'heure actuelle, seule l'expérience permet de déterminer la matrice, le mode de dépôt et le rapport analyte/matrice optimal pour un échantillon donné.

Au cours de nos travaux, trois matrices ont été utilisées :

- Une solution d'**acide sinapinique** (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamique), abrégé SA dans la suite de ce manuscrit, à saturation (20 mg/mL) dans un mélange acétonitrile/eau (v/v), ajusté à 10% d'acide formique, à 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA). Cette matrice a une affinité protonique assez forte, elle offrira donc une ionisation assez douce, très utile lors de l'étude des protéines telles que la tubuline.
- Une solution d'**acide 2,5-dihydroxybenzoïque** (2,5-DHB), à 1M (154mg/mL) dans un mélange acétonitrile/eau (v/v), acide trifluoroacétique 0,1%. Cette matrice a une affinité protonique moyenne et permet la bonne ionisation d'une majorité de composés.

- Une solution d'**acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique** (HCCA, ou α -CHCA) à saturation (20mg/mL) dans un mélange acétonitrile/eau (v/v), acide trifluoroacétique 0,1%. Cette matrice a une affinité protonique très faible et permet un transfert très énergétique de protons. Elle permet de ce fait une ionisation efficace de nombreux composés, mais induit parfois la formation de fragments pouvant nuire à l'interprétation des spectres de masse.

Différents modes de dépôts ont été expérimentés au cours de ces manipulations, mais aucune différence significative n'a été relevée pour les composés analysés. La technique retenue a donc été la plus simple, celle de la **couche mince**. Dans un premier temps 1 μ L des solutions à analyser est déposé sur la plaque porte échantillon du spectromètre de masse à temps de vol ou à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier. Après séchage complet des gouttes, 1 μ L des solutions de matrices appropriées est déposé par-dessus en s'assurant d'une bonne redissolution de l'échantillon préalablement déposé.

Comme nous l'avons précisé précédemment, la technique MALDI est très efficace pour l'ionisation de nombreux composés mais présente le désavantage de donner des spectres assez complexes dans le domaine des basses masses. Ce phénomène est dû, d'une part, aux pics de la matrice organique. En effet, cette molécule, responsable de l'effet MALDI et de l'ionisation de l'échantillon par transfert de protons n'est pas « transparente ». Lors d'une analyse MALDI, de nombreux pics du spectre sont dus à la matrice et peuvent parfois gêner la détermination des espèces présentes. D'autre part, la présence de la matrice peut entraîner également une densification du spectre de masse par le fait que l'échantillon ne donne pas seulement un pic pseudomoléculaire à $[M+H]^+$ ou $[M+H]^-$ mais également des fragments (si l'ionisation n'est pas assez douce, comme dans le cas d'un écart d'affinité protonique important entre l'échantillon et la matrice) ou des adduits dans le cas de la présence de sels (l'échantillon pouvant alors donner des signaux à $[M+Na]^+$ ou $[M+K]^+$ par exemple). Un exemple de spectre MALDI obtenu pour une solution contenant un seul type de molécule (la vinblastine, abrégée vb, à $1.10^{-6}M$) est présenté en **Figure 14**.

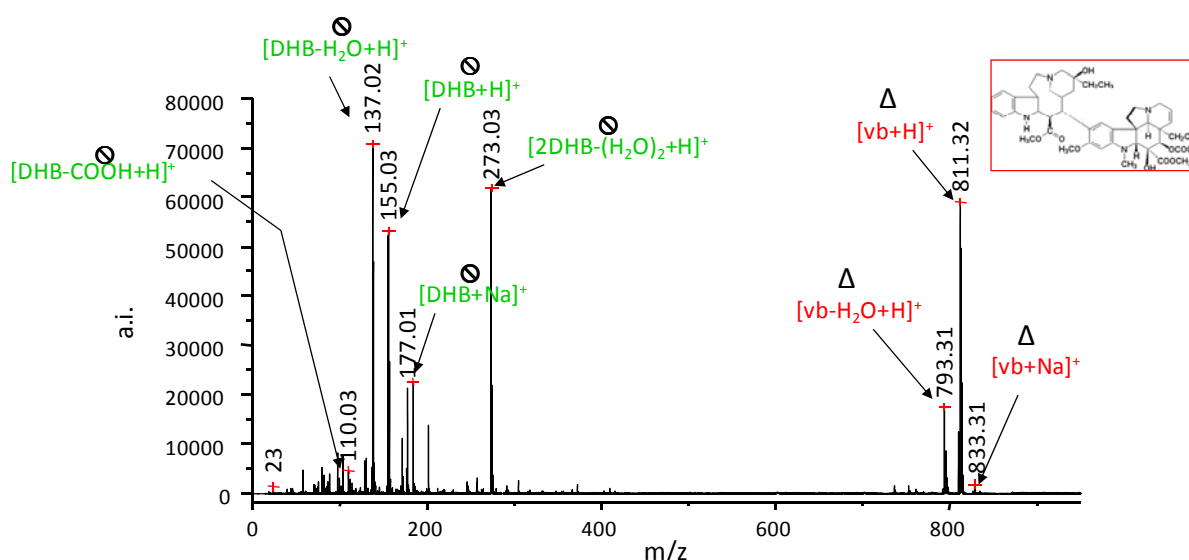


Figure 14 : exemple de spectre MALDI-TOFMS d'une solution de vinblastine (810,3 g/mol) à 1.10^{-6} M (matrice utilisée 2,5-DHB 1 M)

Comme le montre ce spectre, même l'étude d'une seule molécule peut donner lieu à un spectre MALDI assez complexe. Les espèces présentées en vert (⊗) sont relatives à la matrice utilisée (2,5-DHB) et les espèces en rouge (Δ) sont propres à la vinblastine. Même si ce spectre est dense, la résolution et la précision sur la mesure de masse pouvant être obtenues avec les spectromètres de masse utilisés au cours de cette étude (TOF ou FTICRMS) permettent dans la majorité des cas d'attribuer les pics obtenus.

c. Analyse des ions formés

Une fois les ions formés par l'un ou l'autre mode d'ionisation, il convient de les analyser, c'est-à-dire de les séparer en fonction de leurs rapports m/z . Cette opération est réalisée grâce à l'action d'un champ magnétique, ou électrique, ou d'une combinaison des deux, chacun de ces champs pouvant être fixe ou variable. Il existe de nombreux types d'analyseurs de performances (et de prix) très variables. La combinaison ou non de plusieurs analyseurs permet non seulement d'analyser les ions formés lors du processus initial d'ionisation mais également ceux qui proviennent de dissociations spontanées ou induites par collision d'espèces évoluant entre la source et le détecteur.

Il existe une grande variété d'analyseurs en spectrométrie de masse. Ils reposent tous sur l'utilisation soit d'un champ magnétique (secteurs magnétiques, résonance cyclotronique

des ions), soit un champ électrique (temps de vol, filtres de masse quadripolaires, pièges à ions) ou des combinaisons des deux. Différentes grandeurs sont utilisées pour caractériser leurs performances :

- La **résolution** :

Cette grandeur représente le pouvoir séparateur de l'analyseur, c'est-à-dire sa capacité à séparer deux rapports m/z voisins. Elle est définie par le rapport $R = m/\Delta m$, où Δm désigne la plus petite différence de masse pour laquelle il est encore possible de « séparer » le pic m du pic $m + \Delta m$ (**Figure 15**).

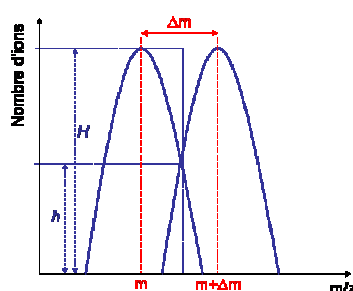


Figure 15 : Représentation graphique de la mesure de résolution à 50% de vallée

La valeur de $m/\Delta m$ dépend du degré de séparation de deux pics considérés comme résolus (% de vallée = h/H). La valeur communément admise est de 50% pour les analyseurs à temps de vol et les spectromètres à résonance cyclotronique des ions. Dans ce cas la détermination de la résolution se fait en mesurant la largeur (exprimée en thomson) à mi-hauteur.

Dans certains cas ($R < 10\,000$), la résolution d'un spectromètre de masse à temps de vol (TOFMS) est suffisante pour mesurer deux pics distincts. Dans les autres cas ($R > 60\,000$), seule la résolution d'un appareil à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FT-ICRMS), d'un spectromètre à secteurs, ou d'un Orbitrap permet l'identification formelle d'un composé à partir de son pic moléculaire.

- La **précision sur la mesure de la masse** :

Cette grandeur est le rapport $\Delta m_e/m$ où Δm_e est l'erreur sur la mesure de la masse de l'ion de masse m . Cette précision est exprimée en ppm. Si cette précision est suffisante (de l'ordre du ppm), il est possible d'atteindre une détermination quasi certaine de la composition élémentaire (formule brute) de l'ion considéré.

Une bonne précision peut être atteinte en calibrant avec soin les spectres de masse, c'est-à-dire, en attribuant des masses bien définies à certains pics des spectres. Ce sont les pics de matrice qui seront utilisés comme étalons internes pour calibrer les spectres de masses obtenus lors de nos recherches. Ainsi lors d'analyses avec le 2,5-DHB comme matrice, en mode de détection positif, les pics $[M+H]^+$ à $m/z = 155,03389$ Th, $[2M-2H_2O+H]^+$ à $m/z = 273,03936$ Th et $[2M-H_2+H]^+$ à $m/z = 307,04594$ Th seront utilisés. Lors d'analyses avec la matrice SA en mode de détection négatif, les pics utilisés comme calibrant interne sont $[M-H]^-$ à $m/z = 223,06$ Th, $[2M-H]^-$ à $m/z = 447,12967$ Th. Nous avons également eu recours pour certaines expériences à des calibrant externes, en utilisant les signaux de molécules étalon (vinblastine et colchicine notamment).

D'autres critères d'évaluation des performances d'un analyseur peuvent être cités comme la gamme de masse accessible, la précision sur la mesure des abondances isotopiques, la sensibilité, le domaine de linéarité dynamique, la vitesse de balayage d'une certaine gamme de masse. Ces diverses performances sont bien entendu différentes d'un analyseur à l'autre. Si elles peuvent guider le choix, il faut leur ajouter d'autres critères tels que la compatibilité avec le mode d'ionisation souhaité, la facilité d'utilisation, la convivialité du logiciel de pilotage, les dimensions ainsi que le prix d'achat et d'entretien et l'éventuel couplage à une ou plusieurs techniques séparatives.

Nous allons à présent décrire plus spécifiquement les deux types d'analyseurs que nous avons utilisés au cours de nos études : l'analyseur à temps de vol et l'analyseur à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier. Le principe de fonctionnement de chacun d'eux sera tout d'abord abordé puis nous présenterons les différents paramètres permettant d'en améliorer les performances et enfin nous détaillerons spécifiquement les appareils utilisés au cours de nos travaux.

d. Analyseur en temps de vol

Un spectromètre de masse de type TOF MS (time of flight mass spectrometer) est basé sur la mesure du temps de vol d'un ion sur une distance donnée, sous un vide poussé de 10^{-5} Pa. Cela implique quatre étapes successives : la formation des ions, leur accélération, leur séparation et leur détection.

Cet analyseur est celui qui a été le plus largement utilisé lors de nos recherches. C'est Dempster⁶⁹ (1918) qui, en premier, a introduit l'usage d'une différence de potentiel (V_0) à la sortie d'une source d'ions. Cette tension confère une énergie cinétique au faisceau d'ion. Les premiers spectromètres de masse à temps de vol, basés sur ce principe, ont été décrits dans les années 1950. Il a connu ces dernières années un essor considérable grâce d'une part à des améliorations électroniques notables, et à l'émergence de la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI). De ce fait, la spectrométrie de masse à temps de vol est devenue l'une des techniques les plus utilisées en analyses de composés bio-organiques. Cet appareil est très sensible, robuste et compatible avec de nombreux types d'échantillons. Il permet d'atteindre une résolution moyenne autour de 10 000. Son coût reste assez limité (autour de 200 000 €) ce qui en fait un spectromètre de masse de plus en plus répandu.

i. Principe

Des ions de masse m et de charge ze sont accélérés par une différence de potentiel V (de l'ordre de 10 kV). Elle peut être optimisée pour fournir plus ou moins d'énergie aux ions formés (lorsque la différence de potentiel augmente, l'énergie apportée aux ions augmente). Ils acquièrent une énergie cinétique donnée par :

$$\frac{1}{2}mv^2 = zeV$$

Ils possèdent alors une vitesse égale à :

$$v = \sqrt{\frac{2zeV}{m}}$$

À cette vitesse, le temps qu'ils mettront à parcourir une longueur L du tube de temps de vol sera donné par :

$$t = L\sqrt{\frac{m}{2zeV}} = K\sqrt{m/z}$$

⁶⁹ (69) Dempster, A. J. *Phys. Rev.* **1918**, 11, 316.

Ainsi, après accélération, les ions parcourent la zone libre de champ en un « temps de vol » proportionnel à leur rapport m/z .

Les ions les plus légers sont détectés les premiers, les ions plus lourds parviennent au détecteur après un temps de vol plus long. Un schéma de principe d'un spectromètre à temps de vol est présenté sur la **Figure 16**.

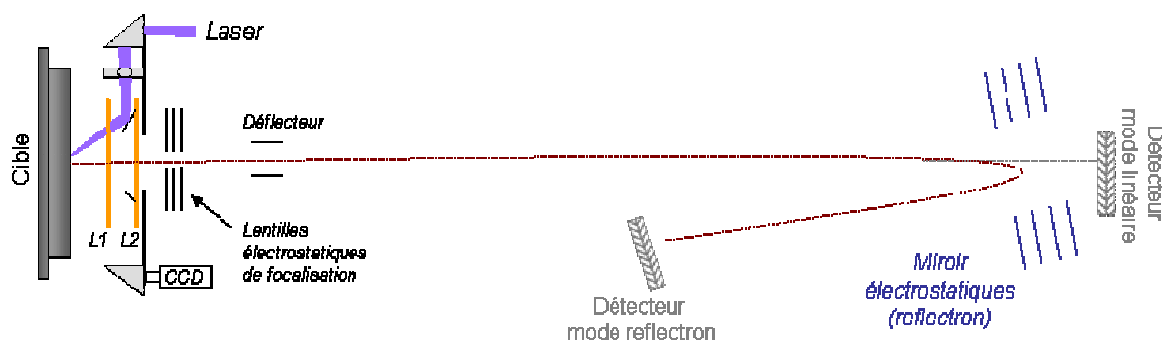


Figure 16 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse à temps de vol

Pour être séparés selon leur temps de vol, les ions doivent être introduits dans l'analyseur par paquets de faible largeur spatiale et temporelle. Cela peut être réalisé soit en créant les ions de façon continue et en pulsant leur injection vers le tube de vol, soit en utilisant des techniques d'ionisation pulsée.

Le pouvoir de résolution d'un TOFMS est théoriquement donné par :

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t}$$

Les ions de bas rapports masse sur charge (inférieurs à 2000 Th), pourront être refocalisés à l'aide d'un reflectron, ou miroir électrostatique, et renvoyés sur un second détecteur. Cette opération permet un gain important en résolution au détriment d'une légère perte de sensibilité.

ii. Analyseur en temps de vol utilisé au cours de ces travaux

Le spectromètre de masse à temps de vol couplé à la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOFMS) utilisé au cours de cette étude est un appareil Bruker

Reflex IV (Bruker-Daltonic, Brème, Allemagne) équipé avec une source SCOUT 384, utilisant un laser à azote pulsé (337 nm, modèle VSD-337ND, Laser Science Inc., Boston, MA) avec une énergie de sortie de 400 $\mu\text{J}/\text{pulse}$ et une irradianance de 2 à 5.10⁷ W.cm⁻². Ce spectromètre de masse est présenté en **Figure 17** ci-après.

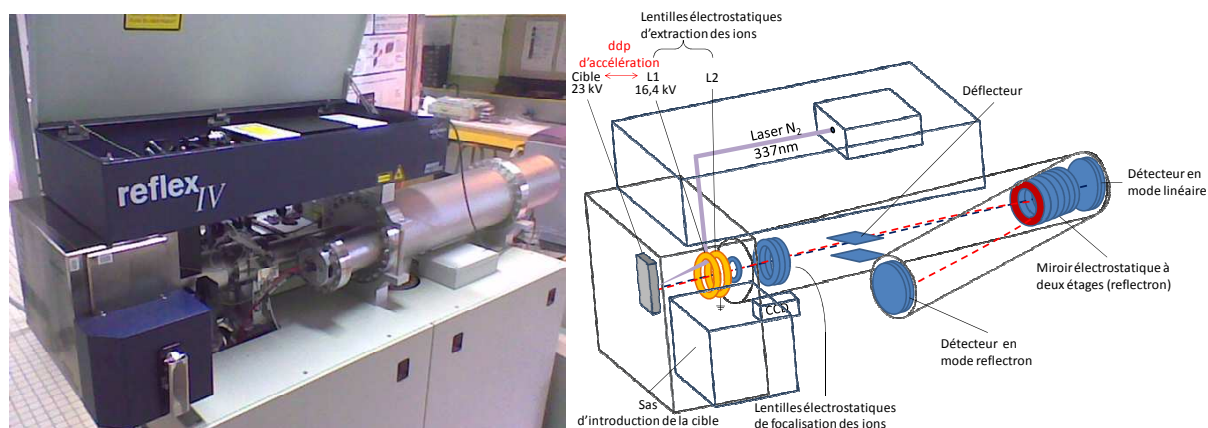


Figure 17 : schéma de l'analyseur TOFMS utilisé au cours de cette étude (Bruker Reflex IV)

Les analyses en hautes masses ont été faites en mode de détection linéaire alors que les analyses en basses masses (inférieures à 2000 Da) ont été faites en mode reflectron. Dans ce cas, les ions ont été accélérés sous des conditions d'extraction retardée (200ns) avec une tension de reflectron de $\pm 23\text{kV}$ (en mode de détection positif ou négatif).

Les signaux des détecteurs ont été amplifiés et transférés sur le programme Flex Control (3.0) (Bruker-Daltonics, Brème, Allemagne) d'une station de travail PC (Dell, Montpellier, France). Les spectres ont été retraités à l'aide du programme Flex Analysis (Bruker-Daltonics, Brème, Allemagne) et la résolution moyenne est de l'ordre de 8000 pour des masses autour de 900 Da.

Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur l'étude des ions pseudomoléculaires $[\text{M}+\text{H}]^+$ en mode positif et $[\text{M}-\text{H}]^-$ en mode négatif pour les différentes espèces analysées. En effet, ces ions sont formés durant une analyse MALDI et leurs intensités sont assez reproductibles d'une analyse à une autre. Les conditions laser optimales (en termes de diamètre et d'énergie) ont été déterminées et utilisées d'une analyse à une autre de manière à pouvoir comparer au mieux différents échantillons entre eux.

Tous les spectres de masse MALDI-TOFMS présentés dans ce manuscrit ont été obtenus par sommation des signaux correspondants à 4 séries de 100 tirs d'un laser à azote de longueur d'onde de 337 nm. En effet cela s'est avéré être une méthode permettant de réduire de manière considérable l'écart type entre les mesures sans pour autant prendre trop de temps d'analyse pour chaque échantillon. La **Figure 18** ci après présente l'écart type pondéré obtenu lors de l'analyse MALDI-TOFMS d'une solution de vinblastine (vb) à 1.10^{-6}M avec la matrice 2,5-DHB comme matrice. 10 acquisitions pour une série de 10, 20, 30, 40, 50 et 100 tirs laser ainsi que 10 acquisitions pour 4 séries de 10, 20, 30, 40, 50 et 100 tirs laser, ont été réalisées pour chaque point. L'écart type pondéré est calculé à chaque point en divisant l'écart type moyen sur les intensités absolues par l'intensité moyenne du pic $[\text{M}+\text{H}]^+$ de la vinblastine.

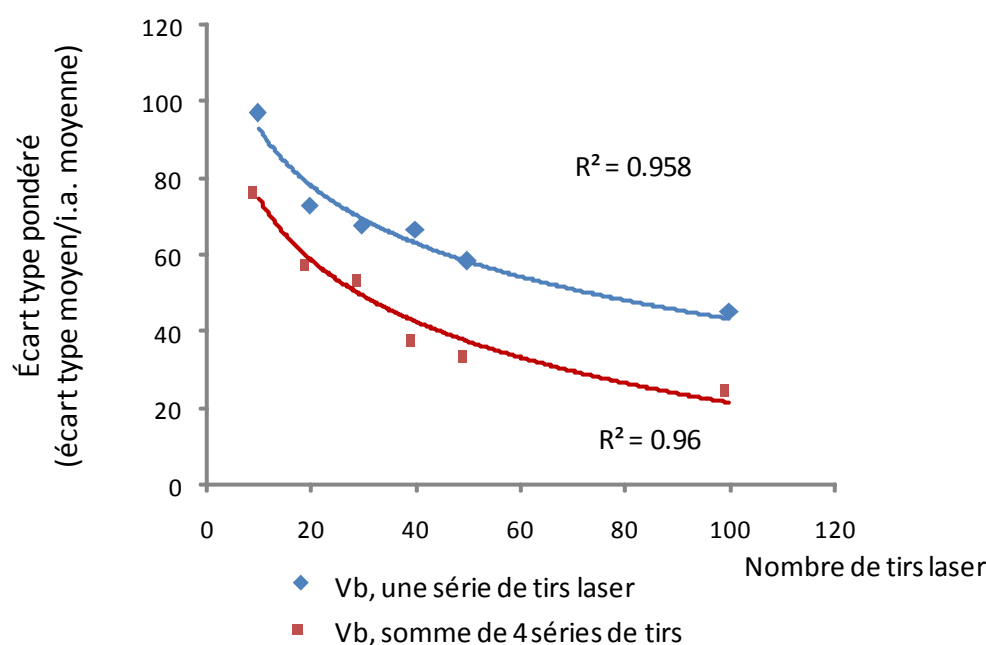


Figure 18 : étude de l'écart type sur l'intensité moyenne du pic à $[\text{M}+\text{H}]^+$ de la vinblastine (solution à 1.10^{-6}M) obtenu par MALDI-TOFMS (1 série et 4 séries de X tirs laser ($10 < X < 100$))

Comme le montre cette figure, l'écart type moyen sur l'intensité d'un pic peut être très important lors d'une étude en MALDI-TOFMS. En effet, dans le cas de la courbe bleue correspondant à une série de tirs lasers on peut voir que pour 10 acquisitions de 10 tirs lasers, l'écart type sur les mesures des intensités absolues du pic à $[\text{M}+\text{H}]^+$ de la vinblastine est proche des 100%. C'est-à-dire qu'aucune reproductibilité ne peut être trouvée entre deux acquisitions successives de la même solution. Cet écart type sur l'intensité absolue d'un pic peut être diminué jusqu'à environ 45% lorsque les acquisitions se font pour des séries de 100 tirs laser. Augmenter le nombre de tirs lasers permet donc de diminuer les différences entre

plusieurs acquisitions en MALDI-TOFMS d'une même solution. Cet écart type sur les mesures peut même être diminué à une valeur proche de 25% lorsqu'une somme de 4 séries de 100 tirs laser est effectuée. Ainsi, augmenter le nombre de séries pour une acquisition donnée permet de diminuer l'écart type sur la mesure de l'intensité absolue d'un pic. C'est pour cette raison que tous les spectres de masse MALDI-TOFMS utilisés au cours de cette étude sont acquis en faisant la somme de 4 séries de 100 tirs laser.

Le porte échantillon du spectromètre à temps de vol Bruker est une plaque en alliage métallique 384 « puits ». Chaque « puit » est en fait un emplacement correspondant à un dépôt de l'ordre de 1 à 2 μL de solvant aqueux. L'avantage de travailler en MALDI est que les solutions une fois déposées sont relativement stables et ne doivent pas forcément être analysées de manière extemporanée. Cette plaque est présentée en **Figure 19**.

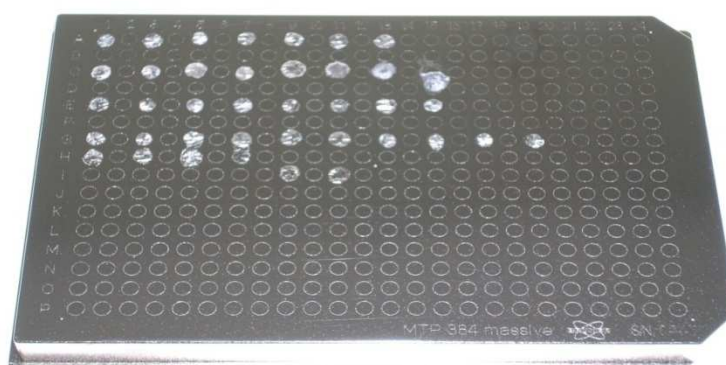


Figure 19 : porte échantillon du MALDI-TOFMS

Dans le cadre de la mise en place d'un protocole de criblage, une augmentation du débit d'analyse est possible en automatisant le dépôt et/ou l'analyse comme le permet le logiciel Flex Control (3.0) (Bruker Daltonics, Brème, Allemagne).

e. Analyseur à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier

Cet analyseur est légèrement moins sensible qu'un analyseur en temps de vol du fait qu'il implique un temps plus long entre l'ionisation des espèces et leur détection (la perte de sensibilité est d'environ un facteur 10 dans le cadre de nos études). Il permet cependant de détecter les ions avec une précision de mesure de masse très importante (souvent inférieure au

ppm) et une résolution très importante (bien supérieure à 100 000). Cet appareil permet également d'avoir accès à des expériences MSⁿ de qualité de par sa compatibilité avec de nombreux modes de fragmentation. L'ensemble de ces critères en font un appareil haute performance pour l'élucidation de structures de composés analysés. Cependant, le coût que représente un tel appareil est important, tant à l'achat (environ 1 000 000 €) qu'à l'entretien (remplissage régulier de l'azote et de l'hélium liquide de l'aimant supraconducteur).

Les ions sont formés soit par impact laser (MALDI) puis envoyés dans la cellule d'analyse (Figure 20).

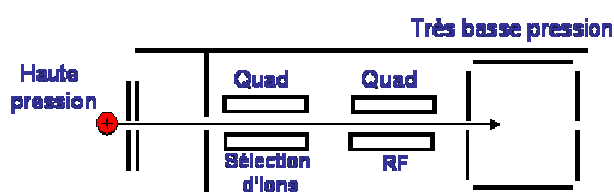


Figure 20 : Source externe du FT-ICRMS IonSpec Explorer, Champ magnétique de 9,4 Tesla

Dans ce cas, un dispositif de piégeage linéaire est interposé entre la source et la cellule d'analyse afin de stocker les ions avant leur injection ou de présélectionner une gamme de masses en vue d'une analyse MSMS. La cellule d'analyse, éloignée de la source d'ions, est ainsi maintenue efficacement à une pression suffisamment faible ($P = 2 \cdot 10^{-8}$ Pa) pour conserver un pouvoir de résolution très élevé.

i. Principe du spectromètre de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier

La détection des ions est ici basée sur la mesure de la fréquence de rotation des ions placés dans un champ magnétique intense. La **Figure 21** présente l'organisation de la cellule d'analyse de l'appareil FTICRMS utilisé au cours de ces travaux (Explorer FTMS, Varian)

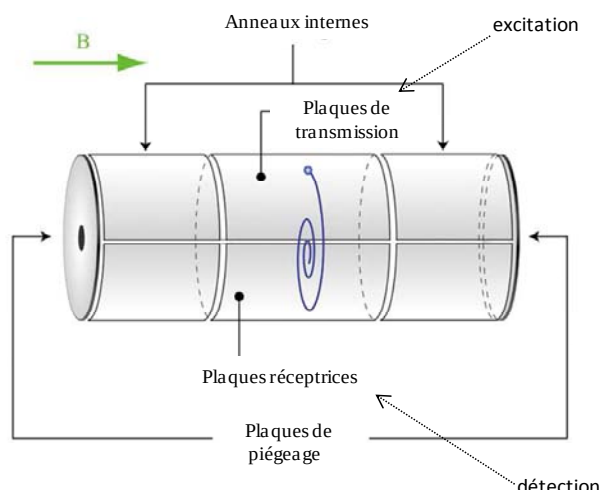


Figure 21 : schéma de la cellule d'analyse FTICRMS équipant notre spectromètre de masse (IonSpec-Varian)

Cette cellule est placée au centre d'un champ magnétique intense produit par un aimant supraconducteur. Chaque paire de plaques parallèles joue un rôle distinct : **piégeage**, **excitation** et **détection**.

- Piégeage

Les ions formés (par impact laser) sont piégés dans l'axe du champ magnétique (B_0) par deux plaques (à gauche et à droite de la **Figure 21**) portées à un potentiel généralement de +/- 15 volt dans notre cas.

Sous l'action du champ magnétique, chaque ion soumis à la force de Lorentz acquiert un mouvement cyclotronique de très faible rayon perpendiculaire à l'axe du champ B_0 , dont la fréquence de rotation (ω_c en hertz) est inversement proportionnelle à son rapport masse sur charge (m/z).

$$\nu_c = \frac{B_0 \cdot e}{2\pi} \times \frac{1}{m/z}$$

- Excitation

Chaque ion ainsi piégé se déplace selon sa propre fréquence cyclotronique. Pour détecter les ions, il faut que leur mouvement orbital devienne cohérent de manière à ce que des ions de même masse aient la même trajectoire. Ceci est réalisé grâce à un balayage très rapide à partir des plaques de transmission qui couvre toutes les fréquences cyclotroniques des ions (de quelques kHz à quelques MHz). Lorsque la fréquence appliquée est égale à la

fréquence cyclotronique (ω_c) d'un ion de masse donnée, celui-ci rentre alors en résonance. Son énergie cinétique augmente alors selon :

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 = m\omega_c^2.R^2$$

Cette augmentation d'énergie cinétique se traduit par une augmentation du rayon de giration R de l'ion. Il décrit alors une spirale d'Archimède.

Ce phénomène est d'autant plus important que le temps d'excitation est long. C'est ce phénomène de transfert d'énergie qui est appelé Résonance Cyclotronique Ionique (ICR).

Après une très courte durée d'excitation à la fréquence responsable de ce phénomène, tous les ions d'une même masse sont alors en phase et ont la même trajectoire : leur mouvement est devenu cohérent. Un signal peut alors être détecté.

- Détection

Les ions, animés d'un mouvement circulaire cohérent après excitation possèdent une trajectoire qui les amène au voisinage des plaques réceptrices, ce qui va induire un courant image. Les ions positifs, par exemple, approchant de façon alternative l'une de ces deux plaques, attirent les électrons, ce qui induit un courant alternatif appelé courant image transitoire dont la fréquence correspond à la fréquence cyclotronique de l'ion en question.

Dans la pratique, le courant alternatif détecté au travers d'un circuit RLC est converti en tension alternative $V(t)$ selon :

$$V(t) = \frac{N.q.R}{d.C} \cos(\omega_c t)$$

avec N = nombre d'ions de masse m détectés

q = charge des ions (C)

R = rayon de l'orbite circulaire des ions (m)

d = distance séparant les deux plaques de la capacité (m)

C = valeur de la capacité

ω_c = vitesse angulaire des ions (rad.s⁻¹)

t = temps de mesure (s)

Le mouvement cohérent de chaque paquet d'ions de même m/z induit un courant image détecté par les plaques réceptrices. Si la cellule ne contient que des ions de même m/z, le signal transitoire observé en fonction du temps f(t) est une sinusoïde amortie de fréquence ω_c . Dans le cas général d'un ensemble d'ions de rapports m/z différents, le signal f(t) correspond à la superposition des courants induits par chaque m/z. La transformée de Fourier de ce signal temporel fournit le spectre des fréquences cyclotroniques correspondantes. Ce dernier est ensuite converti en spectre de masse.

- Performances

La résolution d'un spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique est liée au champ magnétique (B_0) et à son rapport masse sur charge (m/z) selon :

$$R = m / \Delta m = K \cdot z e B_0 / 2m$$

où K est une constante d'amortissement du signal inversement proportionnelle à la pression et Δm la largeur du pic de masse à mi-hauteur.

En conséquence, un pouvoir de résolution important est obtenu avec un champ magnétique intense et avec une pression faible (en pratique 10^{-6} à 10^{-7} Pa). Le pouvoir de résolution diminue lorsque la masse augmente. La spectrométrie de masse à résonance cyclotronique ionique offre néanmoins les meilleures performances actuelles en matière de pouvoir résolutif ($R > 10^6$) et la précision sur la mesure de masse, due à la précision de la fréquence d'excitation appliquée est de l'ordre du ppm, voire beaucoup moins dans certains cas.

ii. Méthodes de fragmentation (MSMS ou MSⁿ)

Les appareils de type FTICRMS sont compatibles avec de nombreuses méthodes de fragmentation (MSⁿ) permettant d'atteindre des informations sur les structures des composés analysés. Une stratégie MSMS (MS²) classique consiste à isoler un ion dans la cellule FTMS et de lui apporter ensuite suffisamment d'énergie pour induire des fragmentations. Les masses

des fragments fourniront ainsi des indices sur les groupements fonctionnels présents sur la molécule de départ. Le mode de fragmentation que nous avons utilisé au cours de ces travaux est le SORI-CID (Sustained Off-Resonance Irradiation Collision-Induced Dissociation), dissociation induite par collision. Ce mode de fragmentation a un grand intérêt du fait de la faible énergie de fragmentation qui peut être appliquée aux ions préalablement sélectionnés au sein de la cellule ICR. Au cours de ce processus de fragmentation à faible énergie, une excitation de l'ion est conduite via l'application d'un champ électrique "off resonance" de fréquence de 500 à 2000Hz en dessous de la fréquence cyclotronique de l'ion⁷⁰. Cette condition "off resonance" entraîne une succession d'accélération et de décélérations (entre 500 et 2000 fois par seconde) des ions sélectionnés.

En présence d'un gaz inerte tel que le diazote, les ions peuvent être activés par des collisions de faible énergie. On parle alors de SORI-CID (collision induced dissociation).

L'énergie gagnée via ces multiples collisions aboutira à la fragmentation de l'espèce excitée et les ions fragments seront alors détectés.

iii. Analyseur à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FTICRMS) utilisé au cours de ces travaux

Le spectromètre de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier utilisé au cours de cette étude est un FTMS explorer 9,4T de IonSpec-Varian. Cet appareil est équipé d'un module ProMALDI (IonSpec, Lake Forest, Etats Unis d'Amérique) équipé d'un laser Nd :YAG Orion refroidi à l'air (New wave research, Fremont, Etats Unis d'Amérique), de longueur d'onde de 355nm avec une énergie de 4mJ/pulse. Un schéma de l'appareil est présenté en **Figure 22**.

⁷⁰ (70) Hofstadler, S. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **1994**, 5, 894.

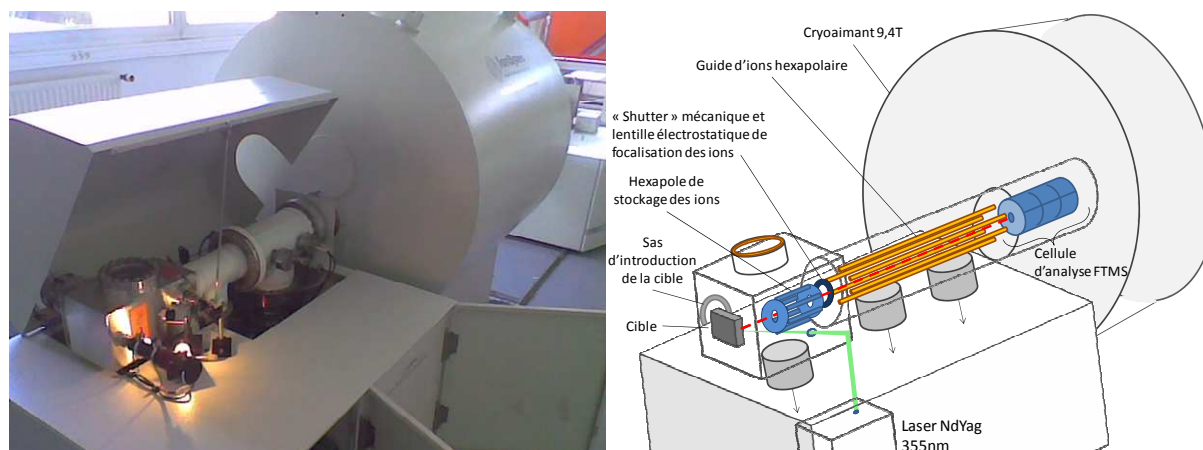


Figure 22 : schéma de l'analyseur FTICRMS utilisé au cours de cette étude (Explorer FTMS 9.4T, module ProMALDI)

Ce spectromètre présente l'intérêt de disposer d'un hexapole de stockage permettant de conserver les ions un certain temps avant de les envoyer dans la cellule d'analyse FTMS. Ceci est particulièrement avantageux lorsqu'une calibration « pseudo interne » est effectuée (les ions provenant du dépôt d'échantillon sont mélangés à ceux provenant d'un dépôt de calibrant avant d'être envoyés ensemble dans la cellule d'analyse). Un autre avantage de cet appareil est de disposer d'un shutter mécanique permettant d'isoler la zone d'analyse du reste de l'appareil. Ceci permet d'atteindre un vide très poussé dans la cellule et ainsi prolonger le temps de vie moyen des ions et d'augmenter la résolution des signaux.

Les échantillons sont déposés sur un porte échantillon ABI 4700 (Applied Biosystem, Foster City, USA). Les signaux du détecteur sont amplifiés, transférés et retraités sur le programme Omega (IonSpec, Lake Forest, USA). Tous les spectres présentés dans ce travail sont le résultat de 7 tirs laser à différents endroits du dépôt.

Par l'optimisation des différents paramètres propres à cet analyseur, la résolution moyenne des pics des analytes sur lesquels a porté notre travail se situe autour de 600 000 ($\Delta m/m$) avec une précision de mesure en masse de l'ordre du ppm.

2. Le criblage moléculaire par spectrométrie de masse

a. Mise en place des tests de criblage

Il existe de nombreuses approches dans le cadre des tests de criblage, et le but de ce manuscrit n'est pas d'en faire une liste exhaustive. Nous nous intéresserons spécifiquement aux tests de « **criblage moléculaire ciblé** ». Ces derniers peuvent être divisés en deux catégories, selon qu'ils requièrent ou non l'usage de cellules entières⁵¹. Les deux types de tests présentent des forces et des faiblesses et sont utilisés à part égale lors des campagnes de criblages^{48,51}

Les **tests impliquant des cellules entières** présentent la cible thérapeutique dans un contexte représentatif de la réalité. Cela permet d'obtenir des informations relatives au passage membranaire, à la cytotoxicité et/ou aux interactions non spécifiques des molécules testées⁵¹ et donnent ainsi des informations plus en rapport avec l'activité biologique des composés testés⁴⁸. Cependant, ce type de tests nécessite d'avoir recours à des souches cellulaires, difficiles d'emploi⁷¹ et devant souvent être génétiquement modifiées pour exprimer de manière importante la cible protéique et/ou des protéines associées créant une cascade réactionnelle en réponse à la liaison d'un composé à la cible (dans le cas des récepteurs couplés aux protéines G par exemple). Ces tests sont donc assez coûteux, car ils nécessitent un équipement permettant de mener à bien des cultures cellulaires⁴⁸, et ne sont pas compatibles avec un haut débit de criblage (peu de molécules analysées en un temps donné). De plus, quand une « touche » est obtenue avec ce type de tests, il convient de la caractériser par d'autres techniques pour préciser plus finement son mode d'action⁵¹.

Nous avons choisi de développer des **tests n'ayant pas recours à des cellules entières**. En effet, ce type de test est plus particulièrement compatible avec une détection par spectrométrie de masse^{47,72}. De plus, ils sont beaucoup plus simples à mener à bien, donnent des résultats très précis et sont compatibles avec une automatisation importante et un haut débit de criblage⁵¹. La cible moléculaire est dans ce cas utilisée en absence de tout autre élément pouvant interférer et les résultats obtenus sont non ambigus quand à l'activité des molécules testées. Cependant, certains de ces tests nécessitent l'usage de tampons et de milieux réactionnels (notamment dans le cadre du suivi de réactions enzymatiques) qui peuvent influencer de manière très importante la réponse. De plus ces tests nécessitent de

⁷¹ (71) Horiatis, D.; Wang, Q.; Pinski, J. *cancer letters* **2004**, 210, 119.

⁷² (72) Enjalbal, C.; Martinez, J.; Aubagnac, J. L. *mass spectrometry reviews* **2000**, 19, 139.

disposer en quantités suffisantes des cibles moléculaires ou cibles thérapeutiques. Il convient alors de les acheter avec un coût retentissant sur le coût du test, ou de les extraire et de les purifier à façon, ce qui nécessite un savoir faire et un équipement conséquents.

Une fois le type de test à développer arrêté, il convient de suivre une démarche étape par étape pour sa mise en place (Figure 23).

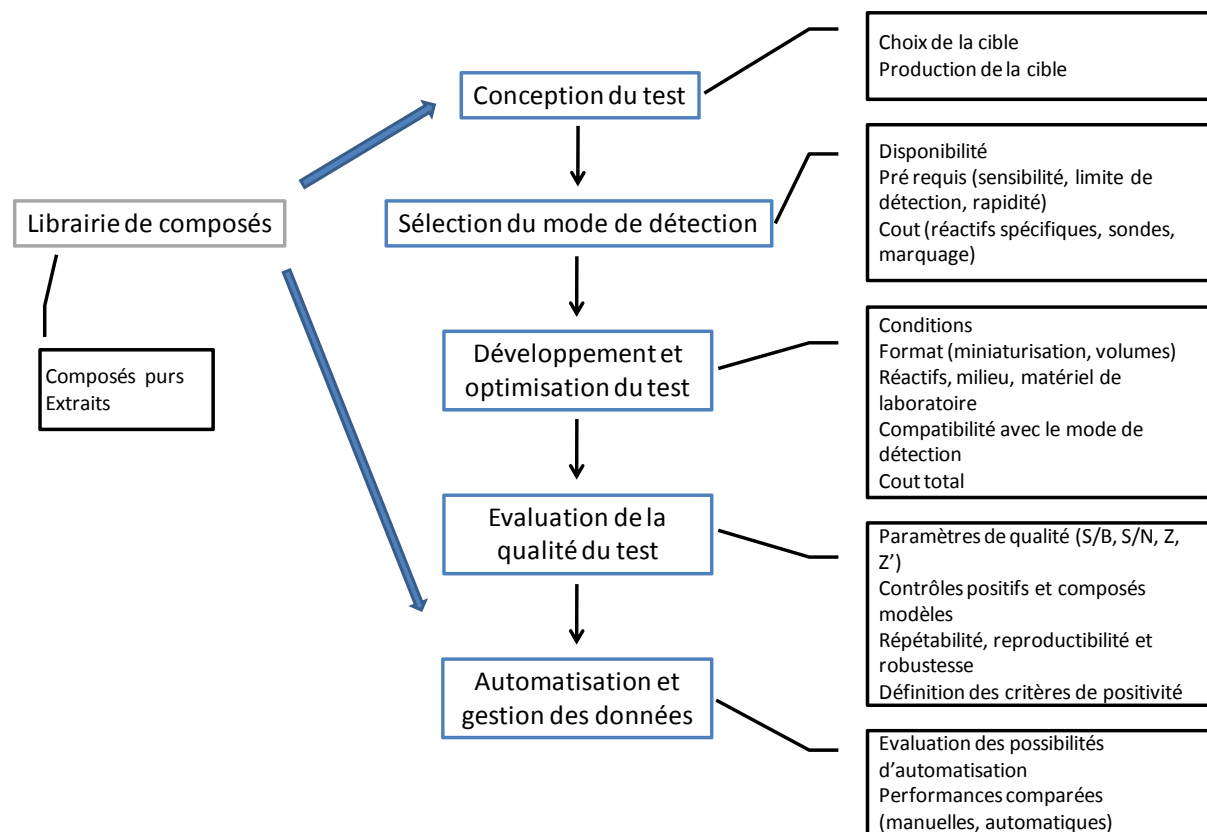


Figure 23 : Schéma des facteurs impliqués dans le développement de tests de criblages moléculaires ciblés⁴⁸

La **première étape** du développement du test consiste en sa conception, en ce sens qu'il convient à ce niveau de choisir la cible moléculaire sur laquelle portera le criblage. Cette étape doit aussi regrouper l'étude de l'approvisionnement en cible et en composés à tester, ainsi qu'une définition des molécules standards utilisées pures comme témoins positifs et négatifs. Comme nous l'avons précisé précédemment, nous avons décidé de faire porter notre étude sur la **tubuline**. Nous avons utilisé la vinblastine, la vincristine, la leurosine et la colchicine comme témoins positifs pour le test impliquant la tubuline. Certaines de ces molécules sont d'ailleurs extraites des plantes. Le témoin négatif utilisé a été l'amiodarone, molécule antiarythmique dénuée de toute activité anticancéreuse. Ces molécules seront décrites plus avant dans ce manuscrit (voir chapitre 3).

La **deuxième étape** consiste à sélectionner le mode de détection approprié au test de criblage. Les critères influant sur ce choix sont la disponibilité des appareils au sein de l'unité mettant en place le test mais également les critères économiques, tels que la nécessité, pour mener à bien la détection par certaines techniques, de faire des analogues marqués (radioactifs ou fluorescents) des molécules à tester. Notre choix s'est donc porté sur la détection directe des composés liés aux cibles moléculaires protéiques (tubuline) par spectrométrie de masse à temps de vol couplée à la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOFMS). En effet, cette technique était disponible au sein du laboratoire et permet une ionisation efficace de nombreux composés biologiques. Elle est très répandue au sein des unités de recherche pharmaceutiques et ne nécessite pas de faire appel à des analogues marqués. Elle a de plus un coût de revient par analyse modeste (peu de consommation de solvants, coût de l'analyseur « limité »).

La **troisième étape** est le développement du test proprement dit, avec le choix des conditions et du format de l'analyse, l'étude du matériel et des protocoles les plus appropriés pour obtenir le résultat souhaité et assurer la compatibilité de l'échantillon final avec le mode de détection choisi. Une fois les différents paramètres choisis, une évaluation précise du coût est effectuée et généralement exprimée en coût par molécule testée. Dans le cadre de notre étude, le développement des tests sera présenté en chapitre 2.

Une fois le test mis en place, il convient, lors de la **quatrième étape**, de le valider et de déterminer la qualité des informations qu'il permet d'atteindre. L'étude de composés modèles (contrôles positifs et négatifs) est suivie d'une évaluation de la répétabilité, de la reproductibilité et de la robustesse du test. Cette étape nécessite aussi de déterminer les critères objectifs qui permettront d'en affirmer la positivité, en donnant confiance dans les résultats obtenus pour faciliter la prise de décision sur les molécules testées. Cette étape implique aussi le calcul de certains paramètres de qualité permettant d'évaluer la valeur du test et de le comparer à d'autres, de manière objective⁴⁸. Les différents paramètres de qualité sont regroupés dans la Figure 24 ci-dessous, avec X_S et SD_S représentant la valeur moyenne et d'écart type du signal obtenu pour le contrôle positif donnant le signal le plus intense et X_B et SD_B représentant la valeur moyenne et l'écart type du signal obtenu pour un contrôle négatif (le signal correspondant au bruit de fond de la technique de détection choisie).

$$\begin{aligned}
 (1) \quad S/B &= \frac{X_S}{X_B} \\
 (2) \quad S/N &= \frac{(X_S - X_B)}{\sqrt{SD_S^2 + SD_B^2}} \\
 (3) \quad Z' &= 1 - \left[\frac{(3 \times SD_S + 3 \times SD_B)}{|X_S - X_B|} \right]
 \end{aligned}$$

Figure 24 : équations permettant le calcul des différents paramètres de qualité

L'équation (1) représente le rapport signal sur bruit de fond (background) et mesure simplement la différence d'intensités de signal pouvant être obtenue entre un échantillon positif et un échantillon négatif. L'équation (2) représente elle le rapport signal sur bruit (noise) qui prend lui en compte les variations des intensités des signaux. Plus les valeurs de ces rapports sont élevées et meilleure est la discrimination entre une molécule ayant une activité et une molécule en étant dénuée. La troisième équation (3), transcrit quand à elle le mode de calcul du **facteur Z**, qui est **considéré comme un indicateur global de la qualité d'un test et reflète plus précisément les gammes dynamiques des signaux et les variations associées à leurs mesures**. Ce facteur Z caractérise la capacité du test à mener à l'identification de touches (hits) dans les conditions déterminées préalablement. Ce facteur étant sans dimension, il permet ainsi de comparer des tests entre eux et d'en optimiser les différents paramètres. En effet, plus la valeur de Z est grande et plus la qualité des informations obtenues est grande. Les tests de criblages peuvent ainsi être catégorisés en fonction de leurs facteurs Z respectifs comme le montre le Tableau 5 ci-après.

Tableau 5 : catégorisation des tests de criblage en termes de qualité évaluée par le facteur Z

Valeur de Z	Caractéristique du test	Capacité de criblage
1	Ecart type = 0, ou gamme dynamique infinie (pas de limite haute d'intensité et bruit de fond nul)	Test idéal
1 > Z ≥ 0,5	Pouvoir discriminant fort	Test excellent
0,5 > Z > 0	Pouvoir discriminant faible	Utilisation de répétitions recommandée
0	Pas de pouvoir discriminant, les valeurs avec écarts types des contrôles positifs et négatifs se touchent	Test de type « oui/non », ne permettant pas une prise de décision aisée
< 0	Pas de pouvoir discriminant, les valeurs avec écarts types des contrôles positifs et négatifs se recouvrent	Criblage impossible

La valeur de Z est une valeur théorique obtenue pour un échantillon positif permettant d'atteindre la réponse maximale du détecteur utilisé. Dans certains cas cependant, cette valeur

est difficile à évaluer et on lui préférera alors une valeur de Z' , calculée à partir des données recueillies pour un échantillon donnant une réponse positive.

De plus outre les critères de qualité de l'information pouvant être obtenue sur des composés lors de leur criblage, un test se doit d'être robuste, rapide, précis, sensible et reproductible et ne doit pas être trop coûteux⁴⁸. Les données relatives à cette quatrième étape obtenues pour les tests que nous avons développés seront présentées plus avant dans ce chapitre.

Une fois le test validé, la **cinquième étape** porte sur l'étude de l'automatisation du test et de la gestion des données qu'il fournit. En effet, il est intéressant dans le cadre d'une campagne de criblage, de pouvoir automatiser tout ou partie du test de manière à ne pas mobiliser un équipe entière lors de l'étude de plusieurs centaines de composés. De même, le système mis au point doit permettre de retrouver facilement les données relatives à un échantillon donné. La spectrométrie de masse actuelle permet une automatisation des analyses et une numérisation des données obtenues en vue d'une analyse future des résultats. Ces points ne sont donc pas rédhibitoires dans le cadre de notre démarche.

b. Organisation générale de nos tests de criblage par MALDI-TOFMS

La mise au point d'une nouvelle méthodologie ayant pour but d'étudier la liaison de molécules à une cible moléculaire protéique va être présentée. La particularité de notre travail est de détecter les produits liés sur les cibles moléculaires par spectrométrie de masse couplée à la désorption/ionisation laser assistée par matrice.

La technique MALDI ne permettant pas une détection aisée des complexes non-covalents, il a fallu s'assurer d'éliminer les composés non liés à la cible de manière à ne pouvoir détecter que les molécules liées. Nous avons ainsi été amenés à mettre en place un échantillonnage préliminaire à l'analyse par spectrométrie de masse.

Cet échantillonnage regroupe les étapes générales des tests de criblages de cibles moléculaires que sont : une étape d'incubation des composés avec la cible moléculaire choisie (en conditions non dénaturantes), une étape d'élimination des composés non liés à la cible et enfin l'étape de détection des composés liés par désorption/ionisation laser assistée par matrice couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (MALDI-TOFMS). Les trois étapes principales du protocole sont schématisées ci-dessous (Figure 25) :

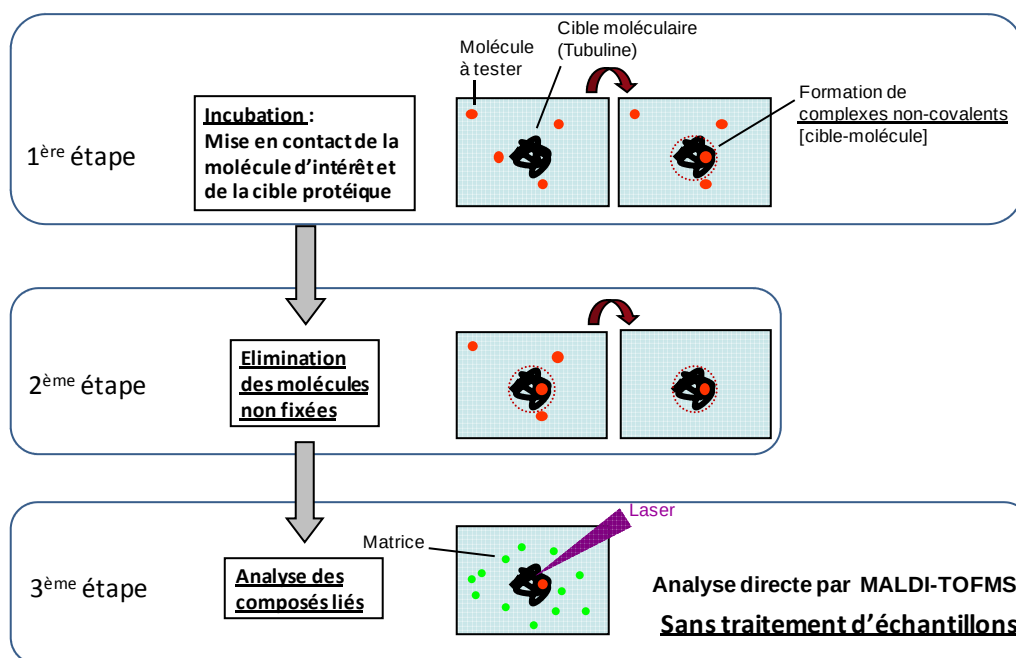


Figure 25 : protocole général de l'étude

Ainsi, notre protocole se divise en trois étapes distinctes. La **1^{ère} étape** correspond à l'incubation des molécules à tester avec la cible moléculaire choisie. Cette étape doit être faite en conditions non dénaturantes, préservant au maximum les interactions non-covalentes entre les molécules actives et la cible. La **2^{ème} étape** consiste en l'élimination des molécules non fixées présentes dans la solution. Elle se doit de conserver des conditions non-dénaturantes tout en offrant une séparation totale des molécules non liées. Enfin, la **3^{ème} étape** de notre protocole consiste en l'analyse de la solution contenant uniquement la cible et les molécules éventuellement liées. Trois stratégies ont été envisagées à ce stade : une analyse directe par MALDI-TOFMS sans aucun traitement supplémentaire, une analyse après digestion de la cible ou une analyse après dénaturation de la cible.

Les différentes étapes d'incubation, d'élimination des composés non liés et de traitement d'échantillons précédant ou non l'analyse des composés, seront décrites plus en détails dans la suite de ce manuscrit. Nous présenterons également le matériel et les solvants utilisés lors de la réalisation des diverses étapes de ces travaux.

i. Incubation des molécules à tester avec la cible moléculaire

L'étape d'**incubation** est la **1^{ère} étape** mise en jeu dans notre protocole de criblage. Cette étape vise à mettre en contact les molécules à tester et la cible moléculaire choisie dans des conditions proches du milieu physiologique de la cible. Cette étape se doit de conserver la cible moléculaire protéique sous sa forme physiologique, native. En effet, les sites de liaison des molécules actives sont formés par les repliements propres à la structure ternaire des protéines. Il ne faut donc pas que les solutions dans lesquelles les composés vont pouvoir former des complexes non-covalents avec leurs cibles soient dénaturantes (acide, basique ou organique) afin que les résultats obtenus soient représentatifs d'une activité biologique.

Dans notre cas, le solvant choisi est de l'**eau ultrapure** qui, mimant de manière satisfaisante les conditions physiologiques, nous a permis de mettre au point ce protocole sans avoir à ajouter de fortes concentrations en sels qui pourraient compliquer l'interprétation des spectres obtenus. Des expériences ont tout de même été menées avec un tampon acétate d'ammonium 10 mM (pH 6,8), représentant plus fidèle des conditions physiologiques et ont donné des résultats probants. Pour nous approcher des conditions natives, nous avons choisi de faire cette incubation à **37°C**.

Une fois le milieu de solvation et d'incubation choisi, il a fallu déterminer le temps de contact pendant lequel les molécules à tester seraient incubées avec les cibles moléculaires protéiques. Ce temps de contact a été porté à **une heure** pour nous laisser la possibilité d'étudier également des molécules dont les liaisons à leurs sites actifs sont lentes (comme la colchicine par exemple, dont la liaison à la tubuline prend jusqu'à une heure). Ce temps d'incubation a également été choisi pour permettre la formation d'un équilibre en solution notamment dans le cas de composés ayant une faible affinité pour leurs cibles moléculaires. En effet, nous nous sommes placés en « condition de cible limitante » (la concentration des cibles étant 10 à 100 fois plus faible que celle des molécules à tester) de manière à nous assurer que tous les sites de liaison disponibles sur les cibles seraient utilisés. C'est donc en partie pour nous assurer que de telles conditions de saturation des récepteurs des cibles étaient atteintes que nous avons porté le temps d'incubation à une heure.

Ainsi, pour le **test impliquant la tubuline**, la solution d'incubation est constituée de 90 µL de solution de tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M) dans l'eau ultrapure et 10 µL de solution à tester (de

concentration de 5.10^{-4} M pour les témoins positifs (colchicine, vinblastine, vincristine) dans l'eau ultrapure. Le temps d'incubation a été porté à 1 heure à 37°C.

Cette étape permet d'obtenir une solution contenant la cible moléculaire (tubuline) sur laquelle est éventuellement fixée une ou des molécules d'intérêt, et/ou des molécules non fixées toujours en solution.

Sauf indication contraire, toutes les solutions aqueuses utilisées au cours de ces travaux ont été préparées avec de l'eau ultrapure obtenue à partir d'un système « simplicity personal ultrapure water » (Millipore, Molsheim, France).

ii. Elimination des composés non liés à la cible moléculaire

Cette **2^{ème} étape**, cruciale, doit également être faite en conditions non dénaturantes. Elle vise à séparer les molécules non liées à la cible moléculaire choisie en vue des étapes ultérieures d'analyses.

La stratégie mise en place pour la séparation des composés non liés est la **filtration/centrifugation** préalable à l'analyse par spectrométrie de masse. Cette technique requiert l'utilisation de microconcentrateurs qui permettent de séparer la protéine cible (emportant avec elle toute molécule y étant liée) des autres constituants du mélange de masse inférieure par passage différentiel au travers d'une membrane spécifique. Cette étape est permise par la grande différence de masse entre les cibles moléculaires choisies (de plusieurs milliers de Da) et les molécules d'intérêt dont on cherche à tester l'activité (moins de 1000 Da).

Parmi les différents modèles disponibles sur le marché, nous avons utilisé des microconcentrateurs (MICROCON[®], Millipore, Molsheim, France) constitués d'une membrane de cellulose permettant de séparer les molécules en fonction de leurs masses. Normalement utilisés pour le dessalage des échantillons de protéines préalablement à leur analyse par spectrométrie de masse, ils permettent également de concentrer les échantillons jusqu'à un facteur 100. Les microconcentrateurs utilisés lors de nos recherches laissent filtrer tout composé ayant une masse inférieure à 30000 Dalton, les molécules de plus hautes masses étant retenues sur la membrane. Ces dispositifs sont présentés en Figure 26.

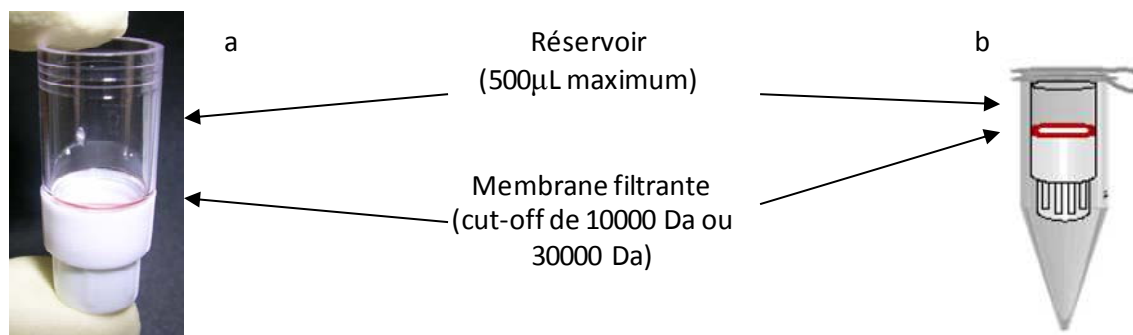


Figure 26 : photographie d'un microconcentrateur (a) et son utilisation au sein d'un tube Eppendorf® (b)

Dans le cadre de nos tests de criblage, nous avons utilisé les microconcentrateurs en une succession d'étapes. Tout d'abord, la membrane du dispositif doit être rincée pour en éliminer le glycérol qui en empêche la détérioration durant le stockage. Cette étape est nécessaire car sinon le glycérol est relargué dans l'échantillon lors de l'élution des composés retenus sur la membrane (la cible et les molécules y étant liées) et sa présence nuira aux analyses MALDI des composés liés en empêchant la cristallisation des dépôts. Une fois cette étape assurée, 100 µL de la solution à filtrer (constituée de la cible moléculaire et des molécules avec lesquelles elle a été incubée) sont ajoutés dans le réservoir du dispositif lui-même placé dans un tube eppendorf®. L'ensemble est ensuite mis à centrifuger 12 minutes. Les protéines de hautes masses et les molécules qui y sont liées sont alors retenues sur les membranes des dispositifs alors que les molécules de plus basses masses se retrouvent dans le filtrat au fond du tube. Une fois le nombre de cycles de lavage désiré effectué, il convient de retourner le filtre et de filtrer un faible volume d'eau ultrapure (25 µL) pour récupérer les composés jusque là retenus sur la membrane. Il faut préciser ici qu'il est important de veiller à ce que les membranes des microconcentrateurs ne sèchent jamais lors de ces étapes (à partir du rinçage du glycérol jusqu'à l'élution des composés retenus) car ceci pourrait détériorer leurs propriétés.

Un protocole adapté à la séparation des molécules de basses masses non liés est ainsi mis en œuvre. Celui-ci doit conserver les cibles moléculaires protéiques sous leurs formes natives et il faut également s'assurer qu'aucune liaison non spécifique ne peut se produire. Nous avons choisis d'éviter ces deux phénomènes par la mise en place d'une série de plusieurs lavages successifs, par de l'eau ultrapure, des membranes après filtration des solutions d'incubation.

Cependant, le protocole que nous avons mis au point ne doit pas contenir trop d'étapes de lavages car il y aura à chaque cycle un déplacement de l'équilibre en faveur d'une

« libération » d'une partie des molécules liées aux cibles moléculaires, ce qui se traduit par une diminution de la quantité globale des molécules liées et ainsi une diminution de la sensibilité de nos tests. Ainsi les lavages que nous avons mis en place devront être assez nombreux pour assurer une bonne séparation des espèces non liées mais ne devront pas être trop nombreux pour ne pas nuire à la qualité du test. Le schéma ci-après, en Figure 27, présente l'organisation générale du protocole mis au point utilisant un microconcentrateur.

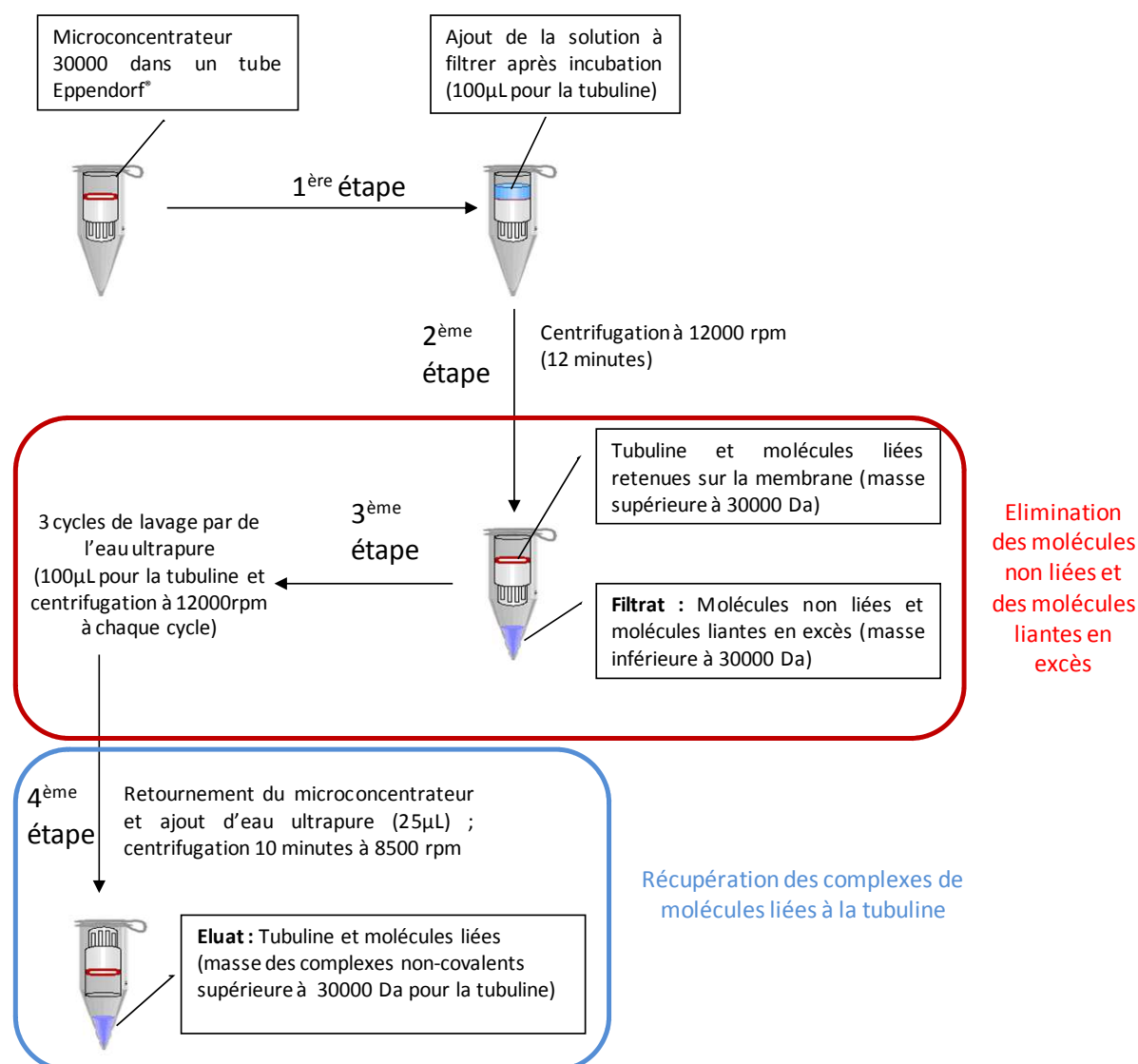


Figure 27 : Schéma général du protocole d'élimination des molécules non liées aux cibles protéiques

Comme nous l'avons vu précédemment l'usage de microconcentrateurs ne dispense pas de faire suffisamment de lavages de la membrane du filtre pour s'assurer qu'aucune liaison non spécifique des composés à sa surface ne peut se produire. Nous discuterons plus avant dans ce manuscrit le choix du nombre de cycles de lavages optimal à mettre en œuvre lors de l'utilisation de nos tests.

La mise en œuvre de ce protocole d'élimination des molécules non liées aux cibles moléculaires nous permet d'obtenir une solution concentrée de cibles moléculaires sur lesquelles sont éventuellement fixées des molécules actives.

Pour les étapes de centrifugation nous avons eu recours à une minicentrifugeuse Costar (Corning, New York, USA).

iii. Analyse des composés liés

Cette étape constitue en la caractérisation des composés liés aux cibles moléculaires protéiques présents dans les solutions éluées à partir des microconcentrateurs. Nous nous intéresserons tout d'abord à l'**analyse directe** des composés liés aux cibles moléculaires, sans aucun traitement d'échantillon préalable.

Cette étape consiste en l'étude des molécules éventuellement liées à la cible moléculaire protéique, sans aucun traitement préalable de l'échantillon. Il s'agit ici plus de détecter l'éventuelle liaison du composé sur sa cible que d'en doser la quantité.

Elle consiste en une analyse directe, par MALDI-TOFMS, de la solution obtenue après incubation, filtration sur microconcentrateur, lavages et élution. En effet, les interactions entre une molécule active et son site de liaison protéique sont d'ordre non-covalent. Ce type de liaison est facilement rompu lors de l'analyse en MALDI-TOFMS par le fait de l'impact laser utilisé pour la désorption et l'ionisation de la matière et des conditions légèrement dénaturantes apportées par les solutions de matrices (faiblement acides et contenant des solvants organiques). Il convient alors d'utiliser un laser de longueur d'onde appropriée à la matrice, à la fois pour l'analyse de la protéine cible et de la molécule dont on teste l'activité. Cela ne sera également possible que si la différence d'affinité protonique entre ces différents composés et la matrice est optimale, le choix de la matrice utilisée étant crucial de manière à permettre une bonne ionisation des composés présents.

Ainsi 1 μ L des différentes solutions éluées (après incubation, filtration sur microconcentrateur et lavages) sont déposées sur le porte échantillon du MALDI-TOFMS et laissés à sécher à l'air libre. Une fois les dépôts parfaitement secs, 1 μ L de la solution de matrice appropriée est déposé sur le puits et repris par 2 cycles d'aspiration – refoulement. Nous avons utilisé ce mode de dépôt par mélange intime, car il permet de remettre en solution

les complexes [cible-molécule liée] dans la solution de matrice choisie, en rompant une partie des liaisons non-covalentes (comme présenté en chapitre 3). Une fois les dépôts parfaitement secs, les échantillons sont analysés par TOFMS (3 dépôts identiques par solution éluée et par matrice) et des **signaux caractéristiques de molécules liées** ($[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$ correspondants) sont recherchés (3 spectres de masse enregistrés par dépôt). Nous nous sommes tenus à ne considérer comme caractéristiques que les pics présents lors de l'analyse directe avec un rapport Signal/Bruit (S/B) au moins égal à 3. Ces pics seront considérés comme significatifs par différence avec ceux de la matrice et de la cible moléculaire.

CONCLUSION

Nous avons commencé ce chapitre par la présentation de la spectrométrie de masse et des instruments utilisés au cours de ces travaux, notamment pour la mise au point du mode de détection impliqué dans notre test.

Nous avons présenté l'organisation générale de notre protocole de criblage. Celui-ci met en jeu **trois étapes successives** qui sont l'**incubation** des molécules à tester avec la cible moléculaire protéique choisie, l'**élimination des molécules non liées** et enfin l'**analyse des composés liés**. Nous avons ensuite présenté la **cible moléculaire**, la tubuline sur laquelle nous avons appliqué notre concept de test de criblage. Nous avons ainsi présenté les molécules dont l'affinité pour ces cibles est avérée (colchicine, vinblastine et vincristine) qui nous ont servi de **témoins positifs** lors de la mise en place de nos tests. Nous avons présenté plus en détails les choix que nous avons faits concernant l'étape d'incubation des molécules à tester avec les cibles et nous avons décidé de faire cette **incubation dans l'eau ultrapure, une heure à 37°C**. Nous avons décidé de faire l'**élimination des composés non liés par filtration/centrifugation sur microconcentrateurs** car cette technique permet une bonne séparation si un nombre suffisant de cycles de lavage est mis en place. Enfin, nous avons présenté l'étape d'**analyse par MALDI-TOFMS des composés liés** directement sans traitement d'échantillon (**analyse directe**).

Chapitre 3 : Résultats expérimentaux

INTRODUCTION

Nous avons choisi de caractériser finement les différents extraits de Colchique d'Automne et de Pervenche de Madagascar que nous avons préparés, de manière à avoir des réponses claires lors de leurs criblages.

Par la suite nous discuterons des résultats obtenus dans le cadre du criblage de molécules témoins puis nous terminerons ce point par la description de la démarche de validation dont notre protocole a fait l'objet.

Comme nous l'avons vu précédemment, les plantes sont, encore aujourd'hui, une des principales sources de molécules actives pouvant agir sur des pathologies intéressant l'homme. En effet, près de 50% des médicaments utilisés aujourd'hui ont pour origine directe ou indirecte une molécule naturelle et plus de la moitié de celles-ci sont extraites, ou ont été extraites, des plantes⁷³. Nous nous sommes proposé d'utiliser les plantes comme source de molécules nouvelles pouvant être soumises aux criblages et dans un dernier point nous détaillerons les résultats que nous avons obtenus dans le cadre du criblage primaire des extraits bruts de Colchique d'automne et de Pervenche de Madagascar. Le but de ce travail est de mettre en évidence les espèces actives en termes de liaison à la tubuline dans les différents extraits par l'application de nos protocoles de criblage et ainsi valider le fait que nos protocoles sont utilisables pour le criblage d'extraits de plantes bruts, non fractionnés, puis de cribler ces extraits à la recherche de molécules actives minoritaires.

⁷³ (93) Cordell, G. A.; Quinn-Beattie, M. L.; Farnsworth, N. R. *phytotherapy research* **2001**, 15, 183.

1. Caractérisation des extraits de Colchique d'Automne

a. Matériel végétal et préparation d'extraits de Colchique

Le matériel végétal que nous avons utilisé au cours de nos études de criblage d'extraits de colchique d'automne à la recherche de molécules liant la tubuline nous a été fourni par le Docteur Anne Poutaraud de l'INRA de Colmar. Ce matériel végétal a été récolté, séché et broyé entre 2001 et 2002. Le matériel à notre disposition contient des broyats des différents organes de la plante récoltés à différents moments du cycle. Les échantillons sont présentés dans la Figure 28 ci-après.

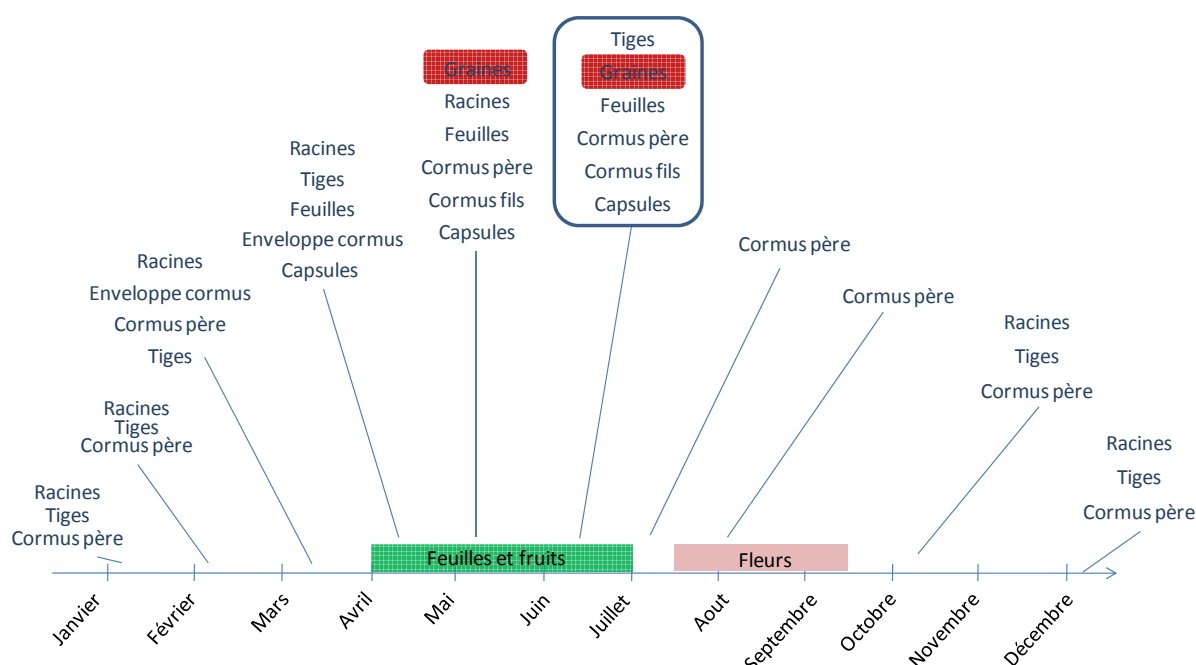


Figure 28 : Représentation schématique des dates de récoltes des différents échantillons de Colchique d'automne disponibles pour nos recherches

Comme nous l'avons vu précédemment, du fait du cycle particulier de cette plante, la composition en alcaloïdes des extraits dépend du moment de la récolte ainsi que de la qualité du séchage et du stockage. Il a cependant été prouvé que la teneur maximale en alcaloïdes (colchicine et apparentés) est rencontrée dans les graines pour des échantillons récoltés aux alentours du mois de juin⁷⁴. Nous avons ainsi décidé de préparer des extraits des différentes

⁷⁴ (74) Poutaraud, A.; Girardin, P. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* **2002**, 9, 63.

parties de cette plante disponibles à cette date en recherchant notamment des différences en composition des différents alcaloïdes.

Les extraits des différentes parties de plantes récoltées début juin (tiges, graines, feuilles, cormus père, cormus fils et capsules) ont été préparés tels que : 100 mg des différentes parties de plante broyées et séchées ont été extraits, pendant deux heures à température ambiante, par 2 mL d'un mélange éthanol/eau ou dichlorométhane/méthanol (v/v). Les extraits obtenus ont été ensuite évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif Antrieb-VV-mikro (Heidolph Instruments, Schwabach, Allemagne) puis repris par 10 mL d'eau ultrapure.

b. Caractérisation par spectrométrie de masse des extraits de Colchique

Les extraits des différentes parties de plantes (tiges, graines, feuilles, cormus père, cormus fils et capsules) ont été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF avec la matrice 2,5-DHB. Les résultats obtenus sont présentés ci-après (Figure 29).

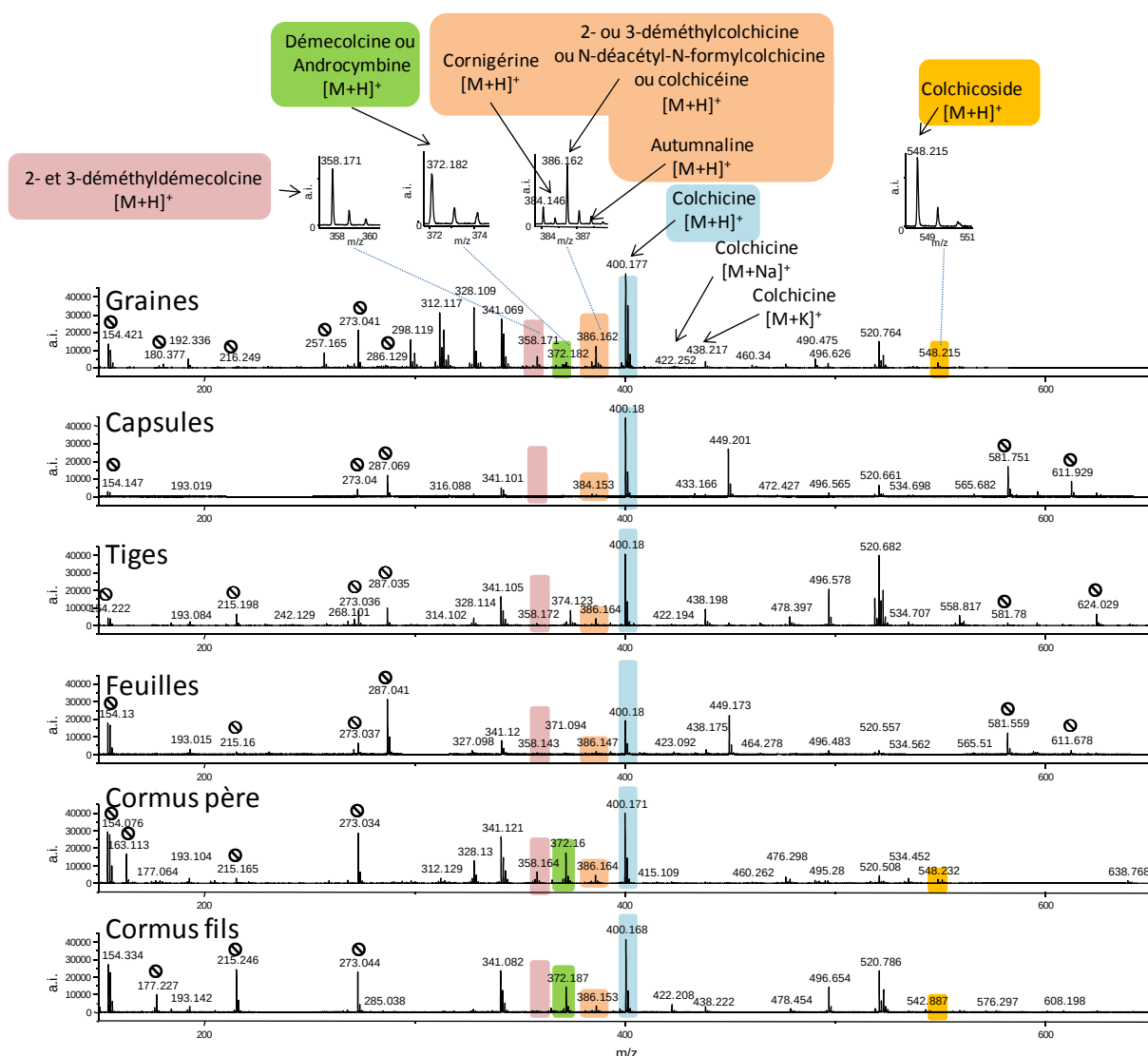


Figure 29 : Spectres MALDI-TOFMS (2,5-DHB, mélange intime) des extraits (dichlorométhane/méthanol v/v) de graines, capsules, tiges, feuilles, cormus père et cormus fils de Colchique d'automne (pics de matrice ⊗)

Des signaux caractéristiques (pics pseudomoléculaires $[M+H]^+$) de différents alcaloïdes sont retrouvés en MALDI-TOFMS pour les différents extraits de colchique d'automne. Ces alcaloïdes présents dans l'ensemble des extraits de graines, de capsules, de tiges, de feuilles et de cormus père et fils sont la colchicine $[M+H]^+$ expérimental = 400,176 Th (erreur de 1,3 ppm par rapport à la masse théorique), la 2- ou 3-déméthylcolchicine ou N-déacétyl-N-formylcolchicine ou colchicine $[M+H]^+$ expérimental = 386,158 Th (erreur de 4,6 ppm). Certaines espèces ne sont cependant présentes que dans des organes spécifiques. C'est le cas par exemple de la démecolcine ou Androcymbine $[M+H]^+$ expérimental = 372,176 Th (erreur de 11,4 ppm) retrouvée uniquement dans les extraits de graines, cormus père et cormus fils. Le colchicoside

n'est lui aussi détecté que dans les extraits de graines, cormus père et cormus fils $[M+H]^+_{\text{expérimental}} = 548,2235$ Th (erreur de 19 ppm). L'autumnaline quant à elle n'est détectée que dans l'extrait de graines de colchique d'automne $[M+H]^+_{\text{expérimental}} = 388,193$ Th (erreur de 21 ppm) (différent du pic de la [colchicine $^{13}\text{C}_2+H]^+$ à $m/z_{\text{théorique}} = 388.16652$ Th, qui entrainerai une erreur de 70 ppm).

Bien que ces attributions puissent être faites avec des erreurs moyennes inférieures à 11 ppm par MALDI-TOFMS, nous les avons validées par analyse en MALDI-FTICRMS haute résolution. Comme **l'extrait de graines de colchique d'automne contient le plus grand nombres d'alcaloïdes différents avec des intensités absolues importantes**, nous avons décidé de nous limiter uniquement à son étude pour la suite de nos manipulations.

Le spectre MALDI-FTICRMS de l'extrait de graines de colchique d'automne avec la matrice 2,5-DHB est présenté en Figure 30.

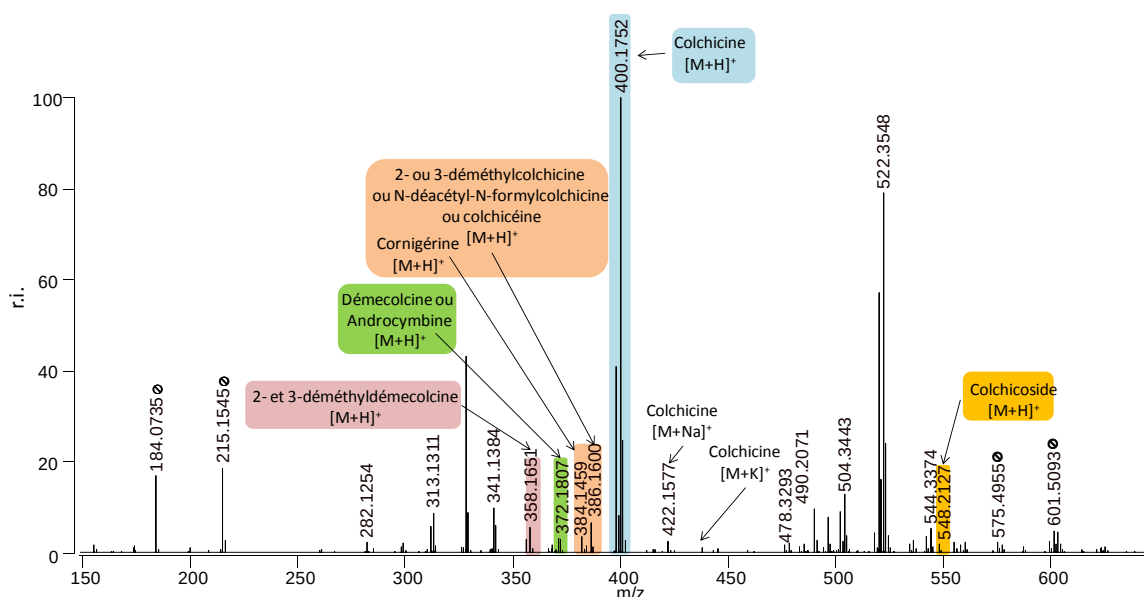


Figure 30 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) d'un extrait (dichlorométhane/méthanol v/v) de graines de Colchique d'automne (pics de matrice ⊙)

Le spectre MALDI-FTICRMS de l'extrait de graines de colchique d'automne montre lui aussi des signaux caractéristiques de différents alcaloïdes : 2- ou 3-déméthyl-démecolcine $[M+H]^+_{\text{expérimental}} = 358,1651$ Th (erreur de 2,7 ppm par rapport à la masse théorique), démecolcine ou androcymbine $[M+H]^+_{\text{expérimental}} = 372,1807$ Th (erreur de 0,4 ppm), cornigérine $[M+H]^+_{\text{expérimental}} = 384,1459$ Th (erreur de 3,6 ppm), 2- ou 3-déméthylcolchicine, N-décétyl-N-formylcolchicine ou colchicine $[M+H]^+_{\text{expérimental}} = 386,1600$ Th (erreur de 0,5 ppm), colchicine $[M+H]^+_{\text{expérimental}} = 400,1752$ Th (erreur de 0,6 ppm) et colchicoside

$[M+H]^+_{\text{expérimental}} = 548,2127$ Th (erreur de 0,1 ppm). Ainsi, les attributions des pics correspondants aux alcaloïdes effectuées par MALDI-TOFMS sont validées à l'aide de la mesure de masse exacte atteinte lors d'une analyse de la même solution par MALDI-FTICRMS (avec une erreur moyenne de l'ordre de 1 ppm et une résolution moyenne aux alentours de 700000 ($m/\Delta m$)). Il est cependant à noter qu'une différence entre les deux spectres obtenus existe en ceci que l'autumnaline n'est pas détectée par MALDI-FTICRMS. Ceci peut néanmoins s'expliquer par la plus faible sensibilité de cette technique par rapport au MALDI-TOFMS.

Ainsi, nous avons donc préparé un extrait de graines de colchique d'automne. Celui-ci a été caractérisé par MALDI-TOFMS en vue de son criblage pour rechercher des composés montrant une affinité de liaison pour la tubuline.

2. Caractérisation des extraits de Pervenche de Madagascar

a. Matériel végétal et préparation d'extraits de Pervenche de Madagascar

Le matériel végétal que nous avons utilisé au cours de nos études sur la Pervenche de Madagascar nous a été fourni par Léontine Rahelinirina du Centre National d'Application des Recherches Pharmaceutiques de Madagascar, dirigé par A. Rakotobe et cette collaboratoir à donné lieu à un agrément de transfert de matériel entre le CNARP et le laboratoire. Ainsi, deux lots différents de plantes ont été récoltés, séchés puis mis à notre disposition : la plante entière broyée ou non, la partie aérienne (fleurs, feuilles, tiges et fruits) et les racines.

Les études menées sur la plante ayant montré que les extraits actifs contre le cancer étaient réalisés à partir des feuilles³⁵, nous avons décidé de centrer notre travail sur les extraits de parties aériennes de Pervenche de Madagascar.

D'autre part, des protocoles d'extraction très complexes ont été mis en œuvre afin d'extraire de cette plante des fractions d'alcaloïdes quasiment pures, ne contenant qu'une voire deux espèces. Dans le protocole initialement mis au point³⁵ les feuilles sont extraites à l'éther de pétrole, puis l'extrait est repris dans du chloroforme après alcalinisation. Le matériel végétal est ensuite repris dans du benzène acidifié par 2% d'acide tartrique. Suivent plusieurs étapes de séparation dans lesquelles la phase liquide subit une acidification et une extraction liquide/liquide au dichloroéthane puis une basification par de l'ammoniaque avant

une nouvelle extraction au dichloroéthane. Le matériel végétal est quand à lui successivement extrait par du benzène puis de l'éthanol, et chacun des extraits obtenus subit une extraction liquide/liquide au dichloroéthane. Ce protocole d'extractions différentielles mène ainsi à 7 fractions différentes qui doivent encore être à nouveau fractionnées en vue de leur caractérisation ultérieure. D'autres approches visent à remplacer le dichloroéthane par de l'eau basifiée lors des extractions liquide/liquide³⁵.

Nous avons cependant voulu mettre en œuvre une méthode d'extraction beaucoup plus globale, sans nécessiter de fractionnement dans le but de disposer des solutions les plus riches possible en vue de leur criblage à la recherche d'agents se liant à la tubuline. Une alternative étant donc d'extraire le matériel végétal par du méthanol, de l'acétate d'éthyle ou du chloroforme, et ce à température ambiante ou à l'aide d'un dispositif de soxhlet⁴⁴.

Ainsi nous avons réalisé les extractions de 15 g de Pervenche de Madagascar (feuilles, tiges et fruits séchés) par 200 mL de méthanol, ou de chloroforme, ou de dichlorométhane, ou de dichloroéthane ou encore de dibromométhane, par macération 15j à température ambiante. Les solutions obtenues ont été ensuite évaporées à sec et les résidus solubilisés dans 20 mL d'eau ultrapure puis filtrées sur des membranes PTFE (polytetrafluoroéthylène) de maille de 0,45 μm . Les extraits ainsi obtenus, ont été caractérisés par spectrométrie de masse.

b. Caractérisation par spectrométrie de masse des extraits de Pervenche de Madagascar

1 μL des différents extraits ont été déposés sur la cible porte échantillon du MALDI-TOFMS en mélange intime avec 1 μL de solution de matrice 2,5-DHB. Les spectres de masse des extraits de Pervenche de Madagascar avec différents solvants (méthanol, chloroforme, dichlorométhane, dichloroéthane ou dibromométhane) sont présentés en Figure 31.

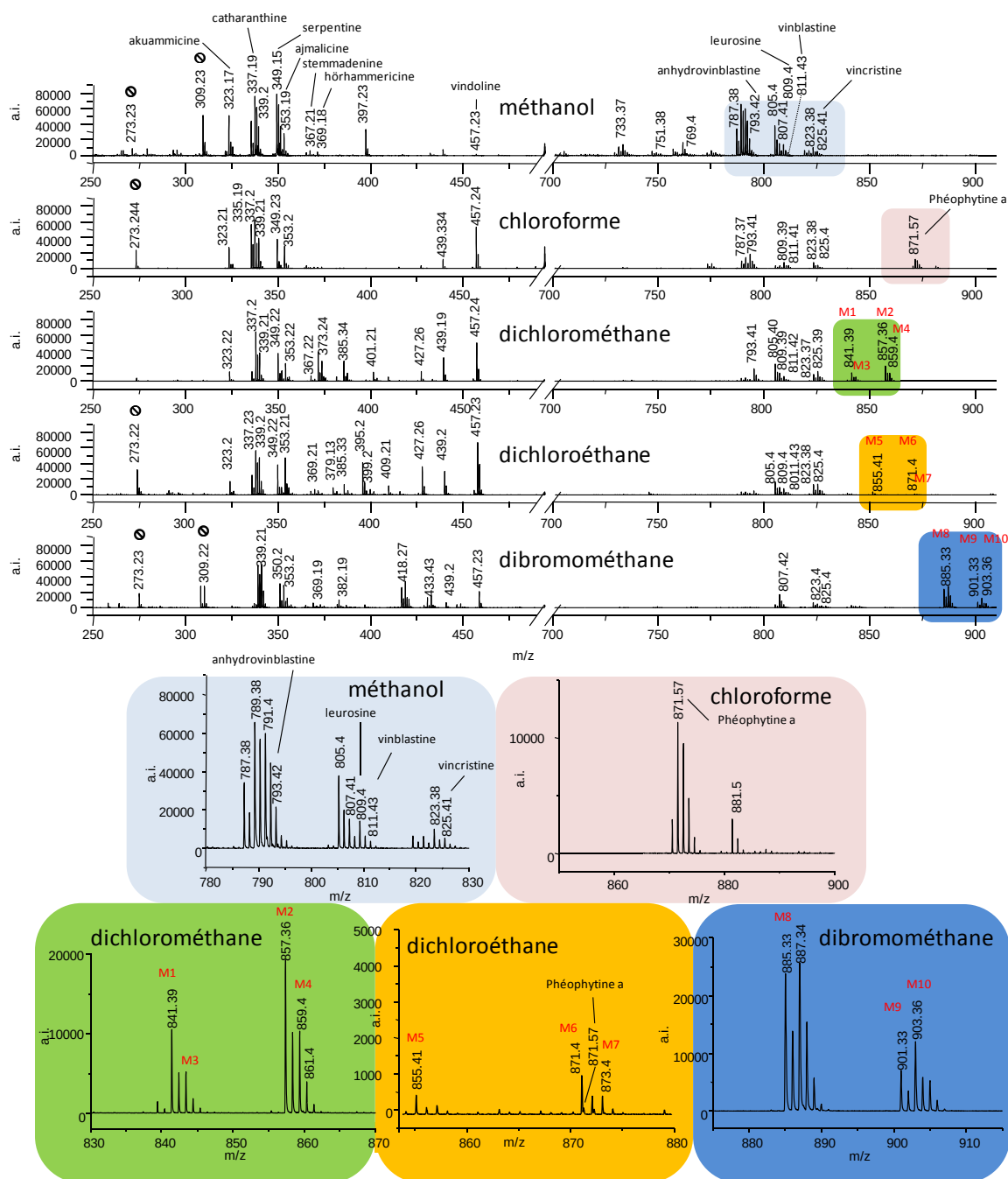


Figure 31 : Spectres MALDI-TOFMS (2,5-HHB mélange intime) d'extraits (méthanol, chloroforme, dichlorométhane, dichloroéthane, dibromométhane) de Pervenche de Madagascar. Les attributions des espèces connues se font par rapport à leurs pics pseudomoléculaires $[M+H]^+$ respectifs (pics de matrice ☉)

Comme le montre la Figure 31, les extraits de Pervenche de Madagascar ont des profils différents en fonction du solvant utilisé.

Avec le méthanol, l'extrait semble le plus riche tant en nombre d'espèces détectées qu'en intensités de signaux. Ainsi, des signaux peuvent être attribués à :

- l'apparicine ou à la péricalline $[M+H]^+=265,17$ Th,

- l'ammocalline $[M+H]^+=279,16$ Th,
- la sécodine $[M+H]^+=293,19$ Th,
- l'**akuammicine**, la pericyclivine ou la pleiocarpamine $[M+H]^+=323,17$ Th,
- l'akagerine, la cavincine, la kibine, la lochnerine, ou la tubotaiwine $[M+H]^+=325,2$ Th,
- la lochneridine $[M+H]^+=329,17$ Th,
- l'epivindolinine, la **catharanthine**, la **tabersonine**, la venalstonine, la vindolinine $[M+H]^+=337,2$ Th,
- la 12-hydroxy-akuammicine, la fluorocarpamine, la lochrocine, la vinervine, la coronaridine ou la vincadifformine $[M+H]^+=339,2$ Th,
- l'alstonine ou la **serpentine** $[M+H]^+=349,15$ Th,
- la cathenamine, l'isovallesiachotamine, la vallesiachotamine, la vindolinine N-oxyde, la 19-hydroxytabersonine, l'**ajmalicine**, l'akuammidine, l'akuammigine, l'epiajmalicine, la lochnericine, la minovincine, la O-deacetylakuammiline, la preakuammicine, la rauniticine, la rosamine, la tetrahydroalstonine ou la vobasine $[M+H]^+=353,19$ Th,
- l'isositsirikine, la minovincinine ou la yohimbine $[M+H]^+=355,2$ Th,
- la méthoxytabersonine, methoxytabersosine ou à la **stemmadenine** $[M+H]^+=367,21$ Th,
- la 10-hydroxy-deacetylakuammiline, la 7-hydroxyindolenine-ajmalicine, l'epimisiline, l'**hörhammericine**, la mitraphylline, la pseudo-indoxylajmalicine ou la vincoline $[M+H]^+=369,18$ Th,
- la 19-hydroxy-11-méthoxy-tabersosine, l'akuammine, la lochnerinine, la lochrovidine ou la virosine $[M+H]^+=383,19$ Th,
- la vindolicine ou la **vindoline** $[M+H]^+=457,23$ Th,
- la leurosivine $[M+H]^+=733,37$ Th,
- la 17-deacetylleurosine $[M+H]^+=751,38$ Th,
- la déacetylvinblastine ou la pseudovinblastine-diol $[M+H]^+=769,4$ Th,
- l'**anhydrovinblastine** ou vingramine $[M+H]^+=793,42$ Th,
- l'isoleurosine ou la **4'-deoxyvinblastine** $[M+H]^+=795,41$ Th,
- la méthylvingramine $[M+H]^+=807,41$ Th,
- la catharanthamine, la **leurosine** ou la vincathicine $[M+H]^+=809,4$ Th,

- l'épivinblastine, la leurosine, la roseamine, la **vinblastine** ou la vincovaline $[M+H]^+ = 811,43$ Th,
- la catharicine $[M+H]^+ = 821,36$ Th,
- la 5-oxoleurosine ou la catharine $[M+H]^+ = 823,38$ Th
- la carosine, la leurosine N-oxyde, la pleurosine, la vinamidine ou la **vincristine** $[M+H]^+ = 825,41$ Th.

26 pics du spectre de masse peuvent ainsi être attribués à 87 espèces (du fait de la présence de nombreuses molécules isobares) parmi les 142 référencées plus haut. Ces attributions se font dans ce cas avec une erreur moyenne de 13 ppm par rapport aux $[M+H]^+$ théoriques présentés précédemment. Au total, le spectre MALDI-TOFMS obtenu pour l'extrait au méthanol de la Pervenche de Madagascar présente une grande densité de pics et montre ainsi l'intérêt de la technique MALDI-TOFMS pour une caractérisation rapide d'extraits de plantes en vue de leur criblage.

L'utilisation d'autres solvants ne modifie pas grandement le nombre et la nature des espèces extraites et la majorité des espèces citées précédemment sont retrouvées également dans les extraits de Pervenche de Madagascar préparés à partir de chloroforme, de dichlorométhane, de dichloroéthane ou de dibromométhane. Cependant, il est important de noter l'observation d'autres espèces, spécifiques au solvant utilisé (en encarts de la Figure 31).

Dans le cas de l'extrait au chloroforme un pic nouveau est observé à $m/z = 871,57$ Th. Ce pic peut être attribué à l'espèce pseudomoléculaire de la phéophytine-a (pigment chlorophyllien dépourvu de magnésium) de formule brute $C_{55}H_{74}N_4O_5$ ($[M+H]^+_{\text{théorique}} = 871,57320$, erreur de 3,6 ppm). En effet, le chloroforme est connu pour être un très bon solvant des pigments de plantes et d'algues, dont les chlorophylles et les phéophytines⁷⁵. D'ailleurs l'extrait obtenu est de couleur vert profond.

Dans le cas de l'extrait réalisé avec le dichlorométhane des pics nouveaux sont observés à $m/z = 841,39$ Th, $m/z = 843,4$ Th, $m/z = 857,36$ Th et $m/z = 859,4$ Th appelés respectivement M1, M3, M2 et M4.

Dans le cas de l'extrait au dichloroéthane, de nouveaux pics sont observés à $m/z = 855,41$ Th, $m/z = 871,4$ Th (à côté du pic de la phéophytine a à $m/z = 871,57$ Th) et $m/z = 873,4$ Th, appelés respectivement M5, M6 et M7.

⁷⁵ (75) Wood, L. W. *canadian journal of fisheries and aquatic sciences* **1985**, 42, 38.

Enfin, dans le cas de l'extrait au dibromométhane, de nouveaux pics sont observés à $m/z = 885,33$ Th, $m/z = 901,33$ Th et $m/z = 903,36$ Th, appelés respectivement M8, M9 et M10.

Ces dix pics correspondent à des espèces différentes de celles référencées précédemment et la précision sur la mesure de masse obtenue en MALDI-TOFMS ne permet pas de leur attribuer avec certitude une formule brute. Cependant, il est possible de remarquer sur les encarts de la Figure 31 que les massifs isotopiques de ces espèces sont atypiques, pouvant signer la présence de chlore dans les molécules M1, M2, M3, M4, M5, M6 et M7 et de brome dans les molécules M8, M9 et M10.

De manière à préciser les formules et les structures de ces molécules, les mêmes extraits ont été étudiés par MALDI-FTICRMS. Pour ce faire, 1 μ L de l'extrait méthanolique de Pervenche de Madagascar a été déposé avec 1 μ L de solution de matrice 2,5-DHB. Les résultats obtenus pour l'extrait méthanol sont présentés en Figure 32.

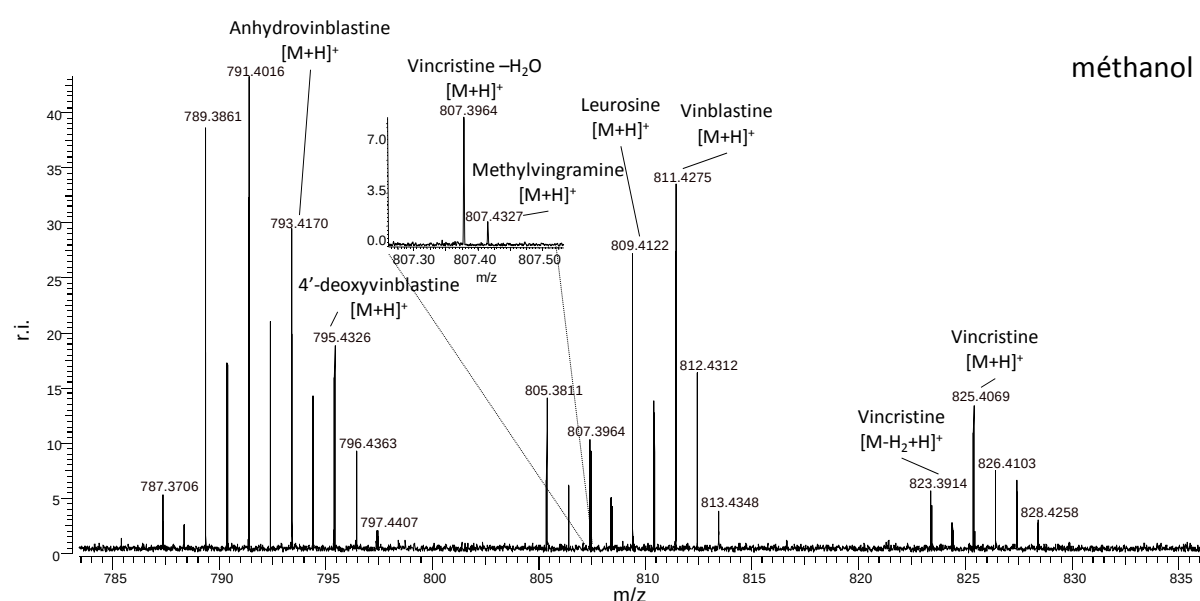


Figure 32 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) de l'extrait méthanol de la Pervenche de Madagascar

Comme le montre le spectre, les mêmes espèces sont détectées en MALDI-FTICRMS qu'en MALDI-TOFMS, cependant, la précision sur la mesure de masse (inférieure à 0,5 ppm dans ce cas) permet d'attribuer les pics avec certitude. De plus, comme le montre l'encart, la résolution moyenne proche de 600000 $m/\Delta m$, permet de séparer les molécules de masses proches comme c'est le cas du fragment de la vincristine $-H_2O$ à $m/z = 807,39636$ Th et de la méthylvingramine à $m/z = 807,43274$ Th.

Pour valider les attributions des pics, notamment de la vinblastine et de la vincristine retrouvées dans l'extrait méthanolique de Pervenche de Madagascar, nous avons mené à bien des expériences de spectrométrie de masse de spectrométrie de masse (MS^2) en SORI-CID (cf. page 50). Durant ces expériences, les ions ont été excités pendant 20 ms. Les résultats obtenus en SORI-CID sont présentés en Figure 33a pour la vinblastine et Figure 33b pour la vincristine extraites de la Pervenche de Madagascar.

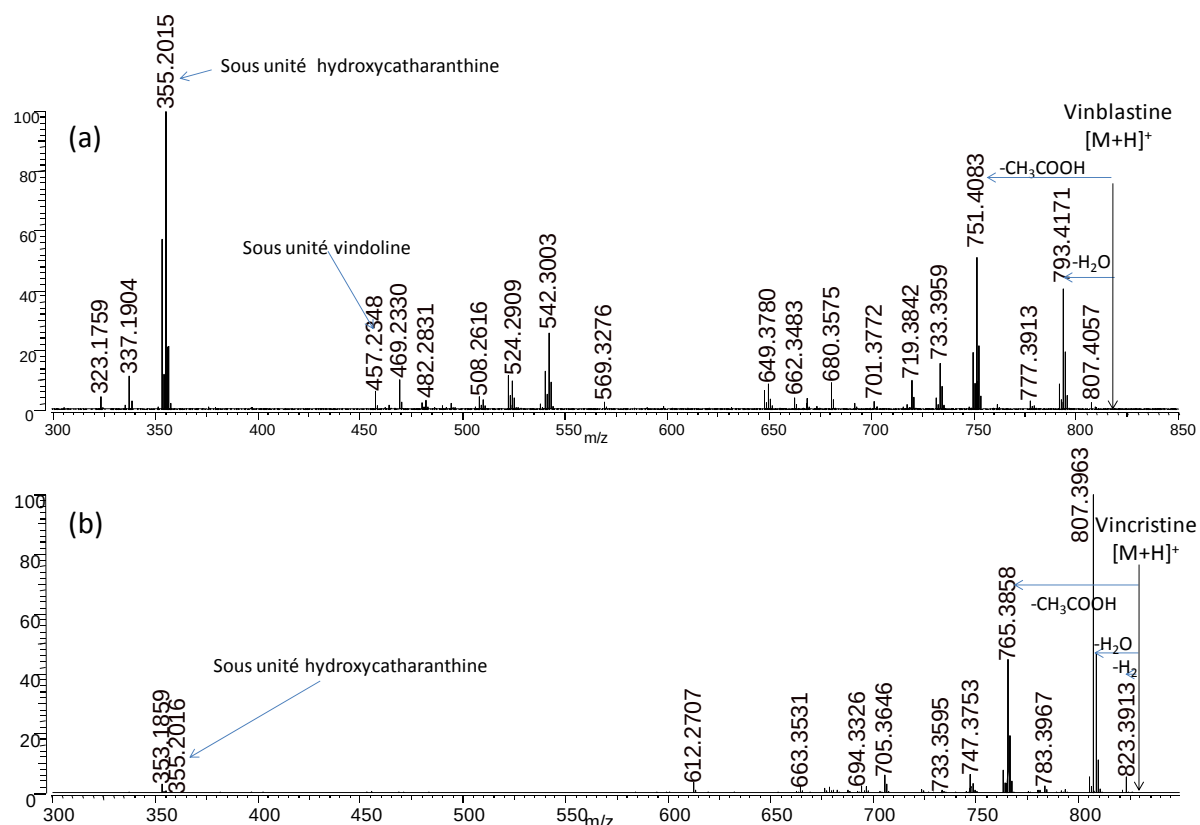


Figure 33 : Spectres SORI-CID MALDI-FTICRMS des pics attribués à la vinblastine (a) et à la vincristine (b) de l'extrait méthanol de Pervenche de Madagascar

Les spectres obtenus présentent des fragments correspondants aux espèces $-H_2$, $-H_2O$ et $-CH_3COOH$ des deux molécules (m/z = 809,41201 Th, 793,4171 Th et 751,4083 Th pour la vinblastine et m/z = 823,3913 Th, 807,3963 Th et 765,3858 Th pour la vincristine). A ces pics intenses s'ajoutent les pics correspondant à la sous-unité hydroxycatharanthine (ou velbanamine) présente dans les spectres de ces deux molécules (m/z = 355,2016 Th) et à la sous unité vindoline (m/z = 457,2348 Th) dans le cas de la fragmentation de la vinblastine. Ces données sont en accord avec les structures de ces deux standards et les données

retrouvées dans la bibliographie^{76,77}. Les schémas de fragmentation de la vinblastine et de la vincristine sont présentés en Figure 34 ci-après.

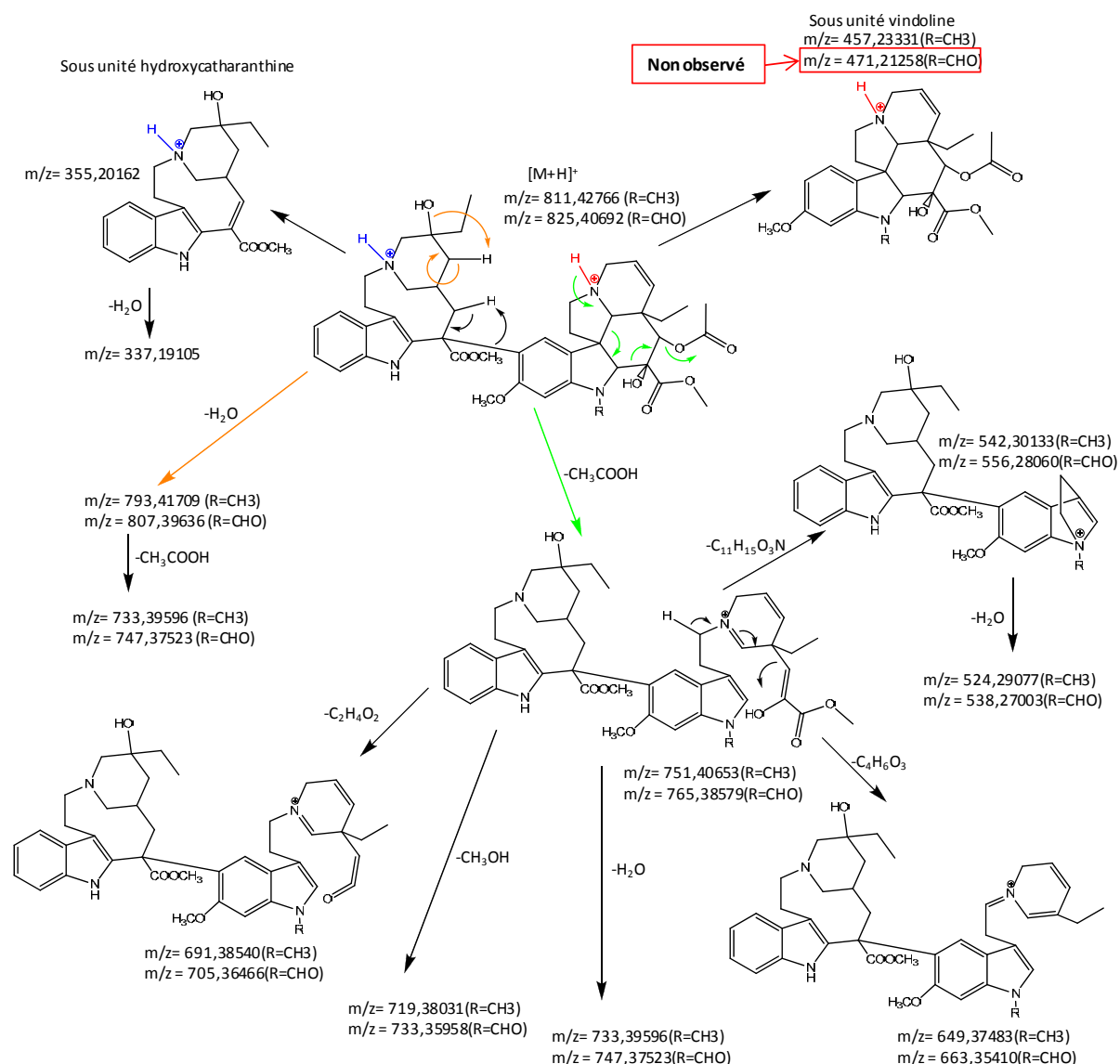


Figure 34 : schémas de fragmentation de la vinblastine (R=CH₃) et de la vincristine (R=CHO)

De par l'apport de toutes ces données concordantes, les attributions faites en MALDI-TOFMS pour l'extrait au méthanol de la Pervenche de Madagascar sont ainsi validées et pourront être utilisées lors de l'étape ultérieure de criblage.

Ensuite, notre attention s'est portée sur la validation, par MALDI-FTICRMS, des attributions faites précédemment pour l'extrait chloroformique de Pervenche de Madagascar.

⁷⁶ (76) Favretto, D.; Piovan, A.; Cappelletti, E. M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 982.

⁷⁷ (77) Trim, P. J.; Avery, J. L.; McEwen, A.; Snel, M. F.; Claude, E.; Marshall, P. S.; West, A.; Princivale, A. P.; Clench, M. "MALDI-ion mobility separation-MS imaging of vinblastine and its metabolites in rat tissues"; ASMS, 2008, Denver.

Pour ce faire 1 μL de l'extrait a été déposé avec 1 μL de matrice 2,5-DHB en mélange intime. Le spectre MALDI-FTICRMS de l'extrait chloroformique de la Pervenche de Madagascar est présenté en Figure 35 ci-après.

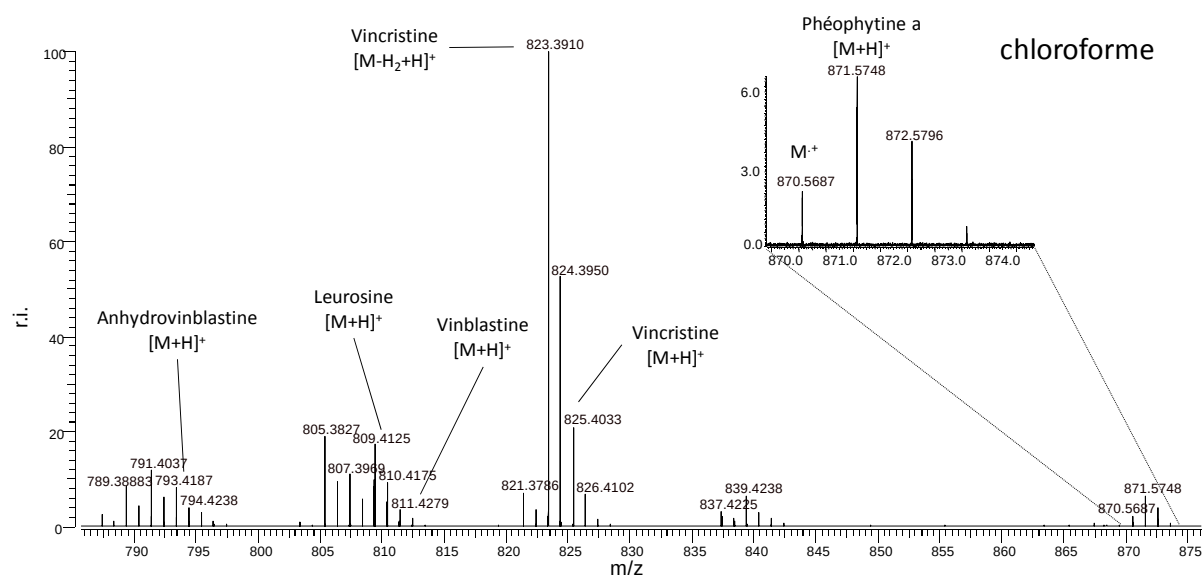


Figure 35 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) de l'extrait chloroforme de la Pervenche de Madagascar

Comme le montre le spectre, les espèces précédemment étudiées sont détectées également par MALDI-FTICRMS. Le pic à $m/z = 871,5748$ Th peut être attribué avec certitude à la phéophytine a ($[M+H]^+$ théorique = 871,5732 Th, erreur de 1,8 ppm). Là encore les attributions faites par MALDI-TOFMS sont validées et l'extrait pourra être utilisé en criblage.

En dernier lieu, les extraits de Pervenche réalisés à l'aide de dichlorométhane, de dichloroéthane ou de dibromométhane ont été eux aussi étudiés par MALDI-FTICRMS, en vue d'attribuer une formule brute aux espèces nouvelles (appelées M1 à M10) observées en MALDI-TOFMS.

Ainsi, 1 μL de l'extrait dichlorométhane de la Pervenche de Madagascar a été déposé sur la plaque avec 1 μL de solution de matrice 2,5-DHB en mélange intime. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 36(a)**.

Là encore, les mêmes espèces sont observées en MALDI-FTICRMS et en MALDI-TOFMS. En effet, dans le cas du dichlorométhane, l'**anhydrovinblastine**, la **leurosine**, la **vinblastine** et la **vincristine** sont détectées avec une précision sur la mesure de masse inférieure à 0,2 ppm (pour l'anhydrovinblastine $[M+H]^+_{\text{théorique}} = 793,41709$ Th, $[M+H]^+_{\text{mesuré}} = 793,4172$ Th, delta = 1,4 ppm, pour la leurosine $[M+H]^+_{\text{théorique}} = 809,41201$ Th, $[M+H]^+_{\text{mesuré}} = 809,4119$ Th, delta = 0,13 ppm, pour la vinblastine $[M+H]^+_{\text{théorique}} = 811,42766$ Th, $[M+H]^+_{\text{mesuré}} = 811,4277$ Th, delta = 0,05 ppm et pour la vincristine $[M+H]^+_{\text{théorique}} = 825,40692$ Th, $[M+H]^+_{\text{mesuré}} = 825,4068$ Th, delta = 0,14 ppm).

En étudiant les pics attribués à M1 et M2 (à $m/z = 841,3940$ Th et $m/z = 857,3888$ Th), il est possible, dans ces conditions de précision sur les mesures de masse, de déterminer les formules brutes correspondantes. Les résultats possibles pour M1 (erreur maximale de 3 ppm) sont présentés à titre d'exemple dans le

83

Tableau 6 : formules brutes probables pour la molécule M1 (erreur maximale 3 ppm)

m/z	Delta m/z	Formule brute
841.39377	0.00023	$C_{47}H_{58}N_4O_8Cl^+$
841.39463	-0.00063	$C_{52}H_{57}O_{10}^+$
841.39328	0.00072	$C_{50}H_{55}N_3O_9^+$
841.39511	-0.00111	$C_{49}H_{60}NO_9Cl^+$
841.39596	-0.00196	$C_{53}H_{53}N_4O_6^+$

Ainsi, les formules brutes les plus probables de ces deux composés sont pour **M1** $C_{47}H_{58}N_4O_8Cl^+$ (écart de 0,30 ppm par rapport à la masse théorique correspondante avec l'isotope 35 du chlore). La même démarche a été faite pour **M2** et mène à la formule brute suivante : $C_{47}H_{58}N_4O_9Cl^+$ (écart de 0,14 ppm).

De plus, l'hypothèse de la présence de chlore au sein de ces molécules est validée par l'étude des massifs isotopiques caractéristiques de ces deux molécules. D'autre part, du fait de la présence de chlore, les massifs isotopiques de ces molécules doivent présenter deux pics à M+2 (843 Th et 859 Th respectivement pour M1 et M2): l'un du fait de la présence de l'isotope 37 du chlore (^{37}Cl) et l'autre du fait de la présence de deux carbones 13 ($^{13}C_2$). Cependant, l'étude expérimentale des pics à M+2 se révèle plus complexe (**Figure 36(b)**). En effet, dans les deux cas, 3 pics sont présents là où 2 seulement étaient attendus. L'attribution des deux premiers pics est dans les deux cas conforme à celle attendue : M1 ^{37}Cl $[C_{47}H_{58}N_4O_8^{37}Cl]^+ = 843,3916$ Th (erreur de 0,9 ppm), M1 $^{13}C_2$ $[C_{45}^{13}C_2H_{58}N_4O_8Cl]^+ = 843,4008$ Th (erreur de 0,35 ppm) et M2 ^{37}Cl $[C_{47}H_{58}N_4O_9^{37}Cl]^+ = 859,3866$ Th (erreur de 1 ppm), M2 $^{13}C_2$ $[C_{45}^{13}C_2H_{58}N_4O_9Cl]^+ = 859,3947$ Th (erreur de 0,8 ppm).

Les troisièmes pics de ces deux distributions à m/z = 843,4096 Th et m/z = 859,4039 Th ont quand à eux pour formules brutes respectives $C_{47}H_{60}N_4O_8Cl^+$ et $C_{47}H_{60}N_4O_9Cl^+$ (erreurs de 0,21 et 0,5 ppm par rapport aux masses théoriques correspondantes) et sont appelés **M3** et **M4** respectivement.

En comparant les formules brutes obtenues pour ces 4 espèces avec celles des alcaloïdes référencés dans les extraits de Pervenche de Madagascar, il advient que **les molécules M1, M2, M3 et M4 peuvent être respectivement des adduits $[M+CH_2Cl]^+$ de l'anhydrovinblastine, de la leurosine, de la 4'deoxyvinblastine et de la vinblastine** par le fait d'une réactivité de ces alcaloïdes avec le dichlorométhane (ce point sera développé plus

loin). Ces adduits chargés positivement doivent présenter, selon ce mécanisme réactionnel, un atome de chlore comme contre anion. La présence d'une telle espèce en solution est validée par l'analyse en basse masse en MALDI-TOFMS (mode de détection négatif) de ce même extrait (**Figure 36(c)**).

De même, 1 μL de l'extrait de Pervenche de Madagascar par le dichloroéthane a été déposé avec 1 μL de la solution de matrice 2,5-DHB puis analysé en MALDI-FTICRMS. Le spectre obtenu est présenté en Figure 37.

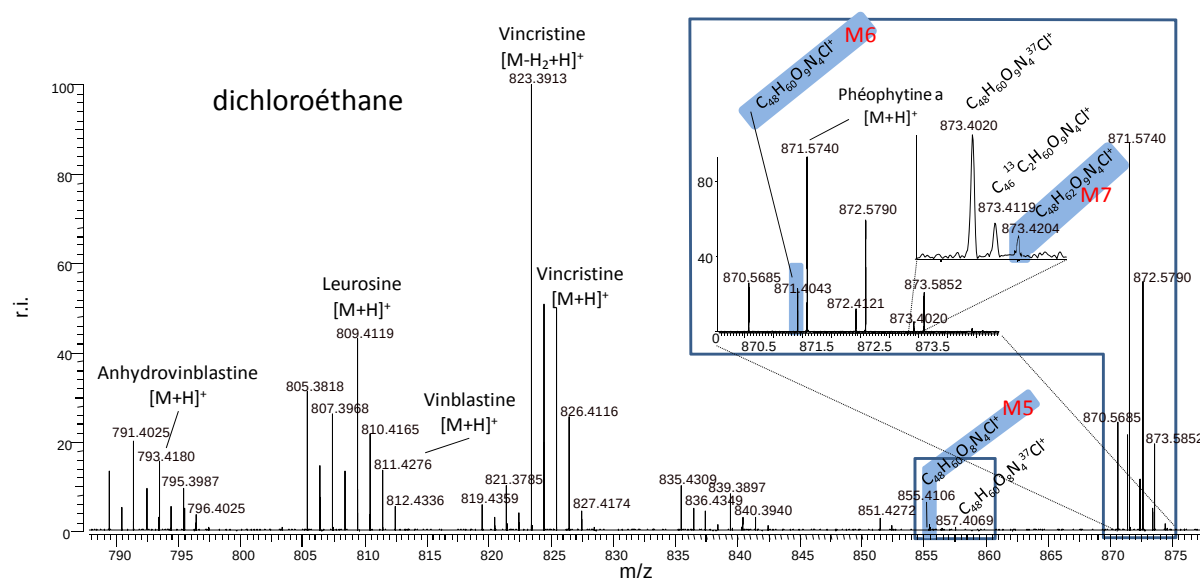


Figure 37 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) de l'extrait dichloroéthane de Pervenche de Madagascar

Comme le montre le spectre de masse, des signaux caractéristiques de l'**anhydrovinblastine**, de la **leurosine**, de la **vinblastine**, de la **vincristine** et de la **phéophytine a** sont observés lors de l'analyse de l'extrait dichloroéthane (erreurs inférieures à 0,5 ppm). Là encore, la précision sur la mesure de masse et la résolution (600000 m/ Δ m) atteintes permettent d'attribuer aux trois espèces M5, M6 et M7 des formules brutes probables. Ainsi, **M5**, observée à m/z = 855,4106 Th, a pour formule brute probable **C₄₈H₆₀N₄O₈Cl⁺** (erreur de 0,7 ppm). **M6**, observée à m/z = 871,4043 Th, a pour formule brute **C₄₈H₆₀N₄O₉Cl⁺** (erreur de 0,05 ppm) et **M7** observée à m/z = 873,4204 Th a pour formule brute **C₄₈H₆₂N₄O₉Cl⁺** (erreur de 0,5 ppm). Il est à noter que dans ce dernier cas, la résolution de l'appareil permet de faire nettement la différence entre les pics de la phéophytine-a (m/z = 871,5740 Th et m/z = 873,5852 Th) et ceux de M6 et M7 (m/z = 871,4043 Th et m/z = 873,4204 Th) là où seulement un épaulement était visible en MALDI-TOFMS.

Là encore, comme dans le cas de l'extrait au dichlorométhane, il pourrait s'avérer que **les trois espèces M5, M6 et M7 soient des adduits $[M+C_2H_4Cl]^+$ de l'anhydrovinblastine, de la leurosine et de la vinblastine**. La 4'-deoxyvinblastine, bien que faiblement détectée dans l'extrait, ne semble pas réagir avec le dichloroéthane. Cependant, les espèces d'adduits sont moins intensément observées qu'avec le dichlorométhane, allant dans le sens d'une moindre réactivité des alcaloïdes avec ce solvant. Lors de l'analyse en basse masses par MALDI-TOFMS en mode de détection négatif, le chlore est là aussi détecté, signant la présence du contre anion.

Enfin, le dernier extrait de Pervenche de Madagascar à être analysé par MALDI-FTICRMS a été l'extrait dibromométhane. 1 μ L de cet extrait a été déposé en mélange intime avec 1 μ L de la solution de matrice 2,5-DHB. Le spectre de masse obtenu est présenté en Figure 38.

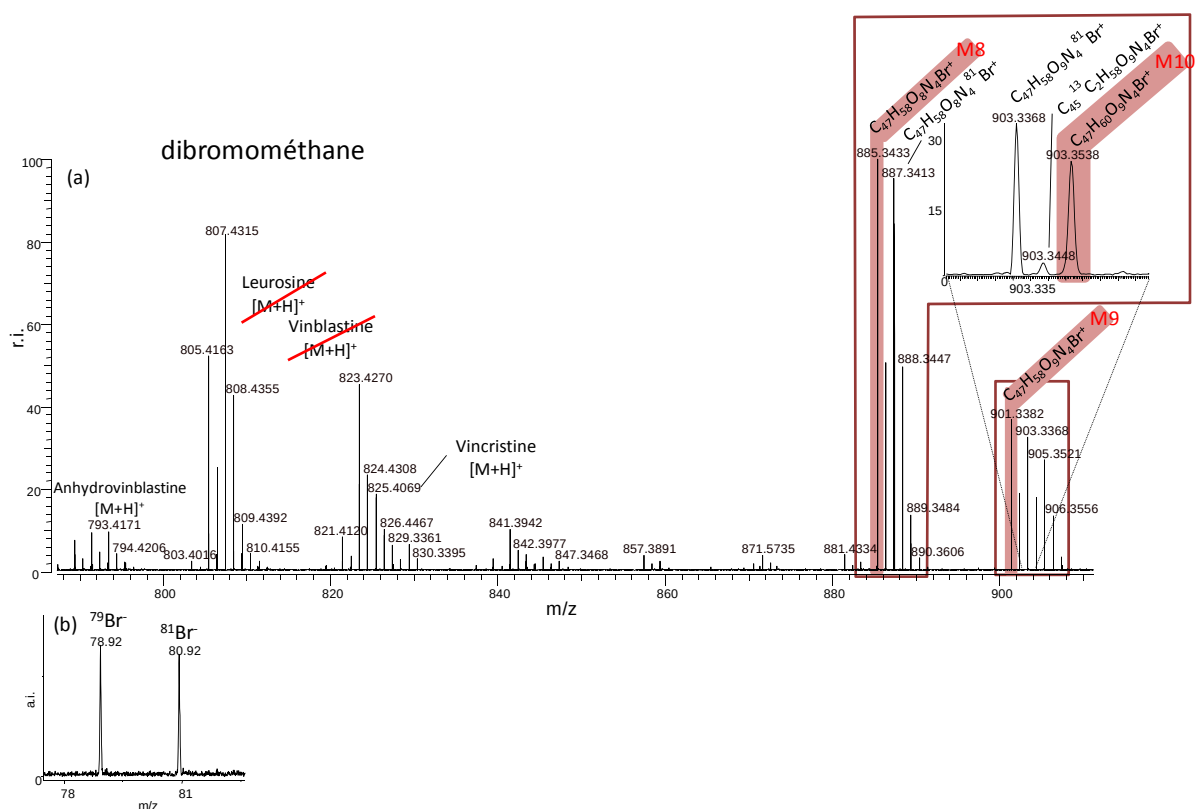


Figure 38 : (a) Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime, mode de détection positif) de l'extrait dibromométhane de Pervenche de Madagascar ; (b) Analyse MALDI-TOFMS (2,5-DHB, mélange intime, mode de détection négatif) de la présence de brome dans l'extrait dibromométhane de la Pervenche de Madagascar

Ce spectre est différent de ceux obtenus avec les autres solvants car les pics correspondants à la leurosine et la vinblastine ne sont ici pas observés. Le pic de l'**anhydrovinblastine** est lui bien présent ($m/z = 793,4171$ Th, erreur de 0,02 ppm), mais son intensité relative est plus faible que précédemment. Le pic de la **vincristine** ($m/z = 825,4069$ Th, erreur de 0,03 ppm) est lui observé sans modification importante de son intensité.

Dans ces conditions, les formules brutes probables attribuées à M8, M9 et M10 (observées respectivement à $m/z = 885,3433$ Th, $901,3382$ Th et $903,3538$ Th) sont les suivantes : **M8** $C_{47}H_{58}N_4O_8Br^+$, **M9** $C_{47}H_{58}N_4O_9Br^+$ et **M10** $C_{47}H_{60}N_4O_9Br^+$ (erreurs respectives de 0,05 ppm, 0,03 ppm et 0,03 ppm).

Dans ce cas encore, par comparaison de formules brutes avec les alcaloïdes référencés dans les extraits de Pervenche de Madagascar, **les molécules M8, M9 et M10 pourraient être respectivement des adduits $[M+CH_2Br]^+$ de l'anhydrovinblastine, de la leurosine et de la vinblastine**. Ces molécules sont observées très intensément au point de ne plus pouvoir détecter de signaux correspondant aux molécules standard non modifiées (leurosine et vinblastine notamment), ceci allant dans le sens d'une réactivité importante des alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar pour le dibromométhane. Comme le montre la Figure 38(b), des signaux caractéristiques du brome sont détectés en mode négatif en MALDI-TOFMS, cela aussi allant dans le sens d'une réactivité des alcaloïdes avec le solvant impliquant, après réaction la présence d'un contre anion.

Le Tableau 7 ci-après présente l'ensemble des données relatives aux 10 nouvelles molécules que nous avons mises en évidence.

Tableau 7 : Récapitulatif des formules brutes et des M^+ théoriques et expérimentaux des 10 adduits d'alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar

Nom	Formule brute	M^+ théorique	M^+ expérimental	Erreur (ppm)
M1	$C_{47}H_{58}N_4O_8Cl^+$	841,39377	841,3940	0,3
M2	$C_{47}H_{58}N_4O_9Cl^+$	857,38868	857,3888	0,14
M3	$C_{47}H_{60}N_4O_8Cl^+$	843,40942	843,4096	0,21
M4	$C_{47}H_{60}N_4O_9Cl^+$	859,40433	859,4039	0,5
M5	$C_{48}H_{60}N_4O_8Cl^+$	855,40942	855,4106	0,7
M6	$C_{48}H_{60}N_4O_9Cl^+$	871,40433	871,4043	0,05
M7	$C_{48}H_{62}N_4O_9Cl^+$	873,41998	873,4204	0,5
M8	$C_{47}H_{58}N_4O_8Br^+$	885,34325	885,3433	0,05
M9	$C_{47}H_{58}N_4O_9Br^+$	901,33817	901,3382	0,03
M10	$C_{47}H_{60}N_4O_9Br^+$	903,35382	903,3538	0,03

Pour valider nos hypothèses de formation d'adduits d'alcaloïdes avec différents solvants, nous avons effectué une expérience de vieillissement de molécules standards, pures, (la leurosine et la vinblastine) à 5.10^{-6} M dans du dichlorométhane. Les solutions obtenues sont indifféremment laissées vieillir 15 jours à température ambiante, avant d'être analysées par MALDI-FTICRMS (matrice 2,5-DHB en mélange intime) (Figure 39).

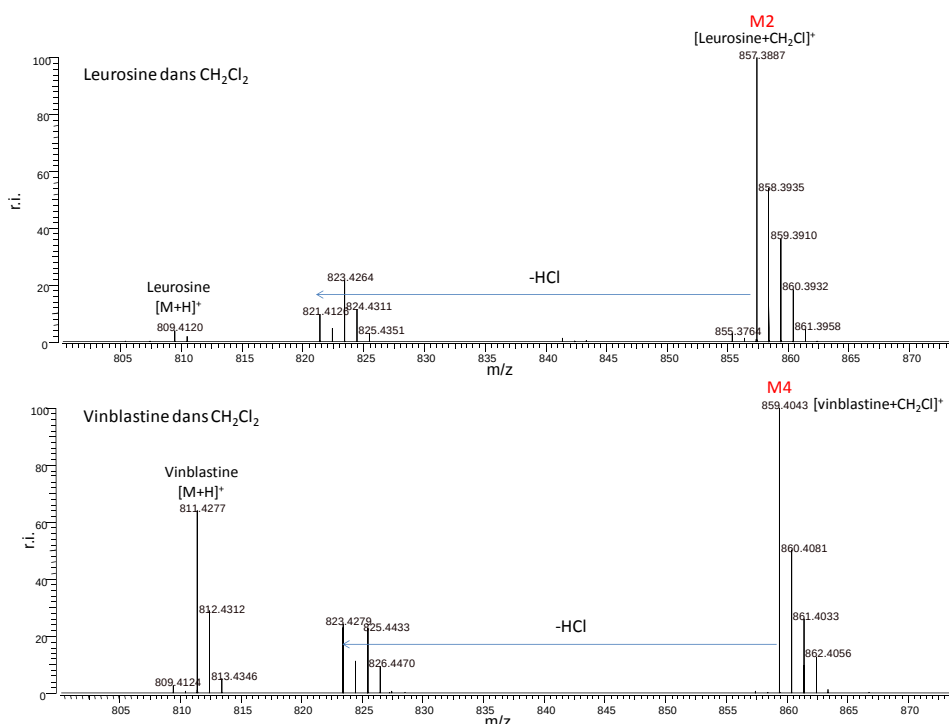


Figure 39 : Spectres MALDI-FTICRMS (2,5-DHB mélange intime) de la leurosine et de la vinblastine (5.10^{-6} M) en solution dans du dichlorométhane

Comme le montrent les spectres, lorsque la leurosine ou la vinblastine sont mises à vieillir dans du dichlorométhane, les pics d'adduits correspondants $[M+CH_2Cl]^+$ (appelés précédemment M1 et M4) sont observés à $m/z = 857,3887$ Th et $m/z = 859,4043$ Th (erreurs inférieures à 0,1 ppm). Il est également à noter que pour un même temps de vieillissement, la transformation de la leurosine est plus importante de celle de la vinblastine, se traduisant par la presque totale disparition de son pic pseudomoléculaire ($m/z = 809,4120$ Th). De plus, des pics pouvant correspondre à une perte d'HCl à partir des molécules M2 et M4 sont observés sur les spectres, sans doute reflets de conditions d'analyses trop énergétiques ($m/z = 821,4128$ Th et $m/z = 823,4279$ Th respectivement). Cette perte d'HCl est donc très facilement observable et, de ce fait, ne doit pas nécessiter beaucoup d'énergie pour se produire.

La présence d'halogène (chlore ou brome) dans les molécules M1 à M10 a été également vérifiée par MSMS. Pour ce faire, les différents pics correspondants à ces molécules ont été isolés puis fragmentés par SORI-CID au sein de la cellule d'analyse du FTICRMS. Les résultats obtenus pour les différents composés sont présentés en Figure 40.

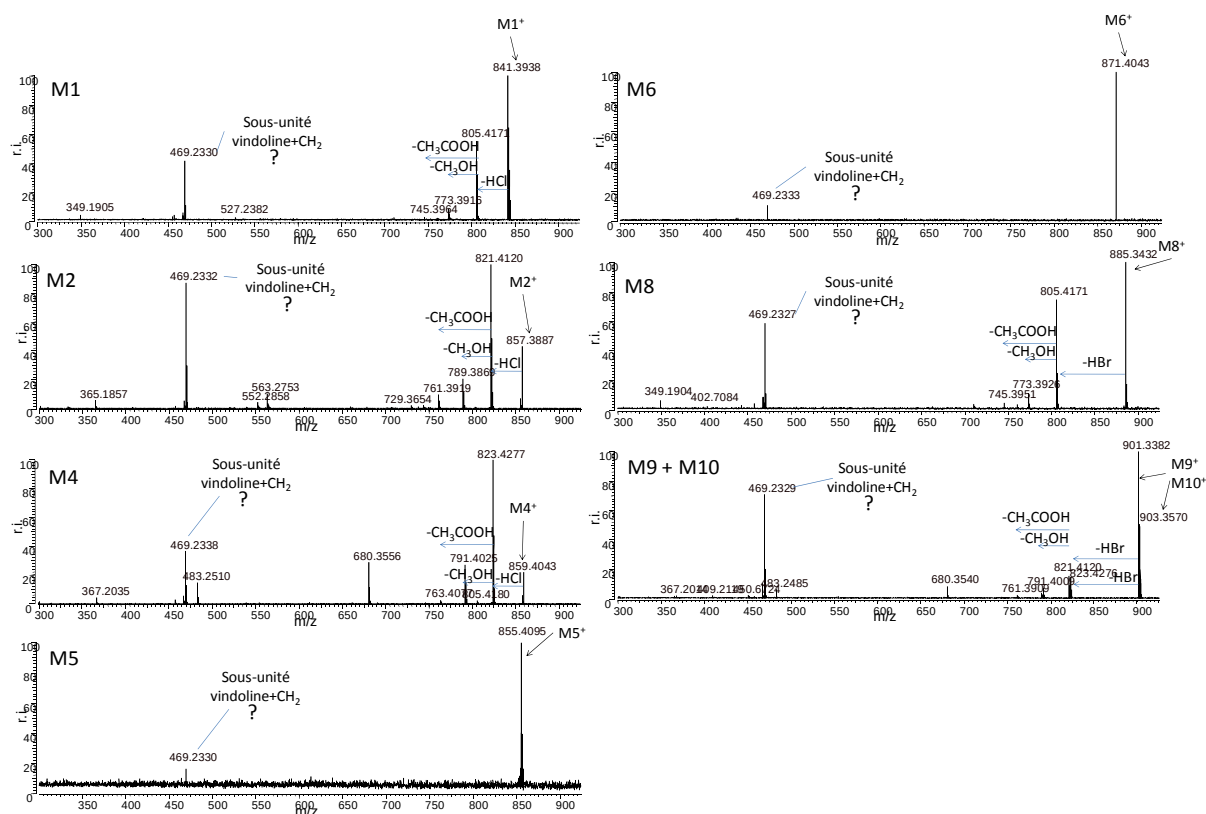


Figure 40 : Spectres SORI-CID-MALDI-FTICRMS (MS²) de M1, M2, M4, M5, M6, M8, M9 et M10

Les spectres SORI-CID (MS²) des différentes molécules d'adduits donnent tous des informations équivalentes. Il faut tout d'abord préciser qu'aucun spectre de qualité suffisante n'a pu être acquis, même en accumulant plusieurs expériences, pour les molécules M3 et M7 du fait que ces espèces ne sont pas présentes de manière assez intense dans les extraits. Les spectres de fragmentation présentent un premier pic intense correspondant à une perte moyenne de 35,9767 Th pour M1, M2 et M4 ou de 79,9262 Th pour M8, M9 et M10. Ces pics correspondent à la perte d'HCl (mw = 35,97668 g.mol⁻¹, erreur de 0,5 ppm) pour M1, M2 et M4 (les adduits chlorés des alcaloïdes) d'une part ou d'HBr (mw = 79,92616 g.mol⁻¹, erreur de 0,5 ppm) pour M8, M9 et M10 (les adduits bromés) d'autre part. Il est à noter que les adduits formés à partir du dichloroéthane (M5 et M6) ne donnent pas de fragments -HCl lorsqu'étudiés en MS². Ceci peut vouloir dire que la perte d'HCl nécessite la présence d'une

chaîne courte (un seul maillon carbone), pour pouvoir être effective. Le mécanisme de cette fragmentation sera détaillé plus loin.

A partir de ce pic $[M-HCl]^+$ ou $[M-HBr]^+$ (-HX), une série de fragmentations (vérifiées par MS^3) sont observées, identiques quelle que soit l'espèce. Ces fragmentations correspondent à des pertes de CH_3OH et CH_3COOH , signant respectivement la présence de groupement $-OCH_3$ et $-COOCH_3$ dans ces différentes molécules.

Un deuxième pic intense des spectres de fragmentation est commun à l'ensemble des espèces. Il est détecté au m/z moyen de 469,2332 Th. Il est possible d'attribuer à ce pic la formule brute suivante : $[C_{26}H_{33}N_2O_6]^+$, correspondant à **une sous-unité vindoline à laquelle un $-CH_2$ est ajouté (erreur de 0,23 ppm)**. Il est important de préciser ici que ce pic est obtenu également lors d'expériences MS^3 qui consistent à fragmenter une nouvelle fois les espèces -HX obtenues à partir des adduits, ainsi qu'en MS^2 à partir de la vinblastine.

Le spectre MS^3 en mode SORI-CID de l'ion à 469,2332 Th est présenté en Figure 41.

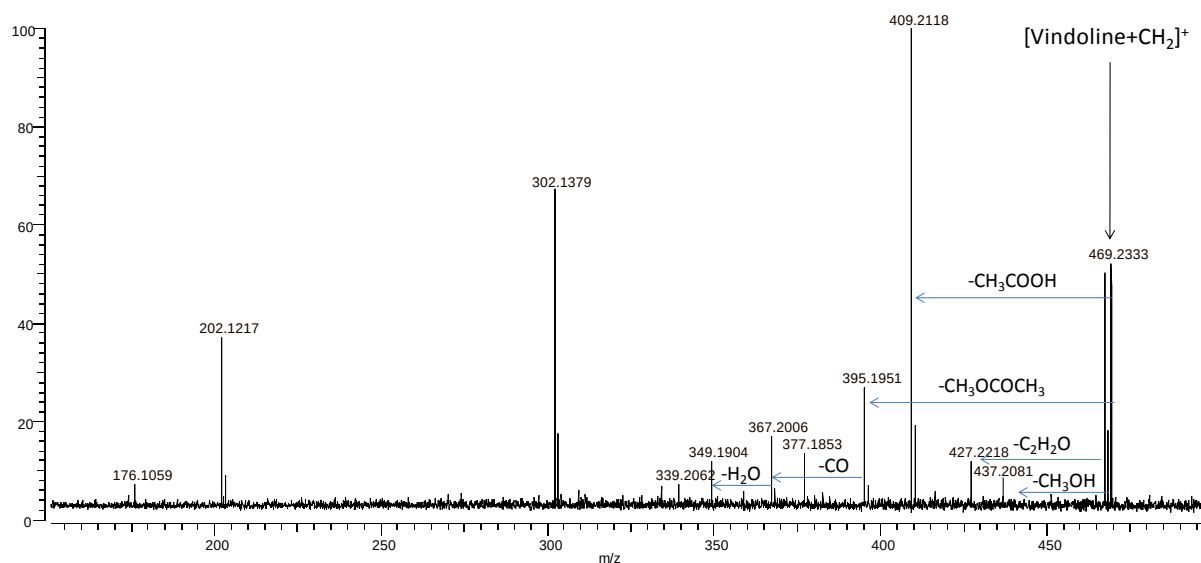


Figure 41 : Spectre MS^3 du fragment $[vindoline+CH_2]^+$ commun à tous les adduits (SORI-CID-MALDI-FTICRMS)

Le spectre MS^3 en mode SORI-CID de l'ion à $m/z = 469,2332$ Th donne des fragments à $-COOCH_3$, à $-CH_3OH$ et à $-CH_3OCOCH_3$. Ces données permettent de mettre en évidence la présence de fonctions $-COOCH_3$, $-OCOCH_3$, $-CH_3$ et ou $-OCH_3$ dans la structure de cet ion à $m/z = 469,23331$ Th. En première analyse, ces éléments sont compatibles avec l'attribution de cette espèce à une sous-unité vindoline modifiée comportant un $-CH_2$ supplémentaire. Par ailleurs, il faut remarquer que les spectres MS^2 de la vinblastine présente

lui aussi ce fragment alors qu'il n'est pas observé lors de la fragmentation de la vincristine (Figure 33).

Il ressort de l'ensemble de ces informations que :

- **les molécules d'adduit possèdent un atome de chlore ou de brome** ($X = \text{Cl}$ ou Br)
- **leurs structures présentent toutes la même sous-unité vindoline, indépendamment de la nature de l'adduit** ($+\text{CH}_2\text{X}$ pour M1, M2, M3, M4, M8, M9 et M10 ou $+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}$ pour M5, M6 et M7, $+\text{H}$ pour la vinblastine). L'adduit doit donc avoir lieu sur la sous-unité catharathine de ces molécules (sous unité de gauche).
- **aucune déshydratation de ces molécules n'a été observée** lors de ces études MS^2 . Or **le pic correspondant à la déshydratation est le fragment majoritaire observé pour les molécules non modifiées** (Figure 33). Il a été établi par ailleurs que le groupement mis en jeu lors de cette perte d'eau est l'hydroxyle en position 4' du cycle D' (Figure 4)⁷⁸. De ce fait, la présence de l'adduit, et la perte préférentielle de $-\text{HX}$ induite, semble diminuer cette possibilité de déshydratation en 4'-3' ou 4'-5'. **L'adduit doit donc être situé à proximité du point 4'-3' ou 4'-5', sur le cycle D' des alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar.**
- l'adduit doit être situé à une position d'où il **permet un départ favorisé de la sous-unité dérivée de la vindoline** car ce fragment est observé de manière très intense sur l'ensemble des spectres SORI-CID (Figure 40). La formation de ce fragment doit impliquer l'azote 1 (Figure 4) car une modification du groupement y étant lié ($-\text{CH}_3$ remplacé par un $-\text{CHO}$), comme dans le cas de la vincristine, empêche son observation.

L'hypothèse avancée de la formation d'adduits d'alcaloïdes par réaction avec le solvant semble donc être validée, d'autant plus que des phénomènes similaires ont déjà été décrits. En effet, des travaux relatent la formation de sels d'ammonium quaternaires

⁷⁸ (78) Miller, J. C.; Gutowski, G. E.; Poore, G. A.; Boder, G. B. *Journal of medicinal chemistry* **1976**, 20, 409.

d'alcaloïdes par action de solvants halogénés sur des amines tertiaires⁷⁹. Ces études ont d'abord porté sur l'iodure et le bromure de méthyle, puis sur le dibromométhane et le diiodométhane et seulement peu d'exemples montrent une réactivité du dichlorométhane. Cependant, un certain nombre d'alcaloïdes, dont ceux de la Pervenche de Madagascar, réagissent suffisamment vite pour former des adduits. Divers travaux de caractérisation des adduits formés ont permis de placer le site de réaction sur l'azote tertiaire de la sous unité catharanthine des alcaloïdes et ont établi un ordre de réactivité tel que la leurosine réagirait plus vite que l'anhydrovinblastine et la vinblastine et en dernier lieu seulement la vincristine³⁵. Une caractérisation par rayons X d'un adduit [leurosine+CH₃]⁺, formé par la mise en solution de leurosine en présence d'iodure de méthyle, a également été publiée et décrit l'adjonction d'un groupement –CH₃ sur l'azote 6' du cycle D' de la leurosine⁸⁰ (cf Figure 4).

Ces données valident nos hypothèses et il nous est possible de proposer une structure pour les différentes molécules M1 à M10 (**Figure 42**)

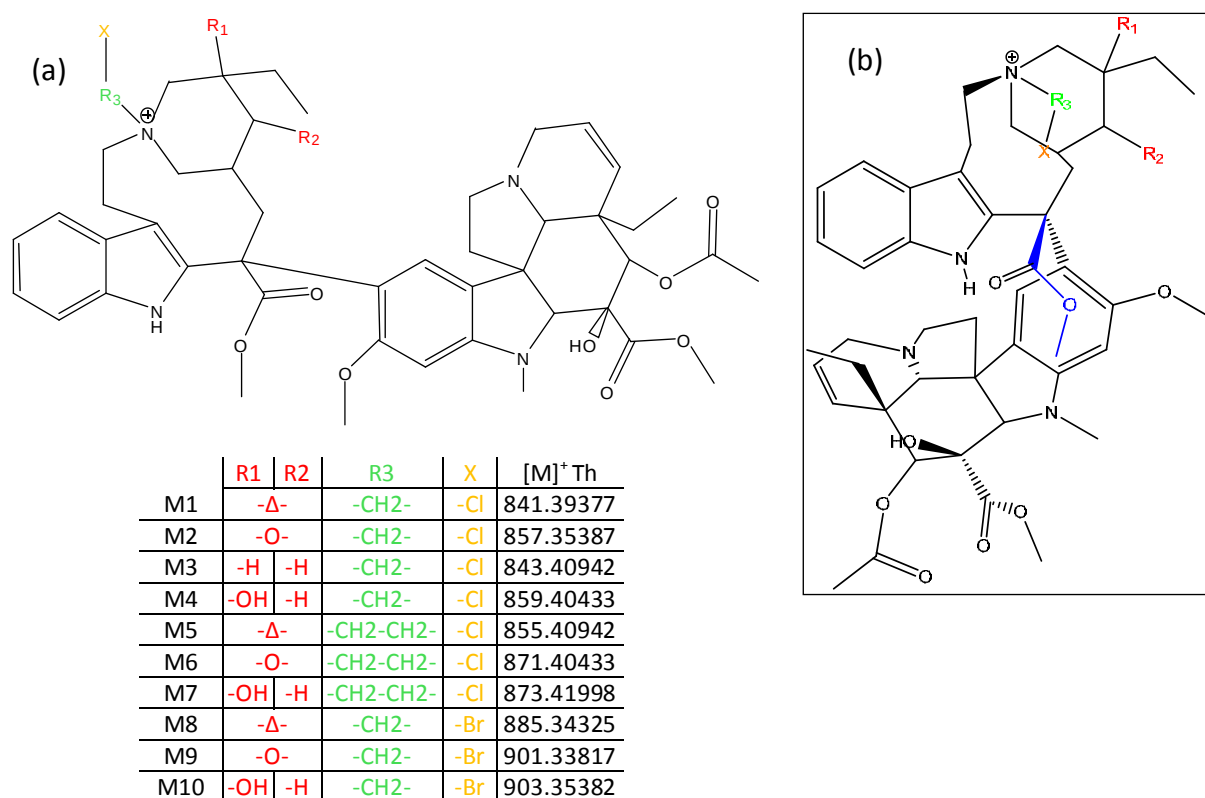


Figure 42 : (a) Proposition de structures des adduits d'alcaloïdes M1 à M10 ; (b) proposition de structure tridimensionnelle des adduits (inspirée de la structure de la leurosine+CH₃)⁸⁰

⁷⁹ (79) Besselièvre, R.; Langlois, N.; Potier, P. *Bulletin de la société chimique de france* **1972**, 4, 1477.

⁸⁰ (80) Hardouin, C.; Doris, E.; Rousseau, B.; Mioskowski, C.; Nierlich, M. *acta crystallogr C*. **1999**, 225.

A partir de cette structure, il est possible d'établir un mécanisme probable de fragmentation MS^2 de ces espèces aboutissant à la formation d'un ion à $m/z = 469,23331$ Th stabilisé par de nombreuses formes mésomères et pouvant présenter les fragmentations mises en évidence lors des expériences MS^3 (Figure 43).

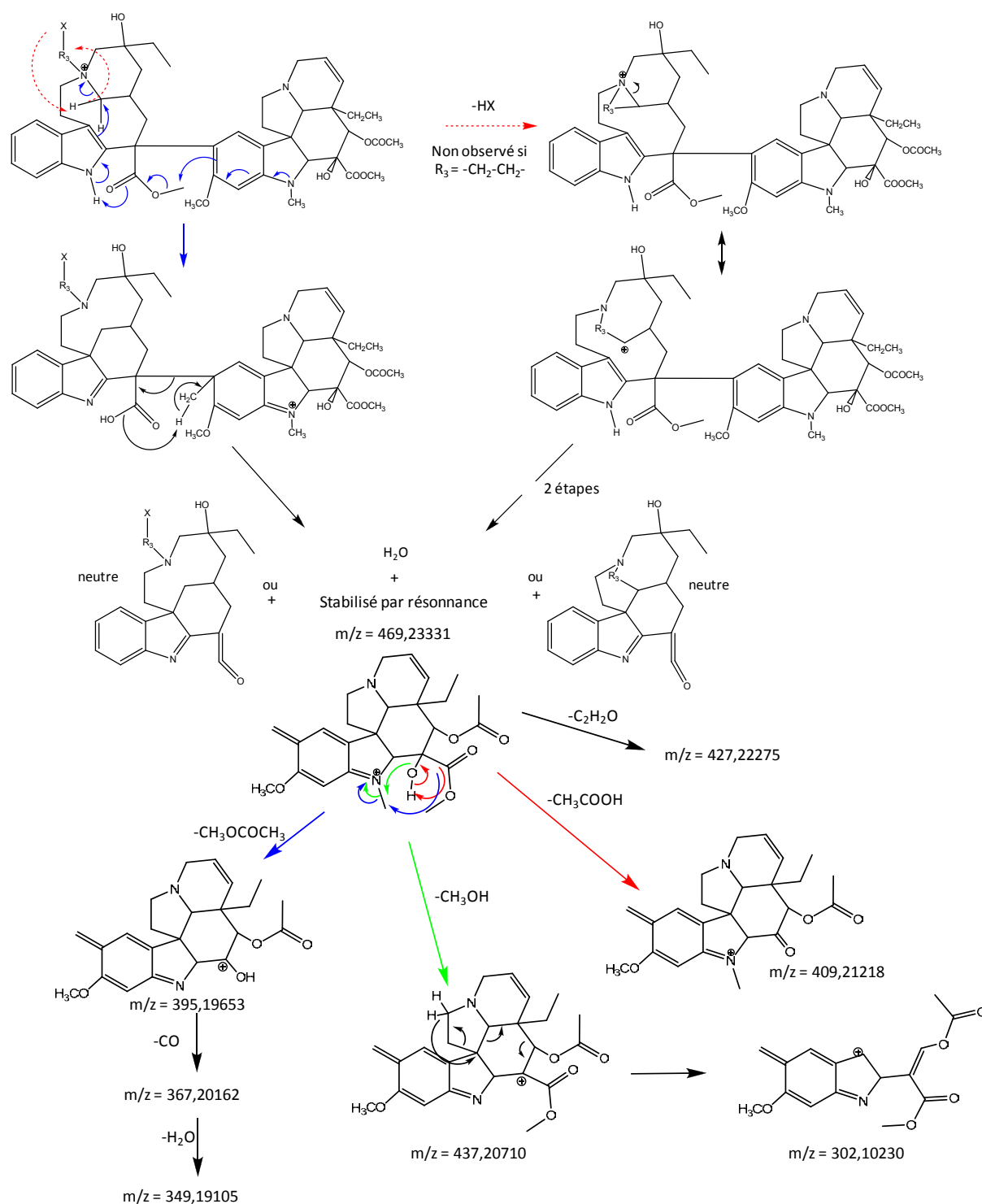


Figure 43 : Proposition de mécanisme de formation de l'ion à $m/z = 469,2332$ Th observé pour tous les adduits par MS^2 et hypothèse de fragmentation MS^3

L'ensemble de ces données doit encore être validé. Les adduits feront ainsi l'objet d'une caractérisation fine par RMN de manière à valider leurs structures (en collaboration avec le laboratoire de RMN de l'institut de recherche en chimie organique fine de l'Université de Rouen). D'autre part le mécanisme de formation de l'ion à $m/z = 469,23331$ Th sera étudié par la mise en œuvre de calculs de chimie théorique (en collaboration avec le laboratoire de chimie et biochimie théorique de l'Université Henri Poincaré de Nancy).

Ainsi, nous avons pu caractériser finement les extraits de Pervenche de Madagascar et leur réactivité vis-à-vis de certains solvants organiques, délétère lorsque c'est la purification des alcaloïdes qui est visée, nous permet d'augmenter le nombre des espèces présentes en vue du criblage de leur liaison à la tubuline.

3. Test de criblage primaire

a. Criblage primaire par MALDI-TOFMS de témoins liant la tubuline

Nous allons présenter et discuter les résultats que nous avons obtenus dans le cadre de la mise en place de nos tests de criblage de la liaison de composés à la tubuline. Ainsi, dans un premier temps nous décrirons les résultats obtenus quand à l'optimisation de la détection par MALDI-TOFMS des molécules d'intérêt sur lesquelles a portée notre étude. Nous détaillerons ainsi les paramètres qui nous ont permis d'obtenir des signaux de qualité pour la cible moléculaire protéique, la tubuline, par MALDI-TOFMS en mode linéaire. Nous nous intéresserons ensuite à l'analyse des témoins positifs se liant à la tubuline (colchicine, vinblastine et vincristine). Dans un deuxième temps nous nous attacherons à présenter les résultats que nous avons obtenus lors du criblage primaire de la liaison de composés à la tubuline, selon le protocole décrit précédemment.

Dans ce paragraphe nous allons nous attacher à présenter les résultats obtenus lors de la mise en place et du développement des tests de criblage primaire des deux cibles moléculaires. **Le but d'un test de criblage primaire étant de faire un tri entre des molécules ayant ou n'ayant pas d'affinité pour la cible choisie.** Les informations générées à ce niveau sont donc uniquement qualitatives : oui ou non une molécule se lie à la cible. Nous allons ainsi présenter les résultats obtenus lors de l'analyse directe des molécules étalon

(dont on connaît l'activité) liées ou non à leurs cibles. Dans un premier temps nous présenterons les résultats obtenus pour le criblage de la liaison de composés à la tubuline. Nous nous intéresserons ensuite à la validation des résultats obtenus par l'évaluation de la spécificité, de la répétabilité, de la reproductibilité, de la robustesse et la détermination des facteurs de qualité propres à ces tests de criblages et permettant d'évaluer la qualité de la réponse.

Le but de ce travail est d'**étudier si un composé montre une capacité à se lier à la tubuline** (cible impliquée dans le traitement de nombreux cancers). Nous avons développé un protocole basé sur trois étapes majeures qui sont illustrées dans le chapitre II. La première étape implique la mise en contact de la molécule à tester avec la tubuline. 100µL d'une solution aqueuse de tubuline (2.10^{-5} M) et de sels de sulfate de colchicine (5.10^{-5} M), de vinblastine (5.10^{-5} M) ou de vincristine (5.10^{-5} M) sont incubés à 37°C pendant une heure. La deuxième étape concerne la séparation des espèces non liées à la cible. Cette étape est assurée par l'utilisation d'un microconcentrateur dont la membrane permet de retenir spécifiquement les composés dont la masse moléculaire est supérieure à 30000 g/mol. 100µL des différentes solutions incubées sont ajoutés dans le compartiment haut du dispositif et centrifugés à 12000 tours par minute pendant 12 minutes. Les membranes des filtres sont lavées trois fois par ajout de 100µL d'eau ultrapure suivi à chaque fois d'une centrifugation (12 min, 12000 rpm). Cela doit permettre de s'assurer de l'élimination des composés non liés. Tout signal d'une des molécules à tester, obtenu par MALDI-TOFMS à partir de cette étape, ne pourra donc qu'être relatif à des espèces préalablement liées à la tubuline. Les composés qui sont retenus sur la membrane au bout des trois lavages sont ensuite élués par 25 µL d'eau ultrapure.

Il apparaît ici que l'élimination des espèces non liées à la tubuline est une étape cruciale. Il a donc été essentiel de valider le fait qu'aucun composé retrouvé dans la solution après le cycle de lavage ne pouvait avoir été retenu de manière non spécifique sur la membrane du microconcentrateur. Ainsi, une série de lavages des membranes par 100µL d'eau ultrapure a été mise en œuvre pour différents microconcentrateurs ayant préalablement servi à filtrer des solutions de colchicine, vinblastine et vincristine à la même concentration (5.10^{-5} M). Les solutions obtenues en éluant les composés retenus sur les membranes des microconcentrateurs, à chaque étape, ont été analysées par MALDI-TOFMS avec le 2,5-DHB comme matrice. Les résultats sont présentés en Figure 44.

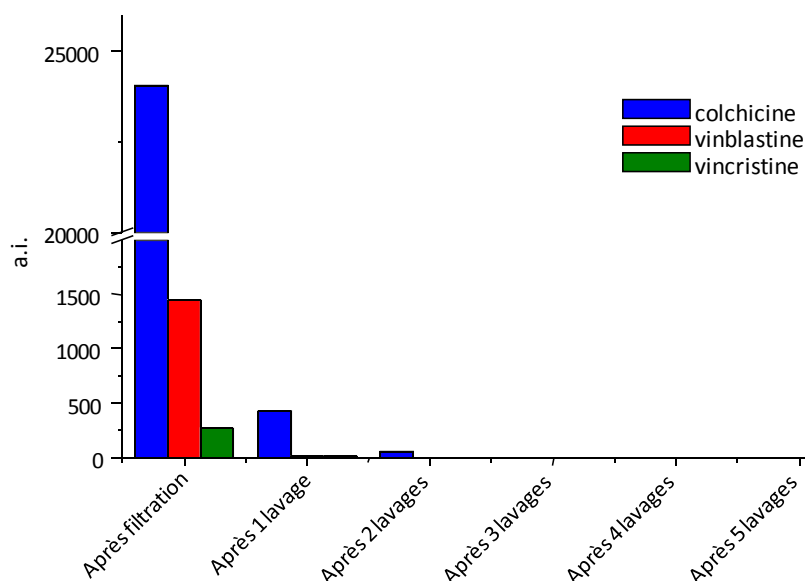


Figure 44 : Intensités absolues des pics pseudomoléculaires obtenus par MALDI-TOFMS pour les composés (colchicine, vinblastine ou vincristine) retenus sur les membranes des microconcentrateurs (mode réflectron, mode de dépôt par mélange intime, matrice 2,5-DHB)

Les signaux obtenus par MALDI-TOFMS pour les trois molécules après un lavage de la membrane sont au moins 50 fois plus faibles comparés à ceux obtenus juste après la filtration des solutions. Après deux lavages, pratiquement aucun signal correspondant aux molécules filtrées n'est mis en évidence par MALDI-TOFMS. Quoiqu'il en soit, pour s'assurer que toute molécule non liée à la tubuline soit éliminée avant l'étape d'élution, il a été décidé de **faire systématiquement trois lavages successifs avant d'éluer les composés retenus sur les membranes des microconcentrateurs.**

Après ces deux étapes principales d'échantillonnage, la troisième étape du protocole est l'analyse directe par MALDI-TOFMS des éluats obtenus, de manière à déterminer si ils contiennent des molécules montrant une activité de type liaison à la tubuline (en étant pas éliminées lors de l'étape de lavage).

Ainsi, 100µL de différentes solutions de tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M) et de colchicine, vinblastine ou vincristine (à $5 \cdot 10^{-5}$ M) ont été incubées et filtrées. Les composés retenus après trois lavages ont été élués par 25µL d'eau ultrapure et analysés par MALDI-TOFMS.

Les spectres obtenus par MALDI-TOFMS en mode linéaire avec la matrice SA montrent des signaux caractéristiques de la tubuline dans les trois éluats, ce qui indique que la protéine a bien été retenue sur les membranes des microconcentrateurs et que ces dernières n'ont pas été endommagées durant l'étape de lavage.

Une fois la présence de la cible moléculaire protéique confirmée, notre étude a portée sur l'analyse directe par MALDI-TOFMS, en mode réflectron avec les matrices HCCA et 2,5-DHB, de la présence éventuelle de molécules y étant liées (colchicine, vinblastine ou vincristine). Les résultats obtenus sont présentés en Figure 45.

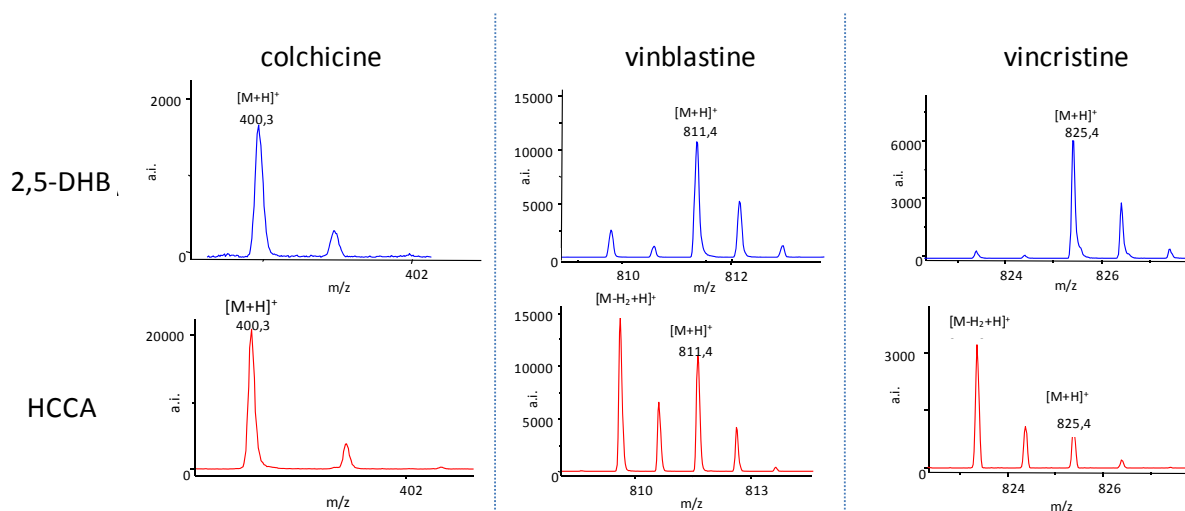


Figure 45 : Analyse directe par MALDI-TOFMS (mode réflectron) de molécules liées à la tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M) (colchicine, vinblastine ou vincristine) (après incubation, filtration, lavages et élution) (dépôt par mélange intime avec le 2,5-DHB ou l'HCCA)

Les spectres correspondants montrent que la colchicine ($[M+H]^+$, $m/z = 400,3$ Th), la vinblastine ($[M+H]^+$, $m/z = 811,4$ Th), ou la vincristine ($[M+H]^+$, $m/z = 825,4$ Th), sont respectivement détectées par MALDI-TOFMS lors de l'analyse directe des solutions éluées. Nous pouvons déduire que **ces molécules, dont le lavage est validé, ne pouvaient être que liées jusque là à la tubuline**. Ceci explique le fait qu'elles n'aient pas été éliminées lors de l'étape de lavage.

Pour comprendre le mécanisme permettant la détection de molécules jusque là liées à leur cible moléculaire, nous avons décidé de comparer différentes techniques d'ionisation. Les paramètres cruciaux à la détection des molécules liées pourront ainsi être mis en évidence. Ainsi, une solution de vinblastine ($5 \cdot 10^{-5}$ M) a été analysée par désorption/ionisation laser (laser desorption/ionization LDI) TOFMS à 337 nm (irradiance de l'ordre de $5 \cdot 10^7$ W.cm⁻²) avant (A) et après (B) incubation avec la tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M), puis par MALDI-TOFMS avec deux modes de dépôts différents (couche mince (C) et mélange intime (D)) avec comme

matrice le 2,5-DHB, après incubation avec la tubuline. Les spectres obtenus sont présentés en **Figure 46**.

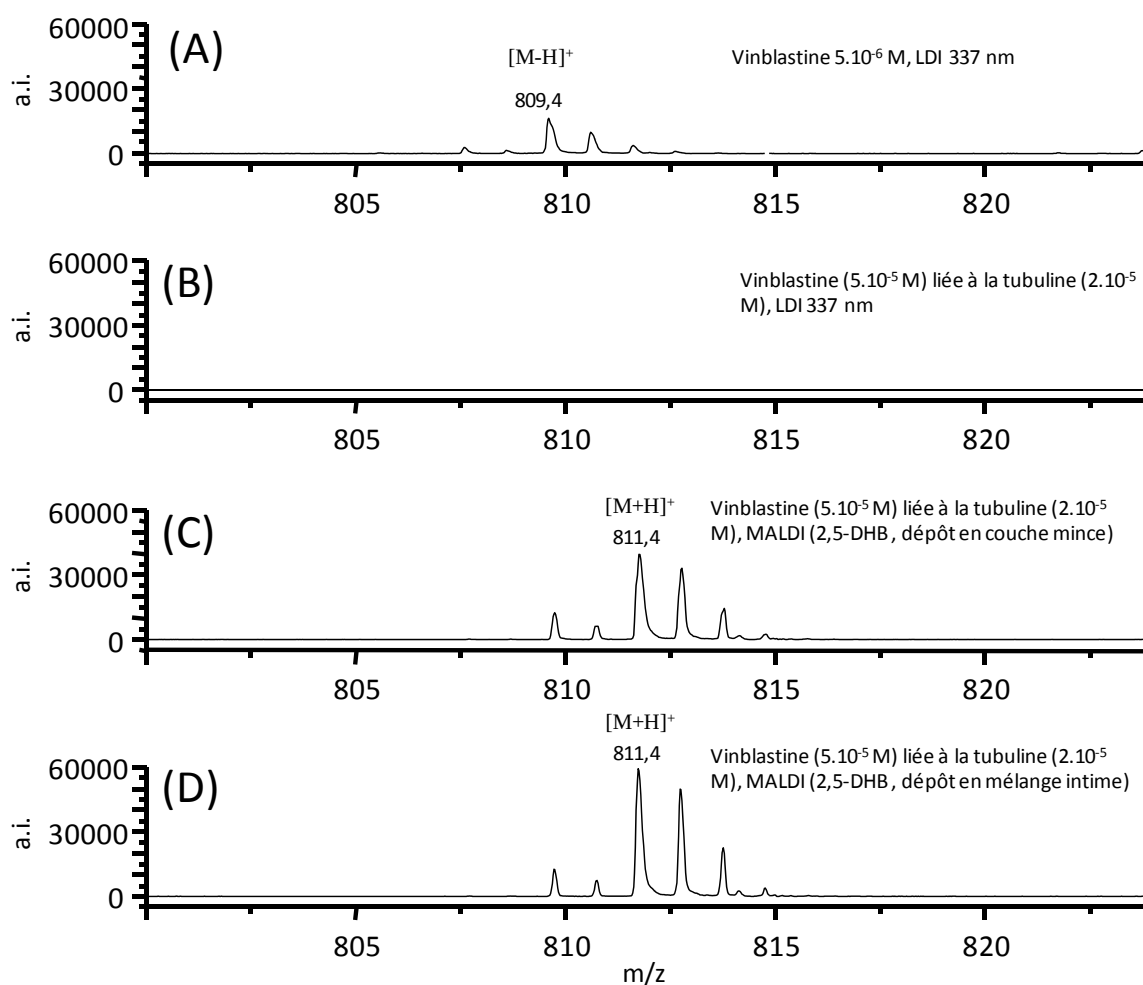


Figure 46 : (A) Vinblastine (5.10^{-6} M) analysée par LDI-TOFMS (mode reflectron, 337 nm); (B) analyse LDI-TOFMS (mode reflectron, 337 nm) de la vinblastine (5.10^{-5} M) liée à la tubuline (2.10^{-5} M); (C) analyse par MALDI-TOFMS de la vinblastine (5.10^{-5} M) liée à la tubuline (2.10^{-5} M) (2,5-DHB, dépôt en couche mince); (D) analyse par MALDI-TOFMS de la vinblastine (5.10^{-5} M) liée à la tubuline (2.10^{-5} M) (2,5-DHB, dépôt en mélange intime); irradiance de l'ordre de 5.10^7 W.cm⁻²

Le spectre de masse de la **Figure 46A**, obtenu lors de l'étude en LDI-TOFMS de la vinblastine seule, montre un ion caractéristique de cette molécule à $m/z=809$ $[M-H_2+H]^+$. Dans un deuxième temps, le spectre de masse LDI-TOFMS relatif à la vinblastine incubée avec la tubuline (après filtration, lavages et élution) (**Figure 46B**) ne montre aucun signal caractéristique. Les analyses en MALDI-TOFMS de cette même solution avec ajout de 2,5-DHB comme matrice en utilisant le mode de dépôt en couche mince (une couche de matrice, puis après séchage une couche d'échantillon) (**Figure 46C**), ou en utilisant le mode de dépôt en mélange intime (mélange v/v des solutions puis dépôt du mélange, ou dans notre cas, dépôt de

l'échantillon puis ajout de la matrice et reprise de l'échantillon et de la matrice déposée par plusieurs cycles d'aspiration refoulement) (**Figure 46D**) montrent quand à elles des signaux caractéristiques (ions à $[M+H]^+$) de la vinblastine liée à la tubuline. De plus les intensités des pics correspondant à la vinblastine augmentent (de 38000 à 60000 coups) lorsque le mode de dépôt par mélange intime est utilisé.

En comparant ces différents résultats, il peut être avancé que **la présence d'une matrice MALDI est nécessaire pour permettre une bonne ionisation de molécules préalablement liées à une cible moléculaire. Le mode de dépôt semble avoir son importance** du fait que l'échantillon est plus ou moins soumis aux conditions dénaturantes mises en jeu. En effet, lors de l'utilisation de la technique dite du mélange intime, il convient de mélanger l'échantillon avec la solution de matrice qui contient 50% d'acétonitrile (solvant organique dénaturant). Lorsque le mode de dépôt en couche mince est utilisé, le solvant organique contenu dans la solution de matrice est évaporé avant que l'échantillon ne soit déposé et ainsi cette technique ne met pas en jeu de conditions dénaturantes autres que l'acidité propre à la matrice. Cette différence peut expliquer l'augmentation des signaux correspondants aux molécules liées à la tubuline lorsque la méthode du mélange intime est utilisée.

Nous avons alors voulu préciser l'importance des conditions dénaturantes de la solution de matrice dans la détection des composés liés aux cibles moléculaires. Ainsi, la même solution de vinblastine ($5.10^{-5}M$) en présence de tubuline ($2.10^{-5}M$) après incubation, filtration, lavages et élution a été déposée en mélange intime avec différentes solutions de matrice 2,5-DHB (acétonitrile/eau v/v) d'acidité croissante (0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 5% et 10% d'acide trifluoroacétique TFA). Les intensités absolues du pic pseudomoléculaire de la vinblastine obtenues lors de l'analyse directe de ces dépôts sont présentées en Figure 47.

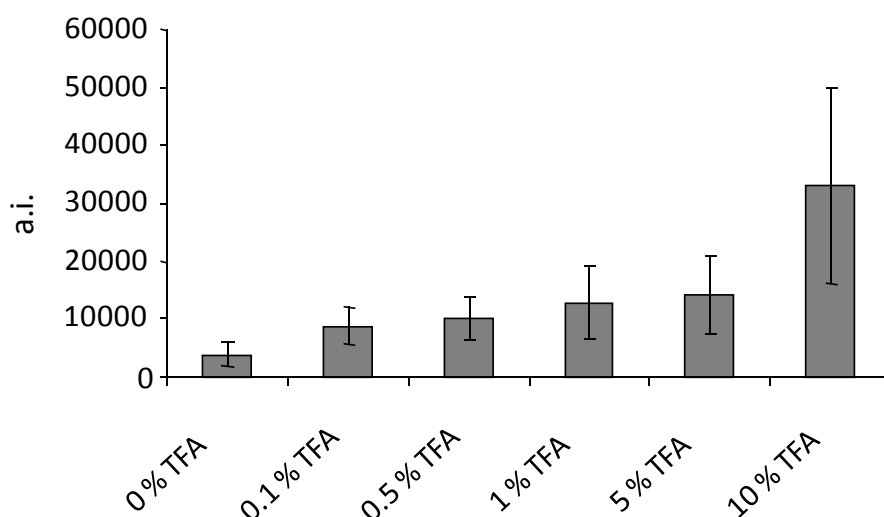


Figure 47 : Intensités absolues du pic pseudomoléculaire de la vinblastine ($[M+H]^+ = 811,42$ Da) lors de l'analyse directe par MALDI-TOFMS (après incubation avec la tubuline, filtration, lavages et élution) pour différentes solutions de matrices d'acidité croissante (2,5-DHB, mélange intime : 0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 5% et 10% de TFA)

Le signal de la vinblastine liée à la tubuline augmente avec la force dénaturante de la solution de matrice utilisée. Plus l'acidité de la solution de matrice augmente et plus l'intensité du pic pseudomoléculaire de la vinblastine augmente. Ainsi, si l'utilisation d'une matrice MALDI est nécessaire pour obtenir un signal correspondant aux molécules liées sur les cibles moléculaires protéiques, le signal obtenu est d'autant plus important que le mode de dépôt met en jeu des conditions dénaturantes. Ainsi, **les conditions dénaturantes mises en jeu lors du dépôt MALDI, précédant l'analyse directe des molécules liées aux cibles moléculaires, permettent de rompre une partie des complexes et de libérer une partie des molécules liées.**

Attachons nous à présent à prouver la faisabilité de notre test de criblage non plus dans le cas de solutions contenant un seul composé actif, mais dans le cas d'un mélange de plusieurs d'entre eux. Pour cela, une solution constituée de tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M), et de vinblastine, vincristine et colchicine ($5 \cdot 10^{-5}$ M) a été incubée une heure à 37°C , puis filtrée, lavée et élue. La solution obtenue a été analysée par MALDI-TOFMS avec les deux matrices utilisées précédemment (HCCA et 2,5-DHB). Les résultats sont présentés en Figure 48 ci-après.

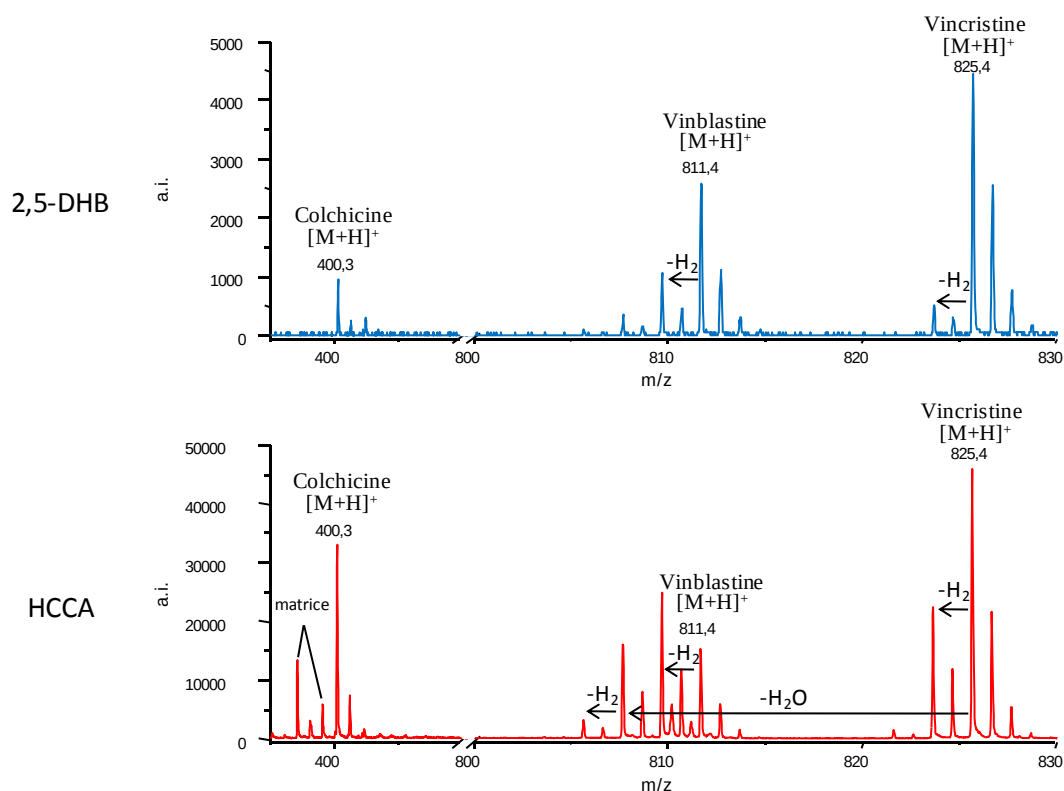


Figure 48 : Analyse directe par MALDI-TOFMS de la colchicine (5.10^{-5} M), vinblastine (5.10^{-5} M) et vincristine (5.10^{-5} M) liées simultanément à la tubuline (2.10^{-5} M) avec le 2,5-DHB ou l'HCCA comme matrice

L'emprunte spectrale obtenue lors de l'analyse directe par MALDI-TOFMS après incubation, lavage et élution présente des signaux caractéristiques des trois molécules mises simultanément en contact avec la tubuline (la colchicine, la vinblastine et la vincristine), et ce quelle que soit la matrice choisie. Il est à noter également que la résolution du spectromètre de masse en temps de vol est tout à fait à même de séparer les pics dus à la vinblastine ($[M+H]^+ = 811,4$ Th et $[M-H_2+H]^+ = 809,4$ Th) de ceux dus à la fragmentation de la vincristine ($[M+H]^+ = 825,4$ Th ; $[M-H_2+H]^+ = 823,4$ Th ; $[M-H_2O+H]^+ = 807,4$ Th et $[M-H_2O-H_2+H]^+ = 805,4$ Th). Ainsi, il est envisageable d'étudier la liaison à la tubuline de plusieurs composés simultanément, en une seule étape d'échantillonnage. Cet échantillonnage comprend une étape d'incubation 1h à 37°C, une étape de filtration et d'élimination des composés non liés à l'aide d'une centrifugeuse avant une élution et une analyse directe par MALDI-TOFMS. Ainsi, avec le matériel à notre disposition au laboratoire nous pouvons tester jusqu'à 60 composés en un peu moins de deux heures (auxquelles s'ajoute le temps d'analyse pouvant être automatisée).

Ainsi, ces études montrent que le test que nous avons mis au point au sein du laboratoire peut être utilisé pour le criblage primaire de composés se liant à la tubuline (tels

que la colchicine, la vinblastine ou la vincristine). **Le protocole permet de séparer et d'étudier les composés se fixant à la tubuline** (qui ne seront pas éliminés lors du lavage et donc seront détectés en analyse directe).

Ainsi, comme nous l'avons démontré, **le protocole que nous avons mis au point et validé permet d'étudier l'éventuelle liaison de composés à des cibles moléculaires protéiques**, cela dans le but de trouver de nouveaux composés actifs. Ce protocole a de plus prouvé pouvoir donner des réponses simultanées pour plusieurs composés testés en même temps.

Il est ainsi tout à fait envisageable d'étudier simultanément jusqu'à 5 molécules par échantillon, et il est possible de passer plusieurs échantillons en même temps dans la centrifugeuse. Cela peut ainsi permettre un débit intéressant de molécules dont on teste l'activité comme par exemple dans notre cas de **60 échantillons en 1h50**, plus le temps, très court, de l'analyse qui peut dès lors être automatisée.

Ce protocole unique met à profit les **intérêts de la désorption/ionisation laser lors d'une analyse MALDI** pour dissocier les complexes non covalents formés lors de l'interaction des molécules actives avec leurs récepteurs. Ce protocole permet de tester la liaison de plusieurs composés simultanément. Ainsi, par la mesure exacte de la masse des composés actifs, il est possible de très vite déterminer quelles seront les « touches » d'une campagne de criblage.

b. Validation des protocoles de criblage primaire

Après nous être penchés sur la mise en place de ces tests, nous allons étudier leur spécificité, leur précision (incluant la répétabilité et la précision intermédiaire), leur reproductibilité et leur robustesse. En dernier lieu nous évaluerons les paramètres permettant de déterminer leur qualité et leur intérêt en criblage (Z et Z'). Ces indicateurs permettent de caractériser la capacité du test à mener à l'identification de touches (hits) et permettent de comparer différents tests entre eux. Plus la valeur de Z est grande et plus la qualité des informations obtenues est grande. Les définitions de ces différents paramètres de validation

sont extraites des référentiels Q2A et Q2B en vue de la validation des méthodes analytiques^{81,82}.

Avant toute chose, pour évaluer la qualité de la réponse d'un test il faut en définir les critères de positivité et de négativité. Il nous est donc nécessaire de préciser les différents critères permettant de qualifier une réponse de positive ou négative.

↳ Critères de positivité du test :

Une réponse aux tests que nous avons mis en place est **qualifiée de positive** pour une molécule donnée lorsque **tous les points suivants sont validés** :

- L'étape de lavage de la membrane du microconcentrateur a été validée pour la molécule.
- Des signaux caractéristiques de la cible protéique de type $[M+H]^+$, $[2M+H]^+$ ou $[M+2H]^{2+}$ sont obtenus en MALDI-TOFMS en mode de détection linéaire avec la matrice SA lors de l'analyse directe des solutions après incubation, filtration, lavages et élution.
- Des signaux caractéristiques de la molécule de type $[M+H]^+$ sont obtenus en MALDI-TOFMS après incubation avec la protéine cible, filtration, lavages et élution avec un rapport signal/bruit supérieur ou égal à trois avec les matrices HCCA ou 2,5-DHB déposées en mélange intime.

↳ Critères de négativité du test :

Une réponse au test est **qualifiée de négative** (ou de non exploitable) pour une molécule donnée lorsqu'**un des points suivant n'est pas validé** :

- L'étape de lavage de la membrane du microconcentrateur n'a pas été validée pour la molécule.

⁸¹ (81) ICH, c. "Text on validation of analytical procedures Q2A", 1994.

⁸² (82) ICH, c. "validation of analytical procedures: methodology Q2B", 1996.

- Absence de signaux caractéristiques de la cible protéique de type $[M+H]^+$, $[2M+H]^+$ ou $[M+H_2]^{2+}$ lors de l'analyse directe en MALDI-TOFMS en mode de détection linéaire avec la matrice SA après incubation, filtration, lavages et élution.
- Absence de signaux caractéristiques de la molécule de type $[M+H]^+$ lors de l'analyse en MALDI-TOFMS après incubation avec la cible moléculaire protéique, filtration, lavages, et élution avec les matrices HCCA ou 2,5-DHB, ou lorsque les signaux obtenus ont un rapport signal/bruit inférieur à 3.

i. La spécificité

La spécificité est la qualité d'un test à donner une réponse juste qu'elle soit positive ou négative.

L'étape de lavage étant validée, il est important d'étudier un autre point crucial qui est qu'une adsorption non spécifique des molécules sur les cibles moléculaires peut nuire à la spécificité des tests mis en œuvre.

Cette étude a été divisée en deux parties distinctes : en premier lieu, les molécules à tester, colchicine, vinblastine et vincristine d'une part et aminoptérine, acide folique, acide folinique, méthotrexate et pyriméthamine d'autre part, ont été incubées avec une autre protéine de haute masse, l'ovalbumine ($MM = 45000 \text{ g.mol}^{-1}$) théoriquement dénuée de tout site spécifiques sur lesquels ces molécules pourraient venir se lier⁸³. Le but de cette démarche est d'étudier si les composés testés montrent une affinité non spécifique pour toute protéine de haute masse avec laquelle ils sont incubés.

Ainsi, 100 μL de solutions d'ovalbumine (2.10^{-5} M) et de colchicine, vinblastine ou vincristine (5.10^{-5} M) ont été incubés, filtrés, lavés et élués. En parallèle ces différentes molécules ont été incubées avec la tubuline (2.10^{-5} M), puis filtrées, lavées et éluées. Les différents éluats obtenus ont été ensuite analysés par MALDI-TOFMS avec le 2,5-DHB. Les

⁸³

(83) Rajaian, H.; Symonds, H. W.; Bowmer, C. J. J. *Vet. Pharmacol. Ther.* **1997**, 20, 421.

résultats sont équivalents quelle que soit la molécule et les analyses directes de la colchicine incubée avec l'ovalbumine et la tubuline sont présentées en **Figure 49A** et **B** à titre d'exemple.

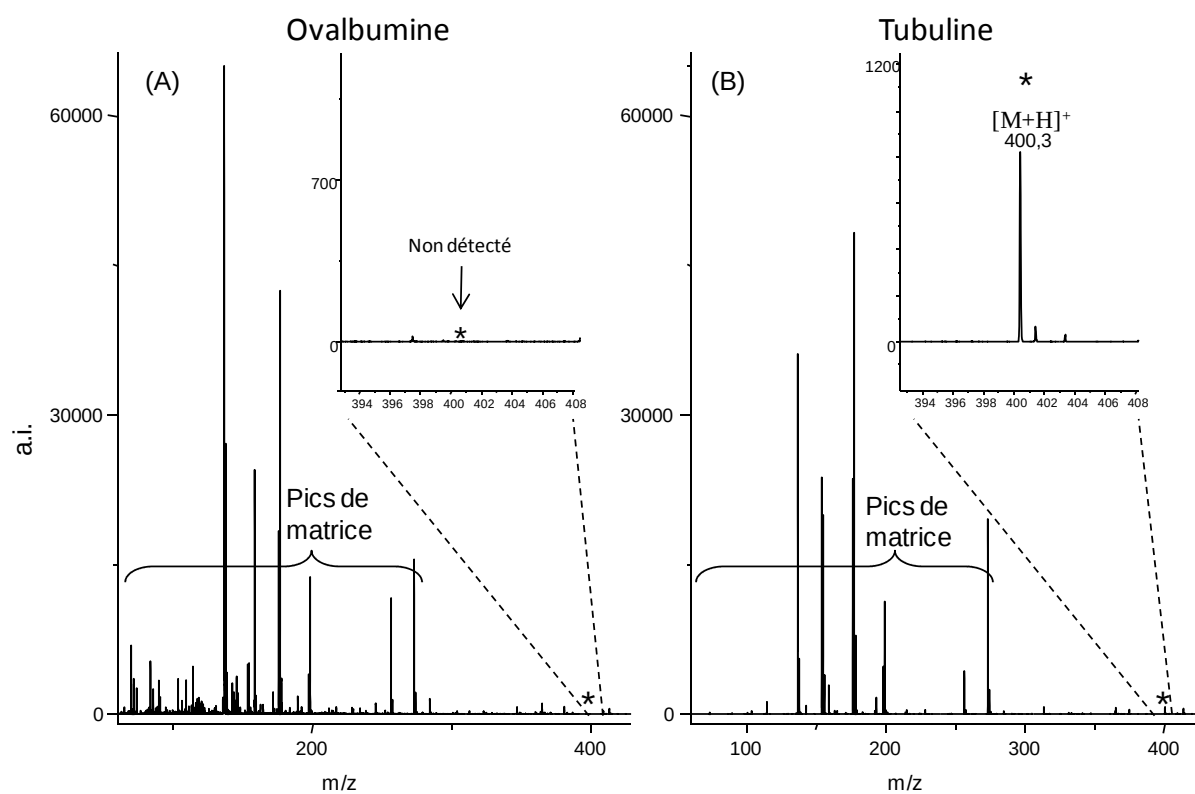


Figure 49 : (A) Analyse directe par MALDI-TOFMS (mode reflectron) de la colchicine ($5 \cdot 10^{-5}$ M) liée à l'ovalbumine ($2 \cdot 10^{-5}$ M) après incubation, filtration, lavage et élution ; (B) Analyse directe par MALDI-TOFMS (mode reflectron) de la colchicine ($5 \cdot 10^{-5}$ M) liée à la tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M) après incubation, filtration, lavage et élution ; (mode de dépôt par mélange intime avec le 2,5-DHB) (* correspond au pic pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de la colchicine)

Que ce soit pour la vinblastine, la vincristine ou la colchicine, aucun des échantillons incubés avec l'ovalbumine ne montre de signaux caractéristiques des molécules testées.

Le deuxième aspect important pour évaluer la spécificité de nos tests était de prouver que les cibles moléculaires que nous utilisons n'offraient pas de sites actifs sur lesquels n'importe quelle molécule de basse masse viendrait se lier. Cette étude a été faite en utilisant de l'amiodarone, un antiarythmique puissant mais dénué de toute action anticancéreuse (antitubuline)⁸⁴(Figure 50A). Cette molécule nous a servi de témoin négatif au cours de la validation de nos tests. Ainsi une solution d'amiodarone ($5 \cdot 10^{-6}$ M) a d'abord été analysée en

⁸⁴ (84) Vicken, R.; Vorperian, M. D.; Thomas, C.; Miller, S.; Craig, T. *Journal of the American College of Cardiology* **1997**, 30, 791.

MALDI-TOFMS avec la matrice 2,5-DHB. Le spectre obtenu présente le signal caractéristique de l'amiodarone⁸⁵ $[M+H]^+$ $m/z = 646$ (Figure 50B).

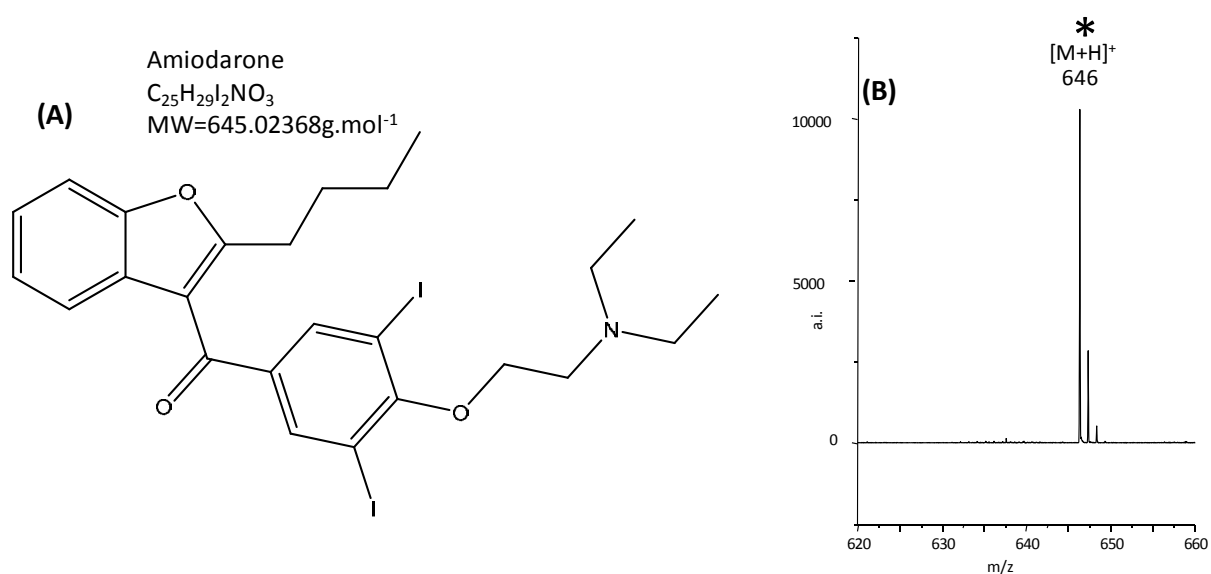


Figure 50 : (A) structure de l'amiodarone ; (B) analyse MALDI-TOFMS (mode reflectron) de l'amiodarone ($5 \cdot 10^{-6}$ M) (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB)

Après quoi, une solution de tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M) et d'amiodarone ($5 \cdot 10^{-5}$ M) et une solution d'ovalbumine ($2 \cdot 10^{-5}$ M) et d'amiodarone ($5 \cdot 10^{-5}$ M) ont été incubées, filtrées, lavées et éluées comme décrit précédemment. Les composés élués ont été analysés par MALDI-TOFMS (Figure 51A et Figure 51B respectivement).

⁸⁵

(85) Myung, S. W. *Rapid communications in Mass Spectrometry* **2000**, 14, 2046.

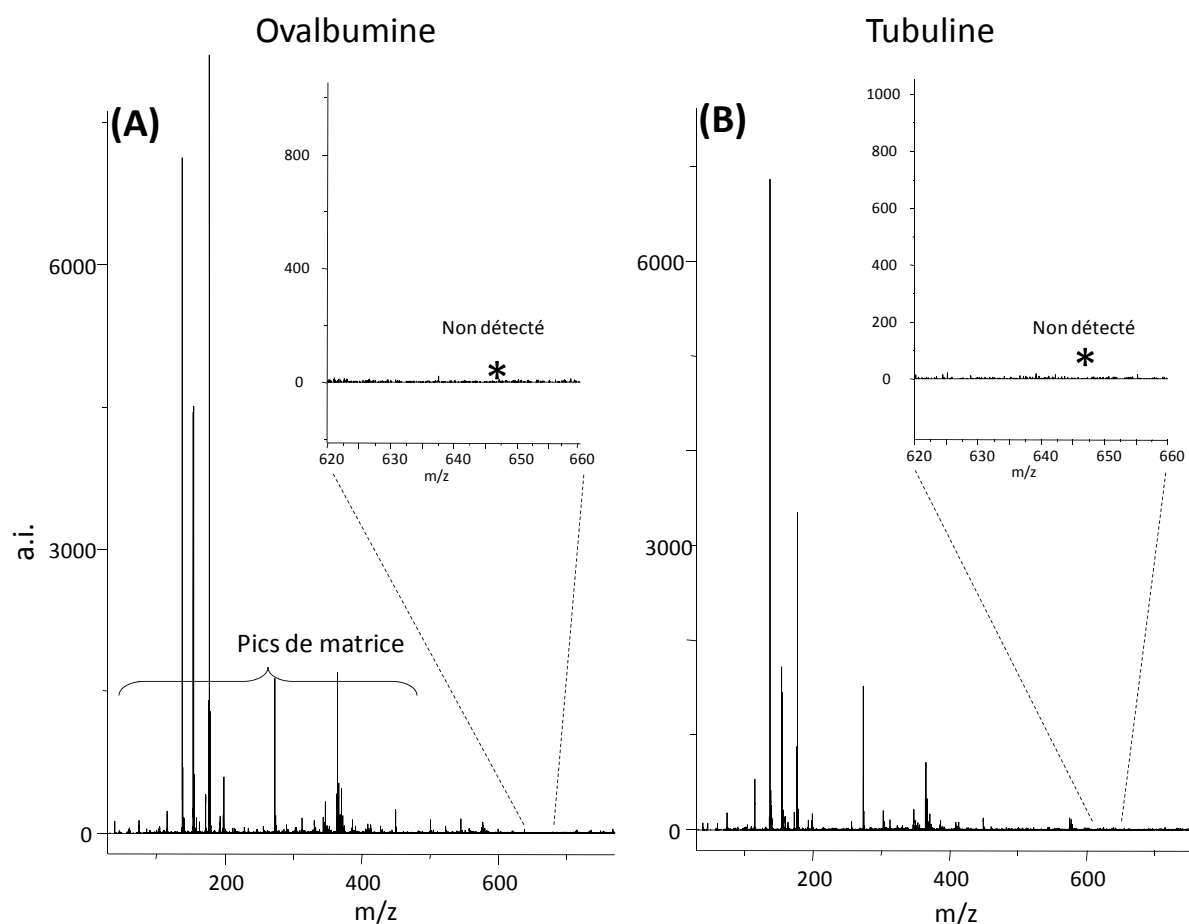


Figure 51 : (A) analyse MALDI-TOFMS de l'amiodarone (5.10^{-5} M) liée à l'ovalbumine (2.10^{-5} M) après incubation, filtration, lavages et élution (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB) ; (B) analyse MALDI-TOFMS de l'amiodarone liée à la tubuline (2.10^{-5} M) après incubation, filtration, lavages et élution (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB) ; (*) correspond à l'ion $[M+H]^+$ de l'amiodarone)

Comme le montrent les spectres de masses, l'ion pseudomoléculaire de l'amiodarone ($m/z=646$ Da) est absent ce qui indique qu'en aucun cas l'amiodarone ne montre d'affinité non spécifique pour une de ces deux protéines de hautes masses moléculaires (tubuline et ovalbumine). Cette molécule n'est en effet pas détectée par MALDI-TOFMS après que le protocole incluant incubation, filtration, 3 lavages et élution, est mené à bien. De plus, lorsque l'amiodarone est mélangée à l'une de ces trois protéines, et analysée directement, sans filtration et sans lavages, des signaux caractéristiques de cette molécule sont obtenus en MALDI-TOFMS. La présence de protéines de hautes masses en solution avec l'amiodarone n'empêche donc pas son ionisation par MALDI. Si aucun signal correspondant à l'amiodarone n'est détecté après le protocole s'est donc bien que cette molécule a été éliminée lors des lavages car elle ne se lie pas aux cibles utilisées.

Parallèlement, la colchicine étant une molécule photosensible pouvant s'isomériser à la lumière blanche en β - et γ -luminocolchicine, une étude a été menée sur une solution de colchicine isomérisée, théoriquement dénuée de toute activité biologique. En effet, cette transformation, (Figure 52), induit une perte de l'activité biologique de la colchicine, par une forte diminution de son affinité pour son site actif⁸⁶.

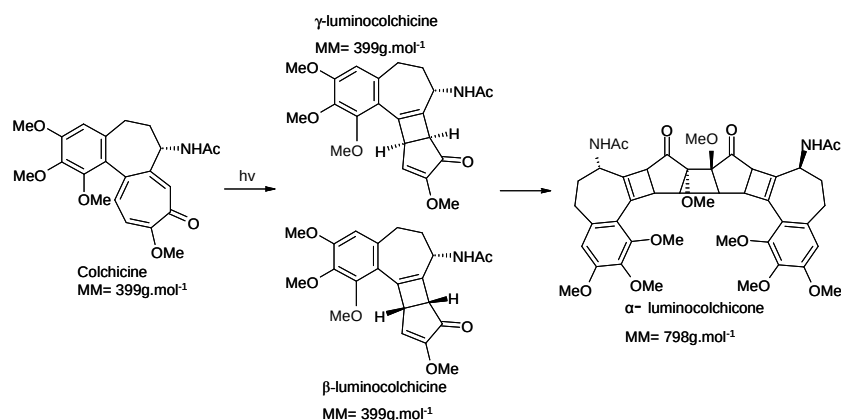


Figure 52 : photo-isomérisation de la colchicine

Dans notre cas, cette isomérisation de la colchicine a été assurée par un séjour en solution aqueuse (5.10^{-4} M) à la lumière blanche pendant 5 jours. L'échantillon a ensuite été incubé avec la tubuline, filtré, lavé et élué, dans les mêmes conditions que précédemment, puis analysé en MALDI-TOFMS. Cette fois-ci, aucun signal correspondant à la colchicine n'a pu être détecté, indiquant que celle-ci, une fois isomérisée, perd son affinité pour son site actif présent sur la tubuline. La spécificité de la réponse de nos tests est d'autant plus importante qu'une modification de la capacité de liaison d'une molécule jusque là active (la colchicine) entraîne une réponse négative.

Ainsi, nous avons montré que les molécules que nous avons utilisées ne présentent pas d'affinité non spécifique pour toute protéine de haute masse avec laquelle elles sont incubées. Nous avons également démontré qu'une molécule théoriquement dénuée d'affinité pour la cible que nous avons utilisé (tubuline) donne une réponse négative lorsque soumise à nos tests (amiodarone et γ - et β -luminocolchicine).

Ces deux aspects prouvent la spécificité de l'approche que nous avons développée et appliquée à une cible moléculaire : la tubuline. Ainsi, il peut être conclu qu'aucune liaison non spécifique ne peut entraîner une perte de spécificité des tests.

⁸⁶ (86) Bussotti, L.; Ccelli, I.; D'Auria, M.; Foggi, P.; Lesma, G.; Silvani, A.; Villani, V. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 9079.

ii. La précision

La précision d'un test définit le degré de dispersion entre différentes séries de mesures obtenues à partir d'échantillons obtenus dans des conditions opératoires identiques. La précision peut être considérée à plusieurs niveaux à savoir la **répétabilité** (qui nous intéressera plus en détails) et la **précision intermédiaire**.

Dans notre cas, l'étude de la précision de nos tests portera sur la qualité, positive ou négative, de la réponse obtenue lors de l'analyse MALDI-TOFMS des échantillons.

1. La répétabilité

La répétabilité d'un test exprime la précision de la réponse obtenue pour des échantillons préparés selon le protocole dans de mêmes conditions opératoires sur un court intervalle de temps. La répétabilité est également appelée précision intra-essai. Cette expérience a été menée uniquement sur la vinblastine pour le test utilisant la tubuline.

Ainsi trois solutions de vinblastine (5.10^{-5} M) et de tubuline (2.10^{-5} M) ont été incubées, filtrées, lavées et éluées simultanément. Les trois solutions obtenues ont été déposées 10 fois chacune sur le porte échantillon MALDI avec deux matrices différentes (HCCA et 2,5-DHB). Au total, cela représente 60 dépôts différents, dont les résultats ont été traités séparément. L'ensemble des 60 dépôts a donné une réponse positive quand à la liaison de la vinblastine à la tubuline (la présence de la tubuline ayant été vérifiée dans les 3 éluats, et le lavage de la vinblastine ayant été validé par ailleurs).

Ce test a donné des résultats avec une bonne sensibilité puisque le rapport signal/bruit moyen du pic pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de la vinblastine a été de $1417(\pm 17.8\%)$ avec la matrice 2,5-DHB et de $670(\pm 19.5\%)$ avec la matrice l'HCCA. Ainsi, dans tous les cas le test est positif et l'intensité des signaux correspondant à la molécule active est très importante (avec une résolution moyenne proche de 8000).

Ces mesures montrent que **les résultats obtenus à l'aide des protocoles que nous avons développés sont répétables en termes de positivité ou de négativité** et aucune réponse imprécise (faux positif ou faux négatif) n'a été enregistrée. Ces données permettent

de garantir une bonne répétabilité dans les mesures. En effet, lors de l'étude des résultats, il faut tenir compte du fait que la technique MALDI-TOFMS ne permet qu'une approche semi quantitative des signaux caractéristiques des molécules présentes.

2. La précision intermédiaire

La précision intermédiaire d'un test exprime les variations intra-laboratoire, d'une même expérience menée sur différents jours par exemple.

Dans le cadre de notre travail, le protocole a été appliqué, trois jours de suite, à un échantillon constitué de tubuline (2.10^{-5} M) et de vinblastine (5.10^{-5} M). Là encore, les différentes solutions ont été déposées 10 fois chacune avec deux matrices différentes (HCCA et 2,5-DHB). Les 60 dépôts donnent tous des résultats positifs et le rapport signal/bruit moyen du pic pseudomoléculaire de la vinblastine est de $1521(\pm 34\%)$ pour la matrice 2,5-DHB et de $676(\pm 26\%)$ pour la matrice HCCA.

Les résultats obtenus sur différents jours sont du même ordre que ceux obtenus lors de l'étude de répétabilité. **Les tests que nous avons mis au point permettent donc d'obtenir des résultats avec une bonne précision.**

iii. La reproductibilité

La reproductibilité évalue la variabilité extra-laboratoire d'un test. Il convient alors de le mener à bien dans les mêmes conditions, dans différents laboratoires et par différents opérateurs. Cette donnée permet d'évaluer l'aisance avec laquelle un test développé dans un laboratoire pourra être appliqué dans d'autres structures tout en assurant une qualité égale des résultats. Cet aspect de la validation de nos protocoles devra être mis en œuvre.

iv. La robustesse

La robustesse d'un test évalue sa capacité à rester inaffecté par de faibles modifications intentionnelles des paramètres du protocole. Son étude permet de présager de l'utilisation en routine du test.

Nous avons ainsi modifié délibérément différents paramètres que sont :

- Le temps d'incubation
- La température d'incubation
- Les concentrations des différents composés (cible moléculaire et molécule à tester)
- Le volume de solvant utilisé pour l'élution

Ainsi, différents **temps d'incubation** (30 minutes, 1 heure et 2 heures) ont été testés pour un même échantillon constitué de tubuline (2.10^{-5} M) et de vinblastine (5.10^{-5} M). Aucune modification importante de la réponse (en termes d'intensité des signaux obtenus en MALDI-TOFMS) n'a cependant été observée, et le test a été positif dans tous les cas. Le temps d'incubation doit être suffisant pour permettre une liaison des composés à tester avec la cible moléculaire. Cependant, les liaisons entre ces composés est généralement rapide et réversible, d'où un faible retentissement de la durée d'incubation sur la positivité ou la négativité de la réponse.

Une modification de la **température d'incubation** a également été envisagée. Ainsi un même échantillon a été incubé à température ambiante (20°C), à 37°C et à 40°C. Aucune de ces expériences n'a montré de différence significative quand à la qualité et l'intensité du signal obtenu et dans tous les cas les tests ont été positifs quand à la liaison du composé testé, la vinblastine, à la cible moléculaire, la tubuline. Cependant, la fenêtre de température pour laquelle les protéines sont sous leurs formes natives est relativement étroite et si leur dénaturation thermique se produit à 90°C, une altération de leurs structures est déjà constatée à des températures moins élevées⁸⁷. Ainsi, si de petites variations de la température d'incubation n'ont pas d'influence sur la réponse obtenue, ce paramètre peut néanmoins entraver les résultats s'il varie de façon importante.

⁸⁷

(87) Park, Z. Y.; Russell, D. H. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2667.

Les **concentrations des différentes molécules** mises en jeu lors de ce test ont aussi leur importance. En effet, il faut toujours s'assurer d'être en conditions d'excès de molécules à tester par rapport à la cible. Ces conditions sont dites « récepteur limitant » et permettent, dans le cadre d'une campagne de criblage pour découvrir de nouveaux médicaments de ne considérer comme « touches » que les molécules ayant une affinité assez élevée pour la cible⁸⁸. Une fois ces conditions assurées, il a été montré que le test fonctionne bien pour des concentrations en cibles moléculaires allant de 6.10^{-8} M à 2.10^{-5} M. Plus la cible est concentrée et plus la sensibilité de la détection sera élevée, mais sa gamme de concentration est surtout conditionnée par sa disponibilité et son coût. De même pour les molécules à tester, la gamme de concentration compatible avec le test est large est seulement limitée par la concentration de la cible en limite basse et par la solubilité du composé à tester dans l'eau ultrapure en limite haute. En effet, il ne faut pas que le composé à tester précipite durant l'étape de filtration car il restera alors fixé sur la membrane et pourra induire un faux positif. Cependant, la présence des lavages successifs permet de limiter cet effet. La gamme de concentration optimale pour les molécules à évaluer lors de nos tests va donc de 1.10^{-6} M à 5.10^{-5} M.

Enfin, le dernier paramètre que nous avons évalué pour déterminer la robustesse des tests que nous avons mis en place est le **volume d'eau ultrapure utilisé pour éluer** les composés retenus sur les membranes des microconcentrateurs. Du fait du faible volume d'eau ultrapure utilisé en fin de protocole, une petite variation de celui-ci peut entraîner une variation importante de l'intensité des signaux obtenus par MALDI-TOFMS. Ainsi, différents volumes d'élution ont été testés (dans le cas de l'étude d'une solution de vinblastine (5.10^{-5} M) liée à la tubuline (2.10^{-5} M)). Une variation de 10 μ L (volume minimal compatible avec le dispositif utilisé) à 100 μ L (contenance maximale du réservoir utilisé pour l'élution) a été envisagée. Cette variation se traduit par un phénomène de concentration ou de dilution des échantillons par rapport à celui obtenu dans les conditions standards d'élution (25 μ L). Cependant, bien que cela entraîne une variation importante des signaux MALDI-TOFMS obtenus lors de l'analyse directe, aucune modification du caractère positif ou négatif de la réponse obtenue n'a été observée. De ce point de vue, le volume d'eau ultrapure utilisé pour l'élution n'est pas critique, mais il convient de le conserver constant pour les différents échantillons (à 25 ou 50 μ L selon la concentration en cible moléculaire de la solution initiale)

⁸⁸ (88) Kaur, S.; McGuire, L.; Tang, D.; Dollinger, G.; Huebner, V. *Journal of Protein Chemistry* **1997**, *16*, 505.

si une comparaison entre différents échantillons est souhaitée. De plus, travailler avec des volumes plus faibles d'élution limite à la fois le nombre de dépôts et les traitements d'échantillon pouvant être menées à partir de cette solution.

L'étude de ces différents paramètres (la durée et la température d'incubation, la concentration des différents composés et le volume de solvant utilisé pour l'élution) a permis d'évaluer la robustesse des protocoles que nous avons mis au point. Aucun de ces paramètres n'a d'influence réellement critique sur les résultats obtenus. **L'approche par spectrométrie de masse MALDI présente donc une robustesse suffisante pour être utilisée en campagnes de criblages primaires.**

v. Evaluation des paramètres de qualité

Cette validation de nos protocoles va donner lieu au calcul des paramètres de qualité permettant d'évaluer un test comme décrits dans le chapitre I.

Le facteur Z correspond à la qualité générale du test et le facteur Z' est une valeur finie de Z calculée comme suit pour un échantillon donné (avec X_S et SD_S représentant la valeur moyenne et l'écart type du signal obtenu pour le contrôle positif et X_B et SD_B représentant la valeur moyenne et l'écart type du signal correspondant au bruit de fond) :

$$Z' = 1 - \left[\frac{(3 \times SD_S + 3 \times SD_B)}{|X_S - X_B|} \right]$$

Nous allons calculer dans un premier temps les facteurs Z' obtenus pour certains composés que nous avons étudiés puis nous nous servirons de ces valeurs pour généraliser notre approche et évaluer le facteur Z propre aux tests que nous avons mis en place.

Pour la vinblastine ($5 \cdot 10^{-5}$ M) incubée avec la tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M), l'intensité moyenne du signal obtenu lors de l'analyse directe en MALDI-TOFMS avec le 2,5-DHB est de 10036 ± 1814 , alors que le bruit moyen est de $4 \pm 3,2$. Le facteur Z' obtenu pour la vinblastine est donc :

$$Z'_{\text{vinblastine 2,5-DHB}} = 0,46$$

Cette valeur de Z' place notre test comme étant utilisable en criblage, mais précise la nécessité de faire des répétitions pour donner un poids décisionnel plus important aux informations obtenues.

A partir de ces valeurs nous pouvons estimer la valeur du facteur Z propre à notre test. En effet, dans tous les cas, la valeur du bruit peut être négligée en par rapport à l'intensité des signaux obtenus dans le cas d'un échantillon positif. De plus, comme nous l'avons présenté précédemment, l'écart type sur les mesures d'intensités est de l'ordre de 20% en MALDI-TOFMS lorsque l'on prend la précaution de faire 4 séries de 100 tirs (chapitre I). En tenant compte de ces deux informations, le **facteur Z de notre test peut être évalué comme étant égal à 0,4**. Cette valeur est satisfaisante en ceci qu'elle est proche de 0,5, valeur permettant de qualifier un test comme étant de très bonne qualité, mais présente tout de même la nécessiter de valider les touches par une répétition des expériences.

Ainsi, comme nous l'avons démontré, **le protocole que nous avons mis au point et validé permet d'étudier l'éventuelle liaison de composés à des cibles moléculaires protéiques**, cela dans le but de trouver de nouveaux composés actifs. Ce protocole a de plus prouvé pouvoir donner des réponses simultanées pour plusieurs composés testés en même temps.

Il est ainsi tout à fait envisageable d'étudier simultanément jusqu'à 5 molécules par échantillon, et il est possible de passer plusieurs échantillons en même temps dans la centrifugeuse. Cela peut ainsi permettre un débit intéressant de molécules dont on teste l'activité comme par exemple dans notre cas de **60 échantillons en 1h50**, plus le temps, très court, de l'analyse qui peut dès lors être automatisée.

Ce protocole unique met à profit les **intérêts de la désorption/ionisation laser lors d'une analyse MALDI** pour dissocier les complexes non covalents formés lors de l'interaction des molécules actives avec leurs récepteurs. Ce protocole permet de tester la liaison de plusieurs composés simultanément. Ainsi, par la mesure exacte de la masse des composés actifs, il est possible de très vite déterminer quelles seront les « touches » d'une campagne de criblage.

4. Criblage primaire des extraits de plantes

a. Criblage primaire des extraits de Colchique d'Automne

Nous allons tout d'abord nous intéresser au criblage des extraits de colchique d'automne. Nous avons ensuite criblé l'extrait dichlorométhane/méthanol (v/v), évaporé à sec et repris à l'eau ultrapure de graines de colchique d'automne. Pour ce faire, 10 μL d'extrait ont été incubés avec 90 μL de tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M) à 37°C pendant une heure. La solution est ensuite filtrée sur Microconcentrateur 30000 et les membranes des filtres lavées 3 fois successivement par 100 μL d'eau ultrapure. Les molécules retenues sur la membrane du filtre sont ensuite éluées par 25 μL d'eau ultrapure. La solution obtenue est analysée en analyse directe par MALDI-TOFMS avec le 2,5-DHB comme matrice. Les résultats obtenus pour l'analyse MALDI-TOFMS de la solution de matrice 2,5-DHB seule, pour l'extrait de graines de colchique d'automne avant protocole et pour le même extrait élué à partir du microconcentrateur après le criblage par incubation avec la tubuline sont présentés en Figure 53.

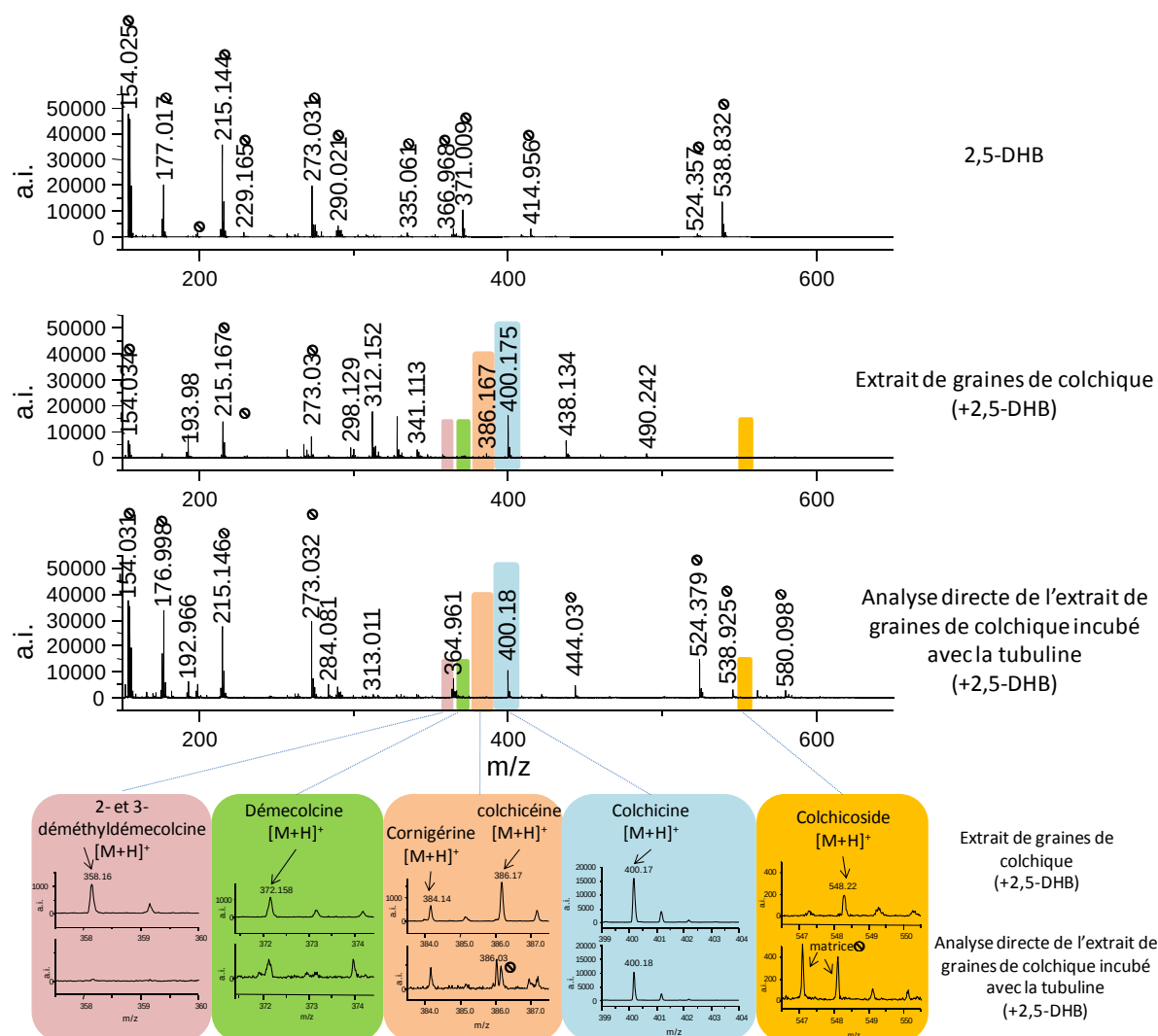


Figure 53 : Spectres MALDI-TOFMS obtenus lors de l'analyse de la matrice 2,5-DHB, de l'extrait de graines de colchique d'automne (avec le 2,5-DHB comme matrice) et de la solution obtenue à partir des microconcentrateurs après incubation du même extrait avec la tubuline, filtration, lavages et élution (matrice 2,5-DHB). En cartouche sont présentés les agrandissements des zones des spectres correspondantes aux différents alcaloïdes présents dans l'extrait de colchique d'automne (pics de matrice O)

En comparant les spectres, une assez grande variabilité des intensités des pics de matrice (2,5-DHB) peut être observée entre la matrice seule, l'extrait brut avec la matrice et l'éluat avec la matrice. En effet, du fait de la présence d'autres molécules dans les solutions analysées, la cristallisation des trois échantillons est différente, cela se traduisant par des différences d'intensités des pics de matrice observés en MALDI-TOFMS.

Par différence entre les spectres obtenus pour l'extrait de graines avant et après incubation avec la tubuline il peut être vu que 4 alcaloïdes montrent une activité de type liaison à la tubuline en n'étant pas éliminés lors des lavages, la présence de tubuline dans les éluats étant validée par ailleurs. C'est le cas notamment pour la **colchicine** dont la liaison à la

tubuline est connue. Les spectres obtenus après le protocole montrent une intensité du pic pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de la colchicine de l'ordre de 10000 coups, presque aussi intense que dans l'extrait de graines brut.

La deuxième espèce montrant une capacité de liaison à la tubuline est la **démecolcine** qui est détectée de manière significative après le protocole de criblage. La détection du pic pseudomoléculaire correspondant permet de lever l'indétermination quand à la présence de démecolcine ou d'androcymbine dans l'extrait brut de graines de colchique. Seule la démecolcine présentant une activité envers la tubuline, les signaux obtenus à $m/z = 372,18$ Th après le protocole peuvent être attribués à cette espèce (et non à son isobare l'androcymbine). Ainsi, même si la liaison de cette molécule à la tubuline est décrite comme prenant plus de deux heures pour être efficace, la sensibilité de notre démarche permet de l'observer.

Il en va de même pour le pic à $m/z = 386,15$ Th qui par son observation après le protocole met en évidence la présence de **colchicine** dans l'extrait brut (parmi ses isobares que sont la 2- ou 3-déméthylcolchicine et la N-déacétyl-N-formylcolchicine). Cette molécule montrant une affinité intense pour les dimères de tubuline il est possible d'avancer l'hypothèse que dans les conditions mises en jeu lors de notre protocole, une certaine partie de la tubuline est présente sous forme dimérique. Cette hypothèse a été validée lors d'une analyse MALDI-TOFMS de tubuline ($5.10^{-5}M$) en présence de crosslinkers bloquant les complexes non-covalents présents en solution (CovalX). Dans ces conditions, des polymères de tubuline sont observés, même dans de l'eau ultrapure.

La dernière espèce montrant une activité de type liaison à la tubuline est la **cornigérine**, qui, bien que faiblement détectée à la suite du protocole reste tout de même significative.

D'autres molécules présentes dans l'extrait ne montrent quand à elles aucune activité de liaison à la tubuline. C'est le cas par exemple des 2- et 3-déméthyl-démecolcine et du colchicoside dont aucun signal caractéristique ne peut être acquis après l'incubation de l'extrait de graines avec la tubuline.

Nous avons ainsi prouvé par cette application de notre test pour le criblage d'un extrait de plante qu'il est possible de faire la différence entre les espèces ayant une affinité pour la cible utilisée (ici la tubuline) et celles n'en ayant pas. Le criblage des extraits de colchique n'a pas permis de mettre en évidence de nouveaux composés minoritaires se liant à la tubuline

mais a tout de même permis de valider notre approche même dans le cas de composés dont la liaison est très lente ou plus spécifique des dimères de tubuline. N'ayant pas montré d'incohérences par rapport à la bibliographie, notre test de criblage est donc tout a fait applicable au criblage d'extraits de plantes bruts et la présence de sels et ou de pigments ne gênent pas l'obtention d'une réponse qualitative nette : oui ou non, un composé extrait se lie à la cible moléculaire.

b. Criblage primaire des extraits de Pervenche de Madagascar

Nous allons à présent nous intéresser au criblage de la liaison de composés présents dans les extraits de Pervenche de Madagascar pour étudier leur capacité à se lier à la tubuline.

Le protocole en lui-même a été mené à bien comme décrit précédemment en mélangeant 10 μL de chaque extrait (méthanol, chloroforme, dichlorométhane, dichloroéthane, dibromométhane) à 90 μL d'une solution de tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M) dans de l'eau ultrapure. Ces solutions ont été incubées une heure à 37°C. Après ce temps d'incubation, les solutions ont été filtrées sur microconcentrateur 30000 et les membranes lavées 3 fois par 100 μL d'eau ultrapure. Les composés retenus sur les membranes à ce stade ont été élués par 25 μL d'eau ultrapure comme décrit précédemment.

Les éluats obtenus ont ensuite été analysés en analyse directe par MALDI-TOFMS (matrice 2,5-DHB en mélange intime). Les résultats obtenus sont présentés en Figure 54.

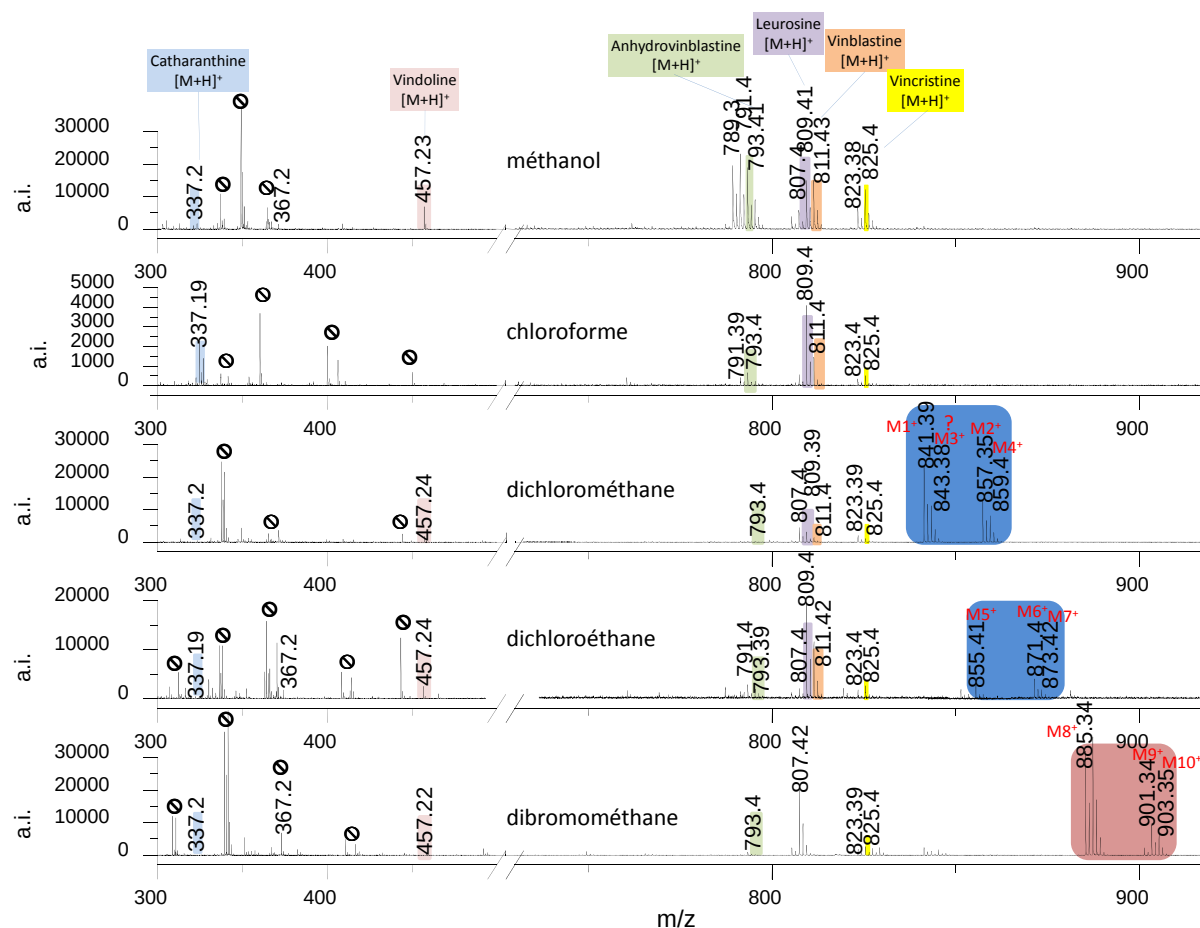


Figure 54 : Analyses directes par MALDI-TOFMS des éluats (après incubation avec la tubuline, filtration, lavages et élution) des différents extraits de Pervenche de Madagascar (méthanol, chloroforme, dichlorométhane, dichloroéthane, dibromométhane) (2,5-DHB, mélange intime) (pics de matrice ⊙)

En comparant les spectres MALDI-TOFMS obtenus en analyse directe à ceux des différents extraits bruts (Figure 31) il peut être vu que de nombreuses espèces extraites de la Pervenche de Madagascar sont éliminées lors de la mise en œuvre de notre protocole. Ces espèces ne montrent ainsi aucune capacité de liaison à la tubuline et sont éliminées durant l'étape de lavage. Cependant, quelque soit l'extrait, certaines molécules ne sont pas éliminées, faisant la preuve d'une activité intéressante.

La première molécule montrant une capacité de liaison à la tubuline en n'étant pas éliminée lors du protocole et donc détectée en analyse directe, est la **catharanthine** $[M+H]^+ = 337,19$ Th (erreur de 4 ppm). Ceci est en accord avec la bibliographie où une activité antimicrotubulaire de la catharanthine est décrite. En effet, même si cette molécule présente une activité 25% plus faible que celle de la vinblastine en termes d'inhibition de la

polymérisation, sa mise en contact avec la tubuline entraîne la formation de structures polymériques non microtubulaires, dépourvues de toutes fonctions biologiques⁸⁹.

La deuxième molécule active mise en évidence par la mise en œuvre de notre protocole est la **vindoline** $[M+H]^+ = 457,24$ Th (erreur de 14 ppm). Sa liaison avec la tubuline, entraînant une légère inhibition de sa polymérisation. Elle est à peine détectable par d'autres techniques (telles que la spectroscopie de fluorescence)⁸⁹.

Les autres espèces détectées en analyse directe du fait de leur capacité de liaison à la tubuline sont l'**anhydrovinblastine** $[M+H]^+ = 793,41$ Th (erreur de 8 ppm), la **leurosine** $[M+H]^+ = 809,41$ Th (erreur de 2,5 ppm), la **vinblastine** $[M+H]^+ = 811,43$ Th (erreur de 3 ppm) et la **vincristine** $[M+H]^+ = 825,4$ Th (erreur de 8 ppm). L'activité antitubuline de ces espèces est bien connue et nos résultats concordent avec les données bibliographiques^{35,90}. En plus de ces espèces, leurs fragments typiques, $[M-H_2+H]^+$ et $[M-H_2O+H]^+$ notamment formés lors de l'ionisation MALDI, sont également observés sur le spectre de masse.

Ces espèces sont les seules détectées dans les extraits méthanol et chloroforme. Dans les autres extraits, certains des adduits d'alcaloïdes que nous avons mis en évidence montrent également une capacité de liaison à la tubuline en étant détectés dans les éluats après l'étape de lavage.

Pour l'extrait dichlorométhane, les molécules **M1**, **M2** et **M4** sont détectées aux m/z respectifs de 841,39 Th, 857,35 Th et 859,4 Th (erreurs respectives de 4, 10 et 5 ppm par rapport aux masses théoriques). Ces molécules étant des adduits de molécules actives (anhydrovinblastine, leurosine et vinblastine +CH₂Cl), il n'est pas contradictoire qu'elles présentent elles aussi une activité vis-à-vis de la tubuline. Cependant, pour le signal obtenu en MALDI-TOFMS à une valeur de m/z de 843,38 Th, l'attribution est plus délicate. En effet, cette valeur amène à une erreur de 34 ppm par rapport à l'espèce $M3^+$ et seulement de 11 ppm si ce pic est attribué à l'espèce $[M1\ 37Cl]^+$. Il semblerait donc que le signal obtenu à $m/z = 843,38$ Th corresponde à M1 avec l'isotope 37 du chlore et non pas à l'espèce M3. Ainsi, il semblerait que M3 (adduit de la 4'-déoxyvinblastine), ne soit pas une molécule active. Cependant, la résolution de l'appareil ne permet pas de séparer finement la contribution des deux espèces et la présence de M3 dans l'éluat ne peut pas être éliminée.

⁸⁹ (89) Prakash, V.; Timasheff, S. N. *Biochem. J.* **1991**, 30, 873.

⁹⁰ (90) Himes, R. H. *pharmacology and therapeutics* **1991**, 51, 257.

De même pour l'extrait au dichloroéthane, les trois adduits que nous avons caractérisés (**M5**, **M6** et **M7**) sont détectés ($m/z = 855,41$ Th, $m/z = 871,40$ Th et $m/z = 873,42$ Th) avec des erreurs respectives de 1 ppm, 5 ppm et 0,5 ppm. Là encore ces adduits sont des dérivés de type $[M+CH_2CH_2Cl]^+$ de l'anhydrovinblastine, de la leurosine et de la vinblastine et de ce fait montrent également une activité de liaison à la tubuline intéressante.

Enfin, les adduits retrouvés dans l'extrait au dibromométhane de la Pervenche de Madagascar sont également actifs puisque détectés de manière très intense lors de l'analyse directe après incubation avec la tubuline. Ainsi, **M8** détecté à $m/z = 885,34$ Th (erreur de 4 ppm), **M9** détecté à $m/z = 901,34$ Th (erreur de 2ppm) et **M10** détecté à $m/z = 903,35$ Th (erreur de 4 ppm) montrent tous trois une capacité de liaison à la tubuline.

Ces données sont là encore en accord avec celles retrouvées dans la bibliographie puisque les adduits de leurosine et de vinblastine, formés suite à la réaction d'iodure de méthyle et d'iodure d'éthyle, ont montré des propriétés biologiques intéressantes en termes d'activité antimitotique. Notamment les adduits formés à partir de la leurosine se sont montrés plus actifs que la molécule parente. L'inverse a été observé pour la vinblastine dont les adduits « quaternaires » ont généralement fait preuve d'une activité anticancéreuse moindre³⁵. Les adduits de leurosine à l'iodure de méthyle ont été testés en première phase d'essais cliniques et bien que montrant une activité supérieure et une absence totale de leucopénie induite, ces molécules ont été abandonnées à cause des effets secondaires très sévères que présentaient les patients traités³⁵.

Nous avons mené à bien un criblage primaire de ces extraits en vue de rechercher de nouveaux agents se liant à la tubuline, et pouvant dans ce cadre montrer des propriétés intéressantes pour lutter contre le cancer. La catharanthine, la vindoline, l'anhydrovinblastine, la leurosine, la vinblastine et la vincristine ont ainsi montré leur activité en n'étant pas éliminées lors de l'étape de lavage lorsqu'incubées avec la tubuline. D'autre part, les adduits de l'anhydrovinblastine, de la leurosine et de la vinblastine : **M1**, **M2**, **M4** (de type $[M+CH_2Cl]^+$), **M5**, **M6**, **M7** ($[M+CH_2CH_2Cl]^+$) et **M8**, **M9**, **M10** ($[M+CH_2Br]^+$) ont également montré une activité intéressante.

Il est par ailleurs très important de mettre ces travaux en parallèle avec d'autres expériences concernant la synthèse de nouveaux alcaloïdes, dont certains dérivés chlorés, qui montrent d'intéressantes activités antitumorales *in vitro* et *in vivo*, évaluées par d'autres protocoles^{43,91,92}. Ainsi, notre protocole de criblage par MALDI-TOFMS montre ici également son potentiel pour la découverte de nouveaux composés extraits de plantes se liant à des cibles moléculaires spécifiques. Un autre aspect intéressant à soulever ici est que l'échantillonnage mis en jeu lors du protocole est tout à fait compatible avec d'autres analyseurs tels que le MALDI-FTICRMS. Pouvoir coupler la sensibilité d'un protocole de criblage par TOFMS avec la résolution et la précision sur la mesure en masse d'un FTICRMS rend possible la caractérisation très fine des éventuelles « touches » obtenues.

CONCLUSION

Ainsi, dans ce chapitre, nous avons présenté les résultats obtenus lors de la préparation et de la caractérisation par spectrométrie de masse des extraits de Colchique d'Automne et de Pervenche de Madagascar. Une analyse préliminaire des extraits des différentes plantes, par MALDI-TOFMS, nous a ainsi permis de mettre en évidence 109 espèces (12 dans les extraits de Colchique et 97 dans les extraits de Pervenche), le tout à partir de seulement quelques microlitres des diverses solutions. Bien que ces étapes ne soient pas obligatoires en vue du criblage, comme présenté dans le chapitre 1, elles permettent d'éviter par la suite tout problème de déréplication (une même molécule étant considérée plusieurs fois comme une touche car extraite de plusieurs plantes ou parties de plantes différentes). Il est généralement acquis cependant, dans le cadre du criblage d'une plante par une industrie pharmaceutique, d'effectuer la démarche inverse, c'est-à-dire de cribler en premier lieu les extraits à la recherche d'une activité biologique et de ne s'intéresser à leur caractérisation que si une touche est mise en évidence⁹³.

Nous avons ensuite présenté l'intérêt d'une approche de criblage moléculaire, simple et potentiellement automatisable, pour atteindre un haut débit d'analyse et avoir confiance

⁹¹ (91) Duflos, A.; Fahy, J.; Boullay, V. T. d.; Barret, J. M.; Hill, B. vinca alkaloid antimitotic halogenated derivatives US, 2000.

⁹² (92) Fahy, J. *current pharmaceutical design* **2001**, 7, 1181.

⁹³ (73) Quetin-Leclerc, J. *journal de pharmacie de belgique* **2002**, 57, 11.

dans les résultats obtenus. L'approche de criblage par spectrométrie de masse a également montré son intérêt dans l'étude de la liaison de composés témoins à la tubuline. C'est pourquoi nous avons décidé de mettre en place une nouvelle approche de criblage moléculaire par spectrométrie de masse MALDI-MS présentant toutes les qualités requises pour devenir une méthode intéressante en criblage.

Nous avons également présenté et validé les résultats qui peuvent être obtenus par l'application de notre stratégie dans le cadre du criblage primaire de la liaison de composés à une cible moléculaire. **Les tests que nous avons mis au point ont ainsi prouvé pouvoir faire aisément la différence entre un composé se liant à une cible et un composé ne s'y liant pas et ce avec une spécificité, une précision, une reproductibilité et une robustesse intéressantes.** La qualité globale de nos tests a été évaluée par le calcul du facteur Z (chapitre I) et ainsi nos tests peuvent être considérés comme intéressants dans le cadre de la mise en place d'une campagne de criblage primaire.

Dans un dernier point, nous avons présenté l'application des protocoles que nous avons mis en place pour le criblage d'extraits de Colchique d'Automne et de Pervenche de Madagascar. Cette démarche a prouvé pouvoir mener à la mise en évidence de nouvelles molécules potentiellement anticancéreuses, par liaison à la tubuline. Cette démarche a permis, à partir de différents extraits de ces plantes, de mettre en évidence **19 molécules actives**, se liant à la cible moléculaire utilisée (la tubuline) : la **colchicine**, la **démécolcine**, la **colchicine** et la **cornigérine** extraites du colchique d'automne ; la **catharanthine**, la **vindoline**, l'**anhydrovinblastine**, la **leurosine**, la **vinblastine**, la **vincristine** et les **9 différents adduits** ($+CH_2CH_2Cl$, $+CH_2Cl$, $+CH_2Br$ de l'anhydrovinblastine, la leurosine et la vinblastine) extraits de la Pervenche de Madagascar.

Conclusion générale

L'objectif de cette étude était de mettre en place et de valider un nouveau test de criblage de la liaison de composés à des cibles moléculaires par spectrométrie de masse ainsi que de l'appliquer à des extraits de plantes.

Nous avons ainsi présenté l'intérêt de la mise en place de nouveaux tests de criblages pour la recherche de nouveaux médicaments tant la santé publique doit faire face, aujourd'hui encore, à des atteintes graves. Ainsi, nous avons présenté l'intérêt de **développer une nouvelle approche, simple, fiable et potentiellement automatisable** pour étudier la liaison de composés à des cibles moléculaires. Nous avons donc décidé de mettre en place une nouvelle approche de criblage moléculaire par spectrométrie de masse MALDI-MS présentant toutes les qualités requises pour devenir une méthode intéressante pour le criblage. Nous avons choisi de l'appliquer à la recherche de nouvelles molécules, extraites de plantes, capables de se fixer à la tubuline, cible importante des traitements des cancers.

Nous nous sommes alors intéressés à décrire en détails les **plantes à activité antitubuline** sur lesquelles nous avons fait porter notre étude : le **Colchique d'automne** et la **Pervenche de Madagascar**. Ainsi, nous avons fourni une description précise des plantes, de leurs usages traditionnels ainsi que des molécules référencées qu'elles contiennent. Nous avons présenté le matériel végétal utilisé au cours de ces travaux et le mode d'extraction choisi. En dernier lieu, nous avons **caractérisé, par spectrométrie de masse, les extraits obtenus** et nous avons présenté et discuté les différents résultats. 109 espèces ont ainsi été mises en évidence (12 dans les extraits de Colchique et 97 dans les extraits de Pervenche) à partir de seulement quelques microlitres des diverses solutions. La facilité et la compatibilité offertes par la technique MALDI-MS rendent légitime la caractérisation des extraits de plantes préalablement à leur criblage à la recherche de nouvelles molécules capables de se fixer à la tubuline.

Nous avons ensuite présenté l'organisation générale de notre protocole de criblage, s'articulant en **trois étapes successives** qui sont l'**incubation une heure à 37°C dans l'eau ultrapure** des molécules à tester avec la tubuline, l'**élimination des composés non liés par filtration/centrifugation sur microconcentrateurs** et enfin l'**analyse par MALDI-TOFMS**

des composés liés directement sans autre traitement d'échantillon (**analyse directe**). Nous avons décrit et validé les résultats qui peuvent être obtenus par l'application de notre protocole qui sont une **discrimination aisée entre une molécule active et une autre non active** avec une précision, une reproductibilité et une robustesse appréciables. Par le calcul des facteurs de qualités des tests, notre démarche a ainsi fait la preuve d'un **potentiel non négligeable dans le cadre de campagnes de criblages**, avec un débit pouvant être évalué à 60 échantillons en 1h50 soit de 32 échantillons à l'heure.

En dernier lieu, l'**application de notre approche de criblage à des extraits bruts de plantes (Colchique d'Automne et Pervenche de Madagascar)** à permis de mettre en évidence **19 molécules actives** se liant à la tubuline.

L'ensemble de ces travaux originaux a donné lieu, en plus de deux articles scientifiques dans des journaux à bons facteurs d'impact, à une déclaration d'invention et un dépôt d'enveloppe Soleau intitulée « **Recherche de nouveaux ligands de récepteurs protéiques par désorption/ionisation laser assistée par matrice couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol** ».

Les perspectives de ces travaux sont nombreuses. En effet, actuellement de nombreux tests différents sont utilisés pour cribler des banques de molécules et de nombreuses techniques sont mises en œuvre. La démarche classiquement utilisée par les industries pharmaceutiques consiste en un criblage d'extraits bruts de plantes à la recherche de touches. Lorsqu'un extrait donne une réponse positive, une étape de fractionnement doit être mise en œuvre pour pouvoir à nouveau tester les fractions de l'extrait actif. Cette étape coûteuse en temps et en matériel végétal ainsi que laborieuse à mettre en place a pour but de déterminer quelle est la molécule de l'extrait brut responsable de l'activité. Notre approche de criblage, par l'utilisation de la spectrométrie de masse comme technique de détection, permet d'avoir directement les deux types d'information : oui ou non un extrait brut de plante est actif, et surtout, quelle molécule est responsable de cette activité.

Ainsi, l'**application de la stratégie globale de criblage proposée dans ce manuscrit permet, à l'aide d'une seule technique, de caractériser finement un extrait de plante en évitant tout risque de dérégulation, puis de le cribler à la recherche de molécules actives, le tout à partir de micro-volumes de solutions.**

De plus notre approche ne met pas en jeu de matériel très coûteux, avec un coût unitaire par molécule testée d'environ 65 centimes d'euro auquel il faut ajouter l'achat d'un spectromètre de masse à temps de vol et source MALDI (coût moyen d'environ 200000€). Il est à noter cependant que ce type d'équipement est largement répandu dans les laboratoires de recherches pharmaceutiques. Par ailleurs, le protocole n'est pas sensible aux pollutions et ne nécessite pas d'étape de purification. Enfin, le risque de pollution croisée est minime du fait que le matériel n'est pas réutilisé d'une analyse à une autre.

Il conviendra alors d'appliquer cette approche au criblage d'autres plantes telles que l'If, à la recherche d'autres nouvelles structures minoritaires capable de se fixer à la tubuline. Une autre perspective consiste en l'application de cette démarche au criblage d'autres cibles, telle que la DiHydroFolate Reductase, enzyme également ciblée par les traitements des cancers. Il suffit pour ce faire d'adapter la membrane du filtre utilisée lors de l'étape de lavage à la taille de la nouvelle cible. Ainsi, d'autres extraits de plantes, telles que le thé vert, pourront être criblés à la recherche de molécules capables de se fixer sur cette autre cible du traitement des cancers.

En dernier lieu, et plus particulièrement en ce qui concerne le criblage d'extraits bruts de plantes, il convient de préciser que cette approche, au même titre que celles utilisées dans les autres tests de criblage, ne met en évidence que des molécules actives « isolées ». En effet, un biais inhérent à ces techniques de criblage moléculaire est de ne pas rendre compte des effets de synergie moléculaire dans lesquels certaines molécules, elles mêmes dénuées d'activité vis-à-vis de la cible utilisée, potentialisent l'activité d'autres molécules. Ces phénomènes rencontrent de plus en plus d'intérêt dans le cadre de la recherche pharmaceutique et nécessitent des tests bien plus complexes pour être mis en évidence. Il est alors important de préciser que, si l'approche que nous avons mis au point ne permet pas d'atteindre une réponse absolue quand à l'activité des molécules testées, elle offre une opportunité simple et efficace de valoriser divers extraits végétaux. Une fois des molécules actives mises en évidence par ce protocole, il conviendra de les étudier à l'aide d'autres tests caractérisants la réponse biologique obtenue.

Bibliographie

- (1) Gwynn, J.; Hylands, P. J. *drug discovery world summer 2000* **2000**, 54.
- (2) Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Prawat, H.; Pisutjaroenpong, S.; Engprasert, S.; Chumsri, P.; Tengchaisri, T.; Sirisinha, S.; Picha, P. *pure & appl. Chem.* **1998**, *70*, 2065.
- (3) Mukherjee, A. K.; Basu, S.; Sarkar, N.; Ghosh, A. C. *Current Medicinal Chemistry* **2001**, *8*, 1467.
- (4) Graham, J. G.; Quinn, M. L.; Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R. *Journal of Ethnopharmacology* **2000**, *73*, 347.
- (5) Mans, D. R. A.; Rocha, A. B. D.; Schwartzmann, G. *The Oncologist* **2000**, *5*, 185.
- (6) Boullard, B. *Plantes médicinales du monde réalités & croyances*, 2001; pp 636 pages
- (7) Bernard, B. *l'herbier oublié, secrets de plantes retrouvés*, éditions plumes de carottes ed., 2003.
- (8) Bellet, P.; Delaveau, P.; Delourme-Houdé, J.; Fourneau, J. P.; Gagnault, J. C.; Gorget, C.; Gueunier, C.; Potier, P. *pérennité des alcaloïdes* **1985**, 119.
- (9) Bruneton, J. *pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, Lavoisier ed.Paris, 1995.
- (10) Gagnault, J. C. *l'actualité chimique* **1981**, *9*, 13.
- (11) Robinson, T. *Alkaloids - The organic constituents of higher plants*; Cordus press: Amherst, 1991.
- (12) Köhler, F. E. *Köhler's Medizinal Pflanzen*, 1887.
- (13) Jaeger, A.; Flesch, F. *Colchicum autumnale*, 1990.
- (14) Huxley, A. H. *The new Royal Horticultural Society dictionary of Gardening*, MacMillan ed.London, 1992; Vol. 1.
- (15) Thies, P. W. *Pharm Unserer Zeit* **1985**, *14*, 149.
- (16) Dehon, B.; Chagnon, J. L.; Vinner, E.; Pommery, J.; Mathieu, D.; Lhermitte, M. *Biomed. Chromatogr.* **1999**, *13*, 235.
- (17) Brvar, M.; Kozelj, G.; Mozina, M.; Bunc, M. *Wien Klin Wochenschr* **2004**, *116*, 205.
- (18) Lenoir, G.; Sermet, I.; Duhamel, J. F. *Journal de pédiatrie et de puériculture* **2001**, *14*, 437.
- (19) Seliger, H. *Ther Umsch* **1958**, *15*, 158.
- (20) Dustin, P. *Rev Med Brux* **1989**, *10*, 385.
- (21) Ondra, P.; Vfilka, I.; ViCar, J.; Sfitltipinar, N.; gimfinek, V. *Journal of Chromatography A* **1995**, *704*, 351.
- (22) Ellington, E.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. *phytochem. Anal.* **2003**, *14*, 164.
- (23) Santavy; Reichstein. *Helv. Chim. Acta.* **1950**, *33*, 1606.
- (24) Potessilova. *Collect. Czech Chem Commun* **1967**, *32*, 141.
- (25) Gaillard, Y.; Pepin, G. *Journal of Chromatography B* **1999**, *733*, 181–229.
- (26) Yoshida, K.; Hayashi, T.; Sano, K. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 593.
- (27) Vicar, J.; Klusakova, L.; Simanek, V. *Acta. Univ. Palacki. Olomuc Fac. Med.* **1993**, *136*, 5.
- (28) Santavy, F.; Preiminger, V.; Simanek, V.; Potesilova, H. *Planta Med* **1981**, *43*, 153.
- (29) Ueno, Y. *Proceeding of the Japan Academy* **1953**, *6*, 264.
- (30) Hamel, E.; Ho, H. H.; Gil-Jong, K.; Lin, C. M. *Biochemical pharmacology* **1988**, *37*, 2445.
- (31) Hostie, S. B.; MacDonald, T. L. *biochemical pharmacology* **1990**, *39*, 1271.
- (32) VanDerHeijden, R.; Jacobs, D. I.; Snoeijer, W.; Hallard, D.; Verpoorte, R. *curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 607.
- (33) Stearn, T. *The Catharanthus alkaloids*; Taylor and Farnsworth, 1975.

- (34) Nammi, S.; Boini, M. K.; Lodagala, S. D.; Behara, R. B. S. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2003**, 3.
- (35) Johnson, I. S.; Armstrong, J. G.; Gorman, M.; Jr, J. P. B. *cancer research* **1963**, 23, 1390.
- (36) Svoboda, G. H. "the role of the alkaloids of catharanthus roseus (L.) G. Don (vinca rosea) and their derivatives in cancer chemotherapy"; plants: the potentials for extracting protein, medicines, and other useful chemicals, 1977, indianapolis.
- (37) Shanks, J. V.; Bhadra, R.; Morgan, J.; Rijhwani, S.; Vani, S. *biotechnology and bioengineering* **1998**, 58, 333.
- (38) McCoy, E.; O'Connor, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14276.
- (39) Irshad, A. isolation and structural studies on the alkaloids of *Catharanthus roseus* (thèse de Doctorat Université de Karachi) Karachi, 1985.
- (40) Tikhomiroff, C.; Allais, S.; Klvana, M.; Hisiger, S.; Jolicoeur, M. *biotechnol Prog.* **2002**, 18, 1003.
- (41) Johnson, I. S.; Wright, H. F.; Svoboda, G. H.; Vlantis, J. *cancer research* **1960**, 20, 1016.
- (42) Jossang, A.; Fodor, P.; Bodo, B. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 7162.
- (43) Duflos, A.; Kruczynski, A.; Barret, J. M. *Curr. Med. Chem. - Anti-cancer agents* **2002**, 2, 55.
- (44) Tikhomiroff, C.; Jolicoeur, M. *journal of chromatography A* **2002**, 955, 87.
- (45) Boyle, P.; Ferlay, J. *ann. oncol.* **2005**, 16, 481.
- (46) Hannun, Y. A. *blood* **1997**, 89, 1945.
- (47) Lee, M. S.; Kerns, E. H. *mass spectrometry reviews* **1999**, 18, 187.
- (48) Tammela, P. screening methods for the evaluation of biological activity in drug discovery, University of Helsinki, 2004.
- (49) Banerjee, P. K.; Rosofsky, M. *script magazine* **1997**, 35.
- (50) Vistoli, G.; Pedretti, A.; Testa, B. *Drug discovery today* **2008**, 13, 285.
- (51) Shoemaker, R. H.; Scudiero, D. A.; Melillo, G.; Currens, M. J.; Monks, A. P.; Rabow, A. A.; Covell, D. G.; Sausville, E. A. *current topics in medicinal chemistry* **2002**, 2, 229.
- (52) Santoro, A.; Cavina, R.; Latteri, F.; Zucali, P. A.; Ginanni, V.; Campagnoli, E.; Ferrari, B.; Morengi, E.; Pedicini, V.; Roncalli, M.; Alloisio, M.; Ravasi, G.; Parra, H. J. S. *Annals of Oncology* **2004**, 15, 33–37.
- (53) Malpas, J. S.; Rohatiner, A. *advances in oncobiology* **1996**, 1, 317.
- (54) CNRS, C. d. p. d. Pierre Potier, médaille d'or du CNRS, 2005.
- (55) Dumontet, C.; Sikic, B. I. *J. Clin. Oncol.* **1999**, 17, 1061.
- (56) Vinh, J. étude et caractérisation structurale des modifications post-traductionnelles de la tubuline par spectrométrie de masse (Thèse présentée pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie- Paris 6), université Pierre et Marie Curie, 1999.
- (57) Jordan, M. A. *Curr. Med. Chem. - Anti-cancer agents* **2002**, 2, 1.
- (58) Hu, W.; Dong, H.; Li, Y. Z.; Hu, X. T.; Han, G. J.; Qu, Y. B. *Acto Pharmacol Sin* **2004**, 25, 775.
- (59) Barron, D. M.; Chatterjee, S. K.; Ravindra, R.; Roof, R.; Baloglu, E.; Kingston, D. G. I.; Bane, S. *analytical biochemistry* **2003**, 315, 49.
- (60) Potier, P.
- (61) Verdier-Pinard, P.; Lai, J. Y.; Yoo, H. D.; Yu, J.; Marquez, B.; Nagle, D. G.; Nambu, M.; White, J. D.; Falk, J. R.; Gerwick, W. H.; Day, B. W.; Hamel, E. *molecular pharmacology* **1998**, 53, 53.
- (62) Hamel, E.; Blokhin, A. V.; Nagle, D. G.; Yoo, H. D.; Gerwick, W. H. *drug development research* **1995**, 34, 110.
- (63) Banerjee, S.; Chakrabarti, G.; Bhattacharyya, B. *biochemistry* **1997**, 36, 5600.
- (64) Vandecandelaere, A.; Martin, S. R.; Engelborghs, Y. *Biochem. J.* **1997**, 323, 189.
- (65) Jordan, M. A.; Wilson, L. *nature reviews, cancer* **2004**, 4, 253.
- (66) Rai, S. S.; Wolff, J. *the journal of biological chemistry* **1996**, 271, 14707.
- (67) Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R. *Environmental Health Perspectives* **2001**, 109, 69.

- (68) Wong, C. K. L.; So, M. A.; Chan, T. W. D. *Eur. J. Mass Spectrom.* **1998**, 223.
- (69) Dempster, A. J. *Phys. Rev.* **1918**, 11, 316.
- (70) Hofstadler, S. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **1994**, 5, 894.
- (71) Horiatis, D.; Wang, Q.; Pinski, J. *cancer letters* **2004**, 210, 119.
- (72) Enjalbal, C.; Martinez, J.; Aubagnac, J. L. *mass spectrometry reviews* **2000**, 19, 139.
- (73) Quetin-Leclerc, J. *journal de pharmacie de belgique* **2002**, 57, 11.
- (74) Poutaraud, A.; Girardin, P. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* **2002**, 9, 63.
- (75) Wood, L. W. *canadian journal of fisheries and aquatic sciences* **1985**, 42, 38.
- (76) Favretto, D.; Piovan, A.; Cappelletti, E. M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, 12, 982.
- (77) Trim, P. J.; Avery, J. L.; McEwen, A.; Snel, M. F.; Claude, E.; Marshall, P. S.; West, A.; Princivalle, A. P.; Clench, M. "MALDI-ion mobility separation-MS imaging of vinblastine and its metabolites in rat tissues"; ASMS, 2008, Denver.
- (78) Miller, J. C.; Gutowski, G. E.; Poore, G. A.; Boder, G. B. *journal of medicinal chemistry* **1976**, 20, 409.
- (79) Besselièvre, R.; Langlois, N.; Potier, P. *Bulletin de la société chimique de france* **1972**, 4, 1477.
- (80) Hardouin, C.; Doris, E.; Rousseau, B.; Mioskowski, C.; Nierlich, M. *acta crystallogr C.* **1999**, 225.
- (81) ICH, c. "Text on validation of analytical procedures Q2A", 1994.
- (82) ICH, c. "validation of analytical procedures: methodology Q2B", 1996.
- (83) Rajaian, H.; Symonds, H. W.; Bowmer, C. J. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1997**, 20, 421.
- (84) Vicken, R.; Vorperian, M. D.; Thomas, C.; Miller, S.; Craig, T. *Journal of the American College of Cardiology* **1997**, 30, 791.
- (85) Myung, S. W. *Rapid communications in Mass Spectrometry* **2000**, 14, 2046.
- (86) Bussotti, L.; Ccelli, I.; D'Auria, M.; Foggi, P.; Lesma, G.; Silvani, A.; Villani, V. *J. Phys. Chem. A* **2003**, 107, 9079.
- (87) Park, Z. Y.; Russell, D. H. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 2667.
- (88) Kaur, S.; McGuire, L.; Tang, D.; Dollinger, G.; Huebner, V. *journal of Protein Chemistry* **1997**, 16, 505.
- (89) Prakash, V.; Timasheff, S. N. *Biochem. J.* **1991**, 30, 873.
- (90) Himes, R. H. *pharmacology and therapeutics* **1991**, 51, 257.
- (91) Duflos, A.; Fahy, J.; Boullay, V. T. d.; Barret, J. M.; Hill, B. vinca alkaloid antimitotic halogenated derivatives US, 2000.
- (92) Fahy, J. *current pharmaceutical design* **2001**, 7, 1181.
- (93) Cordell, G. A.; Quinn-Beattie, M. L.; Farnsworth, N. R. *phytotherapy research* **2001**, 15, 183.

Index des figures et des tableaux

Figure 1 : représentation schématique et photographie du Colchique d'automne ; (a) coupe transversale du fruit ; (b) fruit ; (c) graine ; (d) bulbe (cormus) ; (e) plante entière (feuilles et jeune fruit ou fleur) ; (f) fleur ; (g) style ; (h) étamine ; (i) coupe transversale du bulbe (cormus) et de l'embryon.....	8
Figure 2 : structures des différents alcaloïdes du colchique d'automne	12
Figure 3 : représentation schématique et photographie de la Pervenche de Madagascar <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. ; (a) partie aérienne de la plante ; (b) fruit ; (c) graine ¹²	14
Figure 4 : représentation schématique de la biosynthèse et structures des principaux alcaloïdes indoliques de la Pervenche de Madagascar (avec numérotation IUPAC) ⁴³ ,	20
Figure 5 : stratégie de découverte de nouveaux médicaments	22
Figure 6 : Arrangement des sous unités de tubuline en microtubules au sein des cellules eucaryotes et image de microscopie électronique de microtubules.....	26
Figure 7 : La mitose et la tubuline constituant le fuseau mitotique (en vert) ⁵⁶	27
Figure 8 : Exemple de résultats du « test à la tubuline » en présence de deux types de molécules actives	28
Figure 9 : structure de la colchicine	30
Figure 10 : structures de la vinblastine et de la vincristine	31
Figure 11 : Démarches parallèles de criblage d'extraits de plantes	33
Figure 12 : Éléments constitutifs d'un spectromètre de masse	35
Figure 13 : illustration de la courbe d'ablation et de la "fenêtre MALDI" en fonction de l'énergie du laser incident.....	38
Figure 14 : exemple de spectre MALDI-TOFMS d'une solution de vinblastine (810,3 g/mol) à 1.10^{-6} M (matrice utilisée 2,5-DHB 1 M).....	43
Figure 15 : Représentation graphique de la mesure de résolution à 50% de vallée	44
Figure 16 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse à temps de vol	47
Figure 17 : schéma de l'analyseur TOFMS utilisé au cours de cette étude (Bruker Reflex IV)	48
Figure 18 : étude de l'écart type sur l'intensité moyenne du pic à $[M+H]^+$ de la vinblastine (solution à 1.10^{-6} M) obtenu par MALDI-TOFMS (1 série et 4 séries de X tirs laser ($10 < X < 100$)).....	49
Figure 19 : porte échantillon du MALDI-TOFMS	50
Figure 20 : Source externe du FT-ICRMS IonSpec Explorer, Champ magnétique de 9,4 Tesla.....	51
Figure 21 : schéma de la cellule d'analyse FTICRMS équipant notre spectromètre de masse (IonSpec-Varian).....	52
Figure 22 : schéma de l'analyseur FTICRMS utilisé au cours de cette étude (Explorer FTMS 9.4T, module ProMALDI).....	56
Figure 23 : Schéma des facteurs impliqués dans le développement de tests de criblages moléculaires ciblés ⁴⁸	58
Figure 24 : équations permettant le calcul des différents paramètres de qualité	60
Figure 25 : protocole général de l'étude	62
Figure 26 : photographie d'un microconcentrateur (a) et son utilisation au sein d'un tube Eppendorf® (b).....	65

Figure 27 : Schéma général du protocole d'élimination des molécules non liées aux cibles protéiques	66
Figure 28 : Représentation schématique des dates de récoltes des différents échantillons de Colchique d'automne disponibles pour nos recherches	70
Figure 29 : Spectres MALDI-TOFMS (2,5-DHB, mélange intime) des extraits (dichlorométhane/méthanol v/v) de graines, capsules, tiges, feuilles, cormus père et cormus fils de Colchique d'automne (pics de matrice ☉)	72
Figure 30 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) d'un extrait (dichlorométhane/méthanol v/v) de graines de Colchique d'automne (pics de matrice ☉)	73
Figure 31 : Spectres MALDI-TOFMS (2,5-DHB mélange intime) d'extraits (méthanol, chloroforme, dichlorométhane, dichloroéthane, dibromométhane) de Pervenche de Madagascar. Les attributions des espèces connues se font par rapport à leurs pics pseudomoléculaires $[M+H]^+$ respectifs (pics de matrice ☉)	76
Figure 32 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) de l'extrait méthanol de la Pervenche de Madagascar	79
Figure 33 : Spectres SORI-CID MALDI-FTICRMS des pics attribués à la vinblastine (a) et à la vincristine (b) de l'extrait méthanol de Pervenche de Madagascar	80
Figure 34 : schémas de fragmentation de la vinblastine ($R=CH_3$) et de la vincristine ($R=CHO$)	81
Figure 35 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) de l'extrait chloroforme de la Pervenche de Madagascar	82
Figure 36 : (a) Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime, mode de détection positif) de l'extrait dichlorométhane de la Pervenche de Madagascar ; (b) agrandissements des pics à $M+2$ de M_1 et M_2 ; (c) Analyse MALDI-TOFMS (2,5-DHB, mélange intime, mode de détection négatif) de la présence de chlore dans l'extrait dichlorométhane de la Pervenche de Madagascar	83
Figure 37 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) de l'extrait dichloroéthane de Pervenche de Madagascar	85
Figure 38 : (a) Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime, mode de détection positif) de l'extrait dibromométhane de Pervenche de Madagascar ; (b) Analyse MALDI-TOFMS (2,5-DHB, mélange intime, mode de détection négatif) de la présence de brome dans l'extrait dibromométhane de la Pervenche de Madagascar	86
Figure 39 : Spectres MALDI-FTICRMS (2,5-DHB mélange intime) de la leurosine et de la vinblastine (5.10^{-6} M) en solution dans du dichlorométhane	88
Figure 40 : Spectres SORI-CID-MALDI-FTICRMS (MS^2) de M_1 , M_2 , M_4 , M_5 , M_6 , M_8 , M_9 et M_{10}	89
Figure 41 : Spectre MS^3 du fragment $[vindoline+CH_2]^+$ commun à tous les adduits (SORI-CID-MALDI-FTICRMS)	90
Figure 42 : (a) Proposition de structures des adduits d'alcaloïdes M_1 à M_{10} ; (b) proposition de structure tridimensionnelle des adduits (inspirée de la structure de la leurosine+ CH_3I^{80})	92
Figure 43 : Proposition de mécanisme de formation de l'ion à $m/z = 469,2332$ Th observé pour tous les adduits par MS^2 et hypothèse de fragmentation MS^3	93
Figure 44 : Intensités absolues des pics pseudomoléculaires obtenus par MALDI-TOFMS pour les composés (colchicine, vinblastine ou vincristine) retenus sur les membranes des microconcentrateurs (mode réflectron, mode de dépôt par mélange intime, matrice 2,5-DHB)	96
Figure 45 : Analyse directe par MALDI-TOFMS (mode reflectron) de molécules liées à la tubuline (2.10^{-5} M) (colchicine, vinblastine ou vincristine) (après incubation, filtration, lavages et élution) (dépôt par mélange intime avec le 2,5-DHB ou l'HCCA)	97

Figure 46 : (A) Vinblastine (5.10^{-6} M) analysée par LDI-TOFMS (mode reflectron, 337 nm); (B) analyse LDI-TOFMS (mode reflectron, 337 nm) de la vinblastine (5.10^{-5} M) liée à la tubuline (2.10^{-5} M); (C) analyse par MALDI-TOFMS de la vinblastine (5.10^{-5} M) liée à la tubuline (2.10^{-5} M) (2,5-DHB, dépôt en couche mince); (D) analyse par MALDI-TOFMS de la vinblastine (5.10^{-5} M) liée à la tubuline (2.10^{-5} M) (2,5-DHB, dépôt en mélange intime); irradiance de l'ordre de 5.10^7 W.cm ⁻²	98
Figure 47 : Intensités absolues du pic pseudomoléculaire de la vinblastine ($[M+H]^+ = 811,42$ Da) lors de l'analyse directe par MALDI-TOFMS (après incubation avec la tubuline, filtration, lavages et élution) pour différentes solutions de matrices d'acidité croissante (2,5-DHB, mélange intime : 0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 5% et 10% de TFA)	100
Figure 48 : Analyse directe par MALDI-TOFMS de la colchicine (5.10^{-5} M), vinblastine (5.10^{-5} M) et vincristine (5.10^{-5} M) liées simultanément à la tubuline (2.10^{-5} M) avec le 2,5-DHB ou l'HCCA comme matrice	101
Figure 49 : (A) Analyse directe par MALDI-TOFMS (mode reflectron) de la colchicine (5.10^{-5} M) liée à l'ovalbumine (2.10^{-5} M) après incubation, filtration, lavage et élution ; (B) Analyse directe par MALDI-TOFMS (mode reflectron) de la colchicine (5.10^{-5} M) liée à la tubuline (2.10^{-5} M) après incubation, filtration, lavage et élution ; (mode de dépôt par mélange intime avec le 2,5-DHB) (* correspond au pic pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de la colchicine)	105
Figure 50 : (A) structure de l'amiodarone ; (B) analyse MALDI-TOFMS (mode reflectron) de l'amiodarone (5.10^{-6} M) (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB)	106
Figure 51 : (A) analyse MALDI-TOFMS de l'amiodarone (5.10^{-5} M) liée à l'ovalbumine (2.10^{-5} M) après incubation, filtration, lavages et élution (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB) ; (B) analyse MALDI-TOFMS de l'amiodarone liée à la tubuline (2.10^{-5} M) après incubation, filtration, lavages et élution (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB) ; (* correspond à l'ion $[M+H]^+$ de l'amiodarone)	107
Figure 52 : photo-isomérisation de la colchicine	108
Figure 53 : Spectres MALDI-TOFMS obtenus lors de l'analyse de la matrice 2,5-DHB, de l'extrait de graines de colchique d'automne (avec le 2,5-DHB comme matrice) et de la solution obtenue à partir des microconcentrateurs après incubation du même extrait avec la tubuline, filtration, lavages et élution (matrice 2,5-DHB). En cartouche sont présentés les agrandissements des zones des spectres correspondantes aux différents alcaloïdes présents dans l'extrait de colchique d'automne (pics de matrice ☉)	116
Figure 54 : Analyses directes par MALDI-TOFMS des éluats (après incubation avec la tubuline, filtration, lavages et élution) des différents extraits de Pervenche de Madagascar (méthanol, chloroforme, dichlorométhane, dichloroéthane, dibromométhane) (2,5-DHB, mélange intime) (pics de matrice ☉)	119
Tableau 1 : formules brutes, masses molaires et ions pseudomoléculaires $[M+H]^+$ théoriques des principaux alcaloïdes du Colchique d'automne	12
Tableau 2 : formules brutes, masses molaires et ions pseudomoléculaires $[M+H]^+$ théoriques des principaux alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar ^{32,35,36,37,38,39,,,}	17
Tableau 3 : Molécules liant la tubuline sur lesquelles a porté cette étude (avec présentation des formules brutes, des masses moléculaires et des m/z correspondants aux ions $[M+H]^+$ des différentes espèces)	31

Tableau 4 : matrices MALDI couramment utilisées ⁵⁶	40
Tableau 5 : catégorisation des tests de criblage en termes de qualité évaluée par le facteur Z.....	60
Tableau 6 : formules brutes probables pour la molécule M1 (erreur maximale 3 ppm)	84
Tableau 7 : Récapitulatif des formules brutes et des M ⁺ théoriques et expérimentaux des 10 adduits d'alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar.....	87

Annexes

Publications associées à ces travaux :

- Tubulin-binding drug screening by MALDI-TOFMS, P. Hannewald, B. Maunit, J.F. Muller, Analytical Chemistry 78(13) (2006)
- DHFR binding drug screening by MALDI-TOFMS, P. Hannewald, B. Maunit, J.F. Muller, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 392(7-8) (2008)
- MALDI-MS structural elucidation of tubulin-binding compounds, P. Hannewald, G. Frache, B. Maunit, J.F. Muller, en préparation

Autres publications :

- Synthesis of potentially photoactivatable coumarin derivatives *via* a 1,3-dipolar cycloaddition, E. D. Chenot, J.C. Rodriguez-Dominguez, P. Hannewald, A. Comel, G. Kirsch, Journal of Heterocyclic Chemistry 45(1) (2008)
- Triumfettamide and triumfettoside Ic, two ceramides and other secondary metabolites from stems of wild *Triumfetta cordifolia* A. Rich (*Tiliaceae*), L.P. Sandjo, P. Hannewald, M. Yemloul, G. Kirsch, B. Tchaleu-Ngadjui, Helvetica Chimica Acta, 91(7) (2008)

Valorisation :

- Dépôt d'enveloppe Soleau et déclaration d'invention « Méthode de détermination de la gamme d'affinité de molécules liant des protéines cibles par désorption/ionisation laser assistée par matrice couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol » (2007)

Résumé

Substances naturelles se fixant sur la tubuline – mise en œuvre d'un criblage par spectrométrie de masse

La découverte de nouveaux médicaments par le criblage biomoléculaire est au centre de la recherche pharmaceutique actuelle. La spectrométrie de masse, en tant que technique d'analyse fiable, reproductible, sensible, spécifique, compatible avec de nombreux types d'échantillons et permettant un débit d'analyse conséquent, trouve ainsi sa place dans les stratégies de recherche et développement de nouveaux médicaments. Le but de ce travail était de caractériser finement des extraits de plantes à activité anti-tubuline et de mettre en place et de valider une stratégie de criblage originale, impliquant la spectrométrie de masse comme technique de détection. Son potentiel devait être mis en évidence en l'appliquant à différents échantillons complexes tels que des extraits de plantes. Le protocole que nous avons développé s'articule en trois étapes successives qui sont l'incubation des molécules à tester avec la cible moléculaire choisie (la tubuline), l'élimination des composés non liés et enfin l'analyse par MALDI-TOFMS des composés liés. Notre protocole a fait l'objet d'une démarche de validation et les résultats pouvant être obtenus ont été discutés. L'application de notre approche à des extraits bruts de plantes (Colchique d'Automne et Pervenche de Madagascar) a permis de mettre en évidence 19 molécules actives se liant à la tubuline.

Mots clés : criblage moléculaire ; spectrométrie de masse ; MALDI ; TOFMS ; FTICRMS ; extraits de plantes ; Colchique d'Automne ; Pervenche de Madagascar

TITRE

Substances naturelles se fixant sur la tubuline – mise en œuvre d'un criblage par spectrométrie de masse

Thèse soutenue le 28/04/2009

Par Paul Hannewald

RESUME :

La découverte de nouveaux médicaments par le criblage biomoléculaire est au centre de la recherche pharmaceutique actuelle. La spectrométrie de masse, en tant que technique d'analyse fiable, reproductible, sensible, spécifique, compatible avec de nombreux types d'échantillons et permettant un débit d'analyse conséquent, trouve ainsi sa place dans les stratégies de recherche et développement de nouveaux médicaments. Le but de ce travail était de caractériser finement des extraits de plantes à activité anti-tubuline et de mettre en place et de valider une stratégie de criblage originale, impliquant la spectrométrie de masse comme technique de détection. Son potentiel devait être mis en évidence en l'appliquant à différents échantillons complexes tels que des extraits de plantes. Le protocole que nous avons développé s'articule en trois étapes successives qui sont l'incubation des molécules à tester avec la cible moléculaire choisie (la tubuline), l'élimination des composés non liés et enfin l'analyse par MALDI-TOFMS des composés liés. Notre protocole a fait l'objet d'une démarche de validation et les résultats pouvant être obtenus ont été discutés. L'application de notre approche à des extraits bruts de plantes (Colchique d'Automne et Pervenche de Madagascar) a permis de mettre en évidence 19 molécules actives se liant à la tubuline.

MOTS CLES : criblage moléculaire ; spectrométrie de masse ; MALDI ; TOFMS ; FTICRMS ; extraits de plantes ; Colchique d'Automne ; Pervenche de Madagascar