HAL
open science

Criblage d'inhibiteurs réversibles et irréversibles des phosphatases CDC25s par spectrométrie de masse - Application à des extraits d'origine végétale

Estelle Sibille

To cite this version:

Estelle Sibille. Criblage d'inhibiteurs réversibles et irréversibles des phosphatases CDC25s par spectrométrie de masse - Application à des extraits d'origine végétale. Autre. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0260 . tel-01750541

HAL Id: tel-01750541

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750541v1

Submitted on 29 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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Ecole Doctorale Lorraine de Chimie et Physique Moléculaires

UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

THESE de Doctorat

Présentée par

Estelle SIBILLE

En vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Discipline : Chimie – Physique

Spécialité : Chimie Analytique

Criblage d'inhibiteurs réversibles et irréversibles des phosphatases CDC25 par spectrométrie de masse – Application à des extraits d'origine végétale

Soutenue le 18 octobre 2013 devant le jury composé de :

Prof. Philippe MORIN	Université d'Orléans	Rapporteur
Prof. Jean-Hugues RENAULT	Université de Reims	Rapporteur
Prof. Christiane GARBAY	Université de Paris Descartes	Examinateur
Dr. Paul HANNEWALD	Plant Advanced Technologies SA	Examinateur
Prof. Denyse BAGREL	Université de Lorraine	Co-Directrice
Prof. Patrick CHAIMBAULT	Université de Lorraine	Co-Directeur
Prof. Gilbert KIRSCH	Université de Lorraine	Membre invité

Laboratoire de Chimie et Physique – Approche Multi-Echelles des Milieux Complexes

Laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes

Avant-Propos

Ce travail a été initié et réalisé grâce à la collaboration bi-disciplinaire chimie-biologie entre le Laboratoire de Chimie Physique – Approche Multi-Echelles des Milieux Complexes (LCP-A2MC) et le Laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes (SRSMC) de l'Université de Lorraine.

Je tiens à remercier mes deux co-directeurs de thèse, le Professeur Denyse Bagrel (SRSMC) et le Professeur Patrick Chaimbault (LCP-A2MC), initiateurs de cette thèse, pour la confiance qu'ils m'ont accordée, leur soutien et les connaissances qu'ils m'ont apportées au cours de ces années de thèse.

Je prie le Professeur Philippe Morin ainsi que le Professeur Jean-Hugues Renault d'accepter mes remerciements pour l'honneur qu'ils me font d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je témoigne également ma reconnaissance au Professeur Christiane Garbay et au Docteur Paul Hannewald pour avoir accepté d'être membres du jury. Je remercie le Professeur Gilbert Kirsch pour sa présence en tant que membre invité du jury.

Je désirerai remercier les ingénieurs du LCP-A2MC, Messieurs Gabriel Krier et Lionel Vernex-Loset pour le travail qu'ils fournissent en amont, mais également pour leur présence rassurante au laboratoire et leurs conseils judicieux. Une note particulière à Stéphanie Philippot, ingénieur au SRSMC, qui m'a aidée et accordée de son temps lors de mes passages au laboratoire de biologie.

Je tiens à remercier sincèrement les cadres du laboratoire, M. Vincent Carré, M. Olivier Delhomme, M. Frédéric Aubriet et M. Jean-Jacques Gaumet qui ont su être présent lorsque cela fut nécessaire.

Je témoigne également toute ma reconnaissance aux doctorants actuels, anciens doctorants et « nouveaux docteurs » que j'ai côtoyés durant ma thèse. Mes anciens collègues de Counter Strike, Didier, David, Nico, Junien, Cyril et Greg, merci pour m'avoir fait découvrir ce jeu et ces parties inoubliables. Merci à Seb et Loïc, et le petit dernier Alain, pour avoir partagé mon quotidien, pour m'avoir écouté « raconter ma vie »… Encore un grand merci à Emilie, elle qui m'a tout appris de la production de CDC25s !

Enfin je ne saurai oublier ma famille… et merci à Toi.

Liste des publications et communications

Publications internationales relatives à ce travail

E. Sibille, E. Bana, W. Chaouni, M. Diederich, D. Bagrel, P. Chaimbault, *Development of a matrix-assisted laser desorption/ionization–mass spectrometry screening test to evidence reversible and irreversible inhibitors of CDC25 phosphatases*, Anal. Biochem. 430 (2012) 83-91.

E. Bana, **E. Sibille**, S. Valente, C. Cerella, P. Chaimbault, G. Kirsch, M. Dicato, M. Diederich, D. Bagrel, *A novel coumarin-quinone derivative SV37 inhibits CDC25 phosphatases, impairs proliferation, and induces cell death*, Mol. Carcinogen. DOI: 10.1002/mc.22094.

Autres publications internationales

T. Eddaya, A. Boughdad, **E. Sibille**, P. Chaimbault, A. Zaid, A. Amechrouq, *Biological activity of Sapindus mukorossi Gaerten(Sapindaceae) aqueous extract against Thysanoplusia orichalcea (Lepidoptera: Noctuidae)*, Ind. Crops Prod. 50 (2013) 325-332.

A. Moussaron, P. Arnoux, R. Vanderesse, **E. Sibille**, P. Chaimbault, C. Frochot, Lipophilic phthalocyanines for their potential interest in photodynamic therapy: synthesis and photo-physical properties, Tetrahedron 69 (2013) 10116-10122.

Communications affichées

E. Sibille, E. Bana, D. Bagrel, G. Kirsch, P. Chaimbault, Criblage par MALDI-TOF-MS de nouveaux composés inhibiteurs des protéines phosphatases CDC25s.
Journées de la Société Française de Spectrométrie de Masse, du 19 au 22 septembre 2011 à AVIGNON.

E. Sibille, K. Benlounes, F. Dupire, M. Matt, P. Chaimbault, Study of the composition of broccoli florets and seeds by Thin Layer Chromatography and Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry.
Montreux Symposium on LC-MS, du 07 au 09 novembre 2012 à MONTREUX, Suisse.

Liste des abréviations

2,5-DHB	Acide 2,5-DiHydroxybenzoïque
9-AA	Acide 9-aminoacridine
AC	Adriamicin®, Cyclophosphamide
ACN	Acétonitrile
AcOH	Acide acétique
ADMET	Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination, Toxicologie
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AF	Acide Formique
$AgNO_3$	Nitrate d'argent
APC/C	*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messager
ATM	*Ataxia-Telangiectasia Mutated*
ATR	*ATM and Rad3-Related*
AU	Unité arbitraire
BuOH	Butanol
Ca	Calcium
CAK	*Cyclin-Activated Kinase*
CDC25s	*Cell Division Cycle 25*
CDK	*Cyclin-Dependant Kinase*
CGase	CystéinylGlycinase
α-CHCA	Acide α-Cyano-4-HydroxyCinnAmique
$CHCl_3$	Trichlorométhane
Chk	*Checkpoint*
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer
CKI	*Cyclin-dependant Kinase Inhibitor*
CMR	Cancérogènes, Mutagènes et toxiques pour la Reproduction
COX-2	*CycloOXygenase-2*
DAD	*Diode Array Detector*
DAS_2	DiAllyldiSulfure
DE	Délai d'extraction
ELSD	Détecteur évaporatif à diffusion de la lumière
DHFR	*DiHydroxy Folate Reductase*
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
DSP	Phosphatase à Double Spécificité
DTT	DiThioThreitol
ECD	*Electron Capture Dissociation*
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
EGCG	EpiGalloCatéchine-3-Gallate
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
ESI	Ionisation électrospray

EtOAc	Acétate d'éthyle
EtOH	Ethanol
FA	Acide Férulique
FAC	Fluorouracil Adriamicin® Cytoxan
FCU	Frottis Cervico-Utérin
FEC	*Fluorouracil Epirubicin Cyclophosphamide*
FFT	*Fast Fourier Transform*
FTICR	Résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier
FTMS	Spectrométrie de masse à transformée de Fourier
FWHM	*Full Width at Half Maximum*
GABA	Acide γ-AminoButyrique
GBS	Glucobrassicine
GGT	γ-GlutamylTransférase
GSH	Glutathion
GSL	Glucosinolate
GST	Gluathion *S*-Transferase
GSTO1	Glutathion *S*-Transferase Omega 1
HABA	Acide 2-(4-HydroxyphenylAzo)-Benzoïque
HCl	Acide Chlorhydrique
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HPTLC	Chromatographie sur couche mince haute performance
HTS	Criblage à haut débit
IARC	*International Agency for Research on Cancer*
IC_{50}	Concentration inhibitrice médiane
IMS	Imagerie par Spectrométrie de Masse
iNOS	*inducible Nitric Oxide Synthase*
IRMPD	*Infrared Multiphoton Ionization Dissociation*
ITC	Isothiocyanate
LDI	Ionisation Désorption Laser
LTSS	Etudes de stabilité à long terme
MAE	Extraction Assistée par Microondes
MALDI	Ionisation Désorption Laser Assistée par Matrice
MAP	*Protein Associated Microtubules*
MAPKAPK-2	*MAP kinase-activated protein kinase 2*
Max	*Myc-associated factor X*
MeOH	Méthanol
Mg	Magnésium
MIC	Concentration inhibitrice minimale
MLSMR	Molecular Libraries Small Molecule Repository
MOWSE	*MOlecular Weight SEarch*
MS	Spectrométrie de Masse
NA	Acide Nicotinique
Na	Sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NAT	*N-AcetylTransferase*

OEC	Observatoire Européen de Cancer
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OSC	Composés OrganoSoufrés
PIE	*Pulsed Ion Extraction*
PMF	*Peptide Mass Fingerprint*
PTP	Protéine Tyrosine Phosphatase
PTPB1	Protéine Tyrosine Phosphatase B1
RPLC	Chromatographie liquide à phases inversées
RSA	Relations Structures-Activités
SA	Acide Sinapinique
SAB	Sérum Albumine Bovine
SELDI	*Surface Enhanced Laser Desorption Ionization*
SFE	Extraction par fluide supercritique
SIM	*Selected Ion Monitoring*
SORI-CID	*Sustained Off-Resonance Irradiation Collision Induced Dissociation*
TAC	Taxotere®, Adriamicin®, Cyclophosphamide
TFA	Acide TriFluoroacétique
TIC	Courant d'ion total
TOF	Temps de vol
UAE	Extraction assistée par ultrasons
UV	UltraViolet
VHR	*Vaccinia H1 Related*
Wee1	*Mitose inhibitor protein kinase*
XIC	Courant d'ion extrait

Table des matières

Introduction générale **1**

CHAPITRE I LE CANCER ET LES PROTEINES CDC25 ..... **5**

I. Le cancer **7**

I.1. Généralités 7

I.2. La cancérogenèse 9

I.3. La chimioprévention 11

I.4. Dépistage précoce et thérapies 12

I.4.1. Le dépistage précoce *12*

I.4.2. Les différentes thérapies *13*

II. Le cycle cellulaire **16**

II.1. Fonctionnement 16

II.2. Régulation du cycle cellulaire 17

II.2.1. Régulation de la transition G_0/G_1 ..... *18*

II.2.2. Régulation de la progression en G_1 et de la transition G_1/S *18*

II.2.3. La phase S *19*

II.2.4. Régulation de la progression en G_2 et de la transition G_2/M *19*

II.2.5. Régulation de la mitose *19*

II.3. Les points de contrôle 20

III. Les phosphatases CDC25 ..... **21**

III.1. Généralités et structure 21

III.2. Mécanisme catalytique 23

III.3. Rôle au cours du cycle cellulaire 24

III.4. CDC25s et cancer 26

III.4.1. CDC25s : surexpression et cibles d'intérêt dans le cancer *26*

III.4.2. Le développement d'inhibiteurs et d'activateurs de CDC25s *27*

III.5. Les inhibiteurs de CDC25s 28

III.5.1. Les composés naturels *29*

III.5.2. Les composés de synthèse *31*

CHAPITRE II LE CRIBLAGE MOLECULAIRE **43**

I. Le criblage **45**

I.1. Généralités sur le criblage 45

I.1.1. Le procédé de génération de nouveaux médicaments *45*

I.1.2. Le développement préclinique et le développement clinique ... *46*

I.2. Les différentes techniques de criblage moléculaire ... 48

I.2.1. Le criblage biologique ... *48*

I.2.2. Le criblage virtuel ... *49*

I.2.3. Le criblage par spectrométrie de masse ... *50*

II. La spectrométrie de masse ... 51

II.1. Techniques d'ionisation ... 52

II.1.1. Le processus MALDI ... *52*

II.1.2. La technique d'ionisation électronébulisation ... *56*

II.2. Les analyseurs d'ions ... 59

II.2.1. Analyseur et spectromètre à temps de vol ... *61*

II.2.2. L'analyseur à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier ... *67*

III. Le criblage moléculaire par spectrométrie de masse ... 72

III.1. Le criblage en phase gazeuse par ESI-MS ... 73

III.2. Le criblage en phase liquide couplée à l'ESI-MS ... 74

III.3. Le criblage en phase solide par MALDI-MS ... 76

III.4. Conclusion ... 79

CHAPITRE III DEVELOPPEMENT D'UN TEST DE CRIBLAGE SUR LES PROTEINES CDC25 ... 83

INTRODUCTION ... 85

I. Présentation générale du test de criblage ... 85

II. Spectrométrie de masse des protéines CDC25 et des molécules utilisées pendant le développement du test ... 88

II.1. Les protéines phosphatases CDC25 ... 88

II.1.1. Production et dosage des protéines CDC25 ... *88*

II.1.2. Analyse des CDC25s par MALDI-TOFMS ... *89*

II.2. Les inhibiteurs réversibles ... 92

II.2.1. La 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone ... *93*

II.2.2. Le composé SV37 ... *96*

II.3. Les inhibiteurs irréversibles ... 98

II.3.1. Le BN82002 ... *98*

II.3.2. Le NSC663284 ... *101*

II.4. Le témoin négatif : l'amiodarone ... 102

II.5. Bilan et commentaires associés à l'approche utilisée ... 103

III. Développement du test de criblage ... 104

III.1. Incubation des molécules à tester avec la cible ... 104

III.2. Elimination des molécules non liées à la cible 106

III.3. Description de l'analyse directe par MALDI-TOFMS 107

III.4. Etude de l'empreinte peptidique massique (« Peptide Mass Fingerprint », PMF) 108

III.4.1. Description et protocole de l'étude PMF 109

III.4.2. Résultats de l'étude PMF sur les protéines natives 111

III.5. Criblage des CDC25s 114

III.5.1. Avec l'amiodarone, le témoin négatif 114

III.5.2. Avec les inhibiteurs réversibles 115

III.5.3. Avec les inhibiteurs irréversibles 123

CONCLUSION 128

CHAPITRE IV MISE EN PLACE DE TECHNIQUES D'ANALYSES COMPLEMENTAIRES A PARTIR D'EXTRAITS DE BROCOLIS POUR L'ETUDE DES EXTRAITS VEGETAUX SOUMIS AU CRIBLAGE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE 133

INTRODUCTION 137

I. Composition du brocoli, propriétés anticancéreuses et chimiopréventives associées 138

I.1. Les agents chimiopréventifs 139

I.1.1. Définition 139

I.1.2. Les glucosinolates et isothiocyanates 139

I.2. Les composés antioxydants 143

II. Préparation des extraits de brocolis 145

II.1. Les différentes méthodes d'extraction 146

II.1.1. Procédures d'extraction conventionnelles 146

II.1.2. Méthodes d'extraction améliorées 147

II.2. Extractions au Soxhlet 149

II.2.1. Mode opératoire 150

II.3. Profils des extraits 151

II.3.1. Nombres de signaux détectés 151

II.3.2. Classe de métabolites détectés 152

I.1.2. Analyse des glucosinolates 156

I.2. Analyse ESI-FTICRMS 157

II. Contrôle de la qualité des extraits par HPTLC 160

II.1. Principe et mode opératoire 160

II.2. Stabilité des extraits dans le temps 161

II.3. Profil HPTLC-UV d'un extrait de graines de brocoli 162

II.4. Compléments d'analyse par TLC-MALDI-TOFMS 165

II.4.1. Principe et mode opératoire *165*
II.4.2. Résultats *166*

II.5. Conclusion sur la place de la TLC 169

III. Mise en place des analyses LC-MS et LC-MS^n 169

III.1. Appareillage 170
III.1.1. La chromatographie liquide *170*
III.1.2. La spectrométrie de masse : la trappe ionique *171*

III.2. Résultats expérimentaux 173
III.2.1. Infusion directe *173*
III.2.2. LC-MS et LC-MS^n *174*

IV. Mesure de l'activité biologique des extraits 179

IV.1. Inhibitions des CDC25s et cytotoxicité 179

IV.2. Résultats du test de criblage 180

CONCLUSION 181

CHAPITRE V APPLICATION DU TEST DE CRIBLAGE A UN EXTRAIT DE PLANTE PARTICULIER... 189

INTRODUCTION 193

I. Généralités sur *Morus alba* 193

I.1. Composition générale 193

I.2. Propriétés médicinales 196

II. Criblage de l'extrait racinaire de *M. alba* avec les CDC25s 197

II.1. Profil de l'extrait par spectrométrie de masse 197
II.1.1. MALDI-TOF/TOFMS *198*
II.1.2. ESI-FTICRMS *200*

II.2. Criblage des CDC25s avec l'extrait de *M. alba* 202
II.2.1. Résultats expérimentaux *202*
II.2.2. Conclusion *207*

II.3. Vérification de l'hypothèse « moracénine B » 207
II.3.1. Analyse du composé par spectrométrie de masse *207*
II.3.2. Criblage du standard de moracénine B *209*

III. Analyses chromatographiques de l'extrait végétal 211

III.1. Chromatographie sur couche mince 212
III.1.1. Matériel et méthode *212*
III.1.2. Profil HPTLC de l'extrait brut et identification par TLC-MALDI-TOFMS *213*
III.1.3. Purification de la moracénine B par TLC semi-préparative *216*

III.1.4. Conclusion et perspectives *219*

III.2. Chromatographie en phase liquide 219

III.2.1. Matériel et méthode *219*

III.2.2. Profil HPLC-UV de l'extrait méthanolique en gradient d'élution *220*

III.2.3. Extrait aqueux en gradient d'élution *221*

III.2.4. Analyse en conditions isocratiques de la moracénine B par HPLC-UV *224*

III.3. Analyse de *Morus alba* par LC-MS 227

III.3.1. Etude de la moracénine B dans l'extrait et de l'étalon commercial *227*

III.3.2. Présentation des autres métabolites de l'extrait *229*

III.4. Conclusion 233

IV. Confirmation de l'activité de l'extrait racinaire et de la moracénine B par les tests biologiques 234

IV.1. Effet de l'extrait racinaire de *M. alba* et de la moracénine B sur la viabilité de lignées cellulaires 234

IV.1.1. Evaluation de l'extrait *234*

IV.1.2. Evaluation de la moracénine B *235*

IV.2. Inhibition des CDC25s par l'extrait racinaire de *M. Alba* et par la moracénine B 237

IV.2.1. Mode opératoire *237*

IV.2.2. Résultats et discussion *238*

CONCLUSION 239

Conclusion et Perspectives 245

ANNEXES 249

PUBLICATIONS 273

Introduction générale

Malgré les progrès de la médecine et les recherches continuelles en matière de lutte contre le cancer, ce fléau est l'une des premières causes de mortalité au monde. Les besoins en nouvelles molécules thérapeutiques plus efficaces n'ont jamais été aussi importants. La découverte de molécules actives, d'origine naturelle ou synthétique, requiert des techniques permettant de sélectionner rapidement les composés les plus intéressants ainsi que des méthodes analytiques de haute performance permettant leur caractérisation précise. Il faut donc adapter les technologies et les stratégies afin de pouvoir cibler au mieux ces molécules, très souvent sur de très faibles quantités de matière, évaluer leur potentiel en un temps limité et prendre ainsi une décision quant à la poursuite ou non de leur développement afin de passer à leur première évaluation, à savoir les études précliniques.

Dans cette optique, les tests de criblage moléculaire à haut débit ont permis de réduire les temps de développement des nouveaux médicaments, tout en améliorant les connaissances sur le mode de fonctionnement des molécules candidates. Cette stratégie repose souvent sur la base de protéines cibles sélectionnées pour leur implication dans le processus cancéreux et sur lesquelles le futur médicament a une action (par exemple son inhibition). Ces techniques se doivent alors d'être rapides et sensibles car les protéines cibles ne sont en général disponibles qu'en faible quantité. Par ailleurs, ces techniques de criblage doivent être les plus universelles possible afin de pouvoir détecter à l'état de trace les molécules candidates dans un mélange complexe de plusieurs dizaines, voire centaines d'autres composés. De surcroît, les techniques de criblage doivent permettre un débit d'analyse élevé afin de mieux répondre à la demande qui se veut de plus en plus exigeante, tant en terme de quantité d'échantillon à analyser que de fiabilité des résultats. L'intérêt grandissant pour les substances d'origine naturelle ne fait qu'alimenter cette demande. L'intérêt du grand public pour les substances naturelles est certainement en partie responsable de la multiplication des recherches scientifiques portant sur les végétaux. En conséquence, les métabolites provenant des plantes végétales ne cessent d'attirer l'attention des chercheurs pour leurs effets bénéfiques sur la santé, notamment leur potentielle activité anticancéreuse. L'étude des végétaux possédant une activité thérapeutique reconnue en cancérologie se fait le plus souvent sous forme d'extrait, correspondant parfaitement à la définition de mélange complexe nécessitant des techniques d'analyses perfectionnées.

Les progrès dans le domaine de la chimie analytique, et plus précisément de la spectrométrie de masse, ont fait de cette technique un outil de choix pour le criblage moléculaire parmi celles

disponibles. En effet, sa fiabilité sur l'identification de molécules, sa sensibilité et sa compatibilité analytique avec des échantillons de natures bien différentes lui confèrent un atout sans équivoque dans les stratégies de recherche et de développement de nouveaux médicaments. La rapidité d'analyse accrue qu'elle procure contribue également à l'engouement de son utilisation pour la découverte de nouvelles molécules bioactives.

Dans ce contexte, le but des recherches présentées dans ce mémoire a été de développer un test de criblage moléculaire par spectrométrie de masse permettant la mise en évidence d'inhibiteurs réversibles et irréversibles de protéines impliquées dans le processus cancéreux, puis de l'appliquer à différents extraits végétaux. Les protéines cibles choisies sont les phosphatases CDC25s car elles interviennent lors de la régulation du cycle cellulaire et sont surexprimées dans de nombreux cancers, d'où leur intérêt en tant que cible thérapeutique.

Ce travail de thèse a été effectué au sein du Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser (LSMCL, devenu Laboratoire de Chimie Physique – Approche Multi-Echelle des Milieux Complexes LCP-A2MC en 2011) et du Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biologie Pharmacologique (LIMBP rattaché depuis 2012 au Laboratoire « Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes » SRSMC) de l'Université de Lorraine à Metz. Ce travail s'inscrit dans la continuité de l'expérience et du savoir-faire du laboratoire dans le domaine du criblage moléculaire par MALDI-MS.

Le travail de cette thèse s'inscrit donc dans le contexte venant d'être présenté et s'articule autour de deux axes majeurs :

- Nous avons tout d'abord développé un test de criblage par spectrométrie de masse MALDI-TOF et MALDI-FTICR sur les CDC25s. Il est à noter que lors des précédentes études sur ce sujet, seuls les ligands réversibles d'une protéine pouvaient être détectés. Nous avons étendu le protocole de criblage à la mise en évidence d'inhibiteurs irréversibles de protéines.
- Dans un deuxième temps, les outils nécessaires à l'analyse d'extraits de plantes ont été mis en place au laboratoire. Par exemple, les analyses chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse, incontournables dans ce genre d'approche, n'étaient jusqu'alors pas implantées au laboratoire spécialisé en spectrométrie de masse. Un effort de structuration a dû être fourni afin de relier ces analyses de métabolites au criblage d'extraits végétaux.

Une fois développés, le test de criblage et les méthodes d'analyse complémentaires ont été appliqués à des extraits de plante dont un métabolite s'est révélé particulièrement intéressant.

Ce mémoire sera divisé en cinq chapitres organisés de la façon suivante :

Le **premier chapitre** présentera de manière succincte un rappel sur les chiffres concernant le cancer, le dépistage et les différents traitements existants. Nous verrons plus précisément ensuite les différentes étapes du cycle cellulaire, la fonction des protéines cibles choisies pour ce travail (les phosphatases CDC25) et leur rôle vis-à-vis du processus cancéreux. Nous ferons alors un bref récapitulatif des différents inhibiteurs naturels et synthétiques de CDC25s développés au cours des dernières années.

Le **deuxième chapitre** fera un état de l'art concernant le criblage moléculaire dans le cadre de la recherche de nouvelles substances anticancéreuses. Nous présenterons les différents tests de criblage actuels qui utilisent ou non la spectrométrie de masse. Ceci nous donnera l'opportunité de présenter l'appareillage utilisé au cours de ces travaux.

Le **chapitre III** détaillera la mise en place et le développement du test de criblage par MALDI-MS. Nous ferons l'étude par spectrométrie de masse des cibles sur lesquelles nous avons travaillé au cours de ces travaux, ainsi que les différentes molécules nécessaires à la validation du test.

Le **quatrième chapitre** sera consacré à la mise en place au laboratoire des techniques analytiques complémentaires utilisées pour la caractérisation d'extraits végétaux. Le brocoli a été choisi comme modèle et les extraits de brocoli ont été utilisés pour le développement des méthodes analytiques telles que la chromatographie planaire et la chromatographie liquide couplées à la spectrométrie de masse. Le test de criblage sera appliqué à un extrait dans le but de mettre en évidence d'éventuels inhibiteurs de CDC25s. Les tests biologiques servant à valider nos résultats de criblage par spectrométrie de masse seront également présentés.

Enfin le **dernier** et **cinquième chapitre** s'intéressera à l'application du protocole de criblage que nous avons mis en place en criblant six extraits de plantes à la recherche d'inhibiteur de CDC25s. L'un de ces extraits particulièrement intéressant sera soumis à différentes analyses dans le but de le caractériser et d'en dégager les principales familles de molécules le composant. Cette approche de criblage par spectrométrie de masse développée au laboratoire a été appliquée pour la première fois à un extrait végétal dont nous ne connaissons pas *a priori* la cible potentielle.

CHAPITRE I

LE CANCER ET LES PROTEINES CDC25

Introduction générale **1**

CHAPITRE I LE CANCER ET LES PROTEINES CDC25 ..... **5**

I. Le cancer **7**

I.1. Généralités 7

I.2. La cancérogenèse 9

I.3. La chimioprévention 11

I.4. Dépistage précoce et thérapies 12

I.4.1. Le dépistage précoce *12*

I.4.2. Les différentes thérapies *13*

II. Le cycle cellulaire **16**

II.1. Fonctionnement 16

II.2. Régulation du cycle cellulaire 17

II.2.1. Régulation de la transition G_0/G_1 ..... *18*

II.2.2. Régulation de la progression en G_1 et de la transition G_1/S *18*

II.2.3. La phase S *19*

II.2.4. Régulation de la progression en G_2 et de la transition G_2/M *19*

II.2.5. Régulation de la mitose *19*

II.3. Les points de contrôle 20

III. Les phosphatases CDC25 ..... **21**

III.1. Généralités et structure 21

III.2. Mécanisme catalytique 23

III.3. Rôle au cours du cycle cellulaire 24

III.4. CDC25s et cancer 26

III.4.1. CDC25s : surexpression et cibles d'intérêt dans le cancer *26*

III.4.2. Le développement d'inhibiteurs et d'activateurs de CDC25s *27*

III.5. Les inhibiteurs de CDC25s 28

III.5.1. Les composés naturels *29*

III.5.2. Les composés de synthèse *31*

I. Le cancer

I.1. Généralités

Avec près de 3 450 000 nouveaux cas estimés en 2012 et 1 750 000 décès, le cancer représente la première cause de mortalité prématurée en Europe toutes formes confondues et demeure à ce titre l'un des fléaux de notre société[1]. Par conséquent, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à presque 10 millions le nombre de nouveaux cas en Europe dans les cinq prochaines années. Pourtant, l'évolution de la mortalité due au cancer de façon générale diminue, contrairement à l'incidence qui augmente. Parmi les cancers les plus meurtriers, on retrouve le cancer de la prostate chez l'homme, du sein chez la femme, puis le cancer du poumon et du rectum, ces deux derniers touchant quasiment de la même manière hommes et femmes. La **Figure 1** représente les taux de mortalités et d'incidence chez l'homme et la femme en Europe estimés en 2012, pour 100 000 personnes, selon les données de l'Observatoire Européen de Cancer (OEC). On constate que l'incidence et la mortalité peuvent extrêmement varier d'un cancer à l'autre : par exemple, le cancer de la prostate ne provoque *que* un quart de mortalité, alors que le taux de mortalité du cancer du poumon est quasi égal au taux d'incidence. La même observation est à faire chez la femme, pour les cancers du sein et du poumon.

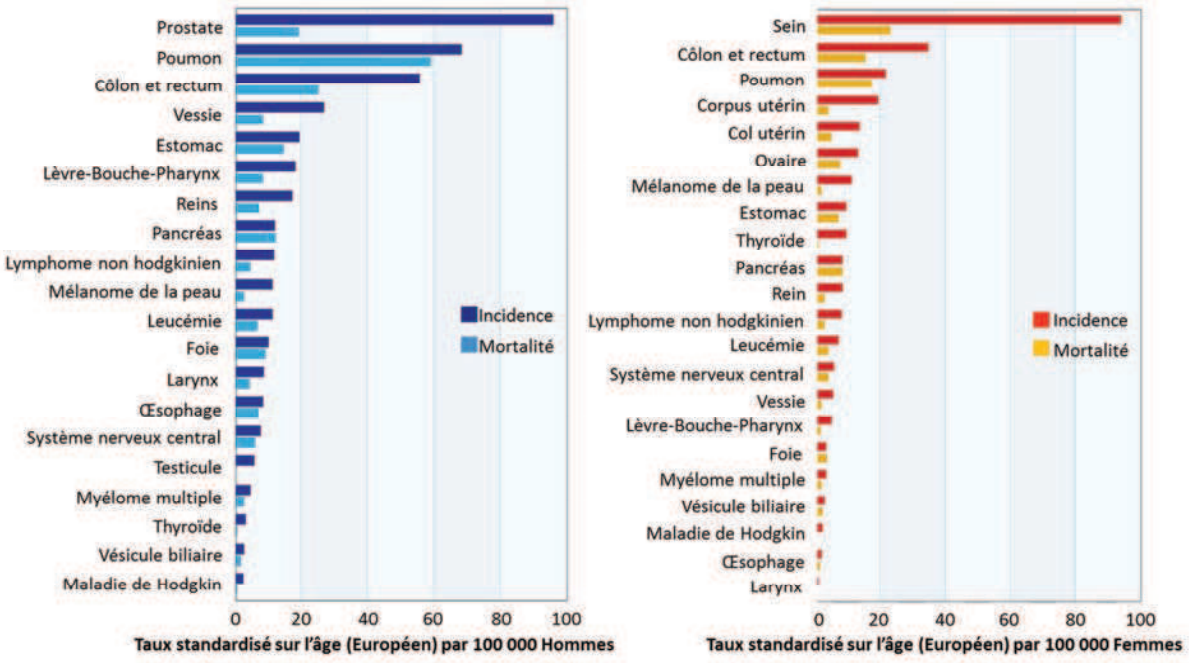


Figure 1 : Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers chez l'homme et la femme en Europe en 2012 (OEC)[1].

[1] http://eu-cancer.iarc.fr, 31 juillet 2013

En France, la tendance du cancer reste la même que pour l'Europe. En 2012, les cancers de la prostate et du sein sont les plus fréquents, mais le cancer du poumon reste le plus meurtrier (**Figure 2**). Cependant, il faut noter qu'entre 2005 et 2011, il y a une augmentation du taux d'incidence pour tous les cancers, sauf le cancer de l'estomac. La mortalité par cancer est estimée à 147 500 en 2011, contre une moyenne de 148 737 par an lors de la période 2004-2008. Ce chiffre laisse supposer que les thérapies sont de plus en plus efficaces, mais il faut encore améliorer le dépistage précoce des cancers afin de mieux soigner les patients[2].

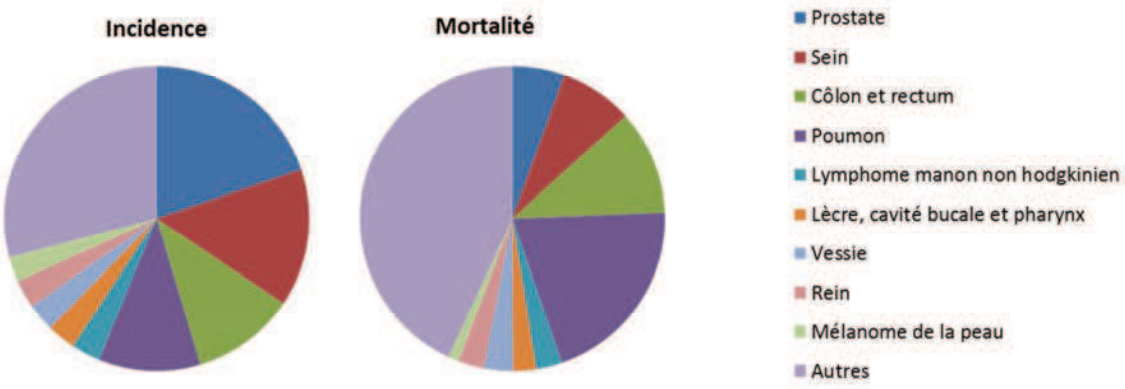


Figure 2 : Estimation de l'incidence et de la mortalité en France des cancers les plus fréquents chez l'homme et la femme confondus en 2012[1].

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent chez la femme en Europe (465 000 nouveaux cas en 2012). Toutefois, son incidence tend à diminuer, même s'il reste la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Parallèlement à la Grèce où 43% des personnes atteintes du cancer du sein décèdent, en France 22% des femmes en décèdent. Cette observation introduit la disparité de prise en charge des patients selon les pays. Cette disparité est plus nette entre les pays de l'Est et l'Ouest de l'Europe : les pays de l'est, moins développés, ont un taux d'incidence plus bas que les pays de l'ouest, plus développés. Cependant le taux de mortalité est beaucoup plus élevé à l'est, ce qui tend à supposer que les personnes ont plus de risque d'avoir un cancer dans les pays de l'ouest qu'à l'est, mais le diagnostic précoce et les traitements actuels permettront une meilleure prise en charge du patient.

Les causes du cancer sont multiples : certains facteurs de risque sont facilement évitables, d'autres sont obligatoirement subis. Parmi les facteurs de risque évitables, le tabac et l'alcool sont les principaux. En 2011, le tabagisme est la principale cause mondiale de décès évitable, sachant que 10% de la mortalité est due au tabagisme passif. L'alcool a été classé comme cancérogène pour l'homme en 1998 par le CIRC (Centre international de recherche sur le cancer). L'alcool serait

[2] La situation du cancer en France en 2011. Collection Rapports & synthèses, ouvrage collectif édité par l'INCa, Boulogne-Billancourt, octobre 2011 Observation des cancers.

responsable de plusieurs cancers, comme les cancers de la bouche, du larynx et de l'œsophage et est attribuable à 10,8% de l'incidence des cancers en France. Il a été estimé qu'en 2007, 30 000 décès par cancer étaient attribuables à l'alcool. En relation avec l'alcool, l'alimentation et l'activité physique sont également deux facteurs à prendre en compte dans les facteurs de risques. La nutrition a une double spécificité par rapport au cancer : elle peut être un facteur de risque (consommation d'alcool, surpoids et obésité, mauvaise alimentation riche en sel et graisses), mais peut aussi être un facteur protecteur, en complément d'une bonne activité physique et une alimentation riche en fruits et légumes. Les facteurs de risques environnementaux subis sont par exemple les ondes électromagnétiques (ex : téléphone portable, micro-onde, …) classés comme cancérogènes en 2011[2] et les rayons UV. Les expositions professionnelles aux CMR (cancérogènes mutagènes et toxiques pour la reproduction) sont également des risques subis, mais peuvent être évitables. Les contaminations de nos milieux de vie et de notre alimentation par des oestrogénomimétiques (ex : bisphénol A dans les emballages) sont également des risques environnementaux qui peuvent affecter le système hormonal[3].

I.2. La cancérogenèse

Le processus cancéreux, appelé **cancérogenèse**, peut durer jusqu'à 20 ans, voire plus longtemps. Il se divise en trois étapes schématisées **Figure 3** : l'initiation, la promotion et la progression[4]. (i) L'*initiation* est l'évènement mutagène qui va créer une altération de l'ADN d'une cellule normale. Si un agent cancérigène induit une mutation dans le patrimoine génétique sans qu'il y ait réparation du dommage, il y a initiation et la cellule touchée pourra évoluer vers la seconde phase du processus. Deux types de gènes peuvent être affectés : les *proto-oncogènes* qui, lorsqu'ils subissent une mutation, acquièrent des propriétés cancérigènes et deviennent alors des oncogènes. Les *anti-oncogènes* sont des gènes suppresseurs de tumeurs ayant la capacité de réguler le cycle cellulaire négativement (induction de l'apoptose ou mort cellulaire programmée). Leur absence ou mauvais fonctionnement favorise l'apparition du cancer. (ii) La phase de *promotion* transforme la cellule initiée en une population de cellules pré-néoplasiques par reproduction et prolifération de la cellule endommagée. Cette étape va amener la lésion de gènes complémentaires afin que la cellule devienne cancéreuse. Cependant cette étape est encore réversible et une suppression de l'agent de promotion peut stopper l'expansion de la masse tumorale. (iii) La dernière phase appelée *progression* est irréversible et implique un nombre conséquent de mutations de gènes, incluant les

[3] A. L. Capriotti, C. Cavaliere, V. Colapicchioni, S. Piovesana, R. Samperi and A. Laganà, J. Chrom. A 1313 (2013) 62-77.

[4] Y.-J. Surh, Mut. Res. 428 (1999) 305-327.

oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Le résultat de la progression est une tumeur bégnine qui peut éventuellement se transformer en tumeur maligne. Selon le type de cancer, ces cellules peuvent migrer plus ou moins précocement vers d'autres organes pour y créer de nouvelles métastases.

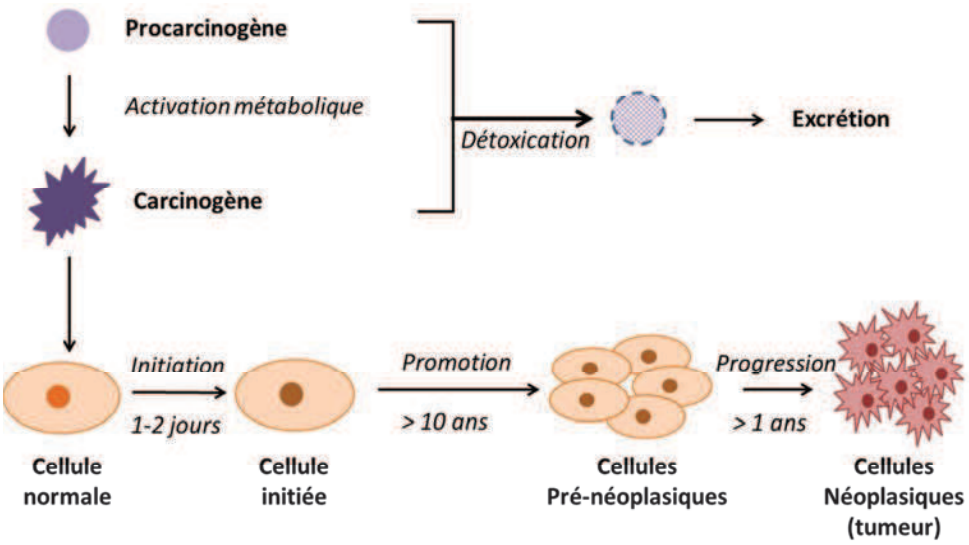


Figure 3 : Représentation schématique des trois étapes de la cancérogenèse : l'initiation, la promotion et la progression[4].

Lorsque la tumeur grandit, elle a besoin d'une augmentation d'apport en sang pour se fournir en nutriments et peut évacuer les métabolites toxiques dus à la production des tissus cancéreux. Afin de pouvoir répondre à cette demande de sang, la tumeur envoie des signaux capables d'induire la production de nouveaux vaisseaux sanguins. Ce processus d'augmentation de l'apport en sang à la tumeur est appelé angiogenèse. Il permet également à la tumeur de pouvoir se propager sur des sites distants de la tumeur primitive à travers le sang. L'utilisation de substances pouvant bloquer l'angiogenèse est l'une des voies actuelles pour le développement de traitements anticancéreux.

Face aux avancées des travaux sur le processus cancéreux, à l'augmentation d'informations sur les données épidémiologiques et à l'augmentation de l'incidence du cancer, le dépistage précoce apparaît comme un facteur important dans l'augmentation du succès de la guérison de cette maladie. Il est également indispensable d'améliorer les traitements anticancéreux actuels, curatifs (chirurgie, chimiothérapie, thérapie photodynamique,…) et préventifs. Bien que la détection et le dépistage précoce du cancer permettent de réduire la mortalité, les recherches visent à développer de nouvelles approches thérapeutiques en recherchant et en développant des composés naturels ou synthétiques ayant un effet notoire sur les cibles impliquées dans le processus cancéreux. La chimioprévention est ainsi favorisée afin de retarder ou d'inhiber le processus cancéreux.

I.3. La chimioprévention

Le cancer est une maladie dépendante de différents facteurs environnementaux, génétiques et hormonaux. Les facteurs génétiques ne peuvent être que peu évités, contrairement aux facteurs environnementaux qui peuvent être sinon éliminés du moins minimisés. Le régime alimentaire est donc l'un des points essentiels sur lequel il est possible d'influer afin de diminuer le risque de cancer. Différentes stratégies sont mises en place dans le but de trouver des « agents » pouvant inhiber, retarder ou renverser le processus cancéreux. En 1976, l'équipe de Sporn *et al.* est la première à aborder le terme de chimioprévention pour l'action de la vitamine A contre certaines formes de cancer épithélial[5]. Depuis, plusieurs travaux tendent à mettre en avant les relations entre les composés naturels et leurs différents effets vis-à-vis de leur activité chimiopréventive. Les agents chimiopréventifs sont évalués en fonction de leur capacité à interférer avec les étapes de la cancérogenèse et se divisent en deux catégories : les agents bloquants, qui agissent durant la phase d'initiation, et les agents suppresseurs qui interviennent lors des deux autres phases. L'alimentation est une source principale d'agents chimiopréventifs naturels[6,7].

Les isothiocyanates (ITCs) sont des composés aux propriétés anticancéreuses de plus en plus connues[8]. Le sulforaphane, que l'on retrouve principalement dans les végétaux crucifères, comme le brocoli ou le chou-fleur, est l'un des ITCs les plus étudiés. Les polyphénols, quant à eux, constituent une famille de composés largement présents chez les végétaux. Leur forte activité antioxydante suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer. Parmi ces molécules, on trouve l'épigallocatéchine-3-gallate (EGCG), un flavonoïde présent dans le thé vert qui montre des vertus chimiopréventives remarquables[9]. Son activité anti-cancérigène est due, comme pour beaucoup de substances naturelles, à son large éventail d'actions cellulaires. En effet, ce composé est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules, ainsi que d'inhiber l'activation de voies de signalisation impliquées dans les processus de croissance, de survie et de prolifération cellulaire[10]. Le resvératrol (stilbenoïde) est un autre polyphénol naturel très étudié actuellement et qui montre des propriétés antioxydantes et anticancéreuses intéressantes. Ce composé est produit par différents végétaux comme les légumineuses, les arachides et les fruits rouges. Cependant c'est dans la peau du raisin rouge que la concentration en resvératrol est la plus

---

5 M. B. Sporn, N. M. Dunlop, D. L. Newton and J. M. Smith, Fed Proc. 35 (1976) 1332-1338.
6 P. Greenwald, G. Kelloff, C. Burch-Whitman and B. S. Kramer, A Cancer J. for Clinicians 45 (1995) 31-49.
7 Y.-J. Surh, Nat. Rev. Cancer 3 (2003) 768-780.
8 H. Yuan, S. Yao, Y. You, G. Xiao and Q. You, Chinese J. Chem. Eng. 18 (2010) 312-321.
9 C. S. Yang and H. Wang, Mol. Nutr. Food Res. 55 (2011) 819-831.
10 N. Khan, F. Afaq, M. Saleem, N. Ahmad and H. Mukhtar, Cancer Res. 66 (2006) 2500-2505.

élevée, ce qui explique en partie les bienfaits du vin rouge. La revue de Li *et al.* (2012) relate les bienfaits de ce composé au niveau cardiovasculaire, et met en avant ses cibles thérapeutiques[11].

D'autres substances naturelles, qu'elles soient polyphénoliques ou non, sont réputées pour leurs propriétés chimiopréventives. On peut alors citer les flavones que l'on trouve dans le soja, les curcuminoïdes dans le curcuma, les procyanidines dans les fruits et les noix et plus généralement les vitamines et antioxydants dans l'alimentation variée. Les composés organosoufrés (OSC) tels que le diallyl disulfure (DAS_2), S-allyl cystéine, S-allyl mercaptocystéine sont également en cours d'étude pour leur activité anticancérigène[12].

Cependant, l'association positive entre un régime alimentaire riche en fruits et légumes et la diminution du risque de cancer n'a été que très peu reportée et semble soumis à différentes controverses[13]. Une revue de G. Russo parue en 2007 discute des hypothétiques effets des agents chimiopréventifs fréquemment décrits dans la littérature[14]. Il apparaît clairement qu'un mélange de composés présents dans la nourriture peut avoir un effet chimiopréventif, mais que la combinaison avec d'autres traitements représente une stratégie ayant un impact important sur leur efficacité[14].

I.4. Dépistage précoce et thérapies

I.4.1. Le dépistage précoce

Un diagnostic précoce du cancer permet d'optimiser sa prise en charge et d'améliorer son efficacité. Deux actions permettent ce diagnostic précoce :

- Le dépistage qui a pour objectif de mettre en évidence la présence d'un cancer en absence de signe clinique. Il s'appuie sur des tests dits de dépistage. Selon les études, le recours au dépistage organisé pourrait réduire la mortalité par cancer du sein de 20 à 30%, dans l'hypothèse où au moins 70% des femmes ciblées participerait (IARC 2002). En 2010, plus de 52% de la population ciblée a eu recours au dépistage du cancer du sein. De même, il est établi qu'en faisant un test de dépistage du cancer colorectal, suivi d'une coloscopie en cas de positivité de sang dans les selles, il est possible de diminuer de 15 à 20% la mortalité par cancer colorectal si la participation de la population ciblées atteint 50%.

---

11 H. Li, N. Xia and U. Förstermann, Nitric Oxide 26 (2012) 102-110.
12 E. Viry, Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine - Metz (2010).
13 J. J. Simon, J. Chiropractic Med. 1 (2002) 91-96.
14 G. L. Russo, Biochem. Pharmacol. 74 (2007) 533-544.

- Le diagnostic précoce qui s'appuie sur la recherche et l'identification de signes cliniques suggestifs du cancer, biologiques et sur l'imagerie.

Le dépistage et la détection précoce s'adressent à une population *a priori* bien portante, ciblée sur un critère de risque de cancer. Au niveau national, deux programmes de dépistage organisé sont actuellement en vigueur. Le premier porte sur le cancer du sein : une mammographie est proposée aux femmes de 50 à 74 ans tous les deux ans. Le deuxième porte sur le cancer colorectal : un test de détection de sang dans les selles est proposé aux personnes de 50 à 74 ans.

En complément de ces deux programmes de dépistage, des expérimentations pilotes sont menées pour un dépistage du col de l'utérus. Ce dépistage repose sur un test cytologique : le frottis cervico-utérin (FCU) recommandé chez les femmes de 25 à 65 ans. Les expérimentations de ce dépistage menées en France ont montré l'impact des programmes sur la couverture des femmes non suivies gynécologiquement. D'autres cancers peuvent bénéficier d'un dépistage à titre individuel, comme le cancer de la prostate, le mélanome cutané (cancer de la peau) et le cancer de la bouche.

Dans ce cadre, la chimie analytique, et en particulier la spectrométrie de masse, est de plus en plus mise à contribution via la protéomique ainsi que la métabolomique. Ces différentes techniques permettent ainsi la recherche et la détection de biomarqueurs de la maladie[15,16].

I.4.2. Les différentes thérapies

A l'issue du dépistage d'un cancer, le patient ne peut être soigné qu'avec un traitement anticancéreux adapté à son cas. Depuis plusieurs années, les avancées sur les moyens thérapeutiques se sont considérablement accrues et ont largement contribué à réduire la mortalité liée au cancer. Les principales méthodes de traitement du cancer sont la chirurgie et la radiothérapie pour les traitements locaux, la chimiothérapie, l'immunothérapie, l'hormonothérapie et la thérapie photodynamique. Tous ces modes de traitement peuvent être appliqués seuls, mais souvent en association pour de meilleurs résultats. Le **Tableau 1** décrit les principes des traitements anticancéreux cités.

---

[15] B. Matharoo-Ball, G. Ball and R. Rees, Vaccine 25, Supplement 2 (2007) B110-B121.

[16] L. Konieczna, T. Bączek, M. Belka, A. Fel, M. Markuszewski, W. Struck, M. Markuszewski and R. Kaliszan, J. Pharm. Biomed. Anal. 73 (2013) 108-115.

Tableau 1 : Les traitements anticancéreux et leur principe[17].

Traitements	Principes
Chirurgie	○ Ablation de la tumeur ; ○ Premier ou second traitement (si traitement néo-adjuvant), peut être couplé avec d'autres traitements.
Chimiothérapie	○ Utilisation de molécules chimiques cytotoxiques visant à ralentir, voire stopper la multiplication anarchique des cellules cancéreuses ; ○ Application avant ou après chirurgie (réduction de la taille de la tumeur ou prévention d'une éventuelle rechute/élimination de métastases restantes).
Radiothérapie	○ Utilisation de rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier.
Immunothérapie	○ Stimulation des défenses immunitaires pour aider à la destruction de la tumeur.
Hormonothérapie	○ Bloquer l'action des hormones afin d'éviter la stimulation de la prolifération des cellules tumorales.
Thérapie photodynamique	○ Traitement par photochimiothérapie qui utilise un agent photosensible permettant d'induire la mort de la cellule sous l'action de la lumière ; ○ Peut être appliquée après chirurgie pour l'élimination de métastases restantes.

Dans la suite de cette étude, nous allons principalement nous intéresser à la chimiothérapie, puisque cette thèse s'inscrit dans le cadre de la découverte de nouvelles substances anticancéreuses. La chimiothérapie est une thérapie curative qui, comme son nom l'indique, est employée pour les cancers chimiocurables. Elle peut être adjuvante (après traitement en phase locale par la chirurgie) ou néo-adjuvante (avant traitement en phase locale) et peut aussi être associée à un traitement palliatif. Le principe est d'injecter au patient une ou plusieurs substances antitumorales (protocoles dits FAC, FEC, AC, TAC…). Ces substances, dites cytotoxiques, vont détruire le plus sélectivement possible les cellules transformées. Plusieurs mécanismes d'actions vont alors intervenir :

- Interactions directes avec l'ADN : (i) réactions chimiques grâce à des agents électrophiles (agents alkylants), (ii) modifications de structure de l'ADN grâce à des agents intercalants et (iii) coupures de l'ADN grâce à des agents scindant.
- Interactions indirectes avec l'ADN : (i) en amont (inhibition de la synthèse d'ADN, de la topoisomérase) et (ii) en aval (formation du fuseau mitotique, inhibition d'enzymes impliquées dans le processus tumoral).

[17] A. I. Baba and C. Câtoi, Comparative Oncology, Chapitre 19 : Principles of anticancer therapy, (2007).

Parmi les protéines visées, la tubuline est l'une des principales. Les substances interagissant avec cette protéine sont appelées *poisons du fuseau mitotique* ou *antimitotiques*. Lors de la mitose du cycle cellulaire, il se passe une polymérisation des dimères de tubuline suivi d'une croissance des microtubules. Les taxanes agissent alors afin d'empêcher cette polymérisation. Lors de l'anaphase, les chromosomes se séparent et les microtubules raccourcissent par dépolymérisation. Les alcaloïdes de la pervenche agissent pendant cette phase afin d'empêcher la dépolymérisation. Plusieurs médicaments sont à base de ces molécules, comme le Velbé® avec la vinblastine (1974), la Navelbine® avec la vinorelbine (1989) (alcaloïdes de la pervenche) et le Taxol® avec le paclitaxel (1993) (taxane).

Malgré son utilisation très répandue, la chimiothérapie ne peut épargner les cellules saines et induit donc de nombreux effets secondaires. Ainsi, en parallèle de ces chimiothérapies dites conventionnelles s'est développé l'usage de chimiothérapies « ciblées » dont l'activité s'adresse aux mécanismes mêmes de l'oncogène impliqué. Par exemple, l'Herceptin®, un anticorps monoclonal qui agit sur les récepteurs membranaires HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2), est indiqué dans le traitement du cancer du sein métastatique avec surexpression tumorale de cette protéine (16% des cas du cancer du sein). Ce traitement a montré une efficacité majeure en termes de risque de rechute (diminution de l'ordre de 50% par rapport à un traitement classique)[18].

De nombreux projets de recherches visent à trouver de nouvelles cibles thérapeutiques dans le but d'élargir les cibles d'actions contre le cancer et ainsi pallier aux résistances rencontrées dans les traitements actuels, ou plus simplement pour être plus efficace. Les protéines du cycle cellulaire apparaissent alors comme des cibles de choix, puisque beaucoup de ces régulateurs jouent un rôle primordial dans le processus de cancérogenèse ainsi que dans le développement de phénomène de résistance[19,20]. Dans cette idée, les kinases dépendantes des cyclines (CDK pour Cyclin-dependant kinases), les phosphatases CDC25 (Cell Division Cycle 25) et d'autres protéines agissant au niveau des points de contrôle du cycle cellulaire sont très étudiées depuis plusieurs années. La recherche et le développement de molécules inhibitrices de ces protéines est en plein essor, mais actuellement les inhibiteurs du cycle cellulaire identifiés restent au stade d'essais précliniques ou cliniques. Parmi ces inhibiteurs, la R-roscovitine (Cyclacel Pharmaceuticals Inc), un inhibiteur sélectif de CDK, est entrée en phase d'essais cliniques mais son activité est apparue faible et peu sélective vis-à-vis des cellules cancéreuses. Une nouvelle génération d'inhibiteurs de CDK est actuellement en cours d'évaluation clinique et préclinique. La silibinine (Legalon SIL®, Rottapharm Madaus), un composé naturel extrait

---

18 N. Cornez and M. J. Piccart, Bull. Cancer 87 (2000) 847-858.

19 G. K. Schwartz and M. A. Shah, J. Clin. Onc. 23 (2005) 9408-9421.

20 G. Deep and R. Agarwal, PMC 9 (2008) 591-604.

du chardon-Marie, est passée en phase II et son activité est évaluée sur des patients atteints de cancer de la prostate[21].

II. Le cycle cellulaire

II.1. Fonctionnement

Le cycle cellulaire est défini comme étant l'ensemble des modifications qu'une cellule subit entre sa formation par division à partir d'une cellule mère et le moment où cette cellule a fini de se diviser en deux cellules filles[22,23]. Ce concept date de 1858 lorsque Rudolph Virchow formule l'axiome *« toute cellule provient d'une cellule »*. Malgré de nombreuses études depuis 150 ans, la régulation intracellulaire du cycle cellulaire n'est connue que depuis quelques décennies grâce à des travaux entrepris sur des modèles biologiques très variés.

La **Figure 4** présente un schéma général du cycle cellulaire. Lorsqu'elles ne se divisent pas, les cellules sont dites en quiescence ou en phase G_0. Sous l'effet de signaux mitogènes, elles entament un cycle de division, subdivisé en deux grandes phases : la **mitose** lors de laquelle la cellule mère se divise en deux cellules filles et l'**interphase** qui est la période entre deux mitoses. L'interphase constitue 90% du cycle cellulaire. Elle dure environ 20 fois plus longtemps que la mitose et est divisée en trois phases distinctes :

- La phase G_1 (Gap 1) est la phase de croissance initiale : après le passage du point de restriction (point de non-retour à partir duquel le cycle est irréversiblement engagé) l'entrée en division ne dépend plus que des signaux mitogènes. Durant cette étape les cellules possède une quantité d'ADN (n) ;
- La phase S est l'étape de synthèse de l'ADN : les chromosomes sont dupliqués et la quantité d'ADN est doublée (2n) ;
- La phase G_2 est une étape de croissance qui précède la phase M (mitose).

---

21 T. Flaig, D. Gustafson, L.-J. Su, J. Zirrolli, F. Crighton, G. Harrison, A. S. Pierson, R. Agarwal and L. M. Glodé, Invest. New Drugs 25 (2007) 139-146.

22 K. Vermeulen, D. R. Van Bockstaele and Z. N. Berneman, Cell Prol. 36 (2003) 131-149.

23 L. Meijer, Bull. Cancer Hors série (2006) 41-53.

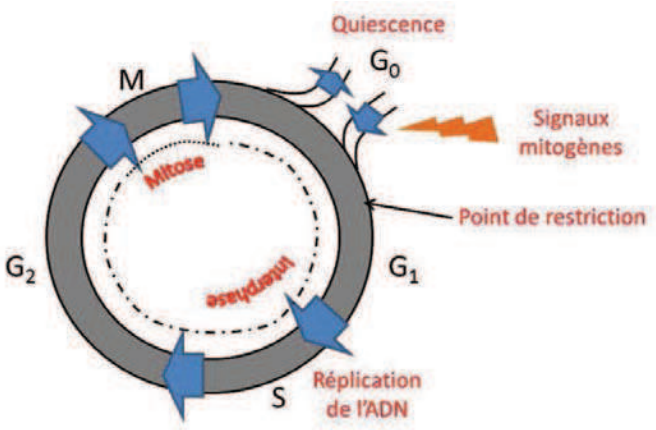


Figure 4 : Les grandes phases du cycle de division cellulaire.

La mitose est classiquement découpée en cinq périodes : la prophase, la métaphase, l'anaphase, la télophase puis, pour finir la division, la cytodiérèse. Lors de cette phase, les chromosomes dupliqués lors de la phase S sont également répartis dans les deux cellules filles grâce au fuseau mitotique (tubuline). Lorsque les cellules cessent toute prolifération, sous l'effet des signaux antimitogènes ou suite à la disparition des signaux mitogènes, elles quittent le cycle cellulaire et retournent en phase de quiescence. Le cycle cellulaire de la plupart des cellules eucaryotes dure entre 10 et 24h.

Les quatre phases s'enchaînent de manière successive et coordonnée, chaque phase ne pouvant commencer que lorsque la précédente s'est déroulée correctement. De nombreux mécanismes de contrôle (points de contrôle/checkpoints) assurent la bonne qualité du déroulement de chaque étape du cycle cellulaire en le bloquant lorsqu'une anomalie est détectée (ex : endommagement de l'ADN, ADN non complètement répliqué, chromosomes non attachés au fuseau mitotique).

II.2. Régulation du cycle cellulaire

Afin que le cycle cellulaire se déroule parfaitement, la famille de protéines CDK joue un rôle indispensable. En effet, ces protéines kinases, associées à leurs sous-unités régulatrices les cyclines, vont permettre le déclenchement, le contrôle et la succession des différentes phases du cycle[19,24]. Selon les phases, différents types d'association CDK/cycline vont intervenir (**Figure 5**).

[24] H. Hochegger, S. Takeda and T. Hunt, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9 (2008) 910-916.

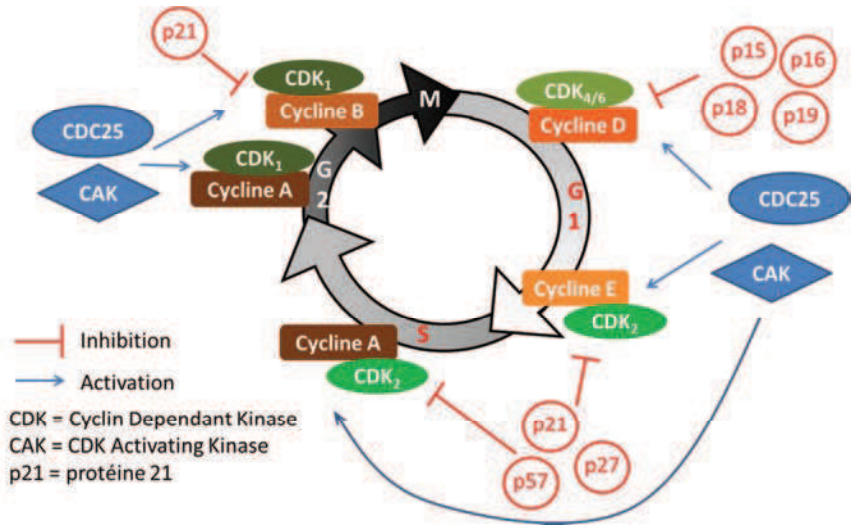


Figure 5 : Contrôle du cycle cellulaire par les complexes CDK/cycline[19].

II.2.1. Régulation de la transition G_0/G_1

Ce sont les signaux mitogènes qui vont induire la cellule en phase de quiescence (G_0) à entrer en prolifération cellulaire. Dans ce cas précis, diverses voies de signalisation sont activées, induisant la transcription de gènes essentiels pour la prolifération cellulaire, dont celui codant le facteur de transcription c-Myc. Ce dernier se dimérise alors avec la protéine Max (Myc-Associated factor X) et active la transcription de gènes codant les cyclines D et E, CDK4 et CDC25A, indispensables pour l'entrée en phase G_1.

II.2.2. Régulation de la progression en G_1 et de la transition G_1/S

Au cours de la phase G_1, la cellule va passer par une étape spécifique, le point de restriction, désigné comme étant le moment où la cellule n'a plus besoin de stimuli mitogènes pour avancer dans le cycle (**Figure 6**). On considère que ce point est atteint lorsque la cellule possède suffisamment de complexes CDK2/cycline E activés. Une fois ce seuil dépassé, la cellule va continuer irréversiblement son cycle sans pouvoir retourner en G_0.

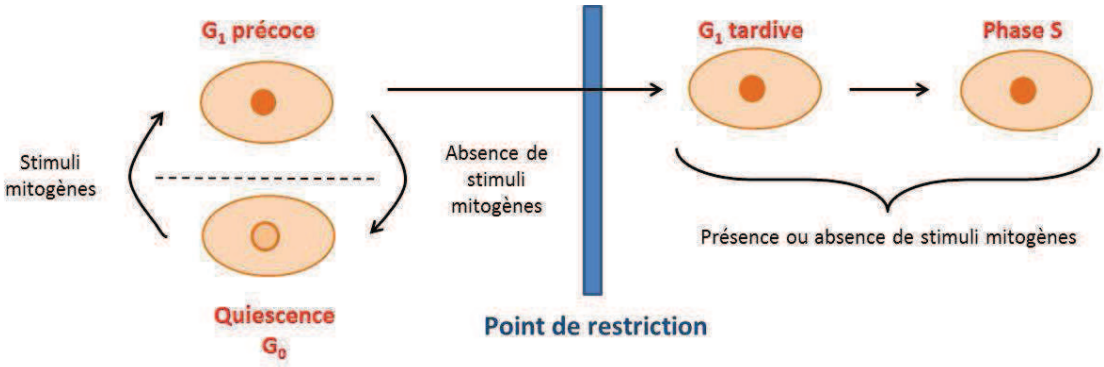


Figure 6 : La transition G_0/G_1 : le point de restriction.

II.2.3. La phase S

Comme le montre la **Figure 5**, la régulation de la phase S est sous le contrôle du complexe CDK2/cycline A. Au début de la phase, les cyclines spécifiques de la phase G_1 sont dégradées par le protéasome. En parallèle de la duplication de l'ADN, la cellule doit également assurer la duplication du centrosome au cours de la phase S. L'activation des complexes CDK2/cyclines E et A induit la duplication du centrosome qui constitue le centre organisateur des microtubules et qui joue un rôle essentiel lors de la mitose.

II.2.4. Régulation de la progression en G_2 et de la transition G_2/M

La phase G_2 est souvent présentée comme une phase de préparation à la mitose et elle est marquée par la condensation des chromosomes. Ce sont alors les complexes CDK1/cycline A qui sont actifs, mais leurs fonctions sont encore mal connues. Par ailleurs, la synthèse de la cycline B est induite à la fin de la phase S, permettant l'accumulation progressive des complexes CDK1/cycline B inactifs au cours de la phase G_2. Ils seront alors activés par plusieurs mécanismes successifs. Intervient alors un processus d'auto-amplification qui active les CDC25s et conduit à une augmentation importante de la quantité de complexe CDK1/cycline A. L'entrée en mitose est alors déclenchée.

II.2.5. Régulation de la mitose

Ce sont les complexes CDK1/cycline B qui, une fois activés en fin de phase G_2, provoquent le déclenchement des évènements majeurs de la mitose en phosphorylant de nombreuses protéines. Les principales protéines phosphorylées sont :

- les histones H1 et H3 ainsi que la condensine, impliquées dans la condensation des chromosomes ;
- les lamines impliquées dans la désorganisation de l'enveloppe nucléaire ;
- les protéines associées aux microtubules (MAP), qui permettent l'assemblage du fuseau mitotique ;
- le complexe ubiquitine ligase APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) responsable de la dégradation, entre autres, de la cycline B en sortie de mitose.

II.3. Les points de contrôle

La cellule possède des mécanismes capables de détecter des anomalies lors des différentes transitions du cycle cellulaire afin de maintenir l'intégrité de leur génome. Lorsqu'un dommage est détecté, par exemple une lésion dans l'ADN ou une réplication d'ADN inachevée, les points de contrôle (Chk) s'activent et stoppent l'avancement du cycle pour laisser le temps à la cellule de réparer ce dommage. Si la lésion est irréparable, alors des processus de mort cellulaire par apoptose sont enclenchés. Ces points de contrôle interviennent à différents moments du cycle, en particulier au niveau des transitions G_1/S et G_2/M.

Lorsque le point de contrôle de la transition G_1/S est activé (suite à un dommage à l'ADN), plusieurs voies métaboliques distinctes se mettent en place[25]. Une première réponse rapide (entre 20 et 30 min) a lieu au cours de laquelle les kinases ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) /ATR (ATM and Rad3-Related) phosphorylent et activent les kinases Chk1 et 2 (Checkpoint Kinase). Ces kinases vont alors phosphoryler et par conséquent induire la protéolyse et/ou la séquestration cytoplasmique des phosphatases CDC25 qui ne pourront pas activer CDK2. De plus, Chk1 et 2 induisent une augmentation de l'activité de Wee1, ce qui amplifie l'inhibition des complexes CDK/cyclines. Dans un deuxième temps, un second mécanisme retardé se met en place. Ce processus dépend du suppresseur de tumeur p53, un facteur responsable de la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire ou le déclenchement de l'apoptose. Suite à un dommage à l'ADN, la protéine p53 va être stabilisée, ce qui va induire une augmentation de son activité transcriptionnelle. L'une des cibles de p53 est le gène codant pour l'inhibiteur de CDK, p21. L'augmentation du niveau protéique de p21 contribue à l'inhibition des complexes CDK/cyclines et renforce le blocage en G_1/S. L'arrêt du cycle est alors plus prolongé, voire définitif[25]. p53 induit également la transcription d'enzymes de réparation de l'ADN (**Figure 7**).

[25] J. Lukas, C. Lukas and J. Bartek, DNA Repair 3 (2004) 997-1007.

Le point de contrôle intervenant au niveau de la transition G_2/M évite la propagation d'aberrations de l'ADN lorsque celui-ci n'a pas été correctement répliqué lors de la phase S (**Figure 7**). Les mêmes mécanismes que ceux du point de contrôle G_1/S interviennent, à savoir l'activation des kinases ATM/ATR conduisant à l'inactivation des CDC25s, rendant impossible l'activation des complexes CDK1/cycline B. La kinase MAPKAP-2 intervient également afin d'induire la séquestration cytoplasmique des CDC25B et C suite à leur phosphorylation. Le 3ème mécanisme retardé faisant intervenir p53 va aussi permettre l'inhibition des complexes CDK1/cycline B.

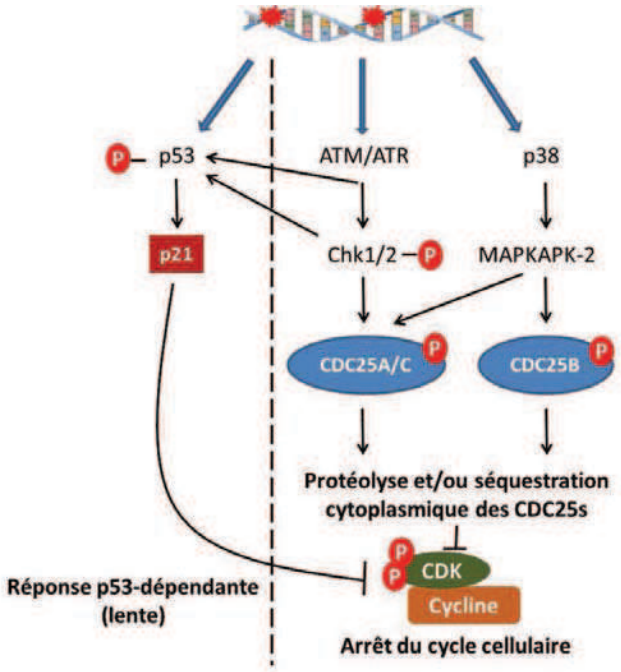


Figure 7 : La réponse cellulaire aux dommages à l'ADN[26].

III. Les phosphatases CDC25

III.1. Généralités et structure

Le gène *cdc25*$^+$ est identifié par Fantes en 1979 chez la *levure Schizosaccharomyces pombe* comme étant un gène essentiel pour l'entrée en mitose du cycle cellulaire. En 1986 Russel *et al.* montrent que ce gène encode pour une protéine de masse moléculaire 67000 Da[27,28]. Par la suite, ce gène et ses homologues sont identifiés chez toutes les cellules eucaryotes, sauf chez les plantes.

Les phosphatases CDC25 (Cell Division Cycle 25) appartiennent à la famille des phosphatases à double spécificité (DSP) car elles sont capables de déphosphoryler à la fois les résidus pThr14 et

26 B. Aressy and B. Ducommun, Anticancer Agents Med. Chem. 8 (2008) 818 - 824.
27 P. A. Fantes, Nature 279 (1979) 428-430.
28 P. Russell and P. Nurse, Cell 45 (1986) 145-153.

pTyr15 de leurs substrats, en l'occurrence les CDK. Les CDC25s jouent ainsi un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire, que ce soit en conditions normales ou en réponse à des dommages de l'ADN[29]. Trois isoformes de CDC25s ont été identifiées chez l'homme : CDC25A, B et C, chacune codée par des gènes situés sur des chromosomes différents. De plus, un mécanisme d'épissage alternatif des différents ARNm (acide ribonucléique messager) conduit à la formation d'isoformes identifiées[30]. La séquence peptidique des phosphatases CDC25, constituée de 300 à 600 acides aminés, peut être divisée en deux domaines distincts : le domaine régulateur se situant à l'extrémité N-terminale et le domaine catalytique à l'extrémité C-terminale de la protéine.

- Le domaine régulateur est très différent selon les isoformes, puisque seulement 20 à 25% de la séquence est identique entre CDC25 A, B et C. Cette région contient de nombreux sites de phosphorylation et d'ubiquitination permettant la régulation de l'activité protéique, le contrôle du niveau intracellulaire en protéine et l'interaction avec d'autres partenaires[29]. Cette région contient également les motifs qui régulent la localisation cellulaire des CDC25s.
- Le domaine catalytique (environ 200 acides aminés) est très conservé entre les différentes isoformes des protéines, puisque 60 à 70% de la séquence sont identiques chez les isoformes. Ce domaine contient le site actif avec le motif HCX_5R caractéristique de toutes les phosphatases à double spécificité, au sein duquel est localisée la cystéine catalytique (« H » représente un résidu histidine, « C » la cystéine catalytique, « X_5 » représente 5 résidus formant une boucle dans laquelle les hydrogènes des groupements amides se lient aux phosphates des substrats et « R » est un résidu arginine). Cependant les CDC25s se diffèrent des autres protéines tyrosine phosphatases car elles possèdent un domaine catalytique superficiel et peu profond. La structure cristalline des domaines catalytiques des CDC25A et B a mis en évidence certaines de leur caractéristiques[31,32] (**Figure 8**). Ces données ont permis de démontrer que leur domaine catalytique ne permet un accès qu'au groupement phosphate de leur substrat, sans permettre la reconnaissance de sites spécifiques en amont et en aval du site de déphosphorylation. C'est cette particularité qui rend possible la double spécificité des CDC25s, puisqu'elles acceptent indifféremment les résidus pThr et pTyr comme substrat.

---

29 I. Nilsson and I. Hoffmann, Prog. Cell Cycle Res. 4 (2000) 107-114.

30 R. Boutros, V. Lobjois and B. Ducommun, Nat. Rev. Cancer 7 (2007) 495-507.

31 E. B. Fauman, J. P. Cogswell, B. Lovejoy, W. J. Rocque, W. Holmes, V. G. Montana, H. Piwnica-Worms, M. J. Rink and M. A. Saper, Cell 93 (1998) 617-625.

32 R. A. Reynolds, A. W. Yem, C. L. Wolfe, J. Deibel, R. Martin, C. G. Chidester and K. D. Watenpaugh, J. Mol. Bio. 293 (1999) 559-568.

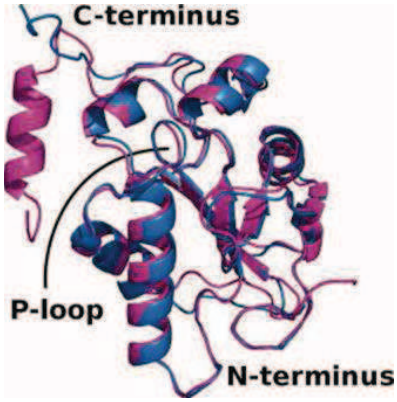


Figure 8 : Structures cristallines des domaines catalytiques de CDC25A (en bleu) et CDC25B (en violet) superposés[33].

Le domaine catalytique est constitué de cinq feuillets β parallèles et entourés de part et d'autre d'hélices α. Le site catalytique des CDC25s se situe au niveau d'une boucle appelée P-loop (Phosphate binding-loop,) au sommet d'une des hélices α, ce qui facilite la déprotonation de la cystéine catalytique.

III.2. Mécanisme catalytique

Le mécanisme catalytique général des CDC25s, comme celui des DSPs, implique la participation de deux résidus catalytiques clés : un anion thiolate et un acide catalytique protoné. Le groupement phosphorylé PO_4^{2-} est maintenu dans la P-loop grâce à la formation de liaisons hydrogène avec les groupements amides des 5 résidus « X » et avec l'arginine du motif HCX_5R. La **Figure 9** représente le mécanisme catalytique général des DSPs. Lors de la première étape de la réaction, l'anion thiolate de la cystéine catalytique attaque le groupement phosphate du substrat. Le produit intermédiaire (substrat-phosphate-cystéine) alors formé est ensuite protoné par action de l'acide catalytique (aspartate pour les DSPs), permettant ainsi le départ du substrat déphosphorylé. Lors de la seconde étape, l'intermédiaire phospho-cystéine restant est hydrolysé après attaque d'une molécule d'eau, elle-même préalablement activée par l'aspartate qui fait alors office de base.

[33] G. M. Arantes, Proteins 78 (2010) 3017-3032.

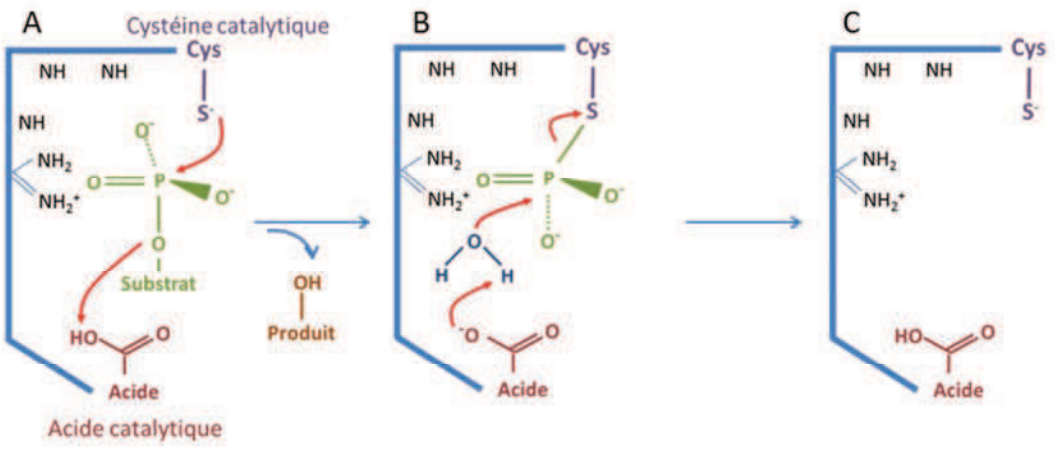


Figure 9 : Mécanisme catalytique général des DSPs[34]. Les flèches rouges représentent les attaques des différentes espèces chargées et les flèches bleues l'avancement entre les différentes étapes de la réaction. *En (A) l'anion thiolate de la cystéine catalytique attaque le groupement phosphate du substrat. Après réaction avec l'acide catalytique le substrat déphosphorylé est libéré sous la forme Produit-OH. En (B) l'attaque d'une molécule d'eau activée par l'acide catalytique (sous sa forme basique) vient hydrolyser l'intermédiaire phospho-cystéine afin de libérer le groupement phosphate et permet ainsi en (C) à la protéine de recouvrir son état initial.*

La seule différence entre le mécanisme catalytique des CDC25s et celui des DSPs est l'acide catalytique qui entre en jeu. Pour les DSPs il s'agit de l'aspartate, alors que pour les CDC25s l'acide n'est pas clairement établi. Il semblerait que ce soit le résidu Glu431 chez CDC25A et Glu474 chez CDC25B qui jouent ce rôle[34,35].

III.3. Rôle au cours du cycle cellulaire

La principale action de CDC25A se situe au niveau de la transition G_1/S en déphosphorylant le complexe CDK2/cycline E (**Figure 10**). Grâce à des mécanismes d'auto-amplification, la progression en phase S est activée, associée à une augmentation d'activité des complexes CDK2/cycline E. De plus, la micro-injection d'anticorps dirigés contre CDC25A provoque un arrêt des cellules en phase G_1[36]. L'activation du complexe CDK1/cycline A au cours de la phase G_2 semble être aussi exclusivement sous le contrôle de CDC25A[37]. Cette isoforme a aussi montré des implications lors de la transition G_2/M puisque sa surexpression accélère la division cellulaire, alors que sa sous expression au contraire retarde l'entrée en mitose[38]. CDC25B quant à elle est considérée comme

34 K. Kristjansdottir and J. Rudolph, Chem. Biol. 11 (2004) 1043-1051.
35 G. M. Arantes, J. Phys. Chem. B 112 (2008) 15244-15247.
36 I. Blomberg and I. Hoffmann, Mol. Cell. Biol. 19 (1999) 6183-6194.
37 O. Timofeev, O. Cizmecioglu, E. Hu, T. Orlik and I. Hoffmann, FEBS Letters 583 (2009) 841-847.
38 N. Mailand, A. V. Podtelejnikov, A. Groth, M. Mann, J. Bartek and J. Lukas, EMBO J. 21 (2002) 5911 - 5920.

étant la phosphatase activatrice des complexes CDK1/cycline B lors de la transition G_2/M[39]. Au début de la prophase, les complexes CDK1/cycline B sont transloqués dans le noyau où CDC25C complète leur activation[40,41]. Là encore, le rôle des CDC25B et C lors de l'entrée en mitose a été mis en évidence par des expériences de micro-injection d'anticorps dirigés contre ces isoformes, ce qui a conduit à un arrêt des cellules en phase G_2[42,43]. Toutefois, il semblerait que CDC25B et C soient également responsables de la progression de la phase S. Effectivement, une expérience a révélé que l'utilisation d'ARN antisens ou d'interférents dirigés contre CDC25B et C empêche la progression des cellules HeLa (du nom Henrietta Lacks) en phase S, même en présence de CDC25A fonctionnelle[42,43].

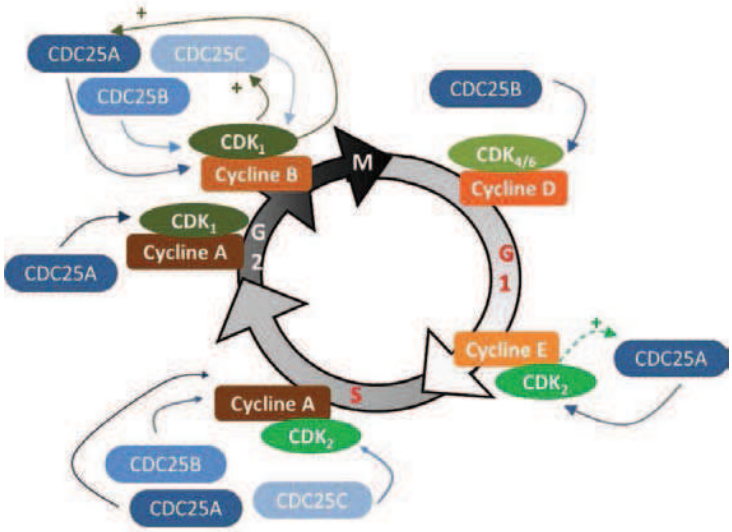


Figure 10 : Régulation du cycle cellulaire par les différentes isoformes de CDC25[44].

De récents travaux sont venus ajouter des informations au modèle initial : il semblerait que CDC25A et C soient également impliqués dans l'activation cytoplasmique et précoce des complexes CDK1/cycline B, en plus de CDC25B, puisque des ensembles de centrosomes de CDC25A et C ont été retrouvés[45,46,47]. Enfin, une étude très récente montre une nouvelle fonction des CDC25A et B lors de la transition G_2/M. En plus de l'activation des complexes CDK1/cycline B, ces deux isoformes

39 B. G. Gabrielli, C. P. C. De Souza, I. D. Tonks, J. M. Clark, N. K. Hayward and K. A. Ellem, J. Cell Sci. 109 (1996) 1081-1093.
40 B. G. Gabrielli, J. M. Clark, A. K. McCormack and K. A. Ellem, J. Biol. Chem. 272 (1997) 28608-28614.
41 A. Lindqvist, H. Källström, A. Lundgren, E. Barsoum and C. K. Rosenthal, J. Cell Biol. 171 (2005) 35-45.
42 P. A. Garner-Hamrick and C. Fisher, Int. J. Cancer 76 (1998) 720-728.
43 P. Turowski, C. Franckhauser, M. C. Morris, P. Vaglio, A. Fernandez and N. J. C. Lamb, Mol. Biol. Cell 14 (2003) 2984-2998.
44 M. O. Contour-Galcera, A. Sidhu, G. Prévost, D. Bigg and B. Ducommun, Pharmacol. Therapeut. 115 (2007) 1-12.
45 C. Busch, O. Barton, E. Morgenstern, C. Götz, J. Günther, A. Noll and M. Montenarh, Int. J. Biochem.Cell Biol. 39 (2007) 1707-1713.
46 C. Franckhauser, D. Mamaeva, L. Heron-Milhavet, A. Fernandez and N. J. C. Lamb, PLoS One 5 (2010) 11798.
47 S. Shreeram, W. K. Hee and D. V. Bulavin, Mol. Cell Biol. 28 (2008) 7442-7450.

favorisent l'assemblage de ces complexes, bien que les mécanismes mis en jeu n'aient pas encore été identifiés[48].

Il est apparu que les différentes isoformes de CDC25 peuvent agir ensemble à diverses phases du cycle, et qu'une isoforme possédait la faculté d'en remplacer une autre si celle-ci était endommagée. Il est donc clair que le rôle de chaque isoforme au cours du cycle cellulaire est loin d'être définitivement établi. De plus, des expériences « knock-out » réalisées chez des souris Cdc25B^{-}/$^{-}$ et Cdc25C^{-}/$^{-}$ suggèrent que CDC25A serait capable de remplir les fonctions des trois isoformes et indispensable à la survie des souris, puisqu'aucune souris Cdc25A^{-}/$^{-}$ n'est apparue viable[49].

III.4. CDC25s et cancer

Le cancer se caractérise par une prolifération anormale et anarchique des cellules suite à une altération de certains régulateurs du cycle cellulaire. Parmi ces régulateurs, on différencie les CKI (Cyclin dependant Kinase Inhibitor), les CDK et les CDC25s. C'est pourquoi les recherches actuelles visent ces régulateurs du cycle cellulaire comme cibles privilégiées dans le cas du développement de nouveaux traitements anticancéreux.

III.4.1. CDC25s : surexpression et cibles d'intérêt dans le cancer

Les phosphatases CDC25 apparaissent comme cibles de choix dans le traitement anticancéreux de par leur surexpression observée dans de nombreux cancers, particulièrement pour les isoformes A et B. En effet, leur surexpression a été constatée dans au moins 17 types de cancers différents, dont les cancers du sein, de l'œsophage, du poumon et du colon (**Figure 11**). Ce phénomène est fréquemment associé à une tumeur de grade élevé ainsi qu'à un mauvais pronostic vital[34]. La surexpression de l'isoforme C n'a été reportée que dans un nombre limité de cas, mais il faut reconnaitre que cette isoenzyme est la moins étudiée. Une étude récente a montré qu'une surexpression de CDC25C était associée dans 63% des carcinomes de la vulve à un stade tumoral avancé, à la présence de métastases ganglionnaires et à un diamètre tumoral important[50].

Comme nous l'avons vu précédemment, ces protéines jouent un rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire par le contrôle de l'activité des CDK, mais également lors de la réponse cellulaire aux

---

48 O. Timofeev, O. Cizmecioglu, F. Settele, T. Kempf and I. Hoffmann, J. Biol. Chem. 285 (2010) 16978-16990.
49 A. M. Ferguson, L. S. White, P. J. Donovan and H. Piwnica-Worms, Mol. Cell. Biol. 25 (2005) 2853-2860.
50 Z. Wang, C. Trope, V. Florenes, Z. Suo, J. Nesland and R. Holm, BMC Cancer 10 (2010) 233.

dommages à l'ADN. Leur inactivation conduit à un arrêt temporaire ou définitif du cycle cellulaire, afin que la cellule puisse réparer son ADN ou entrer en apoptose. Une dérégulation de ces protéines pourrait alors engendrer ou participer à une prolifération anarchique des cellules, et donc amener ces cellules saines à devenir des cellules cancéreuses.

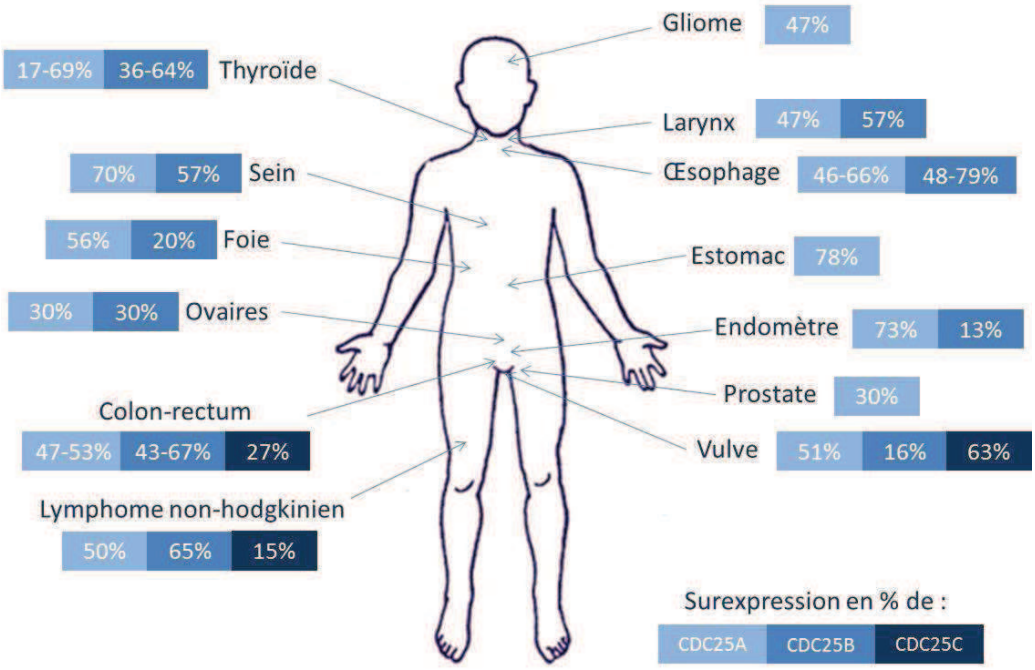


Figure 11 : Surexpression des CDC25s dans différents types de cancer humain[51].

Nous comprenons donc pourquoi, depuis une dizaine d'années, le développement de nouvelles molécules anticancéreuses ciblant les CDC25s connaît un essor important. Cependant les risques de toucher des cellules saines sont bien présents. Tout comme avec d'autres médicaments utilisés en chimiothérapie, il est très difficile de cibler spécifiquement les cellules saines des cellules cancéreuses et ces molécules peuvent donc provoquer des effets néfastes sur ces cellules saines. Néanmoins, suite à la surexpression de ces protéines dans de nombreux cancers humains celles-ci sembleraient être plus sensibles à l'activité des inhibiteurs dans les cellules cancéreuses[52].

III.4.2. Le développement d'inhibiteurs et d'activateurs de CDC25s

Puisque 42% des protéines tyrosine phosphatases (PTP) connues chez l'homme sont identifiées comme intervenant dans la survie ou la mort des cellules cancéreuses, l'intérêt pour le

[51] R. Boutros, V. Lobjois and B. Ducommun, Nat. Rev. Cancer 7 (2007) 495-507.

[52] J. Guo, J. Kleeff, J. Li, J. Ding, J. Hammer, Y. Zhao, T. Giese, M. Korc, M. W. Buchler and H. Friess, Oncogene 23 (2004) 71 - 81.

développement d'agents pharmacologiques ciblant ces protéines ne cesse d'augmenter[53]. Les connaissances concernant les PTPs ont permis de particulièrement développer les agents ciblant les protéines à double spécificité CDC25s.

Le développement de ces inhibiteurs de CDC25s s'est fait en deux temps. Tout d'abord, après identification du premier inhibiteur naturel (dnacin) des CDC25s[54], les agents agissant directement au niveau du site catalytique des protéines sont développés. La question qui s'est alors posée était de cibler ou non une isoforme particulière. Il s'est avéré que privilégier une inhibition globale des CDC25s était la stratégie la plus adéquate puisque nous avons vu que ces protéines jouent la solidarité et chacune peut prendre le rôle d'une autre. Certains inhibiteurs sont cependant spécifiques d'une isoforme de CDC25. Dans un deuxième temps, l'activation des CDC25s est parue intéressante, notamment suite à la mise en évidence de leur rôle primordial lors de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. Différentes études montrent que suite à un arrêt du cycle cellulaire en G_2/M, l'augmentation de l'expression de CDC25B semble cruciale lors du redémarrage après réparation des dommages de l'ADN[55,56]. De même, en 2008 Aressy *et al.* montrent qu'une faible induction au niveau de CDC25B permet d'abolir le point de contrôle en G_2/M et de sensibiliser les cellules à l'action d'agents génotoxiques et de radiations ionisantes[26]. Ainsi la cellule est forcée d'entrer en mitose, malgré les dommages à l'ADN, conduisant à une accumulation d'anomalies génétiques qui favoriserait la mort de la cellule par apoptose. Cependant cette stratégie n'a de sens que si l'activateur de CDC25B est associé à un traitement susceptible de provoquer des dommages à l'ADN (radiothérapie ou chimiothérapie). Actuellement, aucune molécule de ce type n'a été reportée. Il est à préciser que si cette stratégie ne mène pas à la mort des cellules cancéreuses, ces dernières pourraient acquérir d'avantage d'aberrations génétiques qui risqueraient de rendre le cancer plus agressif.

III.5. Les inhibiteurs de CDC25s

On peut différencier deux classes d'inhibiteurs parmi ceux répertoriés à l'heure actuelle : les inhibiteurs d'origine naturelle et les inhibiteurs de synthèse[44,57,58,59].

---

53 J. MacKeigan, L. O. Murphy and J. Blenis, Nat. Cell Biol. 7 (2005) 591 - 600.

54 T. Horiguchi, K. Nishi, S. Hakoda, S. Tanida, A. Nagata and H. Okayama, Biochem. Pharmacol. 48 (1994) 2139-2141.

55 M. A. T. M. Van Vugt, A. Bràs and R. H. Medema, Cancer Res. 65 (2005) 7037-7040.

56 P. Bansal and J. S. Lazo, Cancer Res. 67 (2007) 3356 - 3363.

57 M.-C. Brezak, P. G. Kasprzyk, M.-O. Galcera, O. Lavergne and G. P. Prevost, Anti-Cancer Agents Med. Chem. 8 (2008) 857-862.

58 A. Lavecchia, C. Di Giovanni and E. Novellino, Current Med. Chem. 16 (2009) 1831-1849.

III.5.1. Les composés naturels

Les premiers inhibiteurs de CDC25 sont identifiés en 1994 par Horiguchi *et al.* comme étant des alcaloïdes naturels nommés dnacins[54]. Ces composés sont isolés de cultures bactériennes *Nocardia sp.*, et notamment les dnacins A1 et B1 qui sont apparues comme des inhibiteurs non compétitifs de CDC25B. Plus tard, les recherches continuent avec la découverte en 1996 de nouveaux inhibiteurs naturels, le dysidiolide et ses dérivés[60]. Le dysidiolide provient d'une espèce d'éponge de mer *Dysidea ethyria*. Tout d'abord décrit comme un inhibiteur spécifique de CDC25A, le dysidiolide synthétisé en composé pur s'est révélé faiblement actif (IC_{50} > 50 µM)[61]. Suite à ces constatations, des analogues de dysidiolide et de vitamine D3 ont été synthétisés par l'équipe de Takahashi *et al.* Ces analogues présentant une configuration non naturelle montrent une activité inhibitrice plus importante que le composé naturel. Grâce à des modifications drastiques des sous-structures hydrophobes et hydrophiles du dysidiolide, un analogue insaturé capable d'inhiber CDC25A *in vitro* avec une IC_{50} de 7 µM a été synthétisé[62]. Ce dernier cause un arrêt des cellules HL60 (Human Leukemia 60) en phase G_1.

D'autres types de composés naturels inhibiteurs de CDC25s sont les dérivés de stéroïdes. L'un des plus puissants inhibiteurs de CDC25A est l'acide de cholestanol dithiocarboxylique (IC_{50} = 1 µM, **Figure 12**)[63]. Les études sur les relations structure/activité de ces composés révèlent qu'une chaine latérale cholestéryl hydrophobe et un groupe carboxyle libre, ainsi que la distance entre ces deux pharmacophores sont cruciaux pour l'effet inhibiteur. De nombreuses molécules ont ainsi montré une forte activité inhibitrice *in vitro* sur des cellules cancéreuses de la langue, du colon et du sein. Cette sélectivité est en accord avec les études de 1998 décrivant une surexpression des CDC25s dans ces lignées de cellules cancéreuses[64].

Par la suite, la sulfiricine (**Figure 12**), un sesquiterpène bicyclique extrait d'une autre éponge marine du genre *Ircina*, est identifiée comme étant un inhibiteur de CDC25A avec une IC_{50} de 7,8 µM[65].

---

59 A. Lavecchia, C. Di Giovanni and E. Novellino, Expert Opin. Ther. Pat. 20 (2010) 405-425.

60 S. P. Gunasekera, P. J. McCarthy, M. Kelly-Borges, E. Lobkovsky and J. Clardy, J. Am. Chem. Soc. 118 (1996) 8759-8760.

61 J. L. Blanchard, D. M. Epstein, M. D. Boisclair, J. Rudolph and K. Pal, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9 (1999) 2537-2538.

62 K. Dodo, M. Takahashi, Y. Yamada, Y. Sugimoto, Y. Hashimoto and R. Shirai, Bioorg. Med. Chem. Lett. 10 (2000) 615-617.

63 H. Peng, W. Xie, D.-I. Kim, L. H. Zalkow, G. Powis, D. M. Otterness and R. T. Abraham, Bioorg. Med. Chem. 8 (2000) 299-306.

64 W. Wu, Y.-H. Fan, B. L. Kemp, G. Walsh and L. Mao, Cancer Res. 58 (1998) 4082-4085.

65 R. E. Cebula, J. L. Blanchard, M. D. Boisclair, K. Pal and N. J. Bockovich, Bioorg. Med. Chem. Lett. 7 (1997) 2015-2020.

Un autre composé dérivé d'une éponge marine extraite du genre *Xestospongia* est décrit comme inhibiteur puissant de CDC25B *in vitro*, avec une IC_{50} de 70 nM et environ 19 et 150 fois moins active contre VHR et PTPB1 respectivement. Ce composé, nommé Adociaquinone B (**Figure 12**) bloque la progression du cycle cellulaire au niveau de la mitose, et les auteurs suggèrent qu'une oxydation sélective de la cystéine catalytique pourrait être un mécanisme possible pour l'inhibition CDC25B[66,67].

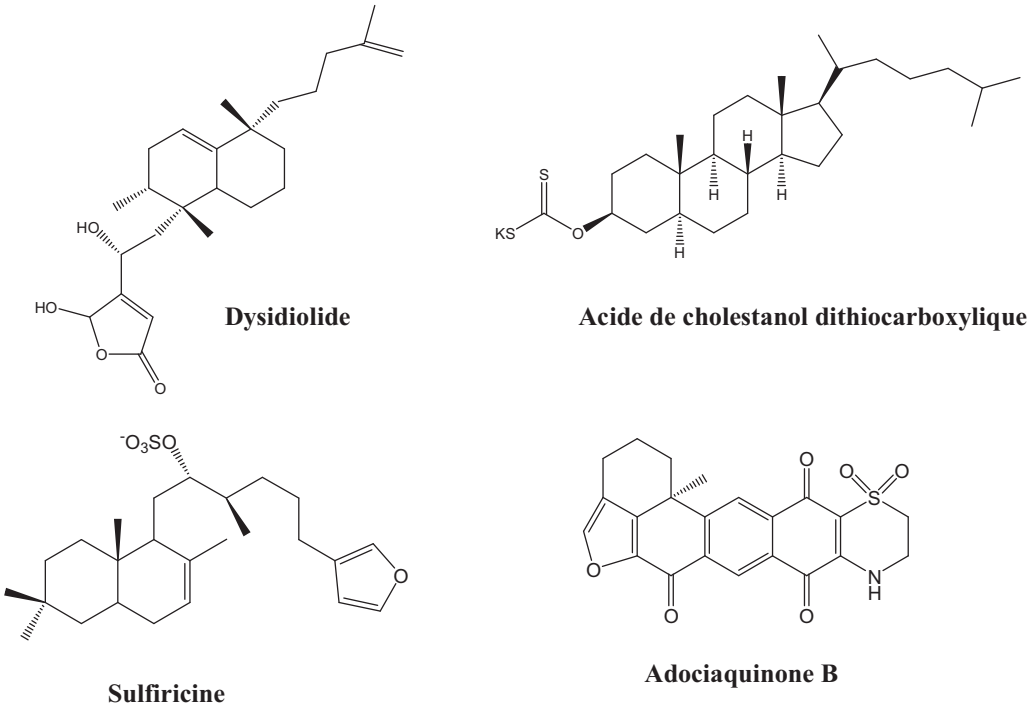


Figure 12: Structures de composés naturels inhibiteurs de CDC25s.

Dans le même registre, le composé Coscinosulfate issu de l'éponge marine *Coscinoderma Mathewsi* est reporté comme inhibiteur de CDC25A avec une IC_{50} de 3 µM[68]. Les derniers composés naturels inhibiteurs de CDC25s sont reportés par le groupe de Lazo (Université de Pittsburgh, MA, USA). Il s'agit de cinq quinones extraites d'un bryozoaire marin et nommés Caulibugulones A-E[69]. Ces caulibugulones inhibent les trois isoformes de CDC25s (IC_{50} entre 1,5 et 19,1 µM) et un arrêt de croissance de cellules tumorales a également pu être observé. Une étude plus récente décrit le mécanisme d'action de la caulibugulone A : elle inactive directement les CDC25A par oxydation de leur cystéine catalytique. Un deuxième mécanisme a lieu parallèlement : la caulibugulone A active la voie p38 MAPK qui induit la dégradation de CDC25A[70].

---

66 S. Cao, C. Foster, M. Brisson, J. S. Lazo and D. G. I. Kingston, Bioorg. Med. Chem. 13 (2005) 999-1003.

67 S. Cao, B. T. Murphy, C. Foster, J. S. Lazo and D. G. I. Kingston, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 2276-2281.

68 A. Loukaci, I. Le Saout, M. Samadi, S. Leclerc, E. Damiens, L. Meijer, C. Debitus and M. Guyot, Bioorg. Med. Chem. 9 (2001) 3049-3054.

69 P. Wipf, B. Joo, T. Nguyen and J. S. Lazo, Org. Biomol. Chem. 2 (2004) 2173-2174.

70 M. Brisson, C. Foster, P. Wipf, B. Joo, R. J. Tomko, T. Nguyen and J. S. Lazo, Mol. Pharm. 71 (2007) 184-192.

III.5.2. Les composés de synthèse

III.5.2.1. Les quinones

Les composés quinoniques font partie des inhibiteurs de CDC25s les plus puissants reportés à ce jour. Ils possèdent des propriétés électrophiles (accepteur de Michael) mais également oxydo-réductrices et sont capables d'oxyder irréversiblement la cystéine catalytique des phosphatases CDC25. Il faut cependant tenir compte de leur partie non quinonique qui joue un rôle important car elle permet de créer les interactions de type polaire, hydrophobe et électronique (ex : empilements π-π ou π-π stacking) avec l'enzyme, et favorise donc le positionnement de la fonction réactive de la molécule (*i.e* la quinone) au voisinage de la cystéine catalytique. Ces quinones restent tout de même à utiliser avec précaution puisqu'elles sont aussi capables de produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui pourraient induire une cytotoxicité au niveau des cellules saines.

- Les para-quinones : la synthèse d'inhibiteurs de CDC25s basés sur la structure de quinone débute après la découverte de la ménadione (vitamine K3) en 1993, un inhibiteur naturel des tyrosines phosphatases[71] (**Figure 13**). Quelques années plus tard, une étude montre que ce composé peut se lier directement au domaine catalytique de CDC25A, provoquant un arrêt de la prolifération, puis l'apoptose de cellules de carcinome vaginal humain[72,73]. Les recherches se tournent alors vers la synthèse de dérivés de ménadione, afin d'optimiser leurs activités inhibitrices sur les CDC25s. Le composé 5 (**Figure 13**), dérivé thioalkyle de ménadione synthétisé montre des propriétés d'inhibiteur compétitif et sélectif des CDC25s pouvant inhiber la prolifération de cellules d'hépatome de rat *in vitro* et *in vivo*[74]. D'autres analogues sont synthétisés dans le but de réduire la toxicité due à la production de ROS. Par exemple le composé F-composé 5, dérivé fluoré du composé 5, permet de conserver les propriétés inhibitrices du composé d'origine, tout en réduisant sa capacité à produire des ROS grâce aux atomes de fluor, très électronégatifs[75].

L'équipe du professeur J. Lazo a identifié une série de quinolidiones comme inhibiteurs de CDC25s. Le composé le plus actif de cette série est le NSC663284 (**Figure 13**) qui inhibe les CDC25s irréversiblement et en fonction du temps (IC_{50} = 210 nM pour CDC25B)[76]. Une digestion trypsique in-gel suivie d'une chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse montre que le NSC663284 se lie directement à l'enzyme à travers une liaison avec l'une des deux sérines du site

---

71 C. C. Juan and F. Y. H. Wu, Biochem. Biophys. Res. Commun. 190 (1993) 907-913.
72 S. W. Ham, H. J. Park and D. H. Lim, Bioorg. Chem. 25 (1997) 33-36.
73 F. Y. H. Wu and T. P. Sun, Europ. J. Cancer 35 (1999) 1388-1393.
74 S. Kar, I. M. Lefterov, M. Wang, J. S. Lazo, C. N. Scott, C. S. Wilcox and B. I. Carr, Biochem. 42 (2003) 10490-10497.
75 S. Kar, M. Wang, S. W. Ham and B. I. Carr, Biochem. Pharmacol. 72 (2006) 1217-1227.
76 J. S. Lazo, D. C. Aslan, E. C. Southwick, K. A. Cooley, A. P. Ducruet, B. Joo, A. Vogt and P. Wipf, J. Med. Chem. 44 (2001) 4042-4049.

actif de CDC25A (Ser[114], correspondant à Ser[434] de CDC25A complète)[77]. Une analyse par spectrométrie de masse indique la présence d'une oxydation irréversible du résidu cystéine du site actif en acide sulfonique, après traitement *in vitro* de l'enzyme avec NSC663284. Ces résultats suggèrent que ce composé inhibe les CDC25s, en partie à travers l'oxydation irréversible de la cystéine du site actif des phosphatases[78].

Les équipes de B. Ducommun (Université Paul Sabatier, Toulouse, France) et G. Prévost (IPSEN, Les Ulis, France) ont également participé à la découverte d'inhibiteurs de CDC25s. En 2005, ils mettent en évidence le composé BN82685 (**Figure 13**), qui non seulement inhibe irréversiblement l'activité des CDC25s *in vitro* (IC_{50} = 250, 250 et 170 nM sur CDC25A, B et C respectivement) mais également sur des cellules en culture[79]. BN82685 est l'un des rares inhibiteurs de CDC25s à être testé montrant une activité *in vivo* après une administration orale[79]. De plus, des études additionnelles montrent qu'un traitement au BN82685, combiné au paclitaxel, inhibe la prolifération de cellules cancéreuses du colon[80]. Ces résultats renforcent l'intérêt porté à l'association d'inhibiteurs de CDC25s à des agents cytotoxiques utilisés en chimiothérapie.

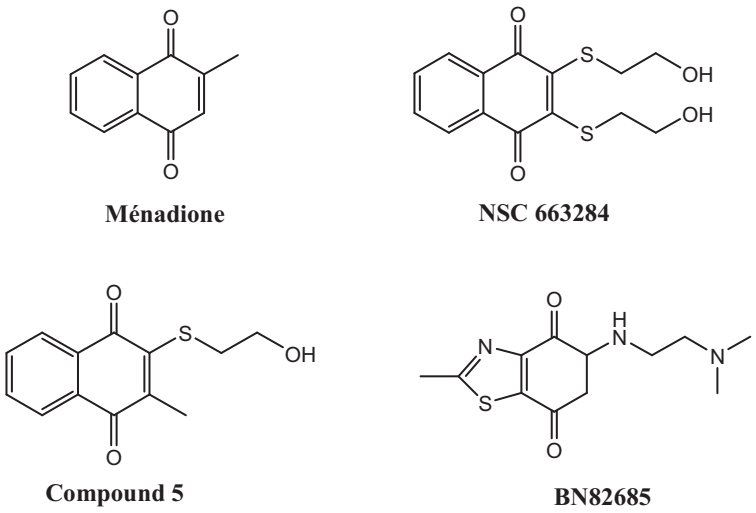


Figure 13 : Structures des inhibiteurs para-quinoniques des phosphatases CDC25.

- Les ortho-quinones : si la structure para-quinonique est commune à de nombreux inhibiteurs de CDC25s, quelques composés actifs de structure ortho-quinonique sont également reportés. Le criblage de la chimiothèque PRIME de Chembridge a permis d'identifier une nouvelle famille d'inhibiteurs compétitifs et réversibles des CDC25s, les naphtofuranediones. L'un des

77 L. Pu, A. Amoscato, M. Bier and J. Lazo, J. Biol. Chem. 277 (2002) 46877-46885.

78 M. Brisson, T. Nguyen, P. Wipf, B. Joo, B. W. Day, J. S. Skoko, E. M. Schreiber, C. Foster, P. Bansal and J. S. Lazo, Mol. Pharmacol. 68 (2005) 1810-1820.

79 M. C. Brezak, M. Quaranta, M. O. Contour-Galcera, O. Lavergne, O. Mondesert, P. Auvray, P. G. Kasprzyk, G. P. Prevost and B. Ducommun, Mol. Cancer Ther. 4 (2005) 1378-1387.

80 M. Cazales, R. Boutros, M.-C. Brezak, S. Chaumeron, G. Prevost and B. Ducommun, Mol. Cancer Ther. 6 (2007) 318-325.

composés de cette série, le 5169131 (**Figure 14**) (IC_{50} = 5, 10,4 et 8,8 µM vis-à-vis de CDC25A, B et C respectivement) est l'un des premiers inhibiteurs réversibles à montrer une activité cellulaire, avec une inhibition des lignées de cellules cancéreuses de la prostate PC-3 et du sein MDA-MB-435 (IC_{50} = 6,5 µM et 1,2 µM respectivement)[81].

D'autres inhibiteurs réversibles des CDC25s reportés sont une famille d'indolyldihydroxyquinones, dont la molécule parent est une para-quinone, la 2,5-dihydroxy-3-(1H-indol-3-yl)[1,4] benzoquine. Bien que ces composés soient de bons inhibiteurs du domaine catalytique de CDC25B, ils sont inefficaces lors des essais cellulaires[82].

Une équipe de chercheurs chinois (Institute of Materia Medica, Shangai, Chine) a également reporté l'efficacité des naphtofuranediones après avoir synthétisé et évalué biologiquement la cryptotanshinone et ses analogues (**Figure 14**) comme inhibiteurs de CDC25B. Ces composés sont dérivés d'une large famille de tanshinones, des diterpènes ortho-quinoniques présents dans le rhizome d'une plante utilisée en médecine chinoise, *Salvia miltiorrhiza*. La (-)cryptotanshinone est décrite comme inhibiteur modéré de CDC25B (IC_{50} = 11 µM), et montre une activité cytotoxique sur des cellules A-549 du cancer du poumon[83].

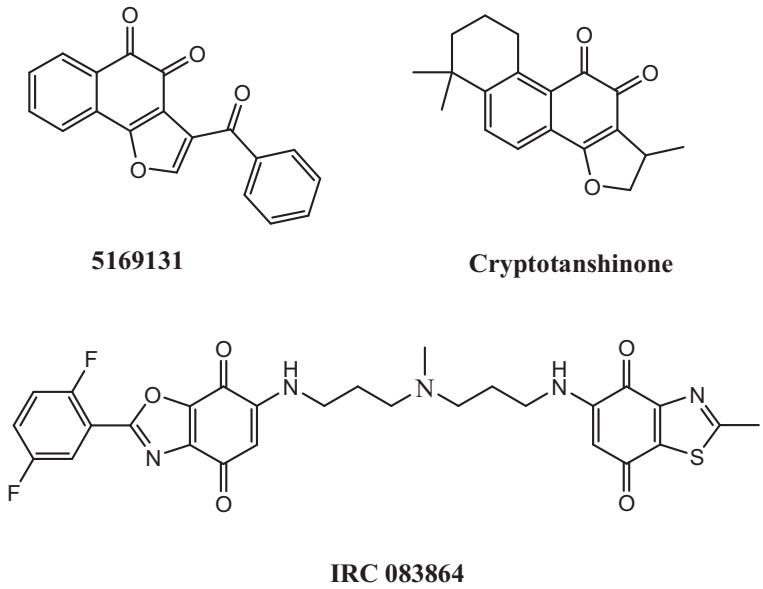


Figure 14 : Structures des inhibiteurs ortho-quinoniques des phosphatases CDC25.

81 M. Brisson, T. Nguyen, A. Vogt, J. Yalowich, A. Giorgianni, D. Tobi, I. Bahar, C. R. J. Stephenson, P. Wipf and J. S. Lazo, Mol. Pharm. 66 (2004) 824-833.

82 J. Sohn, B. Kiburz, Z. Li, L. Deng, A. Safi, M. C. Pirrung and J. Rudolph, J. Med. Chem. 46 (2003) 2580-2588.

83 W. G. Huang, Y. Y. Jiang, Q. Li, J. Li, J. Y. Li, W. Lu and J. C. Cai, Tetrahedron 61 (2005) 1863-1870.

- IRC-083864 : un nouvel inhibiteur des phosphatases CDC25 a récemment été découvert par les équipes de Ducommun et Prévost[84]. Le composé IRC-083864 (**Figure 14**), de structure bis-quinonique, montre des propriétés inhibitrices intéressantes, avec une IC_{50} *in vitro* de 23, 26 et 23 nM respectivement vis-à-vis de CDC25A, B2 et C. L'IRC-083864 est également capable d'inhiber *in vitro* la prolifération de cellules humaines tumorales MIA PaCa-2 (pancréas), DU145 (prostate), LNCaP (prostate), A2058 (peau) et MCF-7 (sein), et particulièrement les cellules tumorales résistantes aux molécules anticancéreuses standards comme la daunorubicine, la doxorubicin et le cisplatine.

III.5.2.2. Les composés non-quinoniques

Les composés quinoniques possèdent, en plus d'être de puissants inhibiteurs de CDC25s, des propriétés oxydo-réductrices qui favorisent la génération de stress oxydant susceptible d'induire une toxicité cellulaire généralisée. Deux autres stratégies ont donc été développées afin de pallier à ce problème et d'envisager de nouveaux inhibiteurs de CDC25s. La première stratégie consiste à mimer le groupement phosphate, présent sur le substrat naturel des CDC25s, en incorporant dans les composés des fonctions réactives de type acide carboxylique, γ-hydroxybutenolides ou acide oxoacétique. La deuxième stratégie consiste à inactiver la cystéine catalytique des CDC25s grâce à des composés électrophiles.

- Les composés mimant le groupe phosphate : le dysidiolide est le premier inhibiteur naturel utilisé comme mimant le groupe phosphate. La partie hydrophile de ce composé mimerait le groupement phosphate, et sa partie hydrophobe servirait à se lier à la protéine. Reposant sur ce modèle, de nouveaux inhibiteurs de CDC25s sont synthétisés. De puissants inhibiteurs sont obtenus en utilisant la structure perhydroindane comme sous-structure hydrophobe, mais en changeant la partie phosphate par le résidu γ-hydroxybutenolide (composé 2 **Figure 15**). Cet hybride de dysidiolide montre une forte activité inhibitrice vis-à-vis de CDC25A et B avec une IC_{50} de l'ordre du micromolaire[85].

Une série d'inhibiteurs macrocycliques dérivés de stéroïdes sont également évalués. Le composé le plus actif de cette série (IC_{50} = 1,5 et 0,17 µM vis-à-vis de CDC25A et B respectivement)

---

84 M. C. Brezak, A. Valette, M. Quaranta, M. O. Contour-Galcera, D. Jullien, O. Lavergne, C. Frongia, D. Bigg, P. G. Kasprzyk, G. P. Prevost and B. Ducommun, Int. J. Cancer 124 (2009) 1449-1456.

85 R. Shimazawa, T. Suzuki, K. Dodo and R. Shirai, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 3291-3294.

(composé 3) serait capable d'entrer en compétition avec le substrat et de se lier à la protéine au niveau du groupement phosphate[86].

Une série de dérivés d'anhydride maléique a été synthétisé et testé sur des enzymes purifiées au sein du laboratoire LIMBP (Université de Lorraine, Metz). Deux de ces composés ayant la chaine hydrophobe la plus longue montrent une forte activité inhibitrice des CDC25s (composés 1i et 1j **Figure 15**). Après 24h de traitement, ces composés induisent un arrêt en G_0/G_1 des cellules MCF-7, suivi par une entrée en apoptose après 48h de traitement[87, 88].

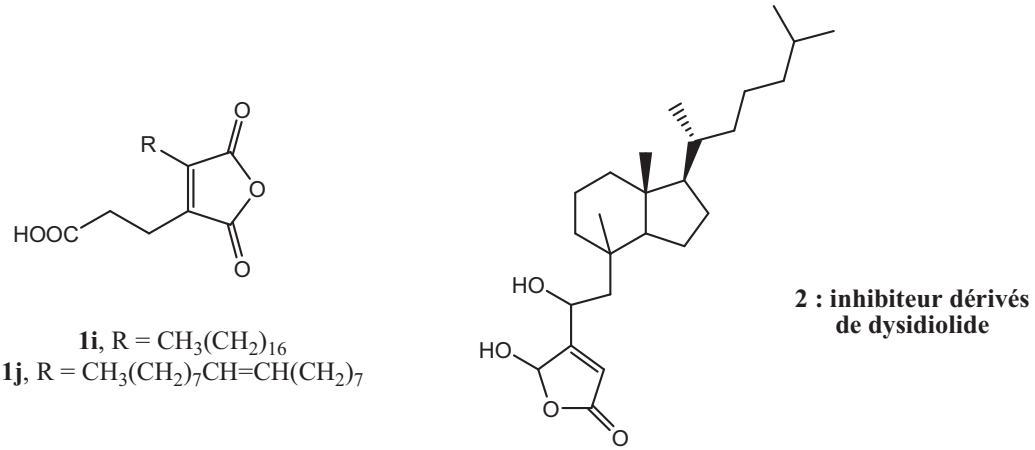


Figure 15 : Inhibiteurs de CDC25s mimant le groupe phosphate.

- Les inhibiteurs électrophiles : beaucoup de composés électrophiles peuvent être envisagés comme inhibiteurs capables de réagir avec la cystéine catalytique des CDC25s. Quelques exemples ont été reportés dans la littérature. Le composé fascaplysin (**Figure 16**), isolé d'un extrait d'éponge de *Thorectandra* sp. qui avait déjà montré des propriétés cytotoxique, antimicrobienne et antipaludique, est également reconnu comme étant le plus puissant inhibiteur de CDC25B de l'extrait (CI_{50} = 3,7 µM), et se lie au site catalytique de l'enzyme, probablement grâce à la cystéine catalytique[89].

Le composé BN82002 (**Figure 16**) est un inhibiteur des CDC25s identifiés par les équipes de Ducommun et Prévost en 2004. Cette amine tertiaire présente une IC_{50} de 2,4, 3,9 et 5,4 µM respectivement vis-à-vis de CDC25A, B2 et C[90]. BN82002 bloque la progression du cycle cellulaire de cellules HeLa aux phases G_1/S, S et G_2/M. N'étant pas réellement un composé électrophile, le

86 S. Bäurle, T. Blume, J. Günther, D. Henschel, R. C. Hillig, M. Husemann, A. Mengel, C. Parchmann, E. Schmid and W. Skuballa, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 1673-1677.

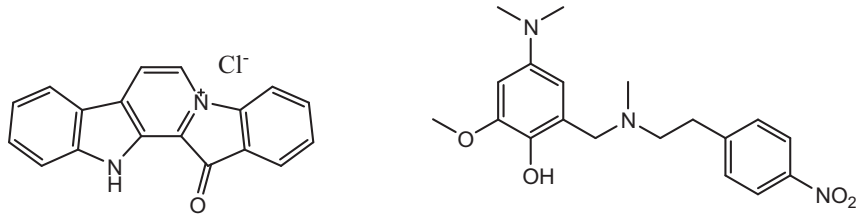
87 L. Brault, M. Denancé, E. Banaszak, S. El Maadidi, E. Battaglia, D. Bagrel and M. Samadi, Eur. J. Med. Chem. 42 (2007) 243-247.

88 L. Brault and D. Bagrel, Life Sci. 82 (2008) 315-323.

89 S. Cao, C. Foster, J. S. Lazo and D. G. I. Kingston, Bioorg. Med. Chem. 13 (2005) 5094-5098.

90 M. C. Brezak, M. Quaranta and O. Mondésert, Cancer Res. 64 (2004) 3320-3325.

BN82002 peut cependant éliminer son amine benzylique par protonation grâce au noyau phénolique, et peut ainsi conduire à un électrophile de type accepteur de Michael.



Fascaplysin **BN82002**

Figure 16 : Inhibiteurs électrophiles des CDC25s.

De nouvelles méthodes permettent le développement et l'identification de nouveaux inhibiteurs de CDC25s. Depuis que la structure 3D de ces protéines est connue[33], il est possible d'effectuer un criblage virtuel *in silico* de nombreuses bases de données de molécules candidates. Les molécules les plus intéressantes sont ensuite testées *in vitro* pour leur activité inhibitrice de l'enzyme.

Dans ce premier chapitre, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux chiffres concernant le développement du cancer dans le monde, et plus particulièrement en Europe. Nous avons également vu les différents moyens mis en œuvre pour tenter de diminuer le taux de mortalité dû à cette maladie, par le dépistage précoce et les traitements en cours de développement.

Puis nous avons également rappelé le principe du développement d'une cellule cancéreuse, du cycle cellulaire, nous amenant directement au rôle des protéines CDC25 dans le cycle cellulaire. L'observation de leur surexpression dans de nombreux cancers a mené les chercheurs à les considérer comme une cible de choix dans la recherche de substances anticancéreuses et la chasse aux inhibiteurs de CDC25s est maintenant en cours depuis plusieurs années.

L'une des alternatives pour la découverte de nouvelles drogues anticancéreuses, et plus particulièrement dans notre cas, de nouveaux inhibiteurs de CDC25s, est le criblage de molécules actives sur des cibles protéiques, appelé « criblage moléculaire ». Différentes stratégies de criblage ont été mises en œuvre :

- le criblage biologique, reposant sur des tests biologiques des molécules à tester sur des cellules ou des cibles protéiques ;

- le criblage virtuel (ou *in silico*) consistant à mettre en relation les données concernant une protéine cible et une banque de données grâce à une logiciel adapté ;
- le criblage par spectrométrie de masse, où différentes techniques de détection sont employées pour mettre en évidence une liaison entre une cible protéique et la molécule testée.

Dans le chapitre suivant, nous allons détailler ces différentes techniques de criblage. Nous verrons plus particulièrement en quoi consistent la spectrométrie de masse, les différentes techniques utilisées lors de cette étude ainsi qu'un bref aperçu du criblage par spectrométrie de masse et les applications qui en découlent.

Bibliographie :

[1] http://eu-cancer.iarc.fr. 31 juillet 2013.

[2] *La situation du cancer en France en 2011. Collection Rapports & synthèses, ouvrage collectif édité par l'INCa, Boulogne-Billancourt, octobre 2011*. 2011, Observation des cancers.

[3] A. L. Capriotti, C. Cavaliere, V. Colapicchioni, S. Piovesana, R. Samperi, A. Laganà, *Analytical strategies based on chromatography–mass spectrometry for the determination of estrogen-mimicking compounds in food*, J. Chrom. A 1313 (2013) 62-77.

[4] Y.-J. Surh, *Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances*, Mut. Res. 428 (1999) 305-327.

[5] M. B. Sporn, N. M. Dunlop, D. L. Newton, J. M. Smith, *Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids).* Fed Proc. 35 (1976) 1332-1338.

[6] P. Greenwald, G. Kelloff, C. Burch-Whitman, B. S. Kramer, *Chemoprevention*, A Cancer J. for Clinicians 45 (1995) 31-49.

[7] Y.-J. Surh, *Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals*, Nat. Rev. Cancer 3 (2003) 768-780.

[8] H. Yuan, S. Yao, Y. You, G. Xiao, Q. You, *Antioxidant Activity of Isothiocyanate Extracts from Broccoli*, Chinese J. Chem. Eng. 18 (2010) 312-321.

[9] C. S. Yang, H. Wang, *Mechanistic issues concerning cancer prevention by tea catechins*, Mol. Nutr. Food Res. 55 (2011) 819-831.

[10] N. Khan, F. Afaq, M. Saleem, N. Ahmad, H. Mukhtar, *Targeting Multiple Signaling Pathways by Green Tea Polyphenol (−)-Epigallocatechin-3-Gallate*, Cancer Res. 66 (2006) 2500-2505.

[11] H. Li, N. Xia, U. Förstermann, *Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol*, Nitric Oxide 26 (2012) 102-110.

[12] E. Viry, *Évaluation biologique de l'inhibition des phosphatases CDC25 dans des lignées d'adénocarcinomes mammaires humains*. Thèse de Doctorat, 2010, Université Paul Verlaine - Metz

[13] J. J. Simon, *Phytochemicals & cancer*, J. Chiropractic Med. 1 (2002) 91-96.

[14] G. L. Russo, *Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention*, Biochem. Pharmacol. 74 (2007) 533-544.

[15] B. Matharoo-Ball, G. Ball, R. Rees, *Clinical proteomics: Discovery of cancer biomarkers using mass spectrometry and bioinformatics approaches—A prostate cancer perspective*, Vaccine 25, Supplement 2 (2007) B110-B121.

[16] L. Konieczna, T. Bączek, M. Belka, A. Fel, M. Markuszewski, W. Struck, M. Markuszewski, R. Kaliszan, *Steroid profiles as potential biomarkers in patients with urogenital tract cancer for diagnostic investigations analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry*, J. Pharm. Biomed. Anal. 73 (2013) 108-115.

[17] A. I. Baba, C. Câtoi, Comparative Oncology, Chapitre 19 : Principles of anticancer therapy. 2007: The Publishing House of the Romanian Academy.

[18] N. Cornez, M. J. Piccart, *Cancer du sein et Herceptin®*, Bull. Cancer 87 (2000) 847-858.

[19] G. K. Schwartz, M. A. Shah, *Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy*, J. Clin. Onc. 23 (2005) 9408-9421.

[20] G. Deep, R. Agarwal, *New Combination Therapies with Cell Cycle Agents*, PMC 9 (2008) 591-604.

[21] T. Flaig, D. Gustafson, L.-J. Su, J. Zirrolli, F. Crighton, G. Harrison, A. S. Pierson, R. Agarwal, L. M. Glodé, *A phase I and pharmacokinetic study of silybin-phytosome in prostate cancer patients*, Invest. New Drugs 25 (2007) 139-146.

[22] K. Vermeulen, D. R. Van Bockstaele, Z. N. Berneman, *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*, Cell Prol. 36 (2003) 131-149.

[23] L. Meijer, *Le cycle de division cellulaire et sa régulation*, Bull. Cancer Hors série (2006) 41-53.

[24] H. Hochegger, S. Takeda, T. Hunt, *Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?*, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9 (2008) 910-916.

[25] J. Lukas, C. Lukas, J. Bartek, *Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time*, DNA Repair 3 (2004) 997-1007.

[26] B. Aressy, B. Ducommun, *Cell cycle control by the CDC25 phosphatases*, Anticancer Agents Med. Chem. 8 (2008) 818 - 824.

[27] P. A. Fantes, *Epistatic gene interactions in the control of division in fission yeast*, Nature 279 (1979) 428-430.

[28] P. Russell, P. Nurse, *cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast*, Cell 45 (1986) 145-153.

[29] I. Nilsson, I. Hoffmann, *Cell cycle regulation by the CDC25 phosphatase family*, Prog. Cell Cycle Res. 4 (2000) 107-114.

[30] R. Boutros, V. Lobjois, B. Ducommun, *CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets?*, Nat. Rev. Cancer 7 (2007) 495-507.

[31] E. B. Fauman, J. P. Cogswell, B. Lovejoy, W. J. Rocque, W. Holmes, V. G. Montana, H. Piwnica-Worms, M. J. Rink, M. A. Saper, *Crystal Structure of the Catalytic Domain of the Human Cell Cycle Control Phosphatase, Cdc25A*, Cell 93 (1998) 617-625.

[32] R. A. Reynolds, A. W. Yem, C. L. Wolfe, J. Deibel, R. Martin, C. G. Chidester, K. D. Watenpaugh, *Crystal structure of the catalytic subunit of Cdc25B required for G2/M phase transition of the cell cycle*, J. Mol. Bio. 293 (1999) 559-568.

[33] G. M. Arantes, *Flexibility and inhibitor binding in cdc25 phosphatases*, Proteins 78 (2010) 3017-3032.

[34] K. Kristjansdottir, J. Rudolph, *Cdc25 phosphatases and cancer*, Chem. Biol. 11 (2004) 1043-1051.

[35] G. M. Arantes, *The Catalytic Acid in the Dephosphorylation of the Cdk2-pTpY/CycA Protein Complex by Cdc25B Phosphatase*, J. Phys. Chem. B 112 (2008) 15244-15247.

[36] I. Blomberg, I. Hoffmann, *Ectopic Expression of Cdc25A Accelerates the G1/S Transition and Leads to Premature Activation of Cyclin E- and Cyclin A-Dependent Kinases*, Mol. Cell. Biol. 19 (1999) 6183-6194.

[37] O. Timofeev, O. Cizmecioglu, E. Hu, T. Orlik, I. Hoffmann, *Human Cdc25A phosphatase has a non-redundant function in G2 phase by activating Cyclin A-dependent kinases*, FEBS Letters 583 (2009) 841-847.

[38] N. Mailand, A. V. Podtelejnikov, A. Groth, M. Mann, J. Bartek, J. Lukas, *Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability*, EMBO J. 21 (2002) 5911 - 5920.

[39] B. G. Gabrielli, C. P. C. De Souza, I. D. Tonks, J. M. Clark, N. K. Hayward, K. A. Ellem, *Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells.*, J. Cell Sci. 109 (1996) 1081-1093.

[40] B. G. Gabrielli, J. M. Clark, A. K. McCormack, K. A. Ellem, *Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of Cdc25 regulates activity toward cyclin B1/Cdc2 but not cyclin A/Cdk2.*, J. Biol. Chem. 272 (1997) 28608-28614.

[41] A. Lindqvist, H. Källström, A. Lundgren, E. Barsoum, C. K. Rosenthal, *Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1–Cdk1 at the centrosome*, J. Cell Biol. 171 (2005) 35-45.

[42] P. A. Garner-Hamrick, C. Fisher, *Antisense phosphorothioate oligonucleotides specifically down-regulate cdc25B causing S-phase delay and persistent antiproliferative effects*, Int. J. Cancer 76 (1998) 720-728.

[43] P. Turowski, C. Franckhauser, M. C. Morris, P. Vaglio, A. Fernandez, N. J. C. Lamb, *Functional cdc25C Dual-Specificity Phosphatase Is Required for S-Phase Entry in Human Cells*, Mol. Biol. Cell 14 (2003) 2984-2998.

[44] M. O. Contour-Galcera, A. Sidhu, G. Prévost, D. Bigg, B. Ducommun, *What's new on CDC25 phosphatase inhibitors*, Pharmacol. Therapeut. 115 (2007) 1-12.

[45] C. Busch, O. Barton, E. Morgenstern, C. Götz, J. Günther, A. Noll, M. Montenarh, *The G2/M checkpoint phosphatase cdc25C is located within centrosomes*, Int. J. Biochem.Cell Biol. 39 (2007) 1707-1713.

[46] C. Franckhauser, D. Mamaeva, L. Heron-Milhavet, A. Fernandez, N. J. C. Lamb, *Distinct pools of cdc25C are phosphorylated on specific TP sites and differentially localized in human mitotic cells.* , PLoS One 5 (2010) 11798.

[47] S. Shreeram, W. K. Hee, D. V. Bulavin, *Cdc25A Serine 123 Phosphorylation Couples Centrosome Duplication with DNA Replication and Regulates Tumorigenesis.*, Mol. Cell Biol. 28 (2008) 7442-7450.

[48] O. Timofeev, O. Cizmecioglu, F. Settele, T. Kempf, I. Hoffmann, *Cdc25 Phosphatases Are Required for Timely Assembly of CDK1-Cyclin B at the G2/M Transition*, J. Biol. Chem. 285 (2010) 16978-16990.

[49] A. M. Ferguson, L. S. White, P. J. Donovan, H. Piwnica-Worms, *Normal Cell Cycle and Checkpoint Responses in Mice and Cells Lacking Cdc25B and Cdc25C Protein Phosphatases*, Mol. Cell. Biol. 25 (2005) 2853-2860.

[50] Z. Wang, C. Trope, V. Florenes, Z. Suo, J. Nesland, R. Holm, *Overexpression of CDC25B, CDC25C and phospho-CDC25C (Ser216) in vulvar squamous cell carcinomas are associated with malignant features and aggressive cancer phenotypes*, BMC Cancer 10 (2010) 233.

[51] R. Boutros, V. Lobjois, B. Ducommun, *CDC25 phosphatases in cancer cells: key players Good targets*, Nat. Rev. Cancer 7 (2007) 495-507.

[52] J. Guo, J. Kleeff, J. Li, J. Ding, J. Hammer, Y. Zhao, T. Giese, M. Korc, M. W. Buchler, H. Friess, *Expression and functional significance of CDC25B in human pancreatic ductal adenocarcinoma*, Oncogene 23 (2004) 71 - 81.

[53] J. MacKeigan, L. O. Murphy, J. Blenis, *Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance*, Nat. Cell Biol. 7 (2005) 591 - 600.

[54] T. Horiguchi, K. Nishi, S. Hakoda, S. Tanida, A. Nagata, H. Okayama, *Dnacin A1 and dnacin B1 are antitumor antibiotics that inhibit cdc25B phosphatase activity*, Biochem. Pharmacol. 48 (1994) 2139-2141.

[55] M. A. T. M. Van Vugt, A. Bràs, R. H. Medema, *Restarting the Cell Cycle When the Checkpoint Comes to a Halt*, Cancer Res. 65 (2005) 7037-7040.

[56] P. Bansal, J. S. Lazo, *Induction of Cdc25B regulates cell cycle resumption after genotoxic stress*, Cancer Res. 67 (2007) 3356 - 3363.

[57] M.-C. Brezak, P. G. Kasprzyk, M.-O. Galcera, O. Lavergne, G. P. Prevost, *CDC25 Inhibitors as Anticancer Agents Are Moving Forward*, Anti-Cancer Agents Med. Chem. 8 (2008) 857-862.

[58] A. Lavecchia, C. Di Giovanni, E. Novellino, *CDC25A and B Dual-Specificity Phosphatase Inhibitors: Potential Agents for Cancer Therapy*, Current Med. Chem. 16 (2009) 1831-1849.

[59] A. Lavecchia, C. Di Giovanni, E. Novellino, *Inhibitors of Cdc25 phosphatases as anticancer agents: a patent review*, Expert Opin. Ther. Pat. 20 (2010) 405-425.

[60] S. P. Gunasekera, P. J. McCarthy, M. Kelly-Borges, E. Lobkovsky, J. Clardy, *Dysidiolide: A Novel Protein Phosphatase Inhibitor from the Caribbean Sponge Dysidea etheria de Laubenfels*, J. Am. Chem. Soc. 118 (1996) 8759-8760.

[61] J. L. Blanchard, D. M. Epstein, M. D. Boisclair, J. Rudolph, K. Pal, *Dysidiolide and related γ-hydroxy butenolide compounds as inhibitors of the protein tyrosine phosphatase, CDC25*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9 (1999) 2537-2538.

[62] K. Dodo, M. Takahashi, Y. Yamada, Y. Sugimoto, Y. Hashimoto, R. Shirai, *Synthesis of a novel class of cdc25A inhibitors from vitamin D3*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 10 (2000) 615-617.

[63] H. Peng, W. Xie, D.-I. Kim, L. H. Zalkow, G. Powis, D. M. Otterness, R. T. Abraham, *Steroidal derived acids as inhibitors of human Cdc25A protein phosphatase*, Bioorg. Med. Chem. 8 (2000) 299-306.

[64] W. Wu, Y.-H. Fan, B. L. Kemp, G. Walsh, L. Mao, *Overexpression of cdc25A and cdc25B Is Frequent in Primary Non-Small Cell Lung Cancer but Is Not Associated with Overexpression of c-myc*, Cancer Res. 58 (1998) 4082-4085.

[65] R. E. Cebula, J. L. Blanchard, M. D. Boisclair, K. Pal, N. J. Bockovich, *Synthesis and phosphatase inhibitory activity of analogs of sulfircin*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 7 (1997) 2015-2020.

[66] S. Cao, C. Foster, M. Brisson, J. S. Lazo, D. G. I. Kingston, *Halenaquinone and xestoquinone derivatives, inhibitors of Cdc25B phosphatase from a Xestospongia sp*, Bioorg. Med. Chem. 13 (2005) 999-1003.

[67] S. Cao, B. T. Murphy, C. Foster, J. S. Lazo, D. G. I. Kingston, *Bioactivities of simplified adociaquinone B and naphthoquinone derivatives against Cdc25B, MKP-1, and MKP-3 phosphatases*, Bioorg. Med. Chem. 17 (2009) 2276-2281.

[68] A. Loukaci, I. Le Saout, M. Samadi, S. Leclerc, E. Damiens, L. Meijer, C. Debitus, M. Guyot, *Coscinosulfate, a CDC25 phosphatase inhibitor from the sponge Coscinoderma mathewsi*, Bioorg. Med. Chem. 9 (2001) 3049-3054.

[69] P. Wipf, B. Joo, T. Nguyen, J. S. Lazo, *Synthesis and biological evaluation of caulibugulones A-E*, Org. Biomol. Chem. 2 (2004) 2173-2174.

[70] M. Brisson, C. Foster, P. Wipf, B. Joo, R. J. Tomko, T. Nguyen, J. S. Lazo, *Independent Mechanistic Inhibition of Cdc25 Phosphatases by a Natural Product Caulibugulone*, Mol. Pharm. 71 (2007) 184-192.

[71] C. C. Juan, F. Y. H. Wu, *Vitamin K3 Inhibits Growth of Human Hepatoma HepG2 Cells by Decreasing Activities of Both p34cdc2 Kinase and Phosphatase*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 190 (1993) 907-913.

[72] S. W. Ham, H. J. Park, D. H. Lim, *Studies on Menadione as an Inhibitor of the cdc25 Phosphatase*, Bioorg. Chem. 25 (1997) 33-36.

[73] F. Y. H. Wu, T. P. Sun, *Vitamin K3 induces cell cycle arrest and cell death by inhibiting Cdc25 phosphatase*, Europ. J. Cancer 35 (1999) 1388-1393.

[74] S. Kar, I. M. Lefterov, M. Wang, J. S. Lazo, C. N. Scott, C. S. Wilcox, B. I. Carr, *Binding and Inhibition of Cdc25 Phosphatases by Vitamin K Analogues*, Biochem. 42 (2003) 10490-10497.

[75] S. Kar, M. Wang, S. W. Ham, B. I. Carr, *Fluorinated Cpd 5, a pure arylating K-vitamin derivative, inhibits human hepatoma cell growth by inhibiting Cdc25 and activating MAPK*, Biochem. Pharmacol. 72 (2006) 1217-1227.

[76] J. S. Lazo, D. C. Aslan, E. C. Southwick, K. A. Cooley, A. P. Ducruet, B. Joo, A. Vogt, P. Wipf, *Discovery and Biological Evaluation of a New Family of Potent Inhibitors of the Dual Specificity Protein Phosphatase Cdc25*, J. Med. Chem. 44 (2001) 4042-4049.

[77] L. Pu, A. Amoscato, M. Bier, J. Lazo, *Dual G1 and G2 Phase Inhibition by a Novel, Selective Cdc25 Inhibitor 7-chloro-6-(2-morpholin-4-ylethylamino)-quinoline-5,8-dione*, J. Biol. Chem. 277 (2002) 46877-46885.

[78] M. Brisson, T. Nguyen, P. Wipf, B. Joo, B. W. Day, J. S. Skoko, E. M. Schreiber, C. Foster, P. Bansal, J. S. Lazo, *Redox Regulation of Cdc25B by Cell-Active Quinolinediones*, Mol. Pharmacol. 68 (2005) 1810-1820.

[79] M. C. Brezak, M. Quaranta, M. O. Contour-Galcera, O. Lavergne, O. Mondesert, P. Auvray, P. G. Kasprzyk, G. P. Prevost, B. Ducommun, *Inhibition of human tumor cell growth in vivo by an orally bioavailable inhibitor of CDC25 phosphatases*, Mol. Cancer Ther. 4 (2005) 1378-1387.

[80] M. Cazales, R. Boutros, M.-C. Brezak, S. Chaumeron, G. Prevost, B. Ducommun, *Pharmacologic inhibition of CDC25 phosphatases impairs interphase microtubule dynamics and mitotic spindle assembly*, Mol. Cancer Ther. 6 (2007) 318-325.

[81] M. Brisson, T. Nguyen, A. Vogt, J. Yalowich, A. Giorgianni, D. Tobi, I. Bahar, C. R. J. Stephenson, P. Wipf, J. S. Lazo, *Discovery and Characterization of Novel Small Molecule Inhibitors of Human Cdc25B Dual Specificity Phosphatase*, Mol. Pharm. 66 (2004) 824-833.

[82] J. Sohn, B. Kiburz, Z. Li, L. Deng, A. Safi, M. C. Pirrung, J. Rudolph, *Inhibition of Cdc25 Phosphatases by Indolyldihydroxyquinones*, J. Med. Chem. 46 (2003) 2580-2588.

[83] W. G. Huang, Y. Y. Jiang, Q. Li, J. Li, J. Y. Li, W. Lu, J. C. Cai, *Synthesis and biological evaluation of (±)-cryptotanshinone and its simplified analogues as potent CDC25 inhibitors*, Tetrahedron 61 (2005) 1863-1870.

[84] M. C. Brezak, A. Valette, M. Quaranta, M. O. Contour-Galcera, D. Jullien, O. Lavergne, C. Frongia, D. Bigg, P. G. Kasprzyk, G. P. Prevost, B. Ducommun, *IRC-083864, a novel bis quinone inhibitor of CDC25 phosphatases active against human cancer cells*, Int. J. Cancer 124 (2009) 1449-1456.

[85] R. Shimazawa, T. Suzuki, K. Dodo, R. Shirai, *Design and synthesis of dysidiolide analogs from vitamin D3: novel class of Cdc25A inhibitors*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 3291-3294.

[86] S. Bäurle, T. Blume, J. Günther, D. Henschel, R. C. Hillig, M. Husemann, A. Mengel, C. Parchmann, E. Schmid, W. Skuballa, *Design and synthesis of macrocyclic inhibitors of phosphatase Cdc25B*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 1673-1677.

[87] L. Brault, M. Denancé, E. Banaszak, S. El Maadidi, E. Battaglia, D. Bagrel, M. Samadi, *Synthesis and biological evaluation of dialkylsubstituted maleic anhydrides as novel inhibitors of Cdc25 dual specificity phosphatases*, Eur. J. Med. Chem. 42 (2007) 243-247.

[88] L. Brault, D. Bagrel, *Activity of novel Cdc25 inhibitors and preliminary evaluation of their potentiation of chemotherapeutic drugs in human breast cancer cells*, Life Sci. 82 (2008) 315-323.

[89] S. Cao, C. Foster, J. S. Lazo, D. G. I. Kingston, *Sesterterpenoids and an alkaloid from a Thorectandra sp. as inhibitors of the phosphatase Cdc25B*, Bioorg. Med. Chem. 13 (2005) 5094-5098.

[90] M. C. Brezak, M. Quaranta, O. Mondésert, *A Novel Synthetic Inhibitor of CDC25 Phosphatases : BN82002*, Cancer Res. 64 (2004) 3320-3325.

CHAPITRE II

LE CRIBLAGE MOLECULAIRE

CHAPITRE II LE CRIBLAGE MOLECULAIRE 43

I. Le criblage 45

I.1. Généralités sur le criblage 45

I.1.1. Le procédé de génération de nouveaux médicaments 45

I.1.2. Le développement préclinique et le développement clinique 46

I.2. Les différentes techniques de criblage moléculaire 48

I.2.1. Le criblage biologique 48

I.2.2. Le criblage virtuel 49

I.2.3. Le criblage par spectrométrie de masse 50

II. La spectrométrie de masse 51

II.1. Techniques d'ionisation 52

II.1.1. Le processus MALDI 52

II.1.2. La technique d'ionisation electrospray 56

II.2. Les analyseurs d'ions 59

II.2.1. Analyseur et spectromètre à temps de vol 61

II.2.2. L'analyseur à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier 67

III. Le criblage moléculaire par spectrométrie de masse 72

III.1. Le criblage en phase gazeuse par ESI-MS 73

III.2. Le criblage en phase liquide couplée à l'ESI-MS 74

III.3. Le criblage en phase solide par MALDI-MS 76

III.4. Conclusion 79

I. Le criblage

I.1. Généralités sur le criblage

La découverte de nouvelles drogues médicamenteuses dépend d'un procédé long et couteux. Le temps compté entre l'identification d'un nouveau composé potentiellement actif sur une cible à son approbation et sa mise sur le marché varie entre 9 et 12 ans[1], sans oublier qu'un grand nombre de molécules sont rejetées au fur et à mesure des phases cliniques. Ce procédé peut être scindé en quatre étapes, allant de la découverte du « composé médicament » à sa production[2].

I.1.1. Le procédé de génération de nouveaux médicaments

Le procédé de développement de nouvelles substances thérapeutiques a été décrit comme particulièrement long et coûteux fait de multiples étapes[3,4]. La génération de têtes de séries (« leads ») requiert les connaissances de secteurs interdisciplinaires dont la pharmacologie, la biochimie, la chimie,… (**Figure 17**). La première de ces étapes consiste à identifier et valider une nouvelle cible biologique, communément une protéine fortement impliquée dans une maladie. Une fois cette cible déterminée, différentes techniques sont mises en œuvres afin d'étudier et d'identifier des molécules aux propriétés nouvelles et biologiquement actives. Le **criblage** désigne cet ensemble de tests et conduit à l'identification de touches (molécules candidates communément appelées « hits » en anglais). Elles sont issues du **criblage primaire** d'une collection de composés de synthèse (chimiothèque) ou de produits naturels (chimiothèque et extractothèque). Ces touches sont alors soumises à un **criblage secondaire** afin d'évaluer activité biologique, toxicité, métabolisme et biodisponibilité.

---

1 M. Dickson and J. P. Gagnon, Nat. Rev. Drug Discov. 3 (2004) 417-429.
2 P. Tammela, University of Helsinki (2004).
3 J. A. DiMasi, R. W. Hansen, H. G. Grabowski and L. Lasagna, J. Health Econom. 10 (1991) 107-142.
4 J. A. DiMasi, R. W. Hansen and H. G. Grabowski, J. Health Econ. 22 (2003) 151-185.

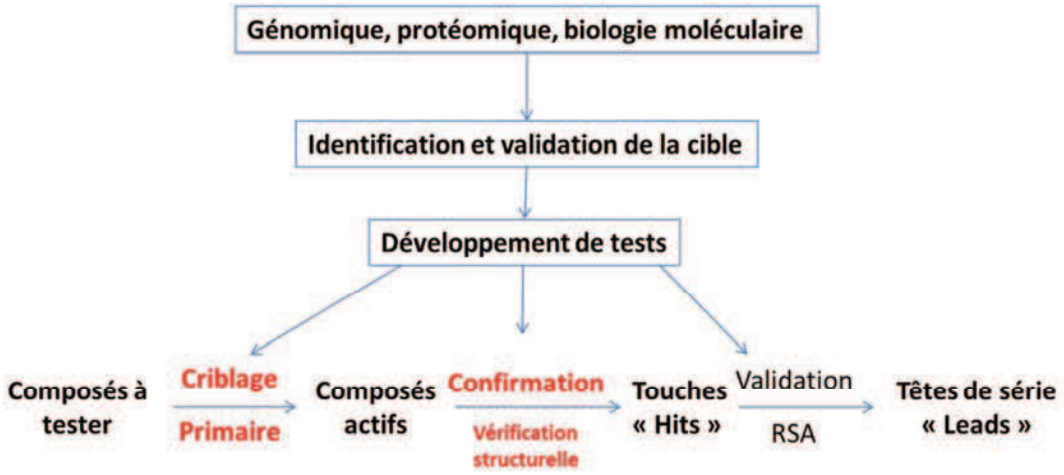


Figure 17 : Protocole de développement de nouvelles substances thérapeutiques (RSA = relations structures-activités)[5].

Les résultats obtenus lors du criblage secondaire sont soumis à une étape de validation lors de laquelle les relations structures-activités (RSA) sont étudiées, des études de pharmacomodulations sur les structures initiales sont souvent menées pour en améliorer les propriétés pharmacologiques et ensuite donner des têtes de séries, les futurs médicaments. L'ensemble de ces tests sera pris en compte pour la suite des analyses au stade du développement préclinique. L'évolution des techniques de criblage à haut débit (HTS = Hight Throughput Screening) a permis de diminuer le temps d'identification de nouvelles molécules de 15 mois en moyenne en 1996 à 6 mois actuellement[6]. Le criblage à haut débit est la méthode de référence, puisque des méthodes à moyen débit sont également développées. A titre d'exemple, en 2011 une étude menée par HTS a permis d'identifier un nouveau composé inhibiteur de la Glutathion *S*-Tranferase Omega 1 (GSTO1), une enzyme surexprimée dans des lignées cellulaires de cancers humains et impliquée dans la résistance chimiothérapeutique[7]. Après criblage d'une partie de la banque de molécules MLSMR (Molecular Libraries Small Molecule Repository), un nouvel agent KT53 est ressorti comme inhibiteur puissant et sélectif des GSTO1.

I.1.2. Le développement préclinique et le développement clinique

Le **développement préclinique** consiste à évaluer de manière plus approfondie le comportement pharmacologique et pharmacocinétique des touches, ainsi que leur toxicité dans des systèmes plus complexes, de la cellule à l'organisme tout entier. La molécule passe alors à une phase

---

5 P. A. Johnston and P. A. Johnston, Drug Discov. Today 7 (2002) 353-363.

6 G. Vistoli, A. Pedretti and B. Testa, Drug Discov. Today 13 (2008) 285-294.

7 K. Tsuboi, D. A. Bachovchin, A. E. Speers, T. P. Spicer, V. Fernandez-Vega, P. Hodder, H. Rosen and B. F. Cravatt, J. Am. Chem. Soc. 133 (2011) 16605-16616.

d'expérimentation chez l'animal. Ces données détermineront la composition du médicament ainsi que les doses optimales à utiliser lors du développement clinique. Lors de cette phase, les molécules sont également soumises à des modifications synthétiques et méthodologiques afin d'optimiser les caractéristiques du composé (activité, profil ADMET : absorption, distribution, métabolisme, élimination, toxicologie). Cette étape peut durer de 10 à 15 mois, bien qu'aujourd'hui des délais plus courts soient envisageables. Des études de stabilité à long terme (LTSS, Long-term Stability Studies) du médicament seront quoi qu'il en soit menées durant 6 mois[8] afin de détecter des éventuelles molécules dégradables.

Le **développement clinique** est une étape comprenant trois phases distinctes qui ont pour but une demande d'autorisation de mise sur le marché[9]. Chaque phase implique des études pharmacocinétique, de biodisponibilité et de sécurité. La **phase I** consiste à définir les profils pharmacocinétique du médicament chez plusieurs volontaires et de sécurité d'emploi du composé. La demi-vie du composé et son excrétion du corps humain sont quelques-unes des propriétés étudiées, puis si les données sont acceptables le composé passe en phase II du développement. La **phase II** est initiée dans le but d'établir l'efficacité, la gamme de dose à prescrire et les données de tolérance. Cette phase requiert 1 à 1 an et demi pour être complète et concerne quelques centaines de patients. Enfin lors de la **phase III** l'ensemble des données concernant l'efficacité et la sécurité d'emploi des médicaments sont validées. Ainsi un plus grand nombre de patients volontaires (milliers voire dizaine de milliers) sont utilisés pour étudier les effets du médicament : étude placebo, en double aveugle (ni le patient ni le clinicien ne savent si le traitement pris est un placebo ou le médicament en développement). Il s'agit souvent d'études comparatives entre le traitement de référence et le candidat médicament. Si le médicament montre une efficacité réelle (au minimum équivalent au traitement de référence), une demande d'autorisation de mise sur le marché est déposée, en même temps que se poursuivent les études relatives à sa fabrication[5]. Après sa mise sur le marché, la phase de pharmacovigilance consiste à enregistrer et évaluer les effets secondaires (en particulier les effets indésirables) résultant de l'utilisation des médicaments.

Deux approches de criblage existent : soit une approche globale qui consiste à appliquer les tests à des cellules entières, soit une approche orientée lors de laquelle les tests sont pratiqués directement sur les protéines cibles. Nous présenterons d'abord de manière succincte les différentes techniques de criblage moléculaire ciblé et nous nous focaliserons particulièrement sur le criblage moléculaire par spectrométrie de masse, technique qui sera utilisée lors de ce travail.

---

8 M. S. Lee and E. H. Kerns, Mass Spectrom. Rev. 18 (1999) 187-279.

9 www.leem.org,

I.2. Les différentes techniques de criblage moléculaire

I.2.1. Le criblage biologique

Le **criblage biologique** implique l'usage de cellules entières permettant de présenter la cible dans un contexte représentatif de la réalité. Ces tests permettent d'obtenir pour une molécule des données relatives à la cytotoxicité, à l'activité cellulaire ou encore à l'inhibition de la cible choisie[10]. Les informations ainsi obtenues sont donc plus en rapport avec l'activité biologique des composés testés mais il sera alors nécessaire de les compléter par des tests biochimiques sur les protéines. Les systèmes de cultures cellulaires, et particulièrement les lignées humaines, sont actuellement prépondérants dans la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques. Ces systèmes sont non seulement capables de mimer les états physio-pathologiques de nombreuses maladies, mais également de fournir des informations utiles sur le caractère prévisible des composés bioactifs *in vivo*, aussi bien que leurs possibles effets toxiques[11].

De nombreux exemples de criblages biologiques peuvent être trouvés dans la littérature. Dans le cadre du criblage de produits naturels, plusieurs extraits de plantes amazoniennes ont été testés pour leur activité biologique sur différentes pathologies (activité cardiovasculaire entre autres)[12], dont huit extraits ont montré des effets hypotensifs en engageant une diminution de la pression artérielle allant de 13 à 50%. Cependant ce type de tests nécessite d'avoir recours à des lignées cellulaires couteuses, délicates à manipuler et nécessitant souvent une transformation génétique de manière à exprimer la cible protéique dans des proportions supérieures[13]. Ces tests ne peuvent donc pas être réalisés sans équipements spécifiques onéreux permettant de mener à bien des cultures cellulaires. Peu de laboratoires, tels que les grands groupes de recherche (Sanofi, Servier, Novartis…) peuvent alors réellement être capables d'effectuer du criblage haut débit.

Par ailleurs, dans le cas de criblage de matrices complexes telles que des extraits végétaux, lorsque ces tests aboutissent à une touche, il devient nécessaire de la caractériser afin de l'identifier et de définir plus précisément son mode d'action. D'autres techniques et analyses sont alors requises jusqu'à ce que la molécule ait été identifiée, allongeant la durée d'aboutissement du criblage.

---

10 P. Kruchten, R. Werth, S. Marchais-Oberwinkler, M. Frotscher and R. W. Hartmann, Mol. Cell. Endocrin. 301 (2009) 154-157.

11 B. Wang, J. Deng, Y. Gao, L. Zhu, R. He and Y. Xu, Fitoterapia 82 (2011) 1141-1151.

12 G. Jiménez, M. Hasegawa, M. Rodríguez, O. Estrada, J. Méndez, A. Castillo, F. Gonzalez-Mujica, N. Motta, J. Vásquez and E. Romero-Vecchione, J. Ethnopharm. 77 (2001) 77-83.

13 D. Horiatis, Q. Wang and J. Pinski, Cancer Lett. 210 (2004) 119-124.

I.2.2. Le criblage virtuel

Le **criblage virtuel** correspond à tout procédé de recherche informatique dans des banques de données moléculaires permettant la sélection de molécules ayant une potentielle activité biologique. Le nombre grandissant de cibles génomiques d'intérêt thérapeutique et de macromolécules (protéines, acides nucléiques) pour lesquels une structure tridimensionnelle (3D) est disponible rendent les techniques de criblage virtuel de plus en plus attractives pour des projets d'identification de molécules bioactives[14,15].

Le criblage virtuel se décompose en trois étapes :

- la mise au point de la chimiothèque de départ. Celle-ci peut être soit une collection de criblage (molécules disponibles) soit une collection virtuelle (molécules à synthétiser) ;
- le criblage proprement dit, qui consiste à prédire à la fois la conformation active et l'orientation relative de chacune des molécules de la chimiothèque, par rapport à la cible d'intérêt ;
- la sélection d'une liste de touches virtuelles : après différents traitements permettant d'éliminer les « faux positifs », la sélection finale des molécules à évaluer passe par un examen individuel des interactions 3D de chaque hit virtuel avec le récepteur.

Deux approches de criblage virtuel sont possibles pour répondre au problème général de recherche de nouvelles molécules bioactives. (i) Le criblage virtuel par amarrage, plus connu sous le terme « docking », qui requiert la connaissance de la structure 3D de la protéine cible (obtenue grâce à des données cristallographiques et RMN). Cette technique classe par ordre de priorité les composés ayant une possibilité de se lier à la cible. On peut comparer cette approche de docking à un système de clé-serrure, dans lequel la serrure correspond à la protéine et la clé à la molécule cherchée. On peut alors soit utiliser la reconnaissance de forme, soit la dynamique moléculaire qui consiste à simuler par le calcul informatique l'évolution d'un système moléculaire au cours du temps. (ii) Le criblage virtuel qui repose sur la similarité où aucune information sur la protéine n'est nécessaire, mais les structures de plusieurs composés connus actifs sur la cible sont alors utilisées[15].

De nombreux exemples de criblages virtuels réussis ont été décrits dans la littérature. Dans le cas des CDC25s, cette approche est fréquemment utilisée puisque la structure cristalline du domaine catalytique des CDC25s est maintenant connue[16]. Des nouveaux inhibiteurs de la protéine CDC25A

---

14 W. P. Walters, M. T. Stahl and M. A. Murcko, Drug Discov. Today 3 (1998) 160-178.

15 T. Lengauer, C. Lemmen, M. Rarey and M. Zimmermann, Drug Discov. Today 9 (2004) 27-34.

16 G. M. Arantes, Proteins 78 (2010) 3017-3032.

ont ainsi été découverts en 2008 grâce au criblage virtuel[17]. En effet, à partir d'une chimiothèque comprenant 85 000 composés, 200 ont été sélectionnés comme hits, et parmi ceux-ci 182 composés commercialement disponibles ont été testés pour leur activité biologique. Cinq d'entre eux ont montré une inhibition de CDC25A avec une IC_{50} comprise entre 0,8 et 15 µM. Leur mode d'action est cependant incertain, des hypothèses de formation de liaisons hydrogènes ou d'interactions hydrophobes sont avancées mais aucune n'a pu être vraiment confirmée.

Bien que cette technique de criblage présente certains avantages (rapidité, très peu cher une fois l'équipement informatique installé), il est inévitable de passer ensuite à des tests sur le vivant afin d'avoir une information plus réaliste sur l'action d'un composé. Même si le criblage virtuel permet d'aboutir à des molécules candidates, la suite du travail (synthèse, évaluation biologique) reste une part importante tant en terme de temps qu'en coûts humain et matériel.

I.2.3. Le criblage par spectrométrie de masse

Le criblage par spectrométrie de masse constitue une bonne alternative aux méthodes informatiques. Il permet une approche rapide sur du matériel biologique avec un coût raisonnable. Longtemps inutilisable pour ce genre d'application, de nouvelles techniques de spectrométrie de masse (MS), apparues au début des années 1990, ont permis pour la première fois l'étude de complexes cible-ligand. Aborder ces problèmes par la spectrométrie de masse nécessite des techniques d'ionisation douces, comme le MALDI[18] ou l'ESI[19] (techniques décrites dans le paragraphe II), permettant l'analyse de molécules de grandes tailles (protéines, ADN, ARN,…) et capables de garder des complexes non covalents entiers. Ces techniques permettent l'analyse de complexes biologiques tels que protéine/protéine, protéine/ligand maintenus par des interactions faibles (interactions électrostatiques (π stacking), liaison hydrogène, interactions de type Van der Waals (ex : effet hydrophobe))[20,21]. Les premiers travaux relatifs à ces analyses ont montrés que les liaisons spécifiques de ces assemblages fragiles pouvaient subsister après une ionisation par électrospray[22], laissant la porte ouverte à la détection et caractérisation de complexes de protéines en interaction,

---

17 H. Park, Y. J. Bahn, S. K. Jung, D. G. Jeong, S. H. Lee, I. Seo, T. S. Yoon, S. J. Kim and S. E. Ryu, J. Med. Chem. 51 (2008) 5533-5541.

18 M. Moniatte, C. Lesieur, B. Vécsey-Semjén, J. T. Buckley, F. Pattus, F. G. van der Goot and A. Van Dorsselaer, Int. J. Mass Spectrom. Ion Process. 169–170 (1997) 179-199.

19 A. Van Dorsselaer, F. Bitsch, B. Green, S. Jarvis, P. Lepage, R. Bischoff, H. V. J. Kolbe and C. Roitsch, Biol. Mass Spectrom. 19 (1990) 692-704.

20 S. Sanglier, A. Van Dorsselaer, V. Vivat-Hannah and J.-P. Renaud, Spectra Analyse 245 (2005) 26-35.

21 H. Rogniaux, S. Sanglier, K. Strupat, S. d. Azza, O. Roitel, V. Ball, D. Tritsch, G. Branlant and A. Van Dorsselaer, Anal. Biochem. 291 (2001) 48-61.

22 B. Ganem, Y. T. Li and J. D. Henion, J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 6294-6296.

et même à la découverte de la fonction de certaines protéines par le biais d'études d'interactions protéine/ligand.

La spectrométrie de masse est alors devenue un outil de choix pour la validation de molécules issues d'un criblage à haut débit. Sur un nombre limité de composés (une centaine de molécules), la MS constitue une nouvelle technique complémentaire aux méthodologies classiquement utilisées à ce niveau (RMN, calorimétrie, fluorescence, etc.) pour déterminer : (i) l'existence d'une interaction entre la molécule testée et la protéine cible (détection de la protéine seule ou du complexe étudié) ; (ii) la spécificité d'interaction avec le site actif (nature covalente ou réversible de la liaison) ; (iii) les affinités relatives en solution des différents composés (nombre de molécules liées par site de liaison)[14].

Nous détaillerons plus précisément dans le paragraphe III de ce chapitre les différentes techniques de spectrométrie de masse utilisées pour le criblage moléculaire, et nous donnerons quelques exemples à titre d'illustration.

II. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet de déterminer précisément la masse moléculaire d'un composé grâce au rapport masse (m) sur charge (z) issu de son ionisation préalable. Cette technique permet également d'avoir des informations sur la présence d'impureté ainsi que sur certaines de ses propriétés (structure développée, stabilité…). Généralement, un spectromètre de masse est constitué de trois éléments, présentés **Figure 18** : le premier élément est la source d'ionisation dans laquelle l'échantillon est introduit. Après ionisation, les ions produits sont envoyés dans un analyseur où ils sont triés selon leur rapport *m/z* et peuvent éventuellement être fragmentés par la suite afin d'obtenir des ions de plus faibles masses. Ces ions sont enfin acheminés vers le détecteur qui amplifie le signal et mesure le courant électrique qu'ils génèrent. La mesure de ces signaux en fonction du balayage de rapports *m/z* conduit au spectre de masse.

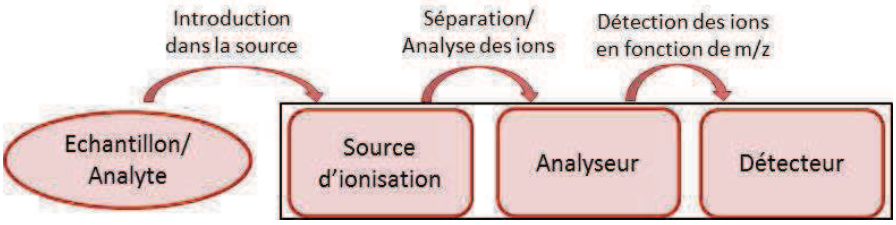


Figure 18 : Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse.

Nos études ont fait intervenir plusieurs techniques de spectrométrie de masse selon les besoins et les caractéristiques de l'échantillon. La suite de ce chapitre va donc être dédiée à la présentation des différents modes d'ionisation et d'analyse des ions utilisés.

II.1. Techniques d'ionisation

La spectrométrie de masse requiert la formation d'ions en phase gazeuse. Le succès d'une analyse passe donc par un choix adapté de la source et une bonne compréhension des mécanismes d'ionisation. Le choix de la source dépend entre autres choses de la nature de l'échantillon à analyser (minéral, organique), de son état physique (liquide, solide ou gazeux), de la polarité des analytes, *etc.* Cette partie n'a pas vocation à être exhaustive mais présentera seulement celles utilisées lors de ce travail. Les deux principaux modes d'ionisation employés sont la technique de désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et l'électronébulisation (ESI).

II.1.1. Le processus MALDI

La désorption/ionisation laser (LDI, Laser Desorption/Ionisation) consiste à désorber/ioniser l'analyte grâce à l'énergie apportée par des photons émis d'un laser, de longueur d'onde généralement comprise entre 180 et 450 nm. Le processus MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation) se différencie de la LDI par l'ajout d'une matrice mélangée à l'analyte (**Figure 19**). Cette matrice va absorber l'énergie apportée par le laser pour, entre autre, la retransmettre aux molécules à analyser sous forme d'hydrogènes labiles (protons).

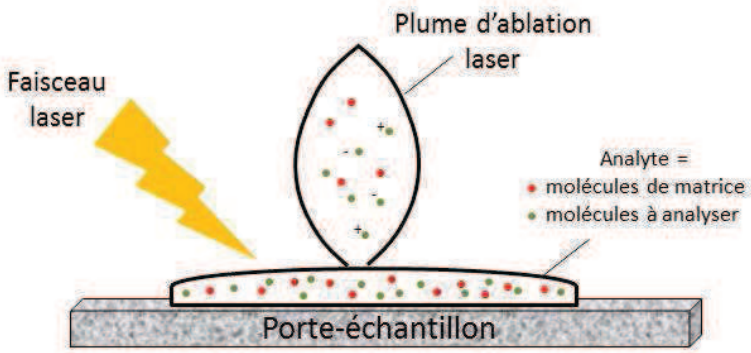


Figure 19 : Principe général du processus MALDI.

La matrice absorbe l'énergie apportée par le faisceau du laser incident et permet ainsi de minimiser la dégradation de l'échantillon (contrairement au LDI). Cet apport d'énergie provoque l'expansion de l'échantillon en phase gazeuse en entraînant les molécules de matrice et d'analyte. 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 20** ci-après.

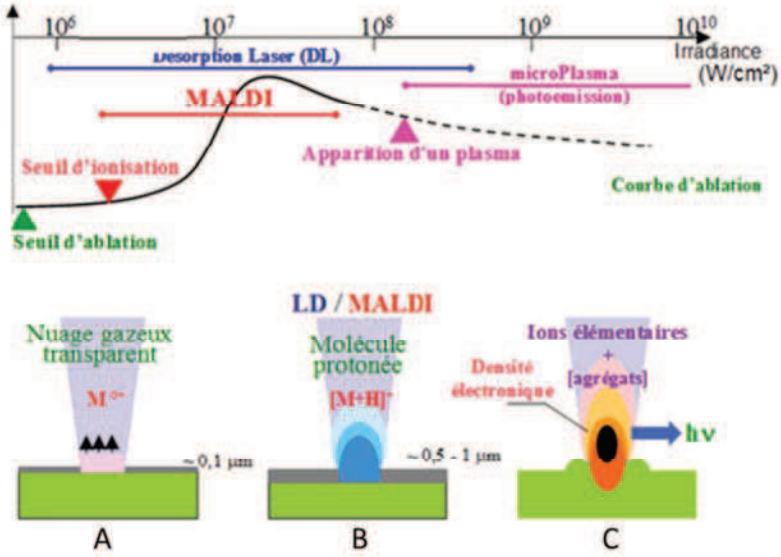


Figure 20 : Illustration de la courbe d'ablation et de la « fenêtre MALDI » en fonction de l'énergie du laser incident. (A) Ablation de l'échantillon sur 0,1 µm et production d'un nuage gazeux contenant des espèces $M^{\cdot+}$; (B) Fenêtre MALDI, ablation de l'échantillon de 0,5 à 1 µm, production d'ions principalement protonés $[M+H]^+$; (C) Forte ablation de l'échantillon, production d'ions élémentaires et d'agrégats[23].

Si l'on se place dans la gamme d'irradiance laser la plus favorable au processus MALDI ($5 \cdot 10^{-6}$ à $5 \cdot 10^{-7}$ W/cm²), l'échantillon étudié sera principalement ionisé par transfert de protons. Ce transfert de proton peut avoir lieu avant désorption dans la phase solide, soit après désorption par collision avec les molécules de matrice excitées ou d'autres molécules. On formera alors des ions mono chargés, $[M+H]^+$ en mode positif ou $[M-H]^-$ en mode négatif, voire multichargés (mais plus rarement) $[M+nH]^{n+}$ ou $[M-nH]^{n-}$. Même si l'ionisation par protonation est majoritairement recherchée, la présence d'adduits alcalins de type $[M+Na]^+$ n'est pas rare. Les protons des groupes acides carboxyliques ou phénoliques provenant de la matrice, du solvant ou de l'échantillon lui-même, ainsi que les protons non labiles de la matrice semblent être impliqués[24]. Le processus d'ionisation se fait en 4 étapes successives :

- la focalisation du faisceau laser sur la cible (tir + impact) ;
- la désorption du mélange [composé à analyser + matrice] qui consiste au transfert de l'état condensé du dépôt cristallisé à l'état gazeux ;
- l'expansion du nuage éjecté dans la source et ionisation des neutres ;

23 J. F. Muller, International Conference on Laser Probing (2002).

24 C. K. L. Wong, M. A. So and T. W. D. Chan, Eur. J. Mass Spectrom. 1 (1998) 223-228.

- l'extraction des ions par application d'un champ électrique vers l'analyseur.

En outre, la qualité du transfert de ces protons conditionne l'effet MALDI. Si le transfert de protons est très énergétique (différence d'affinités protoniques élevée entre la matrice et l'échantillon), l'excès énergétique apporté lors de la fixation d'un proton sur l'analyte va communiquer suffisamment d'énergie pour que sa fragmentation soit observée. A l'inverse, si le transfert de protons est beaucoup moins énergétique alors l'échantillon ne sera pas ionisé. De ce fait, il est donc important de bien choisir la matrice utilisée afin d'avoir un bon compromis entre l'affinité protonique de l'analyte et celle de la matrice. Les critères à prendre en compte lors du choix de la matrice sont les suivants :

- Minimiser la formation d'adduits et/ou fragments de faibles masses par le choix, soit de matrices conventionnelles de masses moléculaires faibles, soit de nouvelles matrices organiques[25] et inorganiques[26] permettant l'analyse de molécules de basses masses tout en limitant les ions dus à la matrice. Le développement de matrices greffées avec des nanoparticules d'or[27] ou plus récemment d'oxyde de fer[28] permettent de s'affranchir complètement des ions de matrices, tout en augmentant l'intensité des ions moléculaires d'analyte.
- Favoriser la séparation des molécules d'analyte en réduisant les forces intermoléculaires entre celles-ci. En entourant les molécules de l'échantillon, la matrice préserve l'échantillon (i) d'une dégradation photochimique lors des impulsions laser, tout en étant inerte chimiquement vis-à-vis du composé étudié ; (ii) d'une dégradation thermique grâce à des interactions spécifiques comme des liaisons hydrogènes.
- Etre compatible avec le milieu de solvatation de l'analyte, pour un bon transfert d'énergie et une co-cristallisation homogène.
- Absorber préférentiellement la longueur d'onde du laser d'ionisation. Elle constitue ainsi un centre de transfert d'énergie entre le rayonnement laser et le composé analysé. Elle favorise alors 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 co-désorption des molécules cibles.

Un nombre important de composés possède ces caractéristiques et il n'est pas envisageable d'utiliser une matrice universelle. Seuls des tests expérimentaux permettent de définir le choix d'une

---

25 F. O. Ayorinde, P. Hambright, T. N. Porter and Q. L. Keith, Rapid Comm. Mass Spectrom. 13 (1999) 2474-2479.

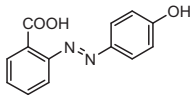
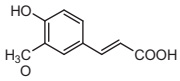
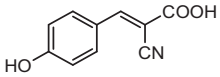
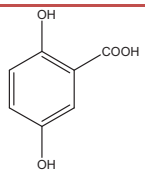
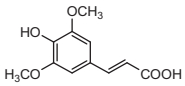
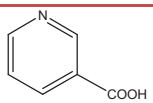
26 T. Kinumi, T. Saisu, M. Takayama and H. Niwa, J. Mass Spectrom. 35 (2000) 417-422.

27 Y.-F. Huang and H.-T. Chang, Anal. Chem. 78 (2006) 1485-1493.

28 M.-C. Tseng, R. Obena, Y.-W. Lu, P.-C. Lin, P.-Y. Lin, Y.-S. Yen, J.-T. Lin, L.-D. Huang, K.-L. Lu, L.-L. Lai, C.-C. Lin and Y.-J. Chen, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 21 (2010) 1930-1939.

matrice pour l'analyse de composés d'intérêts. Le **Tableau 2** regroupe les matrices les plus employées, ainsi que leur domaine d'application, structures et affinités protoniques[29,30].

Tableau 2 : Matrices MALDI couramment utilisées.

Abréviation	Nom(s)	Structure	Affinité protonique ($KJ.mol^{-1}$)	Longueur d'onde optimale (nm)	Applications
HABA	Acide 2-(4-hydroxyphenylazo)-benzoïque		857	337/355	Peptides, protéines, glycoprotéines, polymères synthétiques, glycolipides polyméthylés
FA	Acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique ou acide férulique		782	337	Protéines, peptides
α-CHCA	Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique		847	337	Peptides, protéines, lipides, oligonucléotides, PSD
2,5-DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque ou acide gentisique		853	337	Peptides, protéines, lipides, glycoprotéines, oligosaccharides
SA	Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique ou acide sinapinique		879	337	Peptides, protéines, glycoprotéines
NA	Acide 3-pyridinecarboxylique ou acide nicotinique		899	266	Oligonucléotides, glycopeptides

Après avoir choisi la matrice la plus adaptée à l'échantillon à analyser, il faut étudier le mode de dépôt qui permettra la meilleure ionisation possible des molécules. Ce paramètre est à étudier pour chaque analyte et aura un impact sur la qualité de l'empreinte spectrale[31,32]. Il existe trois modes de dépôt différents qui entraineront chacun une co-cristallisation matrice-échantillon différente. Les trois dépôts sont les suivants :

- La goutte sèche (dried droplet) ou mélange intime est le dépôt le plus employé. Dans ce cas, la matrice et l'échantillon sont mélangés ensemble, le plus fréquemment en volume égaux. Il

29 S. Mirza, N. Raju and M. Vairamani, J. Am0 Soc. Mass. Spec. 15 (2004) 431-435.

30 J. Vinh, Université Piere et Marie Curie (1999).

31 S. L. Cohen and B. T. Chait, Anal. Chem 68 (1996) 31-37.

32 M. Kussmann, E. Nordhoff, H. Rahbek-Nielsen, S. Haebel, M. Rossel-Larsen, L. Jakobsen, J. Gobom, E. Mirgorodskaya, A. Kroll-Kristensen, L. Palmll and P. Roepstorff, J. Mass Spectrom. 32 (1997) 593-601.

faut cependant s'assurer que les deux composés soient solubles dans les mêmes solvants afin d'éviter la migration de l'échantillon lors du séchage, ce qui entraînerait une hétérogénéité du dépôt. Ce dépôt peut également être réalisé en déposant dans un premier temps l'échantillon sur le porte-échantillon, puis déposer par-dessus le même volume de matrice et les mélanger par aspiration-refoulement à l'aide d'une micropipette.

- La couche mince (thin layer) se fait en deux étapes. Dans un premier temps l'échantillon (ou la matrice) est déposé(e) sur le porte-échantillon. Après séchage, on dépose inversement par-dessus la matrice ou l'échantillon. Ce mode de dépôt est utilisé lorsque la matrice et l'échantillon ne sont pas miscibles dans les mêmes solvants. L'ordre de dépôt peut néanmoins avoir une influence sur le spectre de l'analyte.
- La méthode « sandwich » consiste à déposer une première couche de matrice puis de laisser sécher. On dépose alors une couche d'échantillon puis à nouveau une couche de matrice après séchage.

Il faut donc également faire attention au choix du solvant de la matrice car celui-ci conditionne le dépôt mais aussi la cristallisation de l'échantillon.

Pour finir, il faut s'attacher à 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 généralement entre 1/100 et 1/1000. De plus, d'éventuels additifs peuvent être ajoutés à la solution de matrice en proportions relativement faibles. Ces additifs (ex : acide trifluoroacétique, acide formique pour l'analyse en mode positif) ont pour but de favoriser l'ionisation de l'analyte par l'apport de protons supplémentaires.

Les mécanismes d'ionisation de la technique MALDI étant dépendants de l'échantillon à analyser et n'étant encore à l'heure actuelle pas entièrement élucidés, seuls les tests expérimentaux permettent de déterminer la matrice, le mode de dépôt et le rapport analyte/matrice optimal pour un échantillon donné. Nous détaillerons les trois principes de dépôts MALDI dans le chapitre III lors du choix des matrices.

II.1.2. La technique d'ionisation électronébulisation

L'électronébulisation (ou electrospray, ESI) a été nécessaire dans certains cas lors du développement du test de criblage ou dans le cadre d'analyses complémentaires, notamment pour

l'analyse d'extraits végétaux. Le principe de fonctionnement de la source electrospray est décrit **Figure 21**[33].

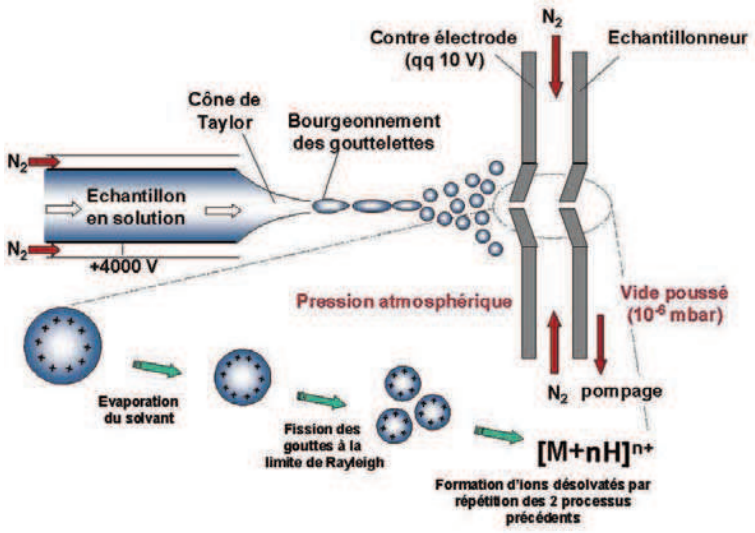


Figure 21 : Principe de la source d'ionisation ESI.

L'échantillon est acheminé en phase liquide vers la source d'ionisation par un capillaire d'infusion *via* un pousse-seringue à un débit inférieur à 10 µL/min. Le débit régulier du pousse-seringue permet une bonne introduction de la solution liquide. Le débit est un paramètre à ajuster en fonction de l'ionisation de l'extrait analysé. Le processus ESI peut être décomposé en 3 étapes : la formation de gouttelettes, l'explosion de ces gouttelettes en de plus petites, puis la formation d'ions en phase gazeuse.

Afin de produire des ions, un potentiel d'en général plusieurs kilovolts est appliqué au capillaire (électrode) entourant le capillaire d'infusion. Par ailleurs, l'accélération des ions vers le guide d'ions et l'analyseur est assurée par une différence de potentiel appliquée entre le cône d'extraction d'une contre-électrode et le cône d'échantillon d'une électrode dite échantillonneur. Cette différence de potentiel constitue un paramètre important dans la stabilité des composés. Trop faible, la transmission des ions vers l'analyseur n'est pas bien assurée ; trop forte, elle peut provoquer une fragmentation des ions dite dissociation « in source » par collision des molécules avec les gaz de l'atmosphère de la source. Néanmoins on peut utiliser ce processus d'activation par collision pour obtenir des informations structurales sans avoir recours à la spectrométrie de masse en tandem (MS^n).

A la sortie de l'électrode polarisée par le champ électrique (différence de potentiel appliquée entre le capillaire et la contre-électrode), le liquide s'enrichit en espèces chargées de même signe

[33] L. Tang and P. Kebarle, Anal. Chem. 65 (1993) 3654-3668.

que l'électrode (les espèces de charges opposées se déchargent à l'extrémité de l'électrode) et conduit à la formation d'une protubérance appelée cône de Taylor. Lorsque le champ électrostatique est suffisamment intense, les gouttelettes chargées s'échappent progressivement du cône de Taylor et se dirigent vers la contre-électrode. Un flux d'azote appliqué parallèlement à l'axe du capillaire d'infusion assiste généralement ce processus. Les gouttelettes chargées traversent alors simultanément un gradient de potentiel et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Le diamètre des gouttes est de l'ordre du micromètre. Celui-ci dépend du champ électrique, du débit de la solution et de la nature du solvant[34]. Au cours de la progression de l'aérosol, l'évaporation du solvant provoque une diminution de la taille des gouttelettes par explosions « *coulombiennes* » successives, c'est-à-dire par division spontanée de la gouttelette chargée en gouttelettes plus petites, lorsque le rapport charge/surface de la gouttelette devient trop élevé. Lorsque la taille de la gouttelette est trop faible, la densité de charge à sa surface devient telle que le champ électrique local, très intense, conduit à la désorption des ions par effet de champ (**Figure 22**).

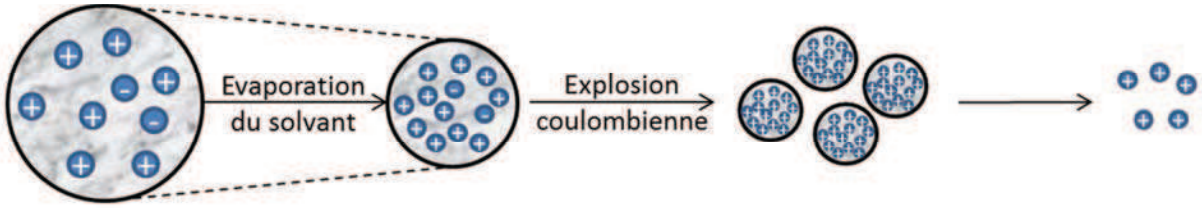


Figure 22 : Production d'ions en phase gazeuse suite à la répétition des deux premières étapes.

De plus, l'ensemble de cette source est chauffé et un flux de gaz (gaz rideau), en général de l'azote, est injecté dans l'intervalle entre les deux électrodes accélératrices, pour aider à l'évaporation du solvant et protéger l'analyseur des pollutions produites par les espèces neutres. L'un des avantages de l'ionisation par ESI réside en la production d'ions multichargés de type $[M+nH]^{n+}$ ou $[M-nH]^{n-}$. Il est donc possible d'analyser des espèces de hauts poids moléculaires dans une gamme d'analyse n'excédant pas 4000 Da. Ce mode d'ionisation très polyvalent permet donc d'analyser de nombreuses espèces, aussi bien des protéines que des molécules de plus petites masses. Il faut cependant respecter des critères bien définis lors du choix de cette source d'ionisation, notamment celui du solvant utilisé pour l'injection de l'échantillon dans la source qui doit impérativement être volatil. Des additifs peuvent également être ajoutés au solvant dans le but d'améliorer l'ionisation des molécules. Ceux-ci, fréquemment des acides donneurs de protons pour

[34] D. P. H. Smith, Ind. App. IA-22 (1986) 527-535.

le travail en mode positif et des bases accepteurs de protons pour le mode négatif, doivent également rester volatils.

II.2. Les analyseurs d'ions

Suite à leur formation dans la source d'ionisation (MALDI ou ESI), les ions sont acheminés vers un analyseur de masse (rapport *m/z*) de type «vrai » ou de type « filtre de masse ». Il existe une grande variété de détecteurs, la plupart basés sur l'utilisation d'un champ magnétique (secteurs magnétiques, résonance cyclotronique des ions) ou électrique (temps de vol (libre de champ dans la partie « temps de vol), pièges à ions, filtres de masse quadripolaires). Trois paramètres sont utiles pour caractériser la performance de ces détecteurs.

La résolution est la capacité d'un analyseur à séparer deux pics de rapport *m/z* voisins. D'un point de vue séparatif, la résolution est définie par le rapport R = m/Δm, où m est la masse d'un ion et Δm la différence minimale entre le pic considéré et son voisin le plus proche (**Figure 23**). La détermination de la résolution se fait en mesurant la largeur (exprimée en Thomson) à mi-hauteur (Full Width at Half Maximum, FWHM).

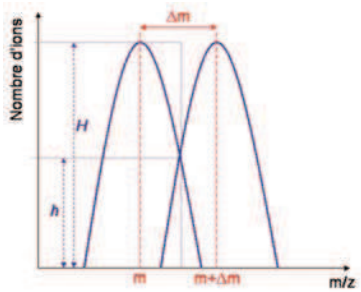


Figure 23 : Représentation graphique de la mesure de la résolution à 50% de vallée (= h/H).

Si R < 100 000, la résolution d'un spectromètre de masse à temps de vol est suffisante pour mesurer deux pics distincts. Si R > 100 000, seule la résolution d'un appareil à résonance cyclotronique des ions, d'un spectromètre à secteur ou d'un orbitrap permet l'identification d'un composé à partir de son pic moléculaire.

L'exactitude sur la mesure de masse (voir Eq. [1]) est appréciée par la différence entre la masse théorique (m_{th}) de l'ion et sa masse expérimentale (m_{exp}), rapportée à sa masse théorique. Cette erreur de mesure est exprimée en partie par million (ppm) et si elle est de l'ordre du ppm, voire plus faible, il est même possible de déterminer une seule composition élémentaire pour un ion donné, et ainsi obtenir sa formule brute.

$$\delta m = \frac{m_{exp} - m_{th}}{m_{th}} \times 10^6 \qquad \text{Eq. [1]}$$

La justesse de la mesure dépend non seulement de l'analyseur considéré mais aussi de sa bonne calibration. La calibration consiste à attribuer à un pic connu (identifié ou référence) sa masse exacte. La calibration est d'autant meilleure que les pics servant à l'établir sont nombreux et qu'ils encadrent au plus juste les masses à déterminer. Les pics utilisés pour calibrer les appareils sont bien souvent soit des pics de matrice (dans le cas du MALDI), soit des calibrants (étalons internes) dont les masses sont connues. Pour nos analyses MALDI, les pics de matrice utilisés (avec la 2,5-DHB) sont $[M+H]^+$ à *m/z* 255,03389, $[2M-2H_2O+H]^+$ à *m/z* 273,03936 et $[2M+H]^+$ à *m/z* 309,06049. D'autres molécules ont également été utilisées comme calibrants, comme la vinblastine ($[M+H]^+$ à *m/z* 811,42766), l'amiodarone ($[M+H]^+$ à *m/z* 646,03096) et le BN82002 ($[M+H]^+$ à *m/z* 360,19178).

La sensibilité du détecteur d'un spectromètre de masse est l'un des autres critères important de sa caractérisation. D'un point de vue utilisation, il faut différencier un temps de vol avec lequel tous les ions produits seront analysés, lui conférant une très bonne sensibilité en mode de travail « full scan » (analyse d'une large gamme de masse). D'un autre côté, un analyseur quadripolaire permet le filtrage des ions et donc une analyse en mode « SIM » (Selected Ion Monitoring), mode qui consiste à suivre un ion d'intérêt lors d'une analyse et de le quantifier. Le choix du détecteur dépend alors de la tâche à accomplir. On peut également citer la gamme de masse accessible, la précision sur la mesure des abondances isotopiques, le domaine de linéarité dynamique ainsi que la vitesse de balayage d'une certaine gamme de masse qui sont différents d'un appareil à l'autre. A tous ces critères de type plutôt analytique, il faut ajouter des critères techniques comme la comptabilité avec le mode d'ionisation, les dimensions de taille (encombrement), voire économique comme le prix d'achat et l'entretien de l'appareil. Tous ces paramètres sont à prendre en compte lors du choix d'un analyseur. La « facilité » de travail peut également influencer sur le choix d'un analyseur, puisqu'un analyseur à transformée de Fourier type « FTICR » (présenté au paragraphe II.2.2.) requiert une plus grande méthodologie qu'un analyseur à temps de vol (présenté au paragraphe II.2.1.).

Lors de nos travaux, nous avons travaillé avec trois analyseurs différents : le temps de vol, l'analyseur à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier et la trappe d'ions. Nous allons tout d'abord présenter le fonctionnement de ces deux premiers types d'analyseurs, puis nous présenterons les appareils sur lesquels nous avons travaillé. La trappe d'ions n'ayant pas été utilisée dans le cadre de la mise en place des tests de criblage, nous présenterons son principe dans le chapitre IV consacré à l'analyse des extraits de plantes.

II.2.1. Analyseur et spectromètre à temps de vol

En 1918, Dempster introduit l'usage d'une différence de potentiel à la sortie d'une source d'ions pour les accélérer et les discriminer en fonction de leur énergie cinétique[35]. Arrivent alors à la fin des années 1940 les premiers spectromètres de masse à temps de vol, appelés velocytrons[36]. Depuis les spectromètres de masse à temps de vol se sont considérablement développés, plus encore avec l'apparition des sources MALDI. Cette technique est actuellement l'une des plus employées pour l'analyse de composés bio-organiques.

- Principe de fonctionnement :

Un schéma de principe de fonctionnement est montré **Figure 24**.

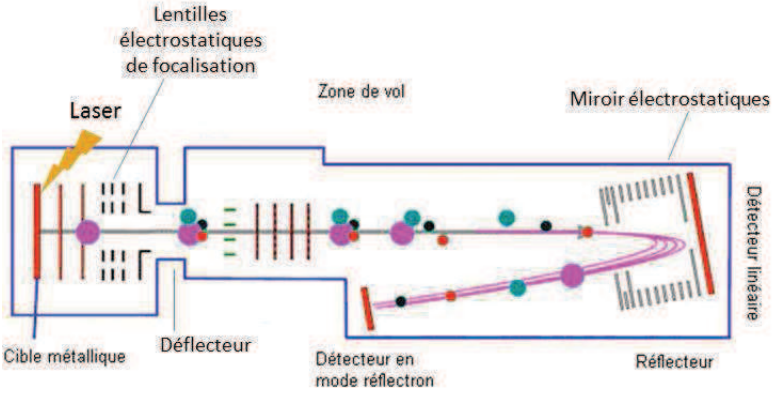


Figure 24 : Représentation schématique d'un analyseur à temps de vol.

Le spectromètre de masse à temps de vol (appelé couramment TOFMS pour Time of Flight Mass Spectrometry) est basé sur le temps de vol d'un ion de masse m et de charge z sur une distance L et sous un vide poussé de 10^{-5} Pa. Ces ions sont accélérés par une différence de potentiel V et acquièrent alors une énergie cinétique donnée par :

$$\mathrm{zeV} = \frac{1}{2}mv^2 \qquad \text{Eq. [2]}$$

Les ions possèdent une vitesse alors égale à :

$$v = \sqrt{\frac{2zeV}{m}} \qquad \text{Eq. [3]}$$

A cette vitesse, le temps mis par les ions pour parcourir une distance L du tube de temps de vol sera :

35 A. Dempster, Phys. Rev. 11 (1918) 316.
36 S. A. Goudsmit, Phys. Rev. 74 (1948) 622.

$$t = \mathrm{L}\sqrt{\frac{m}{2zeV}} = K\sqrt{\frac{m}{z}} \qquad \text{Eq. [4]}$$

Ainsi, après accélération, les ions parcourent la zone libre de champ en un « temps de vol » proportionnel à leur rapport *m/z*. Plus l'ion sera léger, plus sa vitesse sera grande et plus il sera détecté tôt.

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 :

$$\frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} \qquad \text{Eq. [5]}$$

En pratique, la résolution est essentiellement limitée par le fait que des ions de même rapport *m/z* peuvent ne pas atteindre le détecteur au même instant. Ce phénomène peut avoir trois origines :

- La durée d'impulsion de la source d'ions : si les ions sont produits durant un délai Δt trop important, le pic de masse correspondant sera évidemment élargi (**Figure 25**). Les ions formés par les derniers photons émis à la fin de l'impulsion laser atteindront le détecteur avec un retard équivalent à Δt par rapport à ceux formés au début de l'impulsion.

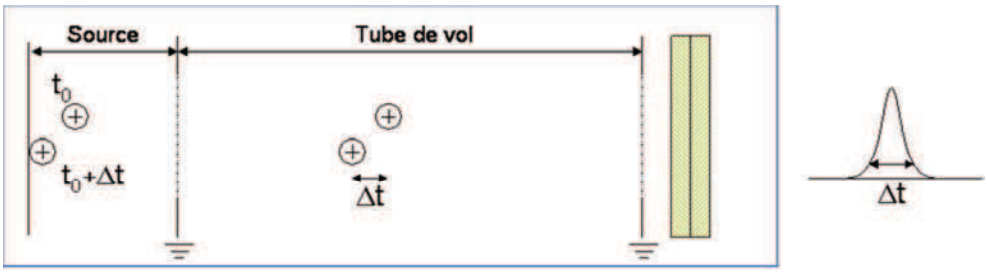


Figure 25 : Influence de la durée d'impulsion laser sur l'élargissement des pics.

Pour remédier à cette difficulté, des impulsions d'ionisation de très courte durée sont utilisées (impulsion laser de l'ordre de la nano-, pico-, ou femto seconde). Dans notre cas, le laser utilisé est un laser à azote de longueur d'onde 337 nm, avec un temps de pulse de 4 ns et de fréquence de tir 5 Hz.

- L'épaisseur de la zone où s'effectue l'ionisation : la distribution spatiale des ions au moment de leur formation se traduit par une dispersion en énergie cinétique puisqu'ils ne subissent pas les effets de la tension d'accélération sur la même distance.

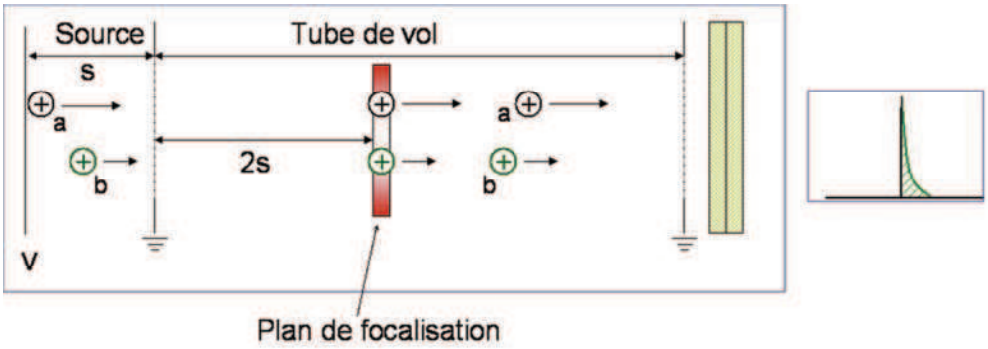


Figure 26 : Influence de la distribution spatiale sur l'élargissement des pics.

La **Figure 26** illustre cette situation pour deux ions *a* et *b* de même masse et formés au même instant mais en des points différents de la source. L'ion *a* subit le champ d'accélération sur une distance correspondant à la distance totale *s* parcourue dans la source. L'ion *b* est accéléré seulement sur une distance *s*/2. Il possède une énergie cinétique plus faible que l'ion *a* puisqu'il est formé plus près de la grille de sortie de la région d'accélération. Il arrivera donc plus tard sur le détecteur. Il existe un point sur le trajet de vol des ions où l'ion *b* va rattraper son retard sur l'ion *a*. Les ions sont alors dans le même plan appelé « plan de focalisation ». En jouant sur les paramètres d'extraction des ions, on pourra déplacer ce plan pour améliorer la résolution spectrale en plaçant ce plan de focalisation au niveau du détecteur. Pour minimiser la perte de résolution due à cet effet dans le cas d'une analyse MALDI, il convient de s'assurer d'une bonne homogénéité des dépôts analysés.

- La distribution initiale en énergie cinétique : lorsque les ions sont formés en phase gazeuse ou par désorption, ils possèdent une distribution en énergie cinétique qui s'ajoutera à l'énergie cinétique communiquée par le potentiel d'accélération. Comme les directions initiales des vecteurs vitesses sont aléatoires, cela se traduit, après accélération, par une distribution en énergie cinétique autour d'une valeur moyenne et, par conséquent, par un élargissement du pic correspondant (**Figure 27**) :

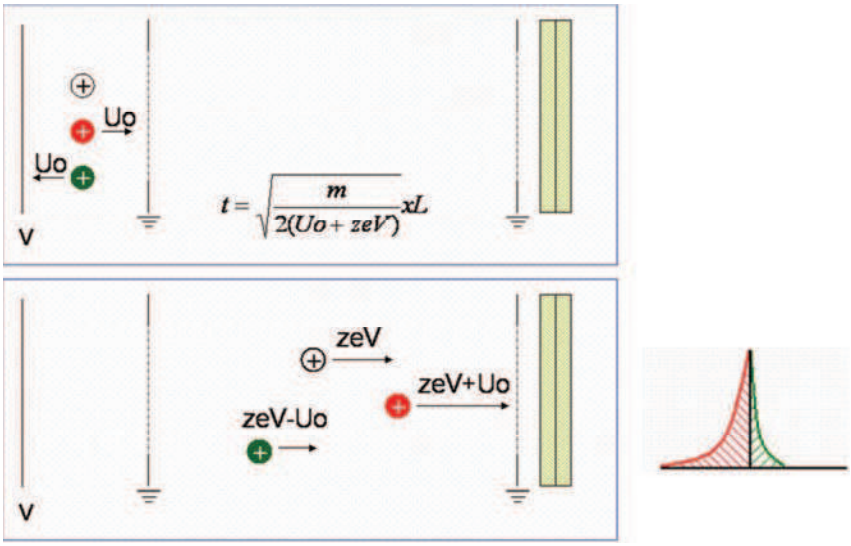


Figure 27 : Influence de la dispersion d'énergie cinétique sur la perte de résolution.

Le spectromètre de masse à temps de vol Bruker Reflex VI sur lequel nous avons mené nos études possède deux techniques pouvant limiter les effets de dispersion en énergie, et donc la perte de résolution. Ces techniques sont décrites ci-dessous :

- L'extraction retardée (Delayed Extraction DE ou Pulsed Ion Extraction PIE dans le cas de notre appareil)[37] : cette technique permet de compenser le retard initial des ions de même rapport *m/z* produit par désorption/ionisation laser, afin que tous ces ions de même *m/z* arrivent en même temps sur le détecteur. Pour ce faire, un délai est introduit entre l'ionisation et l'extraction des ions, comme le montre la **Figure 28**.

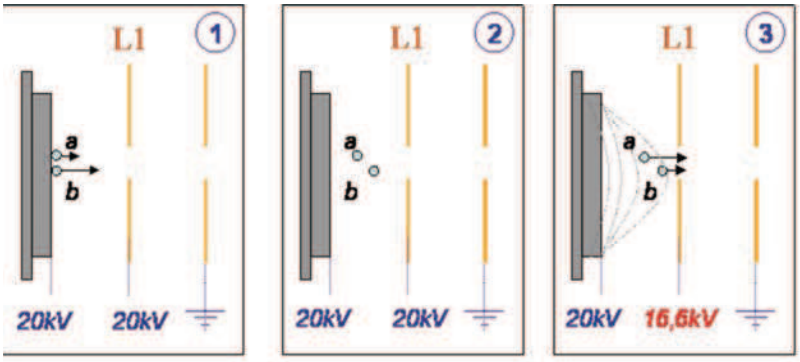


Figure 28 : Principe de l'extraction retardée (PIE). ① Impulsion laser à t = t_0. ② Temps de retard à l'extraction τ. ③ Accélération des ions à t = t_0+ τ.

Lors de l'impact laser, les ions formés *a* et *b* de même *m/z* ont des vitesses initiales variables (**Figure 28**①). Pendant un temps très court de quelques nanosecondes, ces ions évoluent vers la première lentille L1 qui est au même potentiel que la cible (**Figure 28**②). Au bout d'un temps τ le

[37] M. L. Vestal, P. Juhasz and S. A. Martin, Rapid Comm. Mass Spectrom. 9 (1995) 1044-1050.

potentiel de cette lentille L1 est diminué (**Figure 28**③) et les ions sont alors accélérés. L'ion *a* plus lent sera alors soumis à un champ électrique plus intense que l'ion *b* et rattrapera ainsi le retard qu'il aurait eu sans l'extraction retardée. Des distributions plus étroites de temps d'arrivée des ions de même *m/z* au détecteur sont ainsi obtenues, ce qui se traduit par une meilleure résolution que celle obtenue sans extraction retardée. Selon la masse des ions à analyser, différentes valeurs de délais d'extraction peuvent être appliquées. Deux paramètres sont à optimiser : le délai τ et la tension d'extraction intermédiaire de la lentille L1. Le rôle de ces deux paramètres sera précisé plus loin dans le paragraphe.

- Le réflecteur électrostatique est la deuxième technique permettant de compenser les effets de distribution d'énergie cinétique des ions. Ce réflecteur, ou « miroir » électrostatique (reflectron en anglais) est placé avant la sortie du tube de vol. Ce dispositif est constitué d'un ensemble d'électrodes annulaires portées à des potentiels croissants et qui définissent un champ électrique qui s'oppose à la pénétration des ions et les renvoie vers un second détecteur (**Figure 29**).

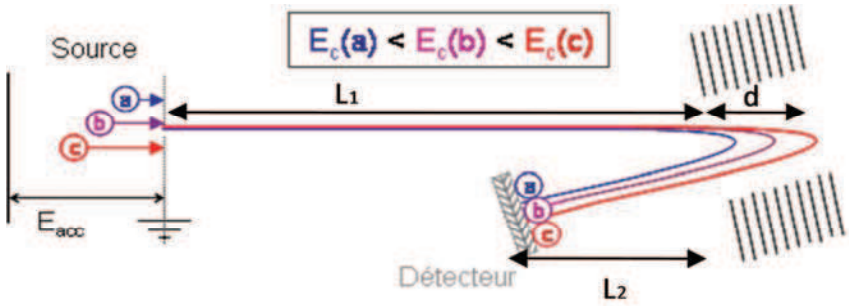


Figure 29 : Principe de la refocalisation des énergies cinétiques en mode reflectron.

Les ions de plus forte énergie cinétique pénètrent plus profondément dans le miroir et par conséquent parcourent un trajet plus long que les ions de moindre énergie cinétique. On observe alors une focalisation de l'ensemble des ions de même *m/z*. En ajustant correctement la tension du reflectron, il est possible de conduire simultanément sur le détecteur tous les ions d'une même masse. Le temps de vol total de l'ion détecté en mode reflectron est alors :

$$t = (L_1 + L_2 + 4\mathrm{d})\sqrt{\frac{m}{2zeV}} \qquad \text{Eq. [6]}$$

Avec L_1, L_2 et d qui désignent respectivement les longueurs représentées sur la **Figure 30**.

La plupart des spectromètres de masse à temps de vol actuels sont équipés d'un reflectron à 1 ou 2 étages, dont les principes sont représentés à la **Figure 30**. Un appareil à 2 étages, comme celui équipant notre spectromètre Bruker Reflex IV, présente un premier étage où règne un plus fort gradient de champ électrique par rapport aux étages suivants. Ceci permet d'améliorer la résolution

et de réduire la taille de l'instrument. Ce dispositif est plus compact et plus efficace que la configuration à un étage, au prix d'une transmission légèrement plus faible.

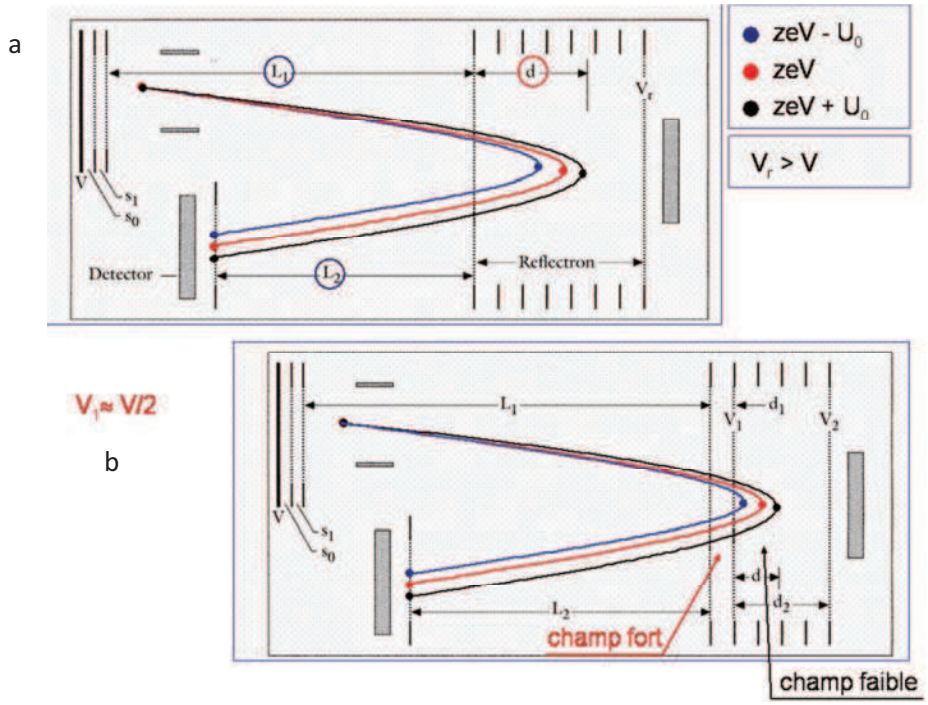


Figure 30 : Principe du reflectron à 1 étage (a) ou 2 étages (b).

En pratique les ions sont détectés par mesure du temps entre le tir laser et leur arrivée sur le détecteur soit en mode linéaire (*m/z* > 3000 Da), soit en mode reflectron (*m/z* < 3000 Da). L'impact de chaque ion sur le détecteur (une galette multicanaux) provoquera une cascade d'électrons qui sera amplifiée pour constituer le signal de l'ion correspondant sur le spectre de masse. Il est possible de modifier la tension des détecteurs (linéaire et reflectron), de manière à augmenter leur sensibilité.

- Description de notre appareil Bruker Reflex IV :

Le spectromètre de masse MALDI-TOFMS Bruker Reflex IV (Bruker-Daltonic, Brème, Allemagne) utilisé au cours de ces travaux est équipé d'une source SCOUT 284, utilisant un laser à azote pulsé à 337 nm (modèle VSD-337ND, Laser Science Inc., Boston, MA) avec une énergie de sortie de 400 µJ/pulse et une irradiance de 2 à $5 \cdot 10^{7}$ W.cm^{-2}. Une photo et un schéma technique sont présentés sur la **Figure 31**.

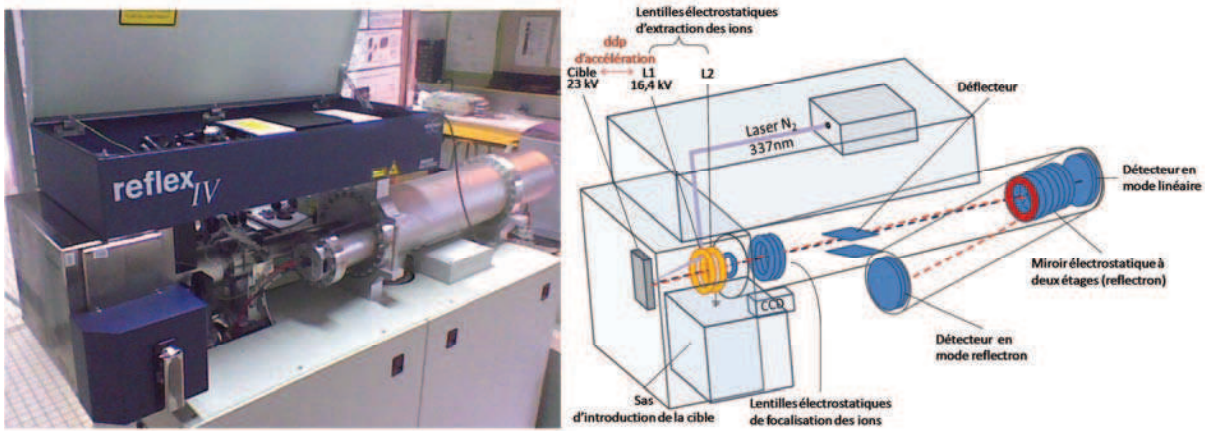


Figure 31 : (a) photo ; (b) schéma du spectromètre de masse MALDI-TOF Bruker Reflex IV.

Les analyses en basses masses (< 3000 Da) ont été réalisées en mode de détection reflectron alors que les analyses en hautes masses ont été réalisées en mode linéaire. Pour le mode reflectron, les ions (positifs ou négatifs) ont été accélérés sous des conditions d'extraction retardée de 200 ns avec une tension de reflectron de ±23 kV. 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. Les spectres ont été retraités sur le programme Flex Analysis (Bruker-Daltonics, Brème, Allemagne).

II.2.2. L'analyseur à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier

L'analyseur à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier assure la mesure précise de la fréquence de giration des ions dans un champ magnétique intense produit par un aimant solénoïde supraconducteur. Cet analyseur permet de détecter des ions avec une précision sur la mesure en masse très importante de l'ordre du ppm (souvent même inférieure à 1 ppm) et une résolution très importante (pouvant aller jusqu'à 1 000 000 à une masse donnée). Sa compatibilité avec de nombreux modes de fragmentation en font un appareil polyvalent permettant l'accès à des expériences MS/MS variées.

- Principe de l'analyseur FTICR :

L'origine de l'analyseur FTICR date de 1929 lorsque Lawrence découvre le principe du cyclotron[38]. Des dates clés comme en 1949[39] et 1974[40] font avancer les travaux sur cette technique et c'est en 1983 que le premier instrument doté d'un aimant supraconducteur est commercialisé. Dans

38 E. O. Lawrence, Nobel Lecture (1951).
39 H. A. Thomas, R. L. Driscoll and J. A. Hipple, Phys. Rev. 75 (1949) 902-903.
40 M. B. Comisarow and A. G. Marshall, Chem. Phys. Lett. 25 (1974) 282-283.

notre cas, nous avons travaillé avec un appareil FTICR doté d'un aimant de 9,4 T (Explorer FTMS, Ion Spec-Varian).

Le cœur de l'analyse se situe au niveau de la cellule de spectrométrie de masse à transformée de Fourier (FTMS). Cette cellule est placée au centre d'un champ magnétique intense produit par un aimant supraconducteur et a pour rôle de piéger efficacement les ions afin de les détecter avec un fort pouvoir de résolution. Afin de décrire le fonctionnement de l'analyse par FTICR, considérons une particule chargée (un ion) de masse *m* et de charge *z*, animée d'une vitesse $\vec{v}$ perpendiculaire à un champ magnétique $\vec{B}$ uniforme (**Figure 32**). Cette particule subit une Force de Lorentz $\overrightarrow{F_1}$ et une force centrifuge $\overrightarrow{F_2}$:

$$\overrightarrow{F_1} = z\vec{v} \wedge \vec{B} \qquad \text{Eq. [7]}$$

$$\overrightarrow{F_2} = \frac{m\vec{v}^2}{r} \qquad \text{Eq. [8]}$$

Ces deux forces agissent simultanément et en sens opposé. Elles conduisent à l'établissement d'un mouvement stable si leur module est égal.

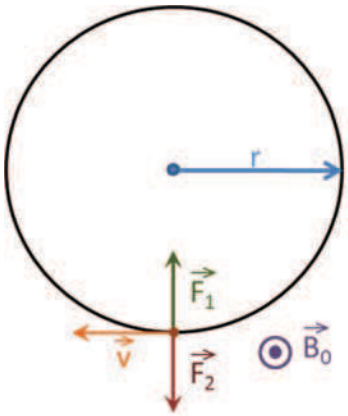


Figure 32 : Mouvement cyclotronique d'une particule chargée.

Le **piégeage** des ions se fait donc grâce au champ magnétique B_0 qui assure le confinement des ions dans le plan perpendiculaire au champ. Pour les piéger dans la dernière direction, un puits de potentiel est créé par application d'un potentiel sur une première paire de plaques appelées plaques de piégeage (**Figure 33**). Le signe du potentiel appliqué sur les plaques de piégeage est adapté à la polarité des ions analysés, généralement de +/- 15 V.

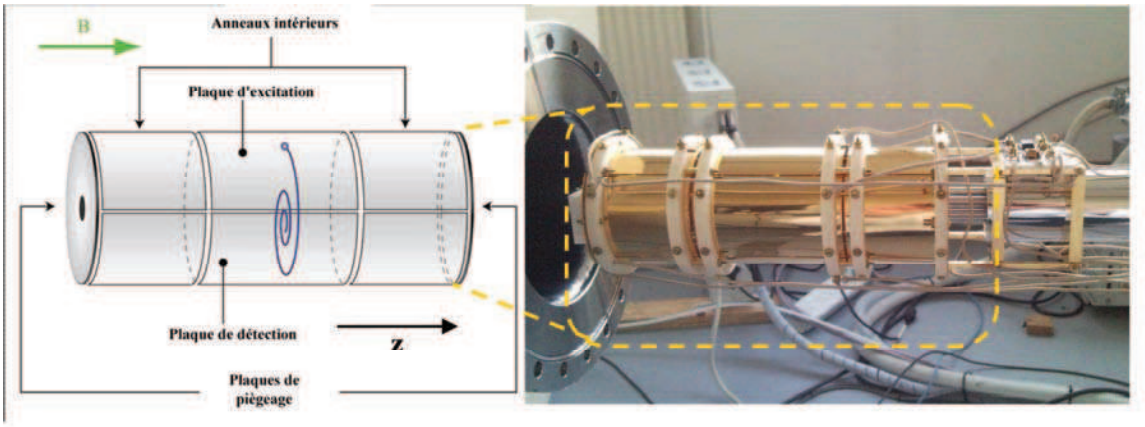


Figure 33 : Cellule cylindrique d'analyse FTICR, schéma et photographie.

Sous l'action du champ magnétique, chaque ion piégé acquiert un mouvement cyclotronique de rayon perpendiculaire à l'axe du champ, et dont la fréquence de rotation v est inversement proportionnelle à son rapport *m/z* :

$$v = \frac{B_0 e}{2\pi} x \frac{1}{m/z} \qquad \text{Eq. [9]}$$

Chaque ion piégé de cette manière se déplace selon sa propre fréquence cyclotronique. La **Figure 34** représente le principe général de la mesure par FTICRMS. La mesure de la fréquence cyclotronique n'est pas possible initialement car les ions introduits à des temps différents et avec de surcroit une dispersion en énergie cinétique ne sont pas en phase (position initiale sur l'orbite). Le rayon de leur trajectoire est faible et non-uniforme pour un même type d'ions. Il est donc nécessaire de mettre en cohérence le mouvement de la population d'ions de même rapport *m/z* en utilisant une procédure d'excitation.

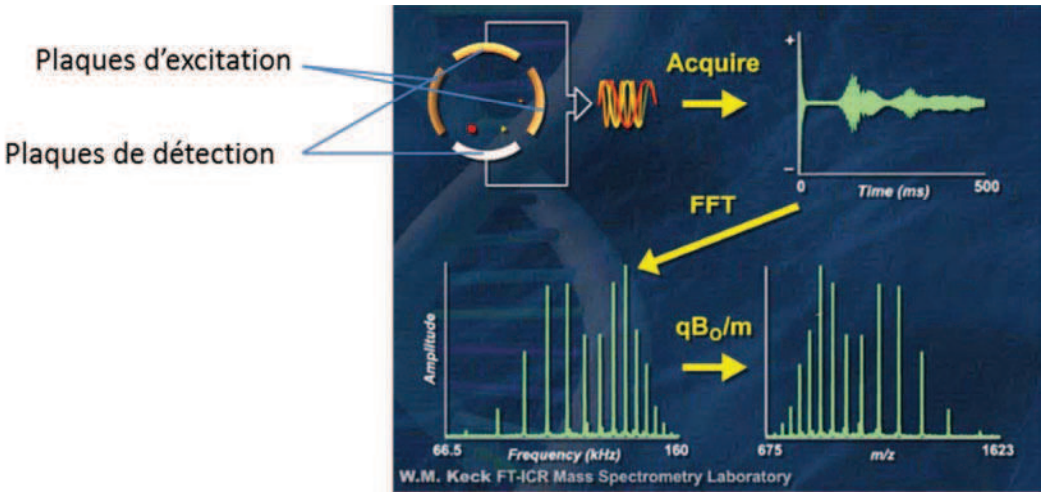


Figure 34 : Principe de l'analyse FTICR. *q représente la charge d'un ion, soit q=ze.*

La phase d'**excitation** utilise deux plaques opposées dites plaques d'excitation (**Figure 34**). Une radiofréquence est appliquée sur ces plaques permettant par un phénomène de résonance un transfert d'énergie aux différentes populations d'ions présentes dans la cellule. Le rayon de leur giration augmente jusqu'à être porté au voisinage des plaques de détection. Cette étape a aussi pour effet d'augmenter la cohérence des ions possédant le même rapport *m/z*. Le rayon de l'orbite ne dépend que de la tension et de la durée d'excitation, deux paramètres important à régler pour l'acquisition du spectre de masse.

Après excitation, les ions animés d'un mouvement circulaire cohérent peuvent être détectés. Cette phase de **détection** consiste à mesurer le courant induit par les ions sur les plaques de détection (**Figure 34**). L'intensité de ce courant alternatif (courant image) est proportionnelle à la quantité d'ions qui le produit et sa fréquence correspond à leur fréquence cyclotronique et donc à leur rapport *m/z*. Dans la pratique, le courant alternatif détecté est converti en tension alternative grâce à une électronique adaptée. La superposition des signaux associés à des ions de rapport *m/z* différents conduit à l'observation d'un signal appelé interférogramme (transient en anglais) où les sinusoïdes amorties de l'ensemble des ions présents dans la cellule se superposent et se combinent. La transformée de Fourier de cet interférogramme (FFT pour Fast Fourier Transform) amène au spectre des fréquences cyclotroniques des ions correspondant, converti ensuite en spectre de masse.

La résolution d'un analyseur à résonance cyclotronique des ions est liée au champ magnétique B_0 et au rapport *m/z* selon l'équation :

$$R = \frac{\mathrm{m}}{\Delta m} = \frac{KeB_0}{2m/z} \qquad \text{Eq. [10]}$$

où K est une constante d'amortissement du signal, inversement proportionnelle à la pression résiduelle dans l'analyseur et Δm est la largeur du pic de masse à mi-hauteur. Un pouvoir de résolution intense est donc obtenu avec un champ magnétique intense et une faible pression (entre 10^{-6} et 10^{-7} Pa). Ce pouvoir de résolution diminue lorsque la masse augmente, mais reste cependant l'un des meilleurs obtenus pour les spectromètres de masse actuellement sur le marché ($R > 10^6$). La précision sur la mesure en masse est également l'une des meilleures performances des spectromètres de masse (< 1 ppm), principalement due à la précision de la fréquence d'excitation.

- Méthodes de fragmentation (MS/MS ou MS^n) – Analyse en tandem

Comme nous l'avons dit précédemment, les appareils de type FTICRMS sont compatibles avec de nombreuses méthodes de fragmentation, permettant ainsi d'obtenir des informations sur la structure et la stabilité des composés analysés. Le principe d'une fragmentation consiste à isoler un

ion (ion parent), puis de lui communiquer assez d'énergie pour qu'il puisse se dissocier. L'indice *n* dans la notation MS^n désigne le nombre de fragmentations successives subies par l'ion parent. Ainsi une MS^2 consiste à fragmenter une fois un ion de masse donnée.

Trois techniques de fragmentation peuvent être appliquées après isolation de l'ion parent :

- Le SORI-CID (Sustained Off-Resonance Irradiation Collision Induced Dissociation) : l'ion parent est soumis, après injection d'un flux d'azote (un « pulse ») dans la cellule d'analyse, à une impulsion radiofréquence de fréquence égale à 98,5% de sa fréquence de résonance (off-resonance). Celui-ci voit alors son énergie cinétique et donc son rayon de giration augmenter et diminuer alternativement pendant la période d'application de cette radiofréquence. Une partie de l'énergie cinétique est convertie en énergie interne par collisions, ce qui a pour effet d'induire sa fragmentation. Il s'agit du mode de fragmentation que nous avons utilisé lors de nos travaux.
- L'ECD (Electron Capture Dissociation) : l'ion isolé est bombardé avec des électrons, provoquant, après capture électronique, des espèces excitées. La cinétique de fragmentation étant supérieure à celle de la relaxation, des fragments (ions fils) sont alors détectés. Ce mode de fragmentation n'est pas employé lors de notre étude car cette technique nécessite des ions multichargés et nous n'avons travaillé qu'avec des ions monochargés.
- L'IRMPD (Infrared Multiphoton Ionization Dissociation) : l'ion isolé est irradié avec un faisceau laser de longueur d'onde 10,6 µm (laser CO_2 continu). Cette longueur d'onde correspond à l'absorption des photons dans les différents modes vibrationnels de l'ion. Ceci engendre un excès d'énergie interne qui conduit finalement l'ion à se fragmenter. Ce mode de fragmentation n'a non plus pas été utilisé lors de nos expérimentations.

- Dispositif expérimental :

L'appareil utilisé lors de nos travaux est un spectromètre de masse FTICR de 9,4 T (IonSpec-Varian corporation) représenté **Figure 35**, piloté par le logiciel Omega. Cet appareil est équipé d'un module electrospray (**Figure 35** à droite) et d'un module MALDI (IonSpec, Lake Forest, Etats Unis, commercialement appelé « ProMALDI ») (**Figure 35** à gauche). Le module ProMALDI est équipé d'un laser Nd : YAG (New Wave research, Fremont, EU) de longueur d'onde triplée en fréquence à 355 nm et une énergie de 4 mJ/pulse. Lors de nos analyses, nous avons utilisé le mode « Wizard » de l'appareil. Ce mode semi-automatique permet d'obtenir un spectre de masse en indiquant (i) la masse de l'ion à optimiser, (ii) la puissance du tir laser, (iii) le nombre de tirs laser et (iv) le mode de détection (positif ou négatif). Les autres paramètres (stockage des ions dans l'hexapole, transfert des

ions vers la cellule de détection, détection des ions) sont optimisés par le logiciel afin d'obtenir la meilleure résolution et précision en masse.

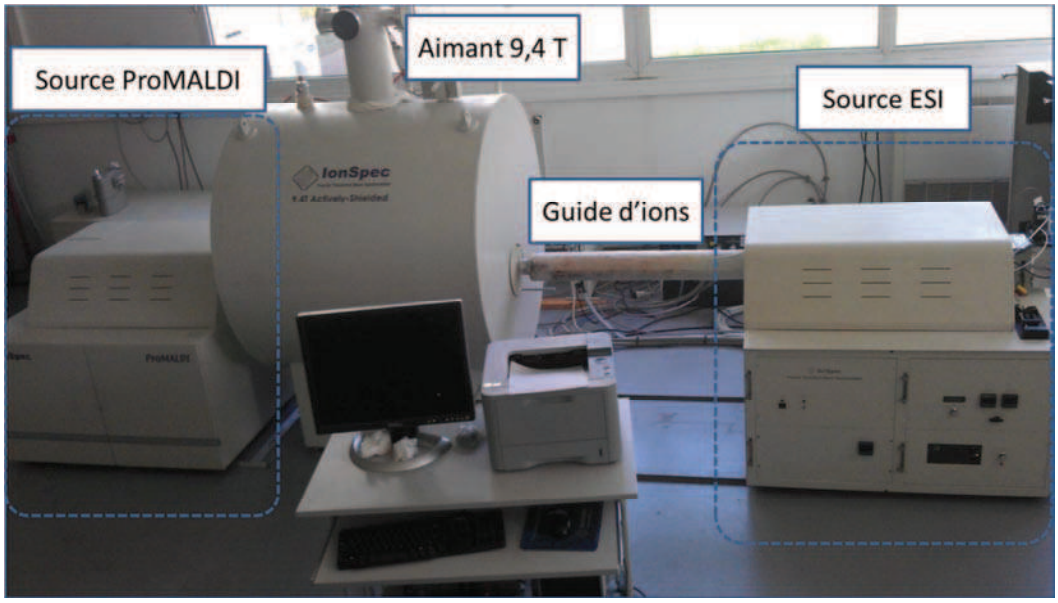


Figure 35 : Représentation du spectromètre de masse utilisé lors de nos travaux. A droite : module ESI (en position de retrait) ; à gauche : module ProMALDI (position engagée dans la cellule).

La source ESI présente une géométrie Z-Spray® : les ions sont dirigés dans l'analyseur en suivant une trajectoire en forme de Z. Cette géométrie est décrite comme présentant l'avantage d'être robuste et tolérante vis-à-vis des molécules peu volatiles. Elle est relativement tolérante vis à vis de concentration élevées en sels. Enfin, elle permet d'atteindre une bonne sensibilité et une meilleure transmission des ions d'intérêts au niveau de l'analyseur.

III. Le criblage moléculaire par spectrométrie de masse

Dans la dernière partie de ce chapitre, nous allons nous attacher à présenter brièvement les différents tests de criblage impliquant la spectrométrie de masse comme méthode de détection. Le but n'étant pas d'en faire une liste exhaustive, nous présenterons dans les grandes lignes leur mode de fonctionnement et nous présenterons quelques exemples pour illustration.

Il existe trois approches utilisant la spectrométrie de masse pour détecter une liaison entre une molécule et une cible protéique : l'étude de complexes [cible + molécule] par électronébulisation (ESI) en phase gazeuse, l'étude de complexes recourant à des techniques séparatives en phase liquide avant une analyse par ESI et l'étude de composés liés de manière réversible (non covalente) à

la cible par spectrométrie de masse couplée à la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-MS)[41].

III.1. Le criblage en phase gazeuse par ESI-MS

La technique d'électronébulisation permettant de conserver en phase gazeuse des molécules biologiques telles que des protéines, de l'ARN ou de l'ADN sous une forme très proche de leurs états natifs, il est apparu très intéressant de l'utiliser comme technique de détection lors de criblage moléculaire par spectrométrie de masse[42].

Le criblage consiste à mettre en contact la ou les molécules à tester avec la cible moléculaire, puis à analyser le complexe par ESI après un certain temps d'incubation. Si la molécule testée montre une affinité pour la cible, il y aura formation d'un complexe [cible + molécule active] qui sera détecté par spectrométrie de masse[43]. Comme nous l'avons vu précédemment, l'ESI est une source d'ionisation douce ne formant pas ou peu de fragments, et est compatible avec des conditions d'analyse non dénaturantes permettant ainsi de garder le complexe intact[44] malgré les différents gaz présents dans le source d'ionisation (ex : gaz rideau).

Un exemple de résultats pouvant être obtenus en appliquant ce type de démarche est présenté en **Figure 36**[45]. Il s'agit là du criblage « multicibles » par ESI-FTICRMS de la liaison entre des ARNs et des composés provenant de librairies de produits naturels et synthétiques. Comme le montre le spectre, il est possible de cribler plusieurs cibles en même temps, soit avec une molécule à tester, soit un panel de composés synthétiques ou naturels (extrait de *S. rimus Sp. paromomycinus*). Cette technique montre qu'il est possible de cribler des librairies de produits synthétiques ou naturels de manière robuste et à haut débit (identification rapide de composés d'intérêt et/ou de motifs structuraux).

Cette technique possède cependant quelques désavantages. En effet, il est important de garder des conditions non dénaturantes durant toutes les étapes du test afin de ne pas altérer la cible (solutions aqueuses contenant 200 mM d'acétate d'ammonium ajusté à pH 6,7) pouvant créer

---

41 M. M. Siegel, Curr. Topics Med. Chem. 2 (2002) 13-33.

42 N. Potier, P. Barth, D. Tritsch, J.-F. Biellmann and A. Van Dorsselaer, Eur. J. Biochem. 243 (1997) 274-282.

43 C. S. Allardyce, P. J. Dyson, J. Coffey and N. Johnson, Rapid Comm. Mass Spectrom. 16 (2002) 933-935.

44 D. I. Papac and Z. Shahrokh, Pharm. Res. 18 (2001) 131-145.

45 K. A. Sannes-Lowery, L. L. Cummins, S. Chen, J. J. Drader and S. A. Hofstadler, Int. J. Mass Spectrom. 238 (2004) 197-206.

une suppression ionique et il faut compter plusieurs centaines de microlitres d'échantillon à infuser pour obtenir des signaux de qualité.

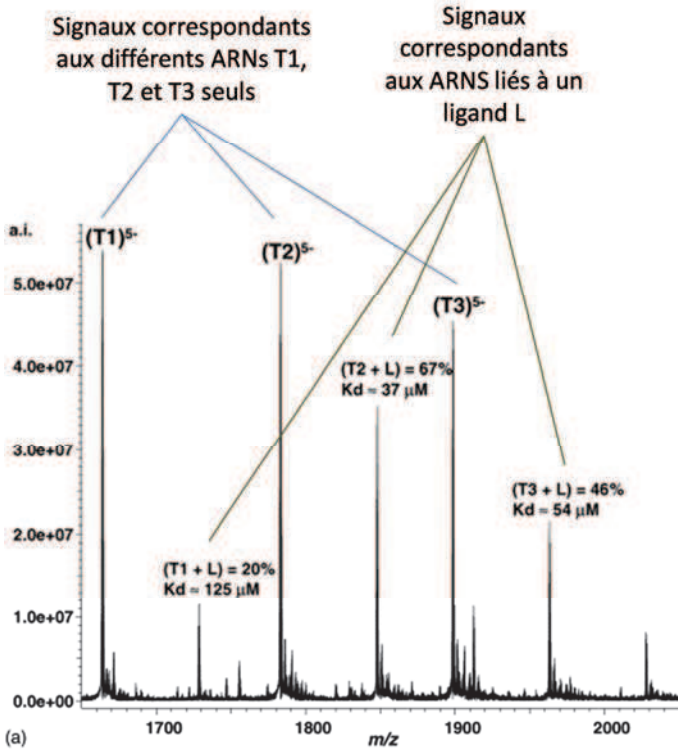


Figure 36 : Spectre de masse ESI-FTICR (9,4 T) de trois ARNs différents (T1, T2 et T3 ; T signifie « target ») incubés avec 11 ligands (L). *Le spectre présente les trois ARNs dans le même état de charge et les complexes non-covalents (T+L)*[45].

III.2. Le criblage en phase liquide couplée à l'ESI-MS

Les techniques de criblage utilisant la spectrométrie de masse et une phase condensée liquide sont nombreuses. Elles font généralement appel à une technique séparative permettant de trier les molécules liées à la cible et les molécules non liées. Nous pouvons donc distinguer ces techniques de criblage par la technique séparative employée. Une revue de 2005 répertorie, entre autres, les différentes techniques de criblage en phase condensée couplée à l'ESI-MS[46]. Les différentes stratégies de criblage en phase condensée liquide sont les suivantes :

- La chromatographie d'affinité couplée à la spectrométrie de masse ESI : la cible moléculaire est immobilisée sur la phase stationnaire d'une colonne dans laquelle les molécules à tester sont injectées. Les molécules non fixées sont éluées grâce à un solvant non dénaturant, puis les molécules liées à la cible sont éluées avec un solvant dénaturant permettant de rompre les liaisons avec la cible.

[46] M. M. Siegel, Mass-Spectrometry-Based Drug Screening Assays for Early Phases in Drug Discovery, (2005) 27-70.M.

Ces molécules éluées sont ensuite soit analysées par LC/ESI-MS, soit analysées directement par ESI-MS[47] sans chromatographie.

- La chromatographie d'affinité frontale couplée à la spectrométrie de masse ESI : le même principe que précédemment est utilisé, mais dans ce cas l'échantillon contenant les molécules à tester est injecté en continu pendant toute la durée de l'analyse. Les molécules qui ne se fixent pas à la cible sont éluées directement au début de la mesure, puis les molécules ayant une affinité faible pour la cible commencent à sortir, et enfin les molécules fortement fixées à la cible sortent en fin d'analyse[48] (débit de la phase mobile 8 µL/min, durée de l'analyse 50 min).

- L'ultrafiltration-centrifugation d'affinité couplée à la spectrométrie de masse ESI : cette technique permet de séparer les cibles de haut poids moléculaire des petites molécules ne se fixant pas à la cible. On utilise alors des microconcentrateurs composés d'un tube à centrifuger et dont l'extrémité porte une membrane spécifique développée pour retenir les composés dont la masse est supérieure à une masse limite. Lors de la centrifugation, les molécules non fixées à la cible passent au travers de la membrane, contrairement aux complexes [cible + ligand] retenus au-dessus de la membrane. On obtient alors une solution qui ne contient que la cible et les éventuels ligands, qui après dénaturation sera analysée par ESI-MS. Cette technique est la base de nombreux succès, notamment dans le cadre du criblage de la liaison d'anticorps polyclonaux dirigés contre les médicaments du type benzodiazepine[49]. Ce test a permis de retenir sélectivement, par la formation de complexes non-covalents avec les anticorps, des molécules candidates présentes dans une librairie de composés. Les molécules liées ont ensuite été libérées des anticorps par acidification du milieu et l'éluat a été analysé par HPLC/ESI-MS.

- L'ultrafiltration pulsée couplée à la spectrométrie de masse ESI : cette technique est une extension améliorée de la précédente, mais sans centrifugation et directement en ligne avec le spectromètre de masse. Après incubation des composés à tester avec la cible, la solution est introduite de manière pulsée dans une chambre contenant une membrane d'ultrafiltration. Après que les composés non liés et faiblement liés aient été éliminés par un flux continu en provenance d'un système de pompage HPLC, les complexes non covalents sont rompus par un solvant dénaturant ou une acidification de la phase mobile. Les composés actifs ainsi libérés de leurs sites de liaison sont piégés sur une colonne classique et analysés en ESI-MS[50].

- Autres techniques de criblage moléculaire par spectrométrie de masse en phase condensée liquide : ces autres techniques sont bien moins répandues que les précédentes. Il s'agit de la

---

47 M. L. Nedved, S. Habibi-Goudarzi, B. Ganem and J. D. Henion, Anal. Chem. 68 (1996) 4228-4236.

48 D. C. Schriemer, D. R. Bundle, L. Li and O. Hindsgaul, Angew. Chem. 37 (1998) 3383-3387.

49 R. Wieboldt, J. Zweigenbaum and J. Henion, Anal. Chem. 69 (1997) 1683-1691.

50 R. B. van Breemen, C.-R. Huang, D. Nikolic, C. P. Woodbury, Y.-Z. Zhao and D. L. Venton, Anal. Chem. 69 (1997) 2159-2164.

technique d'ultracentrifugation, de la chromatographie de perméation de gel et de l'électrophorèse capillaire couplées à la spectrométrie de masse ESI. Ces trois techniques n'ont été référencées que très peu de fois et présentent certains désavantages : (i) matériel spécifique et nombreux prélèvements pour l'ultracentrifugation[51], (ii) coûts des microconcentrateurs spécifiques pour la chromatographie de perméation de gel[52] et (iii) difficulté de mise en œuvre et d'obtention de composés sous forme ionique dans le tampon pour l'électrophorèse capillaire couplée à l'ESI-MS[40]. Bien qu'aucune technique de criblage ne soit réellement parfaite, ces inconvénients ne permettent pas l'exploitation de ces trois techniques pour des analyses à débit intéressant et sont donc peu développées.

III.3. Le criblage en phase solide par MALDI-MS

Les techniques de criblage de cibles moléculaires en phase solide sont bien moins utilisées que celles en phase liquide. Trois protocoles sont disponibles pour cette approche : l'étude de complexes non covalents par MALDI-MS, les « sondes d'affinités » (affinity probes MALDI ou Surface Enhanced Laser Desorption Ionization SELDI-MS)[53] et les études récentes de « décroissance d'intensité » (intensity-fading MALDI-TOFMS)[54].

La technique MALDI ne permet pas facilement d'obtenir des informations sur des complexes non-covalents. En effet, ces complexes ne sont étudiables que lors des premiers tirs laser et avec une sensibilité très faible. De plus, de nombreux facteurs sont à prendre en compte, tels que la force ionique des solutions, le pH, les tampons et le choix des matrices. L'usage du MALDI pour ioniser sans rompre les liaisons des complexes non-covalents est de ce fait très difficile et donc très peu répandu.

Le principe des sondes d'affinité consiste à fixer la cible moléculaire sur un support compatible pour une analyse par spectrométrie de masse. Ces supports sont des plaques spécifiques dont les puits ont été modifiés pour pouvoir fixer et retenir les protéines. Les différents types de traitement disponibles sont présentés en **Figure 37**.

---

51 T. F. Holzman, J. E. Harlan, D. A. Egan, A. M. Buko, L. R. Solomon, U. S. Ladror and Q. Tang, PCT Int. Appl. 57 (2000).

52 Y. M. Dunayevskiy, J.-J. Lai, C. Quinn, F. Talley and P. Vouros, Rapid Comm. Mass Spectrom. 11 (1997) 1178-1184.

53 H. J. Issaq, T. P. Conrads, D. A. Prieto, R. Tirumalai and T. D.Veenstra, Anal. Chem. 75 (2003) 148 A-155 A.

54 O. Yanes, A. Nazabal, R. Wenzel, R. Zenobi and F. X. Aviles, J. Proteo. Res. 5 (2006) 2711-2719.

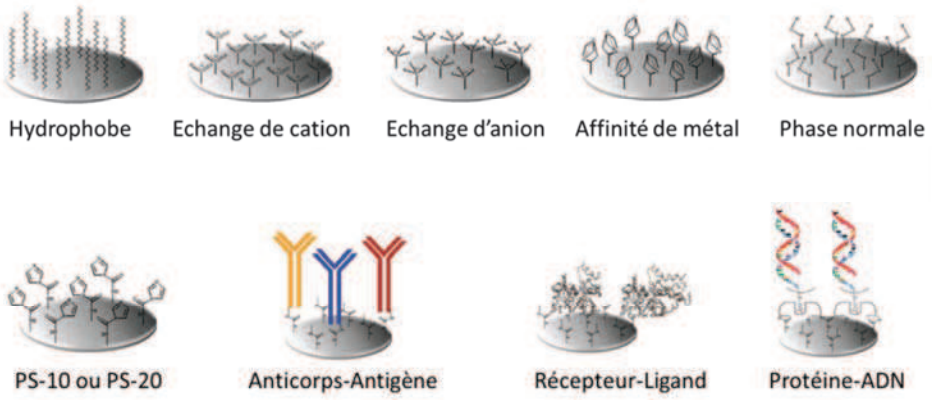


Figure 37 : Les différents types de traitement de surface des « sondes d'affinité » sur lesquelles les cibles moléculaires sont fixées[53].

Les cibles moléculaires ainsi fixées au support par l'une de ces techniques servent à retenir spécifiquement les molécules ayant une affinité. Les molécules à tester sont déposées sur la surface, puis celle-ci est rincée afin d'éliminer toutes les molécules non liées à la cible. Les composés fixés sont ensuite libérés par l'impact laser en présence ou absence de matrice lors de l'analyse par TOFMS[44,55]. En effet, l'énergie apportée par les tirs laser permet de rompre les liaisons entre les ligands et les cibles. De plus, cette approche permet la subdivision du support métallique en petites régions, chacune pouvant être dédiée à une cible spécifique. Ainsi plusieurs cibles peuvent être étudiées en même temps avec la même solution de ligands[44]. Cependant cette approche nécessite d'immobiliser la cible sur la surface métallique et cet aspect est très coûteux et doit être parfaitement maitrisé car il conditionne la qualité des informations pouvant être obtenues. Ainsi même si l'usage de sondes d'affinités couplées à la technique MALDI semble être prometteur en termes de criblage de cibles moléculaires, les limitations dues à l'immobilisation nécessaire des cibles gênent son essor.

La troisième approche de criblage moléculaire par spectrométrie de masse en phase solide est l'étude de « décroissance d'intensité » des signaux de composés retenus sur des cibles moléculaires[54]. Le principe consiste à suivre la décroissance de l'intensité des signaux de molécules obtenus par MALDI-TOFMS avant et après l'ajout de la cible moléculaire. Il convient alors d'analyser une première fois l'échantillon à tester, puis de l'incuber avec la cible moléculaire. Cette dernière doit être modifiée (par biotinylation ou par couplage à des billes magnétiques) afin d'être séparée du reste de la solution une fois l'incubation effectuée. La solution ainsi débarrassée de la cible et des molécules y étant liées est ensuite à nouveau analysée. Un exemple de résultats obtenus dans le cadre du criblage de biomolécules dans la salive de sangsue (*Hirudo medicinalis*) à la recherche

[55] M. Merchant and S. R. Weinberger, Electrophoresis 21 (2000) 1164-1177.

d'inhibiteur de la carboxypeptidase A est présenté **Figure 38**. Comme le montre cette figure, on constate une perte de signal de la molécule LCI lorsque la salive de sangsue est incubée avec la carboxypeptidase A.

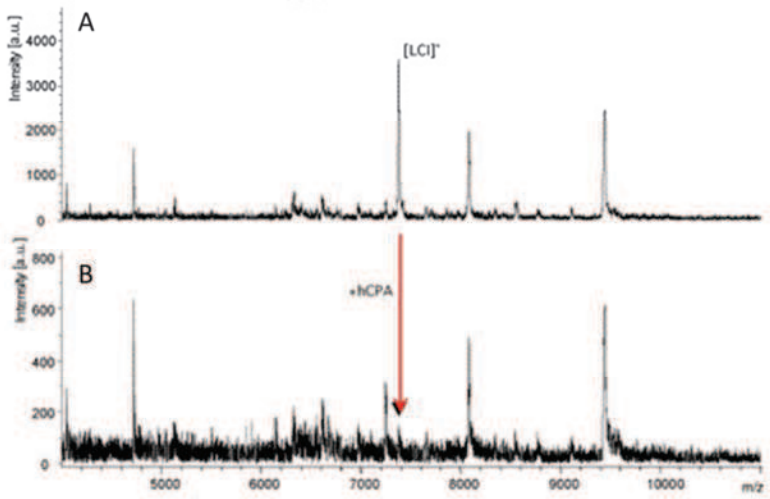


Figure 38 : Spectres de masse MALDI-TOF de la solution de la salive de sangsue (LCI) (A) avant et (B) après addition de la carboxypeptidase A[54].

Cependant un traitement important des signaux et une répétition des expériences pour chaque échantillon sont nécessaires pour donner une importance significative aux données statistiques, ce qui constitue un frein important en criblage et impose un faible débit d'analyse. De plus les composés de faible affinité ne sont pas considérés par cette étude car la décroissance de leurs signaux est trop faible. L'étude des espèces liées se fait par une « non détection », c'est-à-dire que c'est par l'absence de leur signal dans le spectre de masse que l'on conclut à leur liaison à la cible. Ceci implique qu'une fois une molécule intéressante découverte, il faut revenir à l'échantillon de départ pour l'identifier, ce qui amène une perte de temps supplémentaire. Ainsi, bien que mettant à profit les avantages d'une analyse par MALDI-TOFMS (rapidité, sensibilité, ionisation simultanée de nombreux composés et facilité d'ionisation), ce type d'approche reste encore pour l'heure assez limitée en criblage.

La technique de criblage en phase solide par MALDI-MS a été couplée à la technique d'ultrafiltration-centrifugation lors des travaux de thèse développés au sein de notre laboratoire[56,57]. Cette approche particulièrement innovante permet de prendre en compte les avantages de l'ultrafiltration-centrifugation ainsi que ceux du MALDI, tout en s'affranchissant des désavantages

[56] P. Hannewald, Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine - Metz (2008).
[57] P. Hannewald, B. Maunit and J. F. Muller, Anal. Chem. 78 (2006) 4390-4397.

rencontrés avec les techniques séparatives et en contournant les problèmes jusque-là inévitables pour l'étude de complexes non-covalents.

III.4. Conclusion

Dans ce chapitre nous avons vu que la découverte de nouvelles molécules actives est un processus long et coûteux, mais nécessaire au vue des problèmes de santé public actuels. Nous avons également présenté dans les grandes lignes les différents principes de criblage de cibles moléculaires existant, avec leurs avantages et inconvénients respectifs. L'approche du criblage par spectrométrie de masse est un outil de choix dans ce domaine, et plus particulièrement grâce à la technique MALDI qui permet une simplification et une rapidité des expériences, comme cela a également été montré lors de deux études couplant l'ultrafiltration-centrifugation à la spectrométrie de masse MALDI-TOF[57,58].

Dans le chapitre III nous nous sommes attachés à développer un test de criblage moléculaire sur les protéines phosphatases CDC25, utilisant le couplage des techniques d'ultrafiltration-centrifugation et MALDI-TOFMS. Ce travail constitue la suite des recherches entamées dans ce domaine au laboratoire et dans le cas de cette nouvelle cible, nous avons dû aborder entre autres les problèmes de liaisons covalentes « cibles-ligand » pour les inhibiteurs irréversibles, jusqu'à présent non étudiés.

[58] P. Hannewald, B. Maunit and J.-F. Muller, Anal. Bioanal. Chem. 392 (2008) 1335-1344.

Bibliographie :

[1] M. Dickson, J. P. Gagnon, *Key factors in the rising cost of new drug discovery and development*, Nat. Rev. Drug Discov. 3 (2004) 417-429.

[2] P. Tammela, *Screening Methods for the Evaluation of Biological Activity in Drug Discovery*. 2004, University of Helsinki

[3] J. A. DiMasi, R. W. Hansen, H. G. Grabowski, L. Lasagna, *Cost of innovation in the pharmaceutical industry*, J. Health Econom. 10 (1991) 107-142.

[4] J. A. DiMasi, R. W. Hansen, H. G. Grabowski, *The price of innovation: new estimates of drug development costs*, J. Health Econ. 22 (2003) 151-185.

[5] P. A. Johnston, P. A. Johnston, *Cellular platforms for HTS: three case studies*, Drug Discov. Today 7 (2002) 353-363.

[6] G. Vistoli, A. Pedretti, B. Testa, *Assessing drug-likeness – what are we missing?*, Drug Discov. Today 13 (2008) 285-294.

[7] K. Tsuboi, D. A. Bachovchin, A. E. Speers, T. P. Spicer, V. Fernandez-Vega, P. Hodder, H. Rosen, B. F. Cravatt, *Potent and Selective Inhibitors of Glutathione S-Transferase Omega 1 That Impair Cancer Drug Resistance*, J. Am. Chem. Soc. 133 (2011) 16605-16616.

[8] M. S. Lee, E. H. Kerns, *LC/MS Application in Drug Development*, Mass Spectrom. Rev. 18 (1999) 187-279.

[9] www.leem.org. 02/08/2013.

[10] P. Kruchten, R. Werth, S. Marchais-Oberwinkler, M. Frotscher, R. W. Hartmann, *Development of a biological screening system for the evaluation of highly active and selective 17β-HSD1-inhibitors as potential therapeutic agents*, Mol. Cell. Endocrin. 301 (2009) 154-157.

[11] B. Wang, J. Deng, Y. Gao, L. Zhu, R. He, Y. Xu, *The screening toolbox of bioactive substances from natural products: A review*, Fitoterapia 82 (2011) 1141-1151.

[12] G. Jiménez, M. Hasegawa, M. Rodríguez, O. Estrada, J. Méndez, A. Castillo, F. Gonzalez-Mujica, N. Motta, J. Vásquez, E. Romero-Vecchione, *Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons*, J. Ethnopharm. 77 (2001) 77-83.

[13] D. Horiatis, Q. Wang, J. Pinski, *A new screening system for proliferation-independent anti-cancer agents*, Cancer Lett. 210 (2004) 119-124.

[14] W. P. Walters, M. T. Stahl, M. A. Murcko, *Virtual screening—an overview*, Drug Discov. Today 3 (1998) 160-178.

[15] T. Lengauer, C. Lemmen, M. Rarey, M. Zimmermann, *Novel technologies for virtual screening*, Drug Discov. Today 9 (2004) 27-34.

[16] G. M. Arantes, *Flexibility and inhibitor binding in cdc25 phosphatases*, Proteins 78 (2010) 3017-3032.

[17] H. Park, Y. J. Bahn, S. K. Jung, D. G. Jeong, S. H. Lee, I. Seo, T. S. Yoon, S. J. Kim, S. E. Ryu, *Discovery of Novel Cdc25 Phosphatase Inhibitors with Micromolar Activity Based on the Structure-Based Virtual Screening*, J. Med. Chem. 51 (2008) 5533-5541.

[18] M. Moniatte, C. Lesieur, B. Vécsey-Semjén, J. T. Buckley, F. Pattus, F. G. van der Goot, A. Van Dorsselaer, *Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry in the subunit stoichiometry study of high-mass non-covalent complexes*, Int. J. Mass Spectrom. Ion Process. 169–170 (1997) 179-199.

[19] A. Van Dorsselaer, F. Bitsch, B. Green, S. Jarvis, P. Lepage, R. Bischoff, H. V. J. Kolbe, C. Roitsch, *Application of electrospray mass spectrometry to the characterization of recombinant proteins up to 44 kDa*, Biol. Mass Spectrom. 19 (1990) 692-704.

[20] S. Sanglier, A. Van Dorsselaer, V. Vivat-Hannah, J.-P. Renaud, *La spectrométrie de masse des assemblages non-covalents en biologie : aspects fondamentaux et applications à la recherche pharmaceutique*, Spectra Analyse 245 (2005) 26-35.

[21] H. Rogniaux, S. Sanglier, K. Strupat, S. d. Azza, O. Roitel, V. Ball, D. Tritsch, G. Branlant, A. Van Dorsselaer, *Mass Spectrometry as a Novel Approach to Probe Cooperativity in Multimeric Enzymatic Systems*, Anal. Biochem. 291 (2001) 48-61.

[22] B. Ganem, Y. T. Li, J. D. Henion, *Detection of noncovalent receptor-ligand complexes by mass spectrometry*, J. Am. Chem. Soc. 113 (1991) 6294-6296.

[23] J. F. Muller, *Laser probing and materials analysis*, in *International Conference on Laser Probing*. 2002: Leuven, Belgique.

[24] C. K. L. Wong, M. A. So, T. W. D. Chan, *Origins of the proton in the generation of protonated polymers and peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization* Eur. J. Mass Spectrom. 1 (1998) 223-228.

[25] F. O. Ayorinde, P. Hambright, T. N. Porter, Q. L. Keith, *Use of meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin as a matrix for low molecular weight alkylphenol ethoxylates in laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry*, Rapid Comm. Mass Spectrom. 13 (1999) 2474-2479.

[26] T. Kinumi, T. Saisu, M. Takayama, H. Niwa, *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis*, J. Mass Spectrom. 35 (2000) 417-422.

[27] Y.-F. Huang, H.-T. Chang, *Nile Red-Adsorbed Gold Nanoparticle Matrixes for Determining Aminothiols through Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*, Anal. Chem. 78 (2006) 1485-1493.

[28] M.-C. Tseng, R. Obena, Y.-W. Lu, P.-C. Lin, P.-Y. Lin, Y.-S. Yen, J.-T. Lin, L.-D. Huang, K.-L. Lu, L.-L. Lai, C.-C. Lin, Y.-J. Chen, *Dihydrobenzoic acid modified nanoparticle as a MALDI-TOF MS matrix for soft ionization and structure determination of small molecules with diverse structures*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 21 (2010) 1930-1939.

[29] S. Mirza, N. Raju, M. Vairamani, *Estimation of the proton affinity values of fifteen matrix-assisted laser desorption/ionization matrices under electrospray ionization conditions using the kinetic method*, J. Am0 Soc. Mass. Spec. 15 (2004) 431-435.

[30] J. Vinh, *Etude et caractérisation structurale de modifications post-traductionnelles de la tubuline par spectrométrie de masse*. 1999, Université Piere et Marie Curie

[31] S. L. Cohen, B. T. Chait, *Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins*, Anal. Chem 68 (1996) 31-37.

[32] M. Kussmann, E. Nordhoff, H. Rahbek-Nielsen, S. Haebel, M. Rossel-Larsen, L. Jakobsen, J. Gobom, E. Mirgorodskaya, A. Kroll-Kristensen, L. Palm , P. Roepstorff, *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Sample Preparation Techniques Designed for Various Peptide and Protein Analytes*, J. Mass Spectrom. 32 (1997) 593-601.

[33] L. Tang, P. Kebarle, *Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution*, Anal. Chem. 65 (1993) 3654-3668.

[34] D. P. H. Smith, *The Electrohydrodynamic Atomization of Liquids*, Ind. App. IA-22 (1986) 527-535.

[35] A. Dempster, *A new Method of Positive Ray Analysis*, Phys. Rev. 11 (1918) 316.

[36] S. A. Goudsmit, *A Time-of-Fligh Mass Spectrometer*, Phys. Rev. 74 (1948) 622.

[37] M. L. Vestal, P. Juhasz, S. A. Martin, *Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry*, Rapid Comm. Mass Spectrom. 9 (1995) 1044-1050.

[38] E. O. Lawrence, *The evolution of the cyclotron*, Nobel Lecture (1951).

[39] H. A. Thomas, R. L. Driscoll, J. A. Hipple, *Measurement of the Proton Moment in Absolute Units*, Phys. Rev. 75 (1949) 902-903.

[40] M. B. Comisarow, A. G. Marshall, *Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy*, Chem. Phys. Lett. 25 (1974) 282-283.

[41] M. M. Siegel, *Early Discovery Drug Screening Using Mass Spectrometry*, Curr. Topics Med. Chem. 2 (2002) 13-33.

[42] N. Potier, P. Barth, D. Tritsch, J.-F. Biellmann, A. Van Dorsselaer, *Study of Non-Covalent Enzyme-Inhibitor Complexes of Aldose Reductase by Electrospray Mass Spectrometry*, Eur. J. Biochem. 243 (1997) 274-282.

[43] C. S. Allardyce, P. J. Dyson, J. Coffey, N. Johnson, *Determination of drug binding sites to proteins by electrospray ionisation mass spectrometry: the interaction of cisplatin with transferrin*, Rapid Comm. Mass Spectrom. 16 (2002) 933-935.

[44] D. I. Papac, Z. Shahrokh, *Mass Spectrometry Innovations in Drug Discovery and Development*, Pharm. Res. 18 (2001) 131-145.

[45] K. A. Sannes-Lowery, L. L. Cummins, S. Chen, J. J. Drader, S. A. Hofstadler, *High throughput drug discovery with ESI-FTICR*, Int. J. Mass Spectrom. 238 (2004) 197-206.

[46] M. M. Siegel, *Mass-Spectrometry-Based Drug Screening Assays for Early Phases in Drug Discovery*, in *Integrated Strategies for Drug Discovery Using Mass Spectrometry*. 2005, John Wiley & Sons, Inc. p. 27-70.

[47] M. L. Nedved, S. Habibi-Goudarzi, B. Ganem, J. D. Henion, *Characterization of Benzodiazepine "Combinatorial" Chemical Libraries by On-Line Immunoaffinity Extraction, Coupled Column HPLC–Ion Spray Mass Spectrometry–Tandem Mass Spectrometry*, Anal. Chem. 68 (1996) 4228-4236.

[48] D. C. Schriemer, D. R. Bundle, L. Li, O. Hindsgaul, *Micro-Scale Frontal Affinity Chromatography with Mass Spectrometric Detection: A New Method for the Screening of Compound Libraries*, Angew. Chem. 37 (1998) 3383-3387.

[49] R. Wieboldt, J. Zweigenbaum, J. Henion, *Immunoaffinity Ultrafiltration with Ion Spray HPLC/MS for Screening Small-Molecule Libraries*, Anal. Chem. 69 (1997) 1683-1691.

[50] R. B. van Breemen, C.-R. Huang, D. Nikolic, C. P. Woodbury, Y.-Z. Zhao, D. L. Venton, *Pulsed Ultrafiltration Mass Spectrometry: A New Method for Screening Combinatorial Libraries*, Anal. Chem. 69 (1997) 2159-2164.

[51] T. F. Holzman, J. E. Harlan, D. A. Egan, A. M. Buko, L. R. Solomon, U. S. Ladror, Q. Tang, *Integrated Strategies for Drug Discovery Using Mass Spectrometry*, PCT Int. Appl. 57 (2000).

[52] Y. M. Dunayevskiy, J.-J. Lai, C. Quinn, F. Talley, P. Vouros, *Mass spectrometric identification of ligands selected from combinatorial libraries using gel filtration*, Rapid Comm. Mass Spectrom. 11 (1997) 1178-1184.

[53] H. J. Issaq, T. P. Conrads, D. A. Prieto, R. Tirumalai, T. D.Veenstra, *Peer Reviewed: SELDI-TOF MS for Diagnostic Proteomics*, Anal. Chem. 75 (2003) 148 A-155 A.

[54] O. Yanes, A. Nazabal, R. Wenzel, R. Zenobi, F. X. Aviles, *Detection of Noncovalent Complexes in Biological Samples by Intensity Fading and High-Mass Detection MALDI-TOF Mass Spectrometry*, J. Proteo. Res. 5 (2006) 2711-2719.

[55] M. Merchant, S. R. Weinberger, *Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry*, Electrophoresis 21 (2000) 1164-1177.

[56] P. Hannewald, *Etude de l'interaction médicament/récepteur par spectrométrie de masse - Mise en place et validation de nouveaux protocoles de criblage moléculaire-*. Thèse de Doctorat, 2008, Université Paul Verlaine - Metz

[57] P. Hannewald, B. Maunit, J. F. Muller, *Tubulin-Binding Drug Screening by MALDI-TOFMS*, Anal. Chem. 78 (2006) 4390-4397.

[58] P. Hannewald, B. Maunit, J.-F. Muller, *Screening of DHFR-binding drugs by MALDI-TOFMS*, Anal. Bioanal. Chem. 392 (2008) 1335-1344.

CHAPITRE III

DEVELOPPEMENT D'UN TEST DE CRIBLAGE SUR LES PROTEINES CDC25

CHAPITRE III DEVELOPPEMENT D'UN TEST DE CRIBLAGE SUR LES PROTEINES CDC25 83

INTRODUCTION 85

I. Présentation générale du test de criblage 85

II. Spectrométrie de masse des protéines CDC25s et des molécules utilisées pendant le développement du test 88

II.1. Les protéines phosphatases CDC25s 88

II.1.1. Production et dosage des protéines CDC25s 88

II.1.2. Analyse des CDC25s par MALDI-TOFMS 89

II.2. Les inhibiteurs réversibles 92

II.2.1. La 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone 93

II.2.2. Le composé SV37 96

II.3. Les inhibiteurs irréversibles 98

II.3.1. Le BN82002 98

II.3.2. Le NSC663284 101

II.4. Le témoin négatif : l'amiodarone 102

II.5. Bilan et commentaires associés à l'approche utilisée 103

III. Développement du test de criblage 104

III.1. Incubation des molécules à tester avec la cible 104

III.2. Elimination des molécules non liées à la cible 106

III.3. Description de l'analyse directe par MALDI-TOFMS 107

III.4. Etude de l'empreinte peptidique massique (« Peptide Mass Fingerprint », PMF) 108

III.4.1. Description et protocole de l'étude PMF 109

III.4.2. Résultats de l'étude PMF sur les protéines natives 111

III.5. Criblage des CDC25s 114

III.5.1. Avec l'amiodarone, le témoin négatif 114

III.5.2. Avec les inhibiteurs réversibles 115

III.5.3. Avec les inhibiteurs irréversibles 123

CONCLUSION 128

INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, la recherche de nouveaux principes actifs contre le cancer est une course contre la montre et la rapidité de discrimination entre les composés actifs et inactifs est de plus en plus importante. Dans ce troisième chapitre nous allons nous attacher à décrire et expliquer le développement de notre test de criblage sur les protéines phosphatases CDC25, ayant pour but d'identifier rapidement des inhibiteurs de ces protéines. Tout d'abord nous présenterons l'organisation générale du test de criblage de la liaison de composés à une cible moléculaire. Nous décrirons ensuite l'ensemble des différentes protéines et molécules mises en jeu dans ce test ainsi que les paramètres utilisés pour leur analyse par spectrométrie de masse. Enfin nous présenterons chaque étape du protocole que nous avons mis en place, en terminant par les résultats pour les deux types d'inhibiteurs de CDC25s, les ligands réversibles et les ligands irréversibles.

I. Présentation générale du test de criblage

Le test de criblage moléculaire que nous allons présenter s'inscrit dans la continuité de travaux du laboratoire effectués par P. Hannewald[1,2]. Dans ce cadre, il avait été développé un test rapide permettant d'identifier des ligands réversibles (liaison non covalente à la protéine cible) d'origines naturelles ou synthétiques à la tubuline et à la DHFR (DiHydroxy Folate Reductase) par spectrométrie de masse couplée à la désorption/ionisation laser assistée par matrice. Celui-ci avait été alors appliqué a des extraits de plantes, dont les actifs étaient connus pour être des ligands de ces cibles (ex : la vinblastine et la vincristine de la pervenche de Madagascar pour la tubuline). Le test avait permis de retrouver des résultats connus, montrant ainsi qu'il permettait de discriminer de potentiels ligands de la cible moléculaire choisie dans un milieu complexe.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes attachés non seulement à transposer ce test de criblage d'inhibiteurs réversibles aux protéines phosphatases CDC25, mais également à l'étendre à la détection d'inhibiteurs irréversibles liés ou non de façon covalente au site catalytique de ces cibles. Ces mécanismes d'inhibition étant, comme nous le verrons, les plus fréquemment rencontrés et le protocole initial ne permettant que de détecter les ligands non covalents (ou réversibles), il était impératif de pallier à ce problème. Nous avons donc dû étendre le protocole à cette classe de ligands. En effet, comme la majorité des inhibiteurs connus des CDC25s sont des ligands irréversibles

---

1 P. Hannewald, B. Maunit and J. F. Muller, Anal. Chem. 78 (2006) 4390-4397.

2 P. Hannewald, Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine - Metz (2008).

de son site actif, une étape supplémentaire dans le protocole a donc été développée, permettant ainsi la détection complète de ligands réversibles et irréversibles. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans Analytical Biochemestry en 2012[3] à laquelle ce chapitre apportera également des compléments d'information. La **Figure 39** représente un schéma du protocole complet du test de criblage des protéines CDC25 et l'intérêt de chaque étape sera présenté et discuté succinctement au cours du chapitre.

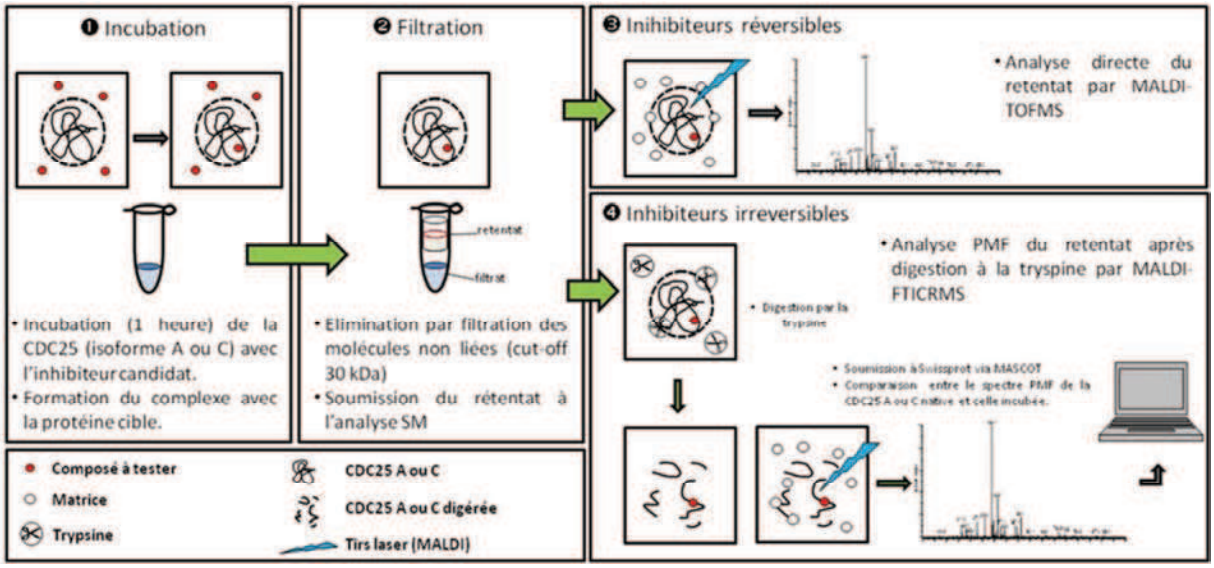


Figure 39 : Protocole général du test de criblage.

D'une manière générale, en dehors des approches *in silico* bien entendu, la détection de ligands lors du criblage suppose une mise en contact physique de la protéine cible avec le ou les composés à évaluer. La première étape (❶) consiste donc en une incubation en conditions non dénaturantes (solvant non organique, température, pH…) entre les molécules candidates et la cible. Une heure d'incubation à température ambiante suffit pour obtenir la formation du complexe ligand-protéine cible.

Afin de détecter uniquement les ligands (réversibles ou irréversibles) de la cible choisie, il faut s'assurer de ne pas détecter les molécules qui ne se lient pas à celle-ci. Un protocole d'échantillonnage préliminaire à l'analyse par spectrométrie de masse est établi dans le but de séparer les ligands des simples molécules n'ayant aucune affinité avec la cible. La deuxième étape (❷) consiste en l'élimination des composés non liés à la protéine cible. Les étapes suivantes (❸ et ❹) sont des analyses par MALDI-MS du complexe ligand-protéine et s'inscrivent avec une certaine logique de déroulement.

[3] E. Sibille, E. Bana, W. Chaouni, M. Diederich, D. Bagrel and P. Chaimbault, Anal. Biochem. 430 (2012) 83-91.

La détection des composés liés de façon non covalente par spectrométrie de masse MALDI-TOF est la première de ces étapes (❸). L'énergie du tir laser va permettre de rompre la liaison faible entre la cible et la molécule liée, et celle-ci va pouvoir ainsi être détectée. Plusieurs possibilités ont été étudiées pour la détection : l'analyse directe du complexe cible-molécule, l'analyse après dénaturation du complexe par un solvant organique et l'analyse après digestion trypsique du complexe. Il a été montré que l'analyse directe est évidemment la détection la plus rapide et elle offre quasiment les mêmes résultats que la dénaturation et la digestion trypsique[2]. C'est donc l'analyse directe du complexe par MALDI-TOFMS que nous utiliserons pour la suite de notre étude.

Comme nous l'avons expliqué, cette détection directe ne permet pas de détecter les ligands irréversibles de la cible moléculaire, puisque l'énergie du tir laser n'est pas suffisante pour rompre ce type de liaison, seules les liaisons faibles sont rompues (le MALDI n'est pas réputé pour être une technique d'ionisation conduisant à une fragmentation abondante de l'analyte). Nous avons donc développé une étape supplémentaire (❹) permettant de détecter si une molécule est liée de manière covalente, ou avec une liaison plus forte (ligand irréversible) à la cible moléculaire. Lors de cette étape, une étude « Peptide Mass Fingerprint » (PMF) de la protéine native (sans criblage) est réalisée, afin d'obtenir une empreinte peptidique référence de la protéine. Le site actif de la protéine est alors identifié et repéré. Cette même étude est menée sur la protéine criblée, puis les deux empreintes obtenues sont comparées entre elles. Si le site actif de la protéine est identifié après criblage de la protéine, cela signifie que celui-ci est « libre » et que le ligand testé n'y est pas lié de manière covalente. Si le site actif de la protéine n'est pas identifié après criblage, alors on suppose que le ligand testé est irréversible et est lié à la protéine à son site actif. Cela entraine un changement de la protéine et son site actif modifié ne peut plus être détecté par l'étude PMF. On peut alors s'attendre à l'apparition de quelques pics correspondants à la masse du site actif et les molécules y étant fixées.

Pour résumer, notre protocole s'articule autour de quatre étapes. La 1ère étape consiste à incuber ensemble la ou les molécules à tester avec la cible protéique (CDC25 A ou C). Il se forme alors potentiellement des complexes covalents ou non covalents entre la molécule et la cible. Lors de la 2ème étape les molécules non liées à la cible sont éliminées. La 3ème étape a pour but l'analyse directe par MALDI-TOFMS des molécules liées par une liaison non covalente, et la 4ème étape consiste en l'étude PMF du complexe (digestion enzymatique) avec l'analyse par MALDI-TOFMS et MALDI-FTICRMS du digest du complexe cible-molécule. Ces deux dernières étapes seront menées de front lors de nos analyses car elles doivent donner des résultats cohérents.

II. Spectrométrie de masse des protéines CDC25 et des molécules utilisées pendant le développement du test

Dans cette partie nous allons étudier par spectrométrie de masse les différentes caractéristiques des protéines CDC25s ainsi que celles des ligands utilisés pour développer notre test de criblage : le BN82002, la 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone, le NSC663284 et le SV37. Nous parlerons également de l'amiodarone, composé utilisé comme témoin négatif.

II.1. Les protéines phosphatases CDC25

II.1.1. Production et dosage des protéines CDC25

La mise au point et la validation du test de criblage nécessite l'utilisation en « grande quantité » (30 et 50 µL de CDC25A et C respectivement par test à environ 10^{-5}M) de la protéine cible fonctionnelle, la protéine entière étant jugée plus représentative qu'une séquence ne contenant que le site actif. Au début de ce travail, il n'était pas facile de se procurer ces protéines de façon commerciale, contrairement à la tubuline par exemple, ou à un prix relativement élevé. De plus, toutes les isoformes humaines ne sont pas commerciales. Chaque production permettant d'obtenir au maximum 2 mL de protéines en concentration suffisante, nous avons dû réaliser plusieurs fois cette étape de production des protéines.

Le laboratoire (LIMBP) possédant les plasmides de ces isoformes transfectables *à Escherichia coli*, les protéines CDC25 ont été produites au laboratoire sous forme de protéines recombinantes CDC25-GST selon le protocole décrit en annexe I[4]. L'objectif est la production de masse du meilleur clone de CDC25-GST, puis l'extraction et la purification des protéines CDC25. Chaque isoforme est produite séparément. Brièvement, le protocole est scindé en trois parties : tout d'abord la production de protéines de fusion (Glutathion *S*-Transferase-CDC25 = GST-CDC25) est induite dans une culture de bactéries *E. coli*. Celles-ci sont ensuite lysées afin de récupérer les protéines qui sont alors purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne contenant un gel Glutathion-Agarose.

Après avoir produit les protéines, celle-ci sont dosées avec la méthode de Lowry afin d'en connaitre la concentration. Le protocole de dosage est décrit en annexe II. Brièvement, cette méthode utilise la fixation aux protéines de deux composés, le réactif de biuret contenant du sulfate de cuivre et le réactif de Folin et Ciocalteu, qui forment un complexe quasi instantanément, en

[4] L. Brault and D. Bagrel, Life Sci. 82 (2008) 315-323.

particulier avec les acides aminés aromatiques et les résidus cystéine des protéines. Une coloration bleue apparait après fixation aux protéines. L'intensité de cette coloration est mesurée à 660 nm.

Les protéines sont ensuite conservées au congélateur à -80°C dans le tampon de production Tris A. La protéine CDC25B n'a pas pu être utilisée car sa concentration était trop faible. Les analyses ont donc été effectuées sur les protéines CDC25A et C seulement, de concentration d'environ $8 \cdot 10^{-5}$M pour CDC25A et $2 \cdot 10^{-5}$M pour CDC25C.

II.1.2. Analyse des CDC25s par MALDI-TOFMS

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, les protéines phosphatases CDC25 se répartissent en trois isoformes A, B et C et sont constituées de 300 à 600 acides aminés. Nous ne parlerons ici que des isoformes A et C, puisque l'isoforme B n'était pas disponible sous sa forme entière lors de ce travail.

La protéine CDC25A possède 524 acides aminés et a une masse moyenne d'environ 59000 g/mol. La CDC25C quant à elle contient 473 acides aminés et a une masse moyenne d'environ 53300 g/mol. Après avoir produit et purifié ces deux isoformes, nous les avons analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (laser à azote pulsé, λ = 337 nm) en mode de détection linéaire et avec les trois matrices suivantes :

- Une solution de 2,5-DHB (acide 2,5-dihydroxybenzoïque), à une concentration de 1 M et diluée dans un mélange eau/acétonitrile (v/v) ajustée à 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) ;
- Une solution d'HCCA (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique) à saturation à 20 mg/mL dans un mélange eau/acétonitrile (v/v) et ajustée à 0,1% de TFA ;
- Une solution de SA (acide sinapinique) à saturation à 20 mg/mL dans un mélange eau/acétonitrile (v/v) et ajustée à 10% d'acide formique. Cette matrice est utile dans l'analyse de composés de hautes masses comme les protéines ainsi que pour les composés polyphénoliques en mode de détection négatif. Nous l'utiliserons principalement pour l'analyse des protéines CDC25s en hautes masses.

Ces trois solutions de matrices seront utilisées dans les mêmes conditions pour toutes les futures analyses par spectrométrie de masse MALDI. Les résultats sont présentés en **Figure 40**.

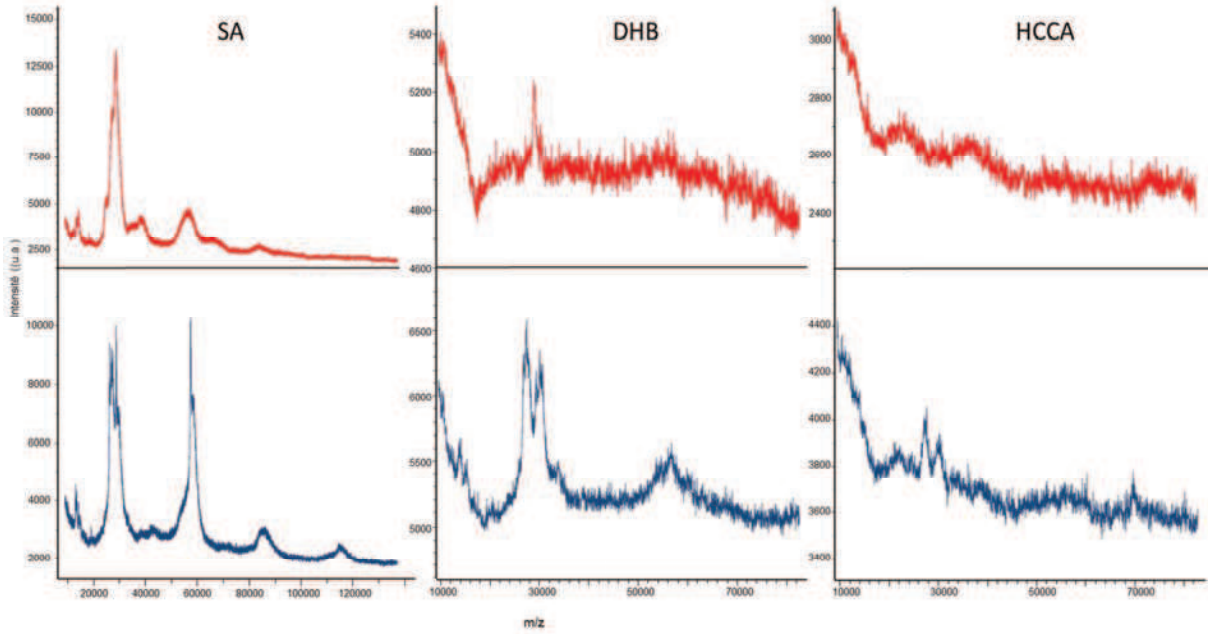


Figure 40 : Analyse par MALDI-TOFMS des protéines CDC25A (rouge) et C (bleu) avec les matrices 2,5-DHB, HCCA et SA (mélanges intimes).

Les spectres obtenus avec les matrices 2,5-DHB et HCCA ne présentent pas ou que de très faibles signaux caractéristiques des protéines. Avec la matrice SA, plusieurs signaux caractéristiques des protéines sont visibles. Pour les deux protéines, les signaux des monomères $[M+H]^+$ ($m/z \approx 57000$), des bichargés $[M+2H]^{2+}$ ($m/z \approx 28500$) et trichargés $[M+3H]^{3+}$ ($13000 < m/z < 14500$) sont observés. Pour CDC25C seulement, le pic du dimère $[2M+H]^+$ ($m/z \approx 114300$) de faible intensité est identifié. La GST est une protéine de 218 acides aminés et ayant une masse approximative de 25500 Da. On peut en déduire que les épaulements à gauche des pics bichargés des protéines correspondent au monomère de la GST, et que l'on observe également le pic du monomère du complexe CDC25-GST (**Figure 41**).

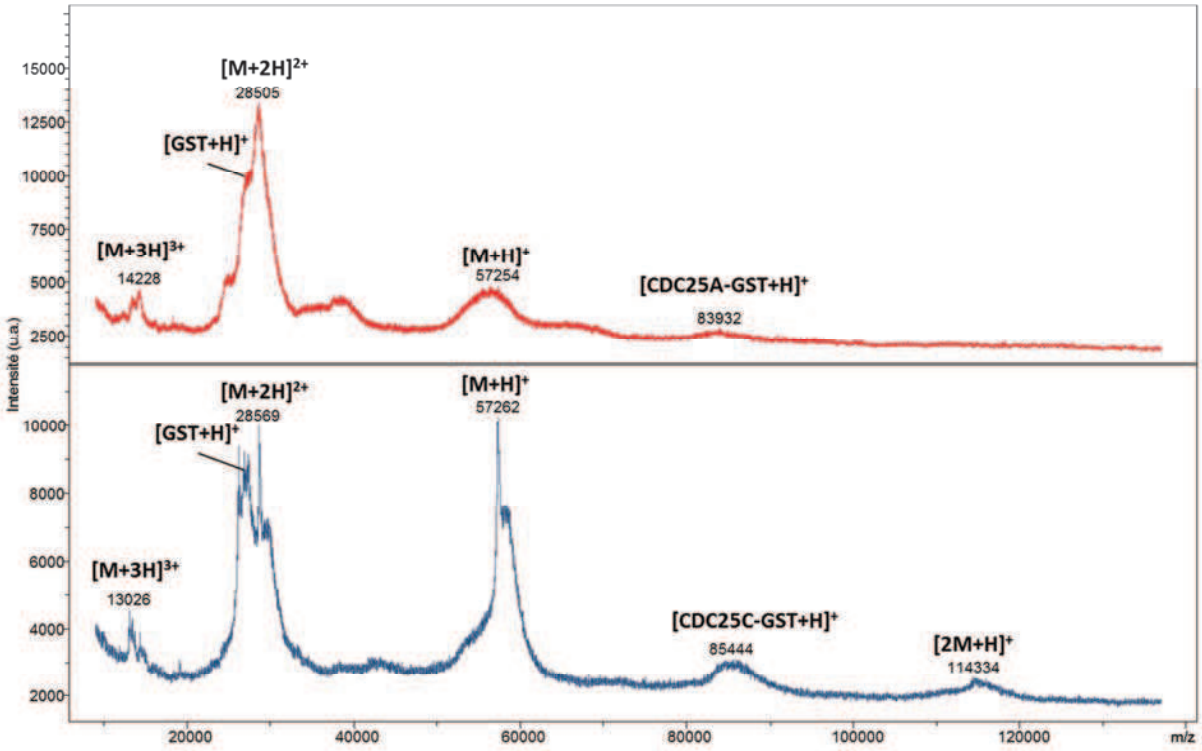


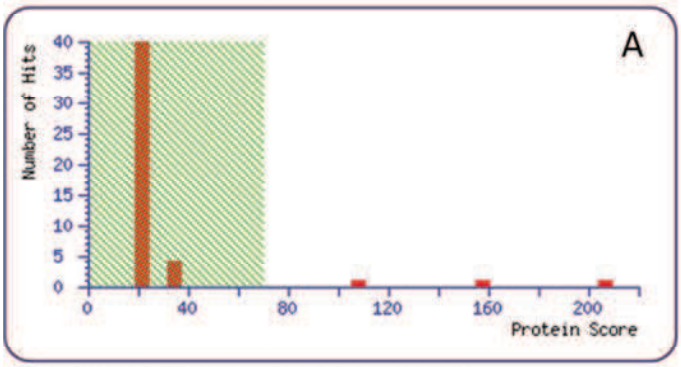
Figure 41 : Spectres MALDI-TOF des CDC25A (rouge) et C (bleu) avec la matrice SA (conditions expérimentales identiques à celles de la Figure 40).

Ces observations ont été ultérieurement confirmées par l'analyse PMF des protéines (protocole expliqué au paragraphe III.4). Les résultats obtenus après soumission à MASCOT™ d'une analyse MALDI-FTICRMS des CDC25A et C après digestion montrent que le digest analysé est bien constitué d'un mélange de CDC25A ou C avec la GST. Un exemple de résultat de soumission à MASCOT™ (moteur de recherche) à la banque de données Swissprot des protéines recombinantes utilisées est montré à la **Figure 42**. L'encadré A présente un histogramme du score des protéines proposées. Ce score correspond à un indice de confiance, plus il est élevé plus le candidat proposé est fiable (fiable à partir de 70). L'encadré B correspond aux candidats proposés, du score le plus élevé au plus faible. Nous pouvons constater que le premier candidat proposé est bien un mélange de « MPIP1_HUMAN » (CDC25A) et GST26_SCHJA, résultat en accord avec l'analyse des protéines par spectrométrie de masse.

Suite à ces résultats, nous avons choisi de ne travailler qu'avec cette solution de matrice SA pour la suite des analyses des protéines en hautes masses.

Mascot Score Histogram

Protein score is -10*Log(P), where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 70 are significant (p<0.05).



Concise Protein Summary Report

Format As | Concise Protein Summary | Help

Significance threshold p< 0.05 | Max. number of hits 20

Re-Search All | Search Unmatched

B

```
1.    Mixture 1    Total score: 207    Expect: 1.1e-15  Matches: 45
      Components (only one family member shown for each component):
      MPIP1_HUMAN    Mass: 59049    Score: 156    Expect: 1.4e-10  Matches: 26
      M-phase inducer phosphatase 1 OS=Homo sapiens GN=CDC25A PE=1 SV=2
      GST26_SCHJA    Mass: 25482    Score: 109    Expect: 6.8e-06  Matches: 19
      Glutathione S-transferase class-mu 26 kDa isozyme OS=Schistosoma japonicum PE=1 SV=3
```

Figure 42 : Résultat d'une soumission MASCOT™ à la banque de données Swissprot du spectre de masse MALDI-FTICR d'une analyse de CDC25A digérée. *Le score obtenu est de 207 pour un mélange de CDC25A et de GST.*

II.2. Les inhibiteurs réversibles

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre I, seulement peu de ligands des CDC25s font partie de la classe des inhibiteurs réversibles. Les recherches actuelles portent moins d'attention sur ce type d'inhibiteurs car étant réversibles, leur action semble moins intéressante d'un point de vue thérapeutique. Cependant quelques classes moléculaires ont été reportées comme étant des inhibiteurs réversibles des CDC25s, et parmi celles-ci on retrouve les indolyl-[1,4]-hydroxyquinones[5] et des [1,2]-hydroxyquinones comme le composé 5169131[6]. Puisque nous n'avons pas trouvé d'inhibiteur réversible commercialement disponible, nous avons choisi de développer notre test avec le composé 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone.. Afin de vérifier que le test de criblage était

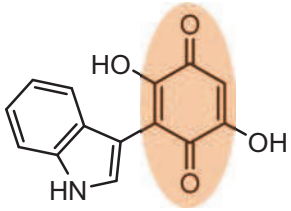
[5] J. Sohn, B. Kiburz, Z. Li, L. Deng, A. Safi, M. C. Pirrung and J. Rudolph, J. Med. Chem. 46 (2003) 2580-2588.

[6] M. Brisson, T. Nguyen, A. Vogt, J. Yalowich, A. Giorgianni, D. Tobi, I. Bahar, C. R. J. Stephenson, P. Wipf and J. S. Lazo, Mol. Pharm. 66 (2004) 824-833.

fonctionnel, nous l'avons appliqué au composé SV37, composé synthétisé par le LIMBP et dont l'étude est en cours de publication[7]. Cette molécule a montré un comportement d'inhibiteur réversible au cours des tests *in vitro* sur les CDC25s.

II.2.1. La 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone

La structure du composé 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone ($C_{14}H_8O_4N$) est représentée sur la **Figure 43**. Le mode de fixation de ce composé aux protéines CDC25s a été prouvé comme étant réversible[5] et ses fortes propriétés électrophiles suggèrent une possible interaction avec le groupe nucléophile du thiolate situé dans la boucle du site actif des CDC25s. De plus, les liaisons hydrogènes intramoléculaires de ce composé réduisent significativement sa réactivité, ce qui l'empêcherait d'avoir un pouvoir réducteur et donc d'oxyder la cystéine catalytique du site actif[4]. Ce composé ne modifie aucun résidu du site actif de manière covalente.



2,5-dihydroxy-3-(1H-indol-3-yl)[1,4]benzoquinone
$C_{14}H_9NO_4$
MM = 255.053g/mol
$[M+H]^+$=256.0604

Figure 43 : Formules brute et développée de l'inhibiteur réversible 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone, masse moléculaire et rapport *m/z* de l'ion monoisotopique protoné $[M+H]^+$. *Le cercle orangé correspond à la fonction quinonique.*

Une quantité suffisante de ce composé a été synthétisée par le LIMBP selon la synthèse décrite en annexe III[8]. Une solution éthanolique à la concentration de 10^{-2}M a été réalisée, puis cette solution a été diluée à $2 \cdot 10^{-3}$M dans de l'eau ultrapure (18 MΩ). Cette solution est analysée par MALDI-TOFMS avec les matrices 2,5-DHB et HCCA en mode positif. La **Figure 44** présente les spectres obtenus.

7 E. Bana, E. Sibille, S. Valente, C. Cerella, P. Chaimbault, G. Kirsch, M. Diedrich and D. Bagrel, Mol. Carcinogen., sous presse (2013).

8 M. C. Pirrung, L. Deng, Z. Li and K. Park, J. Org. Chem. 67 (2002) 8374-8388.

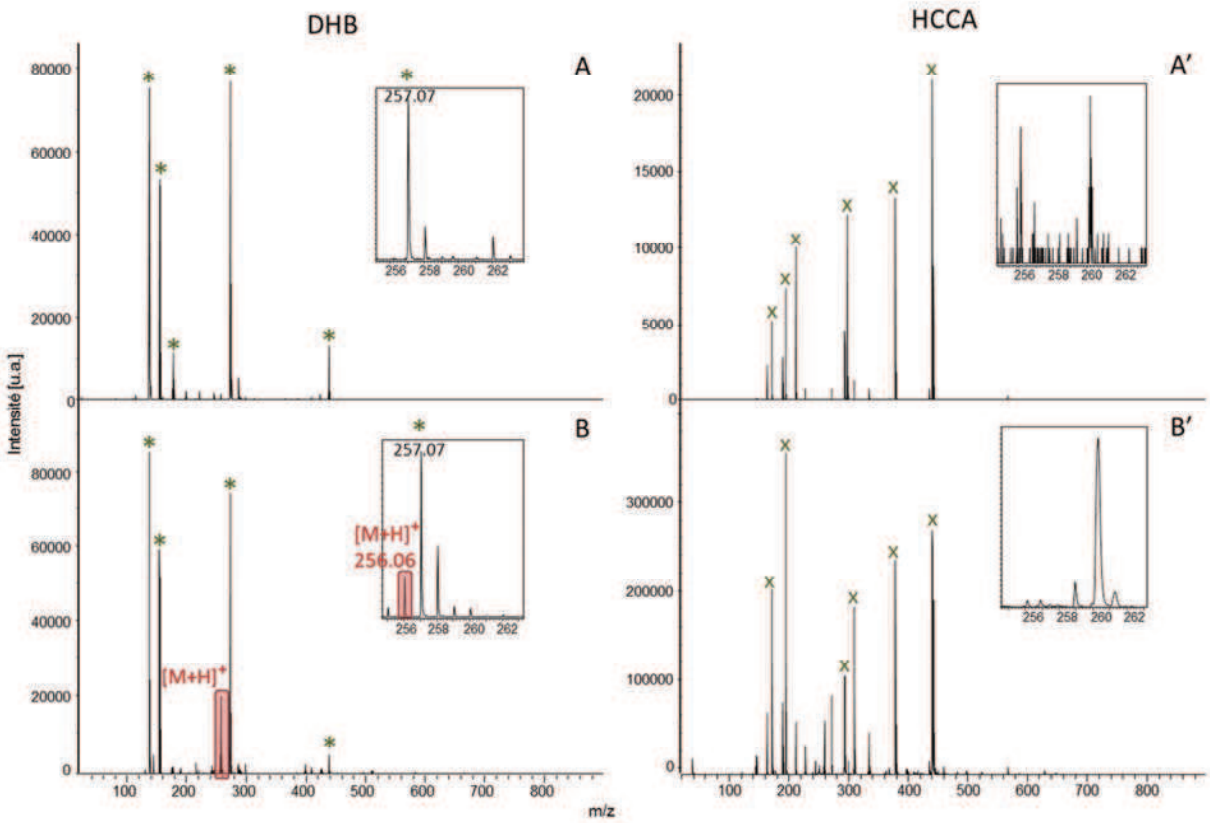


Figure 44 : Spectres de masse MALDI-TOF (A) de la matrice 2,5-DHB ; (B) du composé avec la 2,5-DHB ; (A') de la matrice HCCA ; (B') du composé avec l'HCCA. *Dépôts en mode goutte sèche, * et x correspondent aux principaux pics de matrices.*

Avec la matrice HCCA, le pic moléculaire du composé à *m/z* 256 n'est pas détecté. Avec la matrice 2,5-DHB, nous constatons que le pic moléculaire $[M+H]^+$ du composé étudié à *m/z* 256 est détecté, bien qu'un pic de matrice à *m/z* 257 vient interférer avec le signal du 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone. La résolution atteinte pour le pic moléculaire est d'environ 6000 et la précision sur la mesure en masse de 8 ppm. Afin de vérifier que le pic à *m/z* 257 s'agit bien d'un pic de matrice, nous avons analysé le composé par MALDI-FTICRMS avec la 2,5-DHB, dont le détecteur permet d'obtenir une résolution et une précision en masse supérieure. Le spectre est présenté à la **Figure 45A** montre que les ions $M^{\cdot+}$ et $[M+H]^+$ aux *m/z* 255,0525 et 256,0604 respectivement sont détectés avec une précision en masse de 2,3 ppm. L'ion à *m/z* 257,0683 ne peut pas être l'ion protoné de composé contenant un ^{13}C (*m/z* théorique 257,0638) puisque la précision en masse serait alors de 17,5 ppm. De plus, une résolution minimum de 58000 est requise pour distinguer ces deux pics et la résolution $m/\Delta m$ mesurée à *m/z* 257 est de 265000.

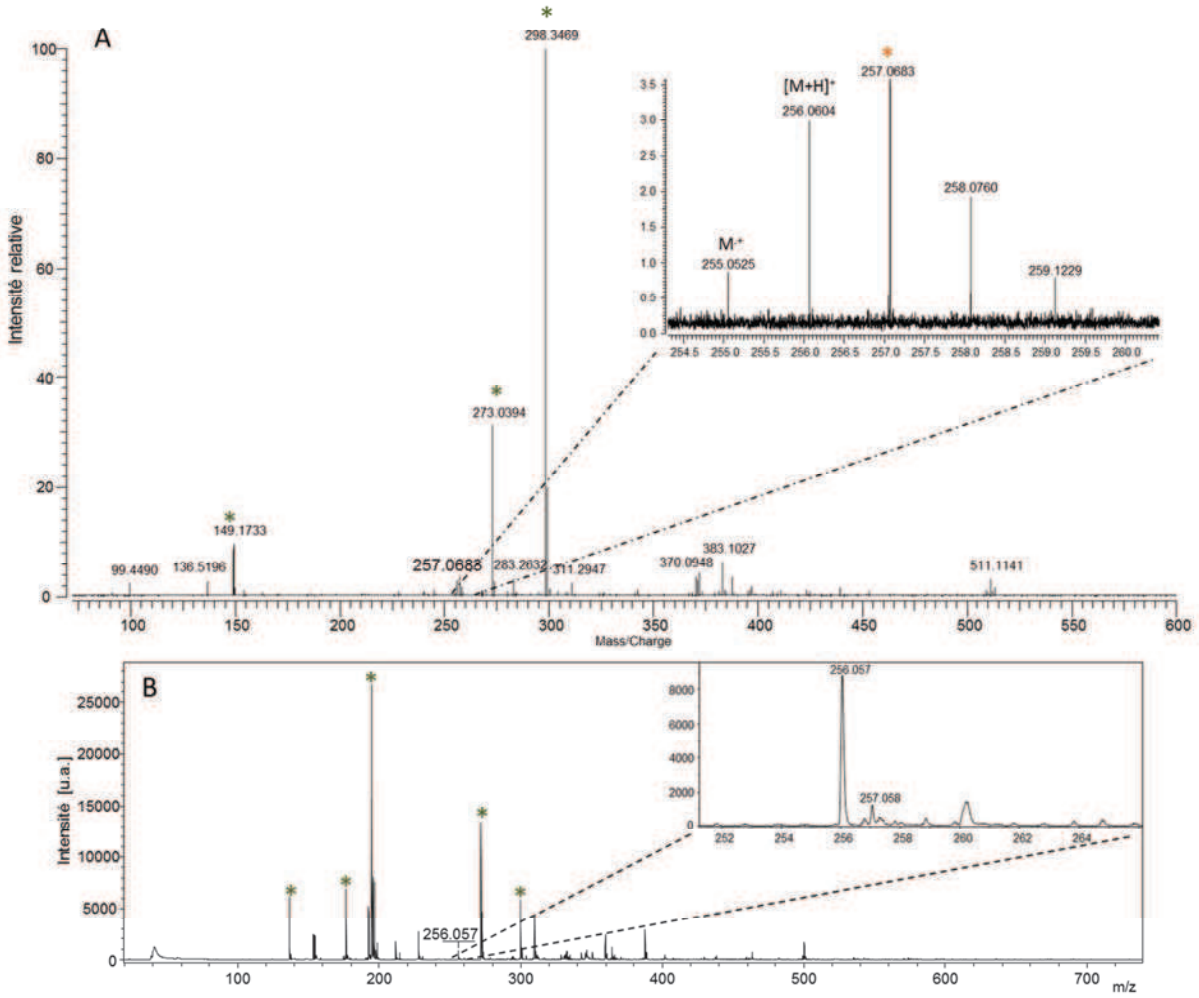


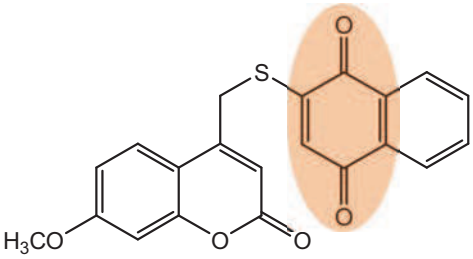
Figure 45 : Analyse de la 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone (A) Spectre MALDI-FTICR avec la matrice 2,5-DHB ; (B) Spectre MALDI-TOF avec la matrice 2,5-DHB fraîchement recristallisée. ** correspond aux principaux pics de matrice et * représente un pic interférant de matrice.*

Si elle ajoute une étape supplémentaire à la manipulation, la recristallisation de la matrice permet quelquefois de s'affranchir de pics interférents. L'analyse de ce composé a donc également été réalisée avec la matrice 2,5-DHB fraîchement recristallisée selon le protocole suivant. Une solution saturée de 2,5-DHB dans ACN/H_2O 50:50 (v/v) est chauffée jusqu'à complète dissolution du solide. La solution est ensuite refroidie à température ambiante, puis dans de la glace jusqu'à ce qu'un précipité se forme. Le précipité est ensuite filtré et séché. La **Figure 45B** nous montre que le pic à *m/z* 257,058 correspond à l'isotope ^{13}C, et non plus à un pic interférant de matrice (abondance relative expérimentale à 14,4% et théorique à 15,1%).

Après avoir effectué ces vérifications, nous avons donc décidé de travailler avec la matrice 2,5-DHB.

II.2.2. Le composé SV37

Le composé SV37 a été synthétisé par l'équipe du LIMBP. Ce composé qui présente également une structure para-quinonique est représenté à la **Figure 46**. Les études menées sur cet inhibiteur ne suffisent pas à l'instant de la rédaction de ce document à démontrer clairement son mode de fixation aux CDC25s, mais les résultats des tests biologiques que nous présenterons plus loin dans ce manuscrit indiquent sa vraisemblable inhibition réversible envers les deux isoformes étudiées.



SV37
$C_{21}H_{14}O_5S$
MM: 378.056 g/mol
$[M+H]^+$= 379.0635

Figure 46 : Formules brute et développée du composé SV37, masse moléculaire et rapport *m/z* de l'ion monoisotopique protoné $[M+H]^+$. *Le cercle orangé correspond à la fonction quinonique.*

Une solution éthanolique de SV37 est réalisée à 10^{-2}M, puis diluée dans de l'eau ultrapure à $2 \cdot 10^{-3}$M. Cette solution est analysée par MALDI-TOFMS avec les matrices 2,5-DHB et HCCA en mode positif. Les spectres obtenus sont présentés **Figure 47**. Comme on peut le constater sur cette figure, l'étude du SV37 avec la HCCA nous montre qu'un pic de matrice à *m/z* 379,09 correspondant à $[2HCCA+H]^+$ vient interférer avec notre composé, dont la masse du pic moléculaire est *m/z* 379,06. Cela rend toute étude impossible pour notre composé. Par contre, avec la matrice 2,5-DHB, le signal du pic moléculaire $[M+H]^+$ obtenu est bien identifié, bien qu'un pic à *m/z* 381,07 soit un peu plus intense que le pic moléculaire. Une distribution isotopique de ce type a déjà été observée par Calba *et al.* pour les composés riches en électrons (spirooxazines)[9]. Les ions abondants à M+2 et M+3 ont été attribués à des ions hydrogénés $[M+H_2]^{\cdot+}$ et $[M+H_2+H]^+$, et peuvent correspondre à la réduction de la quinone en présence de protons et d'électrons dans la plume d'ablation MALDI (**Figure 48**).

[9] P. J. Calba, J. F. Muller, A. Hachimi, P. Laréginie and R. Guglielmetti, Rapid Comm. Mass Spectrom. 11 (1997) 1602-1611.

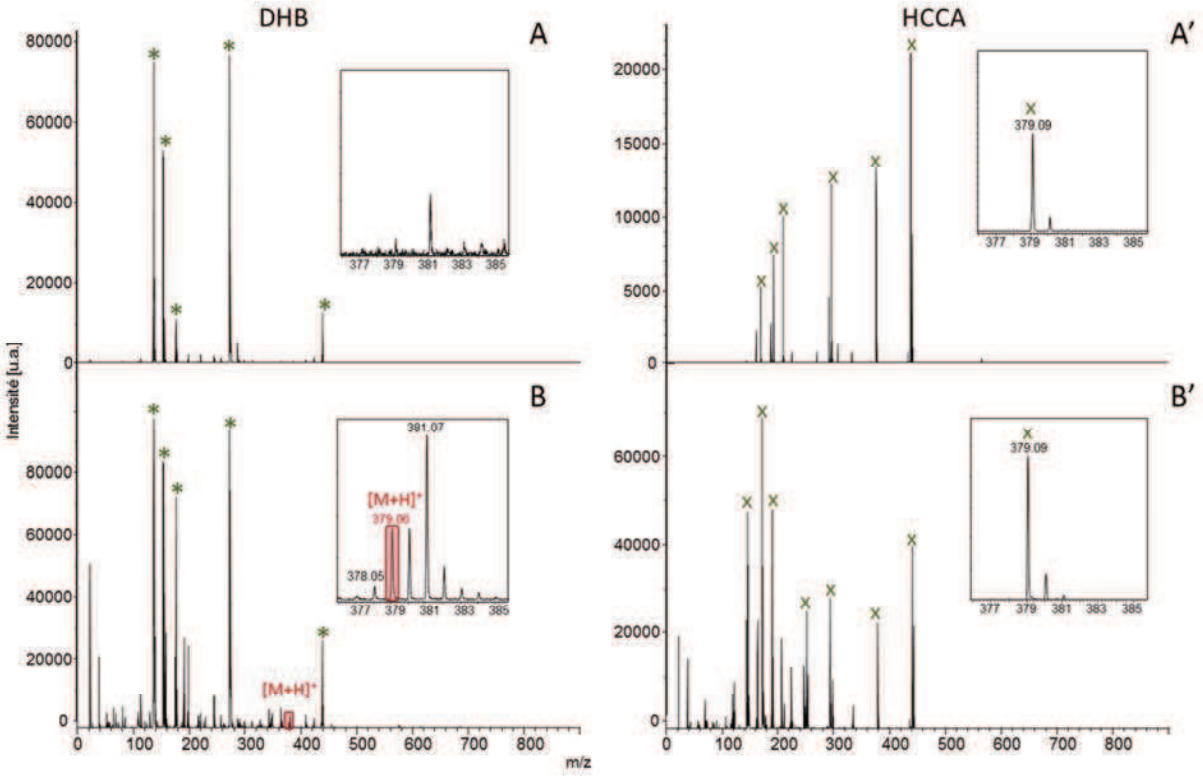


Figure 47 : Spectres MALDI-TOF (A) de la 2,5-DHB ; (B) du SV37 avec la 2,5-DHB ; (A') de l'HCCA ; (B') du SV37 avec l'HCCA. *Dépôts en goutte sèche, * et x correspondent aux principaux pics de matrices.*

Une analyse sans matrice (LDI « Laser Desorption Ionization ») a également été testée, mais l'ion $M^{\cdot+}$ détecté était de d'intensité bien inférieure et ce mode d'analyse n'était donc pas envisageable pour la suite de l'étude. Le pic de l'ion $M^{\cdot+}$ à *m/z* 378 est également identifié, bien que son intensité soit très faible. La résolution sur le pic à *m/z* 379 est de l'ordre de 5000 et la précision en masse par rapport à la masse théorique est d'environ 3 ppm. Pour la suite de notre étude, nous travaillerons avec la matrice 2,5-DHB pour l'analyse du SV37.

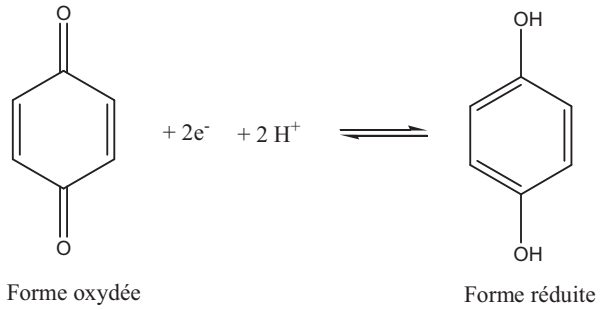


Figure 48 : Réaction de réduction de la quinone.

II.3. Les inhibiteurs irréversibles

Le choix d'inhibiteurs irréversibles pour le développement du test de criblage s'est porté sur les composés BN82002 et NSC663284. Nous avons tout d'abord choisi le BN82002 car il est utilisé comme témoin au laboratoire de biologie pour les tests *in vitro* sur les CDC25s. De plus, il était commercialisé chez Sigma Aldrich avant son interruption en 2012. Afin de valider notre test sur les inhibiteurs irréversibles formant une liaison covalente, nous avons choisi le composé NSC663284 car sa liaison aux protéines CDC25 est clairement établie.

II.3.1. Le BN82002

Le BN82002 est décrit dans la littérature comme étant un inhibiteur irréversible des CDC25s[10,11]. Bien que le mode d'action de ce composé ne soit pas clairement établi, une étude émet l'hypothèse que cet inhibiteur inhibe l'activité des CDC25s par une réaction d'oxydo-réduction provoquant la création d'un pont disulfure de la cystéine catalytique du site actif[12].

La structure de ce composé est représentée **Figure 49**. Comme on peut le constater, ce composé n'est pas de type quinonique mais il montre au moins deux sites basiques protonables permettant son analyse par spectrométrie de masse en mode de détection positif.

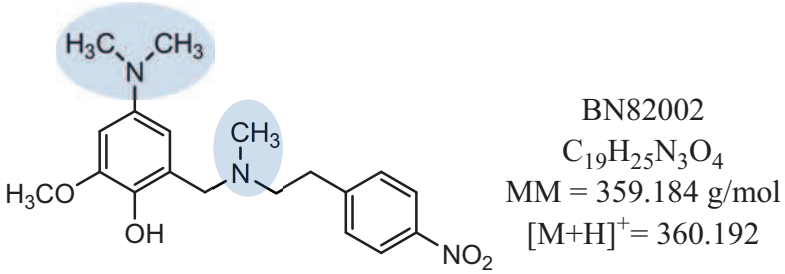


Figure 49 : Formules brute et développée du composé BN82002, masse moléculaire et rapport *m/z* de l'ion monoisotopique protoné [M+H]$^+$. *Les cercles bleus correspondent aux sites basiques du composé.*

Une solution éthanolique de BN82002 (Sigma Aldrich, Saint Quentin, Fallavier, France) à 10^{-2}M est réalisée, puis diluée dans de l'eau ultrapure à $2 \cdot 10^{-3}$M. Cette solution est alors analysée par MALDI-TOFMS avec les matrices 2,5-DHB et HCCA. Les spectres sont présentés à la **Figure 50**.

---

10 M. C. Brezak, M. Quaranta and O. Mondésert, Cancer Res. 64 (2004) 3320-3325.

11 M.-C. Brezak, P. G. Kasprzyk, M.-O. Galcera, O. Lavergne and G. P. Prevost, Anti-Cancer Agents Med. Chem. 8 (2008) 857-862.

12 M. O. Contour-Galcéra, O. Lavergne, M. C. Brezak, B. Ducommun and G. Prévost, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 5809-5812.

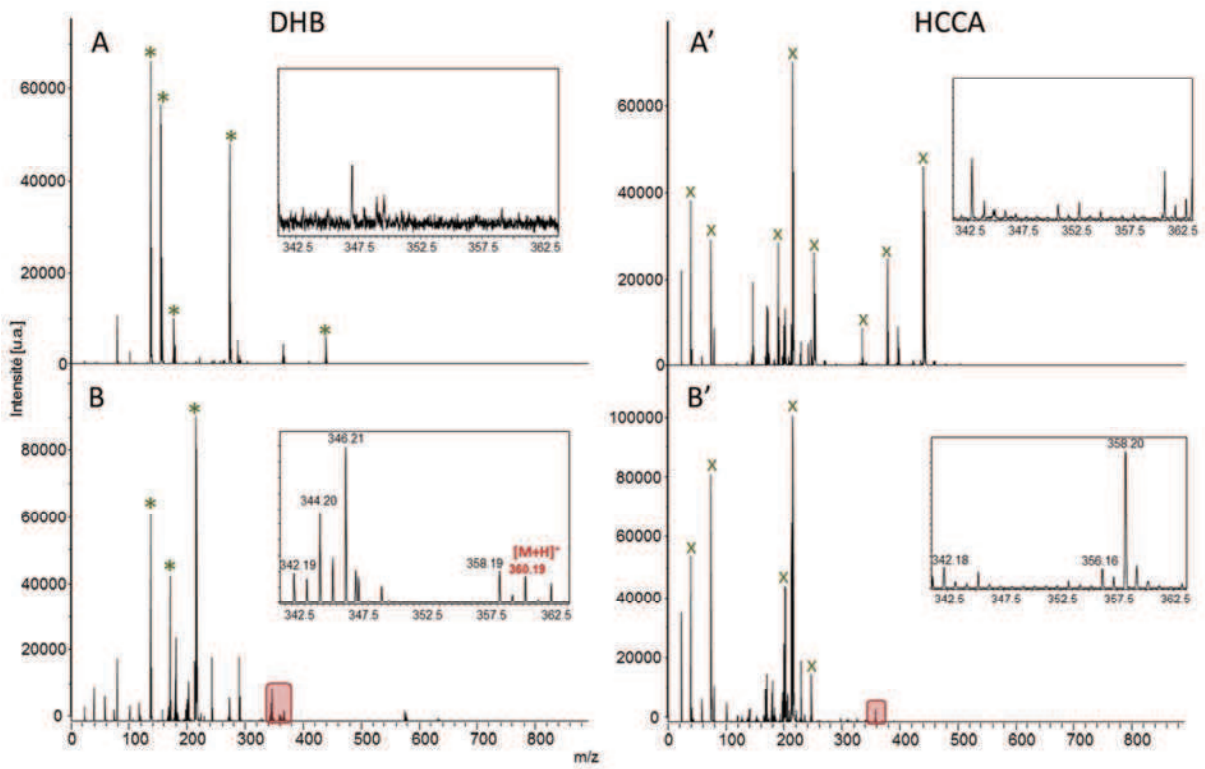


Figure 50 : Spectres de masse MALDI-TOF (A) de la 2,5-DHB ; (B) du composé avec la 2,5-DHB ; (A') de l'HCCA ; (B') du composé avec l'HCCA. *Dépôts en goutte sèche, * et x correspondent aux principaux pics de matrices.*

Comme nous pouvons le constater sur les spectres, la matrice HCCA n'est pas adaptée à l'analyse du BN82002 pour deux raisons. La première est que nous observons quelques pics interférant dans la zone d'ionisation du BN82002, c'est-à-dire entre 358 <*m/z* < 362, et la deuxième raison est que l'ionisation du BN82002 ne produit qu'un ion majoritaire à *m/z* 358,20 correspondant à $[M-H]^+$, ce qui n'est pas adapté à son étude par la suite. Par contre avec la 2,5-DHB, il n'y a aucun pic interférant dans cette gamme de masse et l'ionisation du composé permet d'obtenir le pic moléculaire $[M+H]^+$ à *m/z* 360,19. La résolution obtenue sur le pic moléculaire du BN82002 est d'environ 7700 et la précision en masse de 15 ppm. Cependant nous observons une distribution isotopique plutôt compliquée avec plusieurs pics dans la gamme de masse 342 < *m/z* < 348 qui semblent liées au composé BN82002. Afin de mieux comprendre cette distribution, nous avons analysé le BN82002 par MALDI-FTICRMS avec la matrice 2,5-DHB. Cet analyseur permet d'obtenir une précision en masse supérieure au MALDI-TOF et permet d'attribuer les pics observés. Le spectre obtenu est représenté à la **Figure 51**.

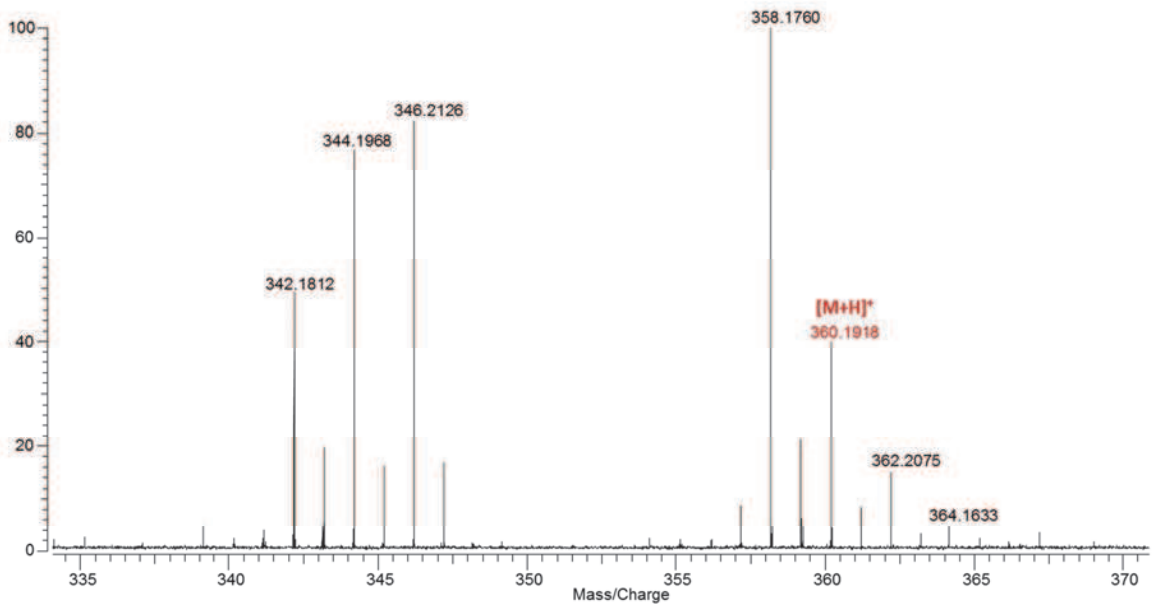


Figure 51 : Spectre de masse MALDI-FTICR du BN82002 avec la matrice 2,5-DHB. *Dépôt goutte sèche.*

Cette analyse nous a permis d'attribuer la masse exacte aux pics observés par MALDI-TOFMS et dont l'attribution a été réalisée avec une erreur sur la mesure en masse moyenne de 0,2 ppm sur la gamme 273 < *m/z* < 409. Une première hypothèse serait une perte de H_2O du BN82002 à *m/z* 342,1812 puis deux agrégats H_2 successifs aux masses *m/z* 344,1968 et 346,2126. On observe également la perte d'un proton à la masse *m/z* 358,1760 et un agrégat H_2 à partir du pic moléculaire à la masse *m/z* 362,2075. Cependant la fragmentation SORI-CID de l'ion protoné à *m/z* 360,1918 ne donne qu'un seul ion fils à *m/z* 180,10, pouvant être attribué à la formule brute $C_{10}H_{14}NO_2^+$ (**Figure 52**). Si l'ion à *m/z* 344,1938 correspondait à une perte d'eau de l'ion moléculaire protoné, il aurait également été détecté lors de sa fragmentation. Nous pouvons donc supposer que les ions entre 342 < *m/z* < 346 correspondent à une dégradation du composé dans le temps.

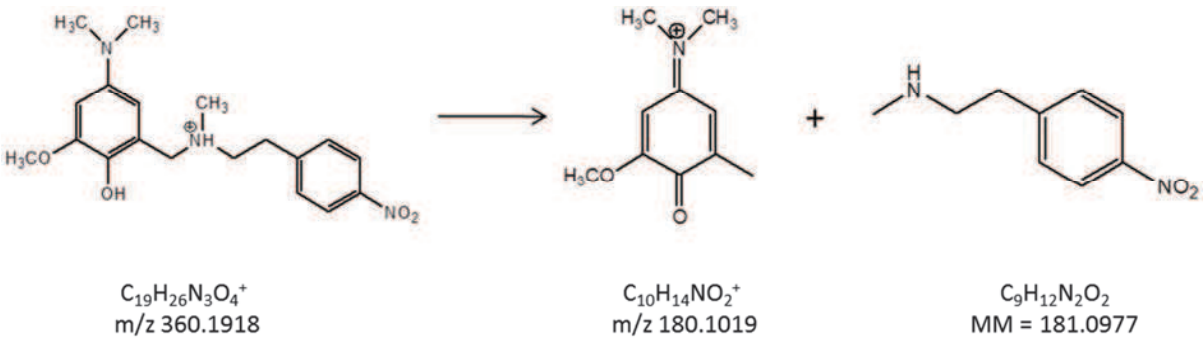


Figure 52 : Hypothèse de fragmentation du BN82002. *Le fragment détecté est l'ion $C_{10}H_{14}NO_2^+$.*

II.3.2. Le NSC663284

Le composé NSC663284 est le deuxième inhibiteur irréversible des CDC25s que nous avons utilisé pour valider notre test. Ce composé est décrit dans la littérature comme étant un inhibiteur formant une liaison covalente avec la sérine Ser[434] du site catalytique des protéines[13]. L'hypothèse de la réaction entre NSC663284 et CDC25A est représentée **Figure 53**, la stœchiométrie impliquée est de 1:1 protéine:composé avec une perte d'une molécule de HCl.

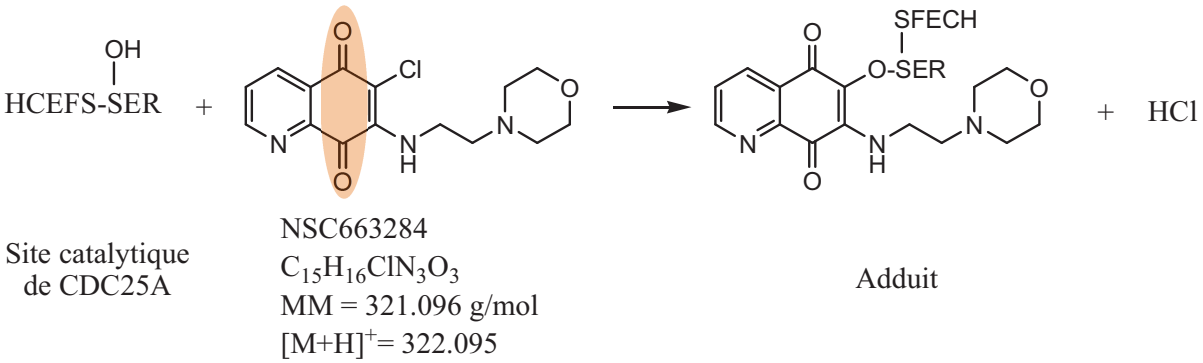


Figure 53 : Hypothèse de réaction entre le NSC663284 et le site catalytique de CDC25A. *Le cercle orangé correspond à la fonction quinonique.*

Une solution éthanolique de NSC663284 (Sigma Aldrich, Saint Quentin, Fallavier, France) à 10^{-2} M est réalisée, puis diluée à $2 \cdot 10^{-3}$ M dans de l'eau ultrapure. Cette solution est analysée par MALDI-TOFMS avec les matrices 2,5-DHB et HCCA. Les spectres obtenus sont représentés à la **Figure 54**. Comme nous pouvons le constater, les deux matrices HCCA et 2,5-DHB permettent d'ioniser le NSC663284 car le pic moléculaire protoné $[M+H]^+$ est observé dans les deux cas à *m/z* 322,1. La résolution obtenue est d'environ 5000 avec la 2,5-DHB et 6000 avec l'HCCA, pour une précision en masse de 3 ppm et 5 ppm respectivement. Cependant la distribution isotopique de ce composé est similaire à celle de SV37, c'est-à-dire que le pic correspondant à $[M+H_2+H]^+$ à *m/z* 324 est beaucoup plus intense que le moléculaire. Cet aspect est dû, comme dans le cas du SV37, à la réduction de la quinone (**Figure 48**).

[13] L. Pu, A. Amoscato, M. Bier and J. Lazo, J. Biol. Chem. 277 (2002) 46877-46885.

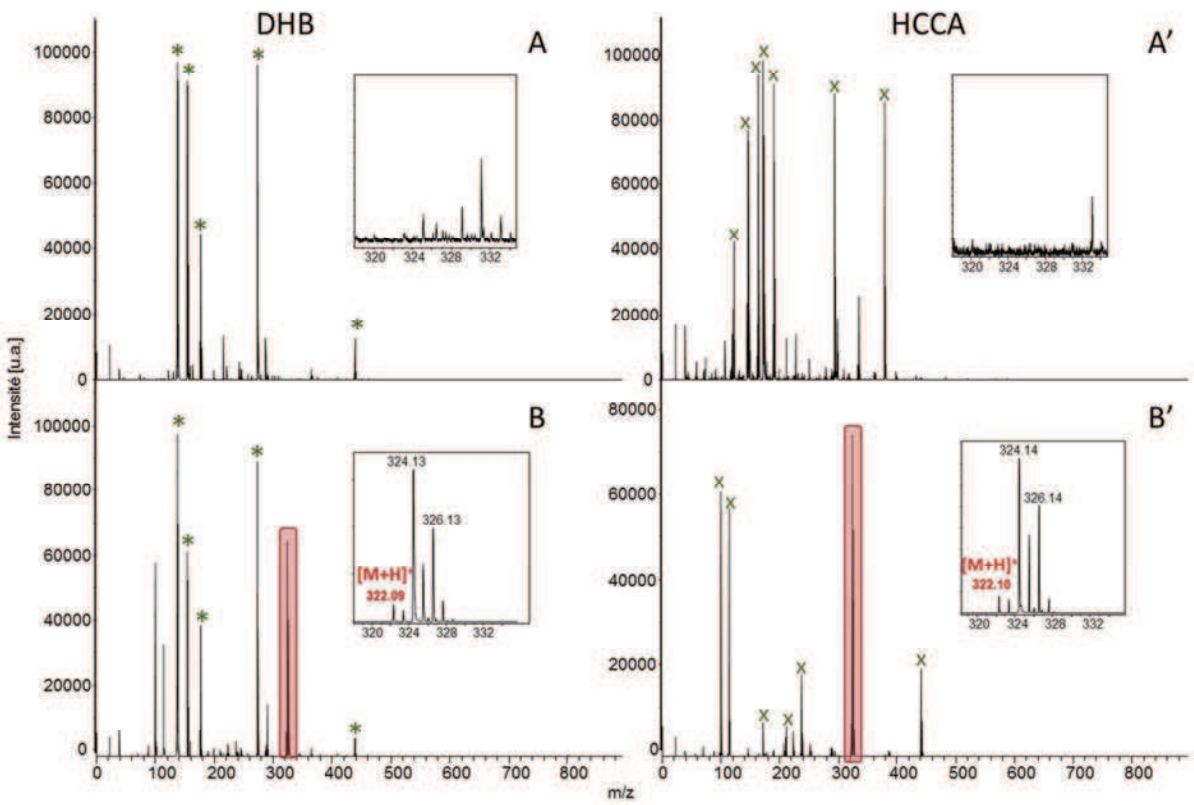


Figure 54 : Spectres de masse MALDI-TOF (A) de la 2,5-DHB ; (B) du composé avec la 2,5-DHB ; (A') de l'HCCA ; (B') du composé avec l'HCCA. *Dépôts en goutte sèche, * et x correspondent aux principaux pics de matrices.*

Ce composé pouvant être ionisé avec une matrice de faible affinité protonique, nous en déduisons qu'il possède une faible affinité protonique et le transfert de proton est donc beaucoup plus énergétique que pour les autres composés déjà présentés. Ceci explique également que le pic à *m/z* 324 soit très intense. Les deux matrices permettant l'ionisation de NSC663284, nous travaillerons avec la 2,5-DHB seule puisque c'est cette matrice qui est utilisée pour l'analyse des autres composés.

II.4. Le témoin négatif : l'amiodarone

Un aspect important pour valider notre test est de vérifier que les cibles moléculaires choisies n'offrent pas de site de liaison à toute molécule de basse masse. Nous avons donc testé l'amiodarone[14] (**Figure 55A**), un antiarythmique dénué de toute activité inhibitrice de CDC25s connue. Ainsi nous avons utilisé cette molécule comme témoin négatif pour la suite de la validation de notre test. Une solution éthanolique d'amiodarone (Sigma Aldrich, Saint Quentin, Fallavier, France) est réalisée à 10^{-2}M, puis diluée à $2 \cdot 10^{-3}$M dans de l'eau ultrapure. Cette solution est ensuite

[14] V. R. Vorperian, T. C. Havighurst, S. Miller and C. T. January, J. Am. Coll. Cardiol. 30 (1997) 791-798.

analysée par MALDI-TOFMS avec les matrices 2,5-DHB et HCCA (**Figure 55B et C**). Le pic moléculaire $[M+H]^+$ à *m/z* 646 est observé avec les deux matrices.

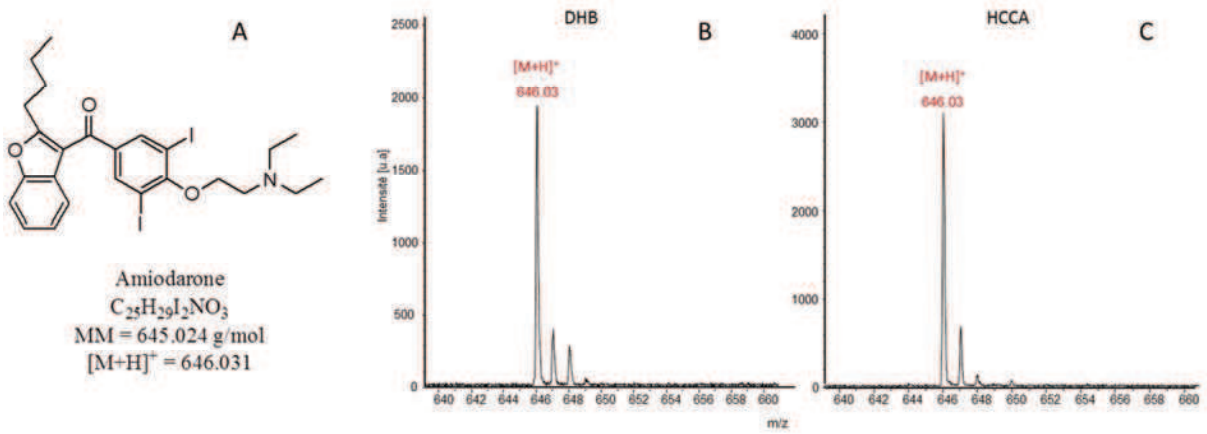


Figure 55 : (A) Structure et données massiques de l'amiodarone et spectres de masse MALDI-TOF du composé avec (B) la 2,5-DHB et (C) l'HCCA. *Dépôts en goutte sèche.*

II.5. Bilan et commentaires associés à l'approche utilisée

Nous avons ainsi analysé par spectrométrie de masse tous les composés que nous allons utiliser lors du développement et de la validation de notre test de criblage. Nous avons pu déterminer les conditions d'analyse MALDI favorables pour la détection des protéines CDC25 ainsi que celles de leurs ligands, réversibles et irréversibles, utilisés comme témoins positifs lors du criblage. Nous avons obtenu pour chaque ligand le signal caractéristique de leur pic moléculaire, avec une précision sur la mesure en masse inférieure à 20 ppm. La SA est donc la matrice que nous avons choisie d'utiliser pour l'analyse des cibles moléculaires de hautes masses, et la 2,5-DHB est la matrice que nous utiliserons pour l'analyse des ligands, de basses masses. Le choix et l'utilisation de cette matrice seront discutés à la fin de ce chapitre dans l'optique d'automatisation du test de criblage. Le mode de dépôt également choisi est celui de la goutte sèche. Le **Tableau 3** regroupe les différentes molécules étudiées, avec leurs formules, masses molaires et $[M+H]^+$ théoriques.

Tableau 3 : Molécules utilisées au cours du développement du test de criblage.

Molécule	Formule	MM (g/mol)	$[M+H]^+$ théorique
2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone	$C_{14}H_8O_4N$	255,0532	256,0604
SV37	$C_{21}H_{14}O_5S$	378,0562	379,0635
BN82002	$C_{19}H_{25}N_3O_4$	359,1845	360,192
NSC663284	$C_{15}H_{16}ClN_3O_3$	321,0880	322,0953
Amiodarone	$C_{25}H_{29}I_2NO_3$	645,0237	646,0310

III. Développement du test de criblage

Comme nous l'avons indiqué précédemment, le test de criblage de cible moléculaire développé dans cette partie comporte 4 étapes. Dans cette partie nous allons nous attacher à décrire ces étapes l'une après l'autre. Dans un premier temps nous discuterons de la 1ère étape concernant les conditions d'incubation des molécules à tester avec la cible. La 2ème étape détaillera les différentes étapes nécessaires à l'élimination des molécules non liées à la cible, la 3ème et la 4ème étape portant directement sur l'analyse et la détection des ligands réversibles et irréversibles. Nous détaillerons ces deux parties selon les différentes caractéristiques des inhibiteurs.

III.1. Incubation des molécules à tester avec la cible

La 1ère étape du test de criblage consiste à incuber ensemble la cible moléculaire et les molécules à tester. Pour cela, il est impératif de choisir un milieu physiologique proche de celui de la protéine *in vivo* afin de la garder dans son état natif. Le domaine catalytique, dont le site actif des protéines est formé dans une certaine conformation spatiale, ne doit pas être modifié afin d'avoir une activité maximale des protéines. Pour ce faire, les conditions d'incubation doivent être non dénaturantes, autrement dit ni acide ni basique, et elles ne doivent pas contenir de solvant organique (ou au maximum 15%). D'autre part, le diméthylsulfoxyde (DMSO), solvant fréquemment utilisé lors des analyses biochimiques, ne convient pas à notre approche : son temps d'évaporation et de séchage extrêmement long est incompatible avec une analyse MALDI.

Puisque les protéines recombinantes CDC25 sont conservées après production dans un tampon Tris A à pH 8 (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT), notre milieu d'incubation sera principalement constitué de ce tampon. Les molécules à tester sont en solution aqueuse contenant 12,5% d'éthanol. Afin de conserver au maximum ce milieu tampon, le volume de

protéines incubées sera largement supérieur au volume de molécules à tester, et ainsi la proportion de solvant organique sera la plus faible possible.

Après avoir spécifié le milieu d'incubation, il a fallu évaluer un temps d'incubation pertinent afin que les molécules à tester puissent former un complexe avec la cible. Ce temps d'incubation a été porté à une heure, comme décrit dans l'étude de P. Hannewald[2]. Ce temps de contact est suffisant pour étudier les molécules ayant une faible affinité avec la cible ou dont le temps de liaison est lent.

Un autre paramètre important dans cette première étape était de s'assurer d'être en condition de cible limitant (la concentration de la protéine doit être environ 10 fois plus faible que la concentration de molécules à tester afin d'utiliser tous les sites de liaison possible offerts par les protéines). Puisque la CDC25A produite est plus concentrée que la CDC25C, nous avons incubé 10 µL de molécules à tester à la concentration de $2 \cdot 10^{-3}$M en solution aqueuse (+ 12,5% éthanol) avec 30 µL de CDC25A à environ $8 \cdot 10^{-5}$ M et 50 µL de CDC25C à environ $2 \cdot 10^{-5}$ M (dans le tampon Tris A). Ainsi, pour le test impliquant la CDC25A, les concentrations finales dans le milieu d'incubation sont de $6 \cdot 10^{-5}$M pour la protéine et $5 \cdot 10^{-4}$M pour les molécules à tester. Pour le test impliquant la CDC25C, les concentrations finales dans le milieu d'incubation sont de $1,6 \cdot 10^{-5}$M pour la protéine et $3,3 \cdot 10^{-4}$M pour les molécules à tester. La concentration en molécules à tester est donc environ 10 fois supérieure à celles des protéines afin d'être sûr d'être en condition de cible limitant. Ceci nous permettra d'avoir une meilleure sensibilité lors de l'analyse directe après criblage.

Pour terminer, il a fallu ajuster la température d'incubation. Les premiers tests ont tout d'abord été réalisés à 37°C afin de rester au plus près des conditions natives puis, suite à une panne de l'appareil bain-marie, les expérimentations ont été menées à température ambiante. Les résultats n'étant pas différents de ceux obtenus à 37°C nous avons décidé de conserver l'incubation à température ambiante.

Afin d'éviter toute contamination ou perte de matériel biologique possible, l'incubation a été réalisée dans un tube « LowBind» (Eppendorf AG, Hambourg, Allemagne) : ceux-ci permettent de s'affranchir de toute interaction entre la surface plastique du tube et son contenu.

Cette 1ère étape a donc pour but de permettre la formation des complexes CDC25A/C-molécule testée. La solution obtenue contient alors les éventuels complexes formés et des molécules non liées. Les différents paramètres optimisés ont été conservés pour chaque test de criblage réalisé et scrupuleusement respectés afin d'avoir la meilleure reproductibilité possible.

III.2. Elimination des molécules non liées à la cible

La 2ème étape de ce test consiste à éliminer les molécules testées non liées à la cible, pour ensuite n'avoir à analyser que les complexes CDC25-ligand covalents ou non covalents. Afin de conserver les complexes intacts, il est important d'effectuer cette étape en condition non dénaturante, en vue de leur analyse ultérieure.

La procédure mise en place repose sur la filtration-centrifugation de la solution d'incubation à travers un microconcentrateur. Ces microconcentrateurs permettent de concentrer une protéine de haut poids moléculaire (> 10000 Da) en solution, mais également de séparer cette protéine d'autres constituants de faibles poids moléculaires (< 1000 Da) à travers une membrane spécifique. Nous avons choisi d'utiliser des microconcentrateurs (MICROCON®, Millipore, Molsheim, France) constitués d'une membrane en cellulose permettant de séparer les molécules en fonction de leur masse. Ceux utilisés dans le cadre de ce test ont un seuil de 30000 Da, c'est-à-dire qu'ils laissent traverser toute molécule dont la masse est inférieure à 30000 Da, et retiennent sur la membrane les molécules dont la masse est supérieure à 30000 Da. Le dispositif utilisé est représenté à la **Figure 56**.

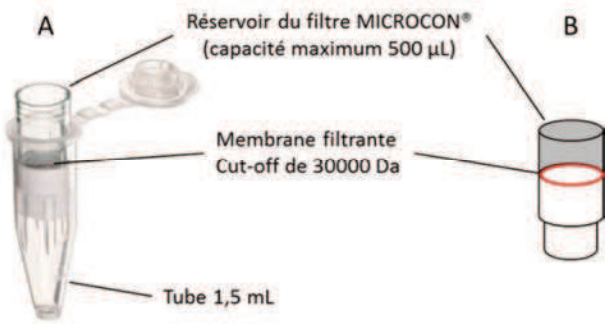


Figure 56 : (A) Photographie d'un microconcentrateur dans un tube 1,5 mL adapté ; (B) Schéma d'un microconcentrateur.

Le protocole d'utilisation de ces microconcentrateurs est divisé en 4 étapes distinctes. La première étape consiste à laver la membrane du glycérol qu'elle contient pour la protéger et éviter de « polluer » notre solution d'incubation. Le filtre est donc retourné dans son tube 1,5 mL, 100 µL d'eau ultrapure sont versés dans le filtre puis celui-ci est centrifugé 8 min à 8000 rpm. A partir de ce moment, il est impératif que la membrane du filtre ne soit jamais sèche, auquel cas elle pourrait se détériorer et modifier le résultat du test. Lors de la deuxième étape, le filtre est remis à l'endroit dans un nouveau tube 1,5 mL, la solution d'incubation (cible et molécules à tester) est ajoutée dans le réservoir du filtre puis centrifugé 8 min à 12000 rpm. Cette étape permet de séparer la cible protéique (et les molécules qui y sont fixées) des autres molécules de plus basses masses moléculaires n'ayant aucune affinité pour la cible. Une fois que la solution d'incubation est éliminée du filtre, la troisième étape consiste à le rincer 3 fois avec 100 µL d'eau ultrapure, en centrifugeant

entre chaque rinçage 10 min à 12000 rpm. Ces rinçages permettent de s'assurer que plus aucune molécule non fixée à la cible n'est retenue sur la membrane, et viendrait donc fausser nos résultats. La validation de cette étape sera faite à l'aide du témoin négatif. La quatrième et dernière étape consiste à récupérer les complexes « protéine-ligand » par dissolution dans 20 µL d'eau ultrapure. L'eau est donc ajoutée dans le filtre afin de rincer la membrane, puis reprise et conservée pour les analyses par spectrométrie de masse.

Le protocole établi permet donc de séparer les complexes d'intérêt cible-ligand des molécules n'ayant aucune affinité pour la cible. Il se doit de conserver la cible dans son état natif et d'être non dénaturant. Les étapes de rinçage de la membrane doivent être suffisantes pour éliminer toutes les molécules non liées à la cible, mais ne doivent pas être trop nombreuses car à chaque lavage une partie des ligands non covalents liés à la cible sont libérés[2], ce qui pourrait nuire à notre test (diminution de la sensibilité après analyse par MALDI-TOFMS). Le schéma présenté à la **Figure 57** résume le protocole d'utilisation des MICROCONS® dans le cadre de notre test de criblage.

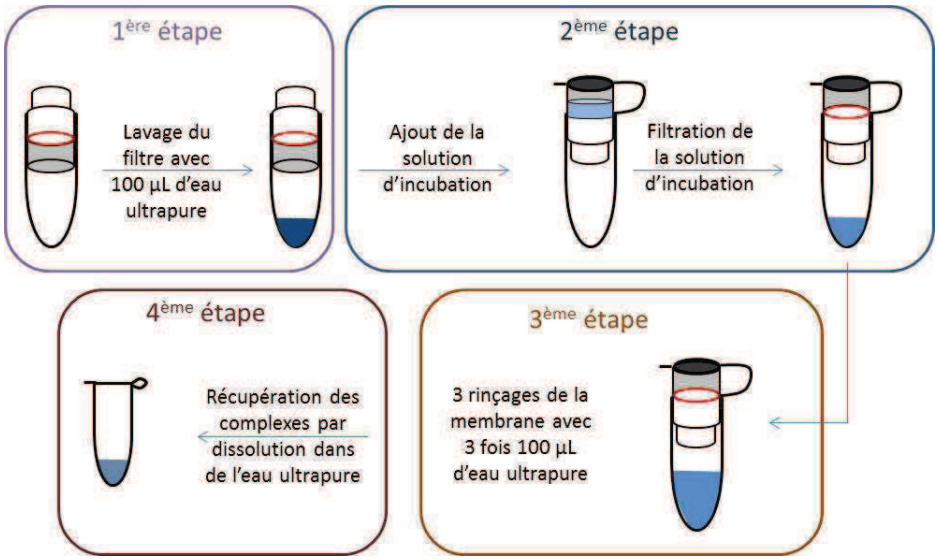


Figure 57 : Schéma du protocole d'utilisation des MICROCONS®.

III.3. Description de l'analyse directe par MALDI-TOFMS

Après avoir incubé la cible et les molécules à tester et appliqué le protocole d'utilisation des MICROCONS®, le retentat élué sur la membrane est analysé directement par MALDI-TOFMS. La liaison, de type non covalente, est facilement rompue par l'impact laser utilisé lors de l'analyse MALDI. De plus, les conditions légèrement dénaturantes apportées par la matrice (faiblement acide et solvant organique) aident à relarguer l'inhibiteur avant séchage de la matrice et augmentent ainsi

la sensibilité de l'analyse. La longueur d'onde du laser doit également être appropriée à la matrice, et la matrice elle-même appropriée à l'analyse des composés (cf. paragraphe II).

Avant toute analyse par spectrométrie de masse, les complexes obtenus après application du protocole de criblage sont d'abord dessalés à l'aide d'une pointe greffée en résine C18 ZipTip® (Millipore, Molsheim, France). En effet, comme les CDC25s sont conservées dans un tampon contenant une forte concentration en NaCl, il est préférable d'effectuer un dessalage des complexes afin d'obtenir une meilleure cristallisation avec la matrice lors du dépôt sur la plaque MALDI. Le protocole d'utilisation des pointes Zip Tip® C18 est présenté à la **Figure 58**.

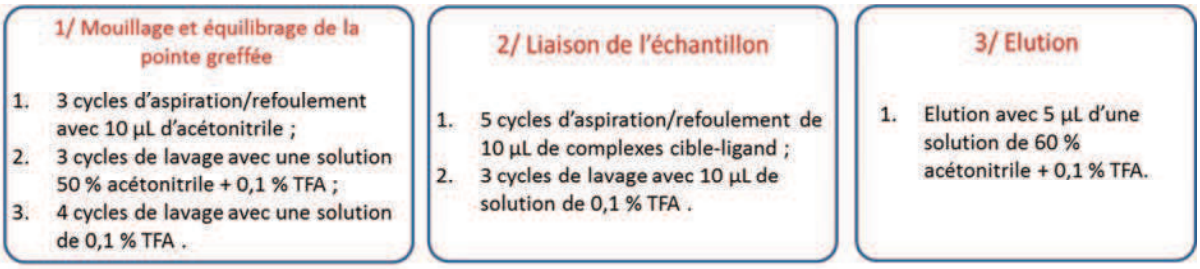


Figure 58 : Protocole d'utilisation d'une pointe ZipTip® C18.

L'application de ce protocole pour l'utilisation des pointes ZipTip® ne nous a pas posé de problème de sensibilité lors de la détection des inhibiteurs, et le MALDI n'étant pas une technique adaptée à la quantification de molécule nous n'avons pas observé de différence d'intensité significative lors de l'analyse de nos échantillons.

Ainsi 1 µL de chaque solution éluée est déposée sur la plaque MALDI. 1 µL de matrice est déposé par-dessus chaque dépôt et suivi de plusieurs cycles d'aspiration-refoulement afin d'obtenir un mélange homogène entre la matrice et les complexes cible-ligand. Après cristallisation complète des différents dépôts, ceux-ci sont analysés par MALDI-TOFMS en recherchant les signaux caractéristiques ($[M+H]^+$) de chaque composé étudié, comme nous l'avons vu au paragraphe II. Ne seront considérés comme significatifs que les signaux dont le rapport signal/bruit est supérieur ou égal à 3.

III.4. Etude de l'empreinte peptidique massique (« Peptide Mass Fingerprint », PMF)

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe I, le protocole de criblage initialement développé au laboratoire[2] ne permet pas de détecter les ligands irréversibles criblés. Puisque la majorité des inhibiteurs des CDC25s sont irréversibles, il était impératif de pallier à ce problème. Nous avons donc

travaillé à l'optimisation du protocole grâce à une étude PMF, laquelle doit mettre en évidence les ligands irréversibles des CDC25s. Pour cela, nous avons tout d'abord étudié les protéines natives, sans criblage, afin d'obtenir une empreinte peptidique de la protéine et de repérer son site actif.

III.4.1. Description et protocole de l'étude PMF

III.4.1.1. Principe

L'empreinte peptidique massique (PMF) est une méthode d'identification de protéines développée dans les années 1990[15,16,17]. L'étude PMF d'une protéine consiste initialement à identifier une protéine, *via* un moteur de recherche, par comparaison de la liste de pics de masse identifiés par analyse MALDI-MS de la protéine digérée avec celle des peptides théoriques calculés à partir de la digestion *in silico* des protéines stockées dans les banques de séquence. Afin de traiter les données obtenues par PMF, de nombreux moteurs de recherche (ex : MASCOT™, ProFound,…) ont été développés[18]. Dans le cadre de notre étude, le moteur MASCOT a été choisi en raison de sa compatibilité avec les données générées sur tous les modèles d'instruments et de son accessibilité en ligne (internet). La banque de données utilisée a été SwissProt afin d'obtenir une information la plus fiable possible.

Dans notre cas, l'étude PMF des protéines CDC25 n'avait pas pour but d'identifier les protéines comme dans le cas d'études protéomiques, puisque nous savions lesquelles étaient analysées. Nous avions simplement besoin d'identifier les peptides digérés suite à la digestion trypsique des protéines soumises au criblage. Cette méthode nous a donc permis d'avoir rapidement accès à un maximum de couverture de séquence des protéines analysées. L'utilisation de la LC-MS/MS pour la discrimination des « faux positifs » n'est pas utile. Cette technique pourrait cependant s'avérer utile afin d'obtenir des compléments d'analyse comme nous le discuterons à la fin de ce chapitre.

Cette étude comprend deux étapes. La première étape est une digestion trypsique de la protéine : la trypsine est une enzyme capable d'hydrolyser et de rompre les liaisons après les C terminaux des acides aminés lysine et arginine. La deuxième étape consiste à analyser par MALDI-TOFMS et/ou MALDI-FTICRMS le digest obtenu et soumettre les spectres obtenus à une base de données. Celle-ci va pouvoir identifier les peptides digérés et former une empreinte peptidique des CDC25s, en mettant en évidence les peptides identifiés et les peptides non identifiés.

---

15 M. Mann, P. Højrup and P. Roepstorff, Bio. Mass Spectrom. 22 (1993) 338-345.
16 D. J. C. Pappin, P. Hojrup and A. J. Bleasby, Curr. Biol. 3 (1993) 327-332.
17 J. R. Yates, S. Speicher, P. R. Griffin and T. Hunkapiller, Anal. Biochem. 214 (1993) 397-408.
18 W. Henzel, C. Watanabe and J. Stults, J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 14 (2003) 931-942.

III.4.1.2. Digestion trypsique

La trypsine est probablement l'enzyme la plus utilisée pour la digestion enzymatique des protéines en PMF. Afin que son activité soit optimale, il est impératif qu'elle soit en condition d'utilisation favorable : pH légèrement basique (pH 8) et en présence de sels (bicarbonate d'ammonium). La solution de trypsine utilisée dans notre cadre a été préparée comme suit : une solution à 0,2 µg/µL de trypsine commerciale (V5111, Promega Corporation, Madison, USA) est préparée dans son tampon. Cette solution est utilisée pour digérer les protéines natives ou les complexes protéine-ligand afin d'obtenir un rapport massique final trypsine/protéine de 1/10, dans un volume final d'environ 10 µL. La solution est digérée durant une nuit à 37°C puis le digest est analysé par MALDI-MS.

III.4.1.3. Analyses du digest par MALDI-MS

Le digest obtenu est analysé par MALDI-MS avec la matrice 2,5-DHB : 1 µL de digest est déposé sur la plaque MALDI, puis 1 µL de matrice est déposé par-dessus, suivi par plusieurs cycles d'aspiration/refoulement afin d'obtenir un mélange homogène. Après séchage complet, les dépôts sont analysés par MALDI-TOFMS et MALDI-FTICRMS.

Les analyses par MALDI-TOFMS ont été menées sur le même appareil que pour les analyses précédentes. Le mode réflectron positif a été utilisé, avec une tension d'accélération de 23 kV et un délai d'extraction de 200 ns. Les spectres de masse ont été acquis manuellement avec le logiciel Flexcontrol (Bruker Daltonic) en accumulant quatre séries de 100 tirs laser. Le logiciel Biotools (version 3.0, Bruker Daltonic, Brême, Allemagne) a été utilisé afin de construire la liste de pics dans la gamme de masse 400 < *m/z* < 4000 Da.

Les analyses par MALDI-FTICRMS ont été menées sur le spectromètre de masse Ion Spec (Varian Corporation, Palo Alto, CA, USA) présenté dans le chapitre II (paragraphe II.3.2). Après ionisation, les ions positifs sont stockés dans un hexapole, transférés dans la cellule FTICR *via* un guide d'ion puis analysés. Tous les spectres de masse ont été acquis manuellement avec le logiciel Omega en mode « Wizard » (Varian Corporation, CA, USA) en accumulant 35 tirs laser à environ 17% de l'énergie laser maximum. Le logiciel FTDOC (FTDOC version 4.1.54, Varian Corporation, CA, USA) a été utilisé afin de construire la liste de pics dans la gamme de masse 400 < *m/z* < 4000 Da.

La calibration externe a été effectuée avec des pics de matrice 2,5-DHB et un mélange de peptides étalons (Bruker Daltonic, Brême, Allemagne). Les pics monoisotopiques suivants ont été utilisés : *m/z* 155,034 ($[DHB+H]^+$), *m/z* 757,400 (bradikynine), *m/z* 1046,542 (angiotensine humaine II) et *m/z* 1533,860 (P14R). La calibration a été validée lorsque l'erreur moyenne était de ± 1-2 ppm pour les analyses par MALDI-FTICRMS et ± 10-15 ppm pour les analyses par MALDI-TOFMS. Les spectres de masse des différents digests ont subi une calibration interne sur deux pics d'autolyse de trypsine aux masses *m/z* 842,510 (VATVSLPR) et *m/z* 2211,104 (LGEHNIDVLEGNEQFINAAK).

III.4.1.4. Etude par MASCOT™

Comme nous l'avons précisé précédemment, les données de spectrométrie de masse obtenues après analyse des digests sont traitées grâce au moteur de recherche MASCOT™. La banque de données SwissProt (2012_02 ; 534695 séquences ; 189667883 résidus) est utilisée afin d'obtenir une information la plus fiable possible, sans aucune restriction de taxonomie, pI ou masse moléculaire. Connaissant les protéines analysées, nous aurions cependant pu ajouter une masse moléculaire afin d'orienter le moteur de recherche Une coupure manquée lors de la digestion trypsique est autorisée. Les identifications sont validées lorsqu'au moins six peptides ont été identifiés avec une erreur inférieure à 50 ppm pour les analyses par MALDI-TOFMS et 10 ppm pour les analyses par MALDI-FTICRMS, comme recommandé par la littérature[19]. Un MOWSE (« MOlecular Weight SEarch ») score supérieur à 70 a été considéré comme significatif ($p < 0,05$).

III.4.2. Résultats de l'étude PMF sur les protéines natives

Afin d'obtenir une empreinte peptidique représentative des CDC25s, l'étude PMF est réalisée sur les protéines sans criblage, dans leur état natif. Cette étude nous permettra par la suite d'obtenir une référence à laquelle nous pourrons comparer les empreintes obtenues après criblage des CDC25s. Nous nous intéresserons particulièrement au peptide correspondant au site actif des protéines, peptide contenant la cystéine catalytique.

Les résultats de l'étude PMF faite sur les CDC25s natives sont présentés sous forme de convolution, spectrale comme décrit par Da Silva *et al.*[20]. La **Figure 59** représente la convolution des couvertures de séquences obtenues par MALDI-TOFMS et MALDI-FTICRMS. Les analyses nous ont

[19] D. M. Horn, E. C. Peters, H. Klock, A. Meyers and A. Brock, Int. J. Mass Spectrom. 238 (2004) 189-196.

[20] D. da Silva, T. Wasselin, V. Carré, P. Chaimbault, L. Bezdetnaya, B. Maunit and J.-F. Muller, Rapid Comm. Mass Spectrom. 25 (2011) 1881-1892.

permis d'identifier les CDC25A et C avec une couverture de séquence totale de 73% et 61% respectivement.

A) CDC25A

1	MELGPEPPHR	RRLLFACSPP	PASQPVVKAL	PASQPVVKAL	PVTNLTVTMD
51	QLQGLGSDYE	QPLEVKNNSN	LQRMGSSEST	DSGFCLDSPG	PLDSKENLEN
101	PMRRIHSLPQ	KLLGCSPALK	RSHSDSLDHD	IFQLIDPDEN	KENEAFEFKK
151	PVRPVSRGCL	HSHGLQEGKD	LFTQRQNSAP	ARMLSSNERD	SSEPGNFIPL
201	FTPQSPVTAT	LSDEDDGFVD	LLDGENLKNE	EETPSCMASL	WTAPLVMRTT
251	NLDNRCKLFD	SPSLCSSSTR	SVLKRPERSQ	EESPPGSTKR	RKSMSGASPK
301	ESTNPEKAHE	TLHQSLSLAS	SPK*GTIENIL	DNDPRDLIGD	FSKGYLFHTV
351	AGKHQDLKYI	SPEIMASVLN	GKFANLIKEF	VIIDCRYPYE	YEGGHIKGAV
401	NLHMEEEVED	FLLKKPIVPT	DGKRVIVVFH	CEFSSERGPR	MCRYVRERDR
451	LGNEYPKLHY	PELYVLKGGY	KEFFMKCQSY	CEPPSYRPMH	HEDFKEDLKK
501	FRTKSRTWAG	EKSKREMYSR	LKKL		

B) CDC25C

1	MSTELFSSTR	EEGSSGSGPS	FRSNQRKMLN	LLLERDTSFT	VCPDVPRTPV
51	GKFLGDSANL	SILSGGTPKR	CLDLSNLSSG	EITATQLTTS	ADLDETGHLD
101	SSGLQEVHLA	GMNHDQHLMK	CSPAQLLCST	PNGLDRGHRK	RDAMCSSSAN
151	KENDNGNLVD	SEMKYLGSPI	TTVPKLDKNP	NLGEDQAEEI	SDELMEFSLK
201	DQEAKVSRSG	LYRSPSMPEN	LNRPRLKQVE	KFKDNTIPDK	VKKKYFSGQG
251	KLRKGLCLKK	TVSLCDITIT	QMLEEDSNQ*G	HLIGDFSKVC	ALPTVSGKHQ
301	DLKYVNPETV	AALLSGKFQG	LIEKFYVIDC	RYPYEYLGGH	IQGALNLYSQ
351	EELFNFFLKK	PIVPLDTQKR	IIIVFHCEFS	SERGPRMCRC	LREEDRSLNQ
401	YPALYYPELY	ILKGGYRDFF	PEYMELCEPQ	SYCPMHHQDH	KTELLRCRSQ
451	SKVQEGERQL	REQIALLVKD	MSP		

Figure 59 : Convolution des couvertures de séquences des CDC25A (A) et C (B) obtenues par MALDI-TOFMS et MALDI-FTICRMS. *En rouge sont représentés les peptides identifiés par MALDI-TOFMS et MALDI-FTICRMS, en bleu les peptides identifiés seulement par MALDI-FTICRMS et en vert les peptides identifiés seulement MALDI-TOFMS. Le site actif des protéines est souligné et * marque le début du domaine catalytique des protéines.*

Cependant, nous constatons que les analyses par MALDI-FTICRMS donnent une plus large identification de peptides que les analyses par MALDI-TOFMS. Cela peut être expliqué par le fait qu'un analyseur FTICR permet de bien meilleures résolution et exactitude en masse qu'un analyseur à temps de vol, et donc une meilleure identification des peptides (erreur en masse de l'identification bien souvent inférieure à 3 ppm pour une référence de 10 ppm). Cet effet peut être illustré par la **Figure 60** représentant un exemple de spectre de masse du digest de CDC25A obtenu par MALDI-FTICR. L'ion à *m/z* 1706,8491 correspond au site actif de la protéine **R**VIVVFHCEFSSER avec un clivage manqué au niveau de la première arginine (**R**). Cet ion peut également être détecté, ici avec une précision en masse de 4,2 ppm, et nous voyons clairement l'utilité de la haute résolution qui permet de détecter séparément ce pic de l'ion à *m/z* 1706,8797 (R = 76100). La résolution minimale permettant de séparer ces deux pics est R = m/Δm = 55779. Dans le meilleur des cas, une analyse MALDI-TOFMS peut aboutir à une résolution de 10000, ce qui n'est pas suffisant pour séparer ces deux pics et on passe alors à côté de la détection du site actif de la protéine.

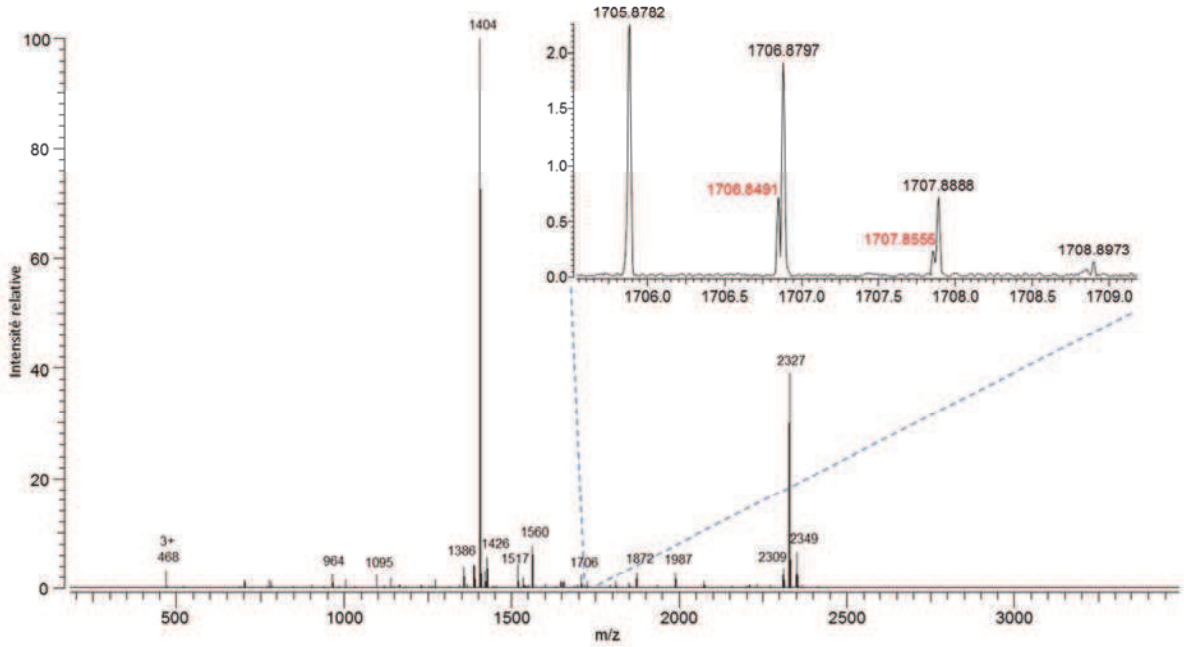


Figure 60 : Exemple de spectre de masse MALDI-FTICR d'un digest de CDC25A. *Le zoom correspond à la gamme de masse contenant l'ion du site actif de la protéine avec 1 clivage manqué à m/z 1706,8491.*

L'ion protoné correspondant au site actif de la protéine CDC25A à *m/z* 1551,7624 (VIVVFHCEFSSER) est détecté 9 fois sur 10 par MALDI-FTICRMS (rapport signal/bruit de 5,5) et 7 fois sur 10 par MALDI-TOFMS (rapport signal/bruit de 4,1). L'ion protoné correspondant au site actif de la protéine CDC25C à *m/z* 1579,7940 (IIIVFHCEFSSER) est détecté 8 fois sur 10 par MALDI-FTICRMS mais en revanche n'est jamais détecté par MALDI-TOFMS. Comme nous pouvons le constater, le rapport S/N de cet ion est à la limite de la détection (S/N = 3), que ce soit par FTICRMS, et encore plus petit par TOFMS. La non-détection de cet ion par l'analyseur à temps de vol est donc peut être due à un manque de sensibilité par rapport à la FTICR. Une étude comparative menée sur ces deux instruments a été réalisée au laboratoire lors de travaux de thèse[20,21]. Différents digests de protéine BSA (« Bovine Serum Albumine ») ont été analysés par MALDI-FTICRMS et MALDI-TOFMS avec les deux matrices 2,5-DHB et HCCA. Les conclusions de ces travaux amènent à dire que dans le cas de l'analyse de cette protéine (BSA), l'analyse par FTICR avec la matrice 2,5-DHB permet d'accroitre la couverture de séquence tout en augmentant la précision en masse des ions détectés. Il n'est donc pas surprenant que nous obtenions de meilleurs résultats (en termes de couverture de séquence) avec la 2,5-DHB lorsque nous analysons nos digests par FTICRMS en comparaison à l'analyse par TOFMS.

[21] D. Da Silva, Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine - Metz (2012).

Ces deux empreintes peptidiques correspondent à une référence à laquelle nous pourrons comparer les analyses suivantes concernant les protéines criblées.

III.5. Criblage des CDC25s

III.5.1. Avec l'amiodarone, le témoin négatif

Un aspect important doit être vérifié avant de continuer notre étude sur les inhibiteurs réversibles et irréversibles. Si un composé ne possède aucune affinité avec la cible, il faut s'assurer qu'il est bien éliminé lors des différents lavages de la membrane. Cette étape consiste à valider que les lavages suffisent à éliminer toute molécule n'ayant aucune affinité pour la cible. Pour valider cette étape, nous avons conservé l'amiodarone[2], présenté dans le paragraphe II, comme témoin négatif n'ayant aucune affinité avec les CDC25s. Le protocole de criblage est appliqué à l'amiodarone et aux CDC25A et C. La solution éluée avec le ZipTip® est alors tout d'abord analysée en mode linéaire avec la matrice SA afin de vérifier que le signal des protéines était identifié. Une fois cette validation effectuée, cette même solution éluée est analysée par MALDI-TOFMS en mode réflectron avec la matrice 2,5-DHB. Les spectres ainsi acquis sont présentés à la **Figure 61**.

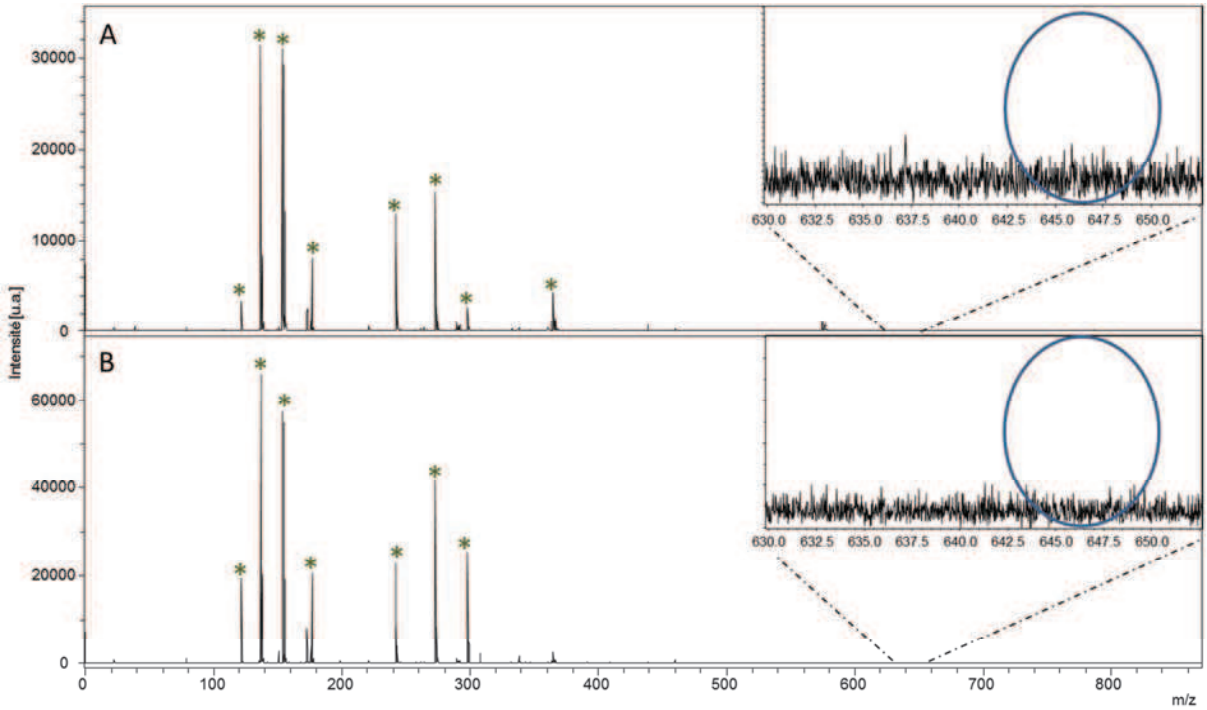


Figure 61 : Analyse directe par MALDI-TOFMS en mode réflectron de l'amiodarone incubée avec CDC25A (A) et C (B). *Dépôt en goutte sèche avec la 2,5-DHB, * correspond aux principaux pics de matrice.*

Les résultats observés sont bien ceux attendus : il n'y a aucun pic caractéristique de l'ion [M+H]+ de l'amiodarone à m/z 646 lorsque celle-ci est incubée avec les CDC25s. Nous pouvons en déduire que l'étape de lavage de la membrane est suffisamment efficace pour éliminer toute molécule de bas poids moléculaire non liée aux protéines.

Une dernière vérification à effectuer avant de poursuivre l'étude concerne l'étape de digestion trypsique et l'étude PMF associée. Il faut également s'assurer que le site actif des protéines n'est pas modifié lorsque les protéines sont criblées avec des molécules ne faisant pas partie de leur ligand. Nous avons donc réalisé la digestion trypsique de la solution obtenue après application des étapes 1 et 2 du protocole de criblage entre les CDC25s et l'amiodarone comme décrit précédemment, suivi de l'étude PMF avec les analyses par MALDI-TOFMS et MALDI-FTICRMS des digests obtenus. Les listes de pics tirées des spectres sont soumises à MASCOT™ et les empreintes peptidiques sont recherchées dans la base de données SwissProt. Les empreintes peptidiques reportées montrent une identification du site actif des protéines, tout comme lorsque l'étude PMF est réalisée sur les protéines natives.

En conclusion, nous avons pu observer que :

- D'une part l'analyse directe par MALDI-TOFMS ne montre aucun signal correspondant au $[M+H]^+$ du composé ;
- D'autre part l'étude PMF montre que le site actif des protéines n'a subi aucune modification d'oxydation et qu'aucun composé n'est fixé dessus, puisque le peptide correspondant au site actif est toujours détecté après criblage. Dans le cas contraire, ce peptide ne serait pas détecté car l'ion correspondant au (site actif + composé lié) aurait forcément une masse différente.

Ces deux résultats concordent sur le fait que l'amiodarone n'a aucune affinité avec les protéines CDC25. Maintenant que ce prérequis est validé, nous pouvons passer à l'étude des inhibiteurs réversibles et irréversibles testés lors de ce criblage.

III.5.2. Avec les inhibiteurs réversibles

Nous avons vu que l'inhibition des CDC25s peut se faire selon deux cas différents: les ligands réversibles (inhibition réversible) et les ligands irréversibles (inhibition irréversible). Le protocole de criblage décrit précédemment doit donc permettre de traiter de ces deux catégories d'inhibiteur. L'analyse des inhibiteurs réversibles (ou ligands réversibles) consiste à détecter par spectrométrie de masse MALDI-TOF les molécules se fixant à la cible avec une liaison non covalente (étape 3 du

protocole). Pour cela nous allons nous intéresser à l'analyse directe des complexes après incubation, filtration et récupération des éventuels complexes du filtre MICROCON®.

Les inhibiteurs réversibles ne modifiant pas définitivement le dite actif de la cible, celui-ci doit rester visible si on procède à une vérification de sa présence lors de l'étude PMF décrite dans le protocole (étape 4). Cette étape vise à comparer les résultats des empreintes peptidiques obtenues avec la référence des CDC25s native. Ces deux étapes sont menées de front pour chaque criblage, et les résultats seront présentés simultanément pour chaque composé criblé. Nous aurons ainsi une validation complète du protocole de criblage, tant au niveau de la détection de l'inhibiteur qui doit être « libéré » de la cible, qu'au niveau du site actif de la protéine.

III.5.2.1. Résultats avec la 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone

Comme nous l'avons vu précédemment, l'étude bibliographique de ce composé montre qu'il se comporte comme un inhibiteur réversible des CDC25s. Il est donc soumis au protocole de criblage des CDC25A et C vu précédemment, à savoir incubation, filtration et lavage de la membrane des MICROCON®. A partir de ce moment, les résultats attendus après criblage devraient être en toute logique similaires à ceux obtenus lors du criblage de la tubuline avec la vinblastine[1,2], c'est à dire l'observation de pics caractéristiques du composé testé lors de l'analyse directe par spectrométrie de masse.

La vérification de la présence des cibles CDC25A et C a été réalisée par analyse de la solution éluée avec la pointe ZipTip® avec la matrice SA en mode de détection linéaire. Une fois cette présence confirmée, notre étude a porté sur l'analyse par MALDI-TOFMS avec la matrice 2,5-DHB de la 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone éventuellement liée aux protéines. Les résultats de cette analyse sont présentés à la **Figure 62**.

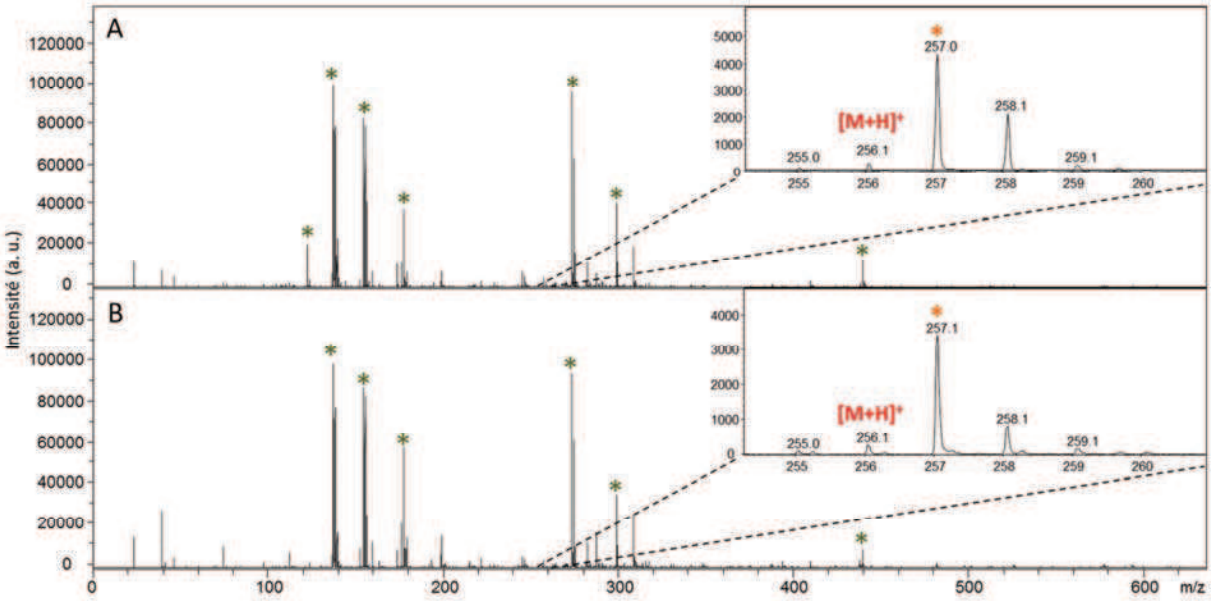


Figure 62 : Analyse directe par MALDI-TOFMS en mode réflectron du 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone lié aux CDC25A (A) et C (B) après application du protocole de criblage. *Dépôt en goutte sèche avec la 2,5-DHB. * correspond aux principaux pics de matrice et * représente un pic interférant de matrice.*

Les spectres correspondants montrent que la 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone ($[M+H]^+$ 256,1) est effectivement détectée par MALDI-TOFMS lors de l'analyse directe des solutions éluées après criblage avec les protéines CDC25A et C. Les intensités observées (environ 500 coups) sont faibles mais ne laissent aucun doute sur la détection du composé, puisque le rapport S/N est supérieur à 17 dans les deux cas (critère d'acceptation : S/N > 3). Nous pouvons en déduire que cette molécule était lié aux CDC25s, puisqu'elle n'a pas été éliminée lors des lavages de la membrane du MICROCON®. A ce stade, nous pouvons affirmer que ce composé est bien un ligand se liant aux protéines CDC25 avec une liaison non covalente.

Afin de confirmer les interactions pouvant intervenir avec le site actif des protéines, nous avons également réalisé l'étude PMF sur les complexes CDC25-ligand après criblage avec la 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone. Nous avons fait la convolution des empreintes peptidiques obtenues par MALDI-TOFMS et MALDI-FTICRMS et les résultats sont présentés sur la **Figure 63**. Nous constatons que le site actif des protéines est identifié de la même façon que lorsque l'étude est réalisée sur les protéines natives. Cela signifie que le site actif des protéines n'est pas détérioré ou modifié de quelque façon que ce soit après criblage avec ce composé.

Les résultats obtenus par l'analyse directe MALDI-TOFMS après criblage (présence du signal caractéristique du composé testé) et par l'analyse PMF du complexe (identification du site actif des protéines) nous confirment que ce composé est un ligand réversible des protéines CDC25A et C, comme décrit dans la littérature.

A) CDC25A criblée avec 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone

1	MELGPEPPHR	RRLLFACSPP	PASQPVVKAL	FGASAAGGLS	PVTNLTVTMD
51	QLQGLGSDYE	QPLEVKNNSN	LQRMGSSEST	DSGFCLDSPG	PLDSKENLEN
101	PMRRIHSLPQ	KLLGCSPALK	RSHSDSLDHD	IFQLIDPDEN	KENEAFEFKK
151	PVRPVSRGCL	HSHGLQEGKD	LFTQRQNSAP	ARMLSSNERD	SSEPGNFIPL
201	FTPQSPVTAT	LSDEDDGFVD	LLDGENLKNE	EETPSCMASL	WTAPLVMRTT
251	NLDNRCKLFD	SPSLCSSSTR	SVLKRPERSQ	EESPPGSTKR	RKSMSGASPK
301	ESTNPEKAHE	TLHQSLSLAS	SPKGTIENIL	DNDPRDLIGD	FSKGYLFHTV
351	AGKHQDLKYI	SPEIMASVLN	GKFANLIKEF	VIIDCRYPYE	YEGGHIKGAV
401	NLHMEEEVED	FLLKKPIVPT	DGKRVIVVEH	CEFSSERGPR	MCRYVRERDR
451	LGNEYPKLHY	PELYVLKGGY	KEFFMKCQSY	CEPPSYRPMH	HEDFKEDLKK
501	FRTKSRTWAG	EKSKREMYSR	LKKL		

B) CDC25C criblée avec 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone

1	MSTELFSSTR	EEGSSGSGPS	FRSNQRKMLN	LLLERDTSFT	VCPDVPRTPV
51	GKFLGDSANL	SILSGGTPKR	CLDLSNLSSG	EITATQLTTS	ADLDETGHLD
101	SSGLQEVHLA	GMNHDQHLMK	CSPAQLLCST	PNGLDRGHRK	RDAMCSSSAN
151	KENDNGNLVD	SEMKYLGSPI	TTVPKLDKNP	NLGEDQAEEI	SDELMEFSLK
201	DQEAKVSRSG	LYRSPSMPEN	LNRPRLKQVE	KFKDNTIPDK	VKKKYFSGQG
251	KLRKGLCLKK	TVSLCDITIT	QMLEEDSNQG	HLIGDFSKVC	ALPTVSGKHQ
301	DLKYVNPETV	AALLSGKFQG	LIEKFYVIDC	RYPYEYLGGH	IQGALNLYSQ
351	EELFNFFLKK	PIVPLDTQKR	IIIVFHCEFS	SERGPRMCRC	LREEDRSLNQ
401	YPALYYPELY	ILKGGYRDFF	PEYMELCEPQ	SYCPMHHQDH	KTELLRCRSQ
451	SKVQEGERQL	REQIALLVKD	MSP		

Figure 63 : Convolution des couvertures de séquences des CDC25A (A) et C (B) criblées avec la 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone. *En rouge sont représentés les peptides identifiés par MALDI-TOFMS et MALDI-FTICRMS, en bleu les peptides identifiés seulement par MALDI-FTICRMS et en vert les peptides identifiés seulement MALDI-TOFMS. Le site actif des protéines est souligné.*

Ainsi les résultats expérimentaux obtenus de l'application de notre protocole de criblage avec la 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone sont tout à fait concluant et en adéquation avec les résultats attendus. Néanmoins, cela n'est pas suffisant pour conclure sur la bonne répétabilité du test et nous ne pouvons, à ce stade, affirmer que les résultats seront similaires avec d'autres composés du même type. Nous avons donc testé un autre ligand, le SV37, composé présenté dans le paragraphe II de ce chapitre.

III.5.2.2. Résultats avec le composé SV37

Afin de vérifier que ce test est opérationnel sur d'autres ligands du même type que la 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone (ligand réversible), nous avons testé un composé dont la synthèse et l'étude des effets biologiques sont en cours de publication[7]. Ce composé montre des propriétés d'inhibiteur réversible lors des tests biologiques *in vitro* sur les CDC25s qui ont pour but de d'évaluer l'activité des CDC25s lorsqu'elles sont en contact de l'inhibiteur et ont fait l'objet d'une partie des travaux de thèse d'E. Bana au laboratoire LIMBP[22].

- ***Evaluation biologique du SV37 sur les CDC25s***

Ce travail a été mené en collaboration avec l'équipe de biologie du LIMBP-SRSMC. Les évaluations biologiques de SV37 sont menées sur les CDC25s produites de la même manière que celles utilisées pour nos tests de criblage. L'activité des CDC25s est évaluée *in vitro* selon la méthode fluorimétrique décrite par E. Viry *et al.* en 2011[23]. Les essais sont réalisés dans une plaque 96 puits dans un tampon (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA et 0,1% SAB) à pH 8,1 et contenant

[22] E. Bana, Thèse de Doctorat, Université de Lorraine (2013).

[23] E. Viry, A. Anwar, G. Kirsch, C. Jacob, M. Diedrich and D. Bagrel, Int. J. Oncol. 38 (2011) 1103-1111.

comme substrat des CDC25s le phosphate de 3-O-méthylfluorescéine. Après 20 minutes d'incubation préliminaire entre l'inhibiteur et les CDC25s à 30°C, l'émission fluorescente du produit de réaction (la 3-O-méthylfluorescéine) est mesurée toutes les 20 minutes avec un CytoFluor (Perseptive Applied Biosystems) pendant 2 heures. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité résiduelle des CDC25s. La concentration du composé inhibant 50% de l'activité des CDC25s (IC_{50}) est évaluée en utilisant un modèle d'approximation non linéaire basé sur la méthode des moindres carrés.

Afin d'établir le mode de fixation d'un composé (réversible/irréversible) *in vitro*, la méthode de dilution décrite par J. Sohn *et al.* est appliquée[5]. Les protéines CDC25s sont incubées avec une forte concentration d'inhibiteur (en général supérieure à l'IC_{50}), puis le milieu est dilué afin d'obtenir une concentration faible en inhibiteur. L'activité des CDC25s est alors mesurée par fluorimétrie.

Les courbes d'inhibition des CDC25A et C, représentées sur les **Figure 64A et B**, servent à définir les IC_{50} (4,3 ± 0,1 µM pour CDC25A et 0,9 ± 0,1 µM pour CDC25C), mais également les concentrations élevées et faibles pour le test de réversibilité : elles sont respectivement de 22 µM et 0,12 µM.

Les tests de dilution sont également effectués afin de déterminer la réversibilité ou l'irréversibilité du SV37. Les protéines sont incubées avec une concentration forte en inhibiteur (22 µM) pendant 0, 15, 30, 60 et 90 minutes, puis diluées 180 fois afin d'obtenir une faible concentration en inhibiteur (0,12 µM). Une fixation irréversible sera toujours effective après dilution et l'enzyme sera toujours inhibée. Les résultats attendus seront donc similaires à ceux obtenus avec une forte concentration en inhibiteur. Dans le cas contraire, l'inhibiteur réversible sera séparé de l'enzyme après dilution et l'enzyme recouvrira son activité, comme dans le cas d'une concentration faible en inhibiteur. Cette hypothèse peut facilement être vérifiée suite au calcul suivant :

Equation de la réaction : $Protéine + Ligand \leftrightarrow complexe\ (Protéine - Ligand)$

Avec :

- C(Protéine) = [P]
- C(Ligand) = [L]
- C(complexe) = [PL]

Equation de conservation des espèces : $[PL] + [P] = C° = 1$ (1)

Equation de la constante d'équilibre : $K = \frac{[PL]}{[P] \cdot [L]}$ (2)

En remplaçant : $[P] = 1 - [PL]$ (1)

$K = \frac{[PL]}{(1 - [PL]) \cdot [L]}$ (2)

$$(2) \quad [PL] = K \cdot (1 - [PL]) \cdot [L] \quad \overset{1}{\Leftrightarrow} \quad [PL] = (K - K \cdot [PL]) \cdot [L]$$

$$\overset{2}{\Leftrightarrow} \quad [PL] = K \cdot [L] - K \cdot [PL] \cdot [L] \quad \overset{3}{\Leftrightarrow} \quad K \cdot [L] = [PL] + K \cdot [PL] \cdot [L]$$

$$\overset{4}{\Leftrightarrow} \quad K \cdot [L] = [PL] \cdot (1 + K \cdot [L]) \quad \overset{5}{\Leftrightarrow} \quad \boxed{[PL] = \frac{K \cdot [L]}{1 + K \cdot [L]}}$$

Ainsi lorsque la concentration en ligand [L] tend vers 0 (dilution), le produit K·[L] tend également vers 0 et 1 + K·[L] tend vers 1. La concentration en complexe [PL] diminue et tend vers 0, donc la concentration [P] augmente selon l'équation (1). Les **Figure 64C et D** montrent que SV37 se comporte comme un inhibiteur réversible, puisque les protéines CDC25A et C recouvrent leur quasi-complète activité après dilution.

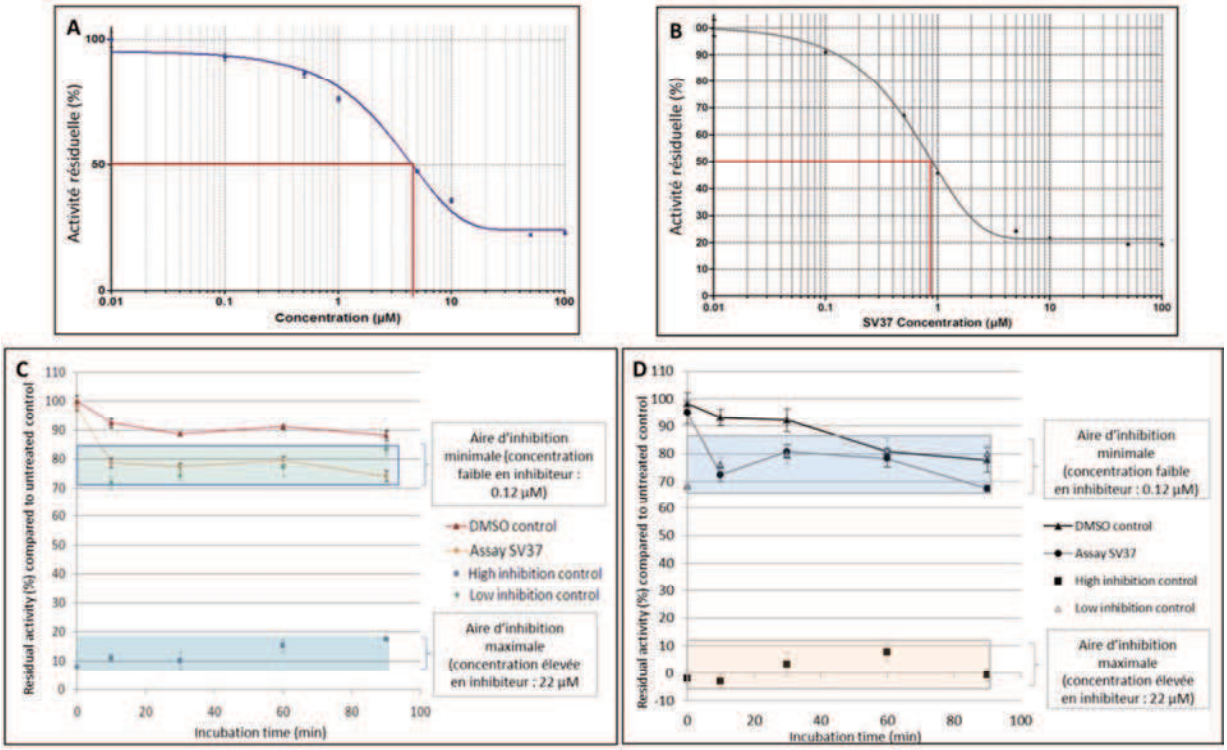


Figure 64 : Courbes IC_{50} du SV37 sur CDC25A (A) et C (B) et activité résiduelle de CDC25A (C) et C (D) mises en contact pendant différents temps avec le composé SV37 au cours du test de réversibilité (N = 3). *Pour les courbes d'IC_{50}, modélisation réalisée avec Graphpad Prism d'après une interpolation non linéaire par la méthode des moindres carrés.*

Selon ces résultats, le composé SV37 se comporte comme un inhibiteur réversible des protéines CDC25A et C. Suite à ces résultats, nous avons appliqué notre protocole de criblage afin de vérifier que nous apportions bien les mêmes conclusions.

- ***Criblage du composé SV37 sur les CDC25A et C***

Le protocole de criblage a été appliqué à SV37 avec les protéines CDC25A et C, comme décrit dans le paragraphe précédent. Après incubation, filtration, rinçage et élution sur une pointe ZipTip®, nous avons vérifié par analyse MALDI-TOFMS en mode linéaire avec la matrice SA que les protéines étaient bien présentes dans la solution d'élution. L'étude s'est alors portée sur l'analyse en mode linéaire de SV37 avec la matrice 2,5-DHB. Les résultats obtenus sont présentés à la **Figure 65**. Même si les intensités restent faibles (entre 500 et 800 coups), nous voyons nettement les signaux caractéristiques de SV37 présentés à la **Figure 47** $[M+H]^+$ à *m/z* 359.

Ces résultats peuvent donc être corrélés avec ceux obtenus par les tests biologiques. Jusqu'à présent, le composé SV37 présente les mêmes caractéristiques que le composé 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone, à savoir le signal de leur pic moléculaire en analyse directe par MALDI-TOFMS après application du protocole de criblage.

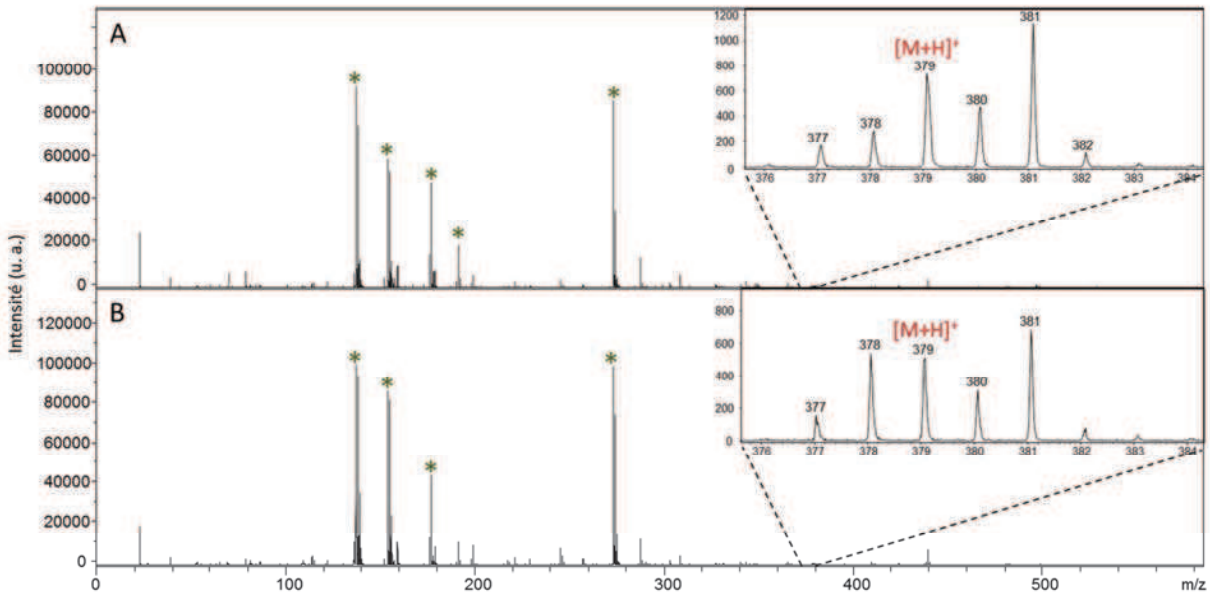


Figure 65 : Analyse directe par MALDI-TOFMS en mode réflectron du SV37 lié aux CDC25A (A) et C (B) après application du protocole de criblage. *Dépôt en mélange intime avec la 2,5-DHB, * correspond aux principaux pics de matrice.*

Tout comme pour la 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone, une étude PMF a été menée sur ce complexe de protéine-ligand. Les complexes ont donc été digérés une nuit avec de la trypsine,

puis analysés par MALDI-TOFMS et MALDI-FTICRMS. Les listes de pics ainsi acquises sont soumises au moteur de recherche MASCOT™, et les recherches sont effectuées dans la banque de données SwissProt. Les empreintes peptidiques obtenues avec les deux techniques d'analyse sont convoluées pour donner les résultats présentés en **Figure 66**.

Sur ces empreintes peptidiques, on constate que le site actif des protéines est identifié 8 fois sur 10 par MALDI-FTICRMS, mais n'est jamais identifié par MALDI-TOFMS. 70% et 74% respectivement de CDC25A et CDC25C sont identifiés. Cela prouve que le site actif n'a subi aucune modification lors du criblage et de la liaison avec le SV37.

Ces résultats confirment les tests biologiques et biochimiques obtenus sur le composé SV37 et en conséquence qu'il est un inhibiteur réversible des CDC25A et C.

A) CDC25A criblée avec SV37

1	MELGPEPPHR	RRLLFACSPP	PASQPVVKAL	FGASAAGGLS	PVTNLTVTMD
51	QLQGLGSDYE	QPLEVKNNSN	LQRMGSSEST	DSGFCLDSPG	PLDSKENLEN
101	PMRRIHSLPQ	KLLGCSPALK	RSHSDSLDHD	IFQLIDPDEN	KENEAFEFKK
151	PVRPVSRGCL	HSHGLQEGKD	LFTQRQNSAP	ARMLSSNERD	SSEPGNFIPL
201	FTPQSPVTAT	LSDEDDGFVD	LLDGENLKNE	EETPSCMASL	WTAPLVMRTT
251	NLDNRCKLFD	SPSLCSSSTR	SVLKRPERSQ	EESPPGSTKR	RKSMSGASPK
301	ESTNPEKAHE	TLHQSLSLAS	SPKGTIENIL	DNDPRDLIGD	FSKGYLFHTV
351	AGKHQDLKYI	SPEIMASVLN	GKFANLIKEF	VIIDCRYPYE	YEGGHIKGAV
401	NLHMEEEVED	FLLKKPIVPT	DGKRVIVVFH	CEESSERGPR	MCRYVRERDR
451	LGNEYPKLHY	PELYVLKGGY	KEFFMKCQSY	CEPPSYRPMH	HEDFKEDLKK
501	FRTKSRTWAG	EKSKREMYSR	LKKL		

B) CDC25C criblée avec SV37

1	MSTELFSSTR	EEGSSGSGPS	FRSNQRKMLN	LLLERDTSFT	VCPDVPRTPV
51	GKFLGDSANL	SILSGGTPKR	CLDLSNLSSG	EITATQLTTS	ADLDETGHLD
101	SSGLQEVHLA	GMNHDQHLMK	CSPAQLLCST	PNGLDRGHRK	RDAMCSSSAN
151	KENDNGNLVD	SEMKYLGSPI	TTVPKLDKNP	NLGEDQAEEI	SDELMEFSLK
201	DQEAKVSRSG	LYRSPSMPEN	LNRPRLKQVE	KFKDNTIPDK	VKKKYFSGQG
251	KLRKGLCLKK	TVSLCDITIT	QMLEEDSN*QG	HLIGDFSKVC	ALPTVSGKHQ
301	DLKYVNPETV	AALLSGKFQG	LIEKFYVIDC	RYPYEYLGGH	IQGALNLYSQ
351	EELFNFFLKK	PIVPLDTQKR	IIIVFHCEFS	SERGPRMCRC	LREEDRSLNQ
401	YPALYYPELY	ILKGGYRDFF	PEYMELCEPQ	SYCPMHHQDH	KTELLRCRSQ
451	SKVQEGERQL	REQIALLVKD	MSP		

Figure 66 : Convolution des couvertures de séquences des CDC25A (A) et C (B) criblées avec le SV37. *En rouge sont représentés les peptides identifiés par MALDI-TOFMS et MALDI-FTICRMS, en bleu les peptides identifiés seulement par MALDI-FTICRMS et en vert les peptides identifiés seulement MALDI-TOFMS. Le site actif des protéines est souligné.*

Conclusion :

Nous avons donc prouvé que notre test de criblage était compatible avec les inhibiteurs réversibles des CDC25s par deux résultats différents :

- Les signaux caractéristiques de l'inhibiteur réversible testé doit impérativement être détecté lors de l'analyse directe après criblage par MALDI-TOFMS ;
- Le site actif des protéines doit également être identifié après étude PMF afin de prouver qu'il n'a subi aucune modification lors de la liaison avec l'inhibiteur.

A présent nous allons passer à l'étude du criblage des inhibiteurs irréversibles des protéines CDC25.

III.5.3. Avec les inhibiteurs irréversibles

Comme nous l'avons déjà signalé, les inhibiteurs des CDC25s les plus répandus sont des ligands irréversibles. La plupart d'entre eux forment une liaison covalente avec l'un des acides aminés du site actif des protéines. Pour les autres ils provoquent une oxydation irréversible de leur cystéine catalytique. Hors, comme nous l'avons expliqué précédemment, l'énergie apportée par le tir laser n'est pas suffisante pour rompre le type de liaison covalente. Nous avons étudié deux inhibiteurs irréversibles présentés dans le paragraphe II de ce chapitre, le BN82002 et le NSC663284. Nous allons présenter les résultats obtenus lorsque ces deux composés sont criblés avec les CDC25s, par analyse directe par MALDI-TOFMS et de l'étude PMF menée sur les complexes.

III.5.3.1. Résultats avec le BN82002

Le BN82002 est un inhibiteur irréversible puissant des CDC25s, de type électrophile, et présente une IC_{50} de 2,4 et 5,4 µM respectivement vis-à-vis de CDC25A et C. Nous avons testé ce composé afin de mettre au point la deuxième partie du test de criblage, c'est-à-dire le test sur les inhibiteurs irréversibles.

Le protocole de criblage est appliqué au BN82002. Après incubation, filtration, lavage de la membrane du MICROCON® et élution sur une pointe ZipTip® du retentat, l'éluât est analysé par MALDI-TOFMS avec la matrice SA en mode linéaire afin de vérifier la présence des protéines. Toutefois, la faible résolution de l'analyse en mode linéaire ne permet pas de différencier le signal de la protéine seule du signal du complexe protéine-ligand. Nous pouvons alors juste vérifier la présence des protéines, et lorsque cette vérification est établie, nous analysons le même éluât avec la matrice 2,5-DHB en mode réflectron pour étudier le signal du BN82002. La **Figure 67A et B** présente les spectres obtenus.

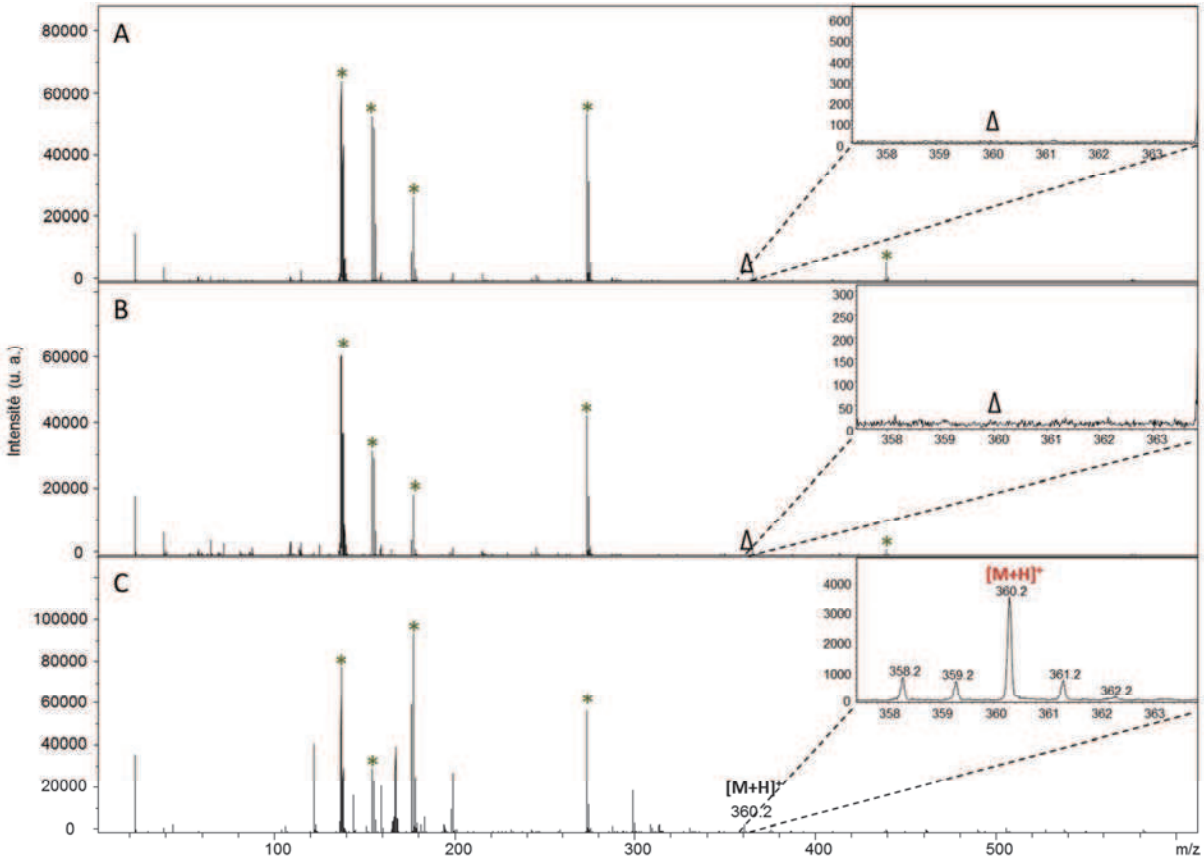


Figure 67 : Analyse directe par MALDI-TOFMS en mode réflectron du BN82002 criblé avec CDC25A (A) et C (B). (C) Spectre de masse MALDI-TOF en mode réflectron du BN82002 incubé avec CDC25A dénaturée. *Dépôt en goutte sèche avec la 2,5-DHB, * correspondent aux principaux pics de matrice.*

Comme nous pouvons le constater sur les spectres A et B, aucun signal du BN82002 à *m/z* 360 n'est détecté par analyse directe après criblage avec les CDC25A et C. Afin d'éliminer toute hypothèse de suppression ionique, comme cela peut arriver dans les mélanges complexes, nous avons incubé le BN82002 avec la protéine CDC25A dénaturée (CDC25A/acétonitrile, v/v) et nous avons analysé le mélange sans passer par l'étape de filtration. La solution est bien entendue dessalée sur une pointe ZipTip®, puis analysée par MALDI-TOFMS en mode de détection réflectron avec la matrice 2,5-DHB. Le spectre représenté à la **Figure 67C** nous prouve que les signaux caractéristiques du BN82002 sont bien détectés, dont l'ion protoné à *m/z* 360, lorsque celui-ci est incubé avec la protéine dénaturée. Cela signifie que nous ne sommes pas en présence d'un cas de suppression ionique lorsque le composé est criblé avec les protéines. De plus, cette expérience nous montre que l'inhibiteur est incapable de se lier de façon covalente aux protéines lorsque celles-ci sont dénaturées et donc inactives.

Nous avons voulu approfondir la compréhension de la liaison du BN82002 avec les protéines CDC25s. Nous avons donc criblé les CDC25s avec des concentrations croissantes de BN82002. Le but de cette expérience est de vérifier si le BN82002 pouvait être détecté dans le filtrat, lors de la

filtration de la solution d'incubation (étape 2), lorsque tous les sites des protéines sont saturés en inhibiteur. L'histogramme présenté en **Figure 68** nous montre que tant que la quantité de BN82002 est inférieure à la quantité de protéines (ratio protéine/BN82002 < 1/1), le BN82002 n'est pas détecté dans le filtrat. Lorsque la quantité de BN82002 atteint et dépasse celle de protéines (ratio protéine/BN82002 ≥ 1/1), alors le BN82002 est détecté et plus la concentration est BN82002 est élevée, plus l'intensité du signal augmente. L'excès d'inhibiteur est donc bien éliminé lors de l'étape de filtration et de lavage.

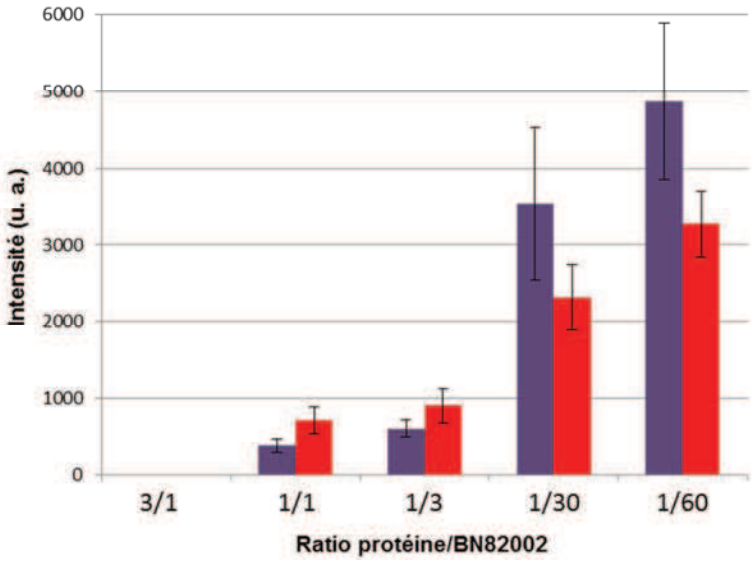


Figure 68 : Intensité du signal de BN82002 obtenu lors de l'analyse MALDI-TOFMS des filtrats en fonction de sa concentration après incubation avec CDC25A (violet, C = $5 \cdot 10^{-5}$ M) et CDC25C (rouge, C = $2 \cdot 10^{-5}$ M). *Les barres d'erreur représentent la déviation standard obtenue sur 10 analyses.*

Tous ces résultats sont en accord avec la formation d'une liaison covalente entre l'inhibiteur BN82002 et les protéines CDC25, mais ne sont pas suffisants pour la démontrer d'autant plus que cette étude de stœchiométrie ne sera pas toujours faite. Nous avons donc réalisé l'étude PMF sur ces complexes après criblage entre le BN82002 et les CDC25s afin de comparer les empreintes peptidiques obtenues avec celles des protéines natives. Les convolutions des résultats MALDI-TOFMS et MALDI-FTICRMS sont présentées sur la **Figure 69**. Les couvertures de séquence totales identifiées sont de 65% pour CDC25A et 50% pour CDC25C. En outre leur site actif n'est jamais identifié, que ce soit par MALDI-FTICR ou MALDI-TOF. On constate donc une réelle différence avec les résultats des inhibiteurs réversibles : d'une part le site actif n'est pas identifié, d'autre part la couverture de séquence identifiée pour les deux protéines est beaucoup plus faible que pour les inhibiteurs réversibles. On peut en déduire que plusieurs modifications interviennent lors de l'inhibition des protéines avec le BN82002, et pas seulement sur leur site actif. Nous avons également cherché dans

les spectres de digests des ions correspondants soit au [site actif + BN82002], soit [site actif oxydé avec la cystéine en $-SO_3H$] mais aucun de ces ions n'a pu être détecté.

A) CDC25A criblée avec BN82002

1	MELGPEPPHR	RRLLFACSPP	PASQPVVKAL	FGASAAGGLS	PVTNLTVTMD
51	QLQGLGSDYE	QPLEVKNNSN	LQRMGSSEST	DSGFCLDSPG	PLDSKENLEN
101	PMRRIHSLPQ	KLLGCSPALK	RSHSDSLDHD	IFQLIDPDEN	KENEAFEFKK
151	PVRPVSRGCL	HSHGLQEGKD	LFTQRQNSAP	ARMLSSNERD	SSEPGNFIPL
201	FTPQSPVTAT	LSDEDDGFVD	LLDGENLKNE	EETPSCMASL	WTAPLVMRTT
251	NLDNRCKLFD	SPSLCSSSTR	SVLKRPERSQ	EESPPGSTKR	RKSMSGASPK
301	ESTNPEKAHE	TLHQSLSLAS	SPKGTIENIL	DNDPRDLIGD	FSKGYLFHTV
351	AGKHQDLKYI	SPEIMASVLN	GKFANLIKEF	VIIDCRYPYE	YEGGHIKGAV
401	NLHMEEEVED	FLLKKPIVPT	DGKRVIVVFH	CEFSSERGPR	MCRYVRERDR
451	LGNEYPKLHY	PELYVLKGGY	KEFFMKCQSY	CEPPSYRPMH	HEDFKEDLKK
501	FRTKSRTWAG	EKSKREMYSR	LKKL		

B) CDC25C criblée avec BN82002

1	MSTELFSSTR	EEGSSGSGPS	FRSNQRKMLN	LLLERDTSFT	VCPDVPRTPV
51	GKFLGDSANL	SILSGGTPKR	CLDLSNLSSG	EITATQLTTS	ADLDETGHLD
101	SSGLQEVHLA	GMNHDQHLMK	CSPAQLLCST	PNGLDRGHRK	RDAMCSSSAN
151	KENDNGNLVD	SEMKYLGSPI	TTVPKLDKNP	NLGEDQAEEI	SDELMEFSLK
201	DQEAKVSRSG	LYRSPSMPEN	LNRPRLKQVE	KFKDNTIPDK	VKKKYFSGQG
251	KLRKGLCLKK	TVSLCDITIT	QMLEEDSNQ`G	HLIGDFSKVC	ALPTVSGKHQ
301	DLKYVNPETV	AALLSGKFQG	LIEKFYVIDC	RYPYEYLGGH	IQGALNLYSQ
351	EELFNFFLKK	PIVPLDTQKR	IIIVFHCEFS	SERGPRMCRC	LREEDRSLNQ
401	YPALYYPELY	ILKGGYRDFF	PEYMELCEPQ	SYCPMHHQDH	KTELLRCRSQ
451	SKVQEGERQL	REQIALLVKD	MSP		

Figure 69 : Convolution des couvertures de séquences des CDC25A (A) et C (B) criblées avec le BN82002. *En rouge sont représentés les peptides identifiés par MALDI-TOFMS et MALDI-FTICRMS, en bleu les peptides identifiés seulement par MALDI-FTICRMS et en vert les peptides identifiés seulement MALDI-TOFMS. Le site actif des protéines est souligné.*

Ces données supplémentaires sont également en accord avec les précédentes conclusions selon lesquelles le BN82002 inhibe irréversiblement les protéines CDC25.

Ce test de criblage sur inhibiteur irréversible a également été testé sur un deuxième ligand irréversible des CDC25s afin de valider les premiers résultats obtenus.

III.5.3.2. Résultats avec le composé NSC663284

Le composé NSC663284 est le deuxième inhibiteur irréversible utilisé pour développer notre test de criblage sur les CDC25s. Son mode de fixation a été présenté dans le paragraphe II : il se fixe à la sérine Ser^{434} du site catalytique des protéines avec une stœchiométrie 1 pour 1. Afin de vérifier s'il se comporte comme le BN82002, nous avons réalisé le test de criblage entre le NSC663284 et les protéines CDC25A et C. L'analyse directe par MALDI-TOFMS de la solution éluée est présentée à la **Figure 70**. Comme on peut le voir sur les spectres, le signal caractéristique $[M+H]^+$ de ce composé à *m/z* 322 n'est pas observé lors de cette analyse. On a donc les mêmes résultats que lors du criblage avec le BN82002.

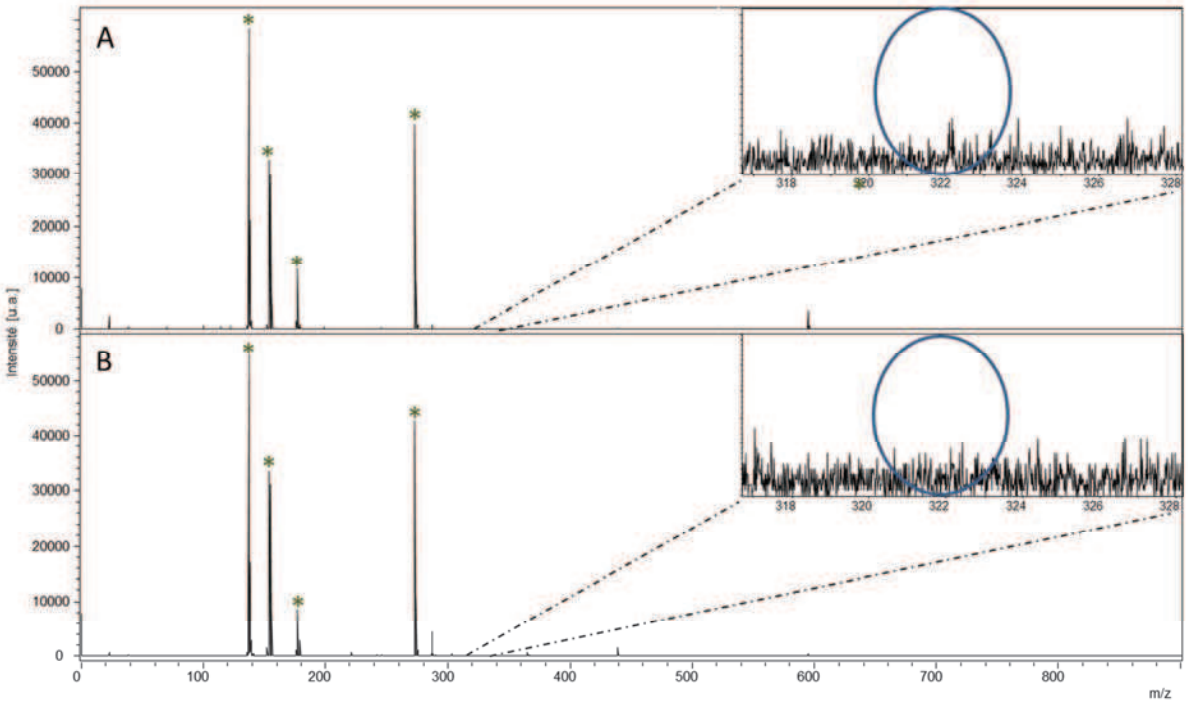


Figure 70 : Analyse directe par MALDI-TOFMS en mode réflectron du NSC663284 criblé avec CDC25A (A) et C (B). *Dépôt en goutte sèche avec la 2,5-DHB, * représentent les principaux pics de matrice.*

L'analyse PMF est alors réalisée sur le complexe. Outre l'empreinte peptidique présentée en **Figure 71**, les spectres MALDI-TOF et MALDI-FTICR du digest ne montrent pas le signal caractéristique du NSC663284 à *m/z* 322. La couverture totale de l'empreinte peptidique identifiée est tout comme le BN82002 plus restreinte qu'avec les inhibiteurs réversibles. 63% de CDC25A et 52% de CDC25C sont identifiés. Le site actif des protéines n'est jamais identifié. Cependant, suite à la réaction de liaison proposée dans la littérature[13], nous nous sommes intéressés aux adduits produits par la liaison de l'inhibiteur au site actif des protéines. Malheureusement l'ion correspondant au [site actif de CDC25A + NSC663284 – HCl + H]$^+$) à $m/z_{\text{théorique}}$ 1837,7 n'est pas détecté ni par MALDI-TOFMS ni par MALDI-FTICRMS. Il semblerait que cet ion devienne silencieux suite à la formation de la liaison covalente avec le site actif. Il pourrait être intéressant dans le futur d'apporter des compléments analytiques à cette approche pour accéder à cette information. L'arrivée au laboratoire d'un appareil dédié aux couplages LC-MS/MS pourrait conduire à ce genre d'information. En effet, ce peptide devenu silencieux en MALDI ne l'est peut-être pas en utilisant l'électronébullisation comme source ionique.

A) CDC25A criblée avec NSC663284

1	MELGPEPPHR	RRLLFACSPP	PASQPVVKAL	FGASAAGGLS	PVTNLTVTMD
51	QLQGLGSDYE	QPLEVKNNSN	LQRMGSSEST	DSGFCLDSPG	PLDSKENLEN
101	PMRRIHSLPQ	KLLGCSPALK	RSHSDSLDHD	IFQLIDPDEN	KENEAFEFKK
151	PVRPVSRGCL	HSHGLQEGKD	LFTQRQNSAP	ARMLSSNERD	SSEPGNFIPL
201	FTPQSPVTAT	LSDEDDGFVD	LLDGENLKNE	EETPSCMASL	WTAPLVMRTT
251	NLDNRCKLFD	SPSLCSSSTR	SVLKRPERSQ	EESPPGSTKR	RKSMSGASPK
301	ESTNPEKAHE	TLHQSLSLAS	SPKGTIENIL	DNDPRDLIGD	FSKGYLFHTV
351	AGKHQDLKYI	SPEIMASVLN	GKFANLIKEF	VIIDCRYPYE	YEGGHIKGAV
401	NLHMEEEVED	FLLKKPIVPT	DGKRVIVVFH	CEFSSERGPR	MCRYVRERDR
451	LGNEYPKLHY	PELYVLKGGY	KEFFMKCQSY	CEPPSYRPMH	HEDFKEDLKK
501	FRTKSRTWAG	EKSKREMYSR	LKKL		

B) CDC25C criblée avec NSC663284

1	MSTELFSSTR	EEGSSGSGPS	FRSNQRKMLN	LLLERDTSFT	VCPDVPRTPV
51	GKFLGDSANL	SILSGGTPKR	CLDLSNLSSG	EITATQLTTS	ADLDETGHLD
101	SSGLQEVHLA	GMNHDQHLMK	CSPAQLLCST	PNGLDRGHRK	RDAMCSSSAN
151	KENDNGNLVD	SEMKYLGSPI	TTVPKLDKNP	NLGEDQAEEI	SDELMEFSLK
201	DQEAKVSRSG	LYRSPSMPEN	LNRPRLKQVE	KFKDNTIPDK	VKKKYFSGQG
251	KLRKGLCLKK	TVSLCDITIT	QMLEEDSNQG	HLIGDFSKVC	ALPTVSGKHQ
301	DLKYVNPETV	AALLSGKFQG	LIEKFYVIDC	RYPYEYLGGH	IQGALNLYSQ
351	EELFNFFLKK	PIVPLDTQKR	IIIVFHCEFS	SERGPRMCRC	LREEDRSLNQ
401	YPALYYPELY	ILKGGYRDFF	PEYMELCEPQ	SYCPMHHQDH	KTELLRCRSQ
451	SKVQEGERQL	REQIALLVKD	MSP		

Figure 71 : Convolution des couvertures de séquences des CDC25A (A) et C (B) criblées avec le NSC663284. *En rouge sont représentés les peptides identifiés par MALDI-TOFMS et MALDI-FTICRMS, en bleu les peptides identifiés seulement par MALDI-FTICRMS et en vert les peptides identifiés seulement MALDI-TOFMS. Le site actif des protéines est souligné.*

Les résultats du criblage confirment cependant que le composé NSC663284 se comporte comme le BN82002, tous deux inhibiteurs irréversibles des CDC25s.

CONCLUSION

Nous avons ainsi établi un protocole de criblage permettant la mise en évidence des deux types d'inhibiteurs des CDC25s, réversibles et irréversibles, et en accord avec les résultats de biologie. Chaque composé testé présente ses propres caractéristiques lors du criblage et peut donc être classé dans une catégorie :

- Les composés inactifs comme l'amiodarone ne sont pas détectés lors de l'analyse directe après criblage par MALDI-TOFMS et le site actif des protéines est toujours identifié par l'étude PMF ;
- Les inhibiteurs réversibles sont détectés par leurs signaux caractéristiques lors de l'analyse directe après criblage par MALDI-TOFMS et le site actif des protéines est toujours identifié par l'étude PMF ;
- Les inhibiteurs irréversibles ne sont jamais détectés lors de l'analyse directe après criblage par MALDI-TOFMS et le site actif des protéines n'est jamais identifié non plus par l'étude PMF.

Le **Tableau 4** résume les résultats attendus lors du criblage de composés avec les CDC25s. Chaque catégorie de molécule a un comportement différent envers le test :

Tableau 4 : Récapitulatif des résultats attendus à partir du test de criblage développé sur les protéines CDC25s. ✓ : détection positive, 0 : détection négative. * : Spectre en hautes masses avec la matrice SA. ** : Spectre en basses masses avec la matrice 2,5-DHB.

	Echantillon contrôle		Composés évalués		
	CDC25s natives	Témoin négatif	Composés inactifs	Inhibiteurs réversibles	Inhibiteurs irréversibles
Analyse directe par MALDI-TOFMS (③)	✓*	0	0	✓**	0
Présence du site actif des CDC25s par analyse PMF (④)	✓	✓	✓	✓	0

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord optimisé les conditions d'analyse MALDI-TOFMS des différents composés témoins et protéines utilisés lors du développement de ce test de criblage (protéines CDC25A et C, molécules 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone, SV37, BN82002 et NSC663284). Nous avons présenté les spectres de masse relatifs à chaque composé, en détaillant à chaque fois leurs signaux caractéristiques ($[M+H]^+$, $[M+H_2+H]^+$,$M^{\cdot+}$, …) obtenus. Ainsi les matrices choisies pour développer ce test sont la 2,5-DHB pour l'étude en mode de détection réflectron positif pour les basses masse et la SA pour l'étude en mode de détection linéaire positif pour les hautes masses.

Nous avons ensuite présenté les différentes étapes du test de criblage, que sont l'incubation des molécules à tester avec la cible protéique, la filtration de la solution d'incubation puis le lavage de la membrane du MICROCON® et enfin l'analyse directe et l'étude PMF des solutions éluées. Les résultats associés à ces deux dernières étapes, menées de front pour chaque test, ont été présentés et discutés pour chaque composé témoin testé. Il en résulte que notre test de criblage a la capacité de détecter les inhibiteurs réversibles (se liant avec une liaison non covalente) des CDC25s grâce à une analyse directe par MALDI-TOFMS de la solution éluée, ainsi que les inhibiteurs irréversibles des CDC25s (se liant avec une liaison covalente ou provoquant une oxydation irréversible du site actif) grâce à une étude PMF mettant en évidence ou non le site actif des protéines.

Ce protocole de criblage pourrait, par la suite, être automatisé afin d'augmenter les débits d'analyse et appliqué à des mélanges plus complexes comme des extraits de plantes. Toutefois l'utilisation de la 2,5-DHB comme matrice n'est sensiblement pas une matrice de choix dans le cas particulier de l'automatisation. Effectivement, sa cristallisation en forme de paillettes ne permet pas une analyse automatique du dépôt, contrairement à l'HCCA qui cristallise de manière homogène sur la totalité du dépôt. Il serait alors impératif d'optimiser ce paramètre, la meilleure des conditions étant de se passer totalement de matrice pour la détection des composés. En ce sens, une étude

montre qu'un mélange des deux matrices 2,5-DHB et HCCA peut être un des moyens de pallier à ce problème. Les dépôts obtenus par la méthode goutte sèche sont plus homogènes qu'un dépôt avec la 2,5-DHB seule et permettent d'augmenter la sensibilité, la résolution et le rapport signal sur bruit des spectres acquis[24]. Un autre mode de dépôt nommé « matrix layer » développé par Garaguso *et al.* consiste à déposer une couche de 2,5-DHB, la laisser sécher, puis déposer une couche d'analyte acidifié et de recristalliser la préparation « sur plaque » par une solution éthanolique à 20% acidifiée par 0,1% de TFA[25]. Cette méthode permet d'obtenir des cristaux de 2,5-DHB beaucoup plus petits et un dépôt homogène, facilitant l'approche d'automatisation de l'analyse MALDI.

Des études complémentaires par LC-ESI-MS/MS seraient intéressantes à développer afin de déterminer la position exacte de la liaison covalente dans le cas du NSC663284 par exemple[13], ou d'autres inhibiteurs irréversibles. D'autre part, bien que pouvant discriminer rapidement un composé inactif des composés actifs, ce test ne remplace en aucun cas les tests biologiques *in vitro* menés sur les protéines, permettant d'évaluer l'IC_{50} d'un inhibiteur.

A ce stade, notre test de criblage peut être néanmoins appliqué pour mettre en évidence de nouveaux inhibiteurs de CDC25s synthétiques ou naturels. Le réel intérêt du criblage se faisant sur un mélange complexe (comme des extraits de plantes), il devient nécessaire de connaitre le contenu de ces mélanges et donc de les caractériser grâce à différentes méthodes analytiques. Dans le prochain chapitre, nous proposons une stratégie analytique pour la caractérisation d'extraits de brocolis préliminaire à leur criblage par spectrométrie de masse, avant de terminer par un chapitre qui, pour la première fois, montre que ce protocole a pu permettre de détecter une molécule candidate à l'inhibition des CDC25s, au sein d'un extrait végétal, alors qu'elle n'était pas connue pour cette activité.

---

24 S. Laugesen and P. Roepstorff, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 14 (2003) 992-1002.

25 I. Garaguso and J. Borlak, Proteomics 8 (2008) 2583-2595.

Bibliographie :

[1] P. Hannewald, B. Maunit, J. F. Muller, *Tubulin-Binding Drug Screening by MALDI-TOFMS*, Anal. Chem. 78 (2006) 4390-4397.

[2] P. Hannewald, *Etude de l'interaction médicament/récepteur par spectrométrie de masse - Mise en place et validation de nouveaux protocoles de criblage moléculaire-*. Thèse de Doctorat, 2008, Université Paul Verlaine - Metz

[3] E. Sibille, E. Bana, W. Chaouni, M. Diederich, D. Bagrel, P. Chaimbault, *Development of a matrix-assisted laser desorption/ionization–mass spectrometry screening test to evidence reversible and irreversible inhibitors of CDC25 phosphatases*, Anal. Biochem. 430 (2012) 83-91.

[4] L. Brault, D. Bagrel, *Activity of novel Cdc25 inhibitors and preliminary evaluation of their potentiation of chemotherapeutic drugs in human breast cancer cells*, Life Sci. 82 (2008) 315-323.

[5] J. Sohn, B. Kiburz, Z. Li, L. Deng, A. Safi, M. C. Pirrung, J. Rudolph, *Inhibition of Cdc25 Phosphatases by Indolyldihydroxyquinones*, J. Med. Chem. 46 (2003) 2580-2588.

[6] M. Brisson, T. Nguyen, A. Vogt, J. Yalowich, A. Giorgianni, D. Tobi, I. Bahar, C. R. J. Stephenson, P. Wipf, J. S. Lazo, *Discovery and Characterization of Novel Small Molecule Inhibitors of Human Cdc25B Dual Specificity Phosphatase*, Mol. Pharm. 66 (2004) 824-833.

[7] E. Bana, E. Sibille, S. Valente, C. Cerella, P. Chaimbault, G. Kirsch, M. Diedrich, D. Bagrel, *Synthesis and Biological Evaluation of a Novel Quinone-Coumarin Compound Inhibiting CDC25 Phosphatases*, Mol. Carcinogen., sous presse (2013).

[8] M. C. Pirrung, L. Deng, Z. Li, K. Park, *Synthesis of 2,5-Dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinones by Acid-Catalyzed Condensation of Indoles with 2,5-Dichlorobenzoquinone*, J. Org. Chem. 67 (2002) 8374-8388.

[9] P. J. Calba, J. F. Muller, A. Hachimi, P. Laréginie, R. Guglielmetti, *Spirooxazines as a Molecular Probe for the Study of Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Processes. Part I: Study of the Interaction Effect Between the Molecular Probe and the Matrix*, Rapid Comm. Mass Spectrom. 11 (1997) 1602-1611.

[10] M. C. Brezak, M. Quaranta, O. Mondésert, *A Novel Synthetic Inhibitor of CDC25 Phosphatases : BN82002*, Cancer Res. 64 (2004) 3320-3325.

[11] M.-C. Brezak, P. G. Kasprzyk, M.-O. Galcera, O. Lavergne, G. P. Prevost, *CDC25 Inhibitors as Anticancer Agents Are Moving Forward*, Anti-Cancer Agents Med. Chem. 8 (2008) 857-862.

[12] M. O. Contour-Galcéra, O. Lavergne, M. C. Brezak, B. Ducommun, G. Prévost, *Synthesis of small molecule CDC25 phosphatases inhibitors*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 5809-5812.

[13] L. Pu, A. Amoscato, M. Bier, J. Lazo, *Dual G1 and G2 Phase Inhibition by a Novel, Selective Cdc25 Inhibitor 7-chloro-6-(2-morpholin-4-ylethylamino)-quinoline-5,8-dione*, J. Biol. Chem. 277 (2002) 46877-46885.

[14] V. R. Vorperian, T. C. Havighurst, S. Miller, C. T. January, *Adverse Effects of Low Dose Amiodarone: A Meta-Analysis*, J. Am. Coll. Cardiol. 30 (1997) 791-798.

[15] M. Mann, P. Højrup, P. Roepstorff, *Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases*, Bio. Mass Spectrom. 22 (1993) 338-345.

[16] D. J. C. Pappin, P. Hojrup, A. J. Bleasby, *Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting*, Curr. Biol. 3 (1993) 327-332.

[17] J. R. Yates, S. Speicher, P. R. Griffin, T. Hunkapiller, *Peptide Mass Maps: A Highly Informative Approach to Protein Identification*, Anal. Biochem. 214 (1993) 397-408.

[18] W. Henzel, C. Watanabe, J. Stults, *Protein identification: The origins of peptide mass fingerprinting*, J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 14 (2003) 931-942.

[19] D. M. Horn, E. C. Peters, H. Klock, A. Meyers, A. Brock, *Improved protein identification using automated high mass measurement accuracy MALDI FT-ICR MS peptide mass fingerprinting*, Int. J. Mass Spectrom. 238 (2004) 189-196.

[20] D. da Silva, T. Wasselin, V. Carré, P. Chaimbault, L. Bezdetnaya, B. Maunit, J.-F. Muller, *Evaluation of combined matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry experiments for peptide mass fingerprinting analysis*, Rapid Comm. Mass Spectrom. 25 (2011) 1881-1892.

[21] D. Da Silva, *Evaluation d'une approche protéomique par spectrométrie de masse pour l'identification de protéines cibles impliquées dans la thérapie photodynamique* Thèse de Doctorat, 2012, Université Paul Verlaine - Metz

[22] E. Bana, *Inhibition des phosphatases CDC25s dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse : étude mécanistique de nouveaux inhibiteurs*. Thèse de Doctorat, 2013, Université de Lorraine

[23] E. Viry, A. Anwar, G. Kirsch, C. Jacob, M. Diedrich, D. Bagrel, *Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases*, Int. J. Oncol. 38 (2011) 1103-1111.

[24] S. Laugesen, P. Roepstorff, *Combination of two matrices results in improved performance of maldi ms for peptide mass mapping and protein analysis*, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 14 (2003) 992-1002.

[25] I. Garaguso, J. Borlak, *Matrix layer sample preparation: An improved MALDI-MS peptide analysis method for proteomic studies*, Proteomics 8 (2008) 2583-2595.

CHAPITRE IV

MISE EN PLACE DE TECHNIQUES D'ANALYSES COMPLEMENTAIRES A PARTIR D'EXTRAITS DE BROCOLIS POUR L'ETUDE DES EXTRAITS VEGETAUX SOUMIS AU CRIBLAGE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

CHAPITRE IV MISE EN PLACE DE TECHNIQUES D'ANALYSES COMPLEMENTAIRES A PARTIR D'EXTRAITS DE BROCOLIS POUR L'ETUDE DES EXTRAITS VEGETAUX SOUMIS AU CRIBLAGE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE 133

INTRODUCTION 137

I. Composition du brocoli, propriétés anticancéreuses et chimiopréventives associées 138

I.1. Les agents chimiopréventifs 139

I.1.1. Définition 139

I.1.2. Les glucosinolates et isothiocyanates 139

I.2. Les composés antioxydants 143

II. Préparation des extraits de brocolis 145

II.1. Les différentes méthodes d'extraction 146

II.1.1. Procédures d'extraction conventionnelles 146

II.1.2. Méthodes d'extraction améliorées 147

II.2. Extractions au Soxhlet 149

II.2.1. Mode opératoire 150

II.3. Profils des extraits 151

II.3.1. Nombres de signaux détectés 151

II.3.2. Classe de métabolites détectés 152

I.1.2. Analyse des glucosinolates 156

I.2. Analyse ESI-FTICRMS 157

II. Contrôle de la qualité des extraits par HPTLC.....160

II.1. Principe et mode opératoire 160

II.2. Stabilité des extraits dans le temps 161

II.3. Profil HPTLC-UV d'un extrait de graines de brocoli 162

II.4. Compléments d'analyse par TLC-MALDI-TOFMS 165

II.4.1. Principe et mode opératoire 165

II.4.2. Résultats 166

II.5. Conclusion sur la place de la TLC 169

III. Mise en place des analyses LC-MS et LC-MS^n 169

III.1. Appareillage 170

III.1.1. La chromatographie liquide 170

III.1.2. La spectrométrie de masse : la trappe ionique 171

III.2. Résultats expérimentaux 173

III.2.1. Infusion directe 173

III.2.2. LC-MS et LC-MS^n 174

IV. Mesure de l'activité biologique des extraits.....179

IV.1. Inhibitions des CDC25s et cytotoxicité..... 179

IV.2. Résultats du test de criblage..... 180

CONCLUSION 181

INTRODUCTION

Comme nous l'avons vu dans les deux premiers chapitres, les recherches actuelles se focalisent sur la découverte de nouvelles molécules bioactives par le biais de criblages moléculaires de plus en plus perfectionnés. Cependant, lorsqu'un extrait d'origine naturelle est criblé, la complexité de sa composition, à laquelle on peut ajouter par exemple l'influence du traitement ou son évolution dans le temps (conservation), nécessitent des analyses complémentaires afin de connaitre au mieux la qualité du matériel travaillé. Au commencement de ce travail, le laboratoire était principalement spécialisé dans des approches analytiques par spectrométrie de masse seule. Cependant cette technique ne peut assurer à elle seule la caractérisation d'un extrait végétal. Des analyses complémentaires, en particulier le couplage à la chromatographie sur couche mince (TLC pour Thin Layer Chromatography) et le couplage à la chromatographie en phase liquide (LC pour Liquid Chromatography), ont dû être mises en place. La mise en place des techniques analytiques et d'extraction de produits naturels requiert plusieurs années et des moyens analytiques considérables afin de couvrir de façon la plus exhaustive les approches citées dans la littérature. C'est pourquoi seules quelques techniques ont pu être abordées durant ce travail. Elles montreront cependant leur potentiel dans l'application présentée dans le dernier chapitre de ce mémoire.

Afin de développer ces analyses complémentaires, nous avons choisi un végétal « modèle » selon les critères suivants :

- Le végétal doit présenter un intérêt sur le plan du cancer ;
- Il doit être disponible en quantité suffisante de sorte à ne pas avoir à nous soucier de la disponibilité de la matière fraiche pour assurer un développement méthodologique sur le long terme ;
- Il doit être cultivable dans la région Lorraine puisque ce travail est supporté financièrement par le conseil régional de Lorraine.

Le choix s'est porté sur le brocoli *(Brassica oleracea)*. Appartenant à la famille des *Brassicaceae* et pouvant être cultivé en Lorraine, il est une source riche en agents phytochimiques qui peuvent contribuer à la protection du corps humain[1]. De nombreux métabolites de cette plante sont recensés dans la littérature et certaines de leurs propriétés bénéfiques sont décrites[2].

Ce chapitre débutera par une présentation des principales classes de familles de molécules du brocoli en relation avec leurs propriétés antioxydantes, anticancéreuses et chimiopréventives. Dans

---

1 R. Verkerk, M. Schreiner, A. Krumbein, E. Ciska, B. Holst, I. Rowland, R. D. Schrijver, M. Hansen, C. Gerhäuser, R. Mithen and M. Dekker, Mol. Nut. Food Res. 53 (2009) S219.

2 T. Sun, J. R. Powers and J. Tang, Food Chem. 105 (2007) 101-106.

un deuxième temps seront présentés la méthode d'extraction utilisée et les résultats des analyses par spectrométrie de masse, par chromatographies planaire et liquide des extraits de fleurs et de graines de brocoli. Enfin, nous décrirons les résultats de l'évaluation biologique de l'extrait de graines et nous dirons quelques mots sur criblage des CDC25s avec cet extrait.

I. Composition du brocoli, propriétés anticancéreuses et chimiopréventives associées

Cette partie de chapitre ne sera pas exhaustive et décrit uniquement les familles principales de métabolites secondaires présents dans le brocoli susceptibles d'être observés lors de nos analyses.

Les végétaux de la famille des *Brassicaceae* (ex : crucifères) sont une excellente source de composés phytochimiques parmi lesquels les glucosinolates, des composés phénoliques variés et autres antioxydants comme les vitamines (C, K1, …) et quelques oligoéléments intéressants comme le sélénium[3,4]. Les antioxydants alimentaires (ex : flavonoïdes) présents dans le brocoli agissent sur le corps humain en provoquant une diminution du risque de cancers et de maladies cardiovasculaires[5,6]. Cependant la composition en métabolites d'intérêt dans le brocoli comme dans tout autre végétal varie significativement d'une espèce à l'autre, ce qui rend difficile toute tentative de rationalisation des quantités[6]. Ainsi une étude portant sur 80 variétés de brocolis a montré que les taux de β-carotène, d'acide ascorbique et de tocophérol peuvent varier jusqu'à 6 fois entre le plus bas et le plus élevé[7]. Une telle variabilité en métabolites au sein d'un même végétal peut également être retrouvée selon la provenance géographique, la saisonnalité, l'état de stress de la plante[8] mais aussi selon le mode de préparation et de cuisson de l'aliment[9].

3 J. W. Finley, C. Ip, D. J. Lisk, C. D. Davis, K. J. Hintze and P. D. Whanger, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 2679-2683.
4 J. W. Finley, J. Med. Food 6 (2003) 19-26.
5 M. E. Cartea, M. Francisco, P. Soengas and P. Velasco, Molecules 16 (2011) 251-280.
6 E. H. Jeffery, A. F. Brown, A. C. Kurilich, A. S. Keck, N. Matusheski, B. P. Klein and J. A. Juvik, J. Food Comp. Anal. 16 (2003) 323-330.
7 E. Koh, K. M. S. Wimalasiri, A. W. Chassy and A. E. Mitchell, J. Food Comp. Anal. 22 (2008) 637-643.
8 Z. Balouchi, G.-A. Peyvast, M. Ghasemnezhad and M. Saadatian, South Western J. Hort. Biol. Environ. 2 (2011) 193-212.
9 R. B. Jones, C. L. Frisina, S. Winkler, M. Imsic and R. B. Tomkins, Food Chem. 123 (2010) 237-242.

I.1. Les agents chimiopréventifs

I.1.1. Définition

En 1976, Sporn *et al*, sont les premiers à utiliser le terme « chimiopréventif » pour la vitamine A et ses analogues synthétiques dans le cas de certaines formes de cancer épithélial[10]. Les agents chimiopréventifs se distinguent en deux catégories : les agents bloquants qui agissent durant la phase d'initiation de la cancérogenèse (cf. chapitre I § I.2) et les agents suppresseurs qui interviennent lors des phases de promotion et de progression de la cancérogenèse. De nombreuses études ont montré que le régime alimentaire était une source riche en agents chimiopréventifs dont, par exemple, les isothiocyanates dans les végétaux crucifères, la catéchine dans le thé vert, les isoflavones dans le soja, le resvératrol dans le raisin, les curcuminoïdes dans le curcuma et les procyanidines dans les fruits et les noix[11,12]. D'autres agents chimiopréventifs ont été synthétisés afin de pallier aux manques d'efficacité des agents naturels et d'éviter leurs possibles effets secondaires[13]. Parmi ces agents synthétiques nous retrouvons par exemple des analogues d'acides ursolique et oléanolique pour leur capacité d'inhibition des enzymes iNOS (inducible nitric oxide synthase) et COX-2 (cyclooxygenase 2).

I.1.2. Les glucosinolates et isothiocyanates

I.1.2.1. Description et métabolisme

Les principaux métabolites secondaires contenant du soufre présents chez les *Brassicaceae* : les glucosinolates et la cystéine S-methyl sulfoxyde. Ces composés organosoufrés montrent des propriétés anticancéreuses et peuvent être utilisés comme agents chimiopréventifs chez l'homme. Ces composés, en action avec d'autres constituants comme les vitamines et les flavonoïdes, pourraient être les agents les plus efficaces dans les végétaux crucifères[14].

Les glucosinolates (GSL, **Figure 72**) sont des composés naturels que l'on retrouve en abondance dans de nombreuses crucifères du genre *Brassica* (brocoli, chou de Bruxelles, chou-fleur…). La structure de base comporte un groupe N-oximesulfate dont le carbone est substitué par un groupe 1-β-D-glucopyranose et un groupe latéral R variable de type alkyl, alkényl, aromatique ou indolyl.

---

10 M. B. Sporn, N. M. Dunlop, D. L. Newton and J. M. Smith, Fed Proc. 35 (1976) 1332-1338.
11 P. Greenwald, G. Kelloff, C. Burch-Whitman and B. S. Kramer, A Cancer J. for Clinicians 45 (1995) 31-49.
12 Y.-J. Surh, Mut. Res. 428 (1999) 305-327.
13 M. B. Sporn and N. Suh, Carcinogenesis 21 (2000) 525-530.
14 K. J. Hintze, K. Wald and J. W. Finley, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 5535-5540.

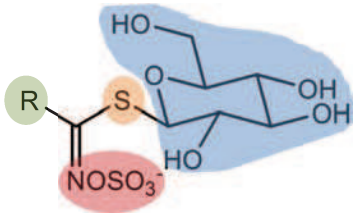


Figure 72 : Formule générale d'un glucosinolate. *« R » entouré en vert correspond à la chaine latérale des glucosinolates, le groupe N-oximesulfate est entouré en rouge, le soufre en orange et le glucose en bleu.*

Plus de 120 GSL ont été identifiés dans les plantes comestibles. Ces composés ont longtemps été connus pour leurs propriétés antifongiques et antibactériennes mais ils ont récemment fait l'objet d'intenses recherches en chimioprévention[15]. Le tableau présenté en annexe IV regroupe les principaux glucosinolates identifiés dans le brocoli et autres crucifères[16].

Les GSL sont présents dans toute la plante, mais en concentrations variables selon ses parties (pied, fleurs, graines) et son stade de développement. Généralement, une seule plante contient 4 GSL majoritaires mais plus de 15 peuvent être détectés dans celle-ci. Chaque espèce de la famille des Brassicaceae a un profil différent en GSL dont quelques-uns, majoritaires, sont représentatifs d'un genre particulier. Dans le cas du brocoli, les GSL majoritaires sont les glucoraphanine, glucoibérine et progoitrine[17].

Lorsque les végétaux sont mâchés ou cuisinés, les GSL sont hydrolysés en isothiocyanates (ITCs) grâce à la myrosinase par coupure de la liaison entre le carbone du glucopyranose et l'atome de soufre de la fonction thioester. Le schéma de métabolisation des GSL est présenté **Figure 73**[18]. Les ITCs se conjuguent alors au glutathion (GSH) *via* l'action de la glutathion *S*-transférase. Ce conjugué est ensuite métabolisé par une série d'enzymes jusqu'en acide mercapturique (N-acétylcystéine) facilement excrété par les urines.

---

15 G. Van Poppel, D. T. Verhoeven, H. Verhagen and R. A. Goldbohm, Adv. Exp. Med. Biol. 472 (1999) 159-168.

16 J. W. Fahey, A. T. Zalcmann and P. Talalay, Phytochem. 56 (2001) 5-51.

17 Q. Tian, R. A. Rosselot and S. J. Schwartz, Anal. Biochem. 343 (2005) 93-99.

18 Y. S. Keum, W. S. Jeong and A. N. Tony Kong, Mutat. Res. Fund. Mol. M. 555 (2004) 191-202.

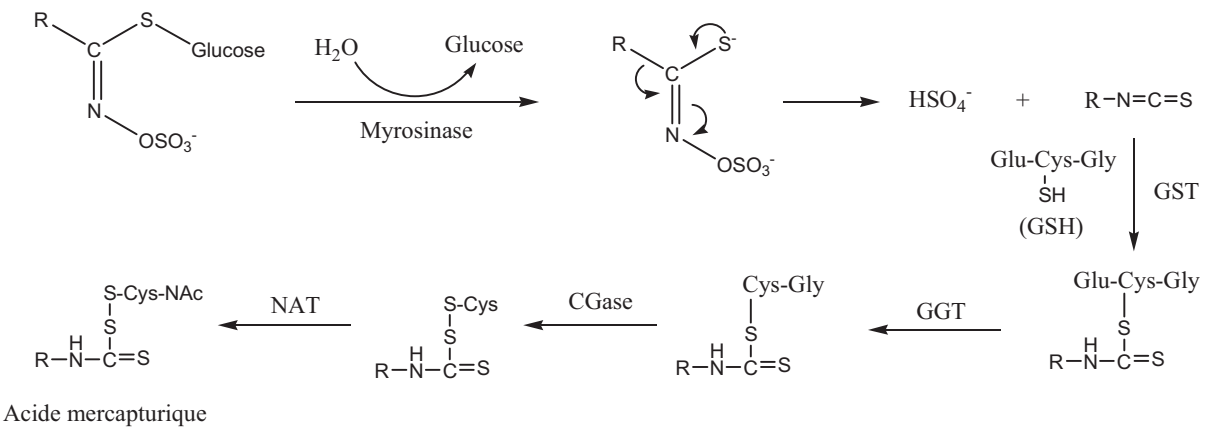


Figure 73 : Voie de métabolisation des glucosinolates[18]. *Après hydrolyse par la myrosinase, les ITCs produits subissent une suite de métabolisation. Le produit résultant est l'acide mercapturique (GST = Glutathion S-transférase, GSH = Glutathion, GGT = γ-glutamyltransferase, CGase = Cystéinylglycinase et NAT = N-acétyltransferase.*

I.1.2.2. Les isothiocyanates

Les ITCs sont des métabolites secondaires organosoufrés de faibles poids moléculaires et de formule générale R-N=C=S. La nature de la chaine latérale R des glucosinolates donne naissance aux différents ITCs qui montrent en retour des effets biologiques distincts. En effet, le carbone hautement électrophile du groupe iothiocyanate réagit plus ou moins facilement avec des nucléophiles cellulaires selon la nature de R influençant leurs métabolisme et activités biologiques[19].

Dès 1966, les premières études menées sur des rats conduisent à observer des effets chimiopréventifs de certains ITCs[20]. Depuis, plusieurs études montrent un effet inhibiteur significatif sur des tumeurs cancérigènes. Par exemple, en 1999, Hecht *et al.* publient sur l'inhibition de tumeurs de la langue par la gluconasturtiine[21] et en 2003, Zhang *et al.* montrent que certains ITCs peuvent rapidement initier l'inhibition de la croissance de cellules cancéreuses en agissant sur de multiples cibles cellulaires[22]. Toutes ces données ont amené à relier la consommation de crucifères riches en glucosinolates à la diminution du risque de nombreux cancers.

De nos jours, les recherches se focalisent sur le mode d'action de ces ITCs. Le **Tableau 5** regroupe les effets connus des ITCS ainsi que la réponse biologique qu'ils provoquent[18]. Certains aspects apparaissent intéressants. Il a été observé que les effets des crucifères sont importants lors de la phase d'initiation de la cancérogénèse, plus particulièrement dans le cas du cancer de la

19 B. E. Cavell, S. S. Syed Alwi, A. Donlevy and G. Packham, Biochem. Pharm. 81 (2011) 327-336.
20 H. Sidransky, N. Ito and E. Verney, J. Natl. Cancer Inst. 37 (1966) 677-686.
21 S. S. Hecht, J. Nutr. 129 (1999) 768-774.
22 Y. Zhang, L. Tang and V. Gonzalez, Mol. Cancer Ther. 2 (2003) 1045-1052.

prostate[23]. Une autre conclusion résulte d'une cascade d'observations. Les ITCs étant des substrats métaboliques de différentes isoenzymes de la GST, les patients dont le polymorphisme génétique montre une déficience de ces enzymes (GSTM1 et GSTT1) ont une concentration d'ITCs dans le sang et les tissus plus élevée que les patients exprimant normalement ces deux isoenzymes. Les ITCs sont donc métabolisés plus lentement et leurs effets bénéfiques seront alors plus importants[24]. Cette étude a cependant été contredite par un autre groupe de chercheurs présentant des résultats différents et montrant que l'effet protecteur des ITCS n'est pas influencé par le génotype GSTM1 ou GSTT1[25].

Tableau 5 : Potentiels mécanismes contribuant à l'effet anticancéreux des ITCs[19].

Réponse biologique	Effets
Régulation des enzymes P450	Inhibition ou dérégulation des cytochromes P450, enzymes importantes pour l'activation des agents cancéreux chimiques.
Induction de l'expression des gènes antioxydant	Augmentation de l'activité de Nrf2, un facteur transcriptionel clé impliqué dans la réponse de gènes d'induction oxydant/électrophile et médiateur de l'activité chimiopréventive.
Arrêt du cycle cellulaire	Observation d'une inhibition de la progression du cycle cellulaire dans différentes lignées cellulaires dérivées de tumeurs malignes. Un arrêt aux phases G1, S or G2/M du cycle cellulaire a été décrit.
Induction de l'apoptose	Induction de l'apoptose par des voies intrinsèques et extrinsèques dans une variété de lignées cellulaires dérivées de tumeurs malignes.
Induction de la nécrose	Nécrose Induite à concentrations plus élevées que pour l'apoptose.
Métastase	Inhibition de la division cellulaire, invasion et la migration *in vitro*, et des métastases *in vivo*.
Inhibition de l'angiogenèse	Inhibition de l'angiogenèses dans des modèles *in vitro* et *in vivo*.

Le **sulforaphane** (SFN) est l'un des deux ITCs les plus étudiés, avec l'indole-3-carbinol (I3C)[26]. Le glucosinolate parent du SFN est la glucoraphanine, abondante dans une large variété de plante, dont le brocoli. De nombreuses références font état des effets et activités du SFN, revues en détail par

23 A. R. Kristal and J. W. Lampe, Nutr. Cancer 42 (2002) 1-9.
24 R. H. Kolm, U. H. Danielson, Y. Zhang, P. Talalay and B. Mannervik, Biochem. J. 311 (1995) 453-459.
25 H. Zhao, J. Lin, H. B. Grossman, L. M. Hernandez, C. P. Dinney and X. Wu, Int. J. Cancer 120 (2007) 2208-2213.
26 J. V. Hidgon, B. Delage, D. E. Williams and R. H. Dashwood, Pharmacol. Res. 55 (2007) 224-236.

Jugea *et al.*[27] Depuis son isolation dans le brocoli en 1980, les recherches ont démontré son effet chimiopréventif par des actions antioxydante, anticancéreuse et anti-proliférative[28,29,30]. Le SFN joue prioritairement le rôle d'inducteur d'enzymes de phase I et II. Les enzymes de phase I sont importantes dans le processus métabolique normal de composés endogènes et exogènes, dont certaines substances cancérigènes. Les enzymes de phase II détoxifient l'organisme de ces substances cancérigènes en facilitant leur excrétion. L'effet de cette induction est donc chimiopréventif. De plus, sachant que certaines enzymes de phase II ont une activité antioxydante, il est alors aisé de comprendre la fonction antioxydante du SFN. Une autre action du SFN consiste à agir sur les CDKs (régulateurs du cycle cellulaire) et les cyclines. On constate l'arrêt du cycle cellulaire à la phase G_2/M de la lignée cellulaire PC-3, ainsi qu'une diminution des cyclines 1 et des CDC25B et C après traitement avec 20 µM de SFN[31]. Or la transition G_2/M requiert la CDK1 qui est activée par déphosphorylation par les CDC25s. L'une des cibles protéiques les mieux caractérisées par le SFN est la tubuline. En effet, en 2004 Jackson *et al.* montrent pour la première fois que le SFN inhibe la prolifération de cellules cancéreuses du sein (MCF7) via un mécanisme de perturbation des microtubules mitotiques, d'activation des kinases CDC2 et un arrêt du cycle cellulaire en phase G_2/M[32].

I.2. Les composés antioxydants

Dans la cellule, les défenses antioxydantes sont de nature enzymatique (glutathion-peroxydase, superoxyde dismutase, …) ou des espèces non enzymatiques. Ces dernières sont des molécules qui diminuent ou empêchent l'oxydation d'autres substances. Ils ont pour but de réduire l'oxydation de leur substrat, soit par neutralisation des radicaux libres, soit par la destruction des hyperperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en rompant la liaison O-O). Les antioxydants jouent un rôle important dans le métabolisme humain en inhibant l'initiation des réactions d'oxydation ou en stoppant leur propagation en chaine néfaste sur les cellules de notre corps (accélération du processus de vieillissement). Normalement, le corps humain maintient l'équilibre entre antioxydants et radicaux libres en les produisant simultanément dans le processus

27 N. Jugea, R. F. Mithena and M. Trakaa, Cell. Mol. Life Sci. 64 (2007) 1105-1127.

28 Y. Zhang, T. W. Kensler, C. G. Cho, G. H. Posner and P. Talalay, Proceedings of the National Academy of Sciences 91 (1994) 3147-3150.

29 W. Wang, S. Wang, A. F. Howie, G. J. Beckett, R. Mithen and Y. Bao, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 1417-1421.

30 W. Y. Choi, B. T. Choi, W. H. Lee and Y. H. Choi, Biomed. Pharmacother. 62 (2008) 637-644.

31 W. F. Chu, D. M. Wu, W. Liu, L. J. Wu, D. Z. Li, D. Y. Xu and X. F. Wang, Oral Oncol. 45 (2009) 998-1004.

32 S. J. T. Jackson and K. W. Singletary, J. Nutr. 134 (2004) 2229-2236.

métabolique. Un déséquilibre entre ces deux substances conduit à un phénomène appelé « stress oxydant »[33].

Le brocoli est une source riche en composés antioxydants puisqu'il contient notamment des polyphénols[34] (**Figure 74**). Cette famille comporte plusieurs sous familles que l'on peut classer selon leur structure ou leurs propriétés, allant des acides phénoliques simples (ex : acides salicylique ou gallique), qui sont également les unités de base d'autres polyphénols comme l'epigallocatechin-3-gallate, à des molécules plus condensées comme les lignines, en passant par les flavonoïdes et autres dérivés d'acides hydroxycinamiques (ex : acide chlorogénique).

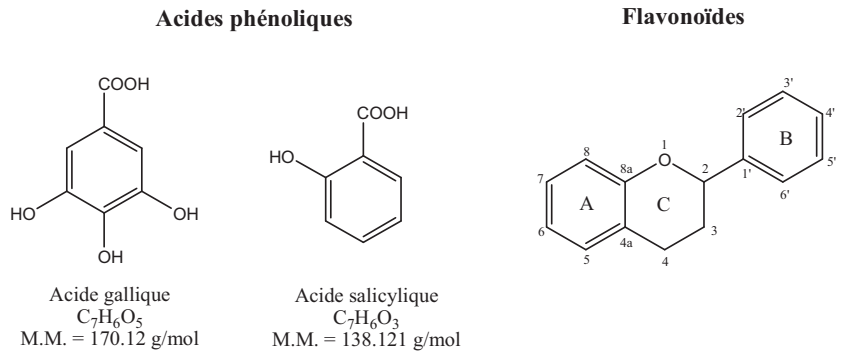


Figure 74 : Masses moléculaires, formules brutes et développées d'acides phénoliques. Structure de base des flavonoïdes et nomenclature générale.

Un grand nombre de ces métabolites sont modifiés dans la plante pour les rendre plus ou moins hydrosolubles. Ainsi, les flavonoïdes possèdent plusieurs sites de fixation pouvant subir différents types de modifications (hydroxylations, méthoxylation ou glycosylation). L'étude de la composition en flavonoïdes des fleurs de brocolis a abouti à la caractérisation d'un grand nombre d'esters glycosylés d'acides hydroxycinnamique et de flavonoïdes[35]. Parmi eux, des sophorosides de kaempferol, de quercétine et de rhamnétine (à l'état de trace pour ce dernier) ont été identifiées. Lors d'une étude portant sur les extraits de 36 végétaux, dont 22 espèces de brocolis, l'activité antioxydante a semblé significativement et positivement corrélée au contenu total en composés phénoliques[36] signifiant que les végétaux riches en composés phénoliques procurent une source d'antioxydants naturels via l'alimentation.

La majeure partie des antioxydants contenus dans les végétaux sont les vitamines C et E, les caroténoïdes et les composés phénoliques, plus particulièrement les flavonoïdes.

---

33 B. Yepez, M. Espinosa, S. López and G. Bolaños, Fluid Phase Equilibr. 194–197 (2002) 879-884.

34 L.-Z. Lin and J. M. Harnly, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 7401-7408.

35 F. Vallejo, F. A. Tomás-Barberán and F. Ferreres, J. Chrom. A 1054 (2004) 181-193.

36 C. Kaur and H. C. Kapoor, Int. J. Food Sci. Technol. 37 (2002) 153-161.

On distingue deux classes d'antioxydants[37] :

- Les antioxydants hydrosolubles comme les composés phénoliques. Ceux-ci sont contenus dans le brocoli principalement sous forme de dérivés de kaempférol, de quercétine et d'isorhamnetine plus ou moins glycosylés (ex : sophorosides). Ils sont capables de capter les ROS grâce à leurs propriétés de donneur d'électrons. Ils procurent un effet protectif capillaire et un effet inhibiteur de tumeur[38]. Leur efficacité antioxydante dépend du nombre et de la position des groupes hydroxyles. Dans de nombreuses études *in vitro*, les composés phénoliques montrent une activité antioxydante supérieure à celle des vitamines et des caroténoïdes. La vitamine C (acide ascorbique et ses produits d'oxydation) est un autre antioxydant hydrosoluble. Elle agit comme capteurs de radicaux libres et comme donneur/accepteur dans le transport d'électrons au niveau de la membrane du plasma[39].
- Les antioxydants liposolubles comme les caroténoïdes (carotènes et xanthophylles) et la vitamine E (tocophérols, tocotriénols). Les taux élevés de cancer, de maladies cardiovasculaires, et l'augmentation du risque d'infarctus du myocarde chez les fumeurs ont été corrélés à une carence en β-carotène. La vitamine E montre des effets protecteurs contre les maladies coronaires par inhibition de l'oxydation des lipoprotéines de basse densité[40]. Le brocoli est le végétal le plus riche en tocophérols et tocotriénols avec environ 0,82 mg/100 g de matière fraiche.

Après avoir présenté les principales familles de métabolites secondaires contenues dans le brocoli, nous allons maintenant traiter de leur extraction.

II. Préparation des extraits de brocolis

L'extraction est l'une des étapes les plus importantes dans l'analyse de produits naturels. Les molécules d'intérêt contenues dans les tissus de la plante doivent être solubilisées dans une phase liquide avant d'être directement analysées ou soumises à un prétraitement analytique. Dans cette deuxième partie nous allons tout d'abord aborder différentes méthodes d'extractions parmi les plus employées actuellement pour les végétaux. Nous verrons plus en détail celle utilisée pour réaliser nos extraits de fleurs et de graines de brocolis avec les conditions expérimentales appliquées.

---

37 A. Podsedek, Food Sci. Tech. 40 (2007) 1-11.

38 S. Kuntz, U. Wenzel and H. Daniel, Eur. J. Nutr. 38 (1999) 133-142.

39 M. W. Davey, M. V. Montagu, D. Inzé, M. Sanmartin, A. Kanellis, N. Smirnoff, I. J. J. Benzie, J. J. Strain, D. Favell and J. Fletcher, J. Sci. Food Agric. 80 (2000) 825-860.

40 M. J. Stampfer and E. B. Rimm, Am. J. Clinic. Nutr. 62 (1995) 1365S-1369S.

II.1. Les différentes méthodes d'extraction

Même si la plupart des métabolites d'intérêt sont solubilisés dans le cytoplasme ou les vacuoles des cellules, nous pouvons considérer que le matériel végétal est, à quelques exceptions près (ex : sève, résine liquide), un solide. L'extraction des composés d'intérêt végétaux consiste à les faire passer d'un échantillon dans un milieu liquide (solvants purs ou en mélange) dans lequel ils seront solubles. Le milieu liquide est en effet souvent plus propice à l'introduction de l'échantillon en vue d'une méthode séparative (chromatographie en phase liquide mais aussi en phase gazeuse) ou spectroscopique (spectrométrie de masse en couplage ou non avec une méthode séparative). Il en va d'ailleurs de même pour notre méthode de criblage décrite au chapitre précédent, pour laquelle la mise en contact avec la protéine cible requiert la solubilisation des molécules candidates. Afin d'améliorer l'efficacité de l'extraction, il faut souvent rompre préalablement les parois cellulaires, par broyage par exemple, afin d'accéder aux métabolites d'intérêt. Ce genre de prétraitement a ici été mis en œuvre avant l'opération d'extraction proprement dite.

Les méthodes d'extraction peuvent être subdivisées en deux grandes catégories. La première repose sur des concepts anciens, simples mais qui ont fait leur preuve dans le passé et dont certains servent de base à des comparaisons entre méthodes d'extraction. La deuxième catégorie repose sur une instrumentation moderne et ces méthodes sont réputées plus efficaces, quoique les résultats dépendent aussi grandement de la nature des métabolites extraits.

II.1.1. Procédures d'extraction conventionnelles

Les premiers procédés d'extraction sont très anciens et ils sont utilisés pour extraire les principes actifs des plantes pour la préparation médicamenteuse, voire même simplement de boissons comme le thé, café ou autres tisanes. Ils reposent sur l'infusion ou la **macération** de la plante dans un solvant, froid ou chaud afin d'augmenter l'efficacité de l'extraction. Durant le procédé, le solvant pénètre les tissus et dissout les métabolites. Dans ce cas, le broyage de la plante est fréquemment réalisé afin de faciliter le passage de la membrane cellulaire et augmenter les échanges entre la matrice solide et le solvant[41]. Le solvant joue un rôle clé dans le procédé et doit être choisi en fonction des propriétés hydrophiles et lipophiles des métabolites à extraire. Cette technique permettant l'extraction d'un gros volume de matière première a d'ailleurs été employée pour l'extraction de racines de plantes dans l'application présentée dans le chapitre V. La macération

[41] D. R. Heldman and R. W. Hartel, Principles of Food Processing, Chapman & Hall, (1997).

est encore fréquemment employée pour l'extraction de pousses ou de graines de brocolis, pour l'analyse des glucosinolates ou d'autres métabolites comme les flavonoïdes[42,43].

Les procédures d'extraction conventionnelles incluent également des méthodes un peu plus complexes comme l'**hydrodistillation** ou l'**extraction au Soxhlet**. Cette dernière est l'une des méthodes d'extraction les plus utilisées et constitue une référence de comparaison avec d'autres procédures existantes. Il s'agit d'une procédure d'extraction solide-liquide présentant l'avantage d'une source constante de solvant frais par distillation[44]. Le solvant d'extraction n'est ainsi jamais saturé et le rendement d'extraction augmente en même temps que l'échantillon est progressivement épuisé des molécules d'intérêt. L'inconvénient majeur concernant cette technique, comparée aux autres techniques d'extraction solide-liquide, est le temps particulièrement long requis pour l'extraction (quelques heures) et la quantité de solvant utilisée (quelques centaines de millilitres). Par ailleurs, l'échantillon est extrait au point d'ébullition du solvant durant de longues périodes, ce qui peut entrainer une dégradation thermique des molécules actives, réduisant ainsi l'activité finale de l'extrait. Une étape d'évaporation/concentration devient également souvent inévitable suite aux larges quantités de solvant utilisées. Cette technique est donc limitée d'un point de vue de la sélectivité du solvant et n'est pas facilement automatisable. Cependant le Soxhlet reste une méthode à faible coût puisqu'une simple verrerie de laboratoire et un chauffage électrique suffisent. Cette technique est d'ailleurs mise en œuvre pour l'extraction méthanolique de graines de brocolis, afin d'isoler le sel de sinapine et de glucoraphanine[45]. Nous avons donc commencé par mettre en œuvre cette technique pour l'extraction du brocoli, d'autant plus que le chauffage procuré lors de l'extraction permet de dégrader la myrosinase et d'ainsi limiter la métabolisation de certains métabolites.

II.1.2. Méthodes d'extraction améliorées

Des méthodes d'extraction améliorées ont été introduites afin de pallier aux inconvénients des méthodes conventionnelles. Elles ont été développées dans le but d'éviter la dégradation thermique des composés actifs, d'augmenter les rendements d'extraction mais également de réduire les consommations de solvant (aspect toxicité environnementale), de temps et de coûts. Bien que déjà

---

42 G. B. Bengtsson, R. Schöner, E. Lombardo, J. Schöner, G. I. A. Borge and W. Bilger, Postharvest Biol. Tec. 39 (2006) 291-298.

43 O. N. Campas-Baypoli, D. I. Sánchez-Machado, C. Bueno-Solano, B. Ramírez-Wong and J. López-Cervantes, Biomed. Chrom. 24 (2010) 387-392.

44 M. D. Luque de Castro and F. Priego-Capote, J. Chrom. A 1217 (2010) 2383-2389.

45 M. A. Berhow, K. Vermillion, G. N. Jham, B. Tisserat and S. F. Vaughn, Am. J. Plant Sci. 1 (2010) 113-118.

appliquées aux brocolis, les méthodes décrites dans la littérature n'ont pas pu être transposées au laboratoire faute de temps et de disponibilité de matériel. En effet, le focus a été mis dans ce travail sur la mise en place des méthodes permettant la caractérisation des échantillons. L'une des perspectives associées au travail présenté dans ce mémoire serait effectivement d'évaluer de nouveaux extraits de brocoli préparés selon les techniques décrites ci-après.

L'**extraction assistée par ultrasons** (UAE, Ultrasonic Assisted Extraction) consiste à mélanger dans un même contenant l'échantillon et le solvant d'extraction, puis de placer l'ensemble dans un bain à ultrasons ou de le soumettre directement aux ultrasons grâce à sonde plongée dans le solvant. Les ondes sonores appliquées de fréquence supérieure à 20 kHz traversent la matière et provoquent une expulsion de petites particules de matrice facilitant le transfert des molécules vers le solvant d'extraction[46]. L'UAE a été testée dans le cadre d'extraction de plantes enrichies en sélénium et permet de réduire le temps d'extraction tout en gardant un bon taux d'extraction du sélénium[47]. Cette technique est très employée pour extraire des polyphénols variés dans les plantes quel que soit l'organe, feuilles[48], tiges[49], fruits[50] ou même graines[51].

L'**extraction accélérée par solvant** (ASE, Accelerated Solvent Extraction) utilise l'effet combiné de température et pression élevées avec des solvants classiques afin d'augmenter l'efficacité du processus d'extraction. L'ASE allie ainsi à une haute solubilité de l'analyte, une diffusion plus rapide de l'analyte contenu dans la matrice vers le solvant, une réduction de la viscosité du solvant pour une meilleure pénétration dans la matrice et une pression accrue pour maintenir le solvant à l'état liquide pendant l'étape d'extraction. Il en résulte des temps d'extraction plus courts (de l'ordre de 30 min) et une réduction significative de l'utilisation de solvants (entre 5 et 100 mL). Ce type d'extraction est d'ailleurs utilisé pour l'extraction et l'analyse de glucosinolates contenus dans des plantes de la famille *Brassicacea*[52].

L'**extraction par fluide supercritique** (SFE, Supercritical Fluid Extraction) est une technique d'extraction solide-liquide avec laquelle le solvant n'est pas un liquide à pression atmosphérique mais un fluide supercritique. Afin d'atteindre un état supercritique, le fluide doit avoir une température et une pression supérieures à son point critique. Pour le dioxyde de carbone (fluide supercritique le plus employé) ces deux paramètres sont 31°C et 74 bars respectivement. La

---

46 J. L. Luque-García and M. D. Luque de Castro, Trend Anal. Chem. 22 (2003) 41-47.
47 M. Montes-Bayón, M. J. D. Molet, E. B. González and A. Sanz-Medel, Talanta 68 (2006) 1287-1293.
48 S. Albu, E. Joyce, L. Paniwnyk, J. P. Lorimer and T. J. Mason, Ultrason. Sonochem. 11 (2004) 261-265.
49 Y. Yang and F. Zhang, Ultrason. Sonochem. 15 (2008) 308-313.
50 J. Dai and R. J. Mumper, Molecules 15 (2010) 7313-7352.
51 Z. Hromádková, Z. Košťálová and A. Ebringerová, Ultrason. Sonochem. 15 (2008) 1062-1068.
52 T. Mohn, B. Cutting, B. Ernst and M. Hamburger, J. Chrom. A 1166 (2007) 142-151.

technique d'extraction au CO_2 supercritique est largement employée pour extraire des phytonutriments apolaires comme les lipides, les carotènes, les tocotriénols et tocophérols[53], mais également la caféine[54] . La SFE est aussi employée pour déterminer les profils en termes d'acides gras contenus dans les feuilles de brocolis[55]. Cette technique permet d'extraire les lipides dans des conditions plus douces que le Soxhlet avec des volumes de solvant bien plus faibles. Adaptée aux composés apolaires, l'ajout de modificateur organique comme le méthanol permet à la SFE d'accéder aux métabolites plus polaires comme les polyphénols[56], voire même les acides aminés libres[57].

L'**extraction assistée par microondes** (MASE, Microwave Assisted Solvent Extraction) est une technique développée au milieu des années 1980[58]. L'énergie microondes est utilisée pour chauffer un solvant directement en contact avec l'échantillon en vase ouvert ou fermé. Le principal avantage de l'extraction assistée par microondes ne repose pas simplement sur sa rapidité mais aussi sur son processus de chauffage. Comparé au chauffage classique, le chauffage par microondes atteint directement le cœur de l'échantillon garantissant une meilleure efficacité d'extraction. Le chauffage par microondes requiert des solvants à forte constante diélectrique, si bien que les solvants les plus communément utilisés en MAE sont des solvants polaires comme le méthanol, l'éthanol, l'eau et l'acétonitrile. Cette technique a été largement utilisée dans le cas de l'extraction de métabolites présents dans des végétaux[59,60]. L'eau de constitution de la plante peut également servir de solvant. La technique prend alors le nom SFMASE (Solvent Free Microwave Assisted Solvent Extraction). Cette variante peut même être effectuée sous pression. Ainsi, par exemple Michel *et al.* ont optimisé (temps d'extraction, puissance du four, nombre de cycles) une extraction de composés antioxydants dans les baies d'argousier[61].

II.2. Extractions au Soxhlet

Nous avons évalué rapidement l'extraction assistée par microonde de fleur de brocolis, mais sans optimisation, les résultats en termes de qualité d'extraits n'étaient pas significativement

53 V. Illés, H. G. Daood, P. A. Biacs, M. H. Gnayfeed and B. Mészáros, J. Chrom. Sci. 37 (1999) 345-352.
54 H. S. Park, H. J. Lee, M. H. Shin, K.-W. Lee, H. Lee, Y.-S. Kim, K. O. Kim and K. H. Kim, Food Chem. 105 (2007) 1011-1017.
55 E. Arnáiz, J. Bernal, M. T. Martín, C. García-Viguera, J. L. Bernal and L. Toribio, Europ. J. Lipid Sci. Tech. 113 (2011) 479-486.
56 J. Liu, S. Lin, Z. Wang, C. Wang, E. Wang, Y. Zhang and J. Liu, Food Bioprod. Proc. 89 (2011) 333-339.
57 E. Arnáiz, J. Bernal, M. T. Martín, M. J. Nozal, J. L. Bernal and L. Toribio, J. Chrom. A 1250 (2012) 49-53.
58 K. Ganzler, A. Salgó and K. Valkó, J. Chrom. A 371 (1986) 299-306.
59 M. Omirou, I. Papastylianou, R. Iori, C. Papastephanou, K. K. Papadopoulou, C. Ehaliotis and D. G. Karpouzas, Phytochem. Anal. 20 (2009) 214-220.
60 H.-F. Zhang, X.-H. Yang and Y. Wang, Trends Food Sci. Tech. 22 (2011) 672-688.
61 T. Michel, E. Destandau and C. Elfakir, Food Chem. 126 (2011) 1380-1386.

différents. Nous n'avons pas tenté de poursuivre pour l'instant dans cette direction pour ce travail car la priorité était de mettre en place les techniques permettant de caractériser le plus largement possible le contenu de l'extrait (métabolites polaires et apolaires). Afin de ne pas nous disperser trop sur la préparation d'échantillon, nous nous sommes donc seulement attachés à chercher les conditions dans lesquelles l'extrait présenterait l'empreinte la plus riche avec la méthode Soxhlet.

II.2.1. Mode opératoire

Afin de pouvoir analyser la composition en métabolites des fleurs et des graines de brocoli, des extraits par la technique d'extraction au Soxhlet avec des solvants de polarité différente ont été réalisés.

Extraits de fleurs de brocolis: 14 g de fleurs de brocolis provenant d'un supermarché local sont broyés jusqu'à obtenir un mélange homogène. Ce mélange est alors introduit dans une cartouche en cellulose, elle-même introduite dans l'extracteur Soxhlet (30 mL). Des extractions différentes ont été réalisées avec l'eau, l'acétonitrile, le méthanol, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, l'hexane, et un mélange méthanol/acétonitrile 50:50 v/v ont afin d'effectuer une comparaison et déterminer le solvant d'extraction le plus adapté, c'est-à-dire fournissant l'empreinte moléculaire la plus riche. 140 mL de solvant sont alors versés dans un ballon de 250 mL, le montage réfrigérant-extracteur Soxhlet-ballon-chauffe ballon est installé. L'extraction est arrêtée après cinq cycles de solvant. Le nombre de cycle est fixé ici arbitrairement sans savoir si l'échantillon est épuisé. L'une des principales raisons était de ne pas dégrader les échantillons avec des temps de chauffage trop long. Les méthodes de caractérisation étant maintenant mise en place, il sera possible de revenir sur ce point à l'avenir.

Extraits de graines de brocolis : 8 g de graines de brocolis (Chou brocoli Verde Calabrese, Koeman Flowerbulbs, Hem, Hollande) sont broyées dans un mortier, puis introduites dans la cartouche. La quantité de graines étant plus restreinte, seul un mélange de solvant a été utilisé pour leur extraction, choisi sur la base des résultats obtenus avec les fleurs de brocolis. Nous avons donc utilisé 60 mL d'un mélange de méthanol/acétonitrile 50:50 v/v, puis réalisé l'extraction comme décrite ci-dessus.

Les extraits de fleurs de brocolis ainsi préparés sont ensuite évaporés et concentrés au maximum à l'évaporateur rotatif (modèle 94200, Heidolph, Allemagne). Ils sont ensuite analysés frais ou stockés au congélateur à -20°C jusqu'à leur analyse. L'extrait de graines de brocolis a été lyophilisé avec un appareil modèle Crios (Cryotec, France) et 50 mg de résidu sec ont été obtenus.

II.3. Profils des extraits

La richesse des extraits a été jugée sur l'empreinte moléculaire effectuée par MALDI-TOFMS car il s'agit de la technique employée par la méthode de criblage présentée au chapitre III. Cette approche permet d'évaluer rapidement la diversité moléculaire de l'extrait par la complexité de son empreinte. Le solvant conduisant à l'empreinte la plus riche sera conservé par la suite. Dans un deuxième temps, une analyse par ESI-FTICRMS sera effectuée afin de comparer (voire compléter) et affiner (erreur plus faible sur les masses) les résultats obtenus par MALDI-TOFMS.

II.3.1. Nombres de signaux détectés

Dans un premier temps, une analyse par MALDI-TOFMS est effectuée avec la 2,5 DHB en mode d'ionisation positif et avec la 9-aminoacridine en mode d'ionisation négatif. L'analyse ne prend que quelques secondes et les deux profils sont obtenus en une, voire deux minutes au plus. Le nombre de signaux détectés pour chaque extrait, en modes positif et négatif, a été comparé. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'histogramme à la **Figure 75** :

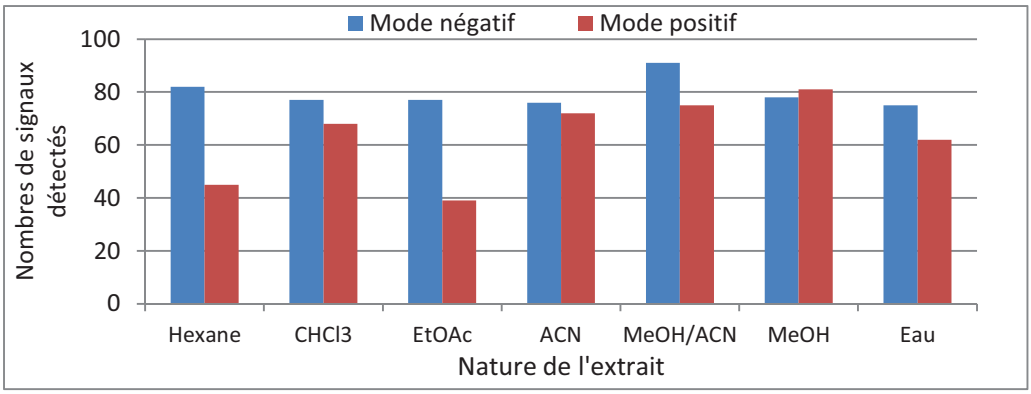


Figure 75 : Histogramme présentant le nombre de signaux détectés dans les extraits de brocolis en modes d'ionisation positif et négatif.

Le nombre de signaux pour l'ensemble des extraits varie entre 75 et 90 pour le mode négatif et entre 38 et 81 pour le mode positif. Si on étudie chaque extrait séparément, on remarque que les solvants moins polaires comme l'hexane et l'acétate d'éthyle présentent une richesse spectrale plus faible que le méthanol ou l'acétonitrile, principalement en mode positif. Au final, le mélange de méthanol-acétonitrile permet l'obtention de l'empreinte la plus complexe.

II.3.2. Classe de métabolites détectés

I.1.1.1. Extraits de fleurs

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la qualité des extraits, c'est-à-dire à leur contenu moléculaire. Les spectres obtenus en mode positif et négatif pour les extraits de brocoli réalisés avec l'eau (très polaire), le mélange acétonitrile/méthanol et l'hexane (apolaire) sont présentés car ils sont représentatifs à eux seuls des principales différences de composition. Les spectres présentés à la **Figure 76** ci-dessous correspondent à l'analyse en mode positif.

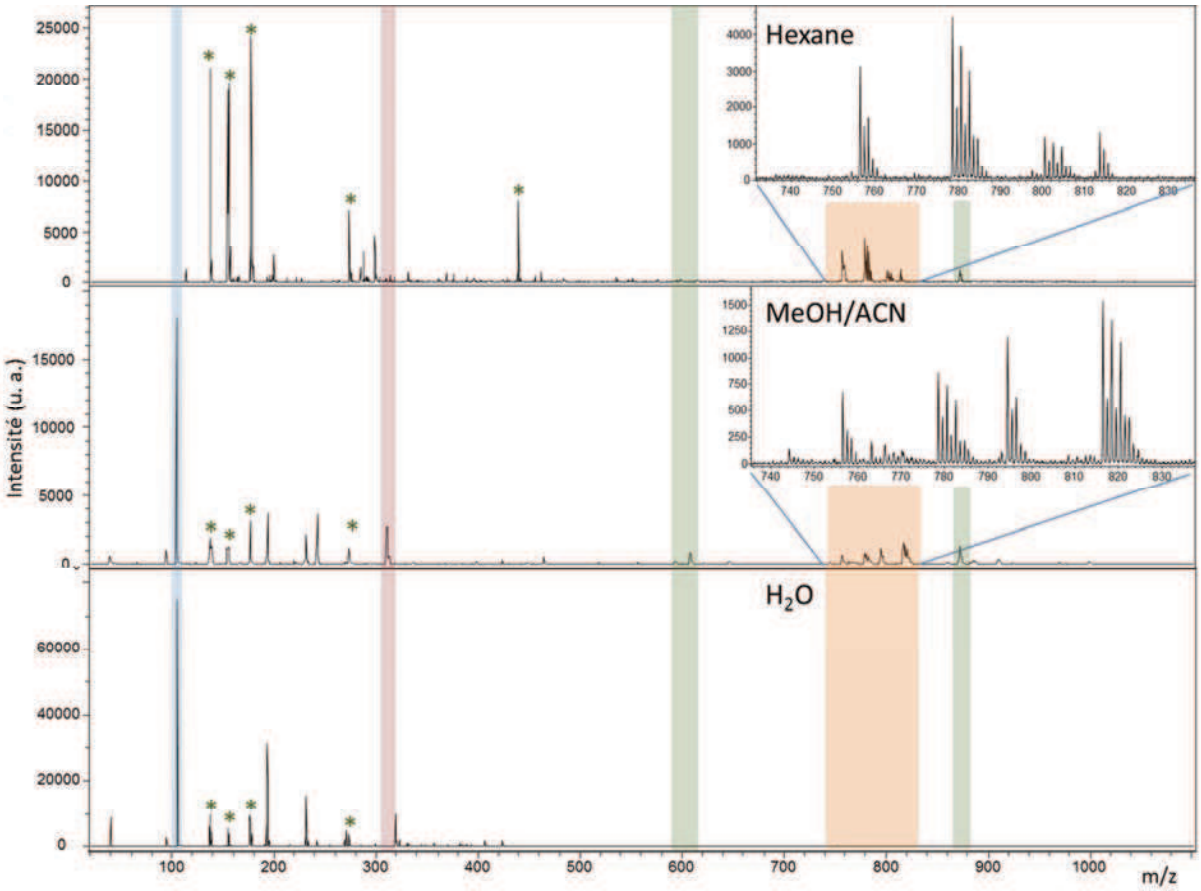


Figure 76 : Spectres MALDI-TOF/TOF des extraits de fleurs de brocolis en mode de détection positif. *Matrice 2,5-DHB, dépôt goutte sèche, * correspond aux principaux pics de matrice. Les zones bleue et verte correspondent respectivement à l'acide γ-amino butyrique et aux chlorophylles, les zones en violet et orange correspondent à la sinapine et aux lipides.*

Nous distinguons différentes zones de présence de métabolites. L'ion à *m/z* 104 dans la zone en bleu correspond à l'acide γ-amino butyrique (GABA). En vert sont représentées les métabolites associés aux chlorophylles, soient les phéophytines a et b (chlorophylles a et b exemptes de l'ion Mg^{2+}) aux *m/z* 871,573 et 885,551 respectivement et les phéophorbides (phéophytines a et b sans chaîne sesquiterpene latérale) aux *m/z* 593,390 et 607,405. Ces molécules sont plutôt extraites avec des solvants apolaires et moyennement polaires, puisqu'elles ne sont pas ou quasiment pas

détectées dans l'extrait aqueux et ces composés deviennent même les pics de base du spectre avec l'acétate d'éthyle (non présenté ici). Des zones spécifiques caractéristiques du solvant d'extraction sont également mises en évidence comme la zone encadrée en violet qui correspond à la sinapine de formule brute $C_{16}H_{24}NO_5^+$ (ion à *m/z* 310,171), un ester d'acide sinapinique qui, conjugué au glucoraphanine, forme un sel d'ammonium quaternaire. Son identité sera confirmée par fragmentation en mode LIFT (MALDI-TOF/TOFMS) avec l'extrait de graines dans lequel ce signal est plus intense. Nous remarquons des différences principales dans la gamme de masses 750 < *m/z* < 850 (en orange), qui correspondent à des lipides (phosphatidylcholine principalement). Ces métabolites sont facilement extraits avec l'hexane, et peu avec des solvants un peu plus polaires comme le méthanol et l'acétonitrile.

Pour l'analyse en mode négatif (**Figure 77**) de ces mêmes extraits, trois zones sont mises en évidence.

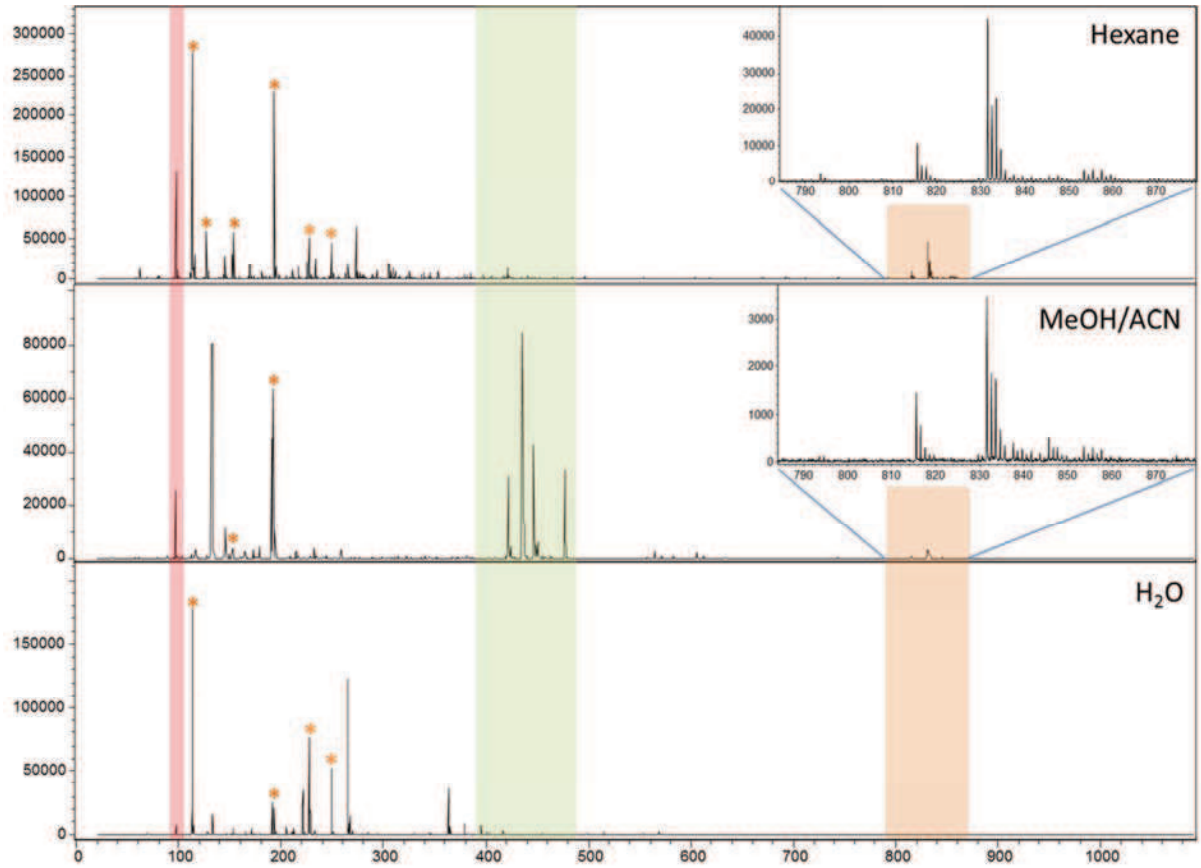


Figure 77 : Spectres MALDI-TOF/TOF des extraits en mode de détection négatif. *Matrice 9-AA, dépôt mélange intime, * correspond aux principaux pics de matrice. La zone rouge correspond à l'ion HSO_4^-, la zone verte aux glucosinolate et la zone orange aux lipides.*

L'ion à *m/z* 97 en rouge correspondant à HSO_4^- provenant des GSL, et en vert la zone correspondante aux GSL (380 < *m/z* < 490) présents dans le brocoli. Les GSL sont détectés le plus intensément dans l'extrait MeOH/ACN. Dans l'extrait à l'hexane, aucun glucosinolate n'a été détecté

et on peut penser que ce solvant plutôt apolaire ne permet pas d'extraire ce type de métabolites. Les autres différences (en orange) observées sur les spectres concernent comme en mode positif aux lipides contenus dans le brocoli (acides phosphatidiques, méthylphospholipides et phosphatidyl glycérols).

A ce stade, si nous détectons sans difficulté les glucosinolates, nous ne détectons pas les polyphénols connus du brocoli qui peuvent être détectés par MALDI-TOFMS[62]. Les raisons peuvent être le manque de sensibilité de l'analyse à cause du phénomène de suppression ionique ou leur destruction par le chauffage lors de l'extraction. Leur présence éventuelle sera discutée un peu plus loin dans ce chapitre avec la mise en place d'autres moyens d'analyse.

I.1.1.2. Extraits de graines

L'extrait de graines de brocolis réalisé avec le mélange de solvants ACN/MeOH, a été analysé par MALDI-TOFMS. Les spectres en mode positif et négatif obtenus sont présentés à la **Figure 78**.

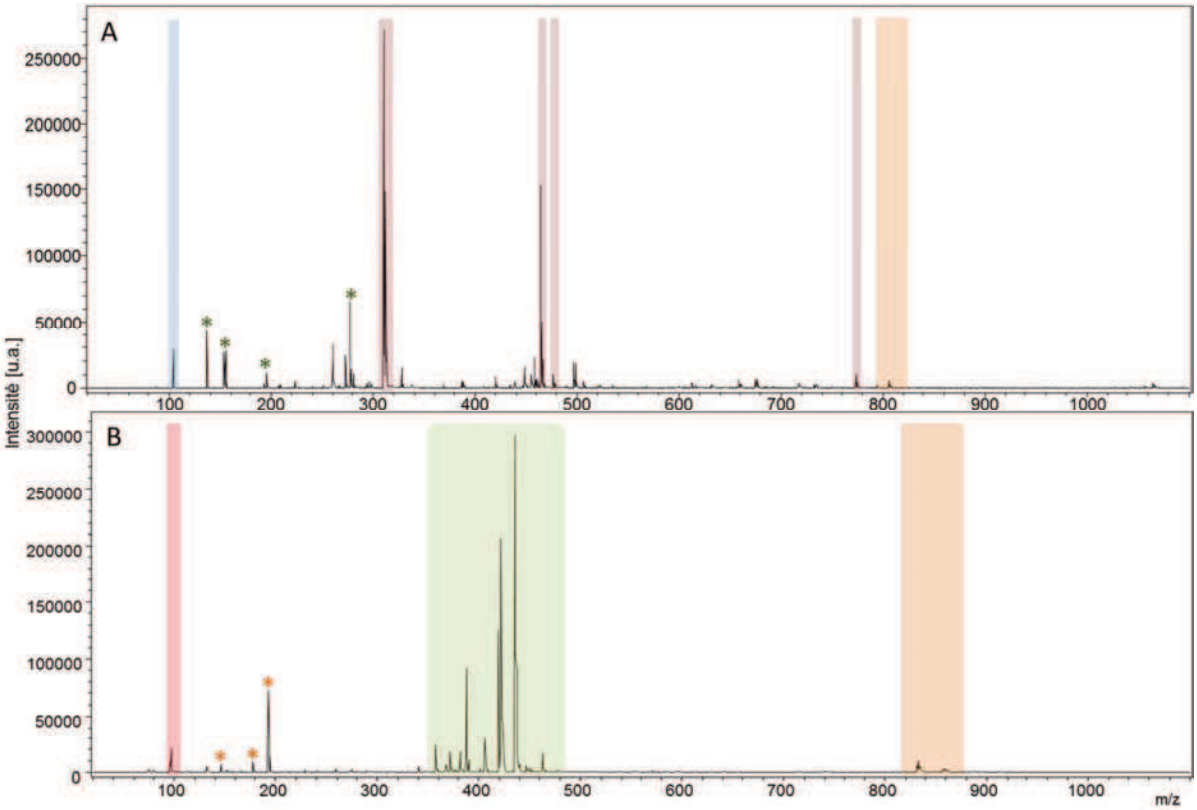


Figure 78 : Spectres en mode positif (A) et négatif (B) de l'extrait de graines de brocolis MeOH/ACN. ** et * correspondent aux principaux pics de matrices. La zone bleue correspond à l'acide γ-amino butyrique, les zones en violet et orange correspondent à la sinapine et aux lipides, les zones rouge et verte à l'ion HSO_4^- et aux glucosinolates.*

[62] P. J. A. Madeira and M. H. Florêncio, J. Mass Spectrom. 44 (2009) 1105-1113.

- Pour le mode positif (**Figure 78A**), la zone bleue correspond comme l'extrait de fleurs de brocolis à l'ion GABA à *m/z* 104,071. Cependant, on s'affranchit des pics de chlorophylles (zone verte **Figure 76**) qui ne sont pas présentes dans les graines. L'ion à *m/z* 310,165 correspond bien à la sinapine présente en grande quantité dans les graines de brocolis. L'analyse MS/MS en mode LIFT (principe présenté à l'annexe V) de cet ion nous a permis de confirmer sa structure, puisque l'ion produit (fils) à *m/z* 251 détecté correspond à une perte de triméthylamine (**Figure 79A**). Les ions encadrés de la même couleur en violet aux masses *m/z* 464,199 ; 476,228 et 773,476 ont la particularité de donner, après fragmentation, deux mêmes ions produits aux *m/z* 310 et 251 correspondant à la sinapine. Nous pouvons formuler l'hypothèse que ces composés sont apparentés à la sinapine. La structure de l'ion *m/z* 476 peut être apparentée aux néolignanes dont la structure **Figure 79B (a)** a déjà été décrite pour *Arabidopsis thaliana* (autre *Brassicaceae* prise comme modèle dans les études métabolomiques chez le végétal)[63,64]. Néanmoins, si cette structure explique les ions produits majoritaires *m/z* 417, 280 et 221 du spectre, les ions *m/z* 310 et 251 ne s'expliquent que grâce à l'hypothèse d'un deuxième composé minoritaire ayant les fragments *m/z* 417, 310 et 251 (**Figure 79B (b)**).

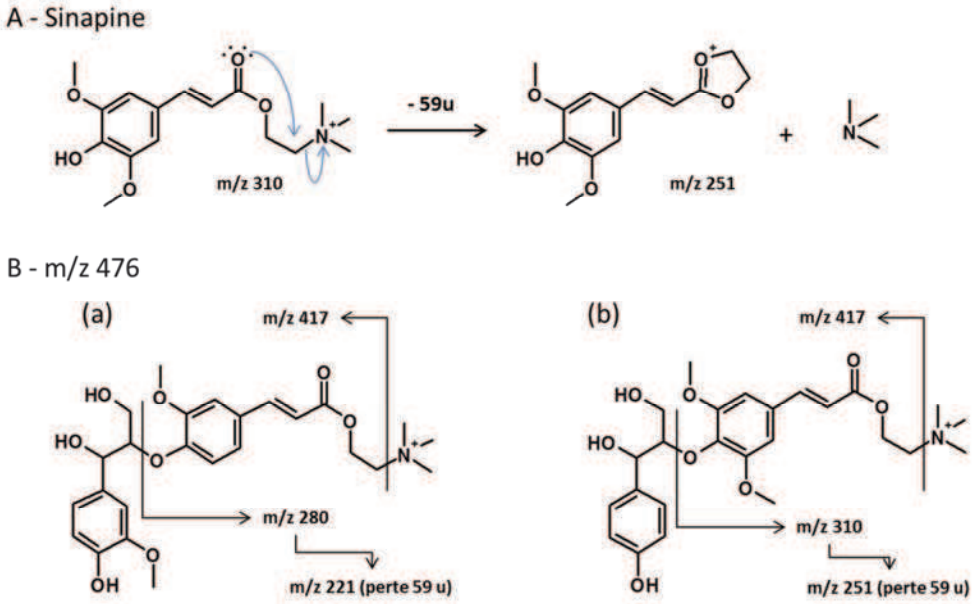


Figure 79 : Fragmentation (A) de la sinapine, (B) de l'ion à *m/z* 476, (a) et (b) désignant les deux hypothèses de structures en mélange dans l'échantillon.

La différence entre les deux isomères réside dans la position du groupe méthoxy. La première hypothèse est un ester de l'acide gaiacylferulique et l'autre est un dérivé de l'acide sinapique

63 C. Böttcher, E. von Roepenack-Lahaye, J. Schmidt, C. Schmotz, S. Neumann, D. Scheel and S. Clemens, Plant Physiol. 147 (2008) 2107-2120.

64 F. Matsuda, M. Y. Hirai, E. Sasaki, K. Akiyama, K. Yonekura-Sakakibara, N. J. Provart, T. Sakurai, Y. Shimada and K. Saito, Plant Physiol. 152 (2010) 566-578.

substitué par un alcool provenant de l'acide coumarique. Les deux ions *m/z* 464 et 773 sont plus difficiles à interpréter même si on retrouve la perte de 59 u (trimethylamine de la choline) et la présence d'un groupe sinapoyl choline. Il faudrait maintenant isoler par chromatographie ces composés pour des analyses complémentaires (ex : RMN).

- Le spectre en mode négatif (**Figure 78B**) présente également les mêmes zones que celui de l'extrait de fleurs de brocolis. Cependant, dans la gamme de masse correspondante aux GSL, on distingue bien plus de pics que sur le spectre de l'extrait de fleurs de brocolis et en plus forte intensité. Ceci confirme que les graines de brocolis sont plus riches en GSL que les pousses.

Par contre, aucun des spectres n'a permis la mise en évidence d'ITCs. Nous supposons à ce stade que suite à l'extraction au Soxhlet, la myrosinase est très vite dégradée et ne permet pas de métaboliser suffisamment de GSL.

I.1.2. Analyse des glucosinolates

Les glucosinolates sont donc les composés majoritairement extraits dans les conditions choisies. Il convient maintenant de détailler la composition de ceux-ci.

Après analyse par MALDI-TOFMS en mode négatif, la présence relative en GSL a été évaluée par rapport à la glucoraphanine (ion majoritaire du spectre de l'extrait de fleurs ou graines de brocolis). L'histogramme de la **Figure 80** présente les résultats obtenus.

Cette figure met clairement en évidence que l'extrait de graines de brocolis est plus riche en glucosinolates différents que les fleurs : 11 de ces métabolites ont été détectés et identifiés (hors isobares et isomères) dans l'extrait de graines alors que seulement 5 le sont dans l'extrait de fleurs. Nous retrouvons ici l'observation faite par Tian *et al.* décrivant la glucoraphanine comme le GSL le plus abondant dans le genre *Brassicacea*[17]. Les solvants moins polaires n'extraient pas ce type de métabolites (aucun n'a été détecté avec les extraits au $CHCl_3$, EtOAc et hexane) et l'eau n'est pas efficace puisque seule la glucoraphanine est détectée dans ce cas.

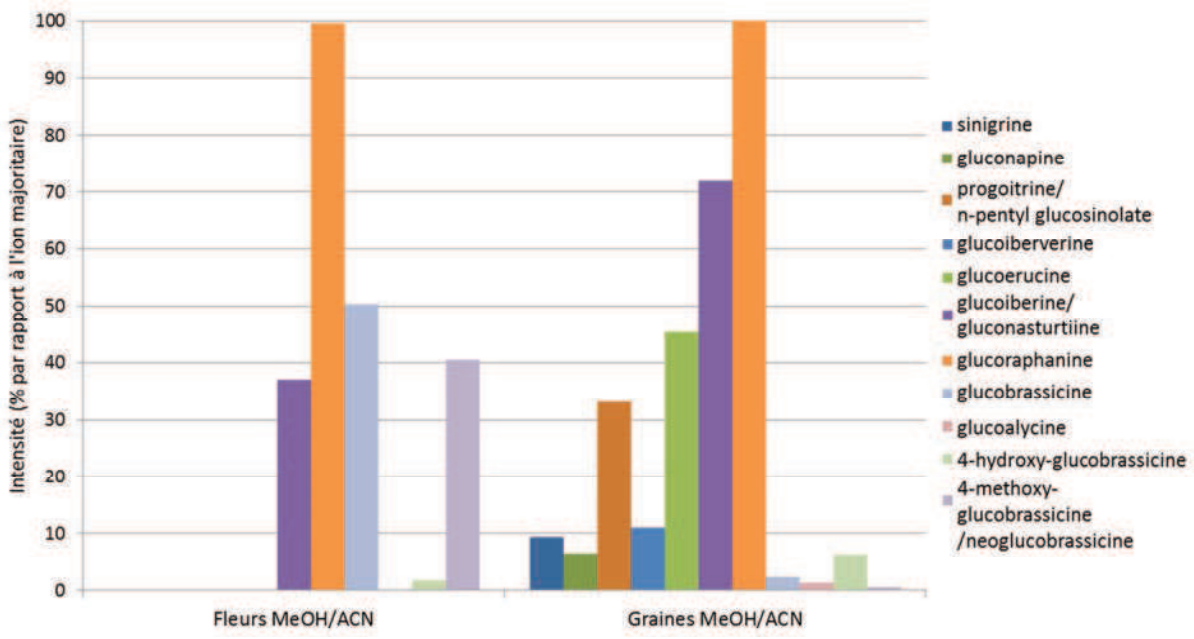


Figure 80 : Histogramme présentant les intensités de chaque glucosinolate dans les extraits de fleurs et de graines de brocolis.

Il existe des isobares pour certains GSL (même masse nominale mais masse exacte différente). Afin de lever ces indéterminations, nous avons analysé l'extrait de graines par ESI-FTICRMS. Cette technique permet de distinguer ces molécules grâce à une résolution bien supérieure à celle du MALDI-TOFMS.

I.2. Analyse ESI-FTICRMS

L'analyse par ESI-FTICRMS en mode négatif (**Figure 81**) nous a permis de détecter et d'identifier 15 glucosinolates présents dans l'extrait de graines de brocolis. En effet, la haute résolution de cette technique nous a permis de distinguer les deux isobares que sont le progoitrine et le n-pentyl glucosinolates (n-pentyl GSL) aux masses théoriques respectives *m/z* 388,0379 et 388,0741. La résolution nécessaire pour séparer ces deux pics est d'environ 10700 alors que celle observée expérimentalement sur ces deux pics est de R = 40300, donc nettement suffisante.

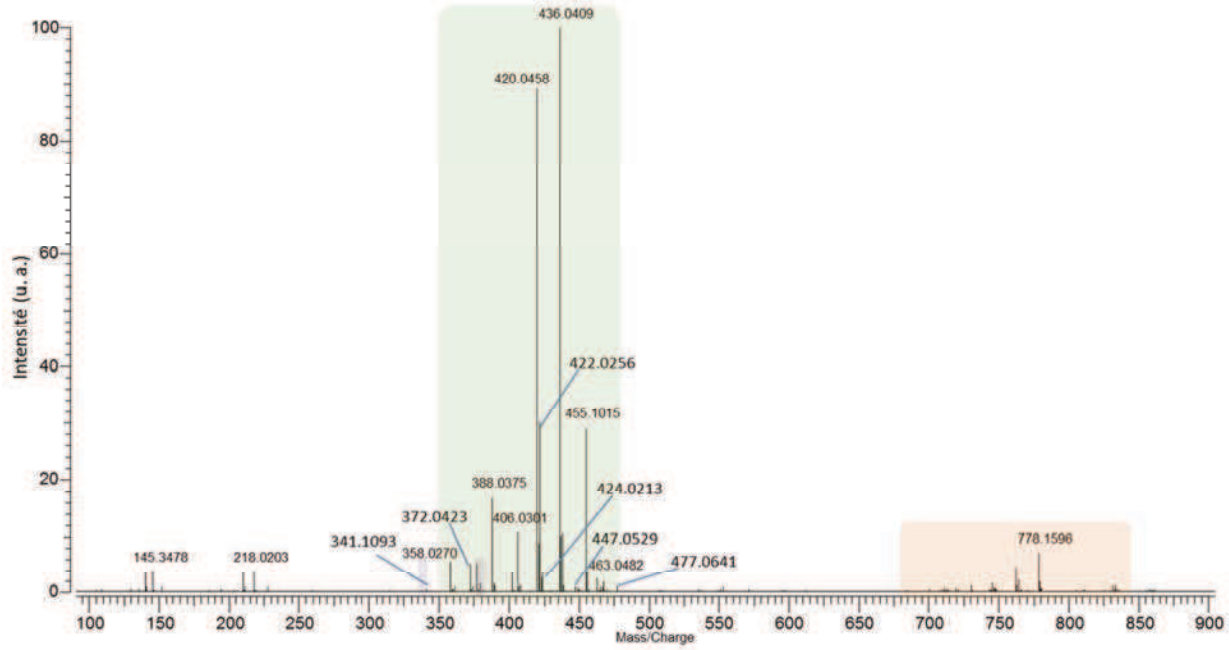


Figure 81 : Spectre ESI-FTICRMS de l'extrait de graines de brocolis en mode de détection négatif.

Tous ces métabolites ont été détectés avec une erreur moyenne de 1,1 ppm. Les pics les plus intenses détectés sont donc les glucosinolates, bien que plus d'une centaine de pics aient été détectés au total. Parmi les ions identifiés, on recense les lipides dans la gamme de masse 650 < *m/z* < 850, un disaccharide et un dérivé chloré de ce disaccharide. Le **Tableau 6** liste les métabolites identifiés avec leur formule brute et l'erreur sur la masse (tous les lipides n'ont pas été recensés).

Tableau 6 : Liste des ions identifiés par ESI-FTICRMS. Formule brute, rapport *m/z* expérimental et théorique et erreur sur la masse calculée.

Nom	Formule brute	m/z_{exp}	m/z_{th}	δm (ppm)
disaccharide	$C_{12}H_{21}O_{11}^-$	341,1093	341,1089	-1,2
sinigrine	$C_{10}H_{16}NO_9S_2$-	358,0270	358,0272	0,6
gluconapine	$C_{11}H_{18}NO_9S_2$-	372,0423	372,0428	1,3
glucochlearine	$C_{11}H_{20}NO_9S_2$-	374,0579	374,0585	1,6
disaccharide (adduit Cl^-)	$C_{12}H_{22}O_{11}Cl^-$	377,0853	377,0856	0,8
progoitrine	$C_{11}H_{18}NO_{10}S_2$-	388,0375	388,0379	1,0
n-pentyl-GSL	$C_{12}H_{22}NO_9S_2$-	388,0733	388,0741	2,1
n-hexyl-GSL	$C_{13}H_{24}NO_9S_2$-	402,0893	402,0898	1,2
glucoiberverine	$C_{11}H_{20}NO_{10}S_3$-	406,0301	406,0306	1,2
n-heptyl-GSL	$C_{14}H_{26}NO_9S_2$-	416,1056	416,1054	-0,5
glucoerucine	$C_{12}H_{22}NO_9S_3$-	420,0458	420,0462	1,0
glucoiberine	$C_{11}H_{20}NO_{10}S_3$-	422,0256	422,0255	-0,2
glucoraphanine	$C_{12}H_{22}NO_{10}S_3$-	436,0409	436,0411	0,5

glucobrassicine (GBS)	$C_{16}H_{19}N_2O_9S_2$-	447,0529	447,0537	1,8
glucoalyssine	$C_{13}H_{24}NO_{10}S_3$-	450,0560	450,0568	1,8
4-hydroxy-GBS	$C_{16}H_{19}N_2O_{10}S_2$-	463,0482	463,0487	1,1
neoglucobrassicine	$C_{17}H_{21}N_2O_{10}S_2$-	477,0639	477,0643	0,8
4-methoxy-GBS	$C_{17}H_{21}N_2O_{10}S_2$-	477,0639	477,0643	0,8
acide phosphatidique 1	$C_{40}H_{72}O_8P^-$	711,4971	711,4970	-0,1
acide phosphatidique 2	$C_{40}H_{74}O_8P^-$	713,5133	713,5127	-0,8
phosphatidylglycerol 1	$C_{40}H_{72}O_{10}P^-$	743,4857	743,4869	1,6
phosphatidylglycerol 2	$C_{40}H_{74}O_{10}P^-$	745,5063	745,5025	-5,1
sulfoquinovosyl diacylglycerol 1	$C_{43}H_{77}O_{12}S^-$	817,5109	817,5141	3,9

Nous avons également comparé le nombre de signaux détectés par ESI-FTICRMS par rapport à celui détecté par MALDI-TOFMS. Le diagramme de Venn de la **Figure 82** nous indique que la technique ESI-FTICRMS permet de détecter un nombre de signaux bien supérieur à la technique MALDI-TOFMS. Cependant, celle-ci montre que 58 pics lui sont spécifiques et donc une complémentarité entre les deux modes d'ionisation.

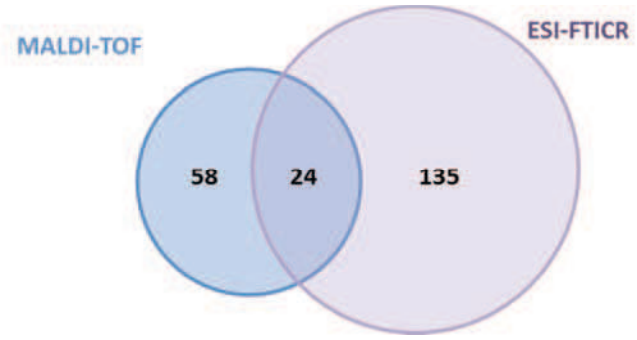


Figure 82 : Diagramme de Venn indiquant le nombre de signaux communs et spécifiques avec les techniques MALDI-TOFMS et ESI-FTICRMS en mode négatif pour l'extrait de graines.

Parmi les métabolites communs, on retrouve principalement les glucosinolates, les lipides et quelques ions non identifiés. Ces deux techniques sont donc complémentaires puisqu'en les couplant nous sommes capables de détecter environ 217 métabolites différents. Cependant, si les flavonoïdes ne sont pas non plus détectés par ESI-FTICRMS, nous pouvons supposer que l'extrait analysé n'en contient pas ou en trop faible concentration. Plusieurs études, dont une en cours au laboratoire, ont montré que ces métabolites sont facilement détectés par cette technique lorsqu'ils sont présents dans un extrait[65,66].

[65] G. Hamm, Université de Metz (2010).

[66] L. Becker, A. Poutaraud, G. Hamm, J.-F. Muller, D. Merdinoglu, V. Carré and P. Chaimbault, Accepté dans Anal. Chim. Acta (2013).

La qualité des extraits lors de leur production est importante mais le contrôle de cette qualité dans le temps est essentiel car bien souvent les différentes analyses, voire plus tard les tests biologiques, ne peuvent être réalisés en même temps.

II. Contrôle de la qualité des extraits par HPTLC

La qualité des extraits peut être évaluée par spectrométrie de masse, néanmoins une seule technique n'est souvent pas suffisante pour mettre en évidence des différences (par exemple dues à la présence d'isomères) entre échantillons issus d'extractions différentes ou pour suivre la stabilité des échantillons dans le temps (par exemple évolution après stockage). Une technique rapide, simple et efficace pour vérifier la stabilité d'un extrait peut être la chromatographie planaire. Contrairement à la chromatographie en phase liquide, la chromatographie planaire permet de suivre l'évolution de composés qui sont non élués car très fortement adsorbés sur la phase stationnaire.

II.1. Principe et mode opératoire

En chromatographie planaire (ou chromatographie sur couche mince), la séparation des analytes se fait sur une phase stationnaire plane (généralement du gel de silice) déposée sur une plaque en verre ou une feuille d'aluminium. Elle est souvent désignée par le sigle (HP)TLC de l'anglais (High Performance) Thin Layer Chromatography. La principale différence entre TLC et HPTLC repose sur la taille des particules de la phase stationnaire. Les plaques TLC sont constituées d'une épaisseur de 250 µm avec des particules de 5 à 20 µm de diamètre, alors que l'épaisseur des plaques HPTLC est de 100 µm avec des particules de 5 µm de diamètre. La réduction de ces dimensions s'accompagne à peu près du doublement de l'efficacité des pics chromatographiques[67]. L'appareillage actuel permet également de contrôler facilement les quantités déposées (déposeur automatique) et une quantité de techniques de détection sont possibles, allant de la colorimétrie pour des révélations qualitatives à des scanners permettant le balayage en réflectance de la plaque dans le domaine de l'UV et du visible. Ce mode de détection permet la quantification de la réponse après étalonnage. La spectrométrie de masse avec ionisation par MALDI peut également être mise en œuvre[68] pour des compléments d'analyse structurale, voire même l'électrospray[69] avec les récents développements de

[67] S. Nyiredy, Trends Anal. Chem. 20 (2001) 91-101.
[68] J. T. Mehl and D. M. Hercules, Anal. Chem. 72 (1999) 68-73.
[69] G. Morlock and U. Jautz, J. Planar. Chrom. 21 (2008) 367-371.

la société CAMAG[70]. Enfin, la TLC peut être aussi mise à profit à des fins semi-préparatives permettant de récupérer facilement les analytes d'intérêt par simple grattage de la silice suivi d'une filtration.

Le mode opératoire commun à toutes nos analyses sur le brocoli par TLC et HPTLC est le suivant. Dix µL d'extrait sont déposés à 15 mm sur une plaque HPTLC ou TLC avec un automate (Linomat 5, Camag, Suisse). Les premiers solvants d'élution testés (hexane/EtOAc ; EtOAc/MeOH) n'étaient pas suffisamment éluant pour séparer les classes de métabolites présents dans les extraits. Après recherche bibliographique[71,72] , nous avons utilisé un mélange n-butanol/acide acétique/eau (proportions variables) et la séparation des pics a paru satisfaisante. La plaque est éluée dans une cuve horizontale (Camag, Suisse) avec le mélange de solvant jusqu'à 80 mm, puis elle est analysée par un scanner UV-visible (Camag, Suisse) permettant une évaluation densitométrique du chromatogramme TLC.

II.2. Stabilité des extraits dans le temps

La répétabilité des extractions a d'abord été vérifiée. Deux extraits de brocolis préparés séparément sont analysés sur plaque HPTLC. Les deux chromatogrammes présentés sur la **Figure 83A** sont superposables et montrent que l'extraction avec un même solvant est répétable.

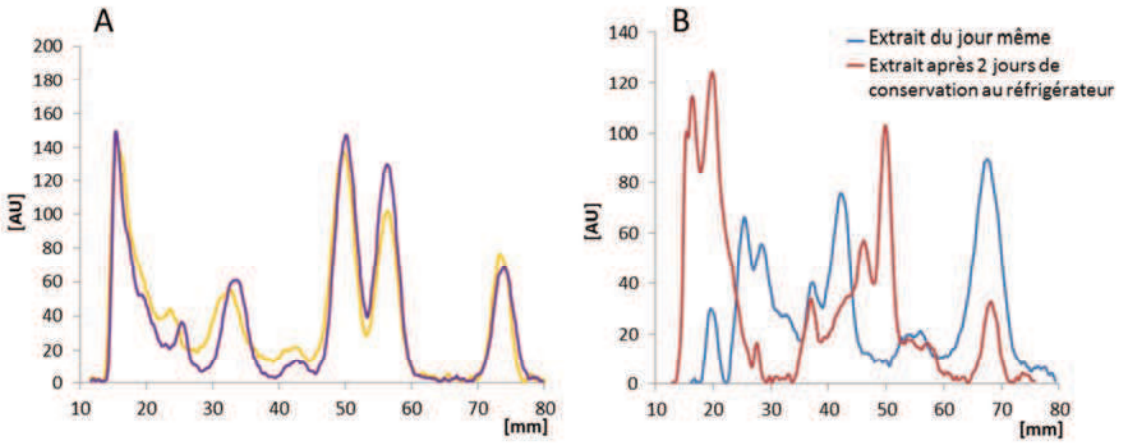


Figure 83 : Chromatogrammes TLC (A) de deux extraits de brocolis frais préparés séparément (détection 330 nm) et (B) d'un extrait de brocolis frais (bleu) et après 2 jours de conservation au frigo (rouge) (détection 220 nm).

70 CAMAG, CBS 102 (2009).

71 C. C. N'gaman Kohué, Y.-A. Békro, J. A. Mamyrbékova-Békro, A. Bénié and S. Gooré Bi, Eur. J. Sci. Res. 36 (2009) 161-171.

72 A. Toribio, Université de Reims Champagne-Ardenne (2007).

La stabilité d'un extrait conservé pendant quelques jours au congélateur à -18°C a été ensuite comparée à un extrait frais. La plaque est analysée à 220 nm afin d'observer les éventuelles différences entre les deux extraits. Les deux chromatogrammes sont présentés sur la **Figure 83B**.

On constate que les deux profils chromatographiques sont très différents. Les deux principales différences se situent entre 25 et 35 mm de distance de migration ainsi qu'entre 40 et 50 mm. Dans le premier cas, les pics observés dans l'extrait frais (en bleu **Figure 83B**) disparaissent après conservation (en rouge) et dans le deuxième cas des pics apparaissent pour l'extrait conservé. Ceci peut être traduit par le fait que les métabolites contenus dans l'extrait peuvent être dégradés au cours du temps. Sans même identifier ici les métabolites, nous pouvons rapidement déduire que les extraits de brocolis ne sont absolument pas stables lors de leur conservation. Cette stabilité dans le temps n'est d'ailleurs pas le seul paramètre montrant une telle variabilité. Les profils métaboliques dépendent de la variété du végétal, de sa maturité, de son stockage avant extraction ou encore de sa provenance.

II.3. Profil HPTLC-UV d'un extrait de graines de brocoli

Le profil mouvant du brocoli nous montre qu'il est nécessaire de maitriser beaucoup de paramètres afin de stabiliser à un instant donné sa composition. Cependant, nous voyons qu'un simple profil HPTLC-UV peut faire office de contrôle qualité de l'extrait. Nous nous sommes donc intéressés à tenter d'assigner les pics observés à des métabolites particuliers. L'exemple portera sur l'extrait de graines MeOH/ACN. Pour cette étude, 3 µL d'extrait sont déposés sur une plaque HPTLC, puis élués avec un mélange n-BuOH/AcOH/H_2O dans les proportions 60:15:25 v/v/v. Le profil UV de la plaque est réalisé à 225, 320 et 400 nm et un spectre d'absorbance est fait sur chaque pic détecté. Les longueurs d'onde de détection ont été choisies arbitrairement de manière à couvrir un domaine assez vaste. Les chromatogrammes présentés à la **Figure 84A** permettent de constater que le profil à 225 nm (bleu) montre 8 pics distincts, entre 30 et 90 mm de de distance de migration. Le pic 7 correspond au front d'élution, et on ne voit pas de pic au niveau du dépôt. Sur le spectre à 320 nm (rouge), le pic 1 a disparu, mais un pic au niveau du dépôt apparait, et les autres pics correspondent toujours. Sur le spectre à 400 nm (vert), la quasi-totalité des pics a disparu, il ne reste plus que les pics 2, 4 et 7. Les espèces séparées absorbent donc principalement dans l'UV entre 220 et 350 nm.

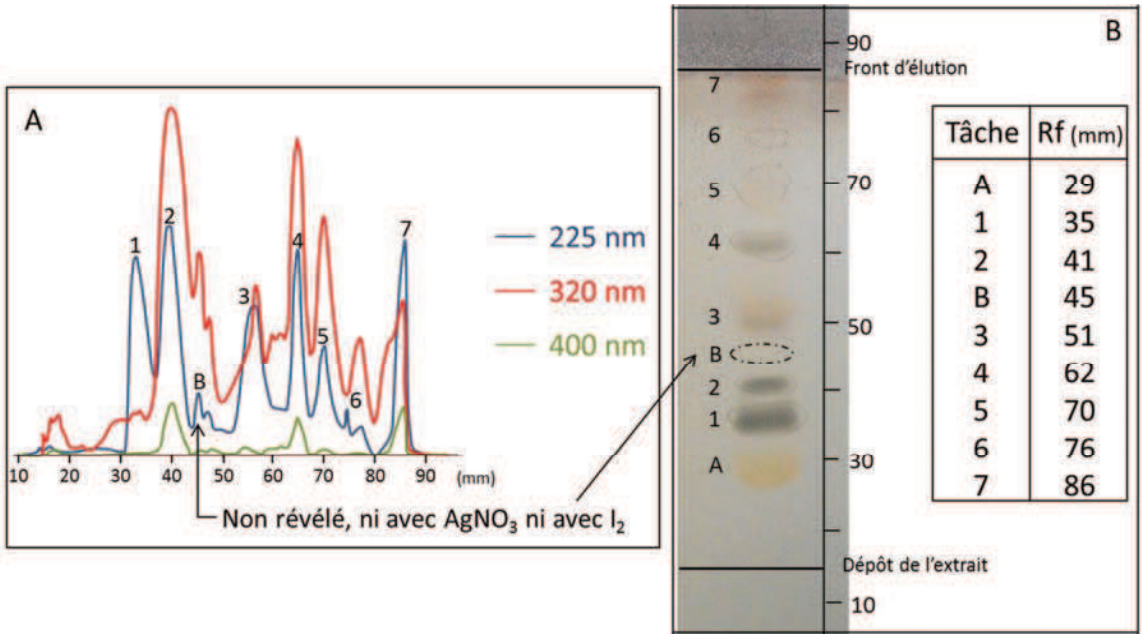


Figure 84 : (A) Profils UV de la plaque HPTLC aux longueurs d'ondes indiquées et (B) Photographie de la plaque CCM éluée et rapports frontaux des *taches* observées après révélation aux vapeurs d'iode.

Afin de confirmer quelques hypothèses d'identifications de métabolites, nous avons révélé certaines familles grâce à des réactifs spécifiques. Par exemple, selon la littérature, les glucosinolates sont révélés par une solution de nitrate d'argent ($AgNO_3$) ammoniacal[74,73]. Le réactif préparé a été vaporisé sur les plaques HPTLC qui ont ensuite été chauffées à 110°C pendant 5 minutes. Les glucosinolates révélés à l'aide de ce réactif ont donné des taches de coloration marron. Les plaques sont également traitées avec des vapeurs d'iode, lesquelles permettent de révéler la plupart des composés organiques. La **Figure 84B** nous montre une photographie de la plaque après révélation à l'iode. Les taches 1 à 7 indiquées correspondent aux 7 pics sur le spectre à 225 nm. Cependant nous observons une tache indexée par la lettre « A » à environ 30 mm, qui n'est détectée sur aucun des profils UV. Nous observons également un pic « B » sur les spectres à 225 et 320 nm à environ 45 mm qui n'est révélé ni avec $AgNO_3$, ni avec l'iode. D'après les taches brunes révélées par $AgNO_3$, les pics 1, 2, 3 et 4 pourraient correspondre à des glucosinolates (non montrée ici). Les *taches* A, 6 et 7 n'ont été observées qu'après révélation à l'iode.

Par ailleurs, nous avons fait un spectre d'absorbance entre 200 et 800 nm sur chaque pic indexé du profil UV à 225 nm (**Figure 85**). Les spectres des pics 1, 2, 4, 5, 6 sont similaires avec deux maxima d'absorbance à 240 nm et 330 nm et les métabolites détectés appartiennent donc surement à la même famille. Les spectres des pics 3 et B sont quasi-identiques aux autres spectres, mais le maximum de la bande d'absorbance à 230 nm est plus intense que celle à 330 nm, ce qui nous laisse

[73] Z. F. Ahmed, A. M. Rizk, F. M. Hammouda and M. M. Seif El-Nasr, Phytochem. 11 (1972) 251-256.

supposer que les composés détectés sont aussi apparentés. Finalement le pic 7 correspondant au front d'élution est encore différent avec deux maxima d'absorbance à 230 et 275 nm. Quoi qu'il en soit, attribuer ici une structure ou famille structurale de composés sur un simple spectre d'absorbance est un peu douteux. Les flavonoïdes montrent deux bandes d'absorption principales dans la région 240-400 nm : la bande I (300-395 nm) est considérée comme étant associée à l'absorption de la partie cinnamoyle du flavonoïde (cycle B) et la bande II (240-280 nm) à celle de la partie benzoyle (cycle A)[74]. Les glucosinolates présentent une bande principale aux alentours de 225 nm[75]. Si les flavonoïdes étaient présents dans les graines, il serait donc difficile de différencier ces deux familles de métabolites à la seule vue des spectres d'absorption.

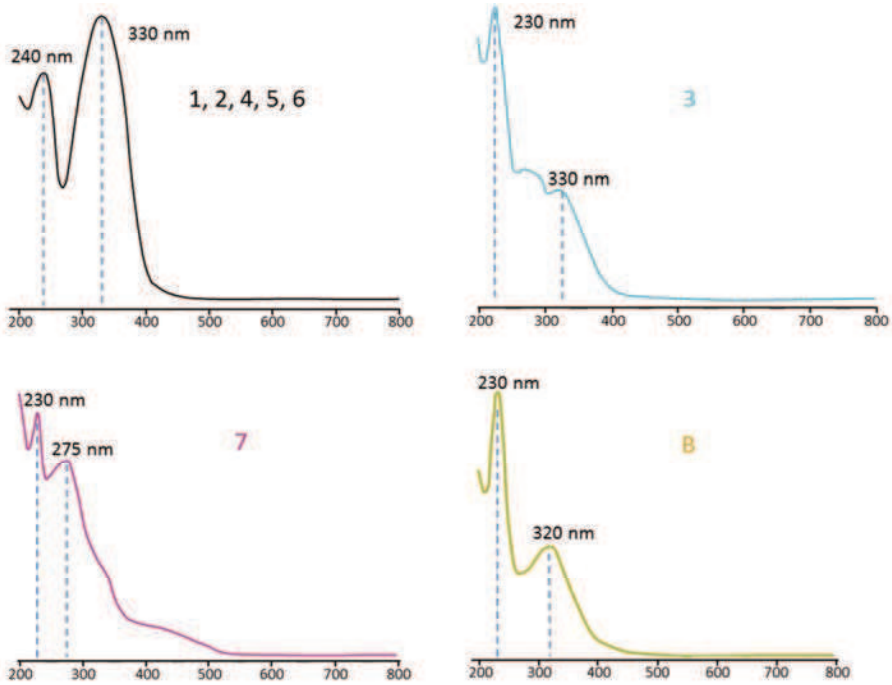


Figure 85 : Spectres d'absorbance des pics indexés sur le profil UV à 225 nm.

Afin de pouvoir identifier les métabolites correspondants aux pics présents sur les profils UV, des analyses complémentaires par TLC-MALDI-TOFMS sont réalisées.

[74] L.-Z. Lin and J. M. Harnly, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 7401-7408.

[75] G. Kiddle, R. N. Bennett, N. P. Botting, N. E. Davidson, A. A. Robertson and R. M. Wallsgrove, Phytochem. Anal. 12 (2001) 226-242.

II.4. Compléments d'analyse par TLC-MALDI-TOFMS

II.4.1. Principe et mode opératoire

La deuxième étape de notre analyse consiste à réaliser une image de la plaque TLC par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Plusieurs études proposent des systèmes plus ou moins fastidieux pour l'analyse d'une plaque TLC par MALDI-MS, soit par un système hybride de plaque TLC-MALDI[72], soit par un système de pressage entre la plaque MALDI recouverte d'une couche de matrice et la plaque TLC[76]. Dans notre cas, afin de faciliter le couplage entre ces deux techniques nous avons simplement vaporisé la matrice à l'aide du déposeur automatique d'échantillon sur la plaque TLC en aluminium, sur toute la longueur d'élution de l'extrait. La plaque TLC est ensuite fixée sur une plaque MALDI adaptée, puis une image de toute la longueur d'élution est réalisée par MALDI-TOFMS. Les ions d'intérêts correspondants aux glucosinolates sont alors extraits de l'image afin de comparer les résultats avec ceux observés avec la révélation visuelle de la plaque. L'ordre d'élution des glucosinolates est également comparé avec les résultats obtenus par LC-MS par la suite.

L'imagerie par spectrométrie de masse (IMS, Imaging Mass Spectrometry) MALDI-TOF combine la localisation spatiale des composés et la capacité analytique de la spectrométrie de masse afin d'analyser localement la composition d'échantillons. Les premiers travaux de Caprioli *et al*. relatifs à cette technique datent de 1997[77]. Appliquée à notre étude, cette technique permet d'analyser la trace complète de l'élution de l'extrait et d'avoir une représentation visuelle de la localisation des ions d'intérêts. Quatre étapes sont requises pour une analyse IMS :

- La préparation de l'échantillon : cette première étape consiste à préparer l'échantillon à analyser. Pour cela, la matrice (9-AA ou 2,5-DHB) est d'abord pulvérisée uniformément sur la plaque TLC en aluminium (afin de conserver une conductance, contrairement à une plaque en verre isolante) sur toute la longueur d'élution à cartographier. Cette opération est réalisée grâce à l'automate utilisé pour les dépôts d'analyte sur les plaques TLC. Une fois cette opération terminée, la plaque TLC est fixée sur une plaque MALDI adaptée (**Figure 86**).

[76] J. T. Mehl, A. I. Gusev and D. M. Hercules, Chromatographia 46 (1997) 358-364.
[77] R. M. Caprioli, T. B. Farmer and J. Gile, Anal. Chem. 69 (1997) 4751-4760.

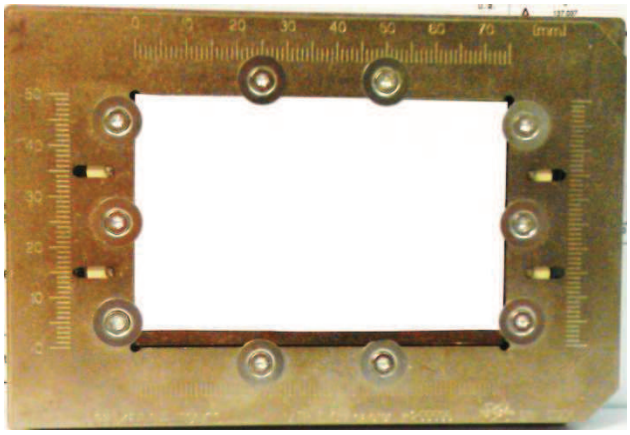


Figure 86 : Photographie d'une plaque MALDI adaptée pour la fixation d'une plaque TLC.

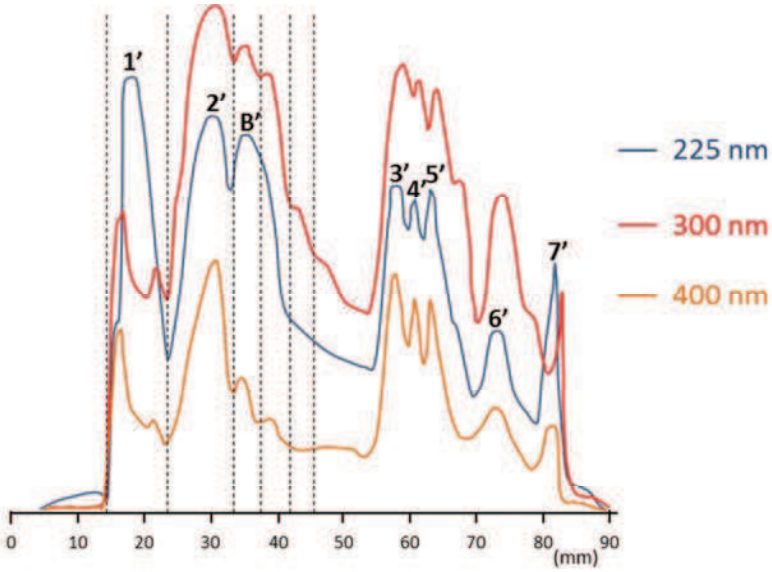
- La préparation de l'analyse d'imagerie : une simple photographie de la plaque MALDI (**Figure 86**) suffit à faire corréler le logiciel FlexImaging utilisé pour contrôler l'acquisition de l'image et FlexControl utilisé pour contrôler l'acquisition des spectres. La zone à cartographier est clairement définie sur FlexImaging. Un pixel est défini par 350 µm² et la taille de l'image dépend de la longueur de la plaque TLC à cartographier.

- Les analyses d'imagerie MALDI-TOFMS : les analyses sont effectuées avec le spectromètre Ultraflex III (Bruker Daltonic, présenté en annexe V). Une calibration externe est appliquée au début de chaque cartographie. L'acquisition automatisée des spectres est gérée à l'aide de la fonction « autoexecute » du logiciel FlexControl, lié directement au logiciel FlexImaging. L'acquisition a été réalisée pour des rapports *m/z* allant de 0 à 1500. 500 tirs lasers sont acquis pour chaque pixel.

- A l'issue de l'acquisition des spectres, les données sont traitées par le logiciel FlexImaging afin de reconstituer un fichier global à partir de chaque spectre de masse (correspondant à un pixel). L'image de la répartition d'une espèce (ion d'intérêt) est alors obtenue par sélection de l'intervalle de masse du massif monoisotopique de l'espèce à cartographier.

II.4.2. Résultats

Pour pouvoir faire une cartographie de la plaque TLC, nous avons dû travailler sur une plaque en aluminium, et non en verre comme précédemment. La même élution est donc répétée sur une plaque en aluminium, puis les profils UV de la plaque sont pris à 225, 300 et 400 nm. La **Figure 87** représente ces profils UV. Par comparaison avec les profils de la plaque en verre, on constate que les pics sont moins bien résolus mais le profil reste ressemblant. Les pics sont indexés sur le profil à 225 nm **:** les pics de 1' à 7' correspondent aux pics 1 à 7 de la **Figure 85A** et le pic B' correspond au pic B. Les bandes de couleurs encadrant les premiers pics 1', 2' et B' sont utilisées pour marquer la correspondance avec les résultats de l'imagerie par spectrométrie de masse.



Tâche	Rf (mm)
1'	19
2'	30
B'	36
3'	58
4'	60
5'	64
6'	74
7'	82

Figure 87 : Profils UV de la plaque TLC à 225, 300 et 400 nm et indexation des pics du profil à 225 nm. *Les traits verticaux encadrant les premiers pics sont utilisés pour marquer la correspondance avec les résultats de l'imagerie par spectrométrie de masse.*

L'élution est moins forte par rapport à celle sur la plaque HPTLC, puisque le premier pic 1' apparait peu après le dépôt à Rf = 19 mm, alors que sur la plaque en verre il était élué à Rf = 35 mm. La distance entre B' et 3' est supérieure à celle entre B et 3, ceux sont bien les pics 1', 2' et B' qui ont migré un peu plus lentement.

Les spectres d'absorbance ont également été réalisés sur les pics observés (non présentés). Les spectres d'absorbance sont similaires à ceux de l'élution de la plaque en verre comme précédemment. On peut alors en conclure que cette plaque est identique à la plaque en verre, outre l'élution retardée pour la plaque en aluminium.

La matrice 9-AA est ensuite déposée sur la longueur d'élution de l'extrait de graines de brocolis afin de pouvoir cartographier (en mode négatif pour la détection des GSL) la zone en question.

On observe différentes *taches* correspondant à plusieurs ions extraits de l'image (**Figure 88**). Les ions extraits sont les principaux GSL identifiés dans l'extrait de graines de brocolis. On constate alors que les GSL sont élués différemment selon le type de chaine R.

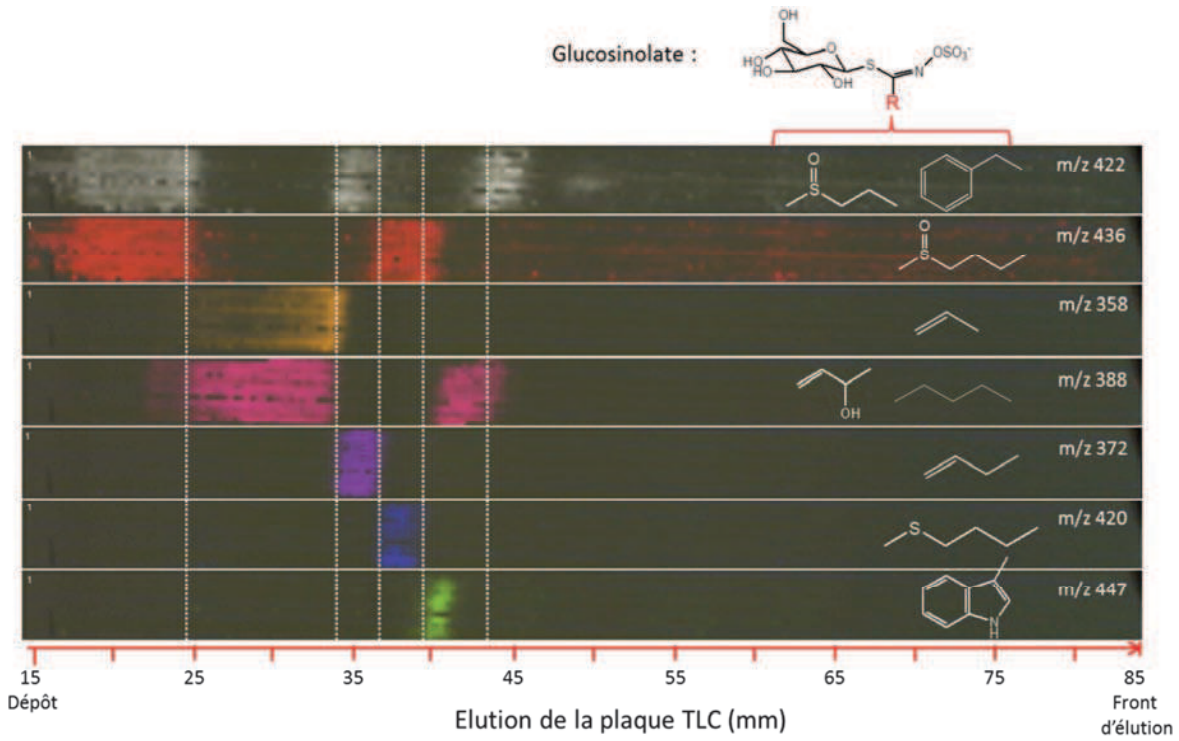


Figure 88 : Images de la plaque TLC en fonction de l'ion extrait (matrice 9-AA, mode négatif). Les bandes de couleurs correspondent à celles de la Figure 87B. *Les traits verticaux blancs sont utilisés pour marquer la correspondance avec les résultats du profil UV de la plaque TLC.*

Pour les GSL isobares aux *m/z* 388 et 422, plusieurs *taches* sont visibles. Cette technique permet donc de les séparer, mais nous ne pouvons pas attribuer formellement une molécule à une distance de migration donnée en l'absence d'étalon. Néanmoins, à la vue des deux structures, nous pouvons émettre l'hypothèse que le GSL ayant la chaine latérale R la plus polaire sera plus retenu sur la silice, et donc moins élué que son isomère. Ainsi le progoitrine et le glucoibérine devraient être moins élués que leurs isomères respectifs le n-pentyl-GSL et le gluconasturtiine (*m/z* 388 et 422). La polarité relative des GSL détectés peut être estimée en fonction de la nature de la chaine latérale. On distingue les GSL ayant une chaine latérale de type aliphatique saturé ou non (n-pentyl GSL *m/z* 388, gluconapine *m/z* 372, sinigrine *m/z* 358), étant les moins polaires et qui devraient être les plus élués. Viennent les GSL aliphatiques hydroxylés (progoitrine *m/z* 388), les aryl aromatiques (gluconasturtiine *m/z* 422) et les aromatiques indoles (glucobrassicine (GBS) *m/z* 447). Les GSL les plus polaires sont ceux contenant un soufre supplémentaire (glucoerucine *m/z* 420) et un oxygène supplémentaire (glucoraphanine *m/z* 436, glucoiberine *m/z* 422). A ces données de polarité, il faut également ajouter la structure de la molécule qui peut être plus ou moins encombrante et donc faire varier les paramètres de rétention sur la silice.

L'ordre d'élution observé sur l'image ne semble donc pas tout à fait correspondre à celui de la polarité des GSL. Deux *taches* pour les ions extraits *m/z* 422 et 436 sont éluées simultanément juste après le dépôt, pouvant être la glucoiberine et la glucoraphanine (d'après les polarités). Suivent deux

taches pour les ions *m/z* 358 et 388 étant respectivement la sinigrine et la progoitrine. Deux *taches* sont encore éluées en même temps aux *m/z* 422 et 372 et peuvent correspondre aux GSL gluconasturtiine et gluconapine. La *tache* suivante pour l'ion *m/z* 420 peut être la glucoerucine, puis nous observons une *tache* pour l'ion *m/z* 447 étant la glucobrassicine, et enfin une dernière *tache* pour l'ion *m/z* 388 correspondant au n-pentyl-GSL. Nous constatons alors qu'une *tache* pour l'ion *m/z* 436 et deux *taches* pour l'ion *m/z* 422 n'ont pas été attribuées, elles peuvent correspondre à des isobares ou isomères non identifiés.

D'autres ions ont été mis en évidence aux endroits repérés par les pics 3' à 7' de la **Figure 87B**. Cependant la dilution chromatographique ajoutée à la complexité des spectres réalisés sur une plaque TLC rendent leur identification peu fiable de par le manque de sensibilité de détection et à l'imprécision plus forte de la mesure de masse sur une plaque. La cartographie en mode positif (avec la 2,5-DHB) réalisée sur une deuxième élution de l'extrait dans les mêmes conditions a été réalisée. Les résultats ne nous ont pas permis de tirer de conclusion intéressante.

II.5. Conclusion sur la place de la TLC

La chromatographie planaire est donc un outil permettant de suivre rapidement l'évolution de la stabilité d'un extrait et peut être utilisée pour le contrôle de la bonne répétabilité d'une extraction. Couplée à la spectrométrie de masse, les principaux métabolites élués peuvent être repérés et l'imagerie permet d'avoir une bonne représentation visuelle, en comparaison avec une révélation de la plaque par des réactifs spécifiques et le profil UV à une longueur d'onde spécifique. Le couplage MALDI-TOFMS sera mis à profit dans le chapitre V. Son intérêt sera exploité pour l'identification de la distance de migration d'un métabolite d'intérêt lors de l'analyse d'un extrait de plante par TLC.

Néanmoins, bien qu'elle soit rapide et facile à mettre en œuvre, la TLC reste relativement peu sensible et de résolution limitée. La suite de ce chapitre sera donc consacrée au développement des analyses par LC-MS et LS-MS^n de l'extrait de graines de brocolis pour tenter d'identifier d'autres métabolites extraits.

III. Mise en place des analyses LC-MS et LC-MS^n

Le couplage de la chromatographie en phase liquide avec la spectrométrie de masse est devenu incontournable dans le monde de l'analyse du végétal. C'est l'une des techniques les plus

adaptées pour l'analyse d'extraits de plantes par sa robustesse et la possibilité d'analyse sur une large gamme de masse et de polarité moléculaire. C'est classiquement grâce à la chromatographie que la résolution des composés isomères (voire isobare pour de la spectrométrie de masse basse résolution) peuvent être mis en évidence au sein des mélanges, la spectrométrie de masse (à l'exception des spectromètres à mobilité ionique) étant incapable d'en faire la distinction. Généralement, le nombre de métabolites détectables s'accroit encore avec la réduction de l'effet de suppression ionique engendré par la matrice lors des phases d'infusion.

La possibilité d'effectuer des couplages en chromatographie en phase liquide (LC pour Liquid Chromatography) couplée à la spectrométrie de masse ne nous a été donnée que très récemment avec l'arrivée au laboratoire d'appareils réellement dédiés à ce genre d'applications. Il s'agit d'un spectromètre de masse de type trappe d'ions équipé de sources à pression atmosphérique. Des essais avaient été menés à l'extérieur du laboratoire mais ne disposant pas quotidiennement de l'appareillage pour développer la méthode, les résultats n'étaient restés qu'au stade prometteur. Un travail de comparaison entre HPTLC-MS et LC-MS centré principalement sur l'identification des glucosinolates avait pu être présenté en congrès[78]. Le travail de mise en place au laboratoire a été restreint aux graines de brocoli pour consacrer plus de temps à l'application présentée au chapitre V.

III.1. Appareillage

A la différence des spectromètres MALDI-TOF/TOF et ESI-FTICRMS, l'appareillage utilisé ici n'est pas impliqué dans le criblage proprement dit mais dans les analyses complémentaires uniquement. Il convient alors maintenant de le présenter.

III.1.1. La chromatographie liquide

Les expériences chromatographiques ont été menées sur une chaine HPLC Dionex Ultimate 3000 (Dionex, France) pilotée par le logiciel Chromeleon™ 6.80. Cette chaine se compose d'une pompe LPG-3400M quaternaire munie d'un dégazeur en ligne et d'un injecteur automatique. La colonne utilisée est une Durashell C18 (2,1 x 150 mm ID) de 5 µm de diamètre, 100 µÅ de diamètre de pores (Jasco, France) munie d'une précolonne. Le volume de la boucle d'injection est de 20 µL et le débit de phase mobile est de 200 µL/min. Les échantillons analysés ayant des polarités très différentes, une élution en gradient a dû être développée. Le profil du gradient d'élution avec la

[78] E. Sibille, K. Benlounes, F. Dupire, M. Matt and P. Chaimbault, Montreux Symposium on LC-MS Lausanne (2013).

phase mobile constituée d'eau (A) et de méthanol (B) est le suivant : le gradient linéaire débute à 10% de B pour atteindre 100% à 30 min, puis reste à 100% de B pendant 10 min.

III.1.2. La spectrométrie de masse : la trappe ionique

La détection se fait par un spectromètre de masse LTQ Velos Pro (Thermo Fisher Scientifique, MA, Etats Unis) dont le schéma est présenté **Figure 89**. Cet appareil est équipé d'une source electrospray (potentiel appliqué au capillaire = 4,2 kV), d'une série de lentilles et de multipôles qui assurent la transmission des ions, puis de deux cellules à haute et basse pression pour le piégeage et l'analyse des ions. Nous allons décrire le principe général d'une trappe ionique, puis le mode de fonctionnement normal, et enfin en mode MS/MS (fragmentation MS^n).

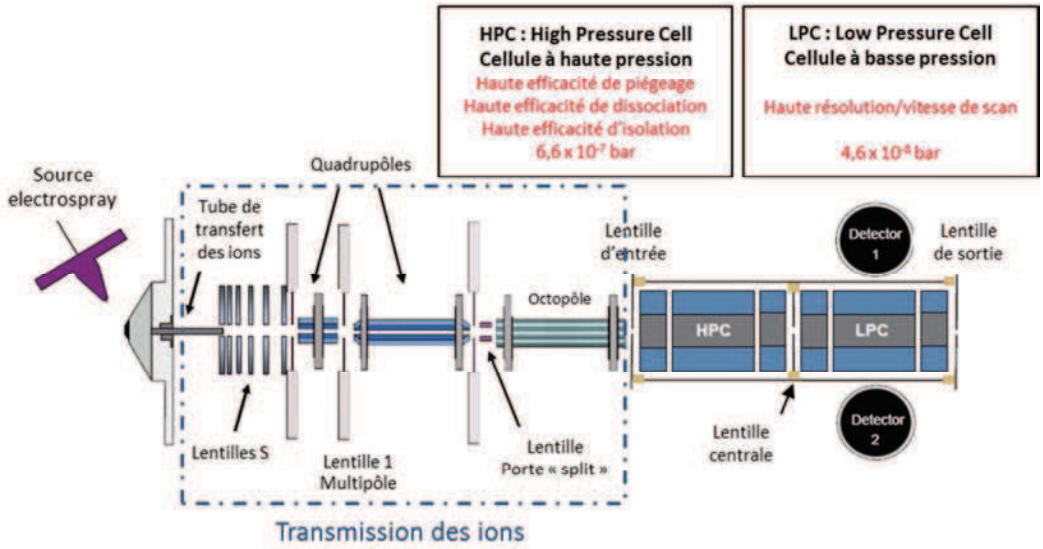


Figure 89 : Schéma du spectromètre de masse Velos Pro.

- Principe de la trappe ionique :

Le principe de cet analyseur consiste à piéger les ions dans une trappe, dite trappe ionique. Cette trappe est constituée de deux électrodes appelées « électrodes chapeaux », par lesquelles les ions entrent et sortent de la trappe, ainsi que d'une électrode annulaire. Cette dernière peut être soumise à différents potentiels, en fonction de l'étape de l'analyse. Deux étapes sont nécessaires à une analyse, que ce soit en mode MS ou MS^n : le piégeage et l'éjection des ions, mais en mode de fragmentation deux étapes supplémentaires sont nécessaires, l'isolement et la fragmentation des ions.

- Fonctionnement en mode MS :

Le **piégeage** des ions dans la trappe ionique constitue la première étape. Les ions entrant dans la trappe par la cellule à haute pression (HPC) restent confinés à l'intérieur pendant un certain temps. Une radiofréquence fixe, appliquée à l'électrode annulaire, assure le piégeage des ions en créant un champ électrique quadripolaire. Si trop d'ions entrent dans la trappe, un phénomène appelé « effet de charge » risque de se produire suite aux répulsions coulombiennes créées entre les ions. Afin d'éviter ce phénomène, le nombre d'ions doit être contrôlé en optimisant le temps de remplissage du piège à ions. Pour améliorer la qualité du piégeage, de l'hélium à pression d'environ 10^{-7} bar est introduit dans la trappe. Les ions sont alors légèrement thermalisés par le gaz. Les ions ainsi piégés décrivent des trajectoires correspondantes au champ quadripolaire, liée à l'alternance de polarité de l'électrode annulaire. Ils sont ensuite transférés dans la cellule basse pression (LPC) afin de minimiser les collisions durant la procédure d'éjection.

L'**éjection** a lieu après piégeage des ions dans la trappe et peut se faire de deux façons. Une éjection simple se fait par balayage croissant de la radiofréquence appliquée à l'électrode annulaire, afin de déstabiliser la trajectoire des ions en fonction de leur rapport *m/z* croissant. Une moitié des ions va donc être éjectée vers l'électrode d'entrée et ne seront donc pas détectés, tandis que l'autre moitié sera dirigée vers l'électrode de sortie en direction du détecteur. Cependant, les faibles valeurs de tensions applicables limitent cette technique qui ne permet pas d'éjecter des ions de hautes masses ($m/z > 650$). Pour obtenir une plus grande gamme d'ions, la méthode de l'éjection résonnante est plus couramment employée. L'éjection des ions est alors réalisée en appliquant une tension alternative aux électrodes de chapeaux de sortie, ainsi que la radiofréquence appliquée à l'électrode annulaire. Puisque chaque ion de rapport *m/z* possède une fréquence qui lui est propre, en appliquant aux électrodes chapeaux un potentiel à une fréquence correspondante à la fréquence de résonnance d'un ion, celui-ci voit son énergie cinétique augmenter. De ce fait, une éjection successive de chaque ion de rapport *m/z* peut être obtenue en augmentant de manière progressive les tensions appliquées sur les électrodes chapeaux et sur l'électrode annulaire.

- Fonctionnement en mode de fragmentation MS^n :

De même que pour le mode MS, les ions sont d'abord piégés dans la cellule haute pression. Un ion, appelé ion précurseur, est alors isolé puis fragmenté en un ou plusieurs ions appelés ions produits.

L'**isolement** consiste à isoler l'ion précurseur dans la trappe ionique. Pour cela, tous les ions de rapports *m/z* plus faibles que l'ion précurseur sont éjectés par balayage croissant de l'amplitude de la

radiofréquence appliquée à l'électrode annulaire. Les ions de rapports *m/z* supérieurs à l'ion précurseur sont éjectés par éjection résonante.

La **fragmentation** en mode CID (Collision Induced Dissociation) a lieu après isolement de l'ion précurseur dans la trappe. Une faible tension alternative est appliquée aux électrodes chapeaux à la fréquence de résonnance de cet ion qui va alors augmenter son énergie cinétique et se fragmenter par collision avec les molécules de gaz tampon (hélium). Les ions produits sont transférés dans la cellule basse pression. Ils sont alors éjectés et analysés de la même manière que pour une analyse en mode MS.

Lorsque les ions précurseurs sont fragmentés pour donner une première génération d'ions produits, on parle de MS/MS mais on préférera noter MS^2 pour la trappe car cet analyseur a la particularité de permettre la génération d'ions produits de seconde génération à partir de la sélection d'un ion produit précurseur. On parle alors de MS^3 (l'appareil permettant d'aller ici jusqu'à MS^{10}). Cet appareil est très intéressant d'un point de vue structural pour remonter la filiation des ions comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

III.2. Résultats expérimentaux

III.2.1. Infusion directe

Après analyse de l'extrait de graines de brocolis, près de 210 métabolites au total sont détectés en mode négatif, ce qui augmente le nombre de métabolites détectés de près de 50 par rapport au profil ESI-FTICRMS. Comme nous le verrons, certains sont attribuables à des isomères qui n'avaient pas pu être mis en évidence par la spectrométrie de masse seule. Le mode positif permet la détection d'environ 130 métabolites. Cumulés, les deux modes portent à 340 le nombre de composés mis en évidence. Ceci peut paraitre peu en regard des méthodes LC-MS appliquées à la métabolomique avec lesquelles il est possible de détecter plusieurs milliers de métabolites[79]. Ceci est lié à notre appareillage qui n'est pas réellement prévu pour ce genre d'application. D'une part, les spectromètres à trappe d'ions ne sont pas des appareils adaptés pour travailler en mode balayage, au contraire par exemple des appareils à temps de vol. D'autre part, les performances des méthodes séparatives ont beaucoup progressé en temps et en résolution avec l'apparition de l'UPLC dont nous ne sommes pas équipés non plus à l'heure actuelle.

[79] R. D. Hall, New Phytol. 169 (2006) 453-468.

III.2.2. LC-MS et LC-MS^n

Comme nous l'avons déjà précisé, pour les analyses LC-MS nous nous sommes concentrés sur l'extrait de graines, plus riche en métabolites identifiés et légèrement plus stable que les extraits de fleurs de brocolis.

Lors de la première analyse LC-MS de cet extrait, en mode positif nous avons extrait 21 composés correspondants à des ions ont été séparés, dont l'acide γ-amino-butyrique (*m/z* 104) et la sinapine (*m/z* 310). En mode négatif, 24 composés ont été séparés, dont 14 ont été identifiés comme GSL. Les chromatogrammes de certains de ces GSL sont présentés à la **Figure 90** et correspondent à quelques-uns de ceux observés lors de l'analyse TLC-MALDI-TOFMS (**Figure 88**). Cet ordre d'élution est en accord avec deux études menées sur les principaux glucosinolates contenus dans les espèces du genre *Brassicacea*[80,81] et correspond à celui obtenu par TLC-MALDI-TOFMS. Lors de cette analyse, la phase stationnaire était en silice, retenant donc principalement les composés polaires. Ceux-ci étaient donc moins élués que les composés apolaires. La chromatographie à polarité de phase inversée utilisée lors de la mise en place du couplage possède une logique de rétention inversée par rapport à la silice vierge utilisée ici en TLC. Les composés apolaires seront moins facilement élués que les composés polaires. Nous pouvons alors faire une correspondance entre ces deux analyses, sur une plaque TLC les composés polaires seront identifiés peu après le dépôt, donc au début de la plaque, et sur notre colonne chromatographique ceux-ci seront élués au début de l'analyse, donc au début du chromatogramme.

[80] Q. Tian, R. A. Rosselot and S. J. Schwartz, Anal. Biochem. 343 (2005) 93-99.
[81] F. Lelario, G. Bianco, S. A. Bufo and T. R. I. Cataldi, Phytochem. 73 (2012) 74-83.

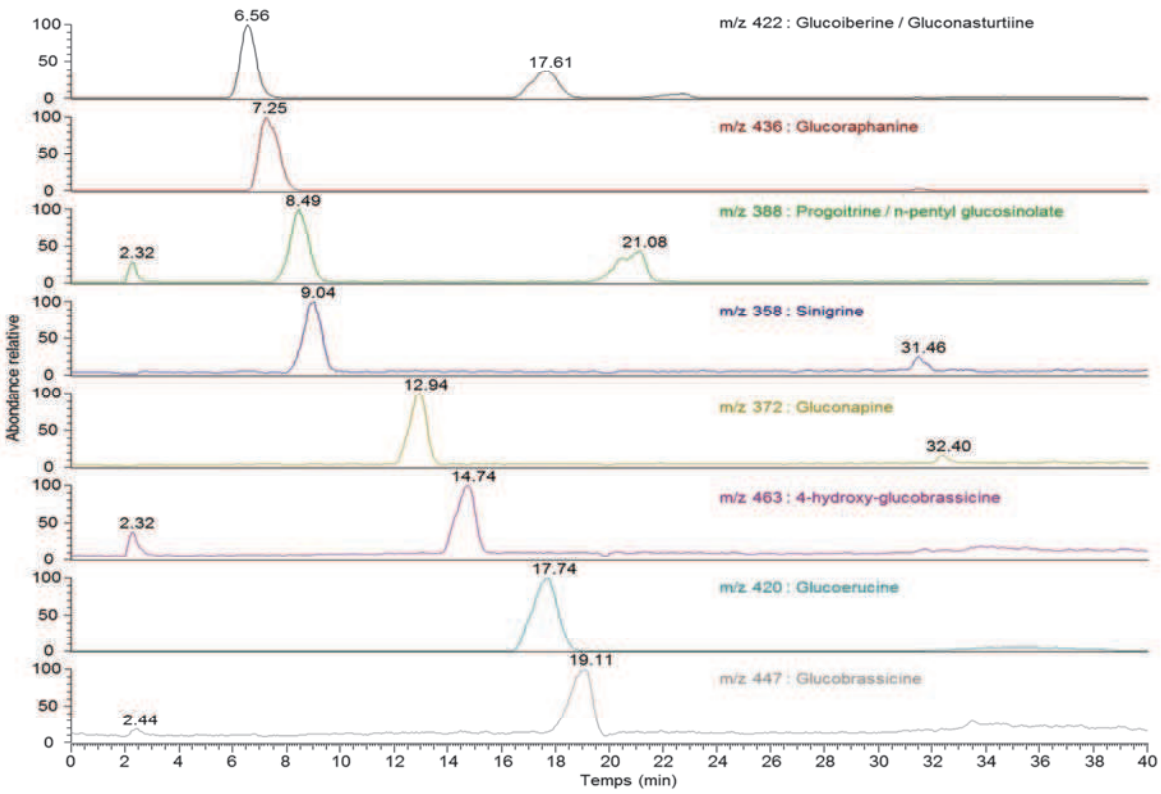


Figure 90 : Chromatogrammes d'ions extraits par LC-MS en mode négatif de l'extrait de graines de brocolis.

Le **Tableau 7** fait un récapitulatif des ions correspondants aux glucosinolates séparés avec leur(s) temps de rétention respectif(s).

Tableau 7 : Liste des ions identifiés comme glucosinolates avec leur temps de rétention respectif. *Les ions en rouges correspondent aux GSL isomères qui ne peuvent pas être formellement attribués à ce stade de l'analyse.*

m/z	T_R	Glucosinolate	Chaine latérale
422	6,6	Glucoiberine	$(CH_2)_3S(O)CH_3$
436	7,3	Glocoraphanine	$(CH_2)_4S(O)CH_3$
388	8,4	Progoitrine	$CH_2CH(OH)CHCH_2$
358	8,9	Sinigrine	CH_2CHCH_2
372	13,1	Gluconapine	$(CH_2)_2CHCH_2$
406	14,4	Glucoiberverine	$(CH_2)_3SCH_3$
463	14,7	4-hydroxy-GBS	CH_2indole 4-OH
422	17,6	Gluconasturtiine	$CH_2CH_2(C_6H_5)$
420	17,7	Glucoerucine	$(CH_2)_4SCH_3$
447	19,1	Glucobrassicine	CH_2indole
388	21,0	n-pentyl-GSL	$(CH_2)_4CH_3$
477	26,6	Neoglucobrassicine	CH_2indole(N)OCH_3
402	28,5	n-hexyl-GSL	$(CH_2)_5CH_3$
477	34,9	4-methoxy-GBS	CH_2indole 4-OCH_3

Cependant, pour les GSL isomères (*m/z* 477) et isobares (*m/z* 422 et 358), deux pics sont isolés à des temps de rétention différents. Afin de pouvoir identifier clairement le pic correspondant à chaque métabolite, nous avons fait une analyse LC-MS^2 de l'extrait dans le but d'obtenir une fragmentation de ces isomères et/ou isobares. Grâce à l'identification des ions produits, nous pourrons remonter à leur ion précurseur respectif et donc le GSL. Le **Tableau 8** liste les différents ions fragments détectés. Grâce à ces fragments, nous avons pu attribuer les pics élués pour un même rapport *m/z* lors de l'analyse chromatographique de l'extrait de graines.

Tableau 8 : Liste des ions fragments détectés par LC-MS/MS pour les glucosinolates cités. Les ions en bleu sont les fragments communs à la famille des GSL.

Glucosinolate	*m/z* ion précurseur	*m/z* ions produits												
Progoitrine	388	136	195	210	226	259	275	301	308	332				
n-pentyl GSL	388	129	146	195	210	226	259	275	287	321	345	357	371	
Glucoiberine	422	259	275	291	342	358	407							
Gluconasturtiine	422	180	195	242	259	277	291	343	379	405				
NeoGBS	477	259	409	433	446	459								
4-methoxy-GBS	477	223	447	459										

Les attributions des fragments correspondant aux ions sont représentées sur les **Figure 91 et 21**.La formation des fragments communs aux glucosinolates aux *m/z* 195, 259 et 275 a été décrite par Bialecki *et al.*[82].

[82] J. B. Bialecki, J. Ruzicka, C. S. Weisbecker, M. Haribal and A. B. Attygalle, J. Mass Spectrom. 45 (2010) 272-283.

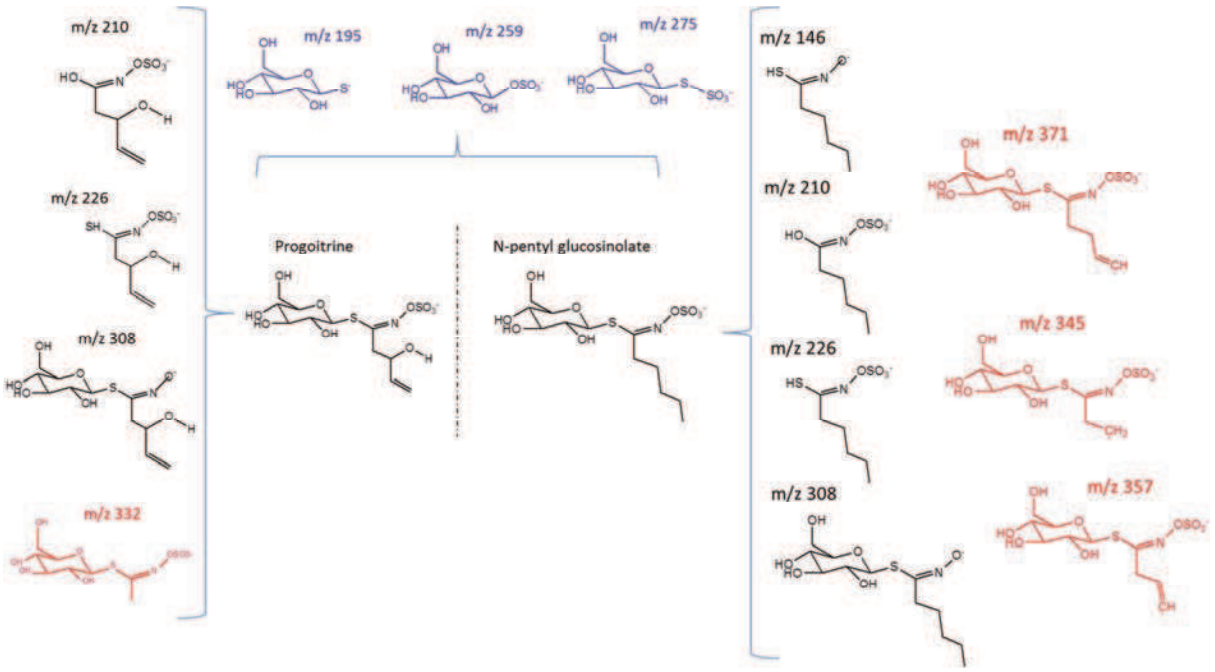


Figure 91 : Proposition d'attribution des différents ions fragments détectés lors de l'analyse MS/MS de l'ion précurseur à *m/z* 388. *Les ions en bleu sont des fragments communs aux GSL, les ions en rouge sont les fragments ayant permis la différenciation entre les deux ions précurseurs.*

Les fragments communs au progoitrine et au n-pentyl GLS (**Figure 91**) correspondent à la perte du glucose (*m/z* 226) qui peut être suivi d'un réarrangement pour l'ion à *m/z* 210. Nous observons également pour le n-pentyl GLS un ion à *m/z* 146 qui semble provenir de la perte du groupe SO_3^- à partir de l'ion produit *m/z* 210. L'ion fragment commun à *m/z* 308 est produit directement par perte du SO_3^-, dont le mécanisme est également été décrit en 2010 par l'équipe de Cataldi et *al.*[83]. Les ions produits peuvent aussi être dus à des réarrangements spécifiques à la chaine latérale portée par le GLS. Ce sont ces fragments qui permettent l'identification du GSL, comme les ions fragments à *m/z* 332 pour la progoitrine, *m/z* 345, 357 et 371 pour le n-pentyl GLS. Le mécanisme réel de formation de ces ions reste cependant peu exploré.

Ces mêmes fragmentations sont valables pour la gluconasturtiine et la glucoiberine (**Figure 92**), en ce qui concerne les fragments communs aux GSL. L'ion produit à *m/z* 342 provient de la perte du SO_3^- pour les deux GSL, et l'ion à *m/z* 180 fragment du gluconasturtiine est produit par perte du glucose et du SO_3^-. Cependant, le fragment ayant permis la différenciation de ces deux GSL est l'ion à *m/z* 358 du glucoiberine, ne pouvant correspondre à un fragment du gluconasturtiine.

83 T. R. I. Cataldi, F. Lelario, D. Orlando and S. A. Bufo, Anal. Chem. 82 (2010) 5686-5696.

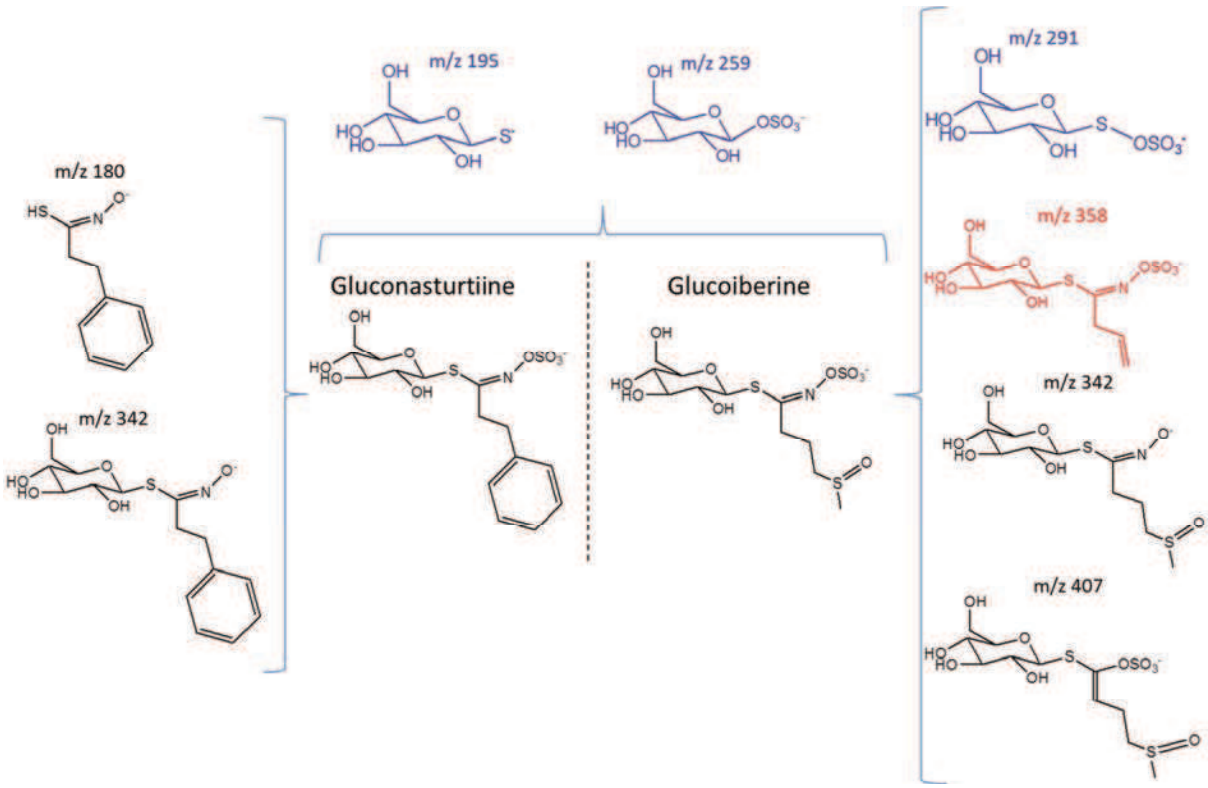


Figure 92 : Hypothèses d'attribution des différents ions fragments détectés lors de l'analyse MS/MS de l'ion précurseur à *m/z* 422. *Les ions en bleu sont des fragments communs aux GSL, l'ion en rouge est le fragment ayant permis la différenciation entre les deux ions précurseurs.*

Concernant les deux isomères à *m/z* 477, la fragmentation de la neoGBS a déjà été publiée[84]. Celle-ci est décrite comme produisant un ion fragment radicalaire à *m/z* 446 par perte de $OCH_3^{\cdot}$, fragment que nous avons également détecté. Un deuxième fragment à *m/z* 433 provient de la perte d'une molécule d'HCN, également décrit dans cette publication. Nous avons donc attribué l'ion à *m/z* 477 produisant ces deux ions à la neoGBS, et le deuxième isomère au 4-methoxy-GBS. Ce dernier produit un ion à *m/z* 447, probablement suite à la perte d'une molécule de formaldéhyde CH_2O.

Ainsi nous avons pu séparer et identifier par LC-MS^2 les GSL présents dans l'extrait de graines de brocolis. Nous n'avons pu identifier formellement d'autres métabolites isolés et fragmentés lors de ces analyses. Des analyses de fragmentations d'ordre supérieur à MS^2 seraient nécessaires pour élucider les ions produits de première génération. Bien que nous n'ayons pas réussi à identifier d'autres métabolites, nous avons pu lever l'indétermination sur certains pics détectés que nous aurions attribués par erreur à certains métabolites. Par exemple, les ions produits suite à la fragmentation de l'ion précurseur *m/z* 353 ne sont pas compatibles avec la formule brute de l'acide chlorogénique. En effet, aucun des ions fragments détectés lors de notre analyse aux *m/z* 222, 237, 307, 321 et 337 ne peut correspondre à un fragment de l'acide chlorogénique, dont les principaux

[84] N. Fabre, V. Poinsot, L. Debrauwer, C. Vigor, J. Tulliez, I. Fourasté and C. Moulis, Phytochem. Anal. 18 (2007) 306-319.

ions produits sont *m/z* 178 et 135[85]. Bien d'autres indéterminations ont également pu être résolues de cette manière, notamment pour les acides érucique, linoléique et linolénique.

Néanmoins cette technique montre son intérêt pour la détermination et l'identification de plusieurs isomères, lorsque ceux-ci sont présents dans un même échantillon. C'est ce potentiel intéressant qui sera mis en œuvre dans le chapitre suivant pour l'élucidation structurale de nombreux métabolites.

Dans une dernière partie, nous allons présenter les résultats obtenus des tests d'activité biologique de l'extrait de graines de brocolis sur les CDC25s et sur différentes lignées cellulaires cancéreuses. Ces résultats seront ensuite corrélés à ceux obtenus pour l'application de notre protocole de criblage sur les CDC25s.

IV. Mesure de l'activité biologique des extraits

Pour confirmer les résultats de criblage ou à l'inverse essayer de cribler la (les) molécule(s) responsable(s) d'une activité sur CDC25 au sein d'un extrait, il est nécessaire d'effectuer des mesures de leur activité biologique. A cette fin, les tests effectués sont des mesures d'inhibition des CDC25s et de cytotoxicité sur cellules mammaires humaines. Ceci a été effectué en collaboration avec l'équipe de biologie du LIMBP-SRSMC.

IV.1. Inhibitions des CDC25s et cytotoxicité

Les résultats de nos analyses sur les extraits de brocolis ont montré que nous ne maitrisions pas réellement leur conservation, en vue de les soumettre aux tests d'activité biologique sur les CDC25s, et bien entendu sur les cellules elles-mêmes. La composition des extraits de graines est cependant un peu plus stable dans le temps. Nous présenterons donc les tests effectués et leurs résultats seulement sur extrait de graines préalablement lyophilisé.

La mesure de la cytoxicité de l'extrait a été réalisée sur 4 lignées cellulaires mammaire (lignées MCF7 et MDA-MB231 sensibles, lignée hTERT-HME1 non cancéreuse mais immortalisée par la télomérase et lignée VCREMS résistante à de nombreux anticancéreux comme la doxorubicine ou encore la vincristine). Les cellules sont traitées par 0,2% v/v d'extrait dans le milieu de culture et incubées pendant 24, 48, 72 et 96 heures. Les cellules vivantes, présentant une activité succinate

[85] R. Jaiswal, T. Sovdat, F. Vivan and N. Kuhnert, J. Agric. Food Chem. 58 (2010) 5471-5484.

deshydrogénase mitochondriale intacte, sont capables de métaboliser les sels de tétrazolium incolores (MTT) en formazan bleu, ce qui permet leur évaluation quantitative[86]. La viabilité cellulaire est exprimée en pourcentage par rapport au témoin négatif non traité.

Les résultats sont présentés sur la **Figure 93**. Ils ne montrent aucun effet significatif en matière de cytotoxicité pour l'extrait de graine. Cependant ils ont été obtenus avec une seule concentration d'extrait (correspondante à 15,5 mg de matière fraiche / mL) et doivent donc être confirmés ou infirmés par des expérimentations plus précises.

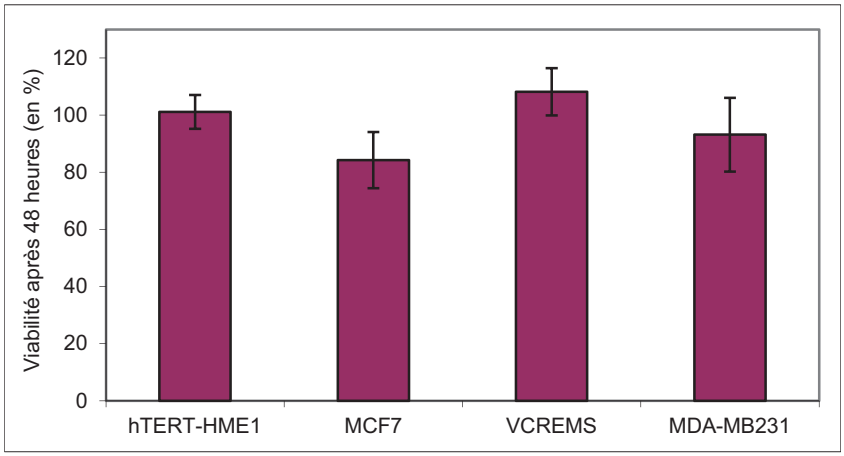


Figure 93 : Effet de l'extrait de graines de brocolis sur la viabilité cellulaire de différentes lignés après 48 heures d'incubation (N = 3).

Le protocole permettant la mesure de l'inhibition sur CDC25s a été présenté dès le chapitre III lors de la mesure de l'inhibition du composé SV37. Le test a été reproduit 3 fois en duplicata avec un extrait concentré à 78 mg/mL (masse de matière sèche/v). Le test n'a pas montré d'inhibition significative des CDC25A et C, ce qui n'est pas illogique au vu des résultats de cytotoxicité. De plus, les GSL, en inhibant les enzymes de phase I (cytochrome P450 dépendantes) et en activant les enzymes de phase II, se présentent plutôt comme des molécules chimiopréventives que comme des molécules actives contre les cellules cancéreuses elles-mêmes[87]. Notre extrait est riche en GSL, et surtout en glucoraphanine, précurseur du SFN. Il faudra donc tenir compte de ces informations pour poursuivre l'étude des effets du brocoli de façon raisonnée.

IV.2. Résultats du test de criblage

Préalablement au criblage, le lyophilisat est repris dans de l'eau additionnée de 5 % de MeOH à une concentration finale de 5 mg/mL. 30 µL de l'extrait sont incubés avec 30 µL de CDC25A ou 50

[86] T. Mosmann, J. Immuno. Meth. 65 (1983) 55-63.
[87] G. Williamson, K. Faulkner and G. W. Plumb, Eur. J. Cancer Prev. 7 (1998) 17-21.

µL de CDC25C à température ambiante pendant une heure. Les deux solutions sont ensuite filtrées sur Microconcentrateur 30000 et les membranes des filtres sont lavées trois fois avec 100 µL d'eau ultrapure. Les protéines et molécules retenues sur la membrane du filtre sont éluées par 20 µL d'eau ultrapure, puis ces éluats sont dessalés grâce à une pointe ZipTip®.

Les solutions obtenues sont analysées directement par MALDI-TOFMS avec les matrices 2,5-DHB pour la détection en mode positif et la 9-AA pour la détection en mode négatif (étape 3 du protocole). Sur trois répétitions, aucun des métabolites observés par MALDI-TOMS dans l'extrait n'a été retrouvé après l'étape de criblage, quelle que soit l'isoforme testée. Ce résultat est logique par rapport aux tests d'inhibition des CDC25s et il est même rassurant car il n'a pas induit de résultats faussement positifs pour le criblage.

CONCLUSION

Les extraits bruts de plantes sont des échantillons extrêmement complexes contenant des milliers de molécules différentes. Ce chapitre a présenté les différentes méthodes d'analyses que nous avons mises en place au laboratoire afin de compléter les connaissances que nous avions déjà acquises pour ce genre d'échantillons (profils MALDI-TOFMS utilisés dans le protocole de criblage).

Les profils MALDI-TOFMS peuvent être complétés par une fragmentation en mode LIFT des composés afin de confirmer certaines structures comme nous l'avons vu pour les néolignanes dans les extraits de graines. Des analyses par ESI-FTICRMS peuvent encore compléter ces profils en mettant en évidence de nouveaux métabolites, mais surtout en précisant les formules moléculaires grâce à l'exactitude de cette technique très haute résolution. Certaines hypothèses d'attribution peuvent alors être très tôt écartées avec ce genre d'analyse.

Associer les techniques séparatives à ces analyses complémentaires est incontournable. La chromatographie sur couche mince, si elle n'est pas aussi performante que la chromatographie en phase liquide, est un moyen rapide de contrôler la qualité d'un échantillon ou son évolution sans même procéder aux identifications des métabolites. L'évolution instrumentale permet maintenant d'accéder à son couplage à la spectrométrie de masse en déposant une matrice à la surface de la plaque après sa migration. Le couplage permet alors des identifications de structures (ou d'en formuler l'hypothèse) en l'absence d'étalon commerciaux comme bien souvent dans le domaine des produits naturels. Par ailleurs, la TLC semi-préparative est un moyen possible de purification de petites quantités de produits pour en faire un étalon ou pour analyses complémentaires comme

nous verrons dans le dernier chapitre. Enfin, la chromatographie en phase liquide, de par ses plus hautes performances, permet de séparer plus facilement les isomères non révélés par la spectrométrie de masse seule. Il est ainsi possible d'augmenter le nombre de composés identifiés au sein de l'extrait végétal.

Le brocoli a été choisi comme plante modèle pour disposer d'une matière première facilement renouvelable et pour son lien avec la chimioprévention. Un travail conséquent reste à fournir sur ce végétal afin de connaitre réellement son potentiel. Comme nous l'avons vu, beaucoup de pistes possibles ont été mises entre parenthèses pour privilégier l'aspect analytique, comme par exemple l'extraction de ses métabolites par l'assistance des ultrasons ou encore des microondes. Il en va de même pour les modes de conservation de l'échantillon. Les tests biologiques ont montré que l'extrait de graines n'était pas cytotoxique sur 4 lignées de cellules cancéreuses et inactif sur CDC25s. Le protocole de criblage n'a pas donné de résultat faussement positif à cette occasion. Cependant ces tests doivent être précisés et complétés. Notamment il sera intéressant de rechercher non pas un pouvoir cytotoxique sur des cellules déjà cancéreuses, mais plutôt un effet chimiopréventif sur des cellules non cancéreuses. Enfin, il sera important de contrôler que cet effet protecteur des cellules non cancéreuses, s'il existe, n'altère pas l'efficacité des substances couramment utilisées en chimiothérapie. Il faudra également tenter d'enrichir les extraits en ITCs, dans la même optique de recherche.

Nous disposons donc maintenant d'une technique de criblage applicable à des extrait végétaux et d'une batterie de méthodes d'analyses complémentaires. Toutes ces techniques vont être appliquées avec succès à un autre extrait de plante dans le chapitre V.

Bibliographie :

[1] R. Verkerk, M. Schreiner, A. Krumbein, E. Ciska, B. Holst, I. Rowland, R. D. Schrijver, M. Hansen, C. Gerhäuser, R. Mithen, M. Dekker, *Glucosinolates in Brassica vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health*, Mol. Nut. Food Res. 53 (2009) S219.

[2] T. Sun, J. R. Powers, J. Tang, *Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices*, Food Chem. 105 (2007) 101-106.

[3] J. W. Finley, C. Ip, D. J. Lisk, C. D. Davis, K. J. Hintze, P. D. Whanger, *Cancer-Protective Properties of High-Selenium Broccoli*, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 2679-2683.

[4] J. W. Finley, *Reduction of Cancer Risk by Consumption of Selenium-Enriched Plants: Enrichment of Broccoli with Selenium Increases the Anticarcinogenic Properties of Broccoli*, J. Med. Food 6 (2003) 19-26.

[5] M. E. Cartea, M. Francisco, P. Soengas, P. Velasco, *Phenolic Compounds in Brassica Vegetables* Molecules 16 (2011) 251-280.

[6] E. H. Jeffery, A. F. Brown, A. C. Kurilich, A. S. Keck, N. Matusheski, B. P. Klein, J. A. Juvik, *Variation in content of bioactive components in broccoli*, J. Food Comp. Anal. 16 (2003) 323-330.

[7] E. Koh, K. M. S. Wimalasiri, A. W. Chassy, A. E. Mitchell, *Content of ascorbic acid, quercetin, kaempferol and total phenolics in commercial broccoli*, J. Food Comp. Anal. 22 (2008) 637-643.

[8] Z. Balouchi, G.-A. Peyvast, M. Ghasemnezhad, M. Saadatian, *Changes of antioxydant compounds of broccoli (Brassica oleracea L.Var. Italica) during storage at low and high temperatures*, South Western J. Hort. Biol. Environ. 2 (2011) 193-212.

[9] R. B. Jones, C. L. Frisina, S. Winkler, M. Imsic, R. B. Tomkins, *Cooking method significantly effects glucosinolate content and sulforaphane production in broccoli florets*, Food Chem. 123 (2010) 237-242.

[10] M. B. Sporn, N. M. Dunlop, D. L. Newton, J. M. Smith, *Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids).* Fed Proc. 35 (1976) 1332-1338.

[11] P. Greenwald, G. Kelloff, C. Burch-Whitman, B. S. Kramer, *Chemoprevention*, A Cancer J. for Clinicians 45 (1995) 31-49.

[12] Y.-J. Surh, *Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances*, Mut. Res. 428 (1999) 305-327.

[13] M. B. Sporn, N. Suh, *Chemoprevention of cancer*, Carcinogenesis 21 (2000) 525-530.

[14] K. J. Hintze, K. Wald, J. W. Finley, *Phytochemicals in Broccoli Transcriptionally Induce Thioredoxin Reductase*, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 5535-5540.

[15] G. Van Poppel, D. T. Verhoeven, H. Verhagen, R. A. Goldbohm, *Brassica vegetables and cancer prevention. Epidemiology and mechanisms.*, Adv. Exp. Med. Biol. 472 (1999) 159-168.

[16] J. W. Fahey, A. T. Zalcmann, P. Talalay, *The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants*, Phytochem. 56 (2001) 5-51.

[17] Q. Tian, R. A. Rosselot, S. J. Schwartz, *Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*, Anal. Biochem. 343 (2005) 93-99.

[18] Y. S. Keum, W. S. Jeong, A. N. Tony Kong, *Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms*, Mutat. Res. Fund. Mol. M. 555 (2004) 191-202.

[19] B. E. Cavell, S. S. Syed Alwi, A. Donlevy, G. Packham, *Anti-angiogenic effects of dietary isothiocyanates: Mechanisms of action and implications for human health*, Biochem. Pharm. 81 (2011) 327-336.

[20] H. Sidransky, N. Ito, E. Verney, *Influence of alpha-naphthyl-isothiocyanate on liver tumorigenesis in rats ingesting ethionine and N-2-fluorenylacetamide.*, J. Natl. Cancer Inst. 37 (1966) 677-686.

[21] S. S. Hecht, *Chemoprevention of Cancer by Isothiocyanates, Modifiers of Carcinogen Metabolism*, J. Nutr. 129 (1999) 768-774.

[22] Y. Zhang, L. Tang, V. Gonzalez, *Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells*, Mol. Cancer Ther. 2 (2003) 1045-1052.

[23] A. R. Kristal, J. W. Lampe, *Brassica Vegetables and Prostate Cancer Risk: A Review of the Epidemiological Evidence*, Nutr. Cancer 42 (2002) 1-9.

[24] R. H. Kolm, U. H. Danielson, Y. Zhang, P. Talalay, B. Mannervik, *Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: structure-activity studies*, Biochem. J. 311 (1995) 453-459.

[25] H. Zhao, J. Lin, H. B. Grossman, L. M. Hernandez, C. P. Dinney, X. Wu, *Dietary isothiocyanates, GSTM1, GSTT1, NAT2 polymorphisms and bladder cancer risk*, Int. J. Cancer 120 (2007) 2208-2213.

[26] J. V. Hidgon, B. Delage, D. E. Williams, R. H. Dashwood, *Cruciferous Vegetables and Human Cancer Risk: Epidemiologic Evidence and Mechanistic Basis*, Pharmacol. Res. 55 (2007) 224-236.

[27] N. Jugea, R. F. Mithena, M. Trakaa, *Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane : a comprehensive review*, Cell. Mol. Life Sci. 64 (2007) 1105-1127.

[28] Y. Zhang, T. W. Kensler, C. G. Cho, G. H. Posner, P. Talalay, *Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates*, Proceedings of the National Academy of Sciences 91 (1994) 3147-3150.

[29] W. Wang, S. Wang, A. F. Howie, G. J. Beckett, R. Mithen, Y. Bao, *Sulforaphane, Erucin, and Iberin Up-Regulate Thioredoxin Reductase 1 Expression in Human MCF-7 Cells*, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 1417-1421.

[30] W. Y. Choi, B. T. Choi, W. H. Lee, Y. H. Choi, *Sulforaphane generates reactive oxygen species leading to mitochondrial perturbation for apoptosis in human leukemia U937 cells*, Biomed. Pharmacother. 62 (2008) 637-644.

[31] W. F. Chu, D. M. Wu, W. Liu, L. J. Wu, D. Z. Li, D. Y. Xu, X. F. Wang, *Sulforaphane induces G2-M arrest and apoptosis in high metastasis cell line of salivary gland adenoid cystic carcinoma*, Oral Oncol. 45 (2009) 998-1004.

[32] S. J. T. Jackson, K. W. Singletary, *Sulforaphane Inhibits Human MCF-7 Mammary Cancer Cell Mitotic Progression and Tubulin Polymerization*, J. Nutr. 134 (2004) 2229-2236.

[33] B. Yepez, M. Espinosa, S. López, G. Bolaños, *Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction*, Fluid Phase Equilibr. 194–197 (2002) 879-884.

[34] L.-Z. Lin, J. M. Harnly, *Identification of the Phenolic Components of Collard Greens, Kale, and Chinese Broccoli*, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 7401-7408.

[35] F. Vallejo, F. A. Tomás-Barberán, F. Ferreres, *Characterisation of flavonols in broccoli (Brassica oleracea L. var. italica) by liquid chromatography-UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry*, J. Chrom. A 1054 (2004) 181-193.

[36] C. Kaur, H. C. Kapoor, *Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables*, Int. J. Food Sci. Technol. 37 (2002) 153-161.

[37] A. Podsedek, *Natural antioxydants and antioxydant capacity of Brassica vegetables : A review*, Food Sci. Tech. 40 (2007) 1-11.

[38] S. Kuntz, U. Wenzel, H. Daniel, *Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines*, Eur. J. Nutr. 38 (1999) 133-142.

[39] M. W. Davey, M. V. Montagu, D. Inzé, M. Sanmartin, A. Kanellis, N. Smirnoff, I. J. J. Benzie, J. J. Strain, D. Favell, J. Fletcher, *Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing*, J. Sci. Food Agric. 80 (2000) 825-860.

[40] M. J. Stampfer, E. B. Rimm, *Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease*, Am. J. Clinic. Nutr. 62 (1995) 1365S-1369S.

[41] D. R. Heldman, R. W. Hartel, Principles of Food Processing, Chapman & Hall. 1997, USA.

[42] G. B. Bengtsson, R. Schöner, E. Lombardo, J. Schöner, G. I. A. Borge, W. Bilger, *Chlorophyll fluorescence for non-destructive measurement of flavonoids in broccoli*, Postharvest Biol. Tec. 39 (2006) 291-298.

[43] O. N. Campas-Baypoli, D. I. Sánchez-Machado, C. Bueno-Solano, B. Ramírez-Wong, J. López-Cervantes, *HPLC method validation for measurement of sulforaphane level in broccoli by-products*, Biomed. Chrom. 24 (2010) 387-392.

[44] M. D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, *Soxhlet extraction: Past and present panacea*, J. Chrom. A 1217 (2010) 2383-2389.

[45] M. A. Berhow, K. Vermillion, G. N. Jham, B. Tisserat, S. F. Vaughn, *Purification of a Sinapine-Glucoraphanin Salt from Broccoli Seeds*, Am. J. Plant Sci. 1 (2010) 113-118.

[46] J. L. Luque-García, M. D. Luque de Castro, *Ultrasound: a powerful tool for leaching*, Trend Anal. Chem. 22 (2003) 41-47.

[47] M. Montes-Bayón, M. J. D. Molet, E. B. González, A. Sanz-Medel, *Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (Allium sativum and Brassica juncea) and Se speciation by HPLC-ICP-MS*, Talanta 68 (2006) 1287-1293.

[48] S. Albu, E. Joyce, L. Paniwnyk, J. P. Lorimer, T. J. Mason, *Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from Rosmarinus officinalis for the food and pharmaceutical industry*, Ultrason. Sonochem. 11 (2004) 261-265.

[49] Y. Yang, F. Zhang, *Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from Euonymus alatus (Thunb.) Sieb*, Ultrason. Sonochem. 15 (2008) 308-313.

[50] J. Dai, R. J. Mumper, *Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties*, Molecules 15 (2010) 7313-7352.

[51] Z. Hromádková, Z. Košťálová, A. Ebringerová, *Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction of phenolics-rich heteroxylans from wheat bran*, Ultrason. Sonochem. 15 (2008) 1062-1068.

[52] T. Mohn, B. Cutting, B. Ernst, M. Hamburger, *Extraction and analysis of intact glucosinolates—A validated pressurized liquid extraction/liquid chromatography–mass spectrometry protocol for Isatis tinctoria, and qualitative analysis of other cruciferous plants*, J. Chrom. A 1166 (2007) 142-151.

[53] V. Illés, H. G. Daood, P. A. Biacs, M. H. Gnayfeed, B. Mészáros, *Supercritical CO2 and Subcritical Propane Extraction of Spice Red Pepper Oil with Special Regard to Carotenoid and Tocopherol Content*, J. Chrom. Sci. 37 (1999) 345-352.

[54] H. S. Park, H. J. Lee, M. H. Shin, K.-W. Lee, H. Lee, Y.-S. Kim, K. O. Kim, K. H. Kim, *Effects of cosolvents on the decaffeination of green tea by supercritical carbon dioxide*, Food Chem. 105 (2007) 1011-1017.

[55] E. Arnáiz, J. Bernal, M. T. Martín, C. García-Viguera, J. L. Bernal, L. Toribio, *Supercritical fluid extraction of lipids from broccoli leaves*, Europ. J. Lipid Sci. Tech. 113 (2011) 479-486.

[56] J. Liu, S. Lin, Z. Wang, C. Wang, E. Wang, Y. Zhang, J. Liu, *Supercritical fluid extraction of flavonoids from Maydis stigma and its nitrite-scavenging ability*, Food Bioprod. Proc. 89 (2011) 333-339.

[57] E. Arnáiz, J. Bernal, M. T. Martín, M. J. Nozal, J. L. Bernal, L. Toribio, *Supercritical fluid extraction of free amino acids from broccoli leaves*, J. Chrom. A 1250 (2012) 49-53.

[58] K. Ganzler, A. Salgó, K. Valkó, *Microwave extraction : A novel sample preparation method for chromatography*, J. Chrom. A 371 (1986) 299-306.

[59] M. Omirou, I. Papastylianou, R. Iori, C. Papastephanou, K. K. Papadopoulou, C. Ehaliotis, D. G. Karpouzas, *Microwave-assisted extraction of glucosinolates from Eruca sativa seeds and soil: comparison with existing methods*, Phytochem. Anal. 20 (2009) 214-220.

[60] H.-F. Zhang, X.-H. Yang, Y. Wang, *Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions*, Trends Food Sci. Tech. 22 (2011) 672-688.

[61] T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir, *Evaluation of a simple and promising method for extraction of antioxidants from sea buckthorn (Hippophaë rhamnoides L.) berries: Pressurised solvent-free microwave assisted extraction*, Food Chem. 126 (2011) 1380-1386.

[62] P. J. A. Madeira, M. H. Florêncio, *Flavonoid–matrix cluster ions in MALDI mass spectrometry*, J. Mass Spectrom. 44 (2009) 1105-1113.

[63] C. Böttcher, E. von Roepenack-Lahaye, J. Schmidt, C. Schmotz, S. Neumann, D. Scheel, S. Clemens, *Metabolome Analysis of Biosynthetic Mutants Reveals a Diversity of Metabolic Changes and Allows Identification of a Large Number of New Compounds in Arabidopsis*, Plant Physiol. 147 (2008) 2107-2120.

[64] F. Matsuda, M. Y. Hirai, E. Sasaki, K. Akiyama, K. Yonekura-Sakakibara, N. J. Provart, T. Sakurai, Y. Shimada, K. Saito, *AtMetExpress Development: A Phytochemical Atlas of Arabidopsis Development*, Plant Physiol. 152 (2010) 566-578.

[65] G. Hamm, *Recherche par spectrométrie de masse de métabolites intervenant dans la résistance de la vigne aux agressions biotiques et abiotiques*. 2010, Université de Metz

[66] L. Becker, A. Poutaraud, G. Hamm, J.-F. Muller, D. Merdinoglu, V. Carré, P. Chaimbault, *Metabolic study of grapevine leaves infected by downy mildew using Negative Ion Electrospray - Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*, Accepté dans Anal. Chim. Acta (2013).

[67] S. Nyiredy, *The bridge between TLC and HPLC: overpressured layer chromatography (OPLC)*, Trends Anal. Chem. 20 (2001) 91-101.

[68] J. T. Mehl, D. M. Hercules, *Direct TLC-MALDI Coupling Using a Hybrid Plate*, Anal. Chem. 72 (1999) 68-73.

[69] G. Morlock, U. Jautz, *Comparison of two different plunger geometries for HPTLC-MS coupling via an extractor-based interface*, J. Planar. Chrom. 21 (2008) 367-371.

[70] CAMAG, *The New TLC-MS Interface*, CBS 102 (2009).

[71] C. C. N'gaman Kohué, Y.-A. Békro, J. A. Mamyrbékova-Békro, A. Bénié, S. Gooré Bi, *Sur la Composition en Métabolites Secondaires et L'activité Anti-Oxydante D'extraits Bruts de Gmelina Arborea Roxb. (Verbanaceae) de Côte d'Ivoire, Afrique del'Ouest: Analyse par Chromatographie en Couche Mince*, Eur. J. Sci. Res. 36 (2009) 161-171.

[72] A. Toribio, *Développement de nouvelles approches méthodologiques en chromatographie de partage centrifuge en vue de la purification de molécules d'intérêt*. 2007, Université de Reims Champagne-Ardenne

[73] Z. F. Ahmed, A. M. Rizk, F. M. Hammouda, M. M. Seif El-Nasr, *Glucosinolates of egyptian Capparis species*, Phytochem. 11 (1972) 251-256.

[74] L.-Z. Lin, J. M. Harnly, *Identification of the phenolic components of collard greens, kale and chinese broccoli*, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 7401-7408.

[75] G. Kiddle, R. N. Bennett, N. P. Botting, N. E. Davidson, A. A. Robertson, R. M. Wallsgrove, *High-performance Liquid Chromatographic Separation of Natural and Synthetic Desulfoglucosinolates and their Chemical Validation by UV, NMR and Chemical Ionization-MS method*, Phytochem. Anal. 12 (2001) 226-242.

[76] J. T. Mehl, A. I. Gusev, D. M. Hercules, *Coupling protocol for thin layer chromatography/matrix-assisted laser desorption ionization*, Chromatographia 46 (1997) 358-364.

[77] R. M. Caprioli, T. B. Farmer, J. Gile, *Molecular imaging of biological samples : localization of peptides and proteins using MALD-TOF MS*, Anal. Chem. 69 (1997) 4751-4760.

[78] E. Sibille, K. Benlounes, F. Dupire, M. Matt, P. Chaimbault, *Study of the composition of broccoli florets and seeds by Thin Layer Chromatography and Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*, Montreux Symposium on LC-MS Lausanne (2013).

[79] R. D. Hall, *Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic*, New Phytol. 169 (2006) 453-468.

[80] Q. Tian, R. A. Rosselot, S. J. Schwartz, *Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts Brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*, Anal. Biochem. 343 (2005) 93-99.

[81] F. Lelario, G. Bianco, S. A. Bufo, T. R. I. Cataldi, *Establishing the occurrence of major and minor glucosinolates in Brassicaceae by LC–ESI-hybrid linear ion-trap and Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*, Phytochem. 73 (2012) 74-83.

[82] J. B. Bialecki, J. Ruzicka, C. S. Weisbecker, M. Haribal, A. B. Attygalle, *Collision-induced dissociation mass spectra of glucosinolate anions*, J. Mass Spectrom. 45 (2010) 272-283.

[83] T. R. I. Cataldi, F. Lelario, D. Orlando, S. A. Bufo, *Collision-Induced Dissociation of the A + 2 Isotope Ion Facilitates Glucosinolates Structure Elucidation by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry with a Linear Quadrupole Ion Trap*, Anal. Chem. 82 (2010) 5686-5696.

[84] N. Fabre, V. Poinsot, L. Debrauwer, C. Vigor, J. Tulliez, I. Fourasté, C. Moulis, *Characterisation of glucosinolates using electrospray ion trap and electrospray quadrupole time-of-flight mass spectrometry*, Phytochem. Anal. 18 (2007) 306-319.

[85] R. Jaiswal, T. Sovdat, F. Vivan, N. Kuhnert, *Profiling and Characterization by LC-MSn of the Chlorogenic Acids and Hydroxycinnamoylshikimate Esters in Maté (Ilex paraguariensis)†*, J. Agric. Food Chem. 58 (2010) 5471-5484.

[86] T. Mosmann, *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*, J. Immuno. Meth. 65 (1983) 55-63.

[87] G. Williamson, K. Faulkner, G. W. Plumb, *Glucosinolates and ohenolics as antioxydants from plant foods*, Eur. J. Cancer Prev. 7 (1998) 17-21.

ANNEXES

Annexe I

Production de protéines recombinantes CDC25-GST

Les protéines de fusion GST-CDC25 A et C sont obtenues après transformation d'une souche bactérienne de type *Escherichia coli* BL21 (DE3)pLys. Ces bactéries sont cultivées en milieu *Lysogeny broth* - Miller (LB) [10 g/L Bacto-tryptone, 5 g/L extrait de levure, 10 g/L NaCl, pH 7].

Après sélection du meilleur clone, les bactéries sont cultivées une nuit à 37°C sous agitation dans un petit volume (10 mL) de milieu SOB (Super Optimal Broth) qui contient de l'ampicilline à 50 µg/mL.

Matériel par clone à produire :

Milieu LB + ampiciline → 2 litres
Milieu SOB + ampiciline → 10mL
Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 200 mg/mL → 595µL
Tampon de lyse : Tris 50mM, NaCl 250mM, EDTA 1mM, Triton 0,1% → 100 mL **pH 7,5**
Tampon Tris A : 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT → 100 mL **pH 8**
PMSF : PMSF 0,3 M en DMSO → 10 µL
Cocktail Inhibiteur de Protéase (CIP) 3% dans phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) → 900 µL
Glutathion réduit 20 mM en tampon Tris A → 20 mL
Tampon Borate : 0,1 M borate, 0,5 M NaCl→ 100 mL
Tampon Acétate : 0,1 M Acétate de sodium, 0,5M NaCl→ 100 mL
Tampon NaCl : 1 M NaCl → 100 mL
Gel Agarose GSH : GSH-Agarose 70mg/mL → 3mL

Protocole :

Induction :

J1
1. Préculture : ensemencer 10mL de milieu SOB + ampicilline avec un fragment de clone congelé préalablement testé pour son activité GST, incuber une nuit à 37°C.

J2
2. Ensemencer 2 Litres de milieu LB + ampicilline avec la préculture, incuber à 37°C sous agitation jusqu'à obtention d'une D.O entre 0,4 et 0,6 UA à 600nm.
3. Induction de l'expression par 595µL d'IPTG à 200mg/mL pendant 5h à 30°C sous agitation.
4. Aliquoter en Corning de 50mL
5. Centrifuger les cellules à 4000 rpm pendant 15 min à froid.
6. Conserver les culots à **-80°C jusqu'à extraction**

Extraction :

J3
1. Reprendre le culot dans 30mL de tampon de lyse additionné de 10µL de PMSF et de 900µL de CIP à 3%.
2. Incuber 15 min.
3. Lyse du culot bactérien par sonication (5*30s) à 4°C
4. Aliquoter en microtubes
5. Centrifuger à 15 000rpm, 45 min à froid.
6. Récupérer le surnageant et **stocker à 4°C jusqu'à purification.**

Les protéines de fusion contenues dans le lysat bactérien sont extraites sur une colonne qui contient des billes d'agarose couplées à un résidu glutathion (GSH), substrat de la GST.

Préparation de la colonne GSH :

La veille :

1. Peser 210mG de gel GSH-Agarose et ajouter 42mL d'eau distillée. Laisser 30 min à température ambiante puis placer sous agitation lente une nuit à 4°C

Le jour même :

2. Rincer la colonne à l'eau distillée et la remplir avec du gel goutte à goutte.
3. Laver l'appareil Biologic LP basse pression 30 min avec de l'eau 1 mL/min
4. Allumer la pompe et rincer la colonne 15 min avec de l'eau distillée (1 mL/min)
5. Saturer la colonne avec NaCl 1 M 10 min à 1 mL/min

Purification :

1. Equilibrer la colonne 25 min à 1 mL/min de tampon de lyse
2. Faire s'écouler le surplus de tampon, mettre les 10 mL d'échantillon directement dans la colonne, puis brancher en circuit ouvert jusqu'à ce que l'absorbance UV augmente.
3. Fermer le circuit, sortir la colonne et homogénéiser gel+ échantillon
4. Incuber sur la colonne pendant 3h au frais et homogénéiser régulièrement
5. Laver la colonne avec du tampon de lyse 1mL/min pendant 15 min
6. Laver la colonne avec du tampon Tris A 1mL/min pendant 15 min
7. Vider le système en amont de la colonne et y mettre la GSH 20 mM dans le tampon Tris A
8. Eluer la protéine de fusion par ajout de 10 mL de GSH 20 mM dans le tampon Tris A directement dans la colonne, faire circuler à 1 mL/min pendant 15-20 min en récupérant l'éluat par fractions de 1 mL (mode collecteur sur le caroussel)
9. Tester l'activité des fractions dans la journée et les aliquoter.
10. Stocker à -80°C les protéines ainsi purifiées.

RQ : régénérer la colonne et la stocker à 4°C en vue d'une réutilisation.

1. Laver avec du tampon borate 1mL/min pendant 15 min
2. Laver avec H_20 1mL/min pendant 15 min
3. Laver avec du tampon acétate 1 mL/min pendant 15 min
4. Laver avec H_20 1mL/min pendant 15 min
5. Saturer la colonne en tampon NaCl 1mL/min pendant 15 min

J4

L'activité de chacune des fractions est évaluée, ainsi que leur pureté et leur concentration protéique. La meilleure fraction est ensuite aliquotée en petits volumes puis stockée à -80°C jusqu'à utilisation.

Annexe II

Dosage de la concentration des protéines CDC25s par la méthode de Lowry

Principe : cette méthode utilise la fixation aux protéines de deux composés, le réactif de biuret contenant du sulfate de cuivre $CuSO_4$ et le réactif de Folin et Ciocalteu. Ces deux composés forment un complexe quasi-instantanément, en particulier avec les acides aminés aromatiques et les résidus cystéine des protéines. Une coloration bleue apparait après fixation aux protéines. L'intensité de cette coloration est mesurée à 660 nm.

1. **Réactif du biuret modifié :**
   - Solution A de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 2 % dans NaOH 0,1 N ;
   - Solution B de tartrate de sodium et de potassium ($C_4H_4KNaO_6$) à 2 % dans H_2O ;
   - Solution C de sulfate de cuivre ($CuSO_4$) à 1 g/L.

Mélanger extemporanément les volumes appropriés dans les proportions suivantes :

10 mL de A + 0,25 mL de B + 0,1 mL de C

2. **Réactif de Folin et Ciocalteu :**

Solution à diluer au préalable au ¼ dans H_2O distillée.

3. **Solution stock de protéines :**
   - Solution d'albumine sérique bovine (SAB) à 1 g/L dans H_2O distillée ;
   - Solution d'albumine sérique bovine (SAB) Contrôle dans H_2O distillée.
   - Solutions de protéines CDC25s à doser.

Mode opératoire :

[SAB] $_{finale}$ (µg/mL)	0	5	10	15	20	25	Contrôle	Essai
Eau distillée (µL)	100	95	90	85	80	75	20	100-X
SAB à 1 g/L ou échantillon (µL)	0	5	10	15	20	25	80	X
Réactif du biuret	0,8 mL							
Homogénéiser et incuber 5 minutes à température ambiante								
Réactif de Folin	0,1 mL							
Homogénéiser et incuber 20 minutes à l'obscurité et à température ambiante								

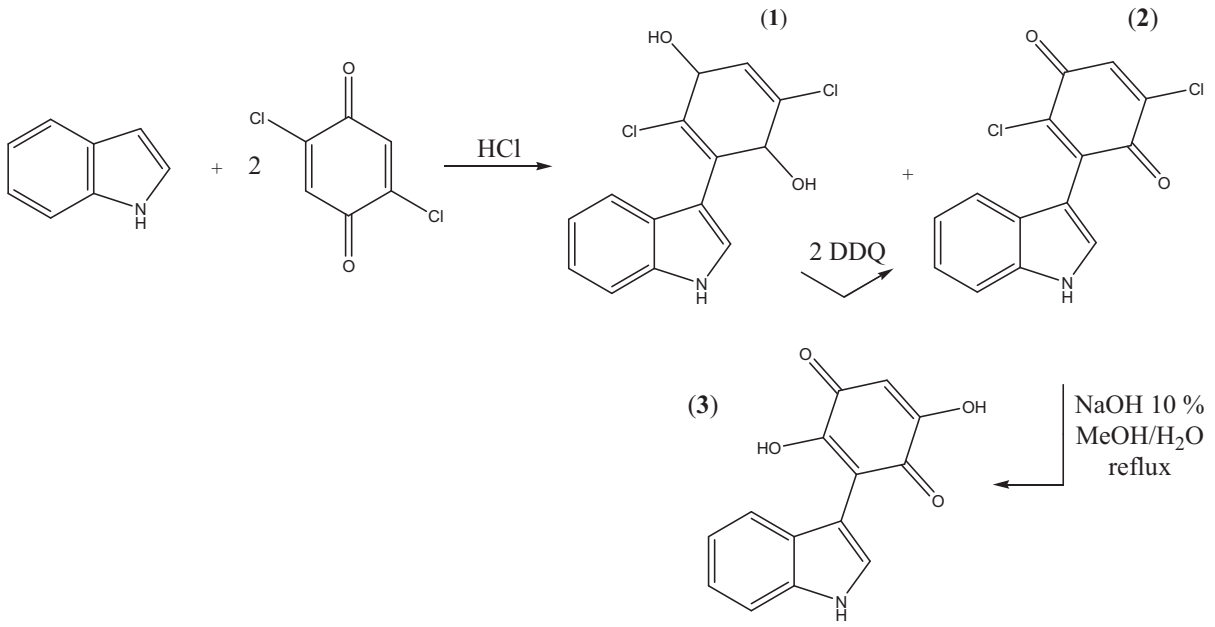
Mesurer l'absorbance à 660 nm.

Annexe III

Synthèse du 2,5-dihydroxy-3-(1H-indol-3-yl)[1-4]benzoquinone

La synthèse de ce composé a été décrite par Pirrung *et al* en 2002[1].

- Condensation de 1 équivalent d'indole avec 2 équivalents de 2,5-dichloro-quinone, en présence de 1 équivalent d'acide chlorhydrique (HCl) pendent 10 h à température ambiante. Obtention de la 2,5-dichloro-3(indol-3-yl)[1,4]hydroquinone (**1**) et de la 2,5-dichloro-3(indol-3-yl)[1,4]benzoquinone (**2**) ;
- Oxydation de (**1**) en (**2**) par un excès de dichlorodicyanobenzoquinone (DDQ, 2 équivalents) pendant 2 à 4 h ;
- Hydrolyse de (**2**) en 2,5-dihydroxy-3(indol-3-yl)[1,4]benzoquinone (**3**) en ajoutant NaOH 10 % à une solution chaude de (**2**) dans du méthanol et chauffage à reflux pendant 20 à 30 minutes (concentration finale 0,02 M).

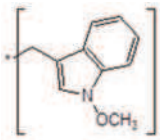
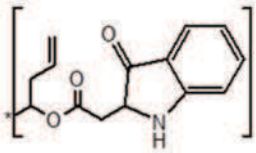
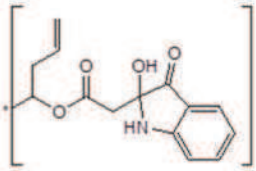
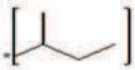
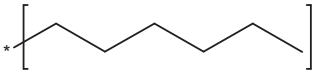
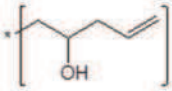
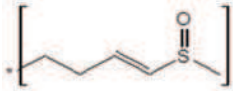


[1] M. C. Pirrung, L. Deng, Z. Li, K. Park, *Synthesis of 2,5-Dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinones by Acid-Catalyzed Condensation of Indoles with 2,5-Dichlorobenzoquinone*, J. Org. Chem. 67 (2002) 8374-8388.

Annexe IV

Tableau non exhaustif des principaux glucosinolates référencés dans le brocoli et autres végétaux.

Nom Chimique	Nom trivial	R	Formule brute	Masse	
2-propenyl	Sinigrine		$C_{10}H_{16}NO_9S_2^-$	358.027	Principaux glucosinolates identifiés dans le brocoli
3-butenyl	Gluconapine		$C_{11}H_{18}NO_9S_2^-$	372.043	
2(*R*)-2-hydroxy-3-butenyl	Progoitrine		$C_{11}H_{18}NO_{10}S_2^-$	388.038	
3-(methylthio)propyl	Glucoiberverine		$C_{11}H_{20}NO_9S_3^-$	374.059	
3-(methylsulphinyl)propyl	Glucoiberine		$C_{11}H_{20}NO_{10}S_3^-$	422.025	
4-(méthylsulphinyl)-butyl	Glucoraphanine		$C_{12}H_{22}NO_{10}S_3^-$	436.041	
5-(methylsulphinyl)pentyl	Glucoalyssine		$C_{13}H_{24}NO_{10}S_3^-$	450.057	
4-(methylthio)butyl	Glucoerucine		$C_{12}H_{22}NO_9S_3^-$	420.046	
2-phenylethyl	Gluconasturtiine		$C_{15}H_{20}NO_{10}S_2^-$	438.053	
4-hydroxybenzyl	Sinalbine		$C_{14}H_{18}NO_{10}S_2^-$	447.053	
Indol-3-ylmethyl	Glucobrassicine		$C_{16}H_{19}N_2O_9S_2^-$	424.038	
4-methoxyindol-3-ylmethyl	4-methoxy-glucobrassicine		$C_{17}H_{21}N_2O_{10}S_2^-$	477.064	

1-methoxyindol-3-ylmethyl	Neoglucobrassicine		$C_{17}H_{21}N_2O_{10}S_2^-$	477.064
2,3-dihydro-2-oxo-1*H*-indol-3-yl acetate	Glucoisatisine		$C_{21}H_{25}N_2O_{12}S_2^-$	561.085
2,3-dihydro-3-hydroxy-2-oxo-1*H*-indol-3-yl acetate	3'-hydroxy-glucoisatisine		$C_{21}H_{25}N_2O_{13}S_2^-$	577.080
1-methylethyl	Glucoputranjivine		$C_{10}H_{19}NO_9S_2^-$	360.043
1-methylpropyl	Glucochlearine		$C_{11}H_{20}NO_9S_2^-$	374.059
4-pentenyl	Glucobrassicanapine		$C_{12}H_{20}NO_9S_2^-$	386.059
n-hexyl-glucosinolate	Glucoraphasativusaine		$C_{13}H_{24}NO_9S_2^-$	402.090
2-hydroxy-4-pentenyl	Gluconapoleiferine		$C_{12}H_{20}NO_{10}S_2^-$	402.053
4-methylsulphinyl-3-butenyl	Glucoraphenine		$C_{12}H_{20}NO_{10}S_3^-$	434.025
5-(methylthio)pentyl	Glucoberteroine		$C_{13}H_{24}NO_9S_3$-	434.062

Annexe V

Appareillage MALDI-TOF/TOFMS

Les analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF sont réalisées avec un appareil Ultraflex III (Bruker Daltonic), équipé d'un laser « Smartbeam » de longueur d'onde 355 nm. Utilisé en mode LIFT™, cet appareil permet de réaliser des analyses de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) et donc d'obtenir des informations structurales supplémentaires sur les composés analysés. Ce mode de fragmentation est basé sur l'augmentation de l'énergie cinétique entre l'ion précurseur et le plus petit ion fragment jusqu'à un niveau de différence d'énergie n'excédant pas 30%. Dans ce cas, tous les ions fragments peuvent être détectés simultanément avec l'ion précurseur. Plus précisément, l'énergie laser est d'abord augmentée de manière à provoquer la fragmentation des ions lors du tir laser. L'ion précurseur d'intérêt et ses fragments associés sont alors sélectionnés dans la zone PCIS (precursor ion selector, **Figure 1**) utilisée comme filtre de masse. Les ions arrivent alors dans la chambre « LIFT » placée juste derrière la zone PCIS, dans laquelle ils se séparent suite à une phase d'accélération. Une seconde unité de déviation (PLMS : post lift metastable suppressor) située entre le LIFT et le réflecteur permet d'éjecter les ions fragmentés après la procédure LIFT, permettant ainsi seulement l'analyse des ions fragmentés sélectionnés.

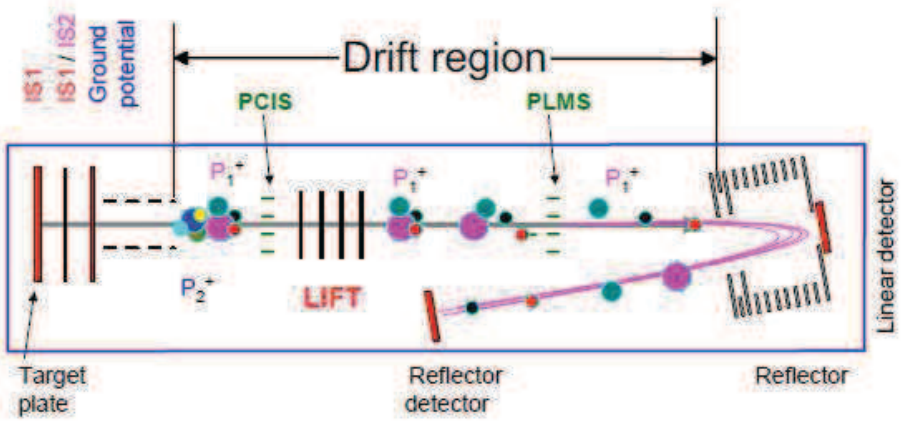


Figure 1 : Schéma de l'appareil Ultraflex III TOF/TOF[1]

Les dépôts sur la plaque MALDI sont réalisés par la méthode de la goutte sèche : 1 µL d'analyte d'extrait) est déposé sur la plaque, puis 1 µL de matrice est déposé par-dessus et est mélangé à

[1] Ultraflex III : User Manual.

l'analyte par plusieurs cycles d'aspiration-refoulement à la micropipette. Les matrices utilisées sont (i) la 2,5-DHB à 1 M dans une solution de ACN/H_2O 50:50 v/v ajustée à 0,1% TFA pour l'analyse en mode positif et (ii) la 9-AA à 7 mg/mL dans une solution de 100% MeOH pour l'analyse en mode négatif. Afin de calibrer notre appareil, nous avons utilisé les pics monoisotopiques d'une solution de TFA à 10^{-3}M pour la calibration en mode négatif, soient $[(CF_3COO)_2Na]^-$ = 248.960, $[(CF_3COO)_3Na_2]^-$ = 384.935, $[(CF_3COO)_4Na_3]^-$ = 520.910, $[(CF_3COO)_5Na_4]^-$ = 656.884, $[(CF_3COO)_6Na_4]^-$ = 792.859 et $[(CF3COO)_7Na_5]^-$ = 928.834. Une solution de berbérine, d'amiodarone et de vinblastine a été utilisée pour la calibration en mode positif. La calibration s'est faite sur les pics monoisotopiques de $[2,5DHB+H]^+$ = 155,034, $[Berbérine+H]^+$ = 336,123, $[Amiodarone+H]^+$ = 646,031 et $[Vinblastine+H]^+$ = 811.428. La calibration est considérée comme acceptable lorsque l'erreur moyenne est inférieure à 15 ppm.

Bibliographie :

[1] B. Daltonics, *Ultraflex III : User Manual*. 2006.

PUBLICATIONS

Analytical Biochemistry 430 (2012) 83–91

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabio

Development of a matrix-assisted laser desorption/ionization–mass spectrometry screening test to evidence reversible and irreversible inhibitors of CDC25 phosphatases

E. Sibille [a], E. Bana [b,c], W. Chaouni [c], M. Diederich [b], D. Bagrel [c], P. Chaimbault [a,*]

[a] Laboratoire de Chimie et Physique–Approche Multi échelle des Milieux Complexes (LCP–A2MC), Institut Jean Barriol, Université de Lorraine, F-57078 Metz, France
[b] Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC), Hôpital Kirchberg, L-2540 Luxembourg, Luxembourg
[c] Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique (LIMBP), Institut Jean Barriol, Université de Lorraine, F-57078 Metz, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 May 2012
Received in revised form 26 July 2012
Accepted 8 August 2012
Available online 16 August 2012

Keywords:
Screening test
MALDI–MS
CDC25 phosphatases
Inhibition

ABSTRACT

The cell division cycle 25 phosphatases (CDC25s) are key regulators of the physiological cell cycle progression. Their overexpression has been reported in a significant number of cancers, and their inhibition appears to be an interesting strategy for treatments. We propose here a rapid screening test allowing the detection of reversible and irreversible CDC25A and -C inhibitors. The test is based on the incubation of the candidate molecules with the human CDC25 proteins followed by an ultrafiltration step. The retentate is then directly analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI–TOFMS) to detect reversible inhibitors or submitted to peptide mass fingerprint (PMF) analysis to reveal irreversible inhibitors covalently bound to the protein active site. After its validation, the protocol is applied to the detection of a novel candidate inhibitor of CDC25s named SV37. The screening procedure, as well as the preliminary biological results, demonstrates that this compound behaves as a reversible inhibitor.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Discovered by Russell and Nurse during the 1980s, the cell division cycle 25 phosphatases (CDC25s)[1] are key regulators of the cell division cycle. In mammalians, three CDC25 isoforms labeled A, B, and C were identified [1,2]. Each isoform is encoded by a specific gene that can generate several splice variants. The CDC25 proteins comprise a regulatory domain and a catalytic one containing the active site HCX_5R [3]. CDC25s activate their substrates (cyclin-dependent kinases, CDKs) by dephosphorylation and, consequently, allow the progression of the cell cycle [4]. Thus, CDC25s are regulators of the cell division [5], and their overexpression has been observed in several cancers [6,7] (e.g., lung, breast, ovarian [8–10]). Therefore CDC25s became attractive targets for anticancerous therapy by inhibiting their activity.

A limited number of potent inhibitors have been discovered so far. They can be classified into two categories depending on their behavior: reversible and irreversible inhibitors. Few of the reversible inhibitors have been evidenced. Most of them belong to the family of indolyl-1,4-hydroxyquinones [11], but some 1,2-hydroxyquinones may also be active. For example, 10 to 30 μM of the 1,2-hydroxyquinone named 5169131 inhibits CDC25B, causing G1/S and G2/M arrest [12].

Irreversible inhibitors inhibit the CDC25s' active site through a covalent modification of the active site or an oxydation of the catalytic cystein [11,13,14]. Consequently the target proteins are definitely inactivated and the cell proliferation is efficiently slowed down. In this way, menadione (vitamin K3), NSC663284, caulibugulones, and BN82002 were found to irreversibly inhibit CDC25s [13,15–17].

Evidencing new drugs that may be potential inhibitors of a given target is very often laborious and time-consuming. It is indeed necessary to verify whether the in vitro observed inhibition of a purified protein is confirmed by assays in cellular systems [18,19] and by in vivo experimentations [20]. Thus, there is a real need for a rapid screening procedure allowing a fast identification of potential inhibitors. Previous studies led by Hannewald and coworkers come to the development of a screening test that evidences active compounds against two cancerous targets: tubulin and dihydrofolate reductase (DHFR) [21,22]. In the first mentioned article, potential inhibitors of microtubule assembly (e.g., vinblastine, vincristine) are discriminated from other compounds thanks

* Corresponding author. Fax: +33 3 87 31 58 51.
E-mail address: patrick.chaimbault@univ-lorraine.fr (P. Chaimbault).

[1] *Abbreviations used:* CDC25, cell division cycle 25; CDK, cyclin-dependent kinase; MALDI–TOFMS, matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry; LC, liquid chromatography; ESI, electrospray ionization; MS/MS, tandem MS; TOF/TOF, tandem TOF; CHCA, α-cyano-4-hydroxycinnamic acid; DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid; FTICR, Fourier transform ion cyclotron resonance; TFA, trifluoroacetic acid; SA, sinapinic acid; S/N, signal/noise; PMF, peptide mass fingerprint; MW, molecular weight; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; LDI, laser desorption ionization.

0003-2697/$ - see front matter © 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.08.006

to their high affinity for tubulin. The ligand–target protein complex is then submitted to matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI–TOFMS). Reversible inhibitors are weakly bonded to the target, and the laser energy is sufficient to break the complex during the ionization process. Then, the ligand is detected in positive ion mode as a protonated molecular ion. However, this screening procedure is able to reveal only noncovalent inhibitors. Covalent inhibitors remain bonded to the target protein and are not detected.

As already mentioned, most CDC25 active inhibitors are described as irreversible inhibitors. Therefore, the protocol previously described needs to be extended to the detection of this type of inhibitors. In 2002, Pu and coworkers published an interesting work proving in two steps that NSC663284 is covalently bound to the CDC25A catalytic domain [23]. First, they identified the covalent complex by MALDI–TOFMS thanks to an unresolved shoulder mass peak emerging from the $[M+H]^+$ signal of the CDC25A catalytic domain. However, the mass accuracy of such an experiment is very low (mean errors ~30–50 Da). Then, to identify the accurate mass of the reaction adduct, the authors proceeded with a 50-min microcapillary liquid chromatography (LC)–electrospray ionization (ESI)–MS run after an in-gel digestion (trypsin) of the CDC25A catalytic domain. After additional tandem MS (MS/MS) experiments, they finally determined the exact nature of the chemical reaction between NSC663284 and the CDC25A active site. Moreover, they showed that NSC663284 is covalently bound to the Ser114 of the CDC25A catalytic domain. Nevertheless, this procedure appears to be time-consuming and complex in the framework of a screening test. MALDI–TOFMS remains a technique of choice for the development of a rapid screening test even for covalent complexes. For example, Kato and coworkers used MALDI and post-source decay–MALDI–TOFMS to assess peptide binding to predict skin sensitization [24]. In their study, they used glutathione as a probe for the detection of conjugates with chemicals. Similarly, Soares and coworkers evidenced the covalent binding of 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J2 to PPARγ receptors by comparing MALDI–TOF mass spectra with and without the presence of ligand [25]. Lately, Brisson and coworkers used MALDI–TOF and tandem TOF (TOF/TOF)–MS experiments to show the ability of some quinoleinediones to irreversibly oxidize the catalytic cystein of CDC25B. Their results are supported by the detection of the fragment corresponding to the sulfonic acid form (Cys-SO_3^-) of the catalytic site [14].

In this article, we present the development of a screening test evidencing the potential activity of reversible, as well as irreversible, inhibitors of CDC25A and -C phosphatases starting from a sole incubation protocol. This screening test combining the two MALDI–MS approaches mentioned above is also evaluated for a rapid highlight of a new candidate molecule for CDC25 inhibition.

Materials and methods

Chemicals and reagents

High-performance liquid chromatography (HPLC)-grade acetonitrile, ethanol, and methanol were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Ultrapure water was obtained from a Simplicity Personal Ultrapure water system (Millipore, Molsheim, France). BN82002, amiodarone, and NSC663284 were purchased from Sigma–Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), and their purities were ⩾97%, 99%, and ⩾98%, respectively. The 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone was synthesized according to Pirrung et al. [26]. CDC25A and -C were produced and purified at a laboratory according to the protocol published by Brault and Bagrel in 2008 [18]. α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) and 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) were obtained from Sigma–Aldrich.

MALDI–TOFMS and MALDI–FTICRMS analyses

MALDI–TOFMS analyses were carried out on a Bruker Reflex IV TOF mass spectrometer (Bruker Daltonic, Bremen, Germany) equipped with the SCOUT 384 probe ion source fitted with a nitrogen pulsed laser (337 nm, model VSD-337ND, Laser Science, Boston, MA, USA). The laser output energy was 400 μJ/pulse. Two different modes of analysis were used. The linear mode was used for high-mass analyses (m/z 1–20 kDa). Positive ions were accelerated without any extraction delay at a 20-kV acceleration voltage. The reflectron mode was used for low masses (m/z 0–5000 Da). The reflector voltage was 23 kV. Positives ions were accelerated with a 200-ns extraction delay. Mass spectra were manually acquired using FlexControl software (Bruker Daltonic) by accumulating four series of 100 laser shots.

MALDI–Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR)–MS analyses were carried out on an IonSpec mass spectrometer (Varian, Palo Alto, CA, USA) fitted with a 9.4 T shielded magnet. The external ProMALDI source was equipped with an Nd:YAG laser at 355 nm (third frequency, New Wave Research, Fremont, CA, USA). After ionization, positives ions were stored in a hexapole, transferred in the FTICR cell through the ion guide, and then analyzed. All mass spectra were manually acquired with Omega software in Wizard mode (Varian). Approximately 35 laser shots were averaged with laser energy at 17% of the laser output maximum.

Two matrices were used for MALDI analyses: (i) a 1-M DHB solution (Sigma–Aldrich) in 50% acetonitrile and 0.1% of trifluoroacetic acid (TFA) (Merck, Darmstadt, Germany) and (ii) a saturated sinapinic acid (SA) solution (Sigma–Aldrich) in 50% acetonitrile and 10% formic acid (VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). All of the depositions were performed using the dried droplet method. After the screening step, the protein–inhibitor complex was concentrated and desalted using C18 resin pipet tips (ZipTip, Molsheim, France). The ZipTip was first equilibrated with 10 μl of acetonitrile and then washed three times with 10 μl of a mixture composed of acetonitrile/water/TFA (50:50:0.1, v/v/v) and four times with 10 μl of an aqueous solution acidified with 0.1% TFA. Next, 5 μl of the sample was adsorbed on the ZipTip (five aspirate dispense cycles) and then washed four times with 10 μl of 0.1% TFA. The sample was eluted using 4 μl of acetonitrile/water/TFA (50:50:0.1, v/v/v).

External calibration was done using DHB matrix peaks and a mixture of standard peptides (Bruker Daltonic). The following monoisotopic peaks were used: m/z 155.034 ($[DHB + H]^+$), m/z 757.400 (bradykinin), m/z 1046.542 (human angiotensin II), and m/z 1533.860 ($P_{14}R$). The calibration was successful if the root mean square (RMS) error was in the range of ±1 to 2 ppm and ±10 to 15 ppm for FTICRMS and TOFMS, respectively. Digest mass spectra were internally calibrated with two trypsin autolytic peaks: m/z 842.510 (VATVSLPR) and m/z 2211.104 (LGEHNIDVLEGNEQFINAAK).

Tryptic digestion and protein identification by PMF analysis

A solution of 0.2 μg/μl commercial trypsin (V5111, Promega, Madison, WI, USA) was prepared in the trypsin buffer. The solution was then diluted to obtain a final enzyme/protein ratio of 1:10, and CDC25s were digested overnight at 37 °C. The digests were then analyzed by MALDI–FTICRMS using DHB matrix. Peaks in the 400 to 4000 m/z range with a signal/noise (S/N) ratio greater than 3 were considered and reduced to files containing peak lists (FTDOC version 4.1.54, Varian) and used for the database search. The

MASCOT search engine was used for interpretation of peptide mass fingerprint (PMF) data with the SwissProt database (2012_02, 534,695 sequences, 189,667,883 residues) without any taxonomy, p*I*, or molecular weight (MW) restrictions. One possible missed cleavage for trypsin digestion was allowed. Identifications were validated when at least six peptides were matched with an error lower than 10 ppm, as recommended for FTICRMS [27]. A score greater than 70 was considered as significant ($P < 0.05$).

Screening protocol

The screening of CDC25 inhibitors is presented in Fig. 1. The first step (1) of the protocol consisted in incubating the target protein (CDC25A or C) with the evaluated compound. This compound was dissolved in ethanol at a concentration of 10^{-2} M and then diluted in ultrapure water (18 M Ω to a final concentration of 2×10^{-3} M). CDC25 phosphatases were solubilized in Tris A buffer (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], and 1 mM dithiothreitol [DTT], pH 8.0) at a concentration of approximately 8×10^{-5} M for isoform A and 2×10^{-5} M for isoform C. Then, 30 μl of CDC25A or 50 μl of CDC25C was incubated with 10 μl of the evaluated compound for 1 h.

The second step (2) was designed to separate unbound species from bound species through a centrifugation step. The incubating solution was introduced into the reservoir of a Microcon centrifugal filter unit with a mass cutoff of 30 kDa (Millipore). The filter was centrifuged for 8 min at 12,000 rpm and then washed by adding 100 μl of ultrapure water. Three washings are sufficient to remove all unbound species [21]. CDC25s and potential protein–ligand complexes were retained by the membrane (retentate). The retentate is dissolved with 20 μl of ultrapure water and desalted using ZipTip C18. Depending on the nature of the tested molecules, the analytical step was divided into two parts. During the third step (3), 1 μl of this solution (desalted retentate) was directly analyzed in MALDI–TOFMS with DHB matrix in low mass ($0 < m/z < 4000$) to evidence potential noncovalent ligands and with SA matrix in higher mass ($m/z > 10{,}000$ Da) in order to check the presence of the protein. The last step (4) consisted in the digestion of CDC25 or the CDC25–ligand covalent complex by trypsin. The digestion was performed as described by Da Silva et al. [28]. The digest was analyzed in MALDI–FTICRMS as described above.

Biological evaluation

These evaluations were performed on recombinant human CDC25s [18]. CDC25 phosphatase activity was evaluated in vitro by the fluorimetric method described previously [29]. Briefly, the assay was performed in 96-well plates in buffer (50 mM Tris–HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.1% Bovine Serum Albumine, pH 8.1) containing 3-*O*-methylfluorescein phosphate as substrate. After 2 h at 30 °C, 3-*O*-methylfluorescein fluorescent emission was measured with CytoFluor 4000 (Perseptive Biosystems, Framingham, MA, USA). Inhibition tests were performed in triplicate by preliminary incubation of inhibitors with the enzyme (20 min) before assessing activity. Results are expressed as the percentage of residual activity of CDC25 phosphatase. The compound concentrations inhibiting 50% of enzyme activity (IC_{50}) were evaluated by using a nonlinear approximation model based on the least squares method.

To assess the reversible/irreversible fixation mode of a compound in vitro, a previously described dilution method [11] was applied. Briefly, the recombinant enzymes were incubated with a strong inhibitory concentration of compound for different times and then diluted to obtain a final weak inhibitory concentration. Activity was then measured by fluorimetry.

Results and discussion

Regarding the potential inhibition of CDC25 phosphatases, the candidate molecules can be divided into three categories: (i) the inactive compounds, (ii) the reversible inhibitors, and (iii) the irreversible inhibitors. Obviously, the forthcoming screening protocol must deal with each category. Moreover, the inactive compounds must behave specifically toward the analytical procedure and must not interfere with the two categories of inhibitors. Thus, to validate the screening test, it is necessary to evaluate a negative control (i.e., a molecule that has no interaction with the target protein). Like Hannewald and coworkers [21,22], the chosen compound is amiodarone (Fig. 2A), an antiarrhythmic agent.

Screening of reversible inhibitors

As mentioned previously, there are only a few described reversible inhibitors for CDC25 phosphatases. Moreover, they are not

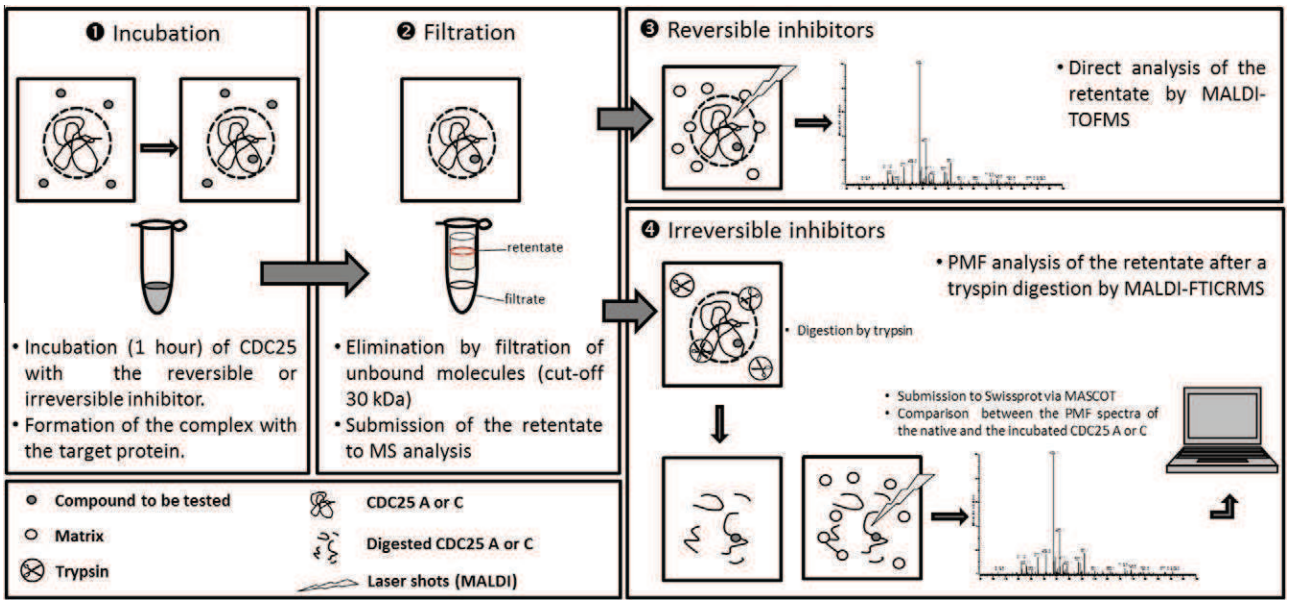


Fig.1. Principle of the screening protocol.

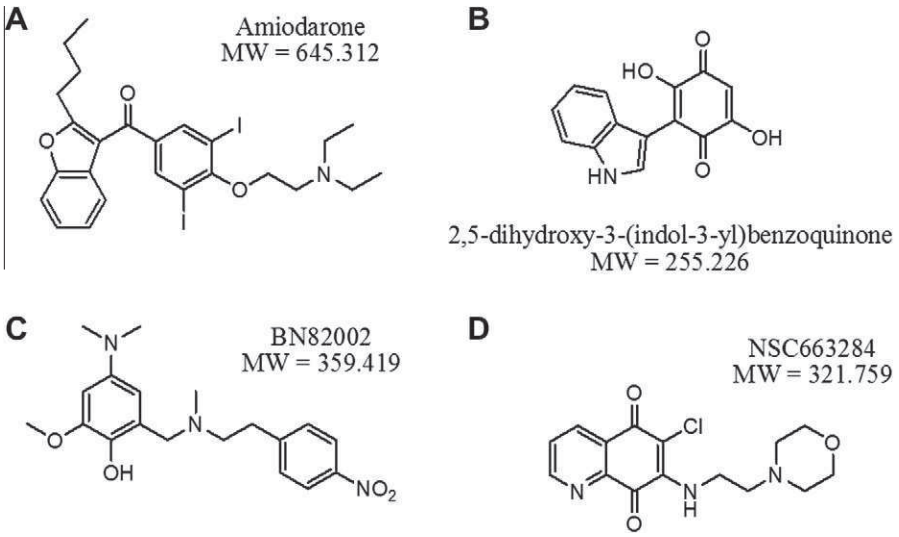


Fig.2. Structures and molecular weights of the tested compounds: (A) amiodarone; (B) 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone; (C) BN82002; and (D) NSC663284.

commercially available. Among them, 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone ($C_{14}H_8O_4N$; see Fig. 2B) was synthesized to develop and validate the screening procedure.

Targeted proteins are put in contact with an excess of 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone. The incubation medium is ultrafiltered using a 30-kDa cutoff Microcon unit. For reversible inhibitors, it is expected that the sample reservoir is retaining the noncovalent complex formed by the target protein and the ligand [19]. Then, 1 μl of the retentate is analyzed by MALDI–TOFMS with DHB. Because the ligand–target protein is a weak complex in this case, the laser energy is sufficient to break the complex during the ionization step. Consequently, the reversible inhibitor is detected by its protonated molecular ion ($[M+H]^+$) in the mass spectrum in positive mode or as its deprotonated molecular ($[M-H]^-$) in negative mode.

2,5-Dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone can be detected either in positive ion mode at *m*/*z* 256.1 (Fig. 3B) or in negative mode at *m*/*z* 254.1 (data not shown). However, negative ion mode is approximately 10 times less sensitive than positive mode and, thus, is not compatible with the concentration of the inhibitor that remains bound to CDC25s after the ultrafiltration step. Consequently, positive ion mode is selected for the detection. The results obtained after the screening procedure with CDC25A and -C are displayed in Fig. 3C and D, respectively. As expected for a reversible inhibitor, the signal corresponding to its protonated molecular ion (*m*/*z* 256.1) is observed with an S/N ratio of 20. Its isotopic pattern does not look good because the peak at *m*/*z* 257.1 is much too intense. This is due only to an interference (Fig. 3A) observed with the matrix DHB. This hypothesis has been checked in FTICRMS of which resolution is able to distinguish both ions at *m*/*z* 257.0638 for 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone containing one ^{13}C and at *m*/*z* 257.0683 observed for the interference (see Fig. S1 of the supplementary material). To avoid the interference at *m*/*z* 257, the matrix CHCA is evaluated but the ionization of the 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone is unsuccessful. The daily recrystallization of a matrix is a somewhat burdensome, but it can be an efficient way in which to remove some impurities. With freshly recrystallized DHB, there are still some impurities but the isotopic pattern of the 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone is correct even if the baseline remains a little bit disturbed (see Fig. S2 of the supplementary material). This last result confirms the hypothesis of an impurity for ion at *m*/*z* 257.1.

Amiodarone, BN82002, and NSC663284 (Fig. 2) are never observed in such conditions, raising three hypotheses: (i) the ultrafiltrate device has been damaged during the protocol, (ii) the molecule is not a natural ligand of the target protein (e.g., amiodarone), and (iii) the candidate molecule is covalently bound to the target (e.g., BN820002, NSC663284).

The first hypothesis can easily be checked. When the retentate is analyzed by MALDI–TOFMS with SA as a matrix in linear mode, the $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, and $[M+3H]^{3+}$ ions can be observed for CDC25A and -C. The dimer ion $[2\ M+H]^+$ is also present for CDC25C. This kind of result confirms that the proteins are well retained on the membrane.

From this point, we can conclude that the test is able to screen reversible inhibitors. However, to resolve the two other hypotheses, the protocol needs to be completed.

Screening of irreversible inhibitors

BN82002 and NSC663284 (Fig. 2C and D) are described in the literature as irreversible inhibitors of CDC25 proteins [23,30]. NSC663284 binds the CDC25A catalytic site thanks to Ser434 (corresponding to Ser114 for Pu and coworkers, who studied only the catalytic site). Although BN82002 is given as an irreversible inhibitor (with an IC_{50} in the micromolar range), the exact way in which this compound inhibits the CDC25 proteins remains unclear. Both compounds have been used as a reference for the development of this part of the test.

When the CDC25A and -C phosphatases are incubated with BN82002, direct mass spectra of the retentate (Fig. 4A and B) do not exhibit the protonated molecular ion of the inhibitor. Similar results were obtained for NSC663284 (data not shown). However, the detection of small molecules in complex samples often undergoes signal suppression. To discard this hypothesis, the same amount of BN82002 is spiked with some denatured CDC25A and directly analyzed (without ultrafiltration) by MALDI–TOFMS. As shown in Fig. 4C, the $[M+H]^+$ ion corresponding to BN82002 effectively appears on the mass spectra, discarding the hypothesis of signal suppression. Furthermore, this experiment shows that BN82002 is not able to bind CDC25A when this protein is denatured. Finally, CDC25A and -C have been incubated with increasing amounts of BN82002. After the ultrafiltration step, the filtrate is analyzed by MALDI–TOFMS. Results are presented in Fig. 5. As long

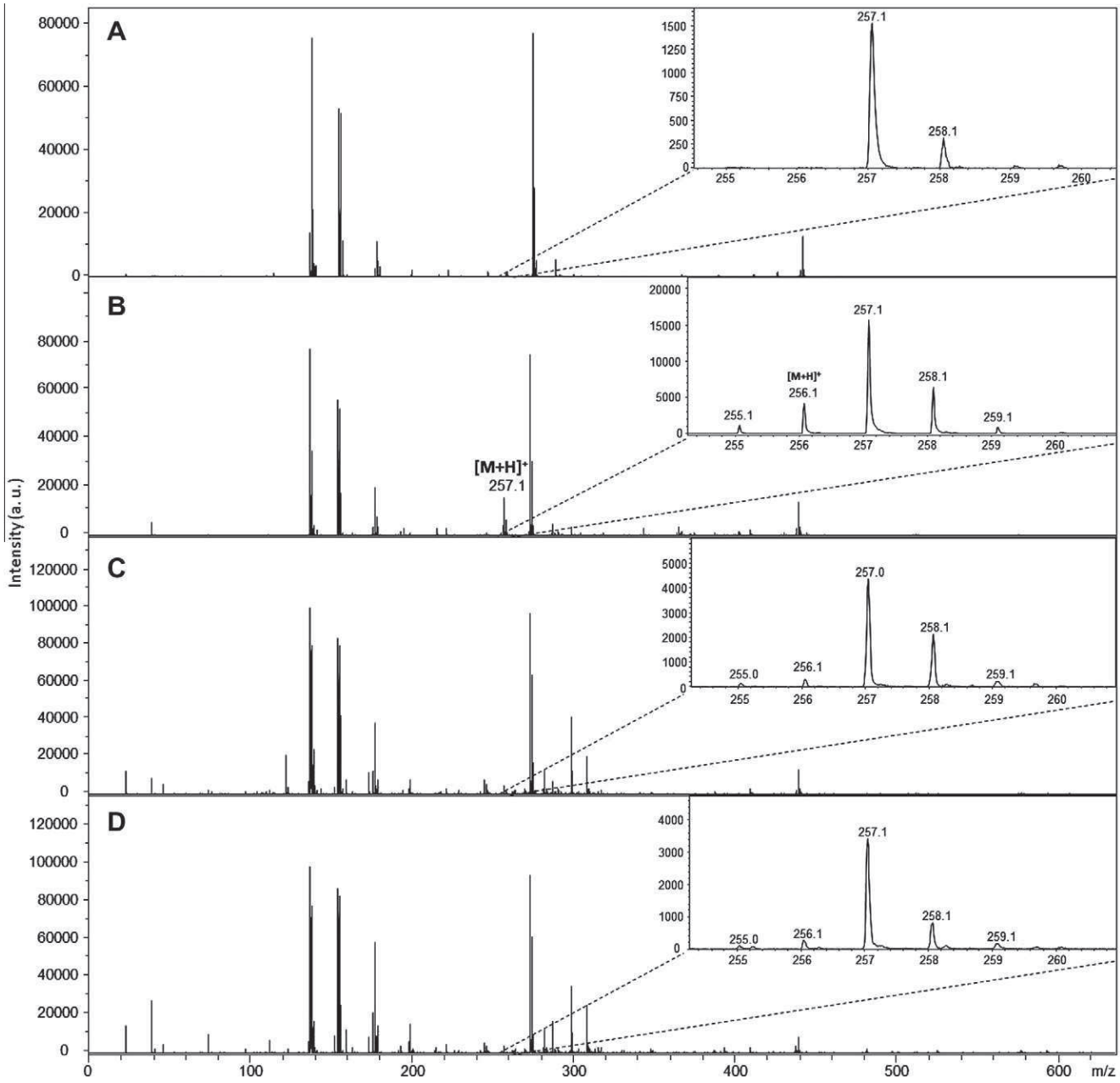


Fig.3. (A and B) MALDI–TOF mass spectra (reflectron mode) of DHB matrix (A) and 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone (DHB matrix, C = 5 × 10^{-4} M) (B). (C) Direct analysis of CDC25A screened with 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone. (D) Direct analysis of CDC25C screened with 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone.

as the ratio of target protein versus inhibitor does not reach 1:1, no BN82002 is evidenced in the filtrate. For a higher ratio, the excess is detected and the higher the concentration of BN82002, the higher the MS signal. Thus, the excess of inhibitor is well eliminated from the retentate during the washing procedure.

All of these experiments are in a good agreement with the formation of a covalent bond between the target protein and the two inhibitors, but they are not sufficient to demonstrate this hypothesis. Indeed, no amiodarone is detected in the retentate because it is eliminated during the washing step and, finally, this negative control compound behaves as BN82002 and NSC663284 in excess.

To determine whether a given compound is covalently linked to the target protein or not, a digestion of the retentate is performed with trypsin. Then, the digest is analyzed by PMF using MALDI–FTICRMS. The high mass accuracy measurement of FTICRMS is used here to improve the confidence of the submitted data. Indeed, by measuring *m*/*z* ratio with accuracy in the ppm range, FTICRMS significantly increases the reliability of PMF analyses [31,32].

When the PMF analysis is performed on the native protein, CDC25A is identified with sequence coverage of 73% (Fig. 6A) and the protonated ion corresponding to the active site (*m*/*z* 1551.7624, VIVVFHCEFSSER) is detected 9 of 10 times with a signal ratio equal to 5.5. For CDC25C, 61% of the protein sequence is covered (Fig. 6B) and the active site (*m*/*z* 1579.794, IIIVFHCERFSSER) is detected 8 of 10 times by MALDI–FTICRMS with a signal ratio equal to 8.0. Thus, the PMF analysis of the native proteins constitutes a reference that can be compared with further PMF analysis obtained from incubated samples.

Fig. 6C and D display the results of the PMF analyses obtained with BN82002 incubated with CDC25A and -C, respectively. Com-

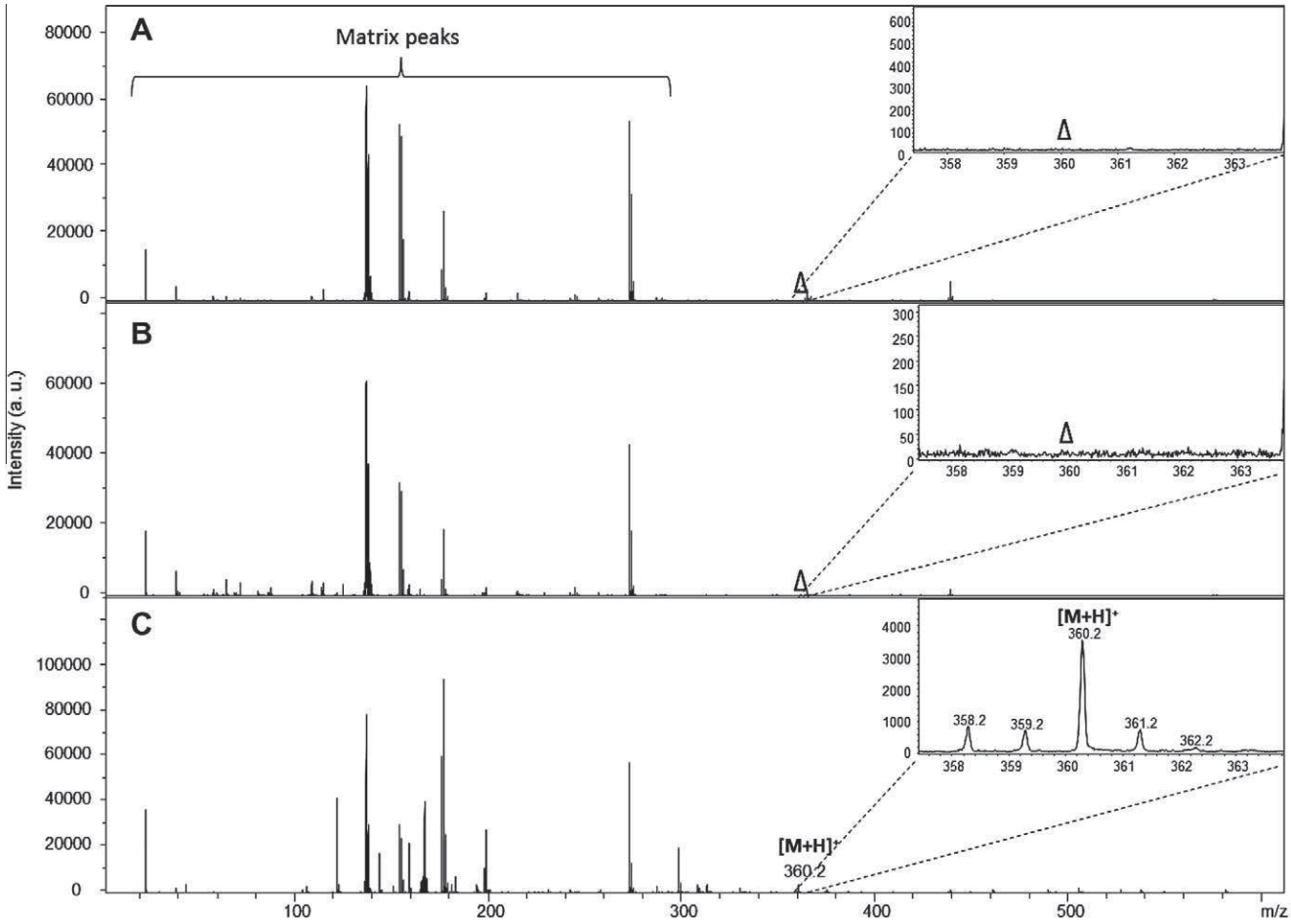


Fig.4. MALDI–TOF mass spectra (reflectron mode) of CDC25A incubated with BN82002 (A), CDC25C incubated with BN82002 (B), and BN82002 incubated with denatured CDC25A (C). Mass peak indexed with Δ corresponds to the $[M+H]^+$ of BN82002 (the spectrum also exhibits the $M^{\cdot+}$ at *m*/*z* 359.2 and a hydrogen loss by fragmentation at 358.2).

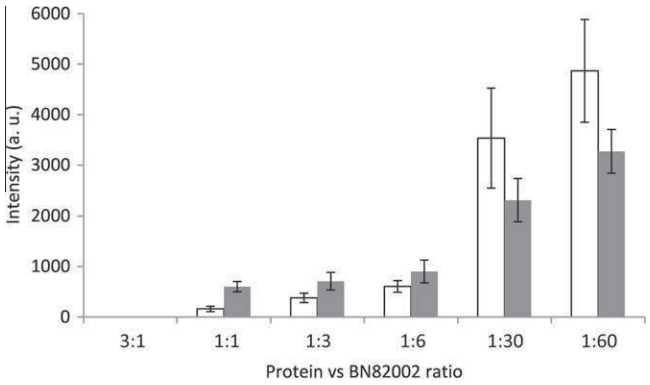


Fig.5. MS signal intensity of BN82002 in the wash filtrates as a function of its concentration during the incubation with CDC25A (white columns, $C = 5 \times 10^{-5}$ M) and CDC25C (gray columns, $C = 2 \times 10^{-5}$ M). Error bars represent the standard deviations obtained from 10 experiments.

parison of these analyses with those obtained with their respective control samples (Fig. 6A and B) clearly shows that the active site of both CDC25A and -C is never identified when the proteins are screened with the irreversible inhibitor. The same trend is observed with NSC663284, which is known to covalently bind the second serine of the CDC25A active site [23]. When the PMF is performed from incubation sample containing amiodarone (negative control compound) or the 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinone (reversible inhibitor), the active site is always detected in PMF.

Our results confirm the covalent binding between the active site of the target protein and the two evaluated irreversible ligands. In addition, they show that inactive compounds and reversible inhibitors do not interfere with the PMF analysis. Notwithstanding the disappearing of the active site of the mass spectrum, no mass peak corresponding to the active site linked to the ligand appears on the PMF spectra. For example, the protonated adduct ion corresponding to $[VIVVFHCEFSSER + NSC663284\text{-}Cl]^+$ is not detected at *m*/*z* 1837.7 in MALDI–FTICRMS, contrary to LC–ESI–MS [23]. It seems that the adduct peptide become silenced in MALDI–FTICRMS. Nevertheless, the systematic disappearing of the active site in PMF coupled to the absence of the protonated molecular ion in direct MALDI–TOFMS analysis constitutes a proof of irreversibility. Our screening test confirms that BN82002 is an irreversible inhibitor. Furthermore, the presented study shows that it covalently binds the active site of CDC25A and -C. Obviously, further experiments (e.g., LC–ESI–MS/MS) would assess the determination of the exact position of the covalent bond.

Conclusion on developed screening procedure

Table 1 summarizes the expected results associated with the developed screening procedure. Each category of molecule has its own behavior toward the test:

(A) CDC25A

```
  1 MELGPEPPHR RRLLFACSPP PASQPVVKAL FGASAAGGLS PVTNLTVTMD
 51 QLQGLGSDYE QPLEVKNNSN LQRMGSSEST DSGFCLDSPG PLDSKENLEN
101 PMRRIHSLPQ KLLGCSPALK RSHSDSLDHD IFQLIDPDEN KENEAFEFKK
151 PVRPVSRGCL HSHGLQEGKD LFTQRQNSAP ARMLSSNERD SSEPGNFIPL
201 FTPQSPVTAT LSDEDDGFVD LLDGENLKNE EETPSCMASL WTAPLVMRTT
251 NLDNRCKLFD SPSLCSSSTR SVLKRPERSQ EESPPGSTKR RKSMSGASPK
301 ESTNPEKAHE TLHQSLSLAS SPKGTIENIL DNDPRDLIGD FSKGYLFHTV
351 AGKHQDLKYI SPEIMASVLN GKFANLIKEF VIIDCRYPYE YEGGHIKGAV
401 NLHMEEEVED FLLKKPIVPT DGKRVIVVFH CEFSSERGPR MCRYVRERDR
451 LGNEYPKLHY PELYVLKGGY KEFFMKCQSY CEPPSYRPMH HEDFKEDLKK
501 FRTKSRTWAG EKSKREMYSR LKKL
```

(C) CDC25A incubated with BN82002

```
  1 MELGPEPPHR RRLLFACSPP PASQPVVKAL FGASAAGGLS PVTNLTVTMD
 51 QLQGLGSDYE QPLEVKNNSN LQRMGSSEST DSGFCLDSPG PLDSKENLEN
101 PMRRIHSLPQ KLLGCSPALK RSHSDSLDHD IFQLIDPDEN KENEAFEFKK
151 PVRPVSRGCL HSHGLQEGKD LFTQRQNSAP ARMLSSNERD SSEPGNFIPL
201 FTPQSPVTAT LSDEDDGFVD LLDGENLKNE EETPSCMASL WTAPLVMRTT
251 NLDNRCKLFD SPSLCSSSTR SVLKRPERSQ EESPPGSTKR RKSMSGASPK
301 ESTNPEKAHE TLHQSLSLAS SPKGTIENIL DNDPRDLIGD FSKGYLFHTV
351 AGKHQDLKYI SPEIMASVLN GKFANLIKEF VIIDCRYPYE YEGGHIKGAV
401 NLHMEEEVED FLLKKPIVPT DGKRVIVVFH CEFSSERGPR MCRYVRERDR
451 LGNEYPKLHY PELYVLKGGY KEFFMKCQSY CEPPSYRPMH HEDFKEDLKK
501 FRTKSRTWAG EKSKREMYSR LKKL
```

(B) CDC25C

```
  1 MSTELFSSTR EEGSSGSGPS FRSNQRKMLN LLLERDTSFT VCPDVPRTPV
 51 GKFLGDSANL SILSGGTPKR CLDLSNLSSG EITATQLTTS ADLDETGHLD
101 SSGLQEVHLA GMNHDQHLMK CSPAQLLCST PNGLDRGHRK RDAMCSSSAN
151 KENDNGNLVD SEMKYLGSPI TTVPKLDKNP NLGEDQAEEI SDELMEFSLK
201 DQEAKVSRSG LYRSPSMPEN LNRPRLKQVE KFKDNTIPDK VKKKYFSGQG
251 KLRKGLCLKK TVSLCDITIT QMLEEDSNQG HLIGDFSKVC ALPTVSGKHQ
301 DLKYVNPETV AALLSGKFQG LIEKFYVIDC RYPYEYLGGH IQGALNLYSQ
351 EELFNFFLKK PIVPLDTQKR IIIVFHCEFS SERGPRMCRC LREEDRSLNQ
401 YPALYYPELY ILKGGYRDFF PEYMELCEPQ SYCPMHHQDH KTELLRCRSQ
451 SKVQEGERQL REQIALLVKD MSP
```

(D) CDC25C incubated with BN82002

```
  1 MSTELFSSTR EEGSSGSGPS FRSNQRKMLN LLLERDTSFT VCPDVPRTPV
 51 GKFLGDSANL SILSGGTPKR CLDLSNLSSG EITATQLTTS ADLDETGHLD
101 SSGLQEVHLA GMNHDQHLMK CSPAQLLCST PNGLDRGHRK RDAMCSSSAN
151 KENDNGNLVD SEMKYLGSPI TTVPKLDKNP NLGEDQAEEI SDELMEFSLK
201 DQEAKVSRSG LYRSPSMPEN LNRPRLKQVE KFKDNTIPDK VKKKYFSGQG
251 KLRKGLCLKK TVSLCDITIT QMLEEDSNQG HLIGDFSKVC ALPTVSGKHQ
301 DLKYVNPETV AALLSGKFQG LIEKFYVIDC RYPYEYLGGH IQGALNLYSQ
351 EELFNFFLKK PIVPLDTQKR IIIVFHCEFS SERGPRMCRC LREEDRSLNQ
401 YPALYYPELY ILKGGYRDFF PEYMELCEPQ SYCPMHHQDH KTELLRCRSQ
451 SKVQEGERQL REQIALLVKD MSP
```

Fig.6. Peptide sequence obtained after PMF study of CDC25A native protein (A), CDC25C native protein (B), CDC25A incubated with BN82002 (C), and CDC25C incubated with BN82002 (D). Bold letters highlighted with a gray background are identified peptides, and the active site of the protein is underlined.

Table 1
Overview of expected results from developed screening test on CDC25 phosphatases.

	Control samples		Evaluated compounds		
	Native CDC25s	Negative controls	Inactive compounds	Reversible inhibitors	Irreversible inhibitors
Direct analysis by MALDI–MS (step 3)	✓*	0	0	✓**	0
Presence of active site of CDC25 by PMF analysis (step 4)	✓	✓	✓	✓	0

Note: Step numbers corresponding to Fig. 1 are in parentheses. ✓, positive detection; 0, absence of detection; *, high mass spectrum with SA; **, low mass spectrum with DHB.

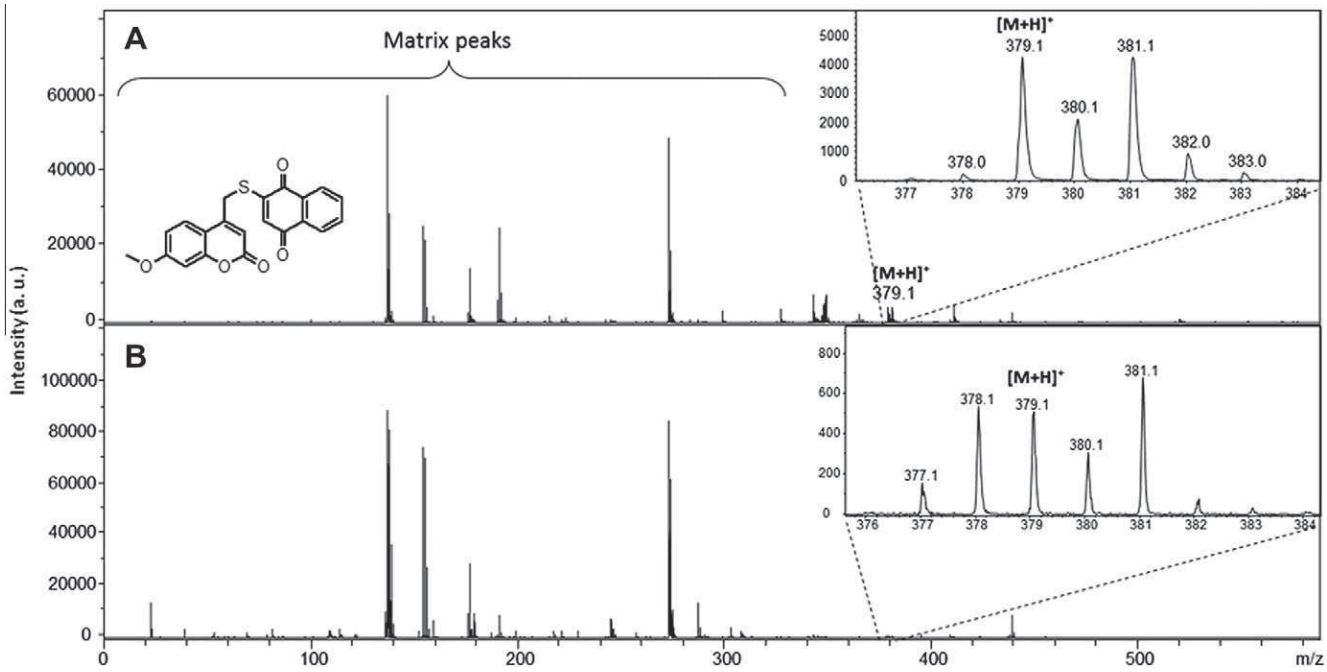


Fig.7. MALDI–TOF mass spectra (reflectron mode) of SV37 (DHB matrix, C = 2×10^{-4} M) and CDC25C incubated with SV37 (B). The ion m/z 378.1 corresponding to $M^{\cdot+}$ and m/z 377.1 is due to a hydrogen loss. The difference between the two ion patterns is due to the difference of laser energy between the standard and incubated samples. The standard is obtained with 20% of the laser energy, whereas 40% is required for the incubated sample. At higher laser energy, the fragmentation of the $[M+H]^+$ increases. Consequently, the relative abundance of m/z 379 is decreasing, whereas m/z 377 is increasing. Meanwhile, the intensity of m/z 378 ($[M^{\cdot+}]$) is also increasing at higher energy.

- Inactive compounds do not present any ions corresponding to their molecular structure in direct MS analysis, but the catalytic site of CDC25s is observed by PMF analysis.
- Reversible compounds can already be evidenced by the direct MS analysis of the retentate, but PMF analysis can also be performed as control. In this case, the catalytic site of the CDC25s is observed and the sequence corresponding to the active site appears in the MASCOT report after PMF analysis.
- Irreversible inhibitors covalently bound to the active site are deduced from both direct and PMF analysis by the absence of detection of the molecule and the absence of the catalytic site in the MASCOT report. The absence of the catalytic site is also expected if its cysteine is definitely oxidized.

Application

The aim of a screening test is to rapidly discriminate potentially active compounds from the others. Such a procedure is particularly interesting because the evaluation of inactive compounds by expensive and time-consuming procedures can be avoided. The developed procedure is applied to some synthesized compounds from which a molecule named SV37 ($C_{21}H_{14}O_5S_1$) emerges as a candidate.

SV37 is incubated with CDC25C as described previously and submitted to the developed testing procedure. Results of direct MALDI–TOFMS analysis (step 3) are presented in Fig. 7. In positive MALDI–TOFMS, the signal corresponding to the molecular ion ($M^{\cdot+}$) can be observed at m/z 378.1 and 379.1 for the $[M+H]^+$ ion. As for indolylquinone, the isotopic pattern looks complicated, but the reason is completely different. Such a complicated pattern was already observed by Calba and coworkers for electron-rich compounds (spirooxazines), and the abundant M + 2 and M + 3 ions were attributed to hydrogenated ions $[M+H_2]^{\cdot+}$ and $[M+H_2+H]^+$ [33]. When the ionization process is performed in laser desorption ionization (LDI) without any matrix addition, SV37 is detected as $M^{\cdot+}$ with a correct isotopic pattern but LDI leads to a less sensitive detection.

Direct MALDI–TOF mass spectrum obtained after the screening with CDC25C presents the typical ion profile of SV37 obtained with matrix (the $M^{\cdot+}$ is a little bit more abundant). Such results characterize potential reversible inhibitors. This behavior is confirmed when step 4 is performed (Fig. 8). Indeed, the active site is still detected in PMF.

To check the reliability of the screening test, two in vitro experiments are performed. First, the IC_{50} (concentration inhibiting 50% of the enzymatic activity) of SV37 on recombinant CDC25 is evaluated. Fig. 9A shows that the IC_{50} value is approximately 1 μM with CDC25C. This IC_{50} curve allowed us to define a strong inhibitory concentration (22 μM, corresponding to ⩾70% of inhibition) and a weak inhibitory concentration (0.12 μM, corresponding to <30% of inhibition) for the evaluation of reversibility.

Second, the dilution test is performed to check the reversibility of SV37 against CDC25C. The enzymes are preincubated with the strongly inhibitory concentration of SV37 for 0, 15, 30, 60, and 90 min and then diluted 180-fold to obtain the final weakly inhibitory concentration. Two controls are used to define positive and negative inhibition controls of 22 and 0.12 μM final inhibitor concentration, respectively (no dilution was performed). For an

CDC25C incubated with SV37

```
  1 MSTELFSSTR EEGSSGSGPS FRSNQRKMLN LLLERDTSFT VCPDVPRTPV
 51 GKFLGDSANL SILSGGTPKR CLDLSNLSSG EITATQLTTS ADLDETGHLD
101 SSGLQEVHLA GMNHDQHLMK CSPAQLLCST PNGLDRGHRK RDAMCSSSAN
151 KENDNGNLVD SEMKYLGSPI TTVPKLDKNP NLGEDQAEEI SDELMEFSLK
201 DQEAKVSRSG LYRSPSMPEN LNRPRLKQVE KFKDNTIPDK VKKKYFSGQG
251 KLRKGLCLKK TVSLCDITIT QMLEEDSNQG HLIGDFSKVC ALPTVSGKHQ
301 DLKYVNPETV AALLSGKFQG LIEKFYVIDC RYPYEYLGGH IQGALNLYSQ
351 EELFNFFLKK PIVPLDTQKR IIIVFHCEFS SERGPRMCRC LREEDRSLNQ
401 YPALYYPELY ILKGGYRDFF PEYMELCEPQ SYCPMHHQDH KTELLRCRSQ
451 SKVQEGERQL REQIALLVKD MSP
```

Fig.8. Peptide sequence obtained after PMF study of CDC25C screened with SV37. Bold letters highlighted with a gray background are identified peptides, and the active site of the protein is underlined.

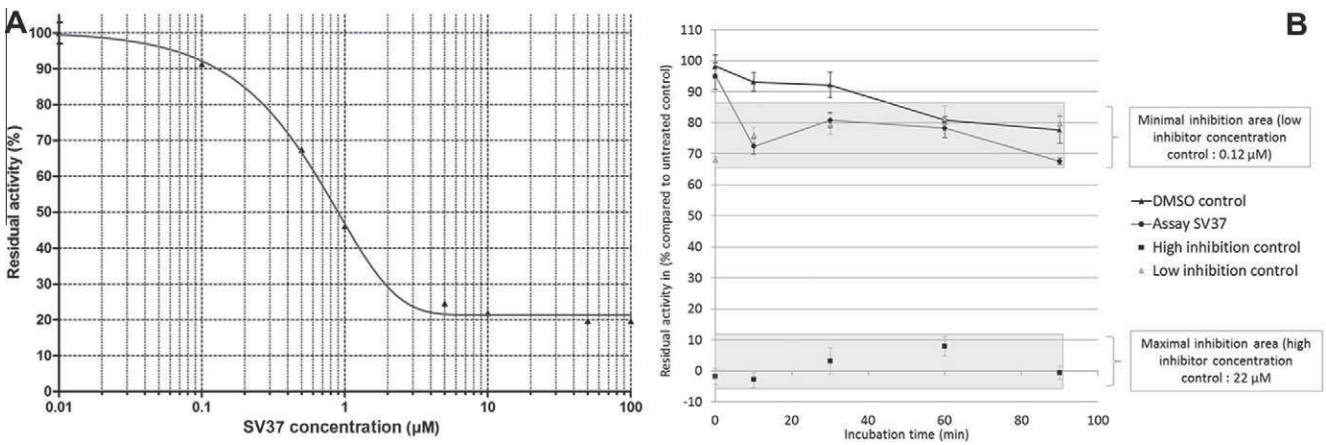


Fig.9. (A) IC_{50} curve for SV37. (B) Reversibility of SV37 against CDC25C. DMSO, dimethyl sulfoxide.

irreversible inhibitor, the fixation to the enzyme is still effective even after a strong dilution. Thus, the inhibition will be maintained after dilution, and the residual activity of the enzyme is expected to be in the same range as the positive inhibition control. On the contrary, with a reversible inhibitor, the dilution will allow the inhibitor to leave the enzyme, and the enzyme will recover the whole or major part of its activity and is expected to be in the same range as the negative inhibition control. SV37 was found to behave like a reversible compound given that the major part of the activity is recovered after dilution for the recombinant CDC25C (Fig. 9B).

According to these results, SV37 seems to be a promising CDC25 inhibitor. This compound, highlighted by the developed procedure, is actually still undergoing complementary biological tests. This study will be published soon.

Conclusion

In this article, we have proposed a rapid screening test allowing the detection of reversible and irreversible CDC25A and -C inhibitors starting from a very simple sample preparation. The sample preparation consists in an incubation of the candidate molecule with the entire target protein, followed by an ultrafiltration step. The retentate is then directly analyzed by MALDI–TOFMS to bring to light reversible inhibitors or is submitted to PMF analysis to reveal irreversible inhibitors.

Such a procedure can be applied to highlight new synthetic inhibitors. In the future, it could also be easily automated in order to increase the analytical throughput and be applied to more complex mixtures. For example, it could be a convenient way in which to screen plant or marine samples for a rapid discrimination of active extracts from inactive extracts before starting a long and heavy complementary biological study.

Acknowledgments

The authors acknowledge the "Région de Lorraine" (E. Sibille) and the "Fond National de la Recherche" of Luxembourg (E. Bana) for scholarships and financial support. The authors also acknowledge G. Kirsch and S. Valente from the Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique (Metz University, France) for providing the compound SV37.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.08.006.

References

[1] A. Nagata, M. Igarashi, S. Jinno, K. Suto, H. Okayama, An additional homolog of the fission yeast *cdc25*$^{+}$ gene occurs in humans and is highly expressed in some cancer cells, New Biol. 3 (1991) 959–968.
[2] K. Galaktionov, D. Beach, Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins, Cell 67 (1991) 1181–1194.
[3] R. Boutros, V. Lobjois, B. Ducommun, CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets?, Nat Rev. Cancer 7 (2007) 495–507.
[4] E.B. Fauman, M.A. Saper, Structure and function of the protein tyrosine phosphatases, Trends Biochem. Sci. 21 (1996) 413–417.
[5] C. Cans, V. Baldin, V. Mils, B. Ducommun, Les phosphatases CDC25: régulateurs du cycle cellulaire et oncogènes potentiels, Med. Sci. 14 (1998) 269–274.
[6] J.W. Eckstein, Cdc25 protein phosphatase: regulation and its role in cancer, Gene Ther. Mol. Biol. 1 (1998) 707–711.
[7] K. Kristjansdottir, J. Rudolph, Cdc25 phosphatases and cancer, Chem. Biol. 11 (2004) 1043–1051.
[8] H. Sasaki, H. Yukiue, Y. Kobayashi, M. Tanahashi, S. Moriyama, Y. Nakashima, I. Fukai, M. Kiriyama, Y. Yamakawa, Y. Fujii, Expression of the cdc25B gene as a prognosis marker in non-small cell lung cancer, Cancer Lett. 173 (2001) 187–192.
[9] M.G. Cangi, B. Cukor, P. Soung, S. Signoretti, G. Moreira, M. Ranashinge, B. Cady, M. Pagano, M. Loda, Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer, J. Clin. Invest. 106 (2000) 753–761.
[10] M. Broggini, G. Buraggi, A. Brenna, L. Riva, A.M. Codegoni, V. Torri, A.A. Lissoni, C. Mangioni, M. D'Incalci, Cell cycle-related phosphatases CDC25A and B expression correlates with survival in ovarian cancer patients, Anticancer Res. 20 (2000) 4835–4840.
[11] J. Sohn, B. Kiburz, Z. Li, L. Deng, A. Safi, M.C. Pirrung, J. Rudolph, Inhibition of Cdc25 phosphatases by indolyldihydroxyquinones, J. Med. Chem. 46 (2003) 2580–2588.
[12] M. Brisson, T. Nguyen, A. Vogt, J. Yalowich, A. Giorgianni, D. Tobi, I. Bahar, C.R.J. Stephenson, P. Wipf, J.S. Lazo, Discovery and characterization of novel small molecule inhibitors of human Cdc25B dual specificity phosphatase, Mol. Pharmacol. 66 (2004) 824–833.
[13] K.E. Pestell, A.P. Ducruet, P. Wipf, J. Lazo, Small molecule inhibitors of dual specificity protein phosphatases, Oncogene 19 (2000) 6607–6612.
[14] M. Brisson, T. Nguyen, P. Wipf, B. Joo, B.W. Day, J.S. Skoko, E.M. Schreiber, C. Foster, P. Bansal, J. Lazo, Redox regulation of Cdc25B by cell-active quinolinediones, Mol. Pharmacol. 68 (2005) 1810–1820.
[15] J.S. Lazo, D.C. Aslan, E.C. Southwick, K.A. Cooley, A.P. Ducruet, B. Joo, A. Vogt, P. Wipf, Discovery and biological evaluation of a new family of potent inhibitors of the dual specificity protein phosphatase Cdc25, J. Med. Chem. 44 (2001) 4042–4049.
[16] M.C. Brezak, M. Quaranta, O. Mondésert, A novel synthetic inhibitor of CDC25 phosphatases: BN82002, Cancer Res. 64 (2004) 3320–3325.
[17] G. Prévost, M.C. Brezak, F. Goubin, B. Ducommun, Inhibitors of the CDC25 phosphatases, Prog. Cell Cycle Res. 5 (2003) 225–234.
[18] L. Brault, D. Bagrel, Activity of novel Cdc25 inhibitors and preliminary evaluation of their potentiation of chemotherapeutic drugs in human breast cancer cells, Life Sci. 82 (2008) 315–323.
[19] E. Viry, A. Anwar, G. Kirsch, C. Jacob, M. Diederich, D. Bagrel, Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases, Int. J. Oncol. 38 (2011) 1103–1111.
[20] M.C. Brezak, M. Quaranta, M.O. Contour-Galcera, O. Lavergne, O. Mondesert, P. Auvray, P.G. Kasprzyk, G.P. Prevost, B. Ducommun, Inhibition of human tumor cell growth in vivo by an orally bioavailable inhibitor of CDC25 phosphatases, Mol. Cancer Ther. 4 (2005) 1378–1387.
[21] P. Hannewald, B. Maunit, J.F. Muller, Tubulin-binding drug screening by MALDI–TOFMS, Anal. Chem. 78 (2006) 4390–4397.
[22] P. Hannewald, B. Maunit, J.-F. Muller, Screening of DHFR-binding drugs by MALDI–TOFMS, Anal. Bioanal. Chem. 392 (2008) 1335–1344.
[23] L. Pu, A. Amoscato, M. Bier, J. Lazo, Dual G1 and G2 phase inhibition by a novel, selective Cdc25 inhibitor 6-chloro-7-(2-morpholin-4-ylethylamino)-quinoline-5,8-dione, J. Biol. Chem. 277 (2002) 46877–46885.
[24] H. Kato, M. Okamoto, K. Yamashita, Y. Nakamura, Y. Fukumori, K. Nakai, H. Kaneko, Peptide-binding assessment using mass spectrometry as a new screening method for skin sensitization, J. Toxicol. Sci. 28 (2003) 19–24.
[25] A.F. Soares, O. Nosjean, D. Cozzone, D. D'Orazio, M. Becchi, M. Guichardant, G. Ferry, J.A. Boutin, M. Lagarde, A. Géloën, Covalent binding of 15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-prostaglandin J2 to PPARγ, Biochem. Biophys. Res. Commun. 337 (2005) 521–525.
[26] M.C. Pirrung, L. Deng, Z. Li, K. Park, Synthesis of 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinones by acid-catalyzed condensation of indoles with 2,5-dichlorobenzoquinone, J. Org. Chem. 67 (2002) 8374–8388.
[27] D.M. Horn, E.C. Peters, H. Klock, A. Meyers, A. Brock, Improved protein identification using automated high mass measurement accuracy MALDI FT–ICR MS peptide mass fingerprinting, Int. J. Mass Spectrom. 238 (2004) 189–196.
[28] D. Da Silva, T. Wasselin, V. Carré, P. Chaimbault, L. Bezdetnaya, B. Maunit, J.-F. Muller, Evaluation of combined matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry experiments for peptide mass fingerprinting analysis, Rapid Commun. Mass Spectrom. 25 (2011) 1881–1892.
[29] S. Valente, E. Bana, E. Viry, D. Bagrel, G. Kirsch, Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases, Bioorg. Med. Chem. Lett. 20 (2010) 5827–5830.
[30] M.O. Contour-Galcéra, O. Lavergne, M.C. Brezak, B. Ducommun, G. Prévost, Synthesis of small molecule CDC25 phosphatase inhibitors, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 5809–5812.
[31] B. Bogdanov, R.D. Smith, Proteomics by FTICR mass spectrometry: top down and bottom up, Mass Spectrom. Rev. 24 (2005) 168–200.
[32] A.G. Marshall, C.L. Hendrickson, G.S. Jackson, Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer, Mass Spectrom. Rev. 17 (1998) 1–35.
[33] P.J. Calba, J.F. Muller, A. Hachimi, P. Laréginie, R. Guglielmetti, Spirooxazines as a molecular probe for the study of matrix-assisted laser desorption/ionization processes: I. Study of the interaction effect between the molecular probe and the matrix, Rapid Commun. Mass Spectrom. 11 (1997) 1602–1611.

A Novel Coumarin-Quinone Derivative SV37 Inhibits CDC25 Phosphatases, Impairs Proliferation, and Induces Cell Death

Emilie Bana,[1,2] Estelle Sibille,[3] Sergio Valente,[1] Claudia Cerella,[2] Patrick Chaimbault,[3] Gilbert Kirsch,[1] Mario Dicato,[2] Marc Diederich,[4]*, and Denyse Bagrel[1]

[1]*Laboratoire "Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, UMR CNRS 7565, Université de Lorraine, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, Metz, France*
[2]*Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer, Fondation de Recherche Cancer et Sang, Hôpital Kirchberg, Luxembourg, Luxembourg*
[3]*Laboratoire de Chimie et Physique-Approche Multi Échelle des Milieux Complexes (LCP-A2MC-EA4632), Institut Jean Barriol—Fédération de Recherche 2843, Université de Lorraine, Metz, France*
[4]*Department of Pharmacy, Seoul National University, Gwanak-gu, Seoul, Republic of Korea*

Cell division cycle (CDC) 25 proteins are key phosphatases regulating cell cycle transition and proliferation by regulating CDK/cyclin complexes. Overexpression of these enzymes is frequently observed in cancer and is related to aggressiveness, high-grade tumors and poor prognosis. Thus, targeting CDC25 by compounds, able to inhibit their activity, appears a good therapeutic approach. Here, we describe the synthesis of a new inhibitor (SV37) whose structure is based on both coumarin and quinone moieties. An analytical in vitro approach shows that this compound efficiently inhibits all three purified human CDC25 isoforms (IC_{50} 1–9 μM) in a mixed-type mode. Moreover, SV37 inhibits growth of breast cancer cell lines. In MDA-MB-231 cells, reactive oxygen species generation is followed by pCDK accumulation, a mark of CDC25 dysfunction. Eventually, SV37 treatment leads to activation of apoptosis and DNA cleavage, underlining the potential of this new type of coumarin–quinone structure. © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: breast cancer; CDC25 inhibitor; quinone; coumarin; apoptosis; reactive oxygen species

INTRODUCTION

Cell division cycle 25 (CDC25) proteins are double specificity phosphatases [1,2]. In eukaryotes, they are known to play an essential role in G1/S and G2/M cell cycle transition, as well as in mitosis via dephosphorylation of phospho-threonine 14 residue (Thr14) and phospho-tyrosine 15 residue (Tyr15) residues of cyclin dependent kinase (CDK)/cyclin complexes. Activity of CDC25s is tightly regulated throughout the cell cycle by various mechanisms involving subcellular relocalization or variations of the expression level of all three CDC25 isoforms in different phases of the cell cycle [3–5].

CDC25 A, B, and C isoforms play various roles in cell cycle progression. CDC25A essentially interacts with CDK2-CyclinE and CDK2-CyclinA complexes, which control G1/S transition and progression through S phase. This isoform also interacts with the CDK1-CyclinB complex involved in G2/M transition [6–8]. CDC25B mainly targets the CDK1-CyclinB complex located in centrosomes implicated in prophase microtubule dynamics. It is also able to dephosphorylate and activate CDK2-CyclinA and CDK2-CyclinE complexes [2,9]. CDC25C is present in each cell cycle phase and regulates G2/M transition by targeting CDK1-CyclinB complex [10,11]. In

Abbreviations: CDC25, cell division cycle 25; CDK, cyclin dependent kinases; ER, estrogen receptor; H2AX, histone 2AX; H_2DCFDA, 2′-7′-dihydro-dichlorofluorescein diacetate; HER2, human epidermal growth factor receptor-2; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; PMF, peptide mass fingerprinting; PR, progesterone receptor; ROS, reactive oxygen species.

Conflict of interest: Authors declare no competing interest.

Grant sponsor: Fonds National de la Recherche (FNR), Luxembourg; Grant sponsor: [European Community's] Seventh Framework Programme [FP7/2007-2013]; Grant number: 215009; Grant sponsor: Région de Lorraine, Conseil Général de la Moselle; Grant sponsor: Ligue contre le Cancer; Grant sponsor: "Recherche Cancer et Sang" foundation; Grant sponsor: "Recherches Scientifiques Luxembourg" association; Grant sponsor: "Een Haerz fir kriibskrank Kanner" association; Grant sponsor: Action Lions "Vaincre le Cancer" association; Grant sponsor: Télévie Luxembourg; Grant sponsor: University of Saarland; Grant sponsor: Ministry of Economics and Science of Saarland; Grant sponsor: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG grant); Grant number: JA1741/2-1; Grant sponsor: European Union (ITN "RedCat" 215009, Interreg IVa project "Corena"); Grant sponsor: National Research Foundation (NRF) by the MEST of Korea for Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) grant; Grant number: 2012-0001184

**Correspondence to:* Department of Pharmacy, Seoul National University, 599 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Republic of Korea.

Received 15 April 2013; Revised 16 September 2013; Accepted 24 September 2013

DOI 10.1002/mc.22094

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

© 2013 WILEY PERIODICALS, INC.

addition, CDC25 isoforms present a level of functional redundancy.

Over-expression of CDC25 activities was frequently observed in cancer [12] as CDC25A and B were found overexpressed in breast, thyroid, laryngeal, esophageal, gastric, hepatocellular, ovarian, endometrial, prostate, and colorectal as well as in non-Hodgkin lymphomas [13]. In breast cancer, CDC25A and B are over-expressed in 70% and 57% of cases, respectively. Over-expression is most often accompanied by over-activation of CDK2 and correlates with aggressiveness, bad prognosis and high-grade tumors [14,15]. Thus, CDC25s constitute a promising target for the development of anti-cancer drugs [16].

There is an apparent functional redundancy between CDC25A, B, and C. Whereas Ferguson et al. [17] showed that CDC25B and C knock-out mice develop normally, suggesting that CDC25A is able to replace functions of CDC25B and C; other show that CDC25B is essential for meiotic resumption in female mice [18], thus suggesting limited redundancy. Based on these results, it appears that targeting a single CDC25 isoform might present interest limited only to mechanistic studies whereas only inhibition of all three CDC25 phosphatases presents a therapeutic interest, enhancing the chance of blocking cell cycle progression in tumor cells.

About 100 compounds, including quinonoids, phosphate surrogates, or electrophilic inhibitors, were previously synthesized in order to inhibit CDC25s [19]. Starting from the structure of vitamin K published in 1993 as a potent CDC25 inhibitor [20], numerous compounds were derived from a para-quinonoid structure. This CDC25 inhibitor family includes thiol-naphtoquinones such as the 2-[(2-hydroxyethyl)sulfanyl]-3-methylnaphtoquinone (NSC 672121) [21], indolyldihydroxyquinones derivated from 2,5-dihydroxy-3-(1H-indol-3-yl)[1,4] benzoquinone [22] or chloroquinones such as 6-chloro-7-{[2-(4-morpholinyl)ethylamino]amino}-5,8-quinolinedione (NSC 663284) [23], and many other quinonoid derivatives able to affect CDC25 activity and tumor cell proliferation. The biological activity of quinonoid compounds can be exerted through the generation of reactive oxygen species (ROS) through the redox cycle of quinones [24,25]. Electrophilic reduction of quinone can lead to semiquinone radicals and superoxide anion able to induce oxidative stress and to react with various cellular molecules, causing DNA damage or inhibition of enzymes.

To date, there is no suitable inhibitor for further drug development, and thus innovative compounds are required. Here, we detail the in vitro inhibitory potential and the effects in breast cancer cell lines of a novel coumarin–quinone derivative, SV37.

MATERIALS AND METHODS

Chemistry

Solvents used were purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France) and chemical compounds were from Acros Organics (Fisher Scientific, Illkirsh, France) or Alfa Aesar (Shiltigheim, France). Melting points were determined with a Stuart SMP3 (Bibby Scientific, Staffordshire, UK) apparatus and are uncorrected. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded with a Bruker AC 250 MHz spectrometer (Brucker Daltonics, Wissembourg, France) in $CDCl_3$ or DMSO-d_6. Mass spectra were recorded with a MicroTof-Q 98 (Brucker Daltonics). Chemical shifts are reported in δ (ppm) units relative to the internal reference tetramethylsilane (Me_4Si). All reactions were routinely checked by thin layer chromatography (TLC). TLC was performed on aluminum-backed silica gel plates (Alufolien Kieselgel 60 F_{254}, Merck DC, Fontenay Sous Bois, France) with spots visualized by UV light. Column chromatography was performed on silica gel LC 60A (70–200 μm). Analytical results are within ±0.40% of the theoretical values.

Synthesis of 2{(7-Methoxy-2-oxo-2H-Chromen-yl) Methylsulfanyl]}Naphtoquinone (SV37)

Naphthalene-1,4-dione (Figure 1B(b)) (1.26 mmol, 0.2 g) was slowly added to a solution of 4-(mercaptomethyl)-7-methoxy-2H-chromen-2-one (Figure 1B(a)) (1.26 mmol, 0.28 g) in ethanol (10 mL) and the resulting mixture was stirred at room temperature overnight. Then the yellow solid was filtered and recrystallized by ethanol to afford pure SV37. Yield: 85%. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ3.56 (s, 2H, –CH_2–), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 6.28 (s, 1H, –CHCOO–), 6.95–6.97 (m, 2H, coumarin protons), 7.34 (s, 1H, benzoquinone proton), 7.58–7.60 (d, 2H, benzoquinone protons), 7.72–7.74 (d, 1H, coumarin proton), 7.93–7.95 (d, 2H, coumarin protons) ppm; ^{13}C-NMR ($CDCl_3$) δ29.76, 55.96, 100.98, 111.40, 111.95, 112.21, 126.02, 126.30, 126.63, 128.16, 131.40, 131.59, 133.72, 134.71, 149.65, 152.29, 155.08, 159.79, 162.60, 181.12, 181.68 ppm; HRMS (ESI) $[M+Na]^{+}C_{21}H_{14}NaO_5S$ Calcd 401.0460, found 401.0468. Elemental Analyses: Calcd C, 66.66; H, 3.73; O, 21.14; S, 8.47; found C, 66.69; H, 3.77; O, 21.10; S, 8.45.

Production and Purification of Recombinant Human CDC25 Phosphatases

Recombinant CDC25-GST proteins of the three isoforms were obtained as previously described by Brault et al. [26]. Briefly, *E. coli* strain BL21-DE3 pLys S was transformed by a plasmidic vector (pGEX 2T, Amersham, GE Healthcare, Vélizy, France) containing the sequences encoding full length CDC25A, B, and C or only the catalytic site of CDC25B. Recombinant protein production was induced by addition of Isopropyl-thio-*β*-galactoside (Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) in the medium. Cells were lysed and centrifuged to recover the supernatant which was purified on a glutathione (GSH)-agarose

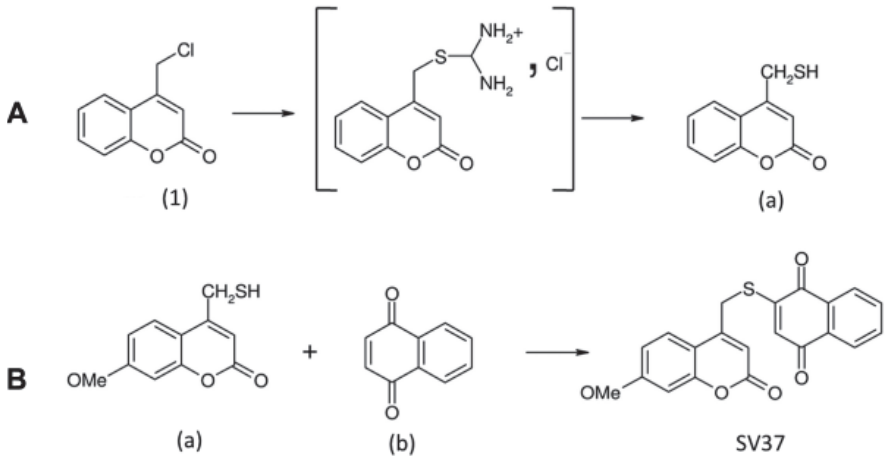


Figure 1. (A) Synthesis of methylthiol derivative (a). Condensation of chloromethyl derivative (1) with thiourea was followed by basic hydrolysis. (B) Synthesis and structure of SV37 and its counterparts. Synthesis of 2-([7-methoxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl]methylthio)naphthalene-1,4-dione (SV37) by reaction of naphthalene-1,4-dione (b, quinone counterpart) and 4-(mercaptomethyl)-7-methoxy-2H-chromen-2-one (a, coumarin counterpart).

column (Sigma–Aldrich), and recombinant GST-CDC25 proteins were eluted and collected in fractions. Activity, purity, and protein concentration of the fractions was evaluated.

In Vitro Enzymatic Assays

CDC25 phosphatase activity was quantified in vitro by a fluorimetric assay as previously described [27]. Measurement of GST-CDC25 enzymatic activity was performed in 96-well plates in (50 mM Tris–HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.1% SAB, pH 8.1) buffer containing 500 μM 3-*O*-methylfluorescein phosphate (Sigma–Aldrich) as substrate. The GST-CDC25 proteins, diluted in assay buffer, were used at a final concentration of 1 μg/well. After 2 h at 30°C, fluorescent emission of 3-*O*-methylfluorescein was measured with a CytoFluor system (Perspective Applied Biosystems, Life Technologies, Villebon sur Yvette, France) with excitation filter: 475 nm and emission filter: 510 nm. Tests were performed in triplicates, and the experiment was performed three times independently (nine values in total). Results are expressed as percentage of inhibition of CDC25 phosphatase activity in presence of the tested compounds.

Measurement of Reversibility/Irreversibility of the Inhibition

To assess reversible/irreversible interaction mode of a compound in vitro, a dilution method previously described by Sohn et al. [22] was applied to the fluorimetric method described above. Briefly, recombinant enzymes were incubated with a strong inhibitory concentration of the compound for different time points, and then, diluted to obtain a final weakly inhibitory concentration (180-fold in this experiment). Activity is then measured by fluorimetry and compared to DMSO control; the reversibility/irreversibility feature is determined by recovering/non-recovering of CDC25 activity after dilution. In order to obtain a comparable enzyme amount during measurement, the enzyme quantity in assays before dilution was 180-fold higher than in undiluted controls. After dilution, same volume (90 μL) of control and assay solutions was used for measurement (rest of assay mix was discarded).

A second evaluation of the fixation mode was made by a mass spectrometry method previously described [28]. Briefly, CDC25A was incubated with SV37 during 1 h allowing the eventual fixation of the compound to the enzyme. The unbound species were then separated from the bound species by a centrifugation and washing step. CDC25 and potential protein–ligand complexes were dissolved with 20 μL of ultrapure water and analyzed in MALDI-TOFMS with 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix (Sigma–Aldrich) for the low mass ($0 < m/z < 4000$) and with sinapinic acid (SA) matrix (Sigma–Aldrich) for the higher mass ($m/z > 10\,000$ Da) in order to check the presence of the protein. Finally, the last step consisted in the digestion of the CDC25 or the CDC25-compound complex by trypsin (lot V5111, Promega Corporation, Madison, WI) as described by da Silva et al. [29]. The digests were analyzed by MALDI-FTICRMS and a peptide mass fingerprinting (PMF) experiment was performed in order to compare the two protein sequences (CDC25 free and incubated with the compound) as described by Sibille et al. [28].

Cell Lines and Culture Conditions

The evaluation of the effects of the inhibitors on cells was realized on various cell lines including two breast cancer cell lines issued from pleural effusion of invasive ductal carcinomas: MCF-7 and MDA-MB-231 [30,31]; an immortalized mammary breast cell line: hTERT-HME1 obtained from the HME1 cells

(Human Mammary Epithelial) which were immortalized by infection with the retrovirus pBabepuro + hTERT [32,33].

MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines were cultivated in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI1640 medium) (Eurobio, Courtabœuf, France), containing 10% (v/v) fetal calf serum, antibiotics, and anti-mycotics (104 UI mL^{-1} penicillin G, 10 mg mL^{-1} streptomycin, 25 μg mL^{-1} amphotericin B) (Eurobio). hTERT-HME1 cell line was cultivated in mixed medium containing 90% of RPMI1640 medium plus 10% (v/v) fetal calf serum, antibiotics, and anti-mycotics as listed above, plus 10% mammary epithelial cell growth medium (MEGM) (Lonza, Levallois-Perret, France) containing 0.5 μg mL^{-1} of hydrocortisone, 5 mg mL^{-1} of insulin, 10 ng mL^{-1-1} of human epidermal growth factor, and 0.52 μg mL^{-1} of bovine pituitary extract, plus 10% (v/v) fetal calf serum. Cells were cultivated at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere.

Cellular Viability Assays

Cytotoxicity of compounds was evaluated by a standard 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenpyl-tetra-zolium bromide (MTT) test [34] based on the reduction of the MTT by mitochondrial succinate dehydrogenase into purple formazan in living cells. Cells were plated at 1×10^4 cells per well in 96-well plates and grown for 24 h. Then, medium was discarded and replaced by fresh medium containing the compound or the solvent alone (DMSO 0.5% v/v). Cells are grown until the experiment's time point and then incubated for 3 h at 37°C with MTT solution (500 μg mL^{-1} of substrate in additive-free medium). Then formazan crystals were dissolved in DMSO and colorimetric measurement was made on a spectrophotometer at 550 nm.

Cytotoxicity Assays

Cell viability was evaluated by trypan blue exclusion assays. Cells were plated at a density of 2×10^5 per well in 6-well plates and grown for 24 h. Then, medium was replaced by fresh medium containing the compound or the solvent alone (DMSO 0.5% v/v). Cells were exposed to the compounds until reaching the different experimental time points. Floating cells were harvested, combined to trypsinized adherent cells and counted by microscopy in the presence of trypan blue dye.

Real Time Imaging and Cell Growth Evaluation

Confluency of growing cells and microscopy images were obtained by the Incucyte real-time automated microscope imaging system (Essen Biosciences, Welwyn Garden City, UK).

Reactive Oxygen Species Detection

ROS production was measured by flow cytometry after CM-2′-7′-dihydro-dichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA) staining (detects hydrogen peroxide, H_2O_2; hydroxyl radicals, $HO^{\bullet}$; hypochlorous acid, HOCl; and peroxyl radicals, $ROO^{\bullet}$) or Redox Sensor Red staining (detects hydrogen peroxide, H_2O_2; peroxyl radicals, $ROO^{\bullet}$; and superoxide anions, $^{\bullet}O_2^{-}$). Sensors were purchased from Invitrogen, Halle, Belgium. Cells were plated at a density of 1×10^6 cells per 100-mm dishes and grown for 24 h. Then, the medium was replaced for 20 min by fresh medium containing the permeable and oxidation sensitive fluorescent probe (CM-H_2DCFDA 10 μM or Redox Sensor Red 2.5 μM). Cells were then treated by the compound or the solvent alone (DMSO 0.5% v/v). Data were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lanes, NJ). Pretreatment with *N*-acetylcysteine (NAC) (Sigma–Aldrich) was at 10 mM for 4 h and the superoxide scavenger Tiron (Sigma–Aldrich) was at 10 mM for 1 h.

Mitochondrial Membrane Potential Loss

After 16 h treatment with SV37, supernatants and trypsinized cells were collected, centrifuged 5 min at 1200 rpm and resuspended in PBS containing 50 nM MitoTracker® Red for 25 min at 37°C. Doxorubicin (Sigma–Aldrich) (100 nM) was used as a control.

Cell Lysate Preparation and Immunoblotting

Cells were plated at a density of 1×10^6 in 100-mm dishes and grown for 24 h. Then, the medium was replaced by fresh medium containing the compound or the solvent alone (DMSO 0.5% v/v). Cells were then scraped and lysed for 30 min on ice in RIPA buffer (NaCl 150 mM, Tris–HCl 50 mM pH 8, Nonidet/NP-40 1% v/v, sodium deoxycholate 0.5% m/v, sodium dodecyl sulfate 0.1% w/v) supplemented with protease/phosphatase inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail [Sigma–Aldrich] 1%, PMSF 1 mM, NaF 10 mM, and Na_3VO_4 1 mM); then cells were centrifuged (12 000*g*, 15 min, 4°C) and lysate supernatant was harvested. For histone extraction, cells were incubated on TEB buffer (PBS containing: 0.5% Triton X100 [v/v], 10 mM sodium butyrate) supplemented with protease/phosphatase inhibitors described above. Then cells were centrifuged (12 000*g*, 15 min, 4°C) and pellet was resuspended in 0.2 M HCl solution and incubated overnight at 4°C for acidic extraction. Finally, cells were centrifuged (12 000*g*, 15 min, 4°C) and lysate supernatant was harvested. After Bradford protein dosage, protein lysate was separated on a SDS–PAGE gel and transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (GE Healthcare).

Washing, antibody dilutions, and blocking dilutions were made in Tris buffer saline (TBS)-Tween buffer. Blocking solution and solutions used for dilution of antibodies were composed of TBS-Tween buffer added with 5% non-fat milk (w/v), except for anti-phopho-CDK1, anti-phospho-CDK2, and anti-phospho-histone 2AX (H2AX) where non-fat milk was replaced by 5% BSA (w/v).

Antibodies

Immunoblotting of phospho-CDK proteins were realized by using anti-phospho-CDK1 (pTpY14/15) diluted 1:1000 (ref. 44686G, Invitrogen) and anti-phospho-CDK2 (pT14) diluted 1:1000 (ref. CDK12351, Epitomics, Bio-Connect, Huissen, The Netherlands). Immunoblotting of apoptosis markers were realized by using anti-caspase 3 diluted 1:1000 (ref. 56053, Cell Signaling, Bioké, Leiden, the Netherlands), anti-caspase 7 diluted 1:1000 (ref. 9494, Cell Signaling). Anti-poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) diluted 1:2000 (ref. 7150, Santa Cruz, Heidelberg, Germany) was used for PARP cleavage detection. Immunoblotting of human histone H2AX phosphorylated form were realized by using anti-phospho-H2AX (Ser139) diluted 1:4000 (ref. 05-636, Millipore, Overijse, Belgium). Anti-β-actin diluted 1:10 000 (ref. A5441, Sigma–Aldrich) was used as loading control.

Primary antibodies were detected by using horseradish peroxidase-donkey anti-rabbit antibody 1:5000 (ref. 2313, Santa Cruz) or horseradish peroxidase-goat anti-mouse antibody 1:5000 (ref. 2005, Santa Cruz) Densitometric analysis was performed using ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) with ECL Prime Western blotting reagent (Amersham, GE Healthcare).

Statistics and Analytical Models

IC_{50} determined by in vitro fluorimetric assays were evaluated with sigmoid curves plotted by using a nonlinear approximation model based on the least square method (GraphPad Prism software, La Jolla, CA).

Data are presented as mean of at least three independent experiments $\pm$ SD. The Student's *t*-test was used to determine statistically significant means. The level of significance was defined as $^{***}P$-value < 0.005; $^{**}P$-value < 0.01; $^{*}P$-value < 0.05.

Quantification of Western blot signals was realized by area measurement by using ImageJ image processing software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD).

RESULTS

Synthesis of a Hybrid Coumarin–Quinone Derivative, SV37

We recently synthesized various coumarin-based derivatives and tested their activity against CDC25 [35]. Best activities were obtained when coumarin moiety was carrying a methoxy group or a hydroxy group in position 7. Considering this framework and considering quinonoid inhibitor structures already described in the literature [36–39], we decided to investigate whether condensation of the corresponding methylthiol derivative (a) (Figure 1A) to a quinone was able to generate novel active compounds. Compound (a) was prepared from the chloromethyl derivative (1) by condensation with thiourea and followed by basic hydrolysis (Figure 1A). Thiol (a) was then condensed with naphtoquinone (b) in ethanol at room temperature to generate compound SV37 (Figure 1B). Thiol and naphtoquinone were tested for their activity against CDC25 alone, in order to exclude bioactivity deriving from only one or the other part of the final molecule.

Evaluation of In Vitro CDC25 Inhibition

SV37 was found to inhibit recombinant full length CDC25A, B, and C with IC_{50} between 1 and 9 μM (Table 1). Truncated CDC25B containing only the active site of the catalytic domain displayed an IC_{50} value three to four times higher compared to the other CDC25s, suggesting that the interaction of the inhibitor with the enzyme may occur not only at the active site but also required the regulatory domain. As a control, inhibition by SV37 was compared to the effect of its coumarinic (a) and quinonoid (b) subparts (Table 1). Results showed no or weak effect of the coumarinic part alone ($IC_{50} > 100\ \mu$M), whereas the quinone moiety alone as well as SV37 showed comparable IC_{50}. Results suggest that the quinonoid moiety is mainly responsible for the inhibition of CDC25 isoforms by SV37.

Characterization of Interaction Between SV37 and CDC25A

The reversible/irreversible fixation mode of the compound in vitro was evaluated by a previously described dilution method [22]. CDC25A recombinant proteins were pre-incubated for different times with a strongly inhibitory concentration of SV37 (22 μM). Then the mix was diluted in order to obtain a weakly inhibitory concentration (0.12 μM). Positive (assay treated at 22 μM without dilution) and negative (assay treated at 0.12 μM without dilution) controls serve as reference. It is expected that an irreversible inhibitor may not liberate the enzyme after dilution whereas a reversible inhibitor may be able to free the enzyme that will recover its activity. Results suggest that SV37 acts as a reversible inhibitor as the activity was almost totally recovered after dilution (Figure 2A).

Similar results were found by direct MALDI-TOFMS screening (Figure 2B). In positive MALDI-TOFMS, the signal corresponding to the molecular ion ($M^{\bullet+}$) of

Table 1. In Vitro IC50 Values of SV37 and Its Moieties for CDC25 Isoforms

	IC_{50} (μM)		
	SV37	Quinone moiety	Coumarin moiety
CDC25A full form	4.3 ± 0.4	0.96 ± 0.04	>100
CDC25B full form	$9.1 \pm 0.7^{*}$	1.8 ± 0.44	>100
CDC25B truncated form	$45.5 \pm 8^{*}$	ND	ND
CDC25C	0.9 ± 0	0.17 ± 0.02	>100

ND, not determined.
$^{*}P$-value < 0.05.

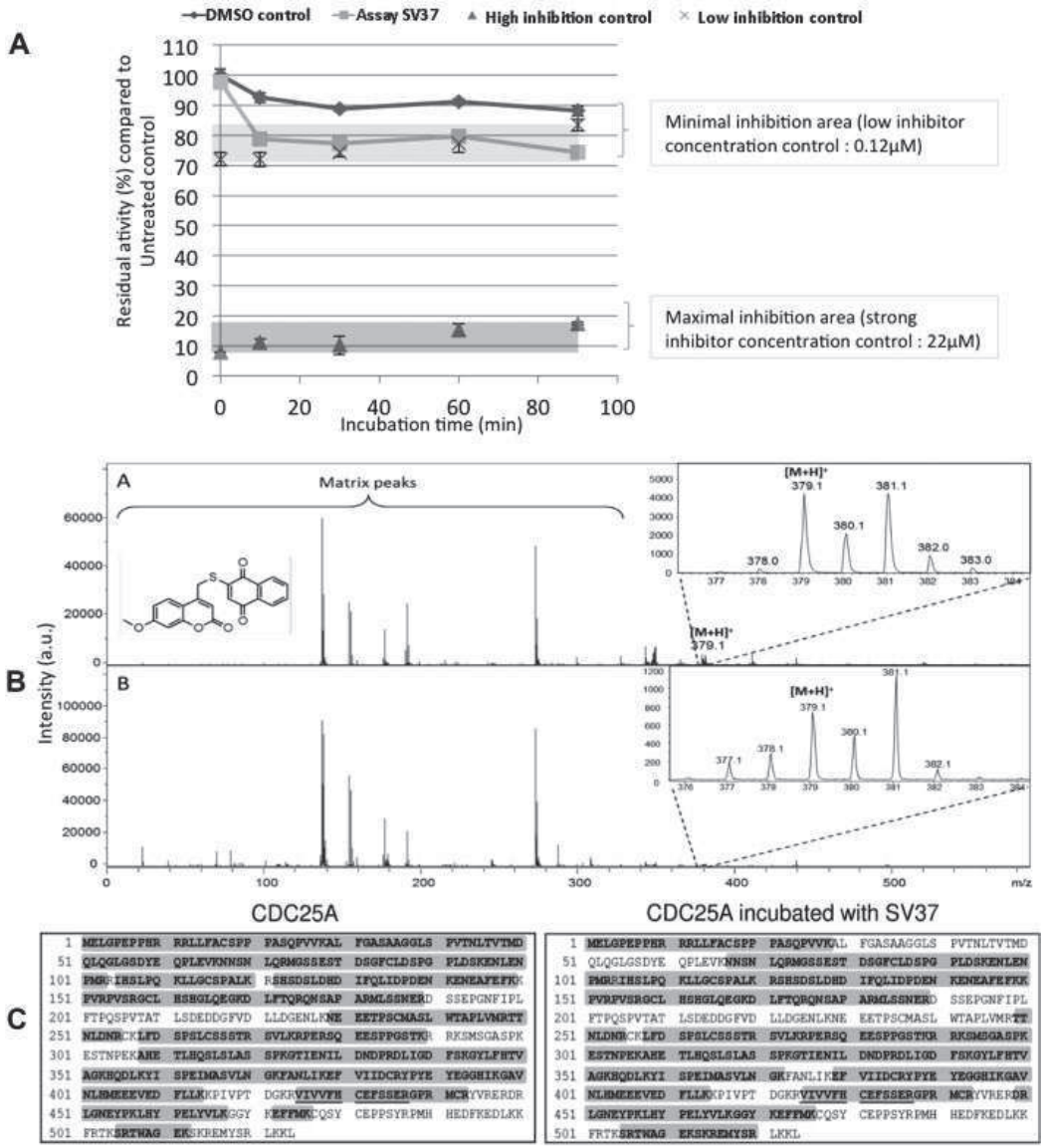


Figure 2. (A) Reversibility of SV37 against CDC25A. CDC25A was incubated with DMSO or SV37 for various times, and then diluted 180-fold, residual phosphatase activity was evaluated by fluorimetric assay. Negative and positive controls were used to define two areas of minimal and maximal inhibition. Results suggest a reversible fixation of SV37 on CDC25A. (B) MALDI-TOF mass spectra (reflectron mode) of SV37 (DHB matrix, C = 2.10-4M) on upper panel, and CDC25A incubated with SV37 on lower panel. The ion m/z 378.1 is corresponding to $M^{\bullet+}$ and m/z 377.1 is due to a hydrogen loss. The difference between the two ion patterns is due to the difference of laser energy between the standard and the incubated sample. The standard is obtained with 20% of the laser energy whereas 40% is required for the incubated sample. At higher laser energy, fragmentation of the [M + H]+ increases. Consequently, the relative abundance of m/z 379 is decreasing whereas m/z 377 is increasing. Meanwhile, the intensity of the m/z 378 ([$M^{\bullet+}$]) is also increasing at higher energy. (C) Peptide sequence obtained after PMF study of CDC25A (left panel) and CDC25A screened with SV37 (right panel). Bold letters highlighted with a gray background correspond to identified peptides; the active site of the protein is underlined.

SV37 can be observed at m/z 378.1 and m/z 379.1 for the $[M+H]^+$ ion. This isotopic complex corresponds to the pattern observed by Calba et al. [40] for electron-rich compounds (spirooxazines) and the abundant M + 2 and M + 3 ions were attributed to hydrogenated ions $[M+H_2]^{\bullet+}$ and $[M+H_2+H]^+$. Direct MALDI-TOFMS spectrum obtained after the screening with CDC25A presents the typical ion profile of SV37 obtained with matrix (the $M^{\bullet+}$ is more abundant). Such results characterize potential

reversible inhibitors. This behavior is confirmed by the PMF study (Figure 2C) which shows that the active site is still detected in PMF for free CDC25A and for CDC25A incubated with SV37. This means that there is no compound bound to the active site, and that SV37 was reversibly linked to the protein.

The kinetics study (Figure 3) of CDC25A inhibition by SV37 showed that K_M of CDC25 for its substrate increases and V_{max} decreases when the SV37 concentration increases (Table 2). Results are consistent with a mixed inhibition. Moreover, K_i (formation constant of the enzyme/inhibitor complex) is different from K'_i (formation constant of the enzyme/substrate/inhibitor complex) for the different concentrations of SV37. Comparison of inhibition constants suggests that the inhibitor preferentially binds to the free form of the enzyme, rather than to the enzyme-substrate complex.

Cytotoxic/Cytostatic Effect on Cells

Cell growth of MCF-7, MDA-MB-231 breast cancer cell lines compared to hTERT-HME1 breast cell line was evaluated after treatment by SV37 and its coumarin and naphtoquinone counterparts. Results showed moderate differential inhibition of cell growth for cancer cells (IC_{50} MCF-7: 9 μM and IC_{50} MDA-MB-231: 11 μM) versus the immortalized cell line (IC_{50} hTERT-HME1: 18 μM) (Table 3). Treatment with naphtoquinone shows lower IC_{50} values than with SV37, whereas coumarin does not strongly inhibit growth of MCF-7 and MDA-MB-231 cells (IC_{50} up to 100 μM for MCF-7 and around 70 μM for MDA-MB-231).

Trypan blue tests were then performed on MCF-7 and MDA-MB-231 cells in order to determine if decreased cell growth is due to cytotoxic or cytostatic effects of the compounds (Figure 4A and B). Cells were treated with DMSO alone, with SV37 at 10 or 25 μM for 0, 12, 24, 36, and 48 h. Results showed a cytostatic effect around the IC_{50} value (10 μM), starting after 12 h of treatment without noticeable cell death in MCF7. This cytostatic effect was accompanied by increased cell death in MDA-MB-231 at 24 h. A strong cytotoxic effect appears at higher concentrations (around IC_{70}: 25 μM) from 12 h in the two cell lines. Considering these results, it appears that the observed cell growth arrest is mainly due to a cytostatic effect exerted at low concentrations in MCF-7, whereas it is mainly due to cytotoxicity in MDA-MB-231. Cytotoxicity appears for higher concentrations in both cell lines.

SV37 Induces Apoptotic Cell Death

In order to investigate the underlying cell death mechanisms, we used triple negative MDA-MB-231 cells representing a form of the disease without existing efficient treatments like hormonal targeted therapies or antibody-based therapies. Therefore, inhibition of CDC25 phosphatases may constitute an interesting therapeutic approach. Morphological

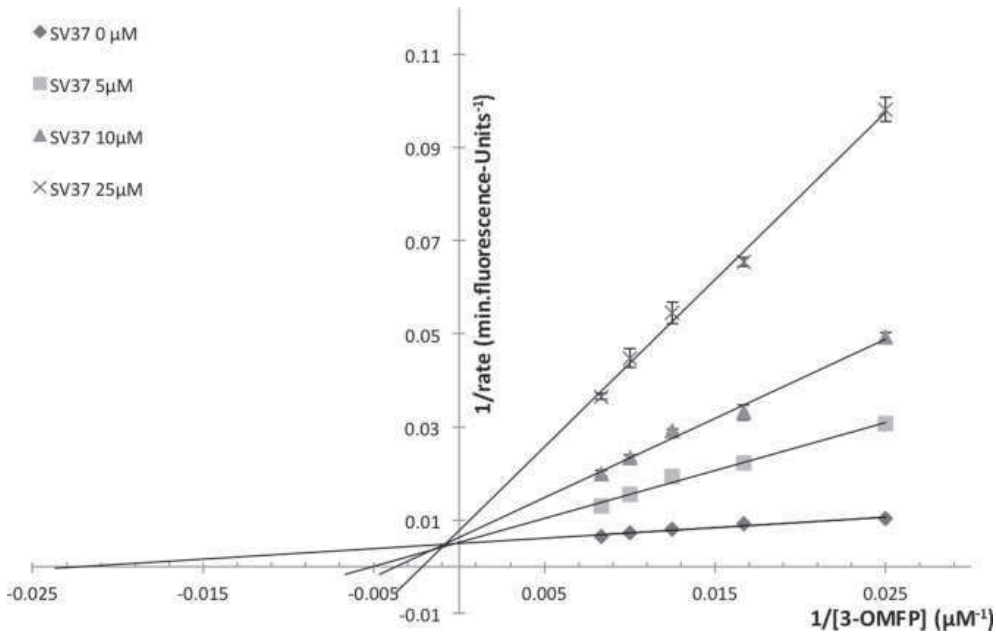


Figure 3. Kinetic analysis of CDC25 A inhibition by SV37. Lineweaver-Burk representation of four different inhibitor concentrations for different substrate values illustrates a mixed inhibition.

Table 2. Experimental Values of KM, V_{max}, K_i, and K'_i for CDC25A Inhibition by SV37

[SV37] (μM)	KM (μM)	V_{max} (UF/min)	K_i (μM)	K'_i (μM)
0	45.06	200	—	—
5	197.96	192.31	8.77	125
10	270.32	158.73	1.53	38.46
25	460.59	128.21	1.67	44.64

changes of MDA-MB-231 cells during the treatment were followed by Incucyte video microscopy. Microscopic observations (Figure 5A) showed cell-death specific cellular alterations after 5 h, culminating with a disruption of cells observed after 21 h. Observations are in agreement with cytotoxicity results obtained by trypan blue assays. In order to ascertain the type of cell death induced by SV37, specific apoptotic markers were assessed in MDA-MB-231 cells (Figure 5B). Caspase-3 and -7 cleavage occurred in cells treated with 10 μM SV37 after 16 h suggesting apoptotic cell death consistent with the results obtained in trypan blue assays.

SV37 Induces Early Generation of Reactive Oxygen Species

Considering the quinonoid-like structure of the compound, we suspected that SV37 undergoes redox cycling of quinones and could generate ROS that may account for the cytotoxic effect observed in MDA-MB-231 cells. We therefore evaluated ROS generation by flow cytometry. H2DCFDA quantification showed that maximum ROS generation appeared 15 min after treatment (Supplementary Data). Then, we evaluated the effect of a pretreatment with NAC at 10 mM for 4 h or the superoxide scavenger Tiron (10 mM, 1 h) on the ROS-eliciting ability of SV37 for 15 min at IC_{50} by using Redox Sensor Red able to detect superoxide anions (Figure 6A). Both pretreatments prevented increase of ROS. Moreover, the inhibitory effect of SV37 on MDA-MB-231 cells was prevented by pretreatment with NAC has showed by Incucyte videomicroscopy (Figure 6B); similarly, NAC prevented mitochondrial membrane potential loss, which occurs during intrinsic apoptosis (Figure 6C). These findings suggest that ROS generation directly affects cell growth and apoptosis induction in this cell line. Nevertheless, observed ROS production cannot be directly linked to DNA damage induction. Indeed, cleaved PARP-1 and phosphorylated H2AX were only detected between 16 and 28 h of treatment (Figure 6D), concomitant with caspase activation (Figure 5B) and with the appearance of cell death as observed by video microscopy (Figure 5A). This correlation strongly suggests that DNA damage is an event downstream to caspase activation and that the observed early ROS peak is not initially responsible for cellular damage.

SV37 Leads to Accumulation of pCDK

Ability of SV37 to inhibit CDC25 in cells was assessed by measuring variations in CDK phosphorylation status (Figure 7A) at time points prior to caspase activation (2, 4, and 8 h). Comparison of pCDK1/β-actin and pCDK2/β-actin ratios (Figure 7B) of treated and untreated cells showed accumulation of pCDK in cells after 4 and 8 h of treatment by SV37 at 10 μM. These results suggest an inhibition of CDC25 activity that is no longer able to dephosphorylate its CDK substrate. Measurement of CDK phosphorylation in cells pretreated with NAC showed no accumulation of pCDK (Figure 7C and D). Our results suggest a link between ROS generation by SV37 in MDA-MB-231 cells and the accumulation of pCDK. Cell death and cytostatic effect, respectively, observed in MDA-MB-231 and in MCF-7 cell lines could therefore be related to CDC25 inhibition by SV37.

DISCUSSION

CDC25 are considered promising targets for anticancer therapies since they are key enzymes for cell cycle regulation and overexpressed in cancer. Development of new CDC25 inhibitors is still needed since are no therapeutically successful pharmacophores to date [41]. Here, we describe a novel inhibitor, SV37, whose structure is based on both coumarin and quinone moieties. On one hand, quinone inhibitory capacities are no longer to demonstrate [41], and on the other hand, we recently published that specific coumarin compounds are able to inhibit CDC25

Table 3. IC50 Values for 24 h Treatment With SV37 on Cell Lines. MCF-7, MDA-MB-231 and HTERT-HME1 Cell Lines Treated With SV37, Quinone-, or Coumarin Moieties

	IC50 value (24 h)		
Cell line	SV37 (μM)	Quinone moiety (μM)	Coumarin moiety (μM)
MCF-7	$11.2 \pm 0.7^{***}$	6.1 ± 0.3	>100
MDA-MB-231	$9.5 \pm 1.0^{*}$	6.8 ± 0.4	69.8 ± 4.6
hTERT-HME1	$18.1 \pm 1.3^{***}$	5.8 ± 0.5	ND

ND, not determined.
$^{*}p$-value < 0.05; $^{***}p$-value < 0.005.

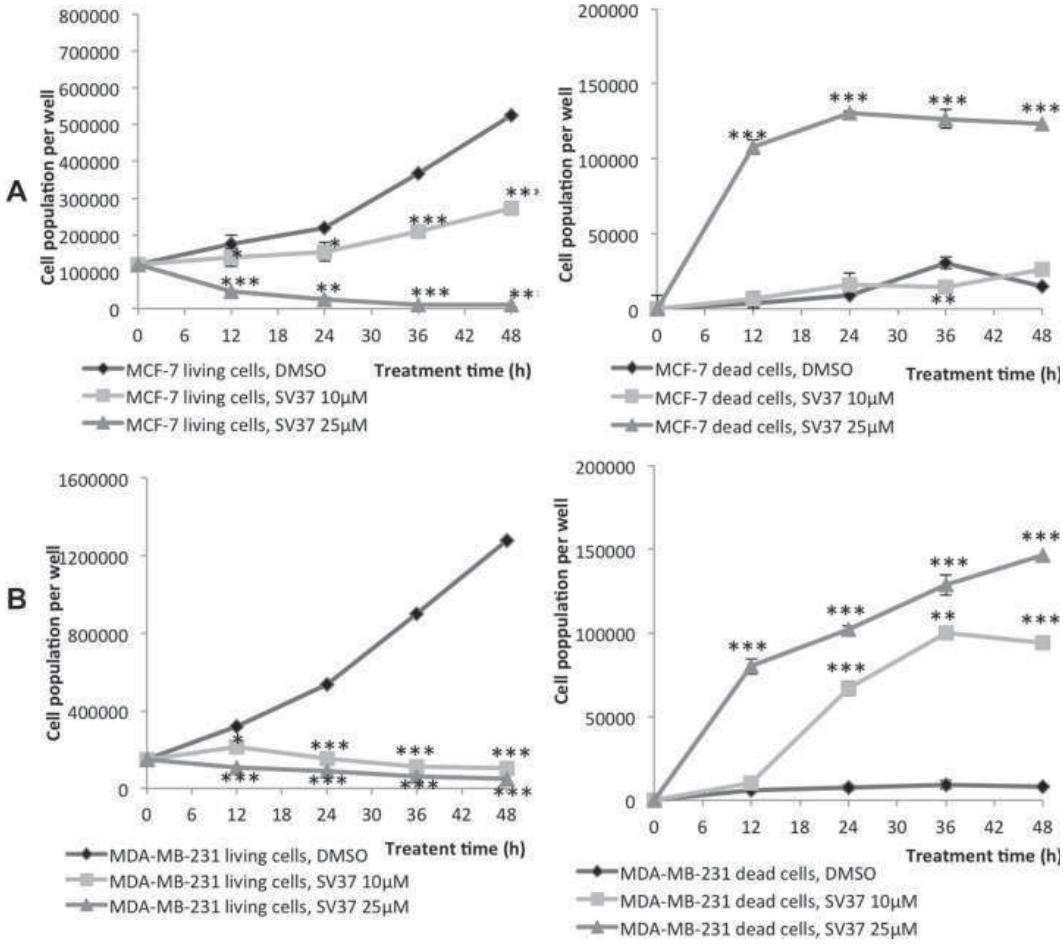


Figure 4. Evaluation of cell viability of MCF-7 (A) and MDA-MB-231 (B) cells treated with SV37 10 or 25 μM or DMSO for different times. Living cells (left) and dead cells (right) were counted by microscopy after trypan blue staining. Staining showed cytostatic effect on MCF-7 cells and cytotoxic effect on MDA-MB-231 cells treated at 10 μM. Significance was calculated for each assay versus corresponding DMSO control.

phosphatases [35]. Two chalcone–coumarin hybrids showed IC_{50} values in a low micromolar range for CDC25A and CDC25C. Here, we designed a new coumarin–quinone hybrid, SV37, with the aim to improve the inhibitory potency against CDC25s.

In vitro, 4-mercaptomethylcoumarin failed to efficiently inhibit purified human CDC25 A, B, and C ($IC_{50} > 100\,\mu M$), whereas SV37 inhibits efficiently the three isoforms (IC_{50} 1–9 μM, Table 1). The significant difference observed between the IC_{50} values obtained for full-length CDC25B and truncated CDC25B (active site only) strongly suggests that the binding of this quinone–coumarin structure may occur at the catalytic site but also needs the presence of the regulatory domain of CDC25 to develop its full inhibitory potential. Moreover, lack of the regulatory domain in the truncated protein may alter the 3D structure of the active site, preventing the substrate to easily access the catalytic pocket.

Moreover, these in vitro IC_{50} values are comparable between naphtoquinone part of SV37 and SV37 itself, in contrast to the coumarin part, which displays very weak inhibitory potential. This suggests that the active part of the compound is the quinonoid moiety. However, quinonoid compounds are known to exhibit toxicity against several tissues. It is therefore expected that the addition of the coumarinic part may decrease the cytotoxicity of the obtained derivative. In order to confirm this hypothesis, we measured growth inhibitory potential of this structure, on four different cell lines (Table 3). Evaluation of viability showed that the coumarin part does not affect cell growth. Increased viability of the immortalized non-cancerous cell line hTERT-HME1 treated by SV37 suggests an interesting differential toxicity.

As SV37 leads to a decreased viability of MCF-7 and MDA-MB-231 cells, it was important to differentiate cytotoxic and cytostatic effects. Our results reveal a

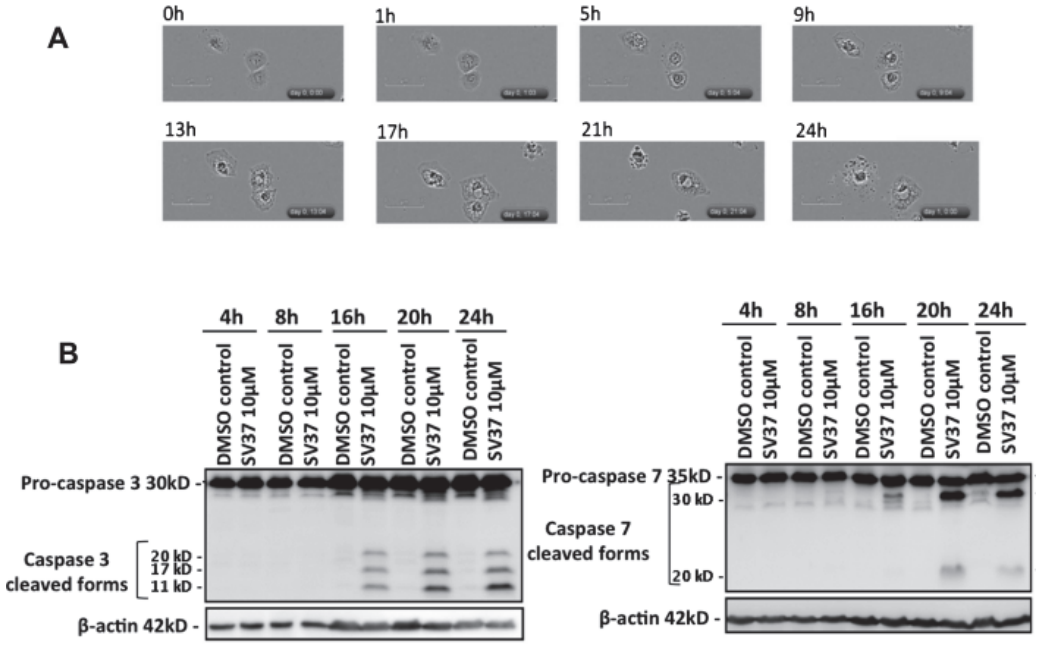


Figure 5. (A) Microscopic observation of MDA-MB-231 treated by SV37 10 μM showed morphological changes after 5 h of treatment. (B) Analysis of caspase-3 and-7 apoptosis markers in MDA-MB-231 cells treated with SV37 at 10 μM or untreated, for various treatment times underline caspase-3 and -7 cleavage after 16 h of treatment.

differential behavior towards SV37 as we observe a cytostatic effect in MCF-7 and a cytotoxic effect in MDA-MB-231 for concentrations around the IC_{50}. This dissimilarity can be explained by cell-type-specific molecular mechanisms as MCF-7 is well known to be deficient in caspase 3 [42] in opposition to MDA-MB-231. Absence of caspase 3 may clearly contribute to drug resistance. Even if its presence is

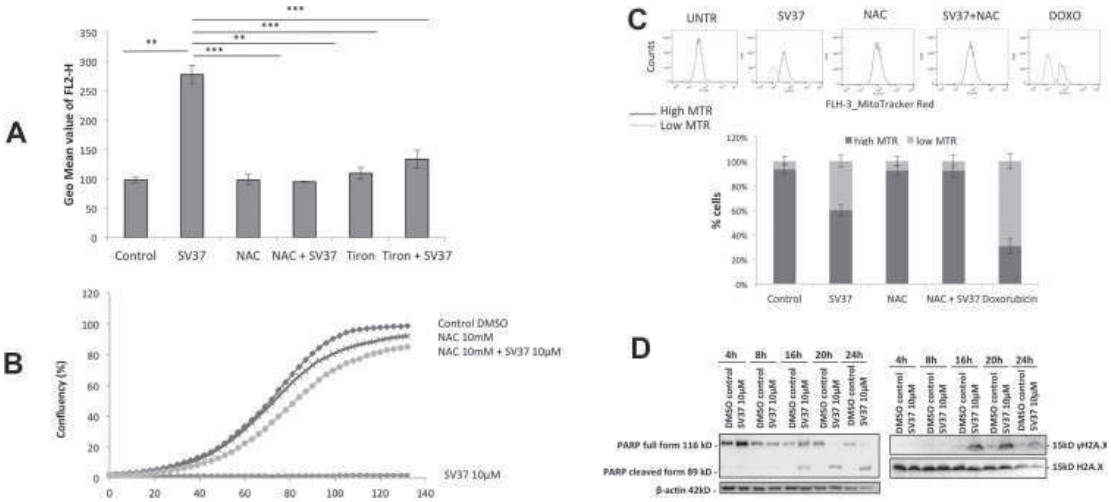


Figure 6. (A) Evaluation of ROS generation in cells pretreated with NAC at 10 mM for 4 h or Tiron at 10 mM for 1 h and treated by SV37 at 10 μM for 15 min. NAC pretreatment prevents increase of ROS signal. Significance was calculated for each assay versus corresponding DMSO control. (B) Monitoring of cell growth, by Incucyte video microscopy of MDA-MB-231 cells pretreated with NAC at 10 mM, treated with SV37 or untreated. (C) Analysis of mitochondrial membrane potential loss under indicated conditions (MTR: MitoTracker® Red). (D) Analysis of PARP and γ-H2AX markers in MDA-MB-231 cells treated with SV37 at 10 μM or untreated, for various treatment times. PARP cleavage and H2A phosphorylation indicates DNA damage.

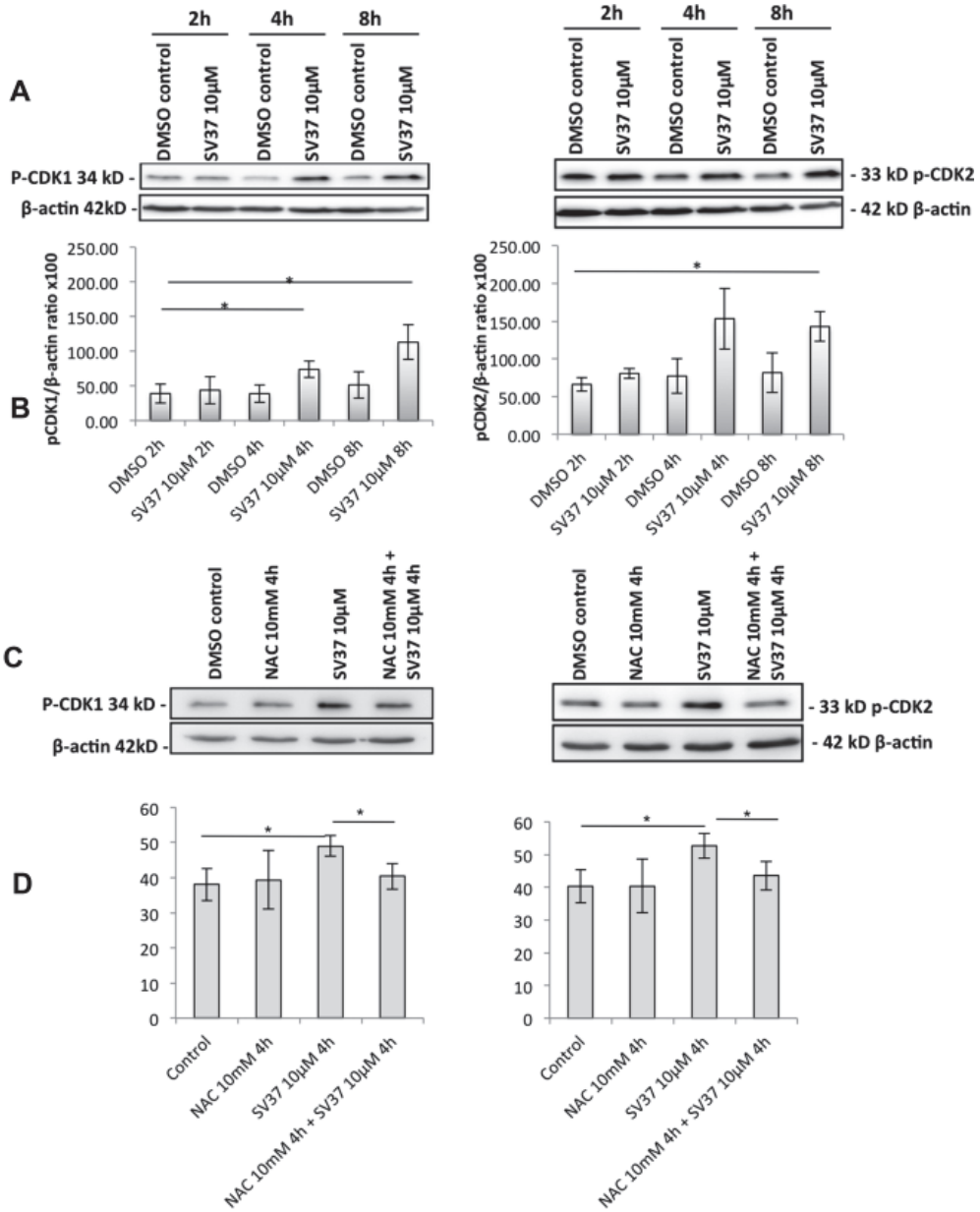


Figure 7. (A) Analysis of pCDK1 and pCDK2 levels in MDA-MB-231 cells treated with SV37 at 10 μM or untreated, for different treatment times, with (B) corresponding ratios of pCDK1/β-actin and pCDK2/β-actin. Significance was calculated for each assay versus corresponding DMSO control (values were calculated from quantification of Western blot signal). Results show an increase of CDK1 and CDK2 phosphorylation after 4 h of treatment with SV37 10 μM. (C) Analysis of pCDK1 and pCDK2 levels in MDA-MB-231 cells pretreated with NAC at 10 mM and treated by SV37 at 10 μM or untreated, for different treatment times with (D) corresponding ratios of pCDK1/β-actin and pCDK2/β-actin.

not always essential, absence of functional caspase 3 significantly alters the execution phase of the apoptotic response [42,43]. Secondly, both cell lines differ in their estrogen receptor (ER)/progesterone receptor (PR)/HER status as MCF-7 is ER+/PR+/human epidermal growth factor receptor-2− (HER2−) while MDA-MB-231 is a triple negative ER−/PR−/HER2− [44,45]. Again this difference was described to influence sensitivity of cells against chemical agents. Moreover, results of clinical trials revealed that ER negative breast cancers are more sensitive to chemotherapeutic agents than ER positive

breast cancers [46–49]. The response of MDA-MB-231 is interesting since this cell line represents triple negative basal type cancers [50] that cannot benefit of targeted therapies with hormonal treatments (successfully applied to ER+/PR+ tumors) or antibody-based therapies such as trastazumab for HER2+ tumors.

The signaling cascade triggered by SV37 is initiated by ROS generation, which may be one of the causes of CDC25 inhibition, as the compound most likely undergoes redox cycle through its quinonoid structure [25]. ROS may directly affect CDC25 structure, as the thiolate groups of catalytic cysteines of CDC25 phosphatases are highly reactive to oxidation [51,52]. This reaction step is well known and allows the formation of a disulfide bond to a backdoor cysteine, preventing the binding of substrate to the active site [52,53]. Subsequently, we observed pCDK accumulation, which is a mark of CDC25 dysfunction. The observation of ROS decrease in cells pretreated with both decreased ROS and lack of pCDK accumulation suggesting that the ROS generated by SV37 inhibit CDC25, which in turn, is no longer able to dephosphorylate CDK.

Accumulation of ROS and pCDK are followed by activation of apoptosis markers (caspases 3 and 7) and DNA cleavage (PARP and γH2AX signals). The absence of H2AX phosphorylation and PARP cleavage before the activation of caspases suggests that cell death may result from a cell cycle blockage consecutive to pCDK accumulation, rather than being the consequence of direct DNA damage induced by ROS. These events underline the potential of SV37 to inhibit CDC25 phosphatases and to induce cell death in this triple negative breast cancer cell line.

In conclusion, we describe here a coumarin–quinone structure as a potent CDC25 inhibitor. The newly designed compound showed improved differential toxicity compared to its natural counterparts. SV37 triggers cell growth inhibition in breast cancer cell lines, accompanied by generation of ROS, accumulation of pCDK and apoptosis in the triple negative MDA-MB-231 cells. Accordingly, this coumarin–quinone structure may serve as a starting point for further optimization and development of derivatives with yet improved inhibitory activity against CDC25.

ACKNOWLEDGMENTS

E.B. is a recipient of an AFR grant from the "Fonds National de la Recherche (Luxembourg)". C.C. is supported by a "Waxweiler grant for cancer prevention research" from the Action Lions "Vaincre le Cancer". S.V. and G.K. have received funding from the [European Community's] Seventh Framework Programme ([FP7/2007-2013] under grant agreement no. 215009). Research at the Laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes is supported by Région de Lorraine, Conseil Général de la Moselle, and Ligue contre le Cancer (54, 55, 57 Departmental committees). Research at the Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer is supported by "Recherche Cancer et Sang" foundation, "Recherches Scientifiques Luxembourg" association, "Een Haerz fir kriibskrank Kanner" association, the Action Lions "Vaincre le Cancer" association and Télévie Luxembourg. The authors thank the Foundation for Scientific Cooperation between Germany and Luxemburg for additional support. Further support was received from the University of Saarland, the Ministry of Economics and Science of Saarland, the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG grant JA1741/2-1) and the European Union (ITN "RedCat" 215009, Interreg IVa project "Corena"). M.D. is supported by the National Research Foundation (NRF) by the MEST of Korea for Tumor Microenvironment Global Core Research Center (GCRC) grant (grant no. 2012-0001184); by the Seoul National University Research grant and by the Research Settlement Fund for the new faculty of SNU.

REFERENCES

1. Russell P, Nurse P. cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. Cell 1986;45:145–153.
2. Fauman EB, Saper MA. Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. Trends Biochem Sci 1996;21:413–417.
3. Ducommun B, Draetta G, Young P, Beach D. Fission yeast cdc25 is a cell-cycle regulated protein. Biochem Biophys Res Commun 1990;167:301–309.
4. Rudolph J. Cdc25 phosphatases: Structure, specificity, and mechanism. Biochemistry 2007;46:3595–3604.
5. Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25B involvement in the centrosome duplication cycle and in microtubule nucleation. Cancer Res 2007;67:11557–11564.
6. Hoffmann I, Karsenti E. The role of cdc25 in checkpoints and feedback controls in the eukaryotic cell cycle. J Cell Sci Suppl 1994;18:75–79.
7. Jinno S, Suto K, Nagata A, et al. Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. EMBO J 1994;13:1549–1556.
8. Mizoguchi S, Kim KH. Expression of cdc25 phosphatases in the germ cells of the rat testis. Biol Reprod 1997;56:1474–1481.
9. Gabrielli BG, Souza CP, De Tonks ID, Clark JM, Hayward NK, Ellem KA. Cytoplasmic accumulation of cdc25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells. J Cell Sci 1996;109:1081–1093.
10. Izumi T, Maller JL. Phosphorylation and activation of the Xenopus Cdc25 phosphatase in the absence of Cdc2 and Cdk2 kinase activity. Mol Biol Cell 1995;6:215–226.
11. Zwicker J, Lucibello FC, Wolfraim La, et al. Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C, cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. EMBO J 1995;14:4514–4522.
12. Boutros R, Dozier C, Ducommun B. The when and whereas of CDC25 phosphatases. Curr Opin Cell Biol 2006;18:185–191.
13. Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: Key players? Good targets? Nat Rev Cancer 2007;7:495–507.
14. Cangi MG, Cukor B, Soung P, et al. Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer. J Clin Invest 2000;106:753–761.
15. Bonin S, Brunetti D, Benedetti E, Gorji N, Stanta G. Expression of cyclin-dependent kinases and CDC25a phosphatase is related with recurrences and survival in women with peri- and

post-menopausal breast cancer. Virchows Archiv 2006;448: 539–544.
16. Contour-Galcera MO, Sidhu A, Prevost G, Bigg D, Ducommun B. What's new on CDC25 phosphatase inhibitors. Pharmacol Ther 2007;115:1–12.
17. Ferguson AM, White LS, Donovan PJ, Piwnica-Worms H. Normal cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking Cdc25B and Cdc25C protein phosphatases. Mol Cell Biol 2005;25:2853–2860.
18. Lincoln AJ, Wickramasinghe D, Stein P, et al. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. Nat Genet 2002;30:446–449.
19. Contour-Galcera MO, Lavergne O, Brezak MC, Ducommun B, Prevost G. Synthesis of small molecule CDC25 phosphatases inhibitors. Bioorg Med Chem Lett 2004;14:5809–5812.
20. Ham SW, Park HJ, Lim DH. Studies on menadione as an inhibitor of the cdc25 phosphatase. Bioorg Chem 1997;25:33–36.
21. Kar S, Lefterov IM, Wang M, et al. Binding and inhibition of Cdc25 phosphatases by vitamin K analogues. Biochemistry 2003;42:10490–10497.
22. Sohn J, Kiburz B, Li Z, et al. Inhibition of Cdc25 phosphatases by indolyldihydroxyquinones. J Med Chem 2003;46:2580–2588.
23. Pu L, Amoscato AA, Bier ME, Lazo JS. Dual G1 and G2 phase inhibition by a novel, selective Cdc25 inhibitor 6-chloro-7-[corrected](2-morpholin-4-ylethylamino)-quinoline-5,8-dione. J Biol Chem 2002;277:46877–46885.
24. Cohen GM, d'Arcy Doherty M. Free radical mediated cell toxicity by redox cycling chemicals. Br J Cancer Suppl 1987;8:46–52.
25. Monks TJ, Hanzlik RP, Cohen GM, Ross D, Graham DG. Quinone chemistry and toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 1992;112:2–16.
26. Brault L, Denancé M, Banaszak E, et al. Synthesis and biological evaluation of dialkylsubstituted maleic anhydrides as novel inhibitors of Cdc25 dual specificity phosphatases. Eur J Med Chem 2007;42:243–247.
27. Viry E, Anwar A, Kirsch G, Jacob C, Diederich M, Bagrel D. Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases. Int J Oncol 2011;38:1103–1111.
28. Sibille E, Bana E, Chaouni W, Diederich M, Bagrel D, Chaimbault P. Development of a matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry screening test to evidence reversible and irreversible inhibitors of CDC25 phosphatases. Anal Biochem 2012;430:83–91.
29. da Silva D, Wasselin T, Carré V, et al. Evaluation of combined matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry experiments for peptide mass fingerprinting analysis. Rapid Commun Mass Spectrom 2011;25:1881–1892.
30. Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. J Natl Cancer Inst 1974;53:661–674.
31. Soule HD, Vazguez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. J Natl Cancer Inst 1973;51:1409–1416.
32. Haegen BA, Van der Shay JW. Immortalization of human mammary epithelial cells by SV40 large T-antigen involves a two step mechanism. In Vitro Cell Dev Biol 1993;29:180–182.
33. Gollahon LS, Shay JW. Immortalization of human mammary epithelial cells transfected with mutant p53 (273his). Oncogene 1996;12:715–725.
34. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55–63.
35. Valente S, Bana E, Viry E, Bagrel D, Kirsch G. Synthesis and biological evaluation of novel coumarin-based inhibitors of Cdc25 phosphatases. Bioorg Med Chem Lett 2010;20:5827–5830.
36. Brun MP, Braud E, Angotti D, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel naphthoquinone derivatives with CDC25 phosphatase inhibitory activity. Bioorg Med Chem 2005;13:4871–4879.
37. Brezak MC, Quaranta M, Contour-Galcera MO, et al. Inhibition of human tumor cell growth in vivo by an orally bioavailable inhibitor of CDC25 phosphatases. Mol Cancer Ther 2005;4:1378–1387.
38. Braud E, Goddard M-L, Kolb S, et al. Novel naphthoquinone and quinolinedione inhibitors of CDC25 phosphatase activity with antiproliferative properties. Bioorg Med Chem 2008;16:9040–9049.
39. Brezak MC, Valette A, Quaranta M, et al. IRC-083864, a novel bis quinone inhibitor of CDC25 phosphatases active against human cancer cells. Int J Cancer 2009;124:1449–1456.
40. Calba PJ, Muller JF, Hachimi A, et al. Spirooxazines as a molecular probe for the study of matrix-assisted laser desorption/ionization processes. Part I: Study of the interaction effect between the molecular probe and the matrix. Rapid Commun Mass Spectrom 1997;11:1602–1611.
41. Lavecchia A, Giovanni C, Di Novellino E. CDC25 phosphatase inhibitors: An update. Mini Rev Med Chem 2012;12:62–73.
42. Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. J Biol Chem 1998;273:9357–9360.
43. Blanc C, Deveraux QL, Krajewski S, et al. Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. Cancer Res 2000;60:4386–4390.
44. Subik K, Baxter L, Strzepek T, et al. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. Breast Cancer Basic Clin Res 2010;4:35–41.
45. Papanikolaou V, Iliopoulos D, Dimou I, et al. The involvement of HER2 and p53 status in the regulation of telomerase in irradiated breast cancer cells. Int J Oncol 2009;35:1141–1149.
46. Berry DA, Cirrincione C, Henderson IC, et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. J Am Med Assoc 2006;295:1658–1667.
47. Sui M, Huang Y, Park BH, Davidson NE, Fan W. Estrogen receptor alpha mediates breast cancer cell resistance to paclitaxel through inhibition of apoptotic cell death. Cancer Res 2007;67:5337–5344.
48. Brady-West DC, McGrowder DA. Triple negative breast cancer: Therapeutic and prognostic implications. Asian Pac J Cancer Prev 2011;12:2139–2143.
49. Ying W, Wang S, Shi J, Sun Y. ER−/ER+ breast cancer cell lines exhibited different resistance to paclitaxel through pulse selection. Med Oncol 2012;29:495–502.
50. Riaz M, Elstrodt F, Hollestelle A, Dehghan A, Klijn JG, Schutte M. Low-risk susceptibility alleles in 40 human breast cancer cell lines. BMC Cancer 2009;9:236.
51. Brisson M, Foster C, Wipf P, et al. Independent mechanistic inhibition of cdc25 phosphatases by a natural product caulibugulone. Mol Pharmacol 2007;71:184–192.
52. Rudolph J. Redox regulation of the Cdc25 phosphatases. Antioxid Redox Signal 2005;7:761–767.
53. Buhrman G, Parker B, Sohn J, Rudolph J, Mattos C. Structural mechanism of oxidative regulation of the phosphatase Cdc25B via an intramolecular disulfide bond. Biochemistry 2005;44:5307–5316.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.