



HAL
open science

Etude de l'interaction médicament/récepteur par spectrométrie de masse : mise en place et validation de nouveaux protocoles de criblage moléculaire

Paul Hannewald

► **To cite this version:**

Paul Hannewald. Etude de l'interaction médicament/récepteur par spectrométrie de masse : mise en place et validation de nouveaux protocoles de criblage moléculaire. Autre. Université Paul Verlaine - Metz, 2008. Français. NNT : 2008METZ042S . tel-01752607

HAL Id: tel-01752607

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752607>

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.



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>

Spécialité :
Chimie Physique

Présentée par :

Paul HANNEWALD

**Etude de l'interaction médicament/récepteur par spectrométrie de masse
-Mise en place et validation de nouveaux protocoles de criblage moléculaire-**

Soutenue le 27 octobre 2008, devant le jury composé de :

Pr. Jean-Claude Tabet	<i>Université Pierre et Marie Curie - Paris</i>	Rapporteur
Pr. Emmanuelle Leize-Wagner	<i>Université Louis Pasteur - Strasbourg</i>	Rapporteur
Pr. émérite Jean-François Muller	<i>Université Paul Verlaine - Metz</i>	Directeur de thèse
Pr. Benoît Maunit	<i>Université d'Orléans</i>	Examineur
Pr. Jacques Fleurentin	<i>Société Française d'Ethnopharmacologie</i>	Examineur
Pr. Laurence Charles	<i>Université de Marseille</i>	Examineur
Pr. honoraire Jean-Marie Pelt	<i>Université Paul Verlaine - Metz</i>	Membre invité

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : Le criblage.....	3
1. Pourquoi le criblage ?.....	3
a. Les besoins en santé publique et le développement de nouveaux médicaments	3
b. Notion de cibles moléculaires thérapeutiques	7
c. Notion de banques moléculaires.....	9
2. Les stratégies de criblage	10
a. Mise en place des tests de criblage.....	10
b. Organisation des campagnes de criblage.....	14
3. Le criblage moléculaire par spectrométrie de masse	15
a. La spectrométrie de masse	16
b. Les tests de criblage par spectrométrie de masse	47
c. Originalité de notre approche de criblage direct par MALDI-TOFMS ?	62
Chapitre 2 : Mise en place des tests de criblage	64
1. Organisation générale de nos tests de criblage par MALDI-TOFMS	64
2. Les cibles moléculaires choisies	66
a. La tubuline.....	66
b. La DiHydroFolate Reductase (DHFR)	73
3. Incubation des molécules à tester avec la cible moléculaire.....	78
4. Elimination des composés non liés à la cible moléculaire	79
5. Analyse des composés liés	83
a. Analyse directe par MALDI-TOFMS	83
b. Analyse par MALDI-TOFMS après traitement d'échantillons.....	84
Chapitre 3 : Développement et validation des tests.....	89
1. Optimisation de la détection MALDI-TOFMS des composés d'intérêt	89
a. Analyse de la tubuline et des molécules s'y liant.....	90
b. Analyse de la DHFR et des molécules s'y liant	97
2. Protocole de criblage primaire	106
a. Analyse directe des molécules liées à la tubuline	107
b. Analyse directe des molécules liées à la DHFR.....	114
c. Validation des protocoles de criblage primaire	118
3. Protocole de criblage secondaire	131

a. Criblage secondaire des composés liés à la Tubuline.....	131
b. Criblage secondaire des composés liés à la DHFR.....	140
Chapitre 4 : Application des tests au criblage d'extraits de plantes	147
1. Criblage de la liaison de composés naturels à la tubuline	147
a. Criblage d'extraits de Colchique.....	148
b. Criblage des extraits de Pervenche de Madagascar.....	161
2. Criblage de la liaison de composés naturels à la DHFR	194
a. Criblage des extraits de thé vert	194
Conclusion générale	208
Bibliographie.....	211
Index des figures et des tableaux.....	216
Annexes	223
Publications associées à ces travaux :	223
Autres publications :	223
Valorisation :	223
Résumé.....	224

Introduction générale

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

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

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

L'idée de base dans le développement des nouveaux médicaments actuellement est de « faire plus avec moins ». Il faut caractériser très finement les molécules à tester, et ce avec un nombre minimum de tests et en un minimum de temps pour permettre une prise de décision efficace et précoce quand à l'abandon ou la poursuite des études sur une molécule.

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

Ce travail de thèse a été effectué au sein du Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser (LSMCL) de l'Université Paul Verlaine de Metz sous la Direction de Monsieur le Professeur Jean-François Muller et le co-encadrement de Monsieur le Professeur Benoît Maunit.

Le travail de thèse présenté dans ce mémoire s'appuie sur l'expérience du laboratoire concernant l'analyse MALDI de protéines et de petites molécules (thèses de Jérôme Bour, Marc Dodeller) ainsi que la caractérisation par spectrométrie de masse d'extraits de plantes (thèse d'Audrey Hecka).

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

Ainsi, le **chapitre 1** présentera l'intérêt du criblage dans le cadre de la recherche pharmaceutique pour répondre aux besoins de santé publique actuels. Nous présenterons également les tests disponibles actuellement qui utilisent la spectrométrie de masse comme technique de détection. Ceci nous donnera l'opportunité de présenter les techniques que nous avons utilisées au cours de ces travaux.

Le **chapitre 2** décrira en détails la stratégie que nous avons mise en place et les différentes solutions que nous avons testé pour mettre un test pertinent, fiable et économiquement viable en vue de son utilisation industrielle. Nous présenterons également les deux cibles sur lesquelles a porté notre travail : la tubuline et la DiHydroFolate Reductase toutes deux impliquées dans les traitements anticancéreux utilisés actuellement.

Le **chapitre 3** regroupera quand à lui les résultats obtenus dans le cadre de la mise en place et de la validation de nos protocoles de criblages de la liaison de composés aux deux cibles choisies précédemment. Un autre point traitera de l'utilisation de ces protocoles pour atteindre des informations tant qualitatives que quantitatives sur les molécules montrant une capacité de liaison.

Enfin le **chapitre 4** s'intéressera à l'application des protocoles que nous avons mis en place en criblant des extraits de différentes plantes à la recherche molécules pouvant montrer une activité intéressante pouvant en faire de nouveaux médicaments.

Chapitre 1 : Le criblage

INTRODUCTION

Notre travail a été de mettre en place une nouvelle stratégie de criblage de la liaison de composés à des cibles thérapeutiques dans le but final de découvrir de nouveaux médicaments. Ce chapitre va ainsi présenter l'intérêt du criblage dans le cadre de la recherche pharmaceutique en définissant les besoins actuels en santé publique et les notions de cible thérapeutique et de banques moléculaires. Dans un deuxième point nous présenterons les stratégies de criblage utilisées pour leur mise en place et leur organisation en campagnes de criblage à plus grande échelle. Dans un dernier point nous nous attacherons à présenter les tests disponibles pour effectuer un criblage, par spectrométrie de masse, de la liaison, en général non-covalente, de différents composés à une cible moléculaire donnée. Ainsi, après avoir défini la spectrométrie de masse et les analyseurs utilisés au cours de cette étude, nous présenterons les différentes approches utilisées actuellement et enfin, nous détaillerons l'intérêt d'en mettre en place une nouvelle, ce qui a constitué le cœur de notre travail.

1. Pourquoi le criblage ?

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

La recherche médicale doit faire face actuellement à de grands problèmes de santé publique, au nombre desquels se trouvent les pathologies cancéreuses. En effet, le cancer représente, en Europe, la deuxième cause de mortalité, juste derrière les maladies cardiovasculaires¹.

Il existe, du fait de la gravité des atteintes cancéreuses, toute une gamme de thérapeutiques dont la place de choix est réservée à la chimiothérapie².

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

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

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

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

Le développement de nouveaux médicaments est une suite d'évènements très spécialisés qui répondent à certains critères validés par ailleurs³, pouvant prendre de 9 à 12 ans⁴. Nous allons à présent nous attacher à présenter brièvement ces différentes étapes.

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

Ainsi le développement de nouveaux médicaments peut être divisé en quatre étapes que sont la découverte du médicament, le développement préclinique, le développement clinique et la phase de mise à l'échelle de la production³.

i. La découverte de nouveaux médicaments

Le but de cette étape est de générer une **nouvelle molécule candidate** pouvant devenir une tête de série ayant des propriétés pharmaceutiques compatibles avec une évaluation préclinique (efficacité, biodisponibilité et toxicité par exemple). La stratégie globale mise en jeu lors de la découverte de nouveaux médicaments est représentée dans la Figure 1 ci-après.

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

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

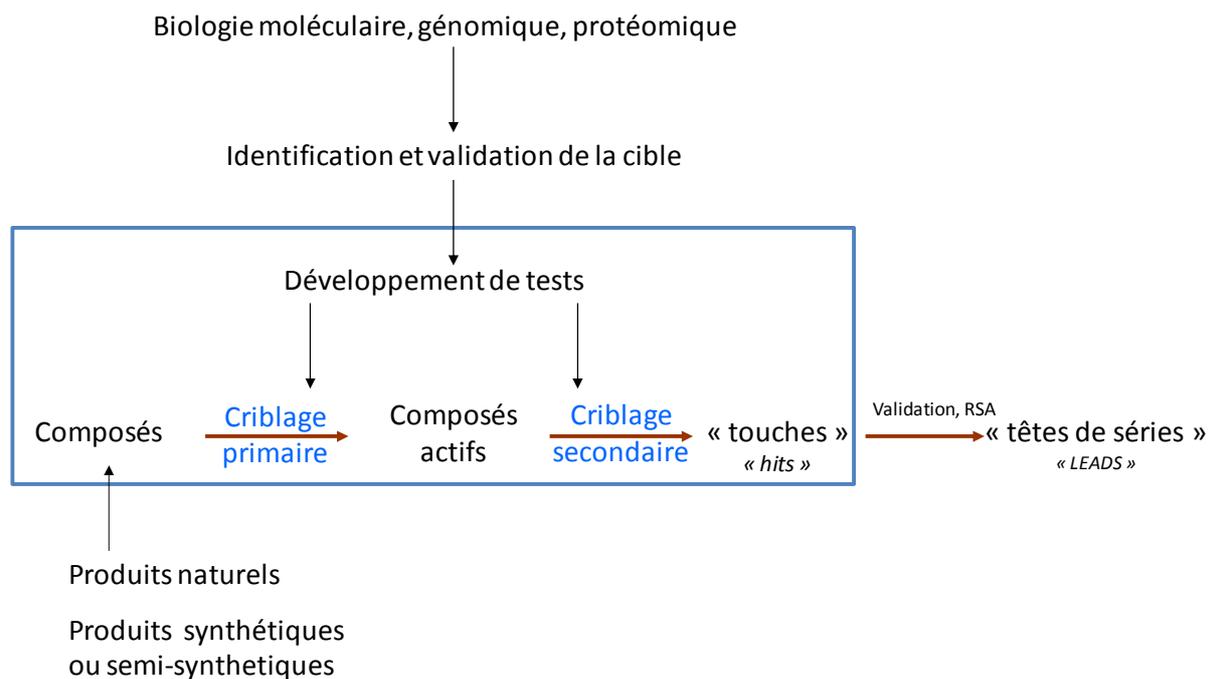


Figure 1 : stratégie de découverte de nouveaux médicaments

La découverte de nouveaux médicaments commence généralement par la recherche et l'identification d'une nouvelle **cible biologique**. Une fois la cible caractérisée et la réponse thérapeutique évaluée, il convient de mettre en place des **tests de criblage** permettant de caractériser l'activité de molécules par rapport à cette cible (dans notre cas une liaison induisant une inhibition d'activité enzymatique ou une perte de fonction biologique...). C'est ce point qui va être développé dans ce manuscrit. Une fois ces tests développés et validés, de nombreuses molécules sont évaluées, c'est ce que l'on appelle le criblage primaire. Ces molécules peuvent être aussi bien d'origine naturelle (dans un grand nombre de cas) que synthétiques. Les composés montrant une activité sont appelés « touches » (« hits »). Leurs affinités pour la cible biologique, leurs activités, leurs toxicités et leurs biodisponibilités et métabolismes sont alors évalués lors d'un criblage secondaire. Ensuite les données obtenues sont validées et les relations structures-activités (RSA) étudiées et l'ensemble permettra de prendre la décision quand à la poursuite des investigations au stade préclinique³.

Par l'essor et l'évolution des techniques d'analyses, le temps d'identification de nouveaux composés tête de série est passé de 15 mois en moyenne en 1996 à environ 6 mois actuellement^{5,6}.

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

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

ii. Le développement préclinique

Cette étape consiste en une étude approfondie de la composition du médicament ainsi que de son procédé d'obtention (procédé de synthèse ou d'extraction et de purification)³. Le développement préclinique comprend également l'obtention de données de toxicité et de pharmacocinétique *in vivo* obtenues chez l'animal permettant une évaluation précise des doses qui seront utilisées lors des premières phases d'essais clinique. Là encore, la part belle est faite aux techniques d'analyses que ce soit au niveau de la recherche du procédé de fabrication, de la formulation, du métabolisme et de la toxicité. Les molécules sont également caractérisées très finement du point de vue de leurs structures, de leurs caractéristiques chimiques et de leurs stéréochimies³.

Cette étape prend en moyenne 10 à 15 mois pour aboutir bien que de plus courts délais soient envisageables à l'heure actuelle, comprenant quoi qu'il en soit toujours au moins six mois d'étude de la stabilité du médicament en devenir⁵.

Le développement préclinique vise également à fournir les protocoles qui seront utilisés lors des études cliniques et les critères qui seront utilisés pour leur évaluation.

iii. Le développement clinique

Cette étape est divisée en trois phases (I-III) et débouche sur une demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) reconnue au niveau Européen. Chacune de ces phases met en jeu des études de pharmacocinétique, de biodisponibilité et de sécurité³.

Lors de la phase I de développement clinique, les profils pharmacocinétiques et la sécurité d'emploi des composés sont déterminés chez l'homme sain. Une fois ces données obtenues, et si les exigences en terme de sécurité sont satisfaites, le composé est appelé à entrer en phase II.

Cette deuxième étape a pour but d'établir l'efficacité des molécules testées, leur marge thérapeutique et leur tolérance, chez des patients malades. Les doses actives et les intervalles de prise sont également déterminés. Cette étape, impliquant un nombre restreint de patients, peut prendre jusqu'à un an et demi pour arriver à son terme.

La troisième étape du développement clinique (phase III) a pour but de valider l'ensemble des données relatives à l'efficacité et la sécurité d'emploi des médicaments. Ces études sont mises en œuvre sur un grand nombre de patients (entre 150 et 200 patients par étude), contre placebo et en double aveugle (ni le patient ni le clinicien qui évalue l'action du traitement ne savent si le traitement pris est un placebo ou le médicament en développement).

Si le médicament testé possède une nette efficacité par rapport au placebo une demande d'autorisation de mise sur le marché est déposée en même temps que se poursuivent les études relatives à sa fabrication.

b. Notion de cibles moléculaires thérapeutiques

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

La recherche de médicaments contre le cancer a été décrétée comme une priorité par le congrès américain au milieu des années 1950. A cette époque le criblage se faisait *in vivo* en injectant les molécules à tester à des **modèles animaux** représentatifs de tumeurs humaines⁷. Ces premières études, bien que laborieuses et coûteuses (en temps et en animaux) ont tout de même mené à quelques succès notamment dans le traitement des leucémies. Par contre aucun résultat n'a été obtenu dans le cadre du traitement des tumeurs solides. Cette conclusion a amené les scientifiques à développer des tests *in vitro*, basés sur des **lignées cellulaires** tumorales.

L'essor de certaines classes médicamenteuses agissant sur des cibles bien identifiées (certains antibiotiques et anti-inflammatoires) et aujourd'hui l'aboutissement de l'étude du génome humain tendent à favoriser une simplification des modèles de criblage, mettant à profit la notion de cible moléculaire thérapeutique. Le potentiel d'une telle approche, dite de

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

« **criblage moléculaire ciblé** »⁷, est énorme sachant que sur les quelque 500 000 protéines différentes recensées récemment, seules 120 sont ciblées par les principes actifs actuels⁴.

Une cible moléculaire thérapeutique peut être définie comme un « récepteur » sur lequel porte spécifiquement l'activité de certains médicaments. De manière simplifiée, cette cible thérapeutique peut être considérée comme une protéine reliée à une pathologie (en étant l'origine, l'expression ou l'intermédiaire)⁴. Son identification repose sur des données génomiques et sa modulation est supposée produire un effet biologique. La validation repose sur la démonstration d'un effet pharmacologique fruit de l'interaction d'un médicament avec la cible et requiert l'usage de souches cellulaires modifiées surexprimant ou non la protéine en question⁴. Ainsi la seule interaction d'une molécule avec cette cible permet d'obtenir de façon quasi assurée une activité biologique⁷.

Notre étude a porté sur deux des cibles protéiques les plus importantes dans le cadre de la thérapie des cancers : la **tubuline** et la dihydrofolate réductase ou **DHFR**⁸. Ces protéines, leurs intérêts biologiques et leurs places thérapeutiques seront présentées plus loin dans ce document (cf. chapitre 2). Ces cibles, et notamment la tubuline, ont été très étudiées et ont amené de grands succès cliniques surtout grâce à la mise en place du « test à la tubuline » par l'équipe de Pierre Potier en 1968⁹. Cependant, les tests de criblage portant sur ces deux cibles présentent des problèmes qui seront décrit plus avant dans ce manuscrit. C'est pourquoi nous avons choisi d'organiser notre recherche autour de ces deux cibles, avec l'objectif de pouvoir fournir, à terme, une alternative robuste.

La tendance actuelle est l'utilisation de cibles thérapeutiques propres aux cellules cancéreuses, permettant d'obtenir une sélectivité des traitements très intéressante⁷. Des succès récents dans ce cadre ont amené à la mise sur le marché de médicaments innovants sélectifs de certains types de tumeurs comme par exemple le Gleevec[®] (Imatinib mesilate) ciblant la kinase Bcr-Abl uniquement exprimée lors des leucémies myéloïdes chroniques ou encore l'Iressa[®] (Gefitinib) ciblant spécifiquement le récepteur au facteur de croissance épithelial EGFR¹⁰.

⁸ (8) Malpas, J. S.; Rohatiner, A. *advances in oncobiology* **1996**, *1*, 317.

⁹ (9) CNRS, C. d. p. d. Pierre Potier, médaille d'or du CNRS, 2005.

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

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

c. Notion de banques moléculaires

De nouveaux médicaments sont recherchés en testant un très grand nombre de composés répartis en banques moléculaires ou librairies. Il existe à l'heure actuelle deux sources majeures pour créer et enrichir les librairies : la **chimie combinatoire** et les **sources naturelles**. Le but visé lors de la création de ces banques de molécules est d'obtenir une diversité structurale très importante. L'usage de la chimie combinatoire et des techniques de synthèse automatisées actuelles permettent d'obtenir un très grand nombre de composés, en peu de temps³. Cependant, de telles techniques ne permettent pas d'atteindre facilement la variété structurale nécessaire à la pertinence des recherches de nouveaux médicaments, et en réalité, le pouvoir de la chimie combinatoire est plutôt mis à profit lors de l'optimisation des médicaments (études de relations structure-activité par exemple)⁴.

Au contraire, les sources naturelles offrent une très grande gamme de diversité structurale et bien que généralement considérées comme plus difficiles à utiliser, les banques moléculaires d'origines naturelles ont permis d'aboutir à de grand succès thérapeutiques^{4,7}. Les sources naturelles de molécules regroupent les plantes, les organismes marins et terrestres aussi bien que les cultures microbiennes et les champignons. Historiquement, la plus exploitée de ces sources est sans conteste le règne végétal et cette dernière continue d'offrir des opportunités majeures car à l'heure actuelle seuls 5% des espèces de plantes ont été étudiées chimiquement. Cependant, l'usage de sources naturelles de molécules présente d'importants challenges tels que la caractérisation des molécules extraites ainsi que le problème récurrent de « dédoublement » (dereplication), dans lequel une même molécule est testée plusieurs fois et parfois même considérée plusieurs fois comme une touche, car contenue dans plusieurs plantes^{3,4,7}. Ces différents problèmes sont actuellement nettement atténués par l'essor des techniques d'analyses telles que la spectrométrie de masse ou la résonance magnétique nucléaire couplées ou non à des techniques séparatives⁷.

Les plantes offrent un panel sans égal de molécules à tester et c'est donc naturellement que nous avons choisi d'y avoir recours. Au cours de nos études, les tests ont ainsi été appliqués pour le criblage d'extraits de différentes plantes (*Colchicum autumnale*, *Catharanthus roseus* et *Camellia sinensis*), lesquelles seront décrites en détail dans le chapitre 4.

2. Les stratégies de criblage

a. Mise en place des tests de criblage

Il existe de nombreuses approches dans le cadre des tests de criblage, et le but de ce manuscrit n'est pas d'en faire une liste exhaustive. Nous nous intéresserons spécifiquement aux tests de « **criblage moléculaire ciblé** ». Ces derniers peuvent être divisés en deux catégories, selon qu'ils requièrent ou non l'usage de cellules entières⁷. Les deux types de tests présentent des forces et des faiblesses et sont utilisés à part égale lors des campagnes de criblages^{4,7}.

Les **tests impliquant des cellules entières** présentent la cible thérapeutique dans un contexte représentatif de la réalité. Cela permet d'obtenir des informations relatives au passage membranaire, à la cytotoxicité et/ou aux interactions non spécifiques des molécules testées⁷ et donnent ainsi des informations plus en rapport avec l'activité biologique des composés testés⁴. Cependant, ce type de tests nécessite d'avoir recours à des souches cellulaires, difficiles d'emploi¹¹ et devant souvent être génétiquement modifiées pour exprimer de manière importante la cible protéique et/ou des protéines associées créant une cascade réactionnelle en réponse à la liaison d'un composé à la cible (dans le cas des récepteurs couplés aux protéines G par exemple). Ces tests sont donc assez coûteux, car ils nécessitent un équipement permettant de mener à bien des cultures cellulaires⁴, et ne sont pas compatibles avec un haut débit de criblage (peu de molécules analysées en un temps donné). De plus, quand une « touche » est obtenue avec ce type de tests, il convient de la caractériser par d'autres techniques pour préciser plus finement son mode d'action⁷.

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

Nous avons choisi de développer des **tests n'ayant pas recours à des cellules entières**. En effet, ce type de test est plus particulièrement compatible avec une détection par spectrométrie de masse^{3,12}. De plus, ils sont beaucoup plus simples à mener à bien, donnent des résultats très précis et sont compatibles avec une automatisation importante et un haut débit de criblage⁷. La cible moléculaire est dans ce cas utilisée en absence de tout autre élément pouvant interférer et les résultats obtenus sont non ambigus quand à l'activité des molécules testées. Cependant, certains de ces tests nécessitent l'usage de tampons et de milieux réactionnels (notamment dans le cadre du suivi de réactions enzymatiques) qui peuvent influencer de manière très importante la réponse. De plus ces tests nécessitent de disposer en quantités suffisantes des cibles moléculaires ou cibles thérapeutiques. Il convient alors de les acheter avec un coût retentissant sur le coût du test, ou de les extraire et de les purifier à façon, ce qui nécessite un savoir faire et un équipement conséquents.

Une fois le type de test à développer arrêté, il convient de suivre une démarche étape par étape pour sa mise en place (Figure 2).

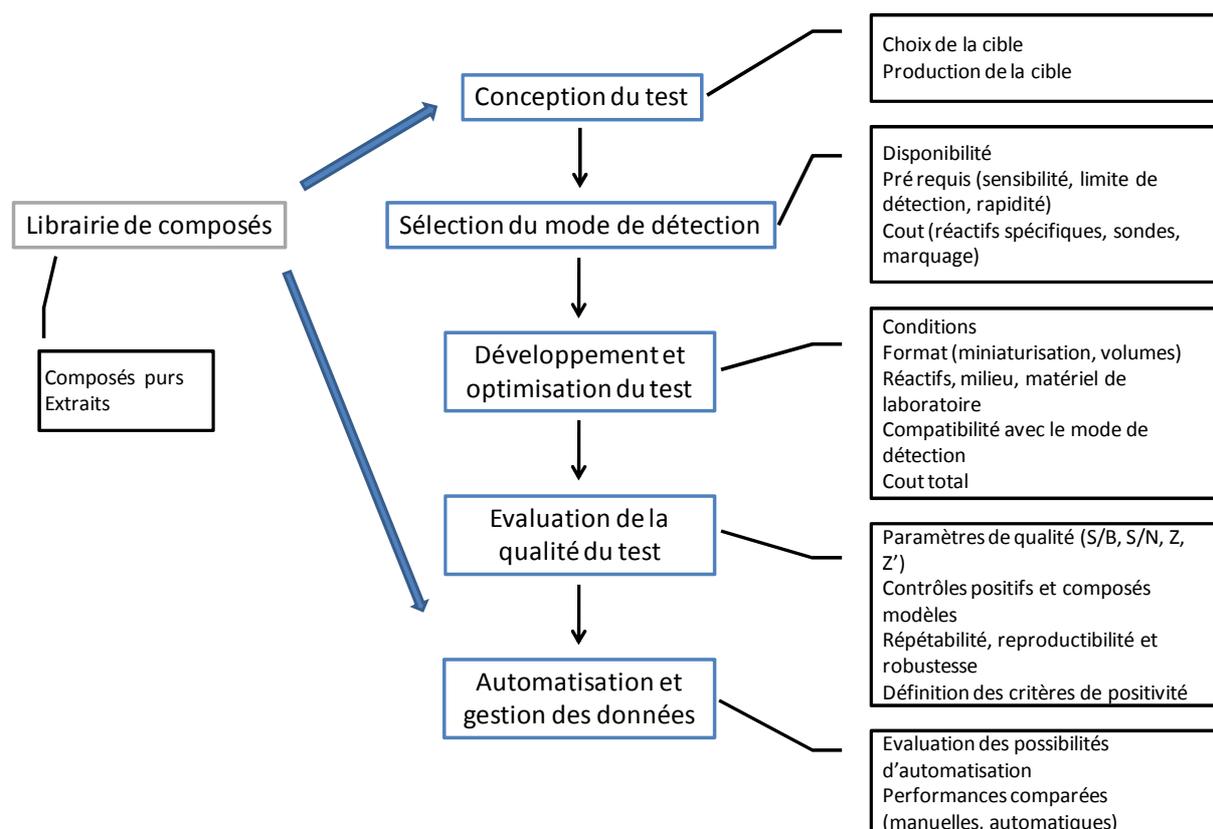


Figure 2 : Schéma des facteurs impliqués dans le développement de tests de criblage moléculaires ciblés⁴

¹²

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

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

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

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

Une fois le test mis en place, il convient, lors de la **quatrième étape**, de le valider et de déterminer la qualité des informations qu'il permet d'atteindre. L'étude de composés modèles (contrôles positifs et négatifs) est suivie d'une évaluation de la répétabilité, de la

reproductibilité et de la robustesse du test. Cette étape nécessite aussi de déterminer les critères objectifs qui permettront d'en affirmer la positivité, en donnant confiance dans les résultats obtenus pour faciliter la prise de décision sur les molécules testées. Cette étape implique aussi le calcul de certains paramètres de qualité permettant d'évaluer la valeur du test et de le comparer à d'autres, de manière objective⁴. Les différents paramètres de qualité sont regroupés dans la Figure 3 ci-dessous, avec X_S et SD_S représentant la valeur moyenne et d'écart type du signal obtenu pour le contrôle positif donnant le signal le plus intense et X_B et SD_B représentant la valeur moyenne et l'écart type du signal obtenu pour un contrôle négatif (le signal correspondant au bruit de fond de la technique de détection choisie).

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

Figure 3 : équations permettant le calcul des différents paramètres de qualité

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

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

Tableau 1 : catégorisation des tests de criblage en termes de qualité évaluée par le facteur Z

La valeur de Z est une valeur théorique obtenue pour un échantillon positif permettant d'atteindre la réponse maximale du détecteur utilisé. Dans certains cas cependant, cette valeur est difficile à évaluer et on lui préférera alors une valeur de Z', calculée à partir des données recueillies pour un échantillon donnant une réponse positive.

De plus outre les critères de qualité de l'information pouvant être obtenue sur des composés lors de leur criblage, un test se doit d'être robuste, rapide, précis, sensible et reproductible et ne doit pas être trop coûteux⁴. Les données relatives à cette quatrième étape obtenues pour les tests que nous avons développés seront présentées en chapitre 3.

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

b. Organisation des campagnes de criblage

Généralement une campagne de criblage se déroule en au moins **deux étapes** comme le montre la Figure 1. La première vise à faire passer les molécules à tester sur un premier test dit de « **criblage primaire** » qui permet d'obtenir des informations qualitatives sur les

composés testés. Dans le cas du criblage par rapport à une cible moléculaire, la première étape peut se résumer à discriminer les molécules testées entre celles interagissant et celles n'interagissant pas avec la cible. En d'autres termes cette première étape de criblage permet de déterminer si oui ou non une molécule interagit avec une cible moléculaire définie⁷.

Une fois cette première étape effectuée, les molécules montrant une activité sont ensuite soumises à un deuxième test de « **criblage secondaire** » visant à quantifier leur activité. En effet, une interaction avec une cible ne se traduit pas nécessairement par l'effet escompté et il convient de caractériser plus finement l'activité des composés issus du criblage primaire. Les molécules répondant aux critères désirés en termes d'activité sont appelés des touches⁷.

Ainsi, une stratégie globale de criblage passe par une étape de criblage primaire, « qualitative », suivie d'une étape de criblage secondaire « quantitative ». Il peut également convenir d'étudier la spécificité d'un effet en testant les touches sur d'autres cibles proches ou présentant une affinité croisée pouvant amener à des effets secondaires rédhitoires⁷.

3. Le criblage moléculaire par spectrométrie de masse

Nous avons travaillé à mettre au point des tests de criblage moléculaires (n'utilisant pas de cellules) et recourant à la spectrométrie de masse comme technique de détection. En effet, après une phase d'incubation (contact entre la cible moléculaire protéique et les molécules à tester dans un milieu permettant une liaison), vient une étape de détection des molécules liées. Cette détection peut se faire par différentes techniques sensibles (fluorescence ou colorimétrie pour les tests de type ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)) mais aussi par la spectrométrie de masse. Il conviendra alors de parler de **tests de criblage par spectrométrie de masse**.

Les tests que nous avons développés impliquent une détection par Spectrométrie de Masse couplée à la Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI-MS) des molécules liées à différentes cibles moléculaires protéiques. Ainsi, après une présentation de la spectrométrie de masse et des différents modes d'ionisation et des analyseurs que nous avons utilisés, nous allons exposer les différents types de tests de criblage par spectrométrie de masse utilisés jusqu'à présent.

a. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse de pointe permettant de déterminer les analytes en fonction de leurs masses moléculaires. Le fonctionnement d'un spectromètre de masse repose sur l'action d'un champ électromagnétique sur une particule chargée. L'analyse par spectrométrie de masse nécessite par conséquent la formation initiale d'ions, en phase gazeuse, à partir de l'échantillon.

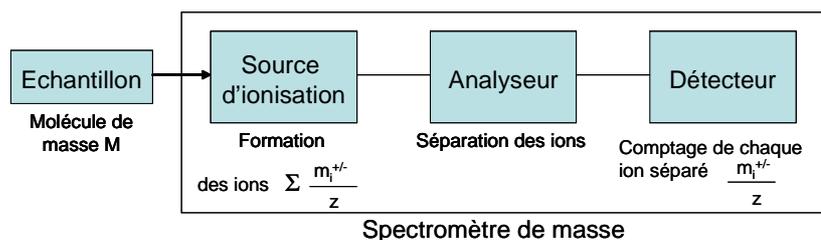


Figure 4 : Éléments constitutifs d'un spectromètre de masse

Lorsqu'un échantillon est introduit dans un spectromètre de masse (Figure 4), il est éventuellement vaporisé, avant d'être transformé en ions de masses distinctes. L'analyseur permet ensuite de trier cet ensemble d'ions, de mesurer leurs masses, de déterminer leurs abondances et, éventuellement, de les fragmenter pour produire d'autres ions de plus faible masse. Nous allons ainsi présenter dans un premier temps les grandeurs utilisées en spectrométrie de masse, puis nous nous intéresserons aux différentes étapes mises en jeu lors d'une telle analyse : les modes d'ionisation (MALDI et ESI), l'analyse des ions formés (par TOFMS et FTICRMS) et l'éventuel couplage à des techniques séparatives (HPLC). A chaque étape nous nous attacherons à présenter les méthodes et les appareils utilisés au cours de nos travaux.

i. Grandeurs utilisées en spectrométrie de masse

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

- La **masse d'un ion** peut s'exprimer en masse exacte et en masse nominale. La masse exacte d'un ion s'exprime en unité de masse atomique, notée u ou u_{ma} , et dont la valeur ($1,66054 \cdot 10^{-27}$ kg) est par définition égale à $1/12$ de la masse de l'isotope ^{12}C du carbone.

Cette unité est également dénommée dalton (symbole Da) bien que cette dénomination n'ait pas été adoptée par l'IUPAC. La masse nominale est égale à la somme des masses unitaires des atomes constituant la molécule ou l'ion.

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

ii. Modes d'ionisation

Il existe un large éventail de méthodes qui permettent d'ioniser des échantillons. Le choix de la technique à utiliser dépend de la nature de l'échantillon (minéral, organique ou bio-organique), de leur état physique (gazeux, liquide ou solide). Selon l'information recherchée (ion moléculaire, pseudo-moléculaire, fragmentation plus ou moins intense), il sera possible d'utiliser une méthode plus ou moins douce. Les principales techniques d'ionisation utilisées dans le cadre de l'analyse de composés biologiques sont la désorption/ionisation laser assistée par matrice (**MALDI**) et l'électronébulisation (**ESI**).

1. La technique MALDI

Dans ce paragraphe nous allons décrire le principe de la technique de désorption/ionisation laser assistée par matrice, les modes d'échantillonnages et les paramètres influençant la réponse MALDI. Dans un deuxième temps nous nous attacherons à décrire plus précisément les matrices et échantillonnages utilisés au cours de nos travaux.

La technique MALDI (matrix assisted laser desorption/ionisation) consiste en la co-cristallisation de la molécule à analyser avec une matrice constituée de petites molécules organiques. Ces dernières vont absorber l'énergie apportée par un impact laser et la retransmettre à l'échantillon sous forme de protons labiles, impliquant la formation d'adduits protonés chargés¹³.

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

Cette technique repose sur le principe de la désorption/ionisation dont l'énergie est apportée par des photons émis par un laser (de longueur d'onde généralement dans l'UV de 180 à 450 nm). Ces photons viennent frapper l'échantillon sous forme condensée (un dépôt solidifié constitué de cristaux de matrice dans lesquels sont contenus les échantillons) et entraînent la vaporisation et l'ionisation de molécules présentes dans le dépôt. La matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie du faisceau laser incident. L'énergie transmise par le laser est absorbée par la matrice, et cet apport d'énergie provoque son expansion en phase gazeuse en entraînant les molécules d'échantillon. Ce phénomène ne mène à un processus d'ionisation que dans certaines conditions d'irradiance du laser incident, dites « **fenêtre MALDI** » comme le montre la Figure 5 ci après.

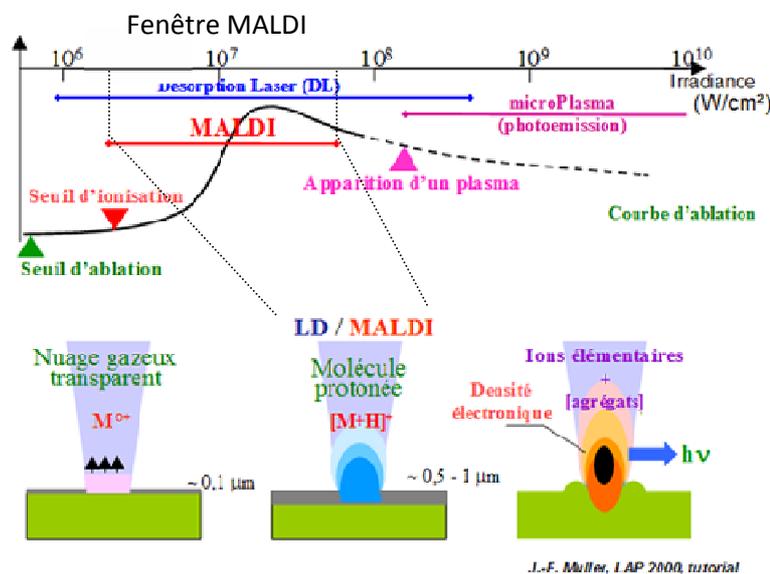


Figure 5 : illustration de la courbe d'ablation et de la "fenêtre MALDI" en fonction de l'énergie du laser incident

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

carboxyliques ou hydroxyliques) de la matrice, du solvant, voire de l'échantillon lui-même, ainsi que les protons non labiles de la matrice semblent être impliqués¹⁴.

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

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

- Avoir une masse moléculaire faible afin que ses adduits ou/et ses fragmentations soient les plus faibles possibles.
- Favoriser la séparation et une distribution homogène des molécules de l'échantillon pour réduire les forces intermoléculaires entre celles-ci. En entourant les molécules de l'échantillon, la matrice préserve l'échantillon d'une dégradation photochimique d'une part lors des impulsions laser, tout en étant inerte chimiquement vis-à-vis du composé étudié et d'une dégradation thermique d'autre part grâce à des interactions spécifiques comme des liaisons hydrogènes.
- Etre compatible avec un milieu de solvation identique à celui de l'échantillon, pour un bon transfert d'énergie et pour une cocrystallisation homogène et complète.
- Absorber préférentiellement la longueur d'onde du laser d'ionisation et ainsi limiter les phénomènes d'adduits. Elle constitue ainsi, un centre de transfert d'énergie entre le

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

rayonnement laser et le composé analysé. Elle favorise ainsi l'ionisation en induisant notamment des transferts de protons de la matrice vers l'échantillon.

- Présenter une faible enthalpie de sublimation avec toutefois une vitesse d'ablation relativement importante, afin de créer un jet supersonique permettant la codésorption des molécules cibles.

À la vue de tous ces critères, il est évident qu'une matrice universelle n'est pas envisageable et parmi les nombreux composés possédant ses caractéristiques, seul un nombre restreint donne de bons résultats. Un exemple des matrices MALDI les plus utilisées est présenté en Tableau 2 ci-après. Ce tableau regroupe les abréviations, noms, structures, affinités protoniques et applications majoritaires de différentes matrices.

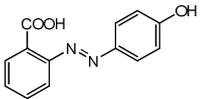
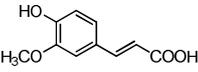
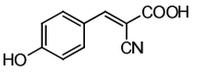
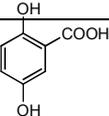
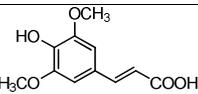
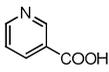
Abréviation	Nom(s)	Structure	Affinité protonique (Kcal.mol ⁻¹)	Longueur d'onde optimale	Applications
HABA	Acide 2-(4-hydroxyphenylazo)-benzoïque		183±2	337/355	Peptides, protéines, glycoprotéines, polymères synthétiques, glycolipides perméthylés
FA	Acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique, ou acide férulique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

Tableau 2 : matrices MALDI couramment utilisées ¹³

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

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

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

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

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

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

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

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

- Une solution d'**acide sinapinique** (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamique), abrégé SA dans la suite de ce manuscrit, à saturation (20 mg/mL) dans un mélange acétonitrile/eau (v/v), ajusté à 10% d'acide formique, à 0,1%

d'acide trifluoroacétique ou à 0,1% d'ammoniaque. Cette matrice a une affinité protonique assez forte, elle offrira donc une ionisation assez douce, très utile lors de l'étude des protéines telles que la tubuline. Elle sera également très utile pour l'étude de composés polyphénoliques en mode de détection négatif.

- Une solution d'**acide 2,5-dihydroxybenzoïque** (2,5-DHB), à 1M (154mg/mL) dans un mélange acétonitrile/eau (v/v), acide trifluoroacétique 0,1%. Cette matrice a une affinité protonique moyenne est permet la bonne ionisation d'une majorité de composés.
- Une solution d'**acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique** (HCCA, ou α -CHCA) à saturation (20mg/mL) dans un mélange acétonitrile/eau (v/v), acide trifluoroacétique 0,1%. Cette matrice a une affinité protonique très faible et permet un transfert très énergétique de protons. Elle permet de ce fait une ionisation efficace de nombreux composés, mais induit parfois la formation de fragments pouvant nuire à l'interprétation des spectres de masse.

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

Comme nous l'avons précisé précédemment, la technique MALDI est très efficace pour l'ionisation de nombreux composés mais présente le désavantage de donner des spectres assez complexes dans le domaine des basses masses. Ce phénomène est du d'une part aux pics de la matrice organique. En effet, cette molécule, responsable de l'effet MALDI et de l'ionisation de l'échantillon par transfert de protons n'est pas « transparente ». Lors d'une analyse MALDI, de nombreux pics du spectre sont dus à la matrice et peuvent parfois gêner la

détermination des espèces présentes. D'autre part, la présence de la matrice peut entraîner également une densification du spectre de masse par le fait que l'échantillon ne donne pas seulement un pic pseudomoléculaire à $[M+H]^+$ ou $[M+H]^-$ mais également des fragments (si l'ionisation n'est pas assez douce, comme dans le cas d'un écart d'affinité protonique important entre l'échantillon et la matrice) ou des adduits dans le cas de la présence de sels (l'échantillon pouvant alors donner des signaux à $[M+Na]^+$ ou $[M+K]^+$ par exemple). Un exemple de spectre MALDI obtenu pour une solution contenant un seul type de molécule (la vinblastine, abrégée vb, à $1.10^{-6}M$) est présenté en **Figure 6**.

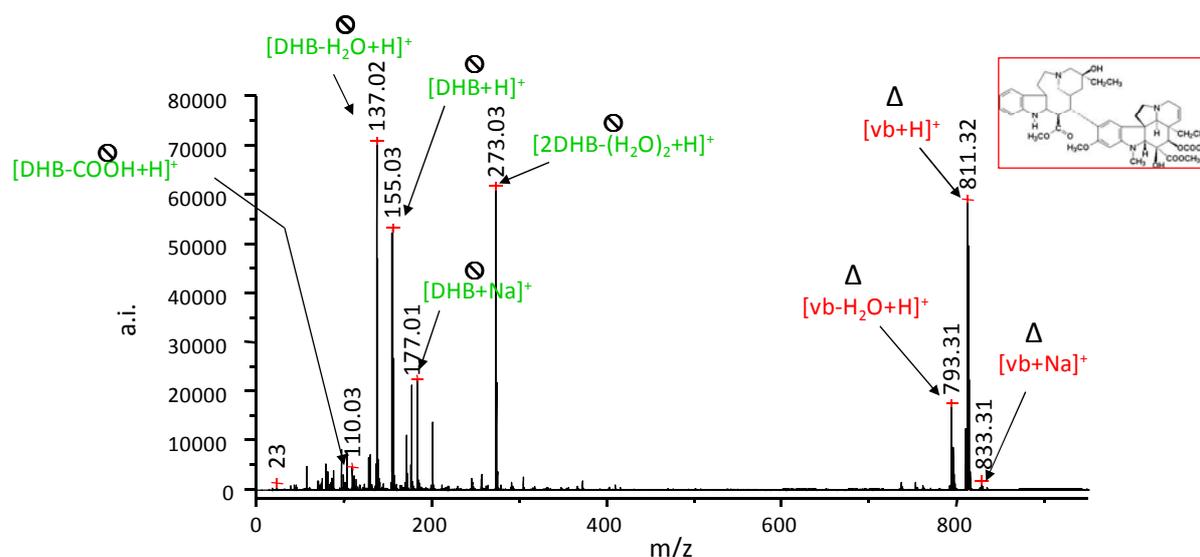


Figure 6 : exemple de spectre MALDI-TOFMS d'une solution de vinblastine (810,3 g/mol) à $1.10^{-6}M$ (matrice utilisée 2,5-DHB 1 M)

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

2. La technique ESI

Dans ce paragraphe nous allons décrire le principe de la technique d'ionisation par électronébulisation (électrospray ou ESI).

Lors d'une analyse par électronébulisation, l'analyte est mis en solution dans un solvant (généralement organique) et amené dans une source à pression atmosphérique par un capillaire. L'extrémité du capillaire est portée à un haut potentiel électrique (4000 V) ce qui induit la formation d'un champ électrostatique entre l'extrémité du capillaire et la contre-électrode. Le processus d'électronébulisation peut être assisté d'un gaz nébuliseur tel que du diazote. Les gouttelettes chargées sont ensuite désolvatées, puis séchées par un flux d'azote chauffé circulant à contre courant. Ceci entraîne une série de fissions des gouttelettes et des ions, généralement multichargés, sont finalement produits en phase gazeuse (Figure 7)¹⁵.

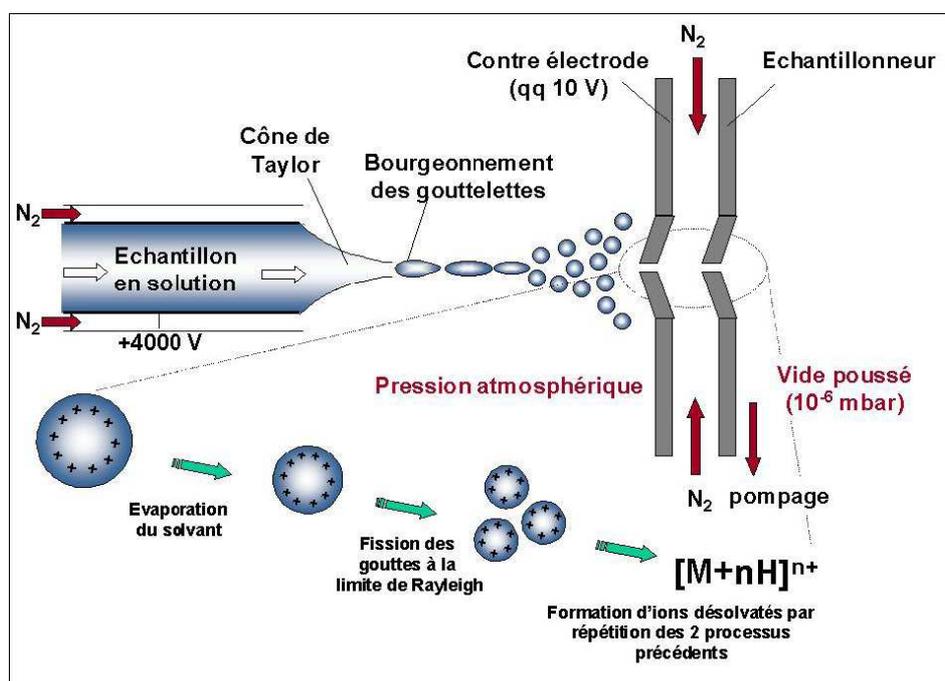


Figure 7 : représentation schématique d'une source ESI

Ainsi, comme le montre cette figure, l'ionisation par ESI forme des ions majoritairement multichargés (z étant un nombre entier différent de 1) et il conviendra souvent de déconvoluer les spectres obtenus (en multipliant la valeur de m/z expérimentale par le nombre de charges z observé) afin d'atteindre la masse m de l'analyte exprimée en daltons.

Ce mode d'ionisation est possible pour de nombreux analytes du moment que ceux-ci sont solubles dans un solvant compatible.

¹⁵ (15) Kebarle P.; Tang L. *Analytical Chemistry* 1993, 65.

iii. Analyse des ions formés

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

Il existe une grande variété d'analyseurs en spectrométrie de masse. Ils reposent tous sur l'utilisation soit d'un champ magnétique (secteurs magnétiques, résonance cyclotronique des ions), soit un champ électrique (temps de vol, filtres de masse quadripolaires, pièges à ions) ou des combinaisons des deux. Différentes grandeurs sont utilisées pour caractériser leurs performances :

- La **résolution** :

Cette grandeur représente le pouvoir séparateur de l'analyseur, c'est-à-dire sa capacité à séparer deux rapports m/z voisins. Elle est définie par le rapport $R = m/\Delta m$, où Δm désigne la plus petite différence de masse pour laquelle il est encore possible de « séparer » le pic m du pic $m + \Delta m$ (Figure 8).

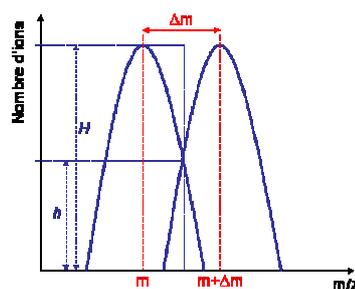


Figure 8 : Représentation graphique de la mesure de résolution à 50% de vallée

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

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

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

Cette grandeur est le rapport $\Delta m_e/m$ où Δm_e est l'erreur sur la mesure de la masse de l'ion de masse m . Cette précision est exprimée en ppm. Si cette précision est suffisante (de l'ordre du ppm), il est possible d'atteindre une détermination quasi certaine de la composition élémentaire (formule brute) de l'ion considéré (par exemple dans le cas de la colchicine, une précision de la mesure de masse inférieure à 1ppm ne peut correspondre qu'à la formule brute correspondante, alors qu'à 10ppm d'erreur 11 formules brutes sont possibles).

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

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

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

1. Analyseur en temps de vol

Un spectromètre de masse de type TOF MS (time of flight mass spectrometer) est basé sur la mesure du temps de vol d'un ion sur une distance donnée, sous un vide poussé de 10^{-5} Pa (1.10^{-7} mBar). Cela implique quatre étapes successives : la formation des ions, leur accélération, leur séparation et leur détection.

Cet analyseur est celui qui a été le plus largement utilisé lors de nos recherches. C'est Dempster¹⁶ (1918) qui, en premier, a introduit l'usage d'une différence de potentiel (V_0) à la sortie d'une source d'ions. Cette tension confère une énergie cinétique au faisceau d'ion. Les premiers spectromètres de masse à temps de vol, basés sur ce principe, ont été décrits dans les années 1950. Il a connu ces dernières années un essor considérable grâce d'une part à des améliorations électroniques notables, et à l'émergence de la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI). De ce fait, la spectrométrie de masse à temps de vol est devenue l'une des techniques les plus utilisées en analyses de composés bio-organiques. Cet appareil est très sensible, robuste et compatible avec de nombreux types d'échantillons. Il permet d'atteindre une résolution moyenne autour de 10 000. Son coût reste assez limité (autour de 200 000 €) ce qui en fait un spectromètre de masse de plus en plus répandu.

Principe

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

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

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

Ils possèdent alors une vitesse égale à :

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

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

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

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

Les ions les plus légers sont détectés les premiers, les ions plus lourds parviennent au détecteur après un temps de vol plus long. Un schéma de principe d'un spectromètre à temps de vol est présenté sur la Figure 9.

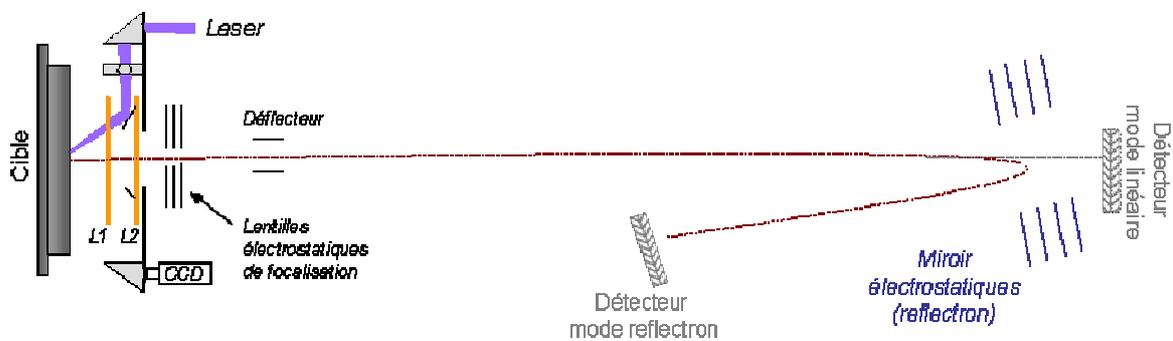


Figure 9 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse à temps de vol

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

Le pouvoir de résolution d'un TOFMS est théoriquement donné par $\frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t}$

En pratique, la résolution est essentiellement limitée par le fait que des ions de même rapport masse/charge peuvent ne pas atteindre le détecteur au même instant. Ceci peut avoir trois origines :

a) la durée de l'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 10). 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 en début d'impulsion.

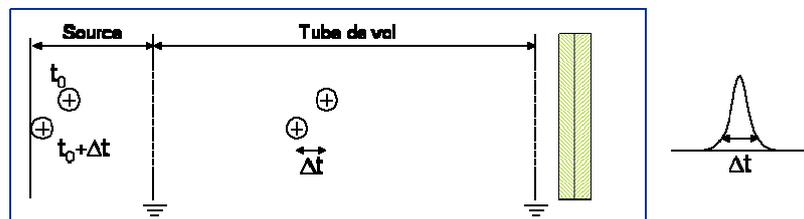


Figure 10 : Influence de la durée d'impulsion laser sur l'élargissement des pics

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 femtoseconde). Dans notre cas, le laser utilisé est un laser à azote de longueur d'onde de 337 nm, avec un temps de pulse de 4 ns et de fréquence de 5 Hz.

b) 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.

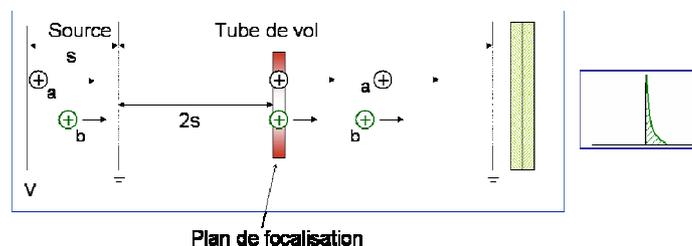


Figure 11 : Influence de la distribution spatiale sur l'élargissement des pics

La Figure 11 illustre cette situation pour deux ions « a » et « b » de même masse : l'ion « a » subit le champ d'accélération sur une distance correspondant à la distance totale notée « s » parcourue dans la source. L'ion « b » quant à lui est accéléré 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 « a » va rattraper son retard sur l'ion « b ». Les ions sont alors dans le même plan de focalisation. En jouant sur les paramètres d'extraction des ions, on pourra déplacer ce plan pour améliorer la résolution spectrale. 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. Dans notre cas, nous avons utilisé des solutions de matrice contenant une forte proportion de solvants organiques de manière à favoriser une cristallisation rapide des dépôts, menant ainsi à des petits cristaux dont la dispersion en altitude n'est pas trop importante.

c) 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 12).

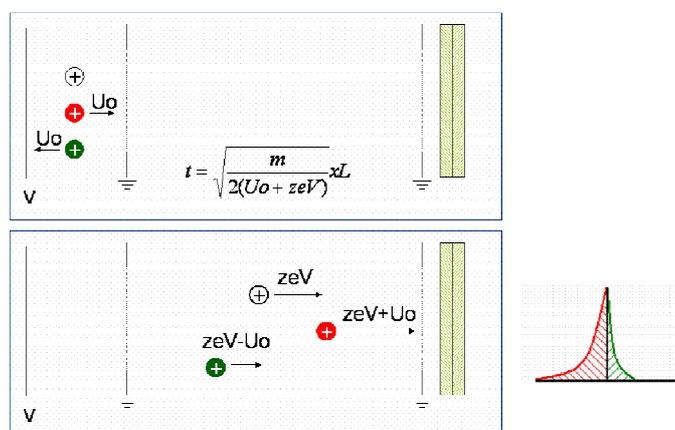


Figure 12 : Influence de la dispersion d'énergie cinétique sur la perte de résolution

Différentes améliorations techniques ont été apportées pour diminuer les effets de ces trois dispersions énergétiques (extraction en deux étapes, extraction retardée, réflecteur électrostatique, injection orthogonale...). Nous détaillerons ici celles dont dispose le spectromètre à temps de vol Bruker Reflex IV (Bruker-Daltonics, Brême, Allemagne) utilisé lors de cette étude.

- Extraction retardée (DE : Delayed Extraction)

Comme nous l'avons présenté précédemment, l'une des causes de la perte de résolution lors de l'analyse par TOFMS est due à une différence de vitesse initiale des ions de même rapport m/z . Cette différence initiale se répercutera sur le temps de vol total de ces ions. Des améliorations peuvent être réalisées en utilisant l'extraction pulsée retardée¹⁷ (appelée PIE pour Pulsed Ion Extraction dans le cas du Bruker reflex IV) pour compenser la distribution initiale de vitesse du paquet d'ion produit par désorption/ionisation laser pour que les ions de mêmes m/z arrivent simultanément au détecteur. Ce principe est ancien puisque l'un des premiers spectromètres de masse à temps de vol (TOFMS), développé en 1955 (Wiley, McLaren) disposait d'un système d'accélération à deux étages, réglant ainsi le problème de la distribution spatiale, mais aussi d'un moyen de focaliser les ions provenant de molécules possédant une distribution de vitesses. Pour cela ils introduisent un délai entre l'ionisation et l'extraction des ions (appelé le Time-Lag Focusing). Le principe du PIE est décrit dans la Figure 13:

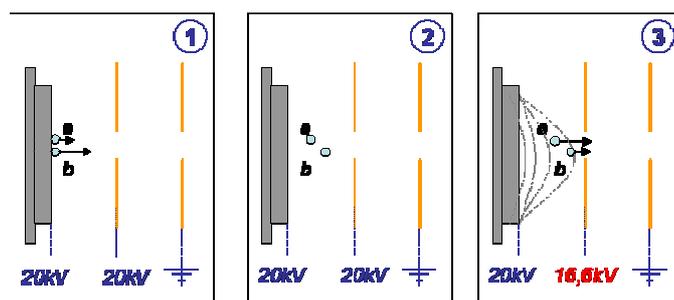


Figure 13 : Principe de l'extraction pulsée (PIE : Pulsed Ion Extraction) (1 : impulsion laser à $t=t_0$; 2 : temps de retard à l'extraction ($t=\tau$) ; 3 : accélération des ion ($t=t_0+\tau$)

Lors de l'impact laser, les ions a et b sont formés avec des vitesses initiales variables pour un même m/z (Figure 13.1). Pendant un laps de temps de quelques centaines de nanosecondes, les ions formés évoluent entre la cible et la première lentille, ces deux éléments sont à un même potentiel (Figure 13.2). Au bout d'un temps $t=\tau$, le potentiel de cette lentille électrostatique est porté à un potentiel plus faible (Figure 13.3), les ions sont alors accélérés. L'ion a sera alors soumis à un champ électrique plus intense, et rattrapera ainsi le retard qu'il aurait eu sur l'ion b sans extraction retardée. Des distributions plus étroites de temps d'arrivée des ions de même rapport m/z au détecteur sont ainsi obtenues, ce qui se traduit par une meilleure résolution par rapport à celle obtenue lors de l'extraction continue. Selon la masse

¹⁷ (17) Vestal, M. L.; Juhasz, P.; Martin, S. A. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2005**, 9, 1044

des ions à analyser différentes valeurs de délais d'extraction pourront être appliquées. Deux paramètres peuvent ainsi être optimisés : le délai τ et la tension d'extraction intermédiaire. Dans le cadre de nos recherches, pour la détection de composés de faibles masses, le délai d'extraction choisi a été de 200 ns permettant un gain spectaculaire en résolution. La tension d'extraction intermédiaire a elle aussi été optimisée, comme le montreront les résultats du chapitre 3.

- Réflecteur électrostatique

Une deuxième manière de compenser les effets de distribution en énergie cinétique des ions consiste à placer un réflecteur, ou « miroir », électrostatique (réflectron) 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 le détecteur (Figure 14).

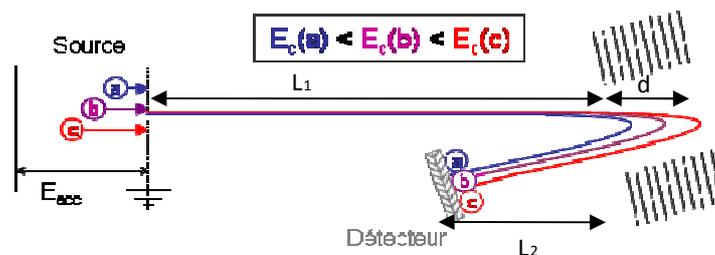


Figure 14 : Principe de la refocalisation des énergies cinétiques

Schématiquement, les ions de plus forte énergie cinétique pénétreront plus profondément dans le miroir et parcourront par conséquent un trajet plus long que les ions les moins énergétiques, d'où un phénomène de focalisation de l'ensemble d'une population d'ions de même rapport m/z .

En ajustant correctement la tension du réflectron, il est possible de conduire simultanément sur le détecteur, pour une masse déterminée, les ions les plus rapides et les plus lents. Le temps de vol total de l'ion détecté en mode réflectron sera alors :

$$t = (L_1 + L_2 + 4d) \sqrt{\frac{m}{2zeV}}$$

La plupart des spectromètres à temps de vol actuels sont équipés d'un réflectron à 1 ou 2 étages.

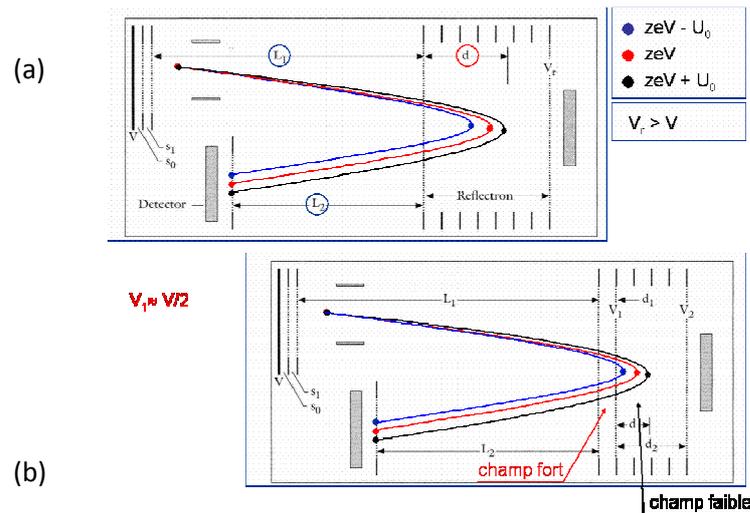


Figure 15 : (a) réflecteur à 1 étage ; (b) réflecteur à 2 étages

La Figure 15 présente la différence entre les configurations du réflecteur électrostatique à 1 ou 2 étages. Un réflectron à 2 étages, comme celui équipant notre Bruker Reflex IV, présente un premier étage où règne 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.

En pratique les ions sont détectés par mesure du temps entre le tir laser et leur arrivée sur le détecteur en mode soit linéaire ($m/z > 2000$ Da), soit réflectron ($m/z < 2000$ 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 réflectron), de manière à augmenter leur sensibilité.

Modes de fragmentations MSMS

Outre l'intérêt du réflecteur électrostatique en termes de gain en résolution, celui-ci est un élément essentiel du TOFMS dans le cadre d'analyses MS/MS (Fragmentations en vol (PSD : Post Source Decay)). En effet, après l'accélération, les fragmentations des ions se produisant durant leur temps de vol, peuvent permettre leur analyse structurale. Lorsqu'une dissociation se produit en vol, avant le réflectron, l'ion fragment réfléchi par le réflectron pourra être détecté. C'est ce type de fragments qui est à l'origine de l'observation de pics mal résolus, appelés pics métastables, sur le spectre de masse. En faisant varier de manière

séquentielle la tension du reflectron, il sera possible de remonter à la masse des ions fragments. En pratique, il est nécessaire de sélectionner préalablement l'ion précurseur par ouverture/fermeture d'une porte temporelle¹⁸. Un exemple de résultats pouvant être obtenu en désorption/ionisation laser(LDI)-PSD-TOFMS dans le cadre de l'identification d'hydrocarbures aromatiques polycycliques issus de moteurs diesel est présenté en Figure 16.

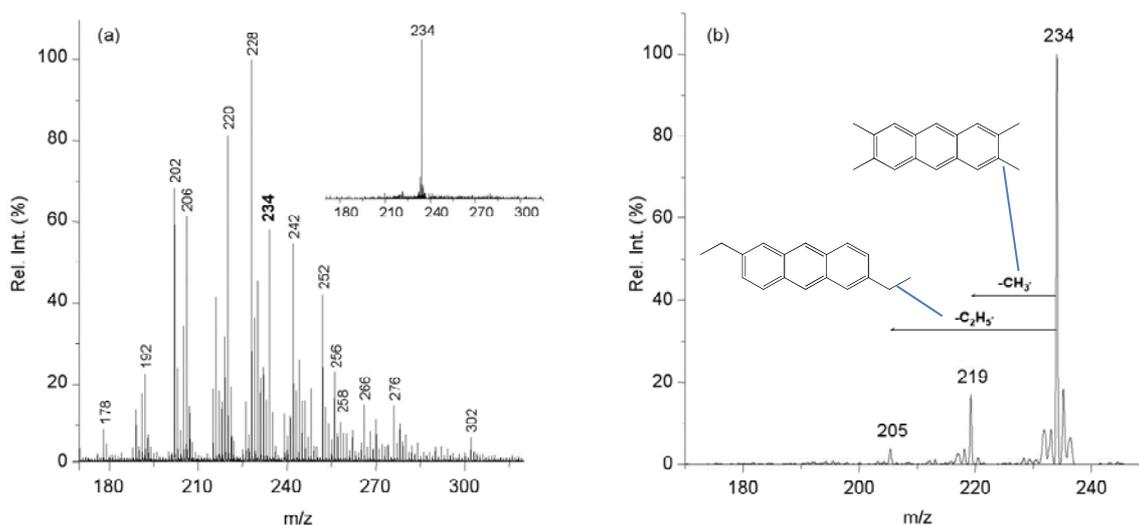


Figure 16 : (a) spectre LDI-TOFMS de l'échantillon de particules de moteur diesel, le spectre de sélection de l'ion parent ($m/z = 234$) est présenté en encart ; (b) spectre LDI-PSD-TOFMS de l'ion sélectionné ($m/z = 234$)¹⁸

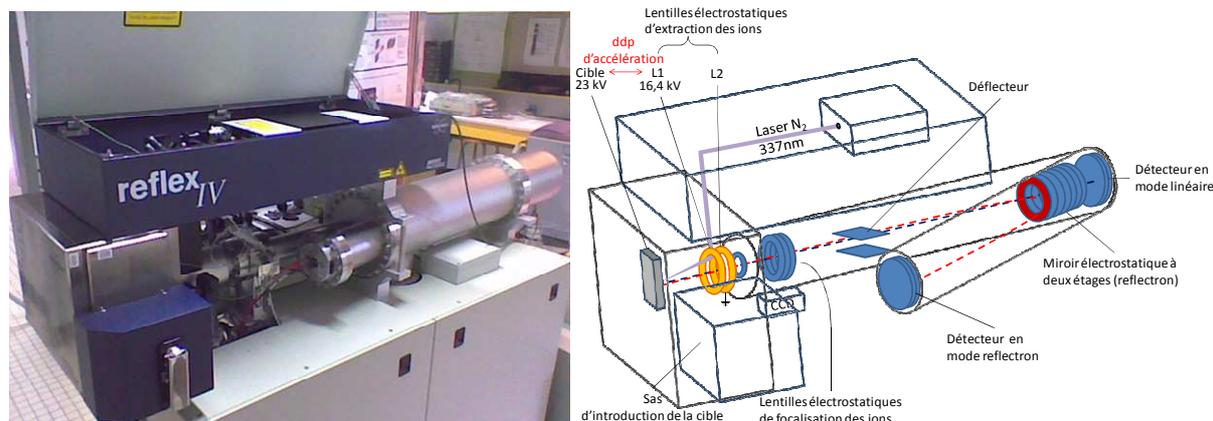
Le spectre de fragmentation des ions de masse 234 indique la présence de chaînes courtes méthyle et/ou éthyle (le fragment majoritaire à $m/z = 219$ ($[M-CH_3]^+$) sur cette molécule. Le pic à $m/z = 205$ ($[M-C_2H_5]^+$) montre la présence d'un groupement propyle. Ainsi, par cette étude PSD il est possible d'obtenir des informations structurales sur les ions parents mesurés à $m/z = 234$ Da, la superposition de fragments caractéristiques indiquant la présence de molécules à chaînes alkyles courtes avec 1 à 3 carbones¹⁸.

Analyseur en temps de vol utilisé au cours de ces travaux

Le spectromètre de masse à temps de vol couplé à la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOFMS) utilisé au cours de cette étude est un appareil Bruker Reflex IV (Bruker-Daltonic, Brème, Allemagne) équipé avec une source SCOUT 384, utilisant un laser à azote pulsé (337 nm, modèle VSD-337ND, Laser Science Inc., Boston,

¹⁸ (18) Frache, G. développements instrumentaux et méthodologiques appliqués à l'étude de particules issues de moteurs diesel de dernière génération par désorption/ionisation laser couplée à la spectrométrie de masse (Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Metz), Université Paul Verlaine de Metz, 2006.

MA) avec une énergie de sortie de $400\mu\text{J}/\text{pulse}$ et une irradianance de $2 \text{ à } 5.10^7 \text{ W.cm}^{-2}$. Ce spectromètre de masse est présenté en **Figure 17** ci-après.



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

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

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

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

Tous les spectres de masse MALDI-TOFMS présentés dans ce manuscrit ont été obtenus par sommation des signaux correspondants à 4 séries de 100 tirs d'un laser à azote de longueur d'onde de 337 nm . En effet cela s'est avéré être une méthode permettant de réduire

de manière considérable l'écart type entre les mesures sans pour autant prendre trop de temps d'analyse pour chaque échantillon. La **Figure 18** ci après présente l'écart type pondéré obtenu lors de l'analyse MALDI-TOFMS d'une solution de vinblastine (vb) à $1.10^{-6}M$ avec la matrice 2,5-DHB comme matrice. 10 acquisitions pour une série de 10, 20, 30, 40, 50 et 100 tirs laser ainsi que 10 acquisitions pour 4 séries de 10, 20, 30, 40, 50 et 100 tirs laser, ont été réalisées pour chaque point. L'écart type pondéré est calculé à chaque point en divisant l'écart type moyen sur les intensités absolues par l'intensité moyenne du pic $[M+H]^+$ de la vinblastine.

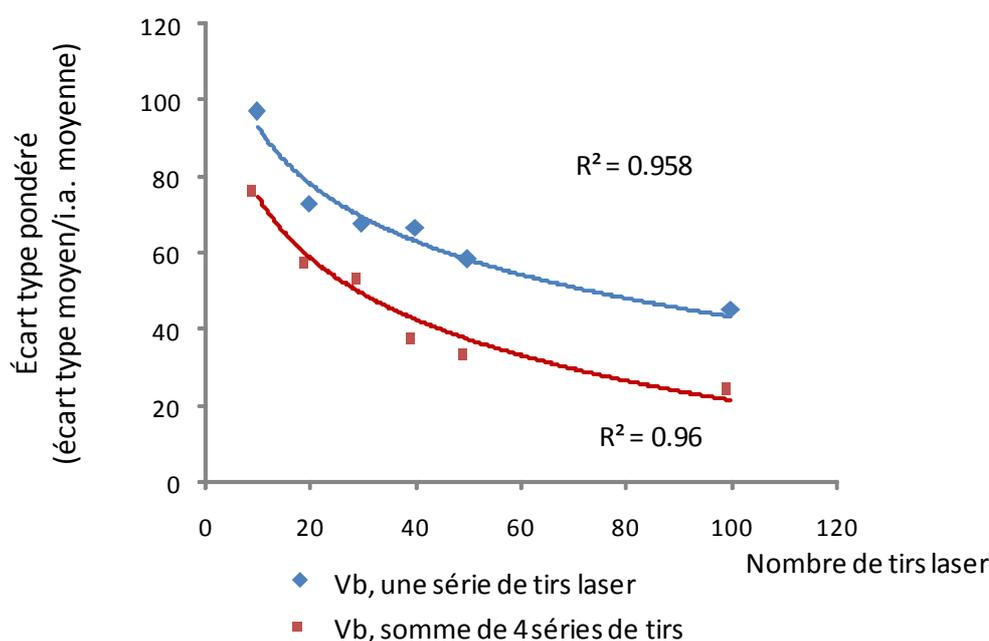


Figure 18 : étude de l'écart type sur l'intensité moyenne du pic à $[M+H]^+$ de la vinblastine (solution à $1.10^{-6}M$) obtenu par MALDI-TOFMS (1 série et 4 séries de X tirs laser ($10 < X < 100$))

Comme le montre cette figure, l'écart type moyen sur l'intensité d'un pic peut être très important lors d'une étude en MALDI-TOFMS. En effet, dans le cas de la courbe bleue correspondant à une série de tirs lasers on peut voir que pour 10 acquisitions de 10 tirs lasers, l'écart type sur les mesures des intensités absolues du pic à $[M+H]^+$ de la vinblastine est proche des 100%. C'est-à-dire qu'aucune reproductibilité ne peut être trouvée entre deux acquisitions successives de la même solution. Cet écart type sur l'intensité absolue d'un pic peut être diminué jusqu'à environ 45% lorsque les acquisitions se font pour des séries de 100 tirs laser. Augmenter le nombre de tirs lasers permet donc de diminuer les différences entre plusieurs acquisitions en MALDI-TOFMS d'une même solution. Cet écart type sur les mesures peut même être diminué à une valeur proche de 25% lorsqu'une somme de 4 séries de 100 tirs laser est effectuée. Ainsi, augmenter le nombre de séries pour une acquisition

donnée permet de diminuer l'écart type sur la mesure de l'intensité absolue d'un pic. C'est pour cette raison que tous les spectres de masse MALDI-TOFMS utilisés au cours de cette étude sont acquis en faisant la somme de 4 séries de 100 tirs laser.

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

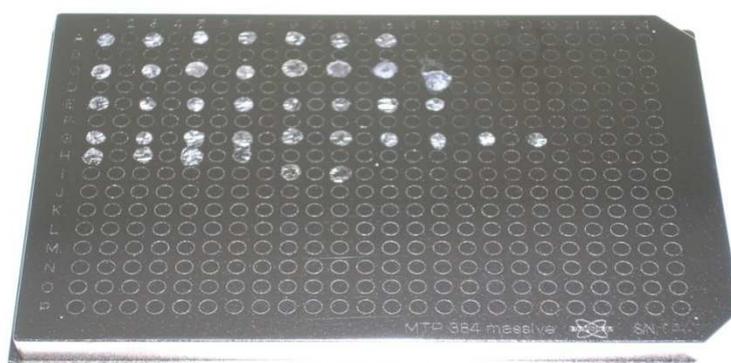


Figure 19 : porte échantillon du MALDI-TOFMS

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

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

Cet analyseur est légèrement moins sensible qu'un analyseur en temps de vol du fait qu'il implique un temps plus long entre l'ionisation des espèces et leur détection (la perte de sensibilité est d'environ un facteur 10 dans le cadre de nos études). Il permet cependant de détecter les ions avec une précision de mesure de masse très importante (souvent inférieure au ppm) et une résolution très importante (bien supérieure à 100 000). Cet appareil permet également d'avoir accès à des expériences MSMS de qualité de par sa compatibilité avec de nombreux modes de fragmentation. L'ensemble de ces critères en font un appareil haute performance pour l'élucidation de structures de composés analysés. Cependant, le coût que représente un tel appareil est important, tant à l'achat (environ 1 000 000 €) qu'à l'entretien (remplissage régulier de l'azote et de l'hélium liquide de l'aimant supraconducteur).

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

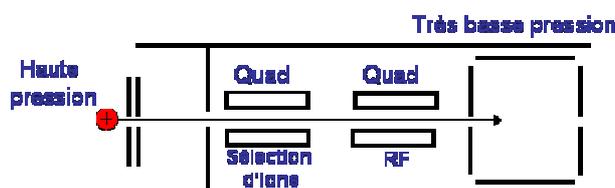


Figure 20 : Source externe du FT-ICRMS IonSpec Explorer, Champ magnétique de 9,4 Tesla

Dans ce cas, un dispositif de piégeage linéaire est interposé entre la source et la cellule d'analyse afin de stocker les ions avant leur injection ou de présélectionner une gamme de masses en vue d'une analyse MSMS. La cellule d'analyse, éloignée de la source d'ions, est ainsi maintenue efficacement à une pression suffisamment faible ($P = 2.10^{-8}$ Pa, 2.10^{-10} mBar) pour conserver un pouvoir de résolution très élevé.

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

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

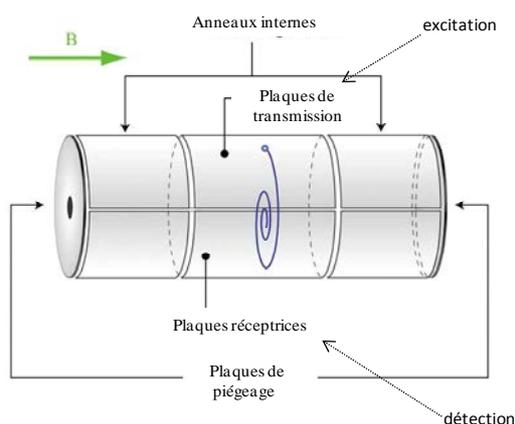


Figure 21 : schéma de la cellule d'analyse FTICRMS équipant notre spectromètre de masse (IonSpec-Varian)

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

- Piégeage

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

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

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

- Excitation

Chaque ion ainsi piégé se déplace selon sa propre fréquence cyclotronique. Pour détecter les ions, il faut que leur mouvement orbital devienne cohérent de manière à ce que des ions de même masse aient la même trajectoire. Ceci est réalisé grâce à un balayage très rapide à partir des plaques de transmission qui couvre toutes les fréquences cyclotroniques des ions (de quelques kHz à quelques MHz). Lorsque la fréquence appliquée est égale à la fréquence cyclotronique (ω_c) d'un ion de masse donnée, celui-ci rentre alors en résonance. Son énergie cinétique augmente alors selon :

$$E_c = \frac{1}{2} m v^2 = m \cdot \omega_c^2 \cdot R^2$$

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

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

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

- Détection

Les ions, animés d'un mouvement circulaire cohérent après excitation possèdent une trajectoire qui les amène au voisinage des plaques réceptrices, ce qui va induire un courant image. Les ions positifs, par exemple, approchant de façon alternative l'une de ces deux

plaques, attirent les électrons, ce qui induit un courant alternatif appelé courant image transitoire dont la fréquence correspond à la fréquence cyclotronique de l'ion en question.

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

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

avec N = nombre d'ions de masse m détectés

q = charge des ions (C)

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

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

C = valeur de la capacité

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

t = temps de mesure (s)

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

- Performances

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

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

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

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

Méthodes de fragmentation (MSMS ou MSⁿ)

Les appareils de type FTICRMS sont compatibles avec de nombreuses méthodes de fragmentation (MSⁿ) permettant d'atteindre des informations sur les structures des composés analysés. Une stratégie MSMS (MS²) classique consiste à isoler un ion dans la cellule FTMS et de lui apporter ensuite suffisamment d'énergie pour induire des fragmentations. Les masses des fragments fourniront ainsi des indices sur les groupements fonctionnels présents sur la molécule de départ. Les modes de fragmentation que nous avons utilisés au cours de ces travaux sont :

- Le SORI-CID (Sustained Off-Resonance Irradiation Collision-Induced Dissociation), dissociation induite par collision.
- L'IRMPD (InfraRed Multi Photon Dissociation) dissociation par photons infrarouges.

Le mode de fragmentation SORI :

Le mode SORI (Sustained off resonance irradiation) a un grand intérêt du fait de la faible énergie de fragmentation qui peut être appliquée aux ions préalablement sélectionnés au sein de la cellule ICR. Au cours de ce processus de fragmentation à faible énergie, une excitation de l'ion est conduite via l'application d'un champ électrique "off resonance" de fréquence de 500 à 2000Hz en dessous de la fréquence cyclotronique de l'ion¹⁹. Cette condition "off resonance" entraîne une succession d'accélération et de décélérations (entre 500 et 2000 fois par seconde) des ions sélectionnés.

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

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

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

Le mode de dissociation par MultiPhotons InfraRouges (IRMPD)

Les fragmentations par IRPMD s'effectuent à l'aide d'un laser continu au CO₂ de longueur d'onde $\lambda = 10,6\mu\text{m}$ (énergie du photon = $1,87 \cdot 10^{-20}\text{J}$). Cette longueur d'onde est très fortement absorbée par les différents modes vibrationnels des liaisons interatomiques. De ce fait de nombreux photons peuvent être absorbés par un ion sur une durée de plusieurs dixièmes de seconde et l'énergie ainsi apportée aboutira à la fragmentation de l'espèce.

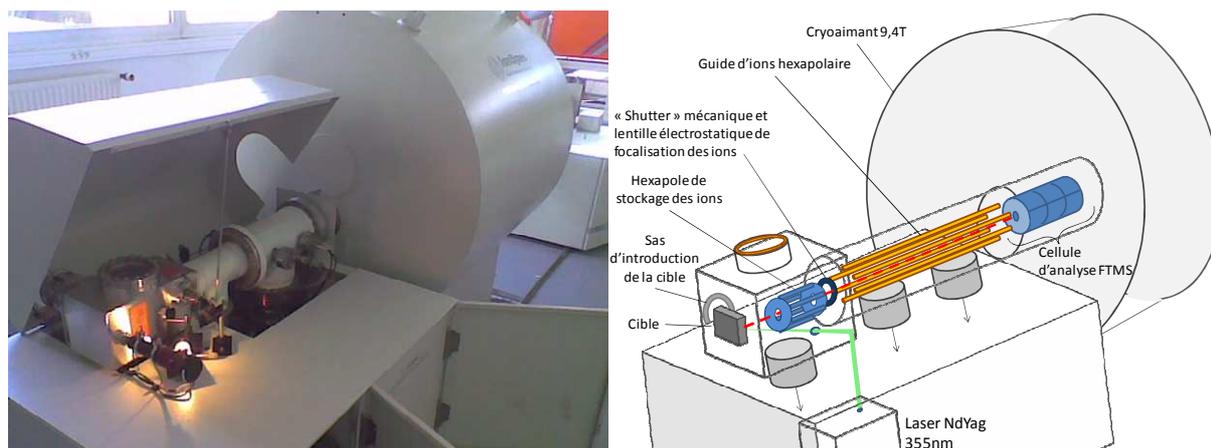
L'IRMPD a l'avantage de fournir un grand nombre de fragments car les premiers fragments issus de la molécule sélectionnée sont eux même irradiés et se fragmentent à nouveau.

Ce mode de fragmentation est populaire du fait de sa facilité de mise en œuvre, du haut niveau de contrôle sur l'énergie appliquée à l'ion et de sa « non sélectivité » quand au type de molécule irradié²⁰.

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

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

²⁰ (20) Little, D. P. *Anal Chem* **1994**, 66, 2809.



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

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

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

Lors d'une analyse MALDI-FTICRMS, de nombreux paramètres sont optimisables pour obtenir les signaux de la meilleure qualité possible. Le logiciel omega[®] (Varian – IonSpec) permet d'avoir accès à tous ces paramètres clés en une seule fenêtre (présentée en Figure 23). Nous allons présenter brièvement les paramètres sur lesquels nous avons joué pour augmenter la qualité des spectres de masse obtenus au cours de nos études. L'objectif ici n'est pas d'en faire un inventaire exhaustif mais bien de signaler les paramètres dont l'optimisation a amenée une nette augmentation de la qualité du spectre (en termes de rapport signal/bruit de résolution et de précision de mesure de masse).

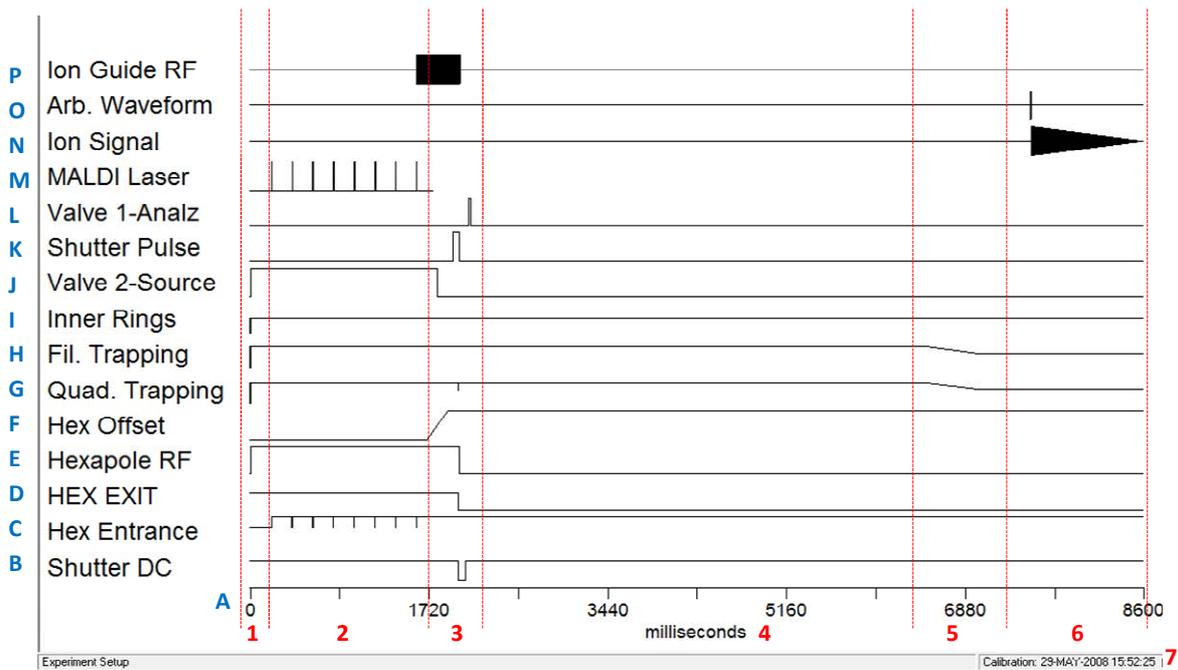


Figure 23 : Représentation schématique des différents paramètres mis en jeu lors d'une analyse MALDI-FTICRMS (Omega® Varian-IonSpec)

Cette figure montre que l'acquisition d'un spectre « haute qualité » en MALDI-FTICRMS est une suite de **7 étapes successives** distinctes, organisées sur un **axe temporel A**.

La première étape, appelée **étape (1)** correspond à un « nettoyage » de l'appareil en vue de l'analyse souhaitée. L'ensemble des potentiels est porté à des valeurs basses de manière à éviter toute présence d'ions jusque là stables dans l'hexapole de stockage ou la cellule.

Vient ensuite l'**étape (2)**, durant laquelle les ions sont générés à partir du dépôt MALDI. Il est possible de voir en **ligne M** les tirs laser demandés et chacun d'entre eux est suivi par une chute du potentiel d'entrée de l'hexapole de stockage (**ligne C**). Ainsi, les ions formés à chaque impulsion laser sont stockés en vue d'être injectés plus tard dans la cellule d'analyse. A ce niveau plusieurs paramètres importants interviennent pour obtenir un spectre de qualité. En effet, il faut prendre soin de régler l'intensité de chaque tir laser de manière à générer des ions en quantité suffisante sans pour autant saturer la cellule (pouvant nuire à la résolution et la précision sur la mesure de masse) ou induire des fragmentations « en source » délétère pour l'identification des analytes (par atténuation de leurs pics pseudomoléculaires $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$). Il convient aussi à ce niveau d'homogénéiser les tensions de l'hexapole de stockage (**E**) et du guide d'ion (**P**) pour favoriser la stabilité et la conduction de la gamme de masse souhaitée vers la cellule ICR. Les tensions moyennes appliquées sur ces hexapoles

sont de 200 V pour des ions autour de 1000 Da et il conviendra de les baisser pour conduire des espèces de masse inférieures.

Vient ensuite l'**étape (3)** qui consiste en l'injection dans la cellule d'analyse des ions stockés dans l'hexapole. En même temps que le potentiel de piégeage des ions dans l'hexapole est diminué (**D**), les ions sont attirés vers le guide d'ion par un pulse de tension négative (**B**) au niveau du shutter mécanique en même temps que celui s'ouvre et se referme pour préserver au mieux le vide poussé qui règne dans la partie analyse de l'appareil (**K**). Vient alors l'ouverture de la cellule du côté du guide d'ions (**G**) qui consiste en une mise à zéro du potentiel de piégeage. Cette ouverture peut être optimisée en termes de délai et de durée d'ouverture de manière à assurer une bonne entrée des ions dans la cellule d'analyse. Une fois entrés et piégés dans la cellule les ions sont thermalisés, refroidis et recentrés, par un jet de diazote (**L**). Ce pulse de gaz (20 ms dans notre cas) est un critère important dans l'optimisation des performances de l'analyse. Cette opération refocalise les ions au centre de la cellule, leur donnant un mouvement cyclotron plus homogène durant l'étape d'excitation. Si cet événement dure trop longtemps (plus de 100 ms en général) il peut entraîner la disparition des espèces piégées ou des réactions d'oxydation.

L'**étape (4)** est le piégeage des ions dans la cellule. Ce piégeage est permis par l'application d'un potentiel égal aux deux extrémités de la cellule (**lignes G et H**). La qualité du piégeage des ions augmente si les tensions augmentent mais l'énergie interne des espèces piégées augmente également, pouvant induire des fragmentations. Là encore le meilleur compromis doit être trouvé (autours de 15 V pour les espèces que nous avons étudiées). Il est également possible de jouer sur le potentiel appliqué sur les anneaux centraux de la cellule (**ligne I**) qui crée un double puits de potentiel au sein de la cellule ICR. Ceci implique une plus grande stabilité et une plus grande focalisation des ions piégés. Une fois une bonne qualité de piégeage obtenue, c'est à cette étape que peuvent avoir lieu les expériences MSMS et MSⁿ.

La cinquième **étape (5)** consiste en la préparation de l'analyse. Les tensions des plaques de piégeage (**G et H**) sont diminuées. En effet, en présence de potentiels de piégeage élevés les ions sont animés d'un double mouvement (le mouvement magnétron s'ajoutant au mouvement cyclotron) nuisant à la précision de la mesure de leur fréquence de rotation. La baisse des potentiels de piégeage se traduit par une diminution de ce mouvement permettant une augmentation de la résolution sur la mesure. Là encore un compromis doit être trouvé car plus le piégeage est diminué, plus la résolution augmente mais plus la sensibilité diminue. Ces potentiels ont été portés à 0,6 V pour nos analyses.

La sixième **étape (6)** est l'excitation (**O**) et la détection des ions (**N**). Là encore ces deux paramètres doivent être optimisés et en règle générale un temps d'acquisition long permet d'obtenir une meilleure résolution. Dans notre cas, le temps d'acquisition a parfois été porté jusqu'à 16 s.

Enfin la dernière et septième **étape (7)** est la calibration du spectre obtenu. Elle a été menée de manière « quasi interne » (le laser étant utilisé pour tirer successivement sur le dépôt à analyser puis sur un dépôt contenant un calibrant. C'est l'ensemble des ions formés et stockés dans l'hexapole lors de cette séquence, qui sera conduit jusqu'à la cellule FTICR en vue de l'analyse) ou interne (le calibrant étant présent dans le dépôt analysé) lors de nos analyses.

Ainsi, par l'optimisation de ces différents paramètres la résolution moyenne des pics des analytes sur lesquels a porté notre travail est autour de 600 000 ($\Delta m/m$) avec une précision de mesure en masse de l'ordre du ppm.

Il doit être précisé ici que certaines expériences MALDI-FTICRMS ont été faites avec une résolution moyenne supérieure à 1 000 000 ($\Delta m/m$) mais pour atteindre une telle résolution, la perte de sensibilité résultant de la diminution des potentiels de piégeage nuit parfois à la qualité de l'information obtenue.

La source ESI également disponible sur cet appareil présente une géométrie Zspray[®] : les ions sont injectés dans l'analyseur en suivant une trajectoire doublement orthogonale (schématiquement en Z). Ce type de source présente l'avantage d'être robuste et relativement tolérante vis-à-vis des sels et des molécules peu volatiles. De plus, elle permet d'atteindre une bonne sensibilité et une meilleure transmission des ions d'intérêts au niveau de l'analyseur. De même l'ouverture de la source électrospray est rapide et facile et un système de vannes permet un nettoyage de la source sans avoir recours à un arrêt total des pompes.

iv. Couplage à des techniques séparatives

Dans le cadre de l'analyse de composés polaires ou thermosensibles, le spectromètre de masse peut être couplé à un chromatographe en phase liquide. La séparation des espèces se fait alors par modification de la polarité de la phase mobile (gradient de solvants). Ce

couplage permet l'analyse de composés de masse élevée grâce à une interface de type électronébulisation (ESI) qui favorise l'obtention d'ions multichargés. Le couplage LC/MS est donc largement utilisé dans l'analyse des composés d'intérêt biologiques.

Ainsi, nous avons défini la spectrométrie de masse et présenté les différents modes d'ionisation (MALDI et ESI) et les différents analyseurs (TOF et FTICRMS) utilisés au cours de ces travaux. Nous avons décrit plus en détails les appareils et les choix sur lesquels nous nous sommes portés pour mener à bien cette étude.

b. Les tests de criblage par spectrométrie de masse

Nous allons à présent nous intéresser aux différents tests de criblage moléculaires utilisant la spectrométrie de masse comme technique de détection. Nous allons nous attacher à présenter ces stratégies dans leurs grandes lignes et nous illustrerons nos propos avec un exemple choisi d'application. Nous présenterons également les avantages et inconvénients de chaque approche.

Il existe trois approches faisant appel à la spectrométrie pour détecter la liaison de composés à des cibles moléculaires protéiques : l'étude de complexes [cible moléculaire + molécule liée] par électronébulisation (ESI) en phase gaz, l'étude de complexes recourant à des techniques séparatives en phase condensée (liquide) avant une analyse par ESI et enfin l'étude de composés liés de manière non covalente à une surface (solide) par spectrométrie de masse couplée à la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-MS)²¹. Ces approches sont regroupées dans la Figure 24 ci-dessous.

²¹ (21) Siegel, M. M. *current topics in medicinal chemistry* **2002**, 2, 13.

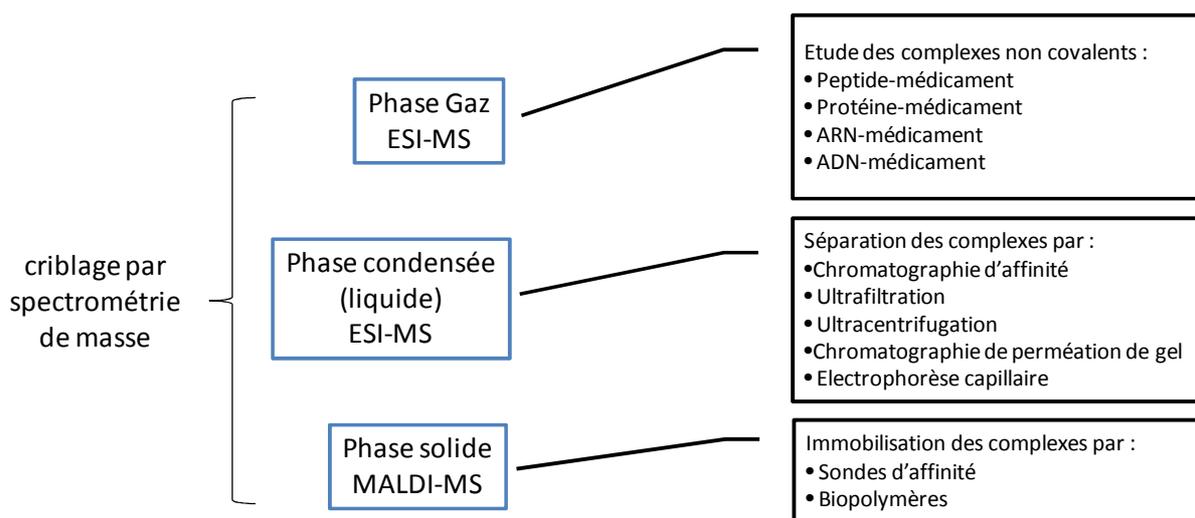


Figure 24 : Représentation schématique des différentes stratégies de criblage moléculaire par spectrométrie de masse

1. Criblage en phase gaz par ESI-MS

Le premier type de test de criblage moléculaire faisant appel à la spectrométrie de masse met en jeu l'usage de l'électronébulisation (ESI) comme technique de détection de composés éventuellement liés à une cible moléculaire. Cette analyse se fait en phase gaz car l'ESI permet de désolvater et de conserver en phase gaz des molécules biologiques telles que des protéines, de l'ADN ou de l'ARN sous une forme très proche de leurs états natifs²². Cette constatation est mise à profit dans des tests de criblages dans lesquels les molécules à tester sont mises en contact d'une cible moléculaire et analysées par ESI après un temps d'incubation adéquat.

Si une molécule montre une affinité pour la cible il y aura formation de complexes non covalents [cible-molécule active] qui seront détectés intacts par spectrométrie de masse^{21,23}. En effet, l'ESI offre les avantages d'être une technique d'ionisation douce, ne formant pas (ou peu) de fragments lors de l'ionisation et étant compatible avec des conditions d'analyses non dénaturantes (pas de solvant organique, milieu tamponné et présence de sels), c'est-à-dire préservant, dans certaines conditions, la structure native des protéines, nécessaire à la liaison éventuelle des composés actifs²⁴.

²² (22) Potier, N.; Barth, P.; Tritsch, D.; Biellmann, J. F.; VanDorsseleer, A. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 274.

²³ (23) Allardyce, C. S.; Dyson, P. J.; Coffey, J.; Johnson, N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 933.

²⁴ (24) Papac, D. I.; Shahrokh, Z. *pharmaceutical research* **2001**, *18*, 131.

Un exemple de résultats pouvant être obtenus en appliquant ce type de démarche est présenté ci-après en **Figure 25** dans le cas du criblage de la liaison de peptides au récepteur SH2²⁵. Une altération ou une perte de fonction de ce type de récepteur est souvent impliquée dans le processus de cancérogénèse. La recherche d'inhibiteurs spécifiques des récepteurs SH2 est ainsi légitime.

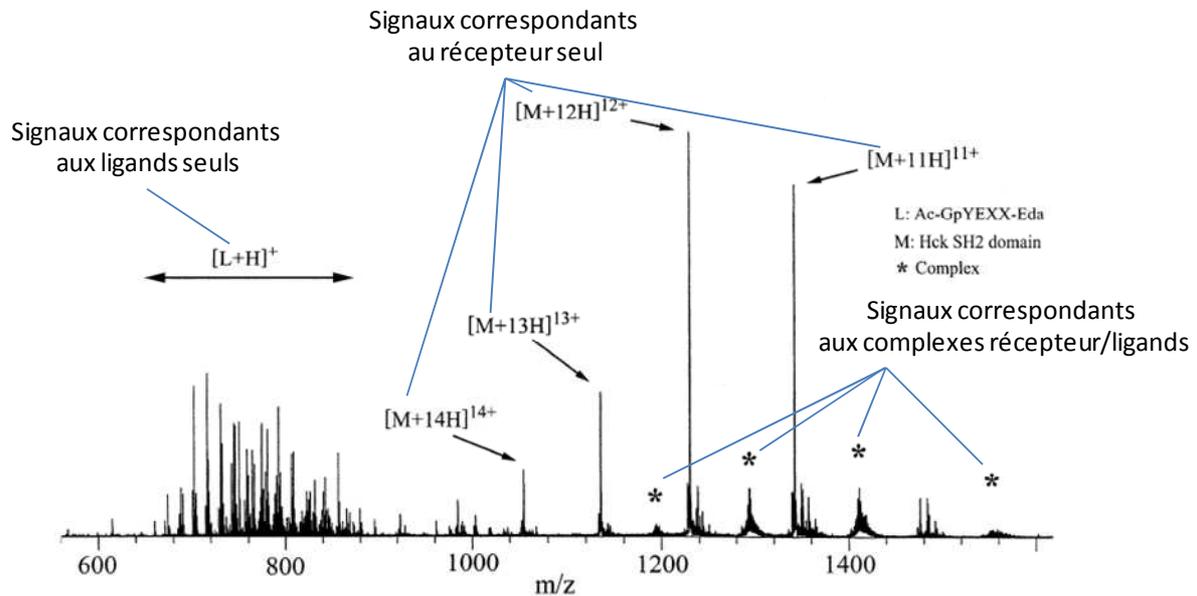


Figure 25 : spectre de masse ESI FTICR (9,4T) du récepteur SH2 (M) incubé avec une librairie de ligands peptidiques (L). Le spectre présente différents états de charge du récepteur et les complexes non covalents [M+L] sont marqués par *²⁵

Comme le montre ce spectre obtenu en ESI-MS en conditions non dénaturantes, des complexes non covalents (*) entre les peptides ayant une affinité pour le récepteur et le récepteur SH2 lui-même sont observés. Cette approche, en prenant la précaution de ne mettre en jeu que des conditions non dénaturantes autant lors de l'incubation que de l'analyse, permet ainsi de distinguer, parmi un mélange de plusieurs molécules, lesquelles sont les plus à même de se lier à un récepteur spécifique²⁵.

En utilisant cette technique il est également possible d'obtenir des informations concernant la force de la liaison de composés sur une cible par évaluation de l'énergie nécessaire pour rompre les complexes non-covalents. Ainsi, plus la liaison entre un composé et sa cible est forte et plus il faudra apporter d'énergie, par une des techniques de fragmentation MSMS, pour la rompre²¹. Ce type de test est ainsi utile pour le criblage de

²⁵ (25) Wigger, M.; Eyler, J. R.; Benner, S. A.; Li, W.; Marshall, A. G. *J Am Soc Mass Spectrom* **2002**, *13*, 1162–1169.

différentes cibles et permet d'obtenir des résultats intéressants tant sur le plan du criblage primaire que sur le criblage secondaire, tâche pour laquelle ces tests sont plus souvent utilisés²¹.

Il est cependant nécessaire de conserver des conditions non-dénaturantes (classiquement des solutions aqueuses contenant 200 mM d'acétate d'ammonium ajusté à un pH de 6,7)²⁶ tout au long du processus d'incubation et d'analyse. Les conditions optimales d'ionisation des composés biologiques ne sont ainsi pas atteintes à cause de la présence de sels et de milieux tamponnés peu volatils, pouvant provoquer des phénomènes de suppression de signal. De plus, l'ionisation doit être aussi douce que possible, en limitant au maximum les différences de potentiel pouvant rompre les complexes avant leur détection. Cela se traduit par une perte de sensibilité. Tous ces paramètres mettent en lumière la nécessité d'un savoir faire spécifique pour pouvoir mener à bien de telles analyses. A cela s'ajoutent les problèmes de pollution et de « mémoire » lors du passage d'un échantillon à un autre dans une source ESI à basse température. La consommation en termes de matière de cible moléculaire protéique est également relativement importante car plusieurs centaines de microlitres sont nécessaires pour obtenir des signaux de qualité. Ces différentes difficultés peuvent néanmoins être limitées en utilisant une source nano-ESI mais cette dernière est plus difficile d'usage et moins robuste qu'une source ESI classique.

ii. Criblage en phase condensée (liquide) couplé 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 faire « le tri » entre les molécules se fixant à une cible et les molécules n'ayant pas cette capacité²¹. Ces techniques de criblage peuvent donc être distinguées en fonction de la technique séparative utilisée puisque la technique d'ionisation couplée par la suite est toujours l'ESI. Dans la suite de ce paragraphe nous allons présenter les différentes stratégies de criblages moléculaires par spectrométrie de masse en phase liquide.

²⁶ (26) Pinkse, M. W. H.; Heck, A. J. R. *Ibid.* **2004**, *15*, 1392–1399.

1. Chromatographie d'affinité couplée à la spectrométrie de masse ESI (affinity chromatography, affinity selection/ESI-MS)

Cette technique met en œuvre une immobilisation de la cible moléculaire protéique sur une colonne (immobilisation de protéines cible ou d'anticorps correspondants à la cible). Le principe général de ce type de test est présenté dans la Figure 26 ci-après.

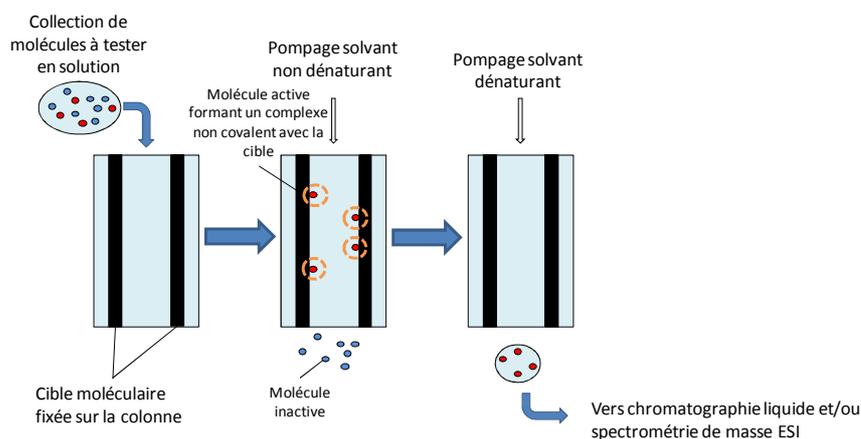


Figure 26 : Schéma de principe de la chromatographie d'affinité couplée à la spectrométrie de masse ESI

Une fois la colonne contenant la cible moléculaire préparée et conditionnée pour présenter la cible sous une forme la plus représentative de son état natif, la collection de molécule à analyser est injectée. Un flux de solvant non dénaturant permet d'élué les molécules n'ayant pas d'affinité alors que celles qui sont actives vont se fixer à la cible. Une fois cette étape de séparation achevée, les molécules actives sont récupérées par injection d'un solvant dénaturant qui rompt les interactions non covalentes avec la cible. Les molécules ainsi éluées sont ensuite analysées en spectrométrie de masse ESI, directement ou après une deuxième séparation par l'intermédiaire d'une chromatographie liquide sur une colonne classique²¹.

La liaison de benzodiazepines à des anticorps a été étudiée par cette technique²⁷. Les anticorps spécifiques ont d'abord été fixés sur une colonne contenant des protéines G immobilisées et après injection de la librairie à analyser, un changement du pH de la phase mobile a permis de désorber les complexes [anticorps-benzodiazepine] des protéines G. Les benzodiazepines sont ensuite séparées des anticorps dans une deuxième colonne par un système de solvant dénaturant et réinjectées dans une colonne analytique classique en C8. Les produits élués de cette dernière colonne sont ensuite analysés par ESI-MS.

²⁷ (27) Nedved, M. L.; Habibi-Goudarzi, S.; Ganem, B.; Henion, J. D. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4228.

Cependant, un des problèmes de cette technique reste l'immobilisation de la cible sur la colonne. Une autre possibilité est de fixer les cibles moléculaires protéiques sur des billes pouvant être chargées dans une colonne. Quoi qu'il en soit l'utilisation en ligne d'un tel système nécessite l'usage de nombreux systèmes de pompes, rendant sa maintenance très complexe²¹. Cette stratégie de criblage a donc un intérêt limité aux étapes de pré-criblages de mélanges très complexes, non couplée à la spectrométrie de masse et précédant l'usage d'une autre technique²¹.

2. Chromatographie d'affinité frontale couplée à la spectrométrie de masse ESI (frontal affinity chromatography/ESI-MS)

Cette technique est basée sur le même principe que la précédente et utilise le même type de colonne d'affinité couplée en ligne à un spectromètre de masse ESI. Cependant, dans ce cas l'échantillon contenant les molécules à tester est injecté en continu pendant toute la durée de l'analyse. Les ligands éventuels passent sur la colonne en condition d'équilibre et ainsi les molécules ne présentant pas d'affinité pour la cible ne sont pas retenues et sont éluées dès le début de la mesure, les molécules montrant une affinité faible pour la cible commencent à sortir ensuite et les molécules ayant une forte affinité sont retenues plus longtemps et sortent en fin d'analyse²¹.

Un exemple de résultats obtenu dans le cadre de la recherche d'oligosaccharides reconnus par des anticorps anti salmonelle est présenté en Figure 27 ci-après.

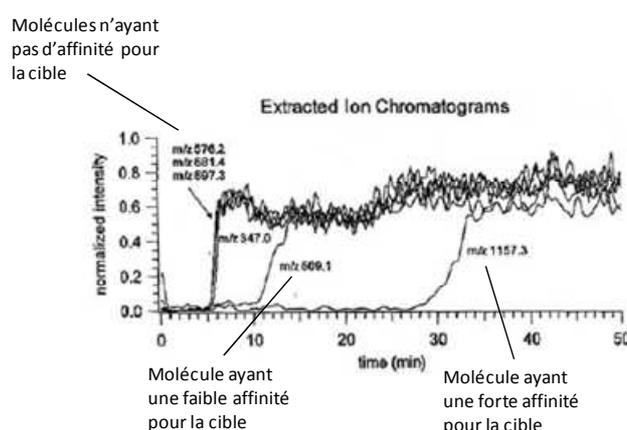


Figure 27 : chromatogrammes d'affinité frontale d'un mélange de six oligosaccharides synthétiques mimant un polysaccharide de *Salmonella* se liant à des anticorps anti-salmonelle (Schriemer et al. 1998)²⁸

²⁸

(28) Schriemer, D. C.; Bundle, D. R.; Li, L.; Hindsgaul, O. *Angew. Chem.* **1998**, *37*, 3383.

Comme le montrent ces chromatogrammes d'ions sélectionnés, une différence entre des composés n'ayant pas d'affinité pour les anticorps ($m/z = 576, 681, \text{ et } 697$) et ceux en montrant ($347, 509 \text{ et } 1157$) est observée. Cette technique présente les avantages de pouvoir être utilisée sur un grand nombre de composés, avec un débit d'analyse relativement important. Cette approche permet de plus d'obtenir un classement des affinités relatives des composés en une seule étape. Cependant, les quantités des différents échantillons doivent être importantes pour permettre une injection continue sur une heure d'analyse et la colonne peut se détériorer d'une analyse à une autre et/ou présenter un effet mémoire. De plus, la préparation et le conditionnement de la colonne (qu'elle soit constituée ou non de billes sur lesquelles sont liées les cibles moléculaires protéiques) est une étape délicate nécessitant un savoir faire particulier et pouvant prendre jusqu'à 48h²⁹.

3. Ultrafiltration-centrifugation d'affinité couplée à la spectrométrie de masse ESI (affinity centrifugal ultrafiltration/ESI-MS)

Une approche très intéressante pour séparer les cibles moléculaires de haut poids moléculaire des petites molécules en solution requiert l'usage de microconcentrateurs ou « unités d'ultrafiltration à centrifuger ». Ces éléments sont composés d'un tube à centrifuger dont l'extrémité porte une membrane spécifique (généralement en cellulose) développée pour retenir les composés dont la masse est supérieure à une masse limite (cutoff). Il existe différents types de membrane pouvant être adaptées aux cibles moléculaires utilisées. Ainsi lors de la centrifugation, les cibles moléculaires sont spécifiquement retenues sur le filtre alors que les molécules non liées de plus basses masses passent au travers. Cette approche permet d'obtenir une solution qui, après incubation des molécules à tester avec la cible et centrifugation, ne contient que la cible et les molécules qui y sont liées. Les cibles sont ensuite dénaturées et les molécules qui y sont liées sont analysées par ESI-MS²¹. Cette technique peut de plus être menée à bien sur un format à 96 puits et permet ainsi d'atteindre un débit de criblage tout à fait intéressant³⁰.

²⁹ (29) Ogata, Y.; Scampavia, L.; Carter, T. L.; Fan, E.; Turebeka, F. *Analytical Biochemistry* **2004**, *331*, 161.

³⁰ (30) DeBasil, V.; Haskins, N.; Organ, A.; Bateman, R.; Giles, K.; Jarvis, S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 1165.

Cette technique a par exemple été appliquée avec succès dans le cadre du criblage de la liaison d'anticorps polyclonaux dirigés contre les médicaments du type benzodiazepine³¹. 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. Ces complexes ont été retenus sur les microconcentrateurs lors des étapes de centrifugation. Les autres composés, ne montrant pas d'affinité pour les anticorps ont été éliminés par passage au travers des membranes des dispositifs. Les molécules liées ont ensuite été libérées des anticorps par acidification du milieu et l'éluat a été analysé par HPLC ESI-MS. Une application du même type a été menée à bien dans le cadre du criblage d'inhibiteurs des protéases du cytomégalovirus humain³².

Ce type de stratégie nécessite de mettre au point des lavages des membranes pour éviter toute liaison non spécifique de composés sur le filtre ou sur la cible. A chaque lavage il y a ré-établissement d'un équilibre entre les molécules liées et le liquide de lavage ce qui est un phénomène d'autant plus défavorable que le composé a une faible affinité pour la cible. Cependant, cette technique permet une séparation rapide et efficace entre les composés ayant ou n'ayant pas d'affinité pour la cible moléculaire utilisée.

La technique de spectrométrie de masse jusque là couplée à cette technique séparative et l'ESI. Cette technique d'ionisation doit dans ce cas être couplée à un analyseur de forte sensibilité compatible avec la détection des composés liés même après un certain nombre de lavages²¹. De plus en l'état, cette stratégie ne permet pas d'obtenir des informations quand à l'affinité relative des composés, obligeant à avoir recours à un deuxième test pour pouvoir caractériser plus finement les touches.

4. Ultrafiltration pulsée couplée à la spectrométrie de masse ESI (pulsed ultrafiltration/ESI-MS)

Cette technique est une extension de la précédente et utilise le même principe de membrane filtrante mais cette fois-ci sans centrifugation et directement en ligne avec le spectromètre de masse. Le schéma de principe utilisé est présenté dans la Figure 28 ci-après.

³¹ (31) Wieboldt, R.; Zweigenbaum, J.; Henion, J. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1683.

³² (32) Siegel, M. M.; Tabei, K.; Bebernitz, G. A.; Baum, E. Z. *journal of mass spectrometry* **1998**, *33*, 264.

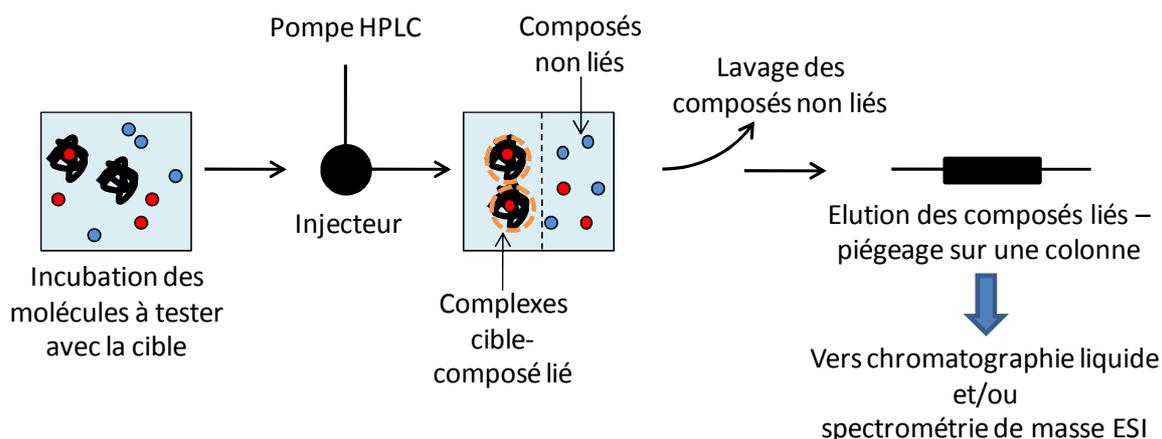


Figure 28 : Schéma illustrant le principe des tests utilisant l'ultrafiltration pulsée en criblage

Après une étape d'incubation des composés à tester avec la cible moléculaire choisie, le mélange est introduit 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 spectrométrie de masse couplée à l'ESI²¹.

Cette démarche a par exemple été appliquée au criblage d'inhibiteurs de la cyclooxygénase de type II (COX II) présents dans des extraits de plantes³³. Les chromatogrammes obtenus en présence et en absence de COX II ont été comparés et sont présentés en Figure 29.

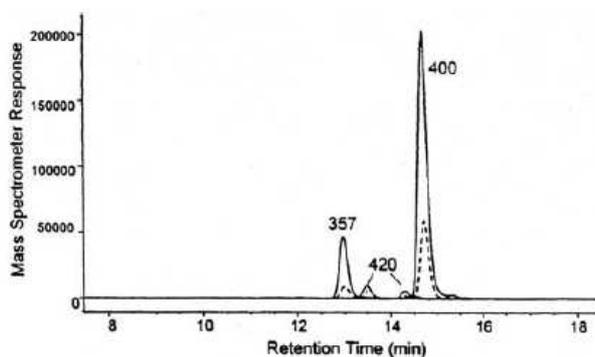


Figure 29 : chromatogrammes HPLC-ESI MS des composés élués dans le cadre du criblage d'inhibiteurs de la COX II avec les valeurs des pics [M-H]- correspondants. En hachuré se trouve le témoin incubé sans cible moléculaire et en trait plein se trouve l'échantillon mis en présence de COX II

³³ (33) VanBreenen, R. B.; Huang, C. R.; Nikolic, D.; Woodbury, C. P.; Zhao, Y. Z.; Venton, D. L. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2159.

Les signaux correspondants aux inhibiteurs ($m/z = 357$ et 400) de la COX II augmentent lorsque l'extrait est incubé avec cette enzyme, le signal en hachuré correspondant au signal observé pour l'échantillon analysé sans cible moléculaire, c'est-à-dire, la part de signal due aux liaisons non spécifiques des composés.

Une étude a également été menée dans le cadre du criblage de la liaison de molécules à la Dihydrofolate réductase³⁴. Une incubation de 22 composés avec et sans DHFR dans un tampon phosphate spécifique a alors été faite. Après injection des solutions incubées, la chambre de filtration a été rincée pendant 40 minutes par de l'eau ultrapure pour éliminer la présence de tampon et les composés non spécifiquement liés. La phase mobile a ensuite été remplacée par une solution contenant 10% de méthanol et 2% d'acide acétique pour rompre les complexes non covalents et libérer les composés liés à la DHFR et l'éluat injecté directement en ESI-MS. Un exemple de résultats est présenté en Figure 30 ci après.

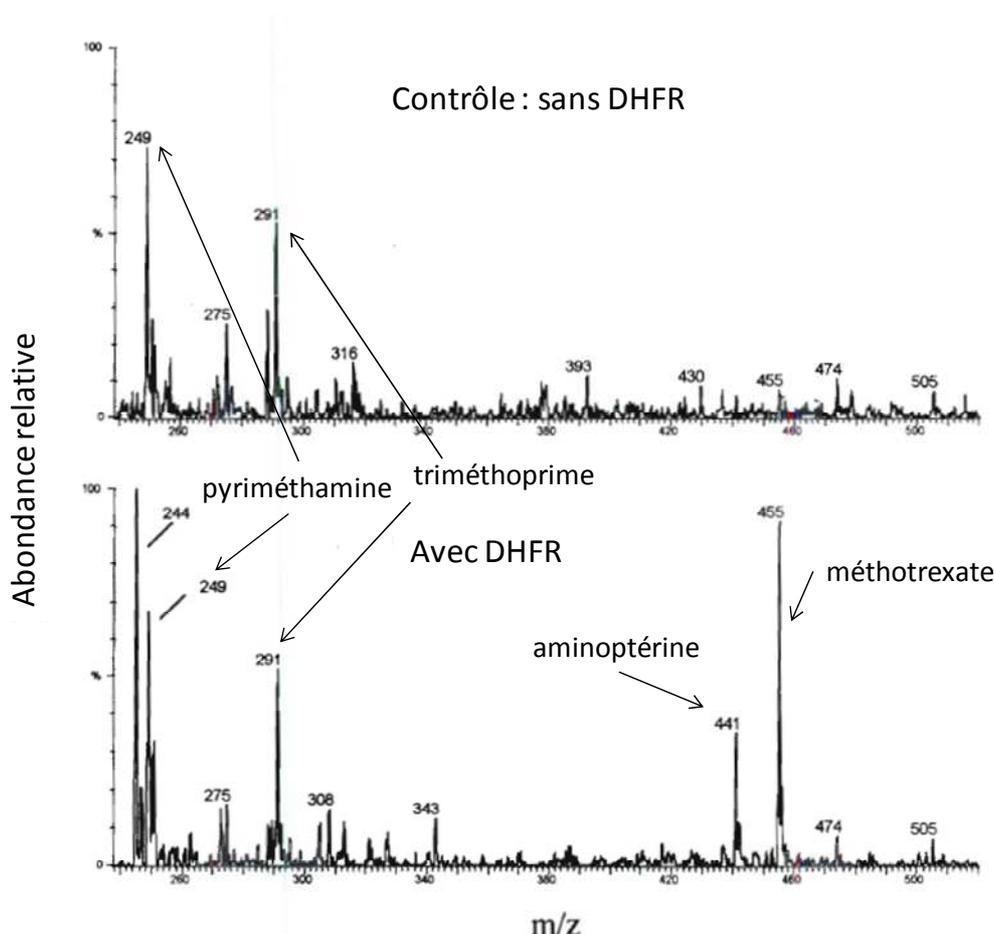


Figure 30 : spectres ESI-MS obtenus lors du criblage d'une librairie de 22 composés à la recherche de molécules liant la DHFR en présence et en absence de DHFR³⁴.

³⁴

(34) Nikolic, D.; Breemen, R. B. v. *Comb. Chem. and HTS* 1998, 1, 47.

La comparaison des 2 spectres permet de mettre en évidence deux inhibiteurs forts de la DHFR (le méthotrexate et l'aminoptérine) dont l'intensité des signaux spécifique augmente lorsque incubés avec l'enzyme. Cependant, il faut remarquer que d'autres produits, tels que la pyriméthamine et le triméthoprime, pourtant ayant une affinité pour la DHFR, sont considérés comme non liants du fait de leur fixation non spécifique au sein du dispositif.

De par l'utilisation de conditions de pouvoir dénaturant croissant pour libérer les molécules liées aux cibles moléculaires, il a été également possible de déterminer les constantes de dissociations des complexes étudiés et ainsi atteindre une information relative à l'affinité des composés.

Là encore, cette technique est utilisée en criblage mais nécessite l'usage d'un système de pompage de solvants complexe. De plus, du fait que la chambre de filtration est réutilisée d'une analyse à l'autre, des phénomènes de pollution peuvent survenir et aboutir à des faux positifs et des liaisons non spécifiques. Pour limiter ces problèmes il faut s'assurer de faire chaque expérience en doublon, avec et sans cible moléculaire et seule une analyse différentielle des deux permet de déterminer les éventuelles touches. Au final, bien que pouvant amener à une double information très intéressante en criblage, un tel protocole n'a pas été validé pour un usage en haut débit et n'a pas trouvé d'application large dans le cadre de grandes campagnes de criblage²¹.

5. Autres techniques de criblage moléculaire par spectrométrie de masse en phase condensée liquide

Il existe d'autres techniques de criblage moléculaire par spectrométrie de masse en phase condensée liquide. Elles sont cependant bien moins répandues que les précédentes.

La première d'entre elles est l'ultracentrifugation couplée à la spectrométrie de masse ESI (ultracentrifugation/ESI-MS). Cette technique n'est pas très répandue et n'a été référencée qu'une fois³⁵. Elle consiste en une ultracentrifugation d'un mélange de molécules à tester et de la protéine cible. La force centrifuge permet de séparer les cibles libres, les cibles liées par des ligands et les molécules non liantes sous la forme d'un gradient. Des prélèvements se font à différents niveaux de profondeur du gradient et les solutions obtenues

³⁵ (35) Holzman, T. F.; Harlan, J. E.; Egan, D. A.; Buko, A. M.; Solomon, L. R.; Lador, U. S.; Tang, Q. *PCT Int. Appl.* **2000**, 57.

sont dénaturées et analysées en spectrométrie de masse couplée à l'ESI. Plus une molécule est présente en profondeur dans le gradient et plus elle se lie fortement à la cible. L'usage de ce test en criblage nécessite cependant un matériel particulier et implique de faire de nombreux prélèvements pour étudier une seule molécule, ne permettant donc pas un débit d'analyse intéressant²¹.

La deuxième technique est la chromatographie de perméation de gel couplée à la spectrométrie de masse ESI (gel permeation chromatography/ESI-MS). Cette technique repose sur l'usage d'une colonne d'exclusion stérique conditionnée pour être centrifugée et les éluats obtenus sont ensuite analysés par spectrométrie de masse ESI³². Cette méthodologie offre une séparation efficace de mélanges de composés non liés, de cibles seules et de cibles sur lesquelles sont fixées des molécules, le tout dans des conditions natives. L'éluat, consistant en un mélange de cibles seules et de complexes [cible+molécule liée] et ensuite dénaturé et les ligands ainsi libérés sont analysés par ESI-MS. Cette approche dissocie l'étape de séparation de l'étape d'analyse pour permettre une bonne flexibilité et a ainsi prouvé être compatible avec différentes techniques de détection telles que l'ESI-MS, ESI-MS-NMR (technique en tandem couplant un spectromètre de masse à un spectromètre de résonance magnétique nucléaire)^{21,36}. Cependant, les dispositifs nécessaires pour mener à bien ce type d'étude sont spécifiques et donc plus coûteux que les microconcentrateurs par exemple.

La dernière technique mettant en œuvre une phase condensée liquide pour le criblage moléculaire est l'électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse (capillary electrophoretic/ESI-MS). Les séparations lors d'une électrophorèse capillaire sont produites par les migrations différentielles des solutés confinés dans un tube capillaire soumis à champ électrique important. L'électrophorèse capillaire d'affinité est permise lorsqu'un changement dans la migration d'une cible est le reflet de son interaction avec un ligand. La procédure généralement mise en place lors de ces études est de garder la cible moléculaire sous une forme neutre (en ajustant le pH du milieu électrophorétique au point isoélectrique de la cible) et les molécules à tester sous une forme chargée. Ainsi la mobilité du complexe [cible+ligand] est inférieure à celle du ligand seul (cette diminution étant due aux effets de taille et de forme du complexe [cible+ligand] alors que la charge est la même qu'avec le ligand seul)²¹. Cette approche est très utile lors du criblage de bibliothèques complexes de composés du fait du pouvoir résolutif très important propre à l'électrophorèse capillaire. Cependant, cette technique reste

³⁶ (36) Dunayevskiy, Y. M.; Lai, J. J.; Quinn, C.; Talley, F.; Vouros, P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1178.

difficile à mettre en œuvre. De plus, bien que le pouvoir résolutif permette la séparation de mélanges de composés à tester, il est concrètement assez difficile d'obtenir l'ensemble des composés sous forme ionique dans le tampon d'électrophorèse sans rencontrer des problèmes de solubilité.

iii. Criblage en phase solide par MALDI-MS

Les techniques de criblage de cibles moléculaires en phase solide couplées à la spectrométrie de masse sont moins utilisées que celles en phase liquide. Trois protocoles distincts sont regroupés dans cette approche : l'étude de complexes non covalents en MALDI, les « sondes d'affinité » (affinity probes MALDI ou Surface Enhanced Laser Desorption Ionization SELDI-MS) et les études récentes de « décroissance d'intensité » (intensity-fading MALDI-TOFMS).

La technique MALDI ne permet pas facilement d'obtenir des informations sur des complexes non-covalents. Seuls quelques résultats probants ont été obtenus avec des laser spécifiques dans l'infra rouge et très peu en ultra-violet (du fait que ce type de laser est plus énergétique et entraîne la rupture des liaisons)²¹. En effet, les complexes non-covalents ne sont étudiables que lors des premiers tirs laser d'une série 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. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les matrices neutres telles que la 6-aza-2-thiothymine, la 2,6-dihydroxyacetophenone et l'acide sinapinique neutralisé pour les lasers UV et l'urée pour les lasers infra-rouge³⁷. L'usage du MALDI pour ioniser sans les rompre des complexes non-covalents est de ce fait très peu pratique et très peu répandu.

Le principe des sondes d'affinité consiste à fixer la cible moléculaire sur un support compatible avec une analyse par spectrométrie de masse. Ces supports sont des plaques spécifiques dont les puits sont modifiés pour pouvoir fixer et retenir les protéines. Les différents types de traitements disponibles sont présentés en Figure 31 ci-après.

³⁷ (37) Hillenkamp, F. *NATO Asi Ser Ser C* **1998**, 510, 181.

Chemical Surfaces – Protein Expression Profiling



Biological Surfaces – Protein Interaction Assays

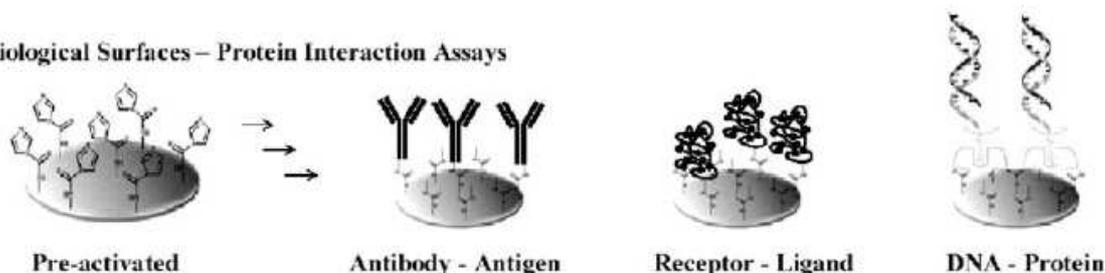


Figure 31 : Les différents types de traitement de surface des « sondes d'affinité » sur lesquelles les cibles moléculaires sont fixées³⁸

Les cibles moléculaires ainsi immobilisées par l'une ou l'autre technique, servent à retenir spécifiquement les molécules ayant une affinité. Il convient alors de déposer l'échantillon à tester sur la surface puis de rincer la sonde d'affinité pour éliminer tous les composés n'ayant pas d'affinité. Les composés fixés sont ensuite libérés par l'impact laser en présence ou en absence de matrice lors de l'analyse en TOF-MS^{21,38,39}. En effet, cette technique rompt les liaisons non-covalentes entre les ligands et les cibles. De plus cette approche permet la subdivision du support métallique en petites régions, chacune dédiée à une cible moléculaire donnée. Plusieurs cibles peuvent donc être testées avec la même solution de ligands⁴⁰. Cette approche nécessite cependant d'immobiliser les cibles moléculaires sur une surface métallique et cet aspect est très coûteux et doit être parfaitement maîtrisé car il conditionne la qualité des informations pouvant être obtenues. Ainsi, même si l'usage de sondes d'affinité couplées à la technique MALDI semble être prometteur en terme de criblage de cibles moléculaires, les limitations dues à l'immobilisation nécessaire des cibles sur un support gênent son essor²¹.

La troisième approche de criblage moléculaire par spectrométrie de masse en phase solide est l'étude de « décroissance d'intensité » (intensity-fading IF) des signaux de

³⁸ (38) Seibert, V.; Wiesner, A.; Buschmann, T.; Meuer, J. *Pathology – Research and Practice* **2004**, *200*, 83–94.

³⁹ (39) Merchant, M.; Weinberger, S. R. *electrophoresis* **2000**, *21*, 1164.

⁴⁰ (40) Little, D. P.; Cornish, T. J.; O'Donnell, M. J.; Braun, A.; Cotter, R. J.; Koester, H. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4540.

composés retenus sur des cibles moléculaires⁴¹. Le principe de cette manipulation est de suivre la décroissance de l'intensité des signaux de molécules obtenus par MALDI-TOFMS avant et après l'ajout de la cible moléculaire en solution. 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) pour pouvoir être séparée du reste de la solution une fois l'incubation effectuée. La solution ainsi débarrassée de la cible moléculaire et des molécules y étant liées est ensuite à nouveau analysée par MALDI-TOFMS. Seule une analyse statistique des intensités des différents pics permet de déterminer quelles espèces ont été retenues sur la cible moléculaire. Un exemple de résultats obtenus dans le cadre du criblage de salive de sangsue (*Hirudo medicinalis*) à la recherche d'inhibiteurs de la carboxypeptidase A (CPA) est présenté en Figure 32.

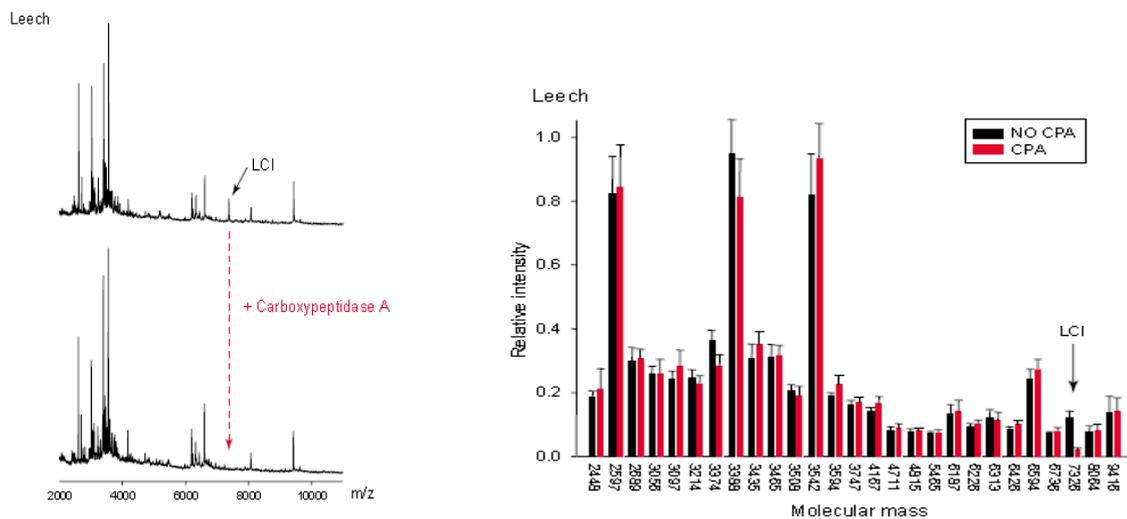


Figure 32 : spectres de masse MALDI-TOFMS de la salive de sangsue avant et après ajout de carboxypeptidase A (CPA) et analyse statistique des intensités des signaux de molécules montrant la présence d'un inhibiteur (LCI)

Comme le montre cette figure, la comparaison statistique des intensités des signaux MALDI-TOFMS obtenus pour les molécules contenues dans la salive de sangsue montre une molécule (LCI) pour laquelle une décroissance est observée lorsque incubée avec la carboxypeptidase A.

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. Cela se traduit par un faible débit d'analyse. De plus, les composés de faible affinité ne sont pas considérés dans cette étude car

⁴¹ (41) Yanes, O.; Villanueva, J.; Querol, E.; Aviles, F. X. *drug discovery today* **2004**, 3, 23.

la décroissance de leurs signaux est faible. L'étude des espèces liées se fait par une détection « négative » : c'est par leur absence dans le spectre après incubation que les molécules montrent leur activité. Cela 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. En dernier lieu, cette approche met en jeu des dispositifs complexes pour la séparation des cibles moléculaires et des molécules liées du reste de la solution, passant soit par une modification des protéines (par fixation de biotine) ou par un greffage à la surface de billes magnétiques. Ainsi bien que mettant à profit les avantages d'une analyse par MALDI-TOFMS (rapidité, sensibilité, ionisation simultanée de nombreux composés et facilité d'automatisation), ce type d'approche reste encore pour l'heure assez limitée en criblage.

c. Originalité de notre approche de criblage direct par MALDI-TOFMS ?

Comme nous l'avons vu précédemment, chacune des approches de criblage moléculaire par spectrométrie de masse présente des avantages et des inconvénients. Nous avons fait le choix de dissocier la formation des complexes de l'analyse de manière à fournir un protocole le plus simple possible et compatible avec de nombreux échantillons.

Ainsi, nous avons choisi d'utiliser une technique de séparation des complexes non-covalents [cible-molécule active] en phase liquide : l'ultrafiltration-centrifugation par microconcentrateurs. En effet, comme nous l'avons vu cette approche donne de très bons résultats si un soin particulier est apporté aux étapes de lavage. De plus la phase liquide est la plus représentative de l'état natif des cibles moléculaires et donne de ce fait une grande vraisemblance aux résultats obtenus. D'autre part, le matériel requis pour une telle étape est peu coûteux et facile d'utilisation.

Nous avons choisi de coupler cette approche à une détection en phase solide par MALDI-TOFMS car cette technique présente des avantages en termes de réactivité et de fiabilité. Elle est très répandue au sein des laboratoires d'analyses et elle est compatible avec un grand nombre de composés. Elle ne nécessite pas le marquage des composés à analyser et atteint des limites de détection très basses. Elle permet de plus l'analyse simultanée de plusieurs molécules, sans avoir recours à une technique séparative (généralement assez coûteuse et assez délicate d'entretien). Cette technique, notamment lorsqu'elle est couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol, est rapide, fiable, précise, spécifique et reproductible,

et regroupe ainsi tous les critères pour être utilisée en criblage. Elle est de plus compatible avec différents analyseurs, ce qui permet de transposer les analyses d'un instrument à un autre. Étant couplée généralement à des analyseurs permettant d'atteindre des informations structurales, cette technique prouvera tout son potentiel lors de l'analyse de mélanges complexes, sans étape de séparation préalable⁴².

Une des limitations en criblage du MALDI-TOFMS étant la nécessité, jusque là, d'immobiliser les cibles moléculaires sur un support, pouvoir s'en affranchir par l'utilisation de microconcentrateurs représente une avancée pouvant permettre d'en généraliser l'usage en criblage²¹.

C'est pourquoi, nous nous sommes proposés de mettre au point un protocole mettant à profit les avantages du MALDI tout en contournant les problèmes rencontrés jusque là pour l'étude des complexes non-covalents. Nous avons gardé à l'esprit les considérations économiques propres à tout test de criblage et nous nous sommes attachés à développer un protocole permettant de faire les deux étapes de criblages (primaire et secondaire) en une seule étape d'échantillonnage pour un coût par échantillon modéré.

CONCLUSION

Ainsi, nous avons vu que le criblage et la mise en place de nouveaux tests pour la recherche de nouveaux médicaments est légitime du fait de la gravité des atteintes auxquelles la santé publique doit faire face. Nous avons également présenté l'intérêt d'une approche de criblage moléculaire, simple et potentiellement automatisable, pour atteindre un haut débit d'analyse et avoir confiance dans les résultats obtenus. L'approche de criblage par spectrométrie de masse a également montré son intérêt dans l'étude de la liaison de composés à diverses cibles moléculaires. C'est pourquoi nous avons décidé de mettre en place une nouvelle approche de criblage moléculaire par spectrométrie de masse MALDI-MS présentant toutes les qualités requises pour devenir une méthode intéressante en criblage.

⁴² (42) Speicher, A.; Hollemeyer, K.; Heinzle, E. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, *15*, 124.

Chapitre 2 : Mise en place des tests de criblage

INTRODUCTION

Dans ce deuxième chapitre, nous allons nous attacher à décrire en détails la stratégie de criblage que nous avons mis en place. Ainsi, dans un premier point nous présenterons l'organisation générale des tests que nous avons développés pour le criblage de la liaison de composés à des cibles moléculaires. Dans un deuxième temps nous décrirons les deux cibles moléculaires sur lesquelles nous avons basé notre étude. Nous présenterons ainsi leurs propriétés biologiques et leurs places en thérapeutique. Nous décrirons également les molécules, dont la liaison à ces cibles est connue, que nous avons utilisées comme témoins positifs au cours de nos travaux. Par la suite nous présenterons chaque étape du protocole que nous avons mis en place : l'incubation des molécules à tester avec la cible, l'élimination des composés non liés et enfin l'analyse des composés liés aux cibles moléculaires. Cette dernière étape sera divisée en deux points distincts, l'analyse directe des composés liés sans traitement d'échantillon et l'analyse des composés liés après digestion ou dénaturation des cibles moléculaires protéiques.

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

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

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

Cet échantillonnage devait regrouper les étapes générales des tests de criblages de cible moléculaires que sont : une étape d'incubation des composés avec la cible moléculaire choisie (en conditions non dénaturantes), une étape d'élimination des composés non liés à la

cible et enfin l'étape de détection des composés liés par désorption/ionisation laser assistée par matrice couplée à la spectrométrie de masse à temps de vol (MALDI-TOFMS). Les trois étapes principales du protocole sont schématisées ci-dessous (Figure 33) :

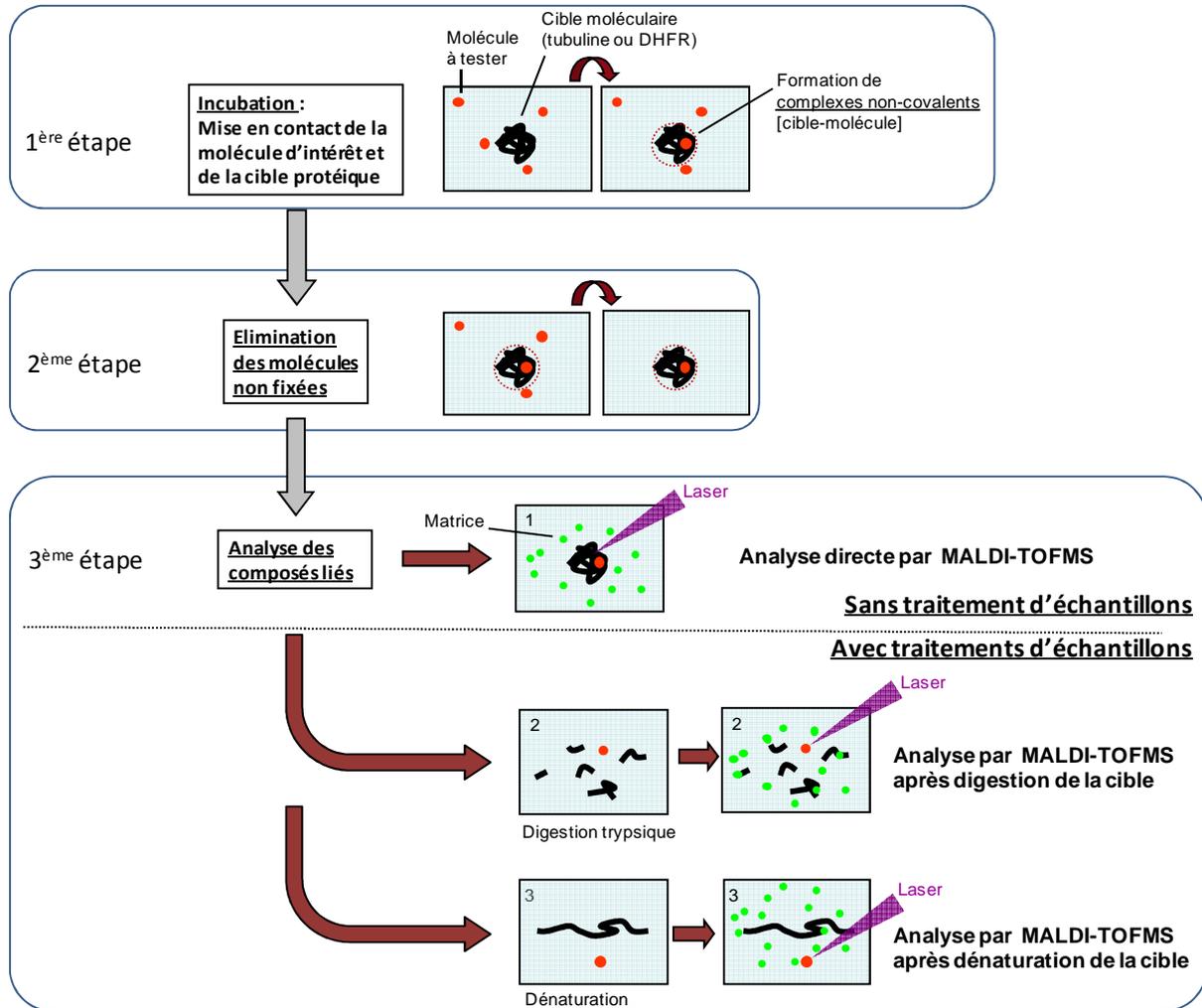


Figure 33 : protocole général de l'étude

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

MALDI-TOFMS sans aucun traitement supplémentaire, une analyse après digestion de la cible ou une analyse après dénaturation de la cible.

Les différentes étapes d'incubation, d'élimination des composés non liés et de traitement d'échantillons précédant ou non l'analyse des composés, seront décrites plus en détails dans la suite de ce manuscrit. Nous ferons également le point sur les différentes méthodes expérimentées et celles sur lesquelles notre choix s'est finalement arrêté. Nous présenterons également le matériel et les solvants utilisés lors de la réalisation des diverses étapes de ces travaux.

2. Les cibles moléculaires choisies

Nous allons à présent décrire les deux cibles moléculaires, tubuline et DHFR, sur lesquelles nous avons mené notre étude. Nous expliquerons leur intérêt biologique et leur place en thérapeutique humaine. Ces cibles sont deux applications du protocole que nous avons mis au point, montrant la possibilité de pouvoir cribler la liaison de composés à diverses cibles protéiques un utilisant une même approche.

a. La tubuline

Les microtubules sont les constituants majeurs du cytosquelette des cellules eucaryotes. Ils sont constitués d'hétérodimères de tubuline et de protéines associées (Microtubules Associated Proteins). La tubuline existe sous différentes sous unités de masses moléculaires de l'ordre de 50 kDa (surtout α et β , mais également γ , δ et ϵ), chacune étant déclinée sous différents isotypes de compositions légèrement différentes (au moins 6 différents pour les sous unités α et β). Tout cela conduit à en faire une famille de protéines très variée⁴³.

Le terme isotype a été utilisé dans la littérature de trois façons différentes. Premièrement, le terme est utilisé pour décrire les formes d'une même protéine, codées par différents gènes, et qui diffèrent dans leur séquence en acides aminés. Deuxièmement, le terme est utilisé pour décrire les différentes formes d'une même protéine, générées après

⁴³ (43) Dumontet, C.; Sikic, B. I. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 1061.

modification(s) post-traductionnelle(s). Troisièmement, le terme est utilisé de façon empirique pour désigner des formes multiples de protéine résolues par électrophorèse sur gel bidimensionnel. Dans le cas de la tubuline, la multiplicité s'explique par la variété des chaînes et/ou par des modifications post-traductionnelles. Nous parlerons d'**isotypes** pour différencier les tubulines (ou autres protéines) issues de gènes différents¹³.

Quoiqu'il en soit, les études phylogéniques menées sur les sous unités majoritaires α et β , ont montré une très forte homologie des ces protéines au sein du règne des mammifères⁴³. Les résultats obtenus lors d'une étude utilisant de la tubuline bovine sont donc parfaitement transposables à l'homme.

La Figure 34 ci-dessous décrit l'arrangement de la tubuline au sein des cellules.

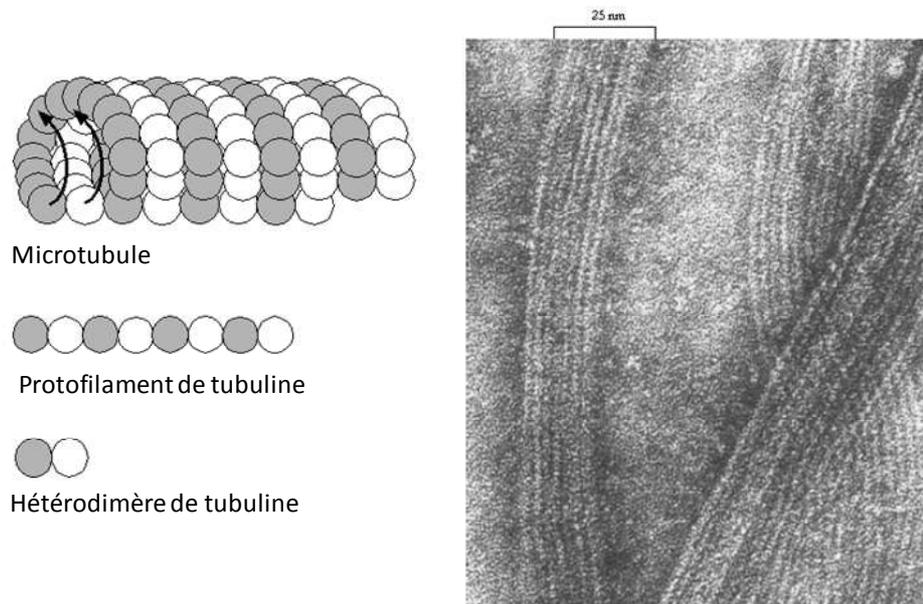


Figure 34 : Arrangement des sous unités de tubuline en microtubules au sein des cellules eucaryotes et image de microscopie électronique de microtubules¹³

Comme le montre la Figure 34, les hétérodimères de tubuline α et β sont alignés en 13 protofilaments, arrangés parallèlement en un cylindre creux et rigide de 25 nm de diamètre⁴⁴. Les microtubules sont en équilibre dynamique avec une extrémité en croissance et l'autre en décroissance, et c'est la stabilisation de l'une ou l'autre de ces extrémités qui permet au microtubule de croître ou de décroître⁴³.

Ces structures jouent un rôle crucial dans la mitose cellulaire, mais elles participent également au transport intracellulaire des molécules et aux mobilités axonales et cellulaires (Figure 35)⁴³.

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

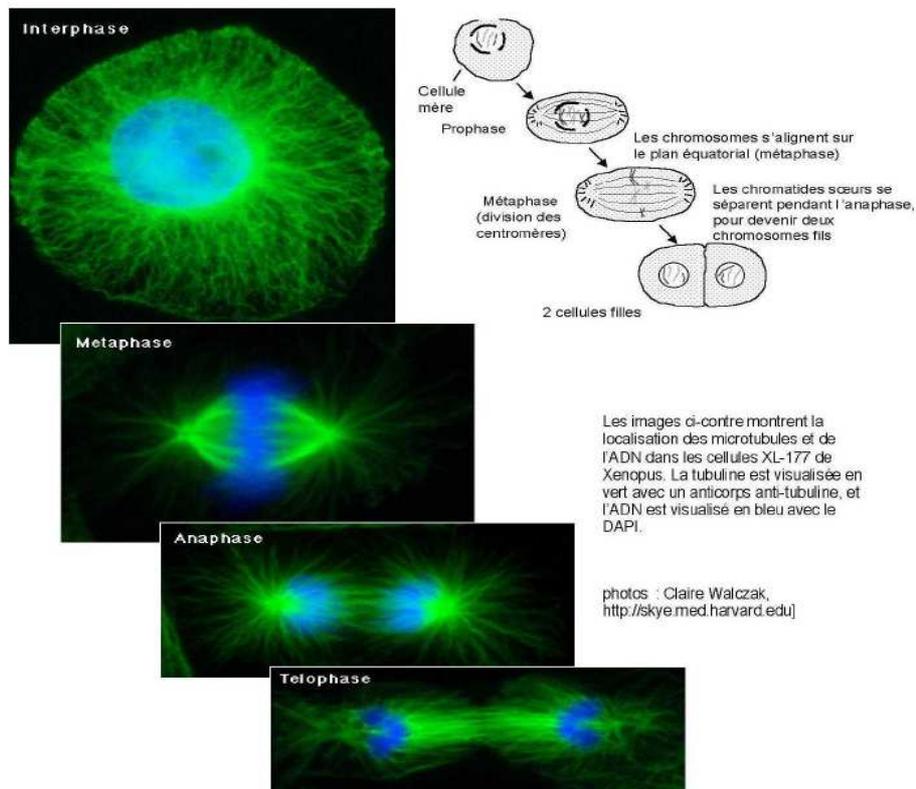


Figure 35 : La mitose et la tubuline constituant le fuseau mitotique (en vert)¹³

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

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

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

A l'heure actuelle, aucun traitement du cancer, notamment en chimiothérapie, n'est totalement satisfaisant du point de vue de sa tolérance et de ses effets secondaires. La découverte de produits à activité spécifique, telle que la liaison à la tubuline, est donc au centre du développement médical⁴⁵. De cela découle le besoin de pouvoir s'appuyer sur des techniques simples, rapides et fiables pour tester l'activité anti-tubuline de nombreuses molécules⁴⁶.

Le test utilisé actuellement pour la découverte et la caractérisation de molécules appartenant à la classe des poisons du fuseau mitotique est le « test de polymérisation de la tubuline ». Il a été mis au point en 1968 par l'équipe de Pierre Potier et prône l'utilisation de la tubuline pour évaluer l'activité antimittotique potentielle de différentes drogues⁴⁷.

Pour cela, un cycle mitotique artificiel est recréé expérimentalement à l'intérieur d'une cuve de spectrophotométrie UV par l'introduction de tubuline, d'adjuvants à la polymérisation, et de la molécule à étudier. Il est alors possible de suivre la cinétique d'assemblage et de désassemblage de la tubuline en mesurant l'absorbance de la solution à 340 nm. En effet, lorsque la tubuline polymérise en microtubules à 37°C, l'absorbance du milieu augmente et lorsque les microtubules se dépolymérisent, à 0°C, l'absorbance du milieu diminue, comme le montre la **Figure 36**.

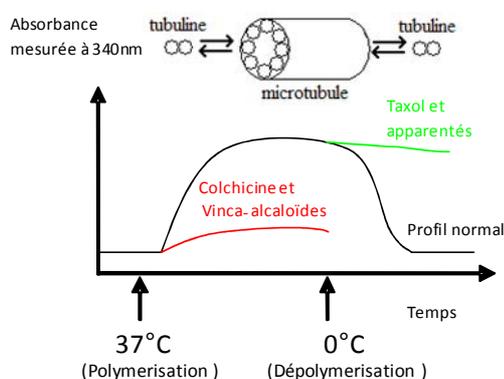


Figure 36 : Exemple de résultats du « test à la tubuline » en présence de deux types de molécules actives

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

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

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

⁴⁷ (47) Potier, P.

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

Cependant, ce test présente des écueils. En premier lieu, il ne peut pas être utilisé avec des produits absorbants dans le domaine de l'UV (entre 340 et 350nm), ou encore avec des mélanges complexes chargés en sels (tels que des extraits de plantes). En effet, les sels, et notamment le calcium, induisent une dépolymérisation des microtubules. Un autre problème est le changement de solubilité des produits lors du passage à 0°C qui peut induire la précipitation de certains composés à tester. De plus ce test souffre d'un manque de spécificité. Il a en effet été prouvé que certains composés, dont la liaison à la tubuline et l'activité antimittotique sont avérées, donnent des réponses négatives, voire paradoxales à ce test. C'est le cas par exemple de la Curacin A, lipide majoritaire de la membrane de *Lyngbya majuscula*, une cyanobactérie. Cet agent antimittotique puissant se lie à la tubuline au même site que la colchicine⁴⁸. Lorsque soumise au test à la tubuline cette molécule ne donne aucune réponse même à de très fortes concentrations (40 mM) et dans certains cas sa présence entraîne même une augmentation de l'absorbance par la formation d'édifices microtubulaires anormaux⁴⁹.

Ainsi, de nombreuses substances de nature chimique très diverse se lient à la tubuline et/ou aux microtubules⁴⁴. Comme nous l'avons vu précédemment, leur liaison à leurs sites actifs protéiques modifie la conformation de la tubuline en altérant sa possibilité de polymérisation. Cela induit une rupture de l'équilibre dynamique des microtubules et un arrêt du cycle mitotique.

Parmi les agents liant la tubuline, le premier mis en évidence fut la **colchicine**, si bien que la tubuline fut d'abord appelée « protéine liée par la colchicine » (colchicine binding protein)⁴³. Cette molécule, dont la structure est donnée ci-après en **Figure 37**, est extraite du Colchique d'automne (*Colchicum autumnale*).

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

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

Colchicine (C₂₂H₂₅NO₆)
MM = 399,16819g.mol⁻¹

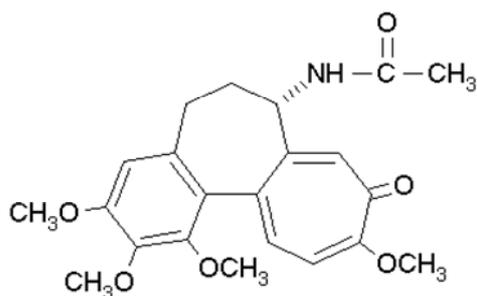


Figure 37 : structure de la colchicine

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

Elle n'est pas utilisée chez l'homme en chimiothérapie à l'heure actuelle du fait de sa forte toxicité se traduisant notamment dans le cas de surdosage par diarrhée, nausée, vomissements suivis de troubles neuromusculaires, rénaux et hématologiques. Cependant, des dérivés synthétiques de cette molécule sont en étude clinique⁴⁴. La colchicine trouve néanmoins une utilité en thérapeutique humaine dans le traitement des crises de goutte où son activité inhibitrice de la mobilisation des macrophages (par blocage de leur mobilité cellulaire) est mise à profit pour limiter l'inflammation. Quand à l'activité antimittotique de la colchicine, elle est utilisée *in vitro* comme sonde de la tubuline et pour l'étude des chromosomes⁴³.

La colchicine se lie à la tubuline soluble et aux microtubules au sein de sites à haute affinité par l'intermédiaire de liaisons non covalentes. Cette liaison relativement lente (un temps de contact de l'ordre d'une heure est nécessaire pour l'observer⁴³) sur un site à haute affinité des monomères de tubuline⁵⁰, induit un changement conformationnel (de la structure spatiale) de la protéine, qui ne sera plus intégrée à l'extrémité en croissance des microtubules⁵¹. Cela aura pour effet d'en favoriser la dépolymérisation par l'autre extrémité, et donc l'arrêt de la mitose⁵².

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

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

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

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

(*Catharanthus roseus*). Les études cliniques organisées alors ont surtout mis en évidence un effet antimétabolique important des extraits de cette plante⁵³. Les structures des molécules sont présentées en **Figure 38** ci après.

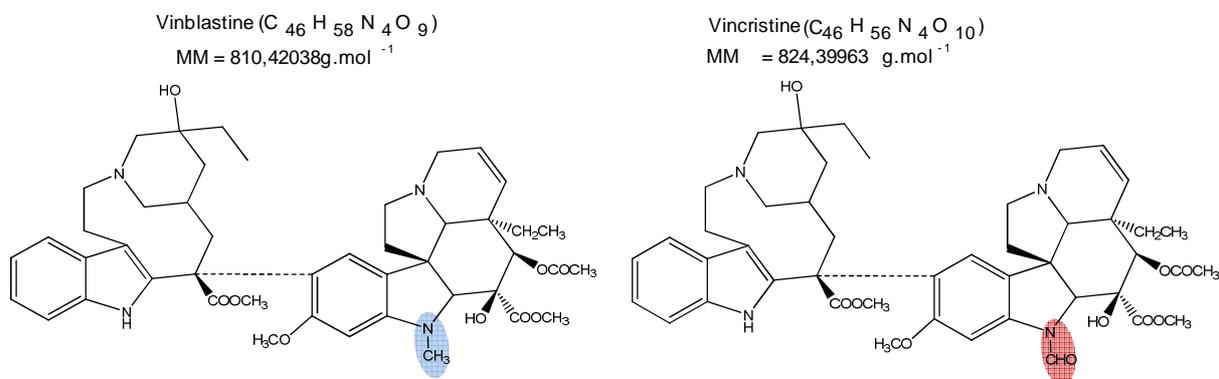


Figure 38 : structures de la vinblastine et de la vincristine

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

La vincristine et la vinblastine sont des alcaloïdes naturels qui se fixent de manière très spécifique sur le même site (dénommé « vinca domain ») de la sous unité β de la tubuline⁵⁴. Les deux molécules peuvent donc entrer en compétition pour le même site de liaison. Leur liaison à la tubuline soluble et aux extrémités des microtubules par des interactions non covalentes, est rapide et indépendante de la température^{44,52}. Là encore, leur liaison induira un changement de conformation de la protéine, bloquant le processus de polymérisation.

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

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

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

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

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

b. La DiHydroFolate Reductase (DHFR)

La deuxième cible moléculaire que nous avons utilisée est la dihydrofolate réductase (ou DHFR). La DHFR est un constituant normal des cellules eucaryotes et procaryotes. Cette protéine a une masse moléculaire voisine de 20 kDa⁵⁵. Elle possède une activité enzymatique en étant responsable de la catalyse d'une réaction essentielle pour la biosynthèse des bases nucléotidiques de l'ADN, comme le montre la **Figure 39**.

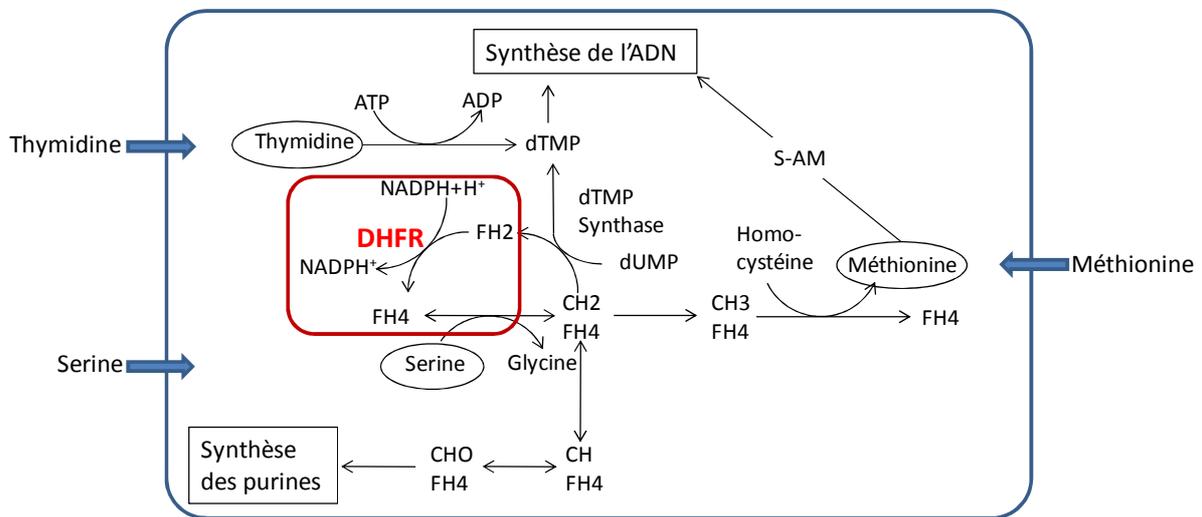


Figure 39 : Représentation schématique de la réaction catalysée par la DHFR et de son rôle dans la voie métabolique de synthèse du thymidilate, des nucléotides puriques et de la méthionine. FH2 : 7,8-dihydrofolate ; FH4 : 5,6,7,8-tetrahydrofolate ; CH3FH4 : 5-methyltetrahydrofolate ; CHOFH4 : 5-formyltetrahydrofolate ; CHF4 : 5-10-methenyltetrahydrofolate ; CH2FH4 : 5,10-methylenetetrahydrofolate ; S-AM : S-adenosylmethionine⁵⁵

Ainsi, comme présenté sur cette figure, la DHFR catalyse la transformation des 7,8-dihydrofolates en 5,6,7,8-tetrahydrofolates lesquels sont incorporés dans la synthèse des bases puriques de l'ADN. Cette réaction nécessite la présence d'un cofacteur, le NADPH+H⁺, consommé durant la réaction.

⁵⁵ (55) Schweitzer, B. I.; Dicker, A. P.; Bertino, J. R. *FASEB J.* **1990**, *4*, 2441.

Cette enzyme constitue donc une sorte de « plaque tournante » de la synthèse de l'ADN, phénomène très important lors de la division cellulaire. En effet, une synthèse d'ADN précède directement la mitose, de manière à former 2 cellules filles avec 2 lots de chromatides identiques.

Ainsi, l'inhibition de l'action de la DHFR entraîne la mort cellulaire par blocage de la synthèse d'ADN. Cette enzyme constitue donc une cible de choix lorsqu'une activité antiméiotique est recherchée. Il existe de plus une spécificité isotypique de cette enzyme au sein des différentes espèces, et il est dès lors envisageable de ne cibler préférentiellement l'activité antiproliférative que sur certains organismes qui s'attaquent à l'homme (comme les bactéries et les parasites tels que le paludisme par exemple).

Cette protéine est devenue une cible pour le développement de nouveaux médicaments dans le cadre de la thérapie des cancers, et à présent une large variété d'inhibiteurs de la DHFR est disponible^{55,56}.

Il semble alors évident qu'il y ait un grand intérêt à découvrir de nouveaux composés actifs qui inhibent la synthèse de l'ADN par une liaison avec la DHFR et ceci dans le cadre des traitements des cancers, mais également des atteintes bactériennes et parasitaires. Pendant 50 ans, de nombreux tests de criblage impliquant la DHFR ont été développés.

Le test moléculaire classique utilisé pour le criblage de la DHFR est de suivre son activité enzymatique par la mesure de la décroissance du signal ultraviolet (à 340 nm) de son cosubstrat (NADPH+H⁺) consommé lors de la réaction⁵⁷. Ce test a été mis au point en 1967 par Hillcoat, Nixon et Blakely⁵⁸. Si une molécule inhibitrice est présente dans le milieu réactionnel, la réaction catalysée par la DHFR n'aura pas lieu et le cosubstrat ne sera pas consommé.

Ce test présente quelques problèmes comme celui d'être imprécis en cas de présence d'agent interférant dans l'UV. Ce test prend également du temps (20 minutes d'analyse par échantillon) et est très dépendant de la température⁵⁷. Une autre limitation à l'usage de ce test est la faible stabilité des réactifs enzymatiques qui conditionnent très fortement la qualité de la

⁵⁶ (56) Matthews, D. A.; Bolin, J. T.; Burrige, J. M.; Filman, D. J.; Volz, K. W.; Kraut, J. J. *Biol. Chem.* **1985**, *260*, 392.

⁵⁷ (57) Widemann, B. C.; Balis, F. M.; Adamson, P. C. *clin. chem.* **1999**, *45*, 223.

⁵⁸ (58) Hillcoat, B. L.; Nixon, P. F.; Blakely, R. F. *Anal Biochem* **1967**, *21*, 178.

réponse obtenue⁵⁹. De plus, l'activité de l'enzyme nécessite un pH constant de 7,5, et ainsi le test de produits à caractère acide ou basique devient problématique. D'autres tests de criblage d'une activité anti-DHFR font appel à des animaux vivants⁶⁰ et sont de ce fait très coûteux. Des travaux récents ont montré l'usage de l'ultrafiltration pulse couplée à la spectrométrie de masse (PUF-MS) pour identifier et caractériser les molécules qui se lient à la DHFR³⁴. Ces études sont menées à bien par PUF-LC-MS dans laquelle une étape de séparation par chromatographie liquide haute performance est nécessaire⁶¹. Ce test vise à étudier la liaison de composés à la DHFR mais il est communément acquis que l'activité des petites molécules passe par leur liaison à des cibles spécifiques⁶¹. Cette démarche consiste à former des complexes de DHFR et de molécules liées dans une chambre de réaction sous un flux de solvant. Ensuite les complexes sont rompus par changement du tampon et les molécules jusque là liées à la DHFR sont libérées. Les molécules ainsi libérées sont analysées par spectrométrie de masse ESI. Quoiqu'il en soit ce test met en jeu un système de chromatographie liquide complexe à manier et le temps d'analyse est relativement long (approximativement 80 minutes par échantillon). De plus la chambre de réaction est utilisée d'une analyse à une autre et des problèmes de contamination et de liaisons non spécifiques peuvent se produire.

La DHFR utilisée au cours de cette étude est une enzyme humaine recombinante. Sa pureté est d'au moins 80% et elle a été fournie par Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le lot d'enzyme que nous avons choisi d'utiliser au cours de nos travaux est peu purifié car ceci n'est pas requis dans le cadre d'un usage en criblage. Travailler avec une protéine plus pure n'aurait pas d'effet sur la qualité de la réponse obtenue tout en augmentant notablement le coût du test. Cette protéine étant une enzyme, elle est fournie et stockée dans un tampon (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 5 µM NADPH, inhibiteurs de protéases et 50% de glycerol) de manière à conserver au maximum son activité.

Comme leur nom l'indique, les agents anticancéreux retrouvés dans la classe des antimétabolites entrent en compétition avec les métabolites naturels. Le remplacement de ces derniers par la molécule anticancéreuse au niveau du site de liaison de l'enzyme, la DHFR, induira une perte d'activité de cette dernière. Ces agents ont trouvé leurs applications

⁵⁹ (59) Brown, L. F.; Johnson, G. F.; Witte, D. L.; Feld, R. D. *clin. chem.* **1980**, *26*, 335.

⁶⁰ (60) McCullough, J. L.; Weinstein, G. D.; Hynes, J. B. *J. Invest. Dermatol.* **1977**, *68*, 362.

⁶¹ (61) Johnson, B. M.; Nikolic, D.; Breemen, R. B. v. *Mass Spectrom. Rev.* **2002**, *21*, 76.

cliniques depuis presque 50 ans et ils ont donné des résultats intéressants dès leur introduction et restent aujourd'hui encore au cœur des protocoles de chimiothérapie⁶².

Les différentes molécules liant la DHFR utilisées au cours de cette étude sont présentées dans la figure **Figure 40** ci-dessous.

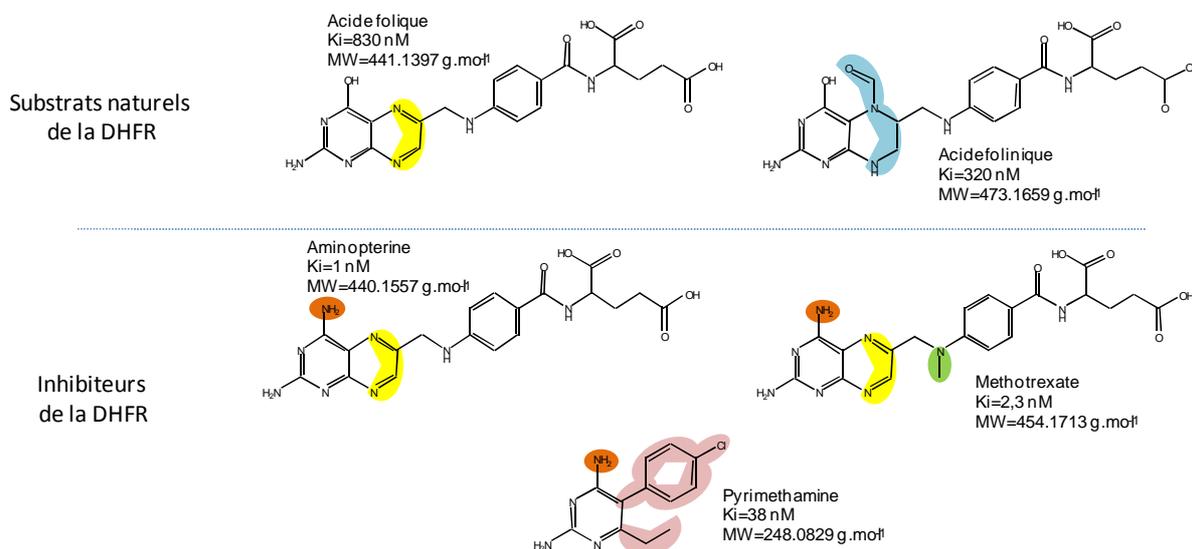


Figure 40 : structures de l'acide folique, de l'acide folinique, de l'aminoptérine, du méthotrexate et de la pyriméthamine. Les similitudes et les différences entre ces molécules sont mises en évidence en couleur.

L'aminoptérine (proche des substrats naturels de la DHFR : l'acide folique et de l'acide folinique), le premier inhibiteur de la DHFR, a été découvert il y a 50 ans. Cette molécule a démontré pouvoir provoquer une rémission même dans le cas d'une leucémie aigue⁶². Sa structure ne diffère de celle de l'acide folique que par le remplacement d'un hydroxyle (-OH) par une amine (-NH₂). Dix ans plus tard, le méthotrexate (un dérivé de l'aminoptérine avec une seule N-méthylation) a été introduit et reste une des molécules les plus utilisées pour traiter les cancers du sein, de la vessie, de la tête et du cou ainsi que les leucémies⁶³. Le méthotrexate (MTX) et l'aminoptérine entrent en compétition avec les substrats au niveau de la DHFR et ne peuvent pas être métabolisés de la même façon que les substrats naturels. Il y a alors blocage de l'enzyme, qui perd toute activité enzymatique. La liaison du méthotrexate à la DHFR est d'ordre non covalent et sa stabilité est encore renforcée au niveau cellulaire par la polyglutamination qu'il subit de la même manière que l'acide folique.

⁶² (62) Kaye, S. B. *Br J Cancer* **1998**, 78, 1.

⁶³ (63) Jolivet, J.; Cowan, K. H.; Curt, G. A.; Clendeninn, N. J.; Chabner, B. A. *N. Eng. J. Med.* **1983**, 309, 1094.

D'autres inhibiteurs de la DHFR sont disponibles pour le traitement d'autres atteintes telles que les parasitoses⁶⁴. C'est le cas de la pyriméthamine, un dérivé inhibant très fortement l'isotype de la DHFR propre aux protozoaires responsables du paludisme (du genre *Plasmodium*)⁵⁵. Cependant, la sélectivité de son action n'est pas totale et cette molécule montre tout de même une action sur la DHFR humaine (entraînant notamment des effets secondaires sur le métabolisme des folates et pouvant ainsi nécessiter une supplémentation du patient en folates lors du traitement antipaludéen).

Les différentes molécules liant la DHFR utilisées au cours de cette étude sont regroupées dans le **Tableau 4** ci-après. Ce tableau présente les formules brutes, les masses moléculaires exactes et les rapport m/z théoriques des ions pseudomoléculaires $[M+H]^+$ correspondants.

Molécule	Formule brute	MM (g/mol)	$[M+H]^+$ théorique (Da)
Aminoptérine	C ₁₉ H ₂₀ N ₈ O ₅	440,15567	441,16294
Acide folique	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	441,13968	442,14751
Acide folinique	C ₂₀ H ₂₃ N ₇ O ₇	473,16590	474,17317
Méthotrexate	C ₂₀ H ₂₂ N ₈ O ₅	454,17132	455,17859
Pyriméthamine	C ₁₂ H ₁₃ N ₄ Cl	248,08287	249,09015

Tableau 4 : Molécules liant la DHFR sur lesquelles a porté cette étude (avec présentation des formules brutes, des masses moléculaires et des m/z correspondants aux ions $[M+H]^+$ des différentes espèces)

Ces différentes molécules présentent de nombreux sites basiques pouvant se protoner facilement. Il est possible d'avancer qu'elles doivent présenter une affinité protonique importante, rendant leur analyse par MALDI-MS aisée et efficace pour une grande variété de matrices.

Le méthotrexate, la pyriméthamine, l'aminoptérine, l'acide folique et l'acide folinique utilisés au cours de ces travaux sont purs à 99% (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France).

⁶⁴ (64) Vangapandu, S.; Jain, M.; Kaur, K.; Patil, P.; Patel, S. R.; Jain, R. *Inc. Med Res Rev* **2007**, 27, 65.

3. Incubation des molécules à tester avec la cible moléculaire

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

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

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

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

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

Pour le **test impliquant la DHFR**, la solution d'incubation est constituée de 200 µL de solution de DHFR ($1,5.10^{-7}$ M) dans son tampon spécifique (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 5 µM NADPH, inhibiteurs de protéases et 50% de glycerol), de 50 µL de solution des molécules à tester (à 1.10^{-4} M pour les témoins : methotrexate, aminoptérine, pyriméthamine, acide folique ou acide folinique) dans de l'eau ultrapure et 250 µL d'eau ultrapure. Là encore le temps d'incubation est porté à une heure à 37°C.

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

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

4. Elimination des composés non liés à la cible moléculaire

Cette **2^{ème} étape**, cruciale, doit également être faite en conditions non dénaturantes. Elle vise à séparer les molécules non liées à la cible moléculaire choisie en vue des étapes ultérieures d'analyses. Nous allons présenter les deux différentes stratégies que nous avons testées pour parvenir à une séparation efficace des molécules non liées.

La **1^{ère} stratégie** consiste à mettre en place une séparation des cibles moléculaires (et des molécules y étant liées) du reste de la solution contenant les molécules non liées par **précipitation différentielle au sulfate d'ammonium**. En effet cet électrolyte est le plus utilisé pour la précipitation différentielle des protéines et son usage ne nécessite pas de faire appel à un matériel spécifique et n'est donc pas coûteux⁶⁵. Le but ici est d'augmenter la force ionique de la solution en ajoutant du sulfate d'ammonium jusqu'à atteindre une concentration qui entrainera la précipitation sélective des cibles moléculaires et des molécules y étant liées. Il conviendra alors de centrifuger et de récupérer le culot constitué des cibles et des molécules

⁶⁵ (65) Jiang, L.; Hea, L.; Fountoulakis, M. *Journal of Chromatography A* **2004**, 1023, 317–320.

y étant liées, les molécules non liées ou en excès, restent en solution. Le sulfate d'ammonium est très soluble en solution aqueuse et permet d'atteindre des forces ioniques très élevées. Les ions sulfates et ammonium peuvent s'approcher très facilement des sites chargés des protéines pour les neutraliser. De plus ce sel a peu d'effet dénaturant et permet de conserver les protéines sous leurs formes biologiquement actives.

Plusieurs essais ont été menés sur des solutions de protéines (tubuline et ovalbumine à 2.10^{-5} M dans de l'eau ultrapure) et ont permis de déterminer une concentration de sulfate d'ammonium entraînant une précipitation totale des protéines en solution. En effet, lorsque la solution contenant les protéines est ajustée à 1,5 M de sulfate d'ammonium, le culot qui se forme renferme la totalité des protéines ajoutées, l'absence de protéines encore en solution dans le surnageant ayant été vérifiée par MALDI-TOFMS. Cependant, il s'est avéré qu'à cette concentration en sulfate d'ammonium, une co-précipitation des molécules à tester intervient (essai mené sur la vinblastine et la vincristine à 5.10^{-5} M dans de l'eau ultrapure). Ceci a rendu l'usage de la précipitation différentielle impossible pour la séparation des cibles moléculaires et des molécules non liées ou en excès, ces dernières précipitant à la même concentration en sulfate d'ammonium.

La **2^{ème} stratégie** mise en place pour la séparation des composés non liés est la **filtration/centrifugation** préalable à l'analyse par spectrométrie de masse. Cette technique requiert l'utilisation de microconcentrateurs qui permettent de séparer la protéine cible (emportant avec elle toute molécule y étant liée) des autres constituants du mélange de masse inférieure par passage différentiel au travers d'une membrane spécifique. Cette étape est permise par la grande différence de masse entre les cibles moléculaires choisies (de plusieurs milliers de Da) et les molécules d'intérêt dont on cherche à tester l'activité (moins de 1000 Da).

Parmi les différents modèles disponibles sur le marché, nous avons utilisé des microconcentrateurs (MICROCON[®], Millipore, Molsheim, France) constitués d'une membrane de cellulose permettant de séparer les molécules en fonction de leurs masses. Normalement utilisés pour le dessalage des échantillons de protéines préalablement à leur analyse par spectrométrie de masse, ils permettent également de concentrer les échantillons jusqu'à un facteur 100. Les microconcentrateurs utilisés lors de nos recherches laissent filtrer tout composé ayant une masse inférieure à 10000 (pour le test utilisant la DHFR) ou 30000

Dalton (pour le celui impliquant la tubuline), les molécules de plus hautes masses étant retenues sur la membrane. Ces dispositifs sont présentés en Figure 41.

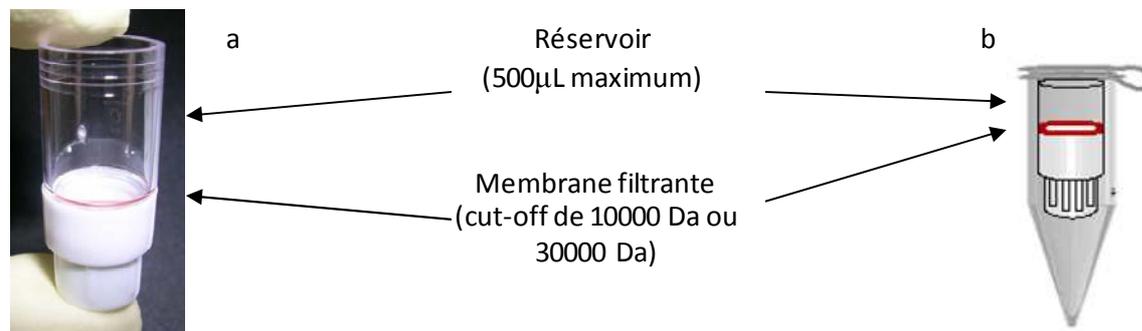


Figure 41 : photographie d'un microconcentrateur (a) et son utilisation au sein d'un tube Eppendorf® (b)

Dans le cadre de nos tests de criblage, nous avons utilisé les microconcentrateurs en une succession d'étapes. Tout d'abord, la membrane du dispositif doit être rincée pour en éliminer le glycérol qui en empêche la détérioration durant le stockage. Cette étape est nécessaire car sinon le glycérol est relargué dans l'échantillon lors de l'éluion des composés retenus sur la membrane (la cible et les molécules y étant liées) et sa présence nuira aux analyses MALDI des composés liés en empêchant la cristallisation des dépôts. Une fois cette étape assurée, 100µL, dans le cas de la tubuline, ou 500µL dans le cas de la DHFR de la solution à filtrer (constituée de la cible moléculaire et des molécules avec lesquelles elle a été incubée) sont ajoutés dans le réservoir du dispositif lui-même placé dans un tube eppendorf®. L'ensemble est ensuite mis à centrifuger selon un temps plus ou moins long en fonction de la membrane choisie (dans notre cas entre 12 et 30 minutes respectivement pour les tests utilisant la tubuline et la DHFR). Les protéines de hautes masses et les molécules qui y sont liées sont alors retenues sur les membranes des dispositifs alors que les molécules de plus basses masses se retrouvent dans le filtrat au fond du tube. Une fois le nombre de cycles de lavage désiré effectué, il convient de retourner le filtre et de filtrer un faible volume d'eau ultrapure (25µL) pour récupérer les composés jusque là retenus sur la membrane. Il faut préciser ici qu'il est important de veiller à ce que les membranes des microconcentrateurs ne sèchent jamais lors de ces étapes (à partir du rinçage du glycérol jusqu'à l'éluion des composés retenus) car ceci pourrait détériorer leurs propriétés.

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

plusieurs lavages successifs, par de l'eau ultrapure, des membranes après filtration des solutions d'incubation.

Cependant, le protocole que nous avons mis au point ne doit pas contenir trop d'étapes de lavages car il y aura à chaque cycle un déplacement de l'équilibre en faveur d'une « libération » d'une partie des molécules liées aux cibles moléculaires, ce qui se traduit par une diminution de la quantité globale des molécules liées et ainsi une diminution de la sensibilité de nos tests. Ainsi les lavages que nous avons mis en place devront être assez nombreux pour assurer une bonne séparation des espèces non liées mais ne devront pas être trop nombreux pour ne pas nuire à la qualité du test. Le schéma ci-après, en Figure 42, présente l'organisation générale du protocole mis au point utilisant un microconcentrateur.

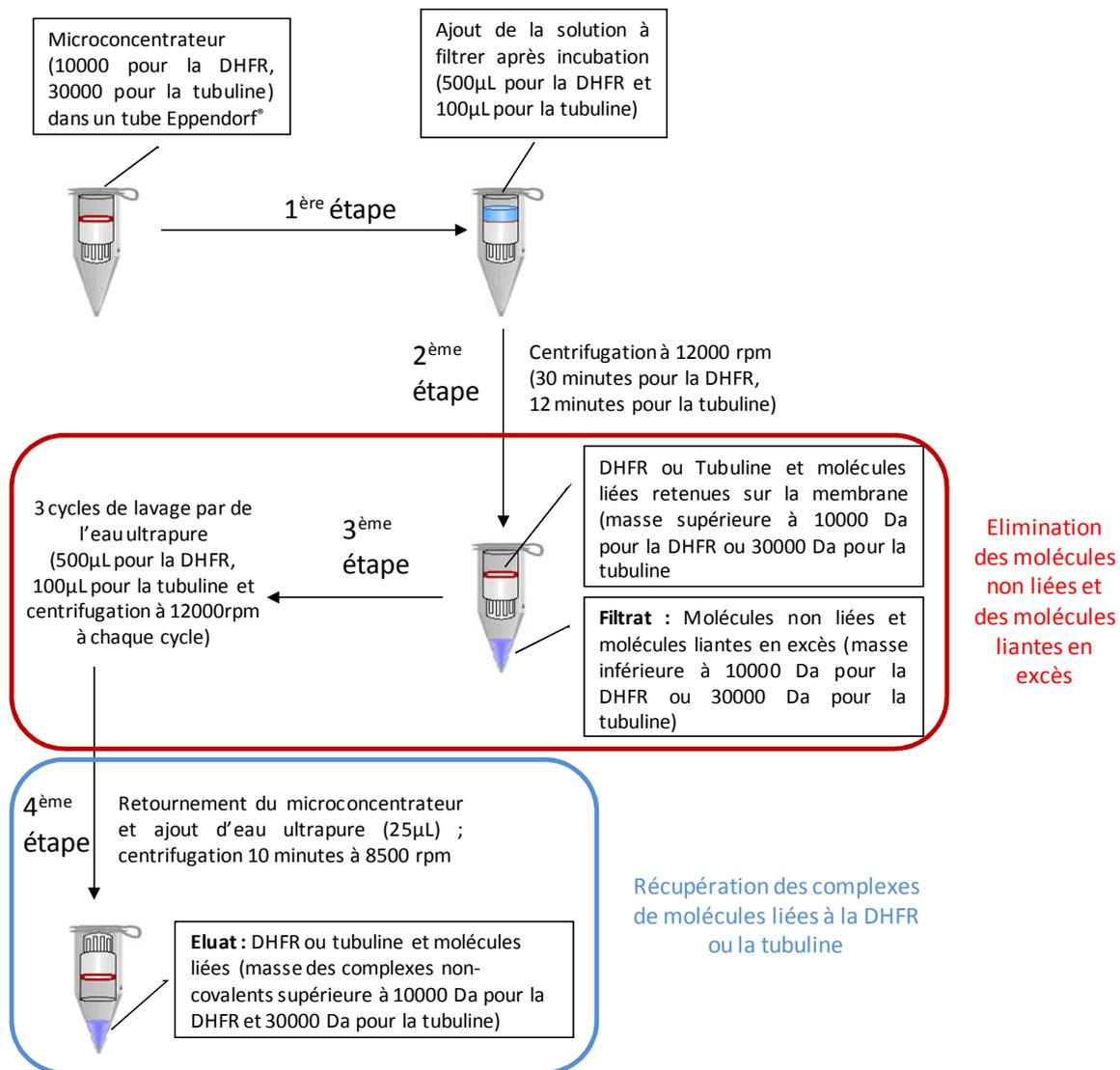


Figure 42 : Schéma général du protocole d'élimination des molécules non liées aux cibles protéiques

Comme nous l'avons vu précédemment l'usage de microconcentrateurs ne dispense pas de faire suffisamment de lavages de la membrane du filtre pour s'assurer qu'aucune liaison non spécifique des composés à sa surface ne peut se produire. Nous discuterons plus avant dans ce manuscrit (chapitre 3) le choix du nombre de cycles de lavages optimal à mettre en œuvre lors de l'utilisation de nos tests.

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

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

5. Analyse des composés liés

Cette étape constitue en la caractérisation des composés liés aux cibles moléculaires protéiques présents dans les solutions éluées à partir des microconcentrateurs. Nous nous intéresserons tout d'abord à l'**analyse directe** des composés liés aux cibles moléculaires, sans aucun traitement d'échantillon préalable. Un deuxième paragraphe portera sur l'analyse des molécules liées aux cibles moléculaires **après deux traitements d'échantillons différents**: la **digestion enzymatique de la cible** et la **dénaturation de la cible par ajout de solvant organique**. Ces deux traitements d'échantillon ont été mis en place dans le but initial d'augmenter la sensibilité de la détection et de l'identification des molécules liées.

a. Analyse directe par MALDI-TOFMS

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

Elle consiste en une analyse directe, par MALDI-TOFMS, de la solution obtenue après incubation, filtration sur microconcentrateur, lavages et élution. En effet, les interactions entre une molécule active et son site de liaison protéique sont d'ordre non-covalent. Ce type de

liaison est facilement rompu lors de l'analyse en MALDI-TOFMS par le fait de l'impact laser utilisé pour la désorption et l'ionisation de la matière et des conditions légèrement dénaturantes apportées par les solutions de matrices (faiblement acides et contenant des solvants organiques). Il convient alors d'utiliser un laser de longueur d'onde appropriée à la matrice, à la fois pour l'analyse de la protéine cible et de la molécule dont on teste l'activité. Cela ne sera également possible que si la différence d'affinité protonique entre ces différents composés et la matrice est optimale, le choix de la matrice utilisée étant crucial de manière à permettre une bonne ionisation des composés présents.

Ainsi 1 μL des différentes solutions éluées (après incubation, filtration sur microconcentrateur et lavages) sont déposées sur le porte échantillon du MALDI-TOFMS et laissés à sécher à l'air libre. Une fois les dépôts parfaitement secs, 1 μL de la solution de matrice appropriée est déposé sur le puits et repris par 2 cycles d'aspiration – refoulement. Nous avons utilisé ce mode de dépôt par mélange intime, car il permet de remettre en solution les complexes [cible-molécule liée] dans la solution de matrice choisie, en rompant une partie des liaisons non-covalentes (comme présenté en chapitre 3). Une fois les dépôts parfaitement secs, les échantillons sont analysés par TOFMS (3 dépôts identiques par solution éluée et par matrice) et des **signaux caractéristiques de molécules liées** ($[\text{M}+\text{H}]^+$ ou $[\text{M}-\text{H}]^-$ correspondants) sont recherchés (3 spectres de masse enregistrés par dépôt). Nous nous sommes tenus à ne considérer comme caractéristiques que les pics présents lors de l'analyse directe avec un rapport Signal/Bruit (S/B) au moins égal à 3. Ces pics seront considérés comme significatifs par différence avec ceux de la matrice et de la cible moléculaire.

b. Analyse par MALDI-TOFMS après traitement d'échantillons

Comme présenté précédemment, deux traitements d'échantillon ont été développés dans le but premier de récupérer l'ensemble des molécules fixées aux cibles moléculaires protéiques. Nous avons souhaité libérer l'ensemble des molécules liées de manière à diminuer la limite de détection de nos tests (augmenter leur sensibilité) et valider le fait que les signaux obtenus lors de l'analyse directe n'étaient pas aléatoires mais bien représentatifs des molécules liées aux cibles. Ainsi, deux approches différentes ont été développées pour atteindre le même but, celui de libérer les molécules liées. La première est de digérer la cible

moléculaire protéique par une enzyme protéolytique (la trypsine) et la deuxième est d'aboutir à la dénaturation de la protéine cible par l'utilisation d'un solvant organique (l'acétonitrile).

i. Libération des molécules liées par digestion de la cible

Dans ce cas, une digestion plus ou moins complète de la protéine cible est envisagée par la mise en présence d'un excès de trypsine, enzyme protéolytique qui va cliver les liaisons peptidiques. La protéine cible sera en grande partie « digérée » et son site actif sera « détruit », libérant ainsi le médicament qui y était fixé. Deux stratégies ont été envisagées pour digérer les cibles protéiques.

La **1^{ère} stratégie** consiste à faire une **digestion à même la plaque porte échantillon**. En effet, cette technique permet de digérer une protéine en quelques minutes (le temps de séchage de la goutte de solution, soit environ 5 minutes) en déposant une solution d'enzyme protéolytique sur le puits contenant la protéine à digérer⁶⁶. 1 µL d'une solution de trypsine à 200 mg/mL est ainsi ajoutée à chaque puits contenant la solution de cible protéique éluée à partir des microconcentrateurs (après incubation, filtration et lavages). La cible protéique est ainsi digérée, à même la plaque. Cependant, dans notre cas, cette démarche n'a pas donné de résultats probants. En effet la digestion des cibles n'était pas suffisamment efficace et la qualité des spectres MALDI-TOFMS obtenus inférieure à celle obtenue en analyse directe du fait de la présence intense et peu reproductible de pics de fragments. Cette stratégie a donc été écartée bien qu'elle permette un traitement de l'échantillon rapide et à même la plaque porte échantillon du spectromètre de masse.

La **2^{ème} stratégie** que nous avons développée consiste à mélanger dans un tube eppendorf l'éluat obtenu à partir du microconcentrateur (après incubation, filtration et lavages) avec une solution de trypsine à 200 mg/mL (volume à volume). Après un temps de réaction de 1 heure, un dépôt de 2 µL de cette solution est effectué sur la plaque du spectromètre. Nous avons choisi ce volume de dépôt car la solution après digestion est diluée de moitié par rapport à la solution initiale analysée en analyse directe. Après un temps de séchage, 1 µL de la solution de matrice appropriée est ajouté. L'ensemble est ensuite analysé

⁶⁶ (66) Harris, W. A.; Reilly, J. P. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 4410.

en MALDI-TOFMS. **Cette démarche donnant de meilleurs résultats que la précédente, nous l'avons retenue pour la suite de notre travail.**

ii. Libération des molécules liées par dénaturation de la cible

Cette étape consiste en la dénaturation de la cible moléculaire protéique par l'ajout d'un solvant organique. Par la présence de solvant organique, la cible protéique va perdre sa structure tridimensionnelle native et, ainsi, les sites de liaison disponibles à sa surface vont être altérés. Cela va entraîner une libération des molécules y étant jusque là liées. A nouveau, nous avons évalué deux stratégies pour mener à bien cette dénaturation des cibles moléculaires protéiques.

La **1^{ère} stratégie** consiste en l'utilisation d'embouts de micropipettes spéciaux (ZipTip[®], Millipore, Molsheim, France), contenant une phase stationnaire en silice greffée (C4 ou C18) présentés en **Figure 43**.

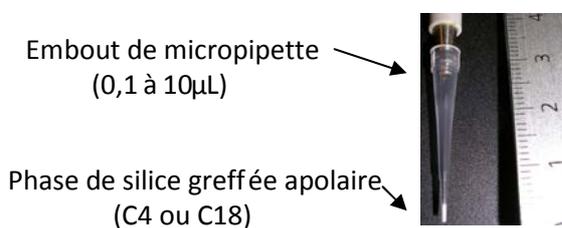


Figure 43 : photographie d'un cône de micropipette ZipTip[®]

Ces dispositifs sont destinés au dessalage et à la concentration d'échantillons de protéines. En effet, ces dernières sont affines pour la phase apolaire que constitue la silice greffée avec des chaînes carbonées plus ou moins longues, et ainsi, les protéines y resteront fixées. Le cône pourra alors être rincé à l'eau pour dessaler la protéine. Il faudra ensuite éluer les molécules retenues à l'aide d'une solution contenant un solvant organique de type acétonitrile.

Dans notre approche, nous nous sommes servis de ces dispositifs pour fixer les cibles moléculaires sur les cônes et les relarguer en utilisant de l'acétonitrile. Le protocole développé pour la dénaturation des cibles est présenté en Figure 44.

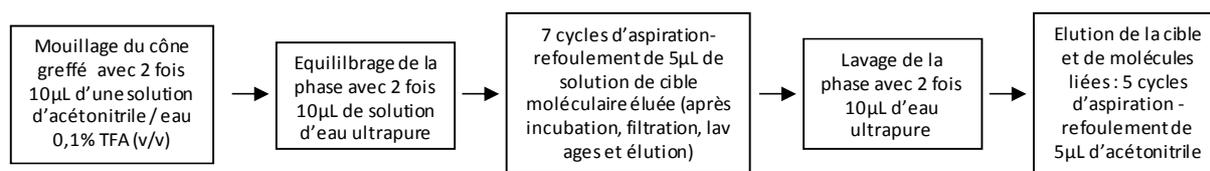


Figure 44 : protocole Zip Tip[®] utilisé pour le passage en phase organique de la cible moléculaire

Une fois ce protocole mené à bien, la cible moléculaire et les molécules qui y sont liées sont en solution organique (acétonitrile). En 10 minutes de contact avec la phase organique, la cible moléculaire va se dénaturer libérant ainsi toute molécule y étant fixée. 1 µL de la solution sera ensuite analysée en MALDI-TOFMS.

Ce protocole donne de bons résultats en termes de dénaturation mais est assez contraignant. En effet, il nécessite de faire appel à un deuxième dispositif et la fixation des cibles n'est pas très reproductible et ne permet pas de comparer différentes expériences entre elles. C'est pourquoi nous avons choisi de l'abandonner au profit de la 2^{ème} stratégie de dénaturation, bien plus simple à mettre en œuvre.

La 2^{ème} **stratégie** de dénaturation des cibles moléculaires que nous avons développé consiste à faire un mélange volume à volume de la solution éluee du microconcentrateur avec de l'acétonitrile. En effet, une concentration de 50% en volume d'acétonitrile est largement suffisante pour dénaturer les cibles moléculaires en solution⁶⁷. Après un temps de contact de 10 minutes, 2 µL de la solution obtenue sont déposés sur le porte échantillon. Après le temps de séchage, 1 µL de la matrice appropriée est ajouté et le dépôt est ensuite analysé par MALDI-TOFMS. De la même manière que précédemment, ce mode de dépôt a été choisi pour pouvoir comparer les résultats obtenus avec ceux de la même solution en analyse directe. C'est cette stratégie de dénaturation que nous avons choisi d'utiliser dans la suite de nos travaux.

Les deux traitements d'échantillons (digestion et dénaturation) permettent de libérer les molécules liées aux cibles moléculaires et ainsi détecter de manière plus sensible la liaison de composés actifs.

⁶⁷ (67) Nguyen, R. T.; Harvey, H. R. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2001**, 65, 1467–1480.

CONCLUSION

Ainsi, nous avons présenté l'organisation générale de notre protocole de criblage. Celui-ci met en jeu **trois étapes successives** qui sont l'**incubation** des molécules à tester avec la cible moléculaire protéique choisie, l'**élimination des molécules non liées** et enfin l'**analyse des composés liés**. Nous avons ensuite présenté les **deux cibles moléculaires**, la tubuline et la DHFR sur lesquelles nous avons appliqué notre concept de test de criblage. Nous avons ainsi présenté les molécules dont l'affinité pour ces cibles est avérée (colchicine, vinblastine et vincristine pour la tubuline, acide folique, acide folinique, aminoptérine, méthotrexate et pyriméthamine pour la DHFR) qui nous ont servi de **témoins positifs** lors de la mise en place de nos tests. Nous avons présenté plus en détails les choix que nous avons faits concernant l'étape d'incubation des molécules à tester avec les cibles et nous avons décidé de faire cette **incubation dans l'eau ultrapure, une heure à 37°C**. Nous avons décidé de faire l'**élimination des composés non liés par filtration/centrifugation sur microconcentrateurs** car cette technique permet une bonne séparation si un nombre suffisant de cycles de lavage est mis en place. Enfin, nous avons présenté l'étape d'**analyse par MALDI-TOFMS des composés liés** directement sans traitement d'échantillon (**analyse directe**) ou après 1 heure de **digestion de la cible moléculaire par la trypsine**, ou après 10 minutes de **dénaturation par ajout d'acétonitrile**. Les résultats obtenus sont reportés et discutés dans le chapitre 3.

Chapitre 3 : Développement et validation des tests

INTRODUCTION

Dans ce chapitre nous allons présenter et discuter les résultats que nous avons obtenus dans le cadre de la mise en place de nos tests de criblage de la liaison de composés à la tubuline et la DHFR. Ainsi, dans un premier temps nous décrirons les résultats obtenus quand à l'optimisation de la détection par MALDI-TOFMS des molécules d'intérêt sur lesquelles a portée notre étude. Nous détaillerons ainsi les paramètres qui nous ont permis d'obtenir des signaux de qualité pour nos deux cibles moléculaires protéiques (la tubuline et la DHFR) par MALDI-TOFMS en mode linéaire. Nous nous intéresserons ensuite à l'analyse des témoins positifs se liant à la tubuline (colchicine, vinblastine et vincristine) et à la DHFR (acide folique, acide folinique, aminoptérine, méthotrexate et pyriméthamine). Dans un deuxième temps nous nous attacherons à présenter les résultats que nous avons obtenus lors du criblage primaire de la liaison de composés à la tubuline et à la DHFR, selon le protocole décrit en chapitre II. Nous étudierons également la validation de notre approche en évaluant la spécificité, la précision, la reproductibilité et la robustesse de la réponse. Nous terminerons ce point par l'évaluation des facteurs de qualité propres à notre approche de criblage. Enfin, nous présenterons les résultats obtenus dans le cadre du criblage secondaire de la liaison de composés à la tubuline ou à la DHFR.

1. Optimisation de la détection MALDI-TOFMS des composés d'intérêt

Dans cette première partie, nous allons mettre l'accent sur l'optimisation de la réponse obtenue en MALDI-TOFMS pour les différents composés sur lesquels a porté notre étude : les deux cibles moléculaires protéiques (la tubuline et la DHFR) ainsi que les composés utilisés comme témoins positifs (la colchicine, la vinblastine et la vincristine pour l'étude de la liaison à la tubuline et l'acide folique, l'acide folinique, l'aminoptérine, le méthotrexate et la pyriméthamine pour l'étude de la liaison à la DHFR). Cette amélioration des réponses porte en général sur le choix des matrices les mieux adaptées à l'ionisation des composés, mais nous verrons que nous pouvons également intervenir sur d'autres paramètres propres à

l'analyseur, pour augmenter la qualité des signaux obtenus lors de l'analyse des cibles moléculaires en mode de détection linéaire.

a. Analyse de la tubuline et des molécules s'y liant

Dans un premier temps nous allons nous intéresser à l'étude des signaux obtenus en MALDI-TOFMS lors de l'analyse de la tubuline puis lors de celle des molécules s'y liant : la colchicine, la vinblastine et la vincristine.

i. Analyse de la tubuline par MALDI-TOFMS

Une solution de tubuline (masse molaire moyenne de 50000 g/mol⁶⁸) à 2.10^{-5} M dans de l'eau ultrapure a été préparée et analysée en MALDI-TOFMS en mode de détection linéaire avec les trois matrices précitées (acide sinapinique SA, acide α -cyano-4-hydroxycinnamique HCCA et acide 2,5-dihydroxybenzoïque 2,5-DHB). Les résultats sont présentés en Figure 45.

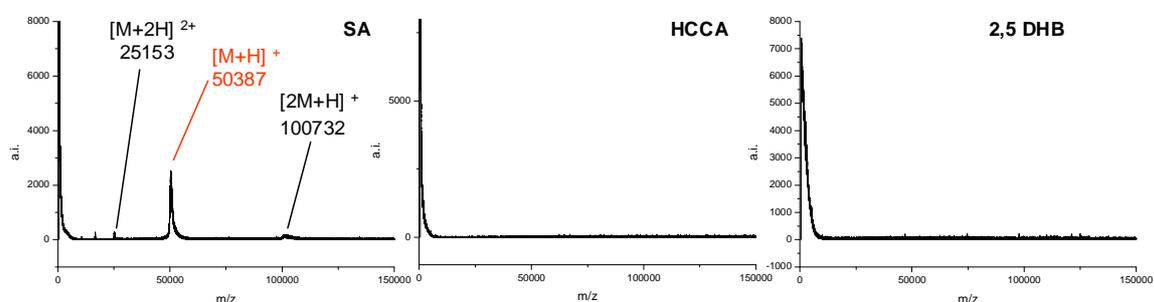


Figure 45 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à 2.10^{-5} M de tubuline avec les matrices SA, HCCA, 2,5-DHB

Les spectres obtenus lors de l'analyse avec les matrices HCCA et 2,5-DHB ne présentent pas de signaux caractéristiques de la tubuline. En revanche, lors de l'analyse avec l'acide sinapinique (SA) comme matrice, les signaux correspondants au pic moléculaire des monomères de tubuline $[M+H]^+$ au pic du dimère de tubuline $[2M+H]^+$ et au pic de bichargé $[M+2H]^{2+}$ sont observés. Seul l'acide sinapinique utilisé comme matrice permet l'ionisation et

⁶⁸ (68) Dumontet, C.; Sikic, B. I. *J Clin Oncol* **1999**, *17*, 1061.

l'analyse efficace de la tubuline en mode de détection linéaire. C'est donc cette solution de matrice qui a été utilisée pour l'analyse des hautes masses dans la suite de nos recherches.

Outre le choix de la matrice, les paramètres d'accélération et de détection des ions sont spécifiques lors d'une analyse en MALDI-TOFMS en mode de détection linéaire. Nous avons donc pu les optimiser de manière à obtenir les meilleurs signaux possibles.

L'accélération des ions

Cette étape est primordiale car elle conditionne le temps de vol des ions. C'est ainsi que nous avons testé plusieurs différences de potentiels (en kV) entre les lentilles électrostatiques servant à l'extraction des ions, et ceci en gardant les autres paramètres constants (énergie laser, diamètre d'impact laser, délai d'extraction retardée, tension appliquée sur les lentilles de focalisation, tension du détecteur en mode linéaire). Les résultats obtenus pour une solution à 1 mg/mL de tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M) sont présentés dans la Figure 46.

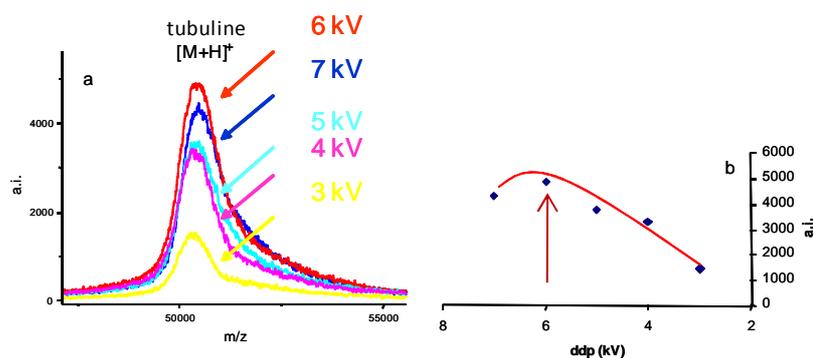


Figure 46 : Optimisation des tensions d'accélération des ions : (a) variation de l'intensité absolue du pic $[M+H]^+$ de la tubuline en fonction de la différence de potentiels appliquée ; (b) signal obtenu par MALDI-TOF-MS et intensité absolue du pic de la tubuline

Lorsque la différence de potentiels entre les lentilles d'extraction des ions augmente de 3 à 6 kV nous observons une augmentation du signal de la tubuline. Si la différence de potentiels dépasse 6kV, nous notons une diminution du signal. En effet, lorsqu'une différence de potentiels plus forte est appliquée, les ions de haute masse sont accélérés de manière plus importante. Cela implique qu'un plus grand nombre d'entre eux atteint le détecteur et que l'intensité absolue du pic correspondant augmente. Cependant, si la différence de potentiels est trop importante, l'énergie communiquée aux ions en induit une dégradation, qui se traduit par une diminution du signal. A la vue de ces résultats il a été décidé d'appliquer la différence

de potentiels optimale, de 6kV, entre les lentilles d'extraction des ions lors de toutes les études en mode linéaire de notre travail.

La détection des ions

Une optimisation des tensions du gain électronique des détecteurs permet d'améliorer les signaux obtenus lors de l'analyse MALDI-TOFMS. Il faut préciser ici, que, outre les caractères présentés précédemment (résolution et précision sur la mesure de masse), un critère permettant d'appréhender la qualité du signal d'un pic donné est son rapport signal/bruit. Plus ce rapport est élevé et plus le signal obtenu est significatif, c'est-à-dire, d'autant plus différent du bruit de fond. Les résultats obtenus en faisant varier la tension du gain du détecteur linéaire du spectromètre de masse lors de l'analyse d'une solution à 1mg/mL de tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M) sont présentés dans la Figure 47.

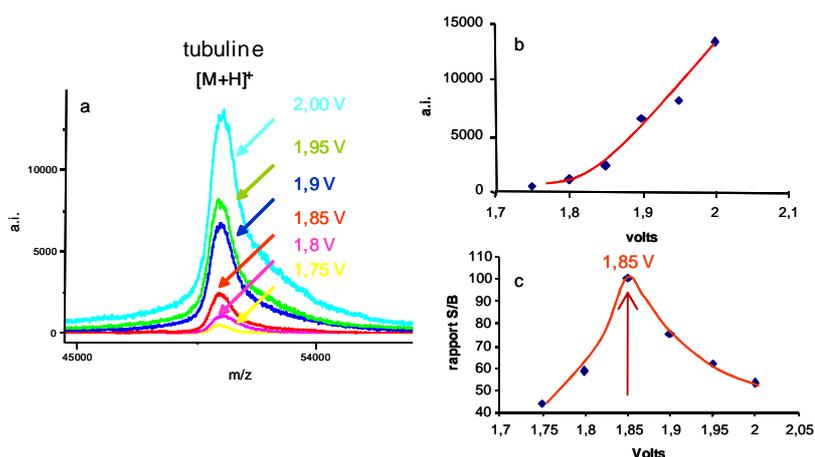


Figure 47 : Optimisation de la tension du gain électronique du détecteur en mode linéaire pour le pic [M+H]⁺ de la tubuline ; (a) signal MALDI-TOF-MS, (b) intensité absolue et (c) rapport signal sur bruit

Lorsque la tension du gain du détecteur linéaire augmente, l'intensité du signal correspondant à la tubuline augmente et devient maximale lorsque la tension du détecteur est égale à 2 Volts (a et b). L'étude du rapport signal sur bruit (c) pour les différentes tensions indique un maximum pour 1,85 volts, puis une diminution si les tensions sont supérieures. En effet, lorsque la tension du détecteur augmente, la sensibilité s'accroît et tout ion le percutant sera détecté. Cependant, toute augmentation de la sensibilité du détecteur va de paire avec une augmentation du bruit de fond et ainsi la tension offrant le meilleur rapport signal sur bruit, soit 1,85 volts, sera appliquée au détecteur utilisé en mode linéaire lors de la suite de notre étude.

ii. Analyse de la colchicine en MALDI-TOFMS

Une solution aqueuse à 5.10^{-5} M de colchicine ($MM= 399,26 \text{ g.mol}^{-1}$) a été préparée et analysée en MALDI-TOFMS. Les résultats obtenus suite à l'utilisation des trois matrices SA, HCCA et 2,5-DHB sont présentés en Figure 48.

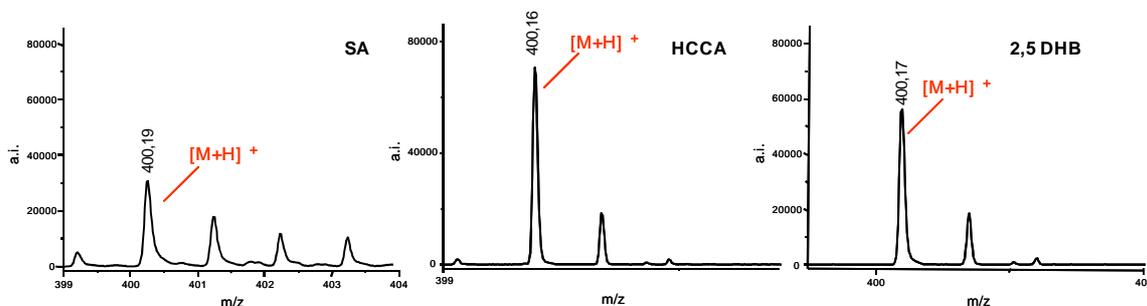


Figure 48 : Analyse par MALDI-TOFMS (mode reflectron) d'une solution à 5.10^{-5} M de colchicine avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)

Comme le montre la figure, les trois matrices permettent d'obtenir un signal caractéristique de l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de la colchicine. Cependant, le spectre obtenu avec l'acide sinapinique présente une distribution anormale par le fait d'un pic d'adduit de matrice interférant $[2SA-HCOOH+H]^+$ ($m/z=403,14$ Th). Les spectres obtenus avec les matrices HCCA et 2,5-DHB présentent des signaux caractéristiques de forte intensité (70000 et 60000 coups respectivement), avec une distribution isotopique conforme à la distribution théorique (résolution moyenne de l'ordre de 9000). La précision sur la mesure de masse permet, dans les deux cas, d'attribuer ce signal à la colchicine avec un écart de 11 ppm par rapport à la masse théorique dans le cas de la matrice HCCA et de 6 ppm dans le cas de la matrice 2,5-DHB.

Le fait que la colchicine soit ionisée très efficacement avec une matrice d'affinité protonique très faible (l'HCCA), et légèrement moins avec une matrice d'affinité protonique moyenne (2,5-DHB) et peu avec une matrice d'affinité protonique forte (SA), permet d'avancer l'hypothèse selon laquelle cette molécule devrait avoir une affinité protonique moyenne. Cela va dans le sens des hypothèses que nous avons émises à partir de l'étude de sa structure moléculaire (chapitre II).

Les trois matrices sont utilisables pour l'analyse de la colchicine mais l'HCCA et le 2,5-DHB seront préférés du fait des meilleures sensibilité et résolution qu'elles offrent.

iii. Analyse de la vinblastine par MALDI-TOFMS

Une solution aqueuse à $5 \cdot 10^{-5}$ M de vinblastine ($MM=810,41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) a été préparée et analysée en MALDI-TOFMS avec les trois mêmes matrices (SA, HCCA, et 2,5-DHB). Les résultats sont présentés ci-après (Figure 49).

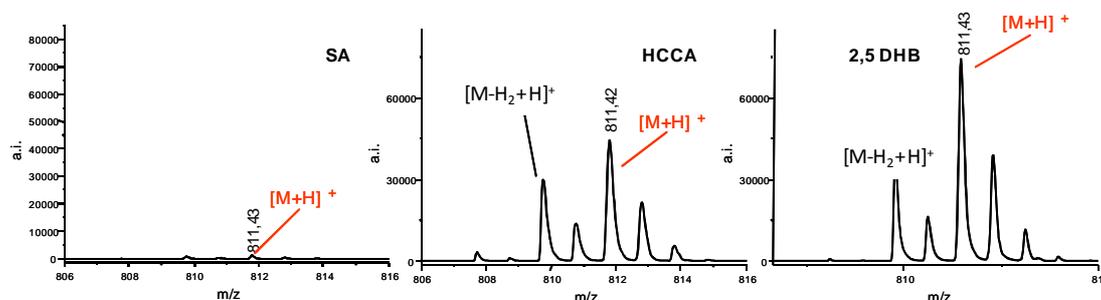


Figure 49 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à $5 \cdot 10^{-5}$ M de vinblastine avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)

Lors de l'étude de la vinblastine avec l'acide sinapinique, les signaux obtenus sont quasi inexistantes. Si l'HCCA ou le 2,5-DHB sont utilisés, l'intensité du pic caractéristique de la vinblastine $[M+H]^+$ est très importante (55000 coups et 75000 coups respectivement). L'écart de mesure en masse par rapport à la masse théorique + est de 9 et 2 ppm respectivement pour l'analyse avec l'HCCA et le 2,5-DHB. L'attribution de ces signaux à la vinblastine est ainsi faite sans ambiguïté.

Le fait que l'ionisation de la vinblastine soit plus performante avec la matrice 2,5-DHB (d'affinité protonique moyenne) implique un écart d'affinité suffisant entre l'analyte et cette matrice. Cependant, dans ce cas, un pic correspondant à une espèce à $[M-H_2+H]^+$, sûrement du au fait d'une déshydrogénation de la molécule, est observé. De plus, dans le cas de l'HCCA, l'intensité de ce pic augmente par rapport au pic de base. Cela peut provenir d'un écart d'affinité protonique trop important entre les deux composés, impliquant donc un échange de protons très énergétique et des fragmentations. Ces deux phénomènes nous permettent d'émettre l'hypothèse que la vinblastine doit avoir une affinité protonique importante, et en tout cas plus importante que celle de la colchicine.

Ce pic fragment à $[M-H_2+H]^+$ est toujours observé lors de l'analyse par MALDI-TOFMS de molécules du type alcaloïde de la pervenche. En effet, l'étude de la présence et de l'intensité de ce photofragment typique a été menée à bien pour une solution de vinblastine

($5 \cdot 10^{-6} \text{M}$) par MALDI-TOFMS avec la matrice 2,5-DHB à différentes énergies laser (exprimées en pourcents). Les résultats obtenus sont présentés en Figure 50.

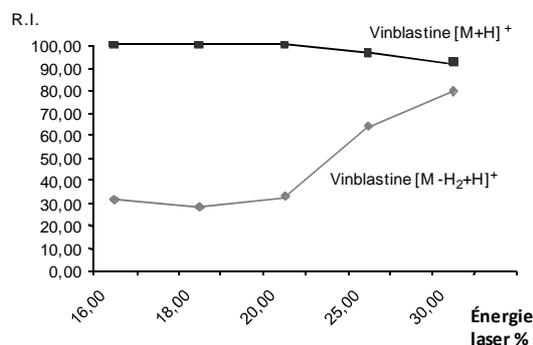


Figure 50 : intensités relatives MALDI-TOFMS de l'ion [M+H]⁺ de la vinblastine ainsi que de son photofragment [M-H₂+H]⁺ en fonction de l'énergie laser (dépôt en mélange intime, 2,5-DHB)

L'intensité relative du fragment [M-H₂+H]⁺ de la vinblastine augmente avec l'augmentation de l'énergie laser. Ceci peut être expliqué par le fait que le transfert de proton du 2,5-DHB vers l'analyte est de plus en plus énergétique lorsque l'énergie laser augmente. Lorsque l'énergie apportée par le transfert de proton est suffisante, l'analyte va se fragmenter en différents photofragments tels que [M-H₂+H]⁺. Ce photofragment est également intensément observé lorsqu'une matrice de plus faible affinité protonique (telle que l'HCCA) est utilisée. Une hypothèse de formation de ce photofragment est présentée en Figure 51.

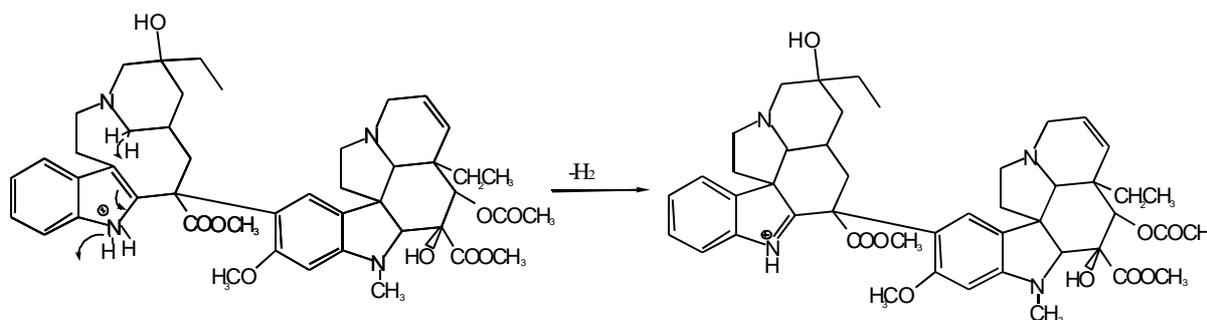


Figure 51 : Hypothèse de formation de l'ion [M-H₂+H]⁺ de la vinblastine

Une fois encore, les matrices HCCA et 2,5-DHB ont été choisies pour l'analyse de la vinblastine par MALDI-TOFMS.

iv. Analyse de la vincristine en MALDI-TOFMS

L'analyse par MALDI-TOFMS d'une solution aqueuse de vincristine ($MM=824,39\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), le deuxième alcaloïde de la pervenche utilisé au cours de cette étude, a été menée à bien avec les différentes matrices (SA, HCCA, et 2,5-DHB). Les résultats sont présentés ci-après (Figure 52).

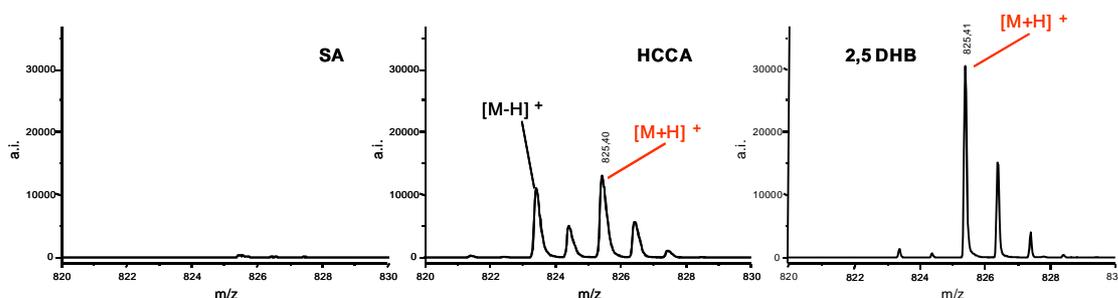


Figure 52 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à 5.10^{-5} M de vincristine avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)

Les spectres obtenus avec la vincristine sont du même ordre que ceux décrits pour la vinblastine. La précision sur la mesure de masse est de 8 ppm avec l'HCCA et de 3 ppm avec le 2,5-DHB, et là encore cet écart permet une attribution quasi certaine des pics correspondant à la vincristine.

Le photofragment $[M-H_2+H]^+$ est également observé lorsque l'énergie laser apportée est importante ou que la matrice utilisée présente une faible affinité protonique (impliquant un transfert de proton plus énergétique). L'étude de l'apparition de ce fragment en fonction de l'énergie laser dans le cas de l'analyse de la vincristine (5.10^{-6} M) avec le 2,5-DHB est présentée en Figure 53.

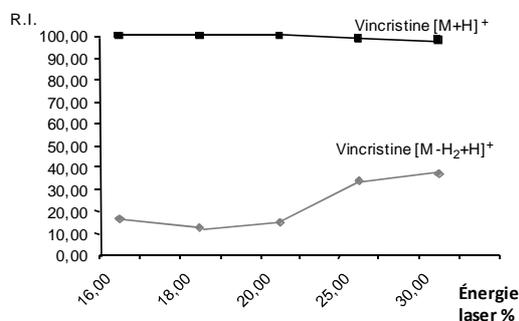


Figure 53 : intensités relatives MALDI-TOFMS de l'ion $[M+H]^+$ de la vincristine ainsi que de son photofragment $[M-H_2+H]^+$ en fonction de l'énergie laser (dépôt en mélange intime, 2,5-DHB)

Ce type de photofragment $[M-H_2+H]^+$ est toujours observé lors de l'analyse d'un alcaloïde de la pervenche par MALDI-TOFMS avec le 2,5-DHB et peut parfois même être plus intense que l'ion pseudomoléculaire du composé.

Lors de l'étude de la vincristine, seule une très faible fragmentation est observée avec le 2,5-DHB à des énergies laser moyennes, ce qui peut faire penser que l'écart d'affinité protonique est plus faible pour cette molécule qu'avec la vinblastine. Il est ainsi possible d'établir un classement des composés en fonction de leur affinité protonique : Colchicine < Vincristine \leq Vinblastine.

Comme précédemment, les matrices HCCA et 2,5-DHB ont été choisies pour mener l'étude sur cette molécule.

b. Analyse de la DHFR et des molécules s'y liant

Nous allons à présent étudier les signaux obtenus en MALDI-TOFMS lors de l'analyse de la DHFR puis lors de celle des molécules s'y liant : les substrats de l'enzyme (acide folique et folinique) et ses inhibiteurs (aminoptérine, méthotrexate et pyriméthamine).

i. Analyse de la DHFR en MALDI-TOFMS

Une solution de DHFR (de masse molaire d'environ 20000 g/mol) à une concentration de $1,5 \cdot 10^{-7}$ M (concentration de la protéine dans son tampon) a été analysée en MALDI-TOFMS avec les trois matrices précitées (SA, HCCA et 2,5-DHB) (Figure 54).

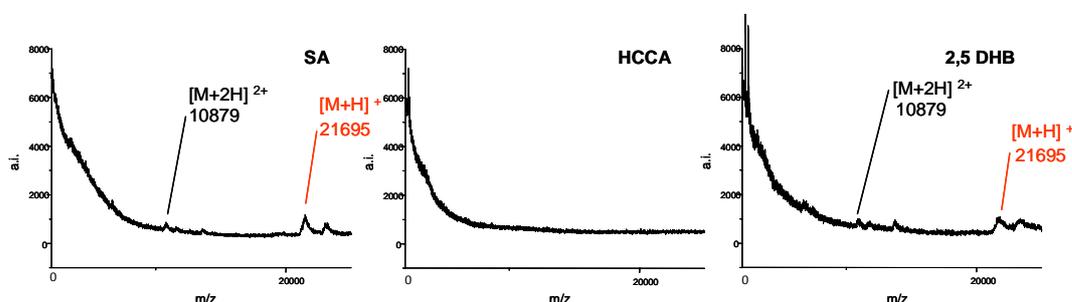


Figure 54 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à $1,5 \cdot 10^{-7}$ M de DHFR avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)

Le spectre de masse obtenu avec l'HCCA ne présente pas de signaux caractéristiques de la DHFR. En revanche lors de l'analyse avec les matrices SA et 2,5-DHB, les signaux correspondants au pic pseudomoléculaire de la DHFR $[M+H]^+$ ainsi qu'au pic bichargé $[M+2H]^{2+}$ sont observés. Il est à noter cependant que l'analyse avec SA offre un meilleur rapport signal/bruit par rapport à celle avec le 2,5-DHB. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que la DHFR est une protéine de masse moyenne, ayant de ce fait une affinité protonique moins élevée que celle de la tubuline de masse plus élevée (les groupements fonctionnels pouvant se protoner étant les mêmes d'une protéine à une autre, leur nombre diminue lorsque la masse de la protéine diminue). La DHFR requiert tout de même une ionisation douce pour pouvoir être analysée. Or la matrice offrant l'affinité protonique la plus forte est SA, suivi du 2,5-DHB. L'HCCA ayant une faible affinité protonique ne permet pas un transfert efficace de proton vers cette protéine, la différence entre les affinités protoniques des deux composés étant trop importante. Il est à préciser ici qu'il semble y avoir deux formes de la DHFR dans notre échantillon, donnant deux composantes distinctes pour chaque pic en MALDI-TOFMS. En effet, la protéine que nous avons achetée est une protéine humaine recombinante, peu purifiée, utilisée pour les campagnes de criblage. Ainsi, ce point ne gênera pas la mise en place de nos tests.

Suite à ces résultats, seul SA sera utilisé comme matrice pour l'analyse de la DHFR dans la suite de notre étude.

ii. Analyse de l'acide folique en MALDI-TOFMS

Une solution aqueuse d'acide folique à 1.10^{-5} M ($MM= 441,1397 \text{ g.mol}^{-1}$) a été analysée en MALDI-TOFMS (matrices SA, HCCA, et 2,5-DHB). Les résultats sont présentés ci-après en Figure 55.

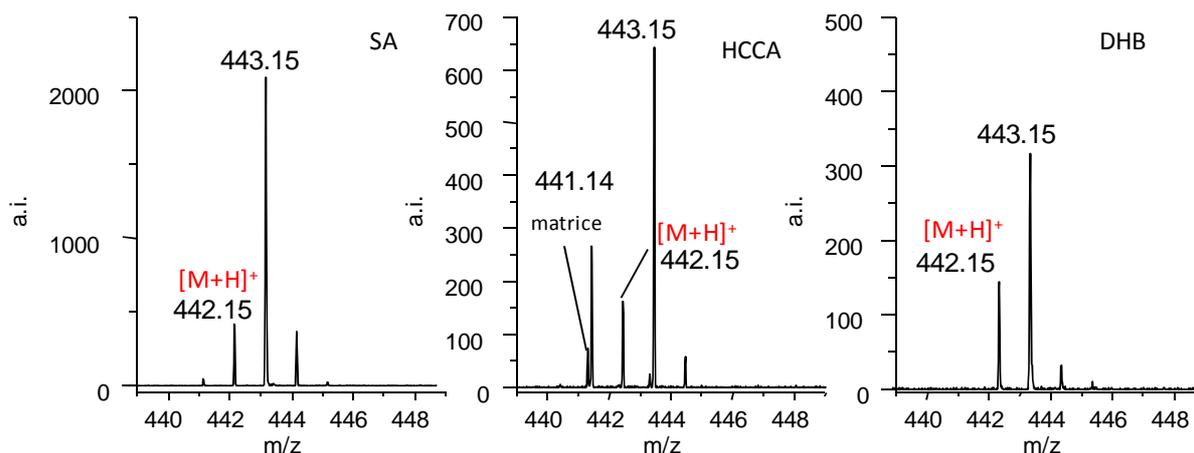


Figure 55 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution d'acide folique à 1.10^{-5} M avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)

Les signaux obtenus en MALDI-TOFMS dans le cas de l'analyse de l'acide folique ne sont pas habituels. Quelle que soit la matrice utilisée, le pic pseudomoléculaire de l'acide folique $[M+H]^+ = 442,15$ Th n'est pas majoritaire. Cependant, la précision de la mesure en masse proche des 5 ppm nous permet de l'attribuer à l'acide folique. C'est ce pic qui sera utilisé pour signer la présence de cette espèce lors des analyses ultérieures.

Le spectre de masse correspondant à l'acide folique analysé en MALDI-TOFMS avec l'HCCA est assez dense du fait de la présence de pics de matrice mais la résolution du spectromètre (environ 10000) permet une bonne séparation des deux espèces (pic de matrice et pic pseudomoléculaire de l'acide folique). Aussi, notre choix de matrices s'est porté sur l'HCCA et le 2,5-DHB pour l'analyse de l'acide folique.

Les spectres MALDI-TOFMS de l'acide folique présentent un pic à $m/z = 443,15$ Th et ce quelle que soit la matrice utilisée. Ce pic a une différence de 1 Da avec l'ion pseudomoléculaire. De manière à lever l'indétermination sur la structure de cet ion, nous avons procédé à l'analyse d'une solution d'acide folique (1.10^{-5} M) par MALDI-FTICRMS 9,4T avec le 2,5-DHB comme matrice (Figure 56).

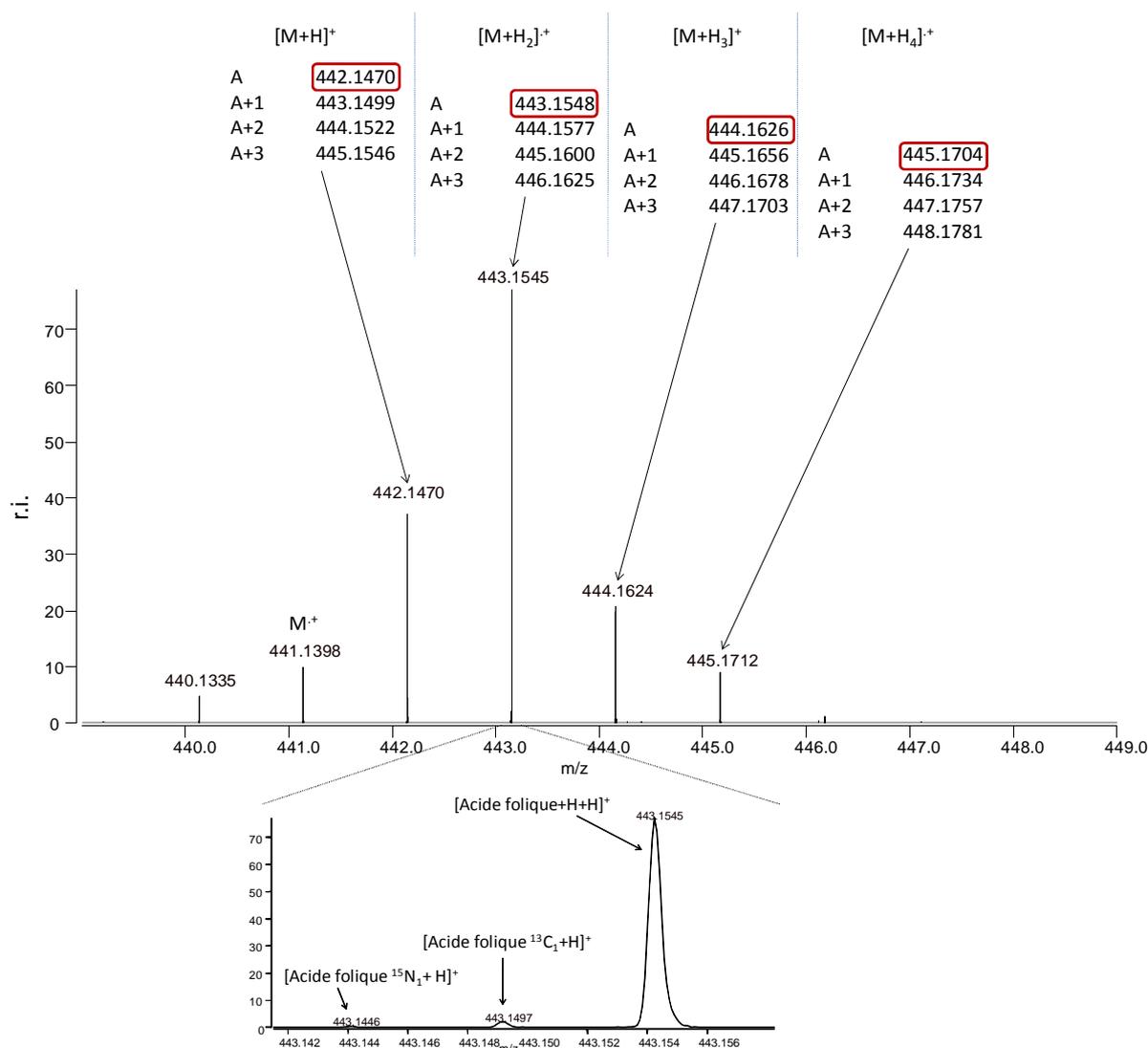


Figure 56 : Analyse par MALDI-FTICRMS d'une solution d'acide folique 1.10^{-5} M (matrice 2,5-DHB) et attribution des pics à des espèces polyhydrogénées (comparaison avec les valeurs théoriques des listes de pics des massifs isotopiques des composés)

Le spectre obtenu pour l'acide folique en MALDI-FTICRMS présente la même empreinte qu'en MALDI-TOFMS. Cependant, la précision de la mesure en masse atteinte avec cet appareil (inférieure à 1 ppm pour l'ensemble des pics) nous permet d'attribuer les pics de la distribution à des adduits hydrogénés de l'acide folique $[M+H]^+$, $[M+H_2]^+$, $[M+H_3]^+$ et $[M+H_4]^+$.

Pour appuyer cette hypothèse, une solution d'acide folique à 1.10^{-5} M a été préparée dans de l'eau lourde ($^2\text{H}_2\text{O}$) puis analysée en MALDI-FTICRMS avec le 2,5-DHB (Figure 57).

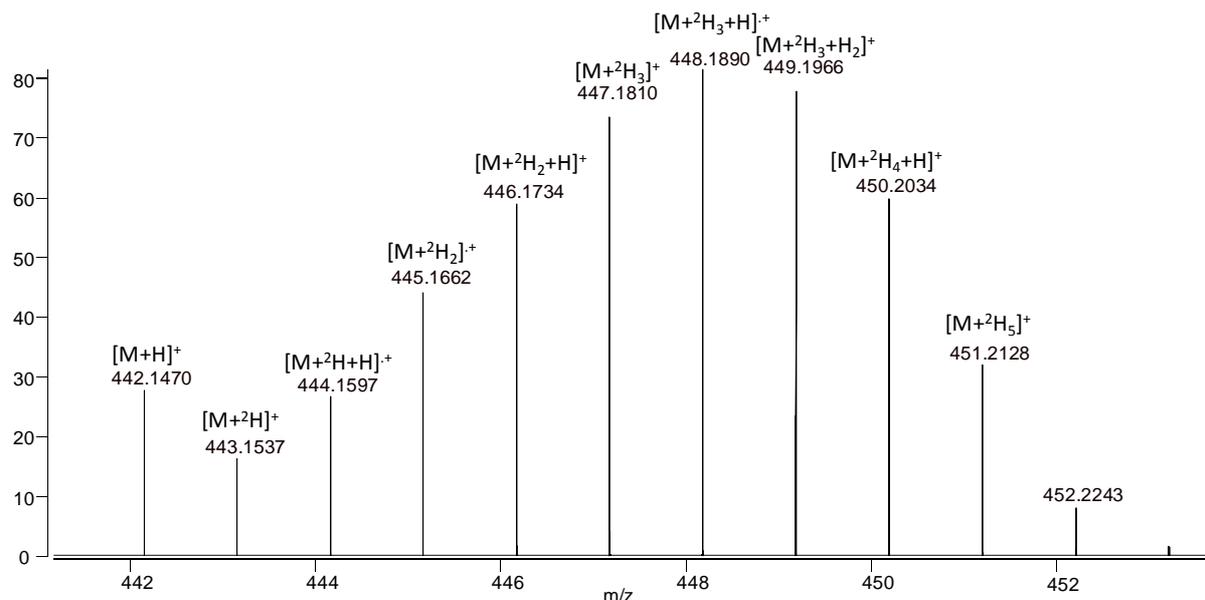


Figure 57 : Analyse par MALDI-FTICRMS d'une solution d'acide folique (1.10^{-5} M) dans de l'eau lourde ($^2\text{H}_2\text{O}$) (matrice 2,5-DHB)

Comme le montre le spectre, le massif obtenu pour l'acide folique est décalé vers les plus hautes masses lorsque celui-ci est mis en solution dans de l'eau lourde. La précision sur la mesure de masse nous a permis d'attribuer les différents pics observés à des adduits hydrogénés et deutérés d'acide folique fixant jusqu'à $5 \text{ } ^2\text{H}_2$. L'acide folique montre donc un effet de type « éponge à protons » qui a déjà été observé par ailleurs sur d'autres composés azotés en MALDI-MS⁶⁹. Les composés présentant ce type de comportement sont décrits comme possédant une grande possibilité de délocalisation de leurs électrons par conjugaison. L'acide folique présente également une très forte conjugaison de ses électrons comme le montre la Figure 58 ci-après.

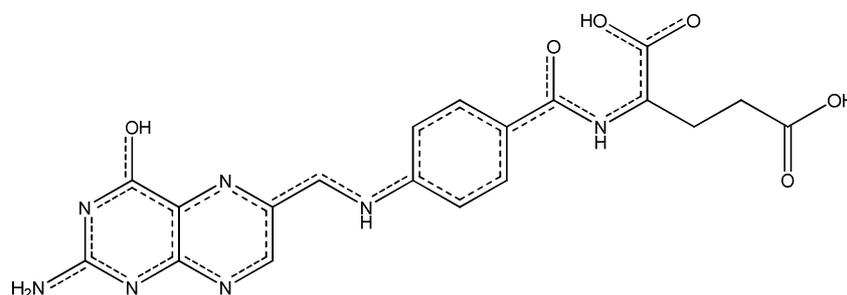


Figure 58 : Représentation schématique de la forme moyenne de la conjugaison des électrons de l'acide folique

⁶⁹ (69) Calba, P. J. Contribution à l'étude du mécanisme MALDI par l'utilisation de sondes moléculaires photochromiques (Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Metz), Paul Verlainne de Metz, 1998.

Ainsi, les électrons de l'acide folique sont fortement conjugués et délocalisés. De ce fait, cette molécule présente un comportement nucléophile et peut capter plusieurs hydrogènes lors de la désorption/ionisation laser assistée par matrice, expliquant notamment la présence intense d'un pic à $m+2$ (443,15 Th) lors de l'analyse de cette molécule. Quoiqu'il en soit, ce phénomène ne gêne pas la bonne ionisation et l'identification de l'acide folique et ne perturbe ainsi en rien la suite de notre étude.

iii. Analyse de l'acide folinique en MALDI-TOFMS

Nous avons de même analysé une solution aqueuse d'acide folinique à 1.10^{-5} M ($MM=473,1659 \text{ g.mol}^{-1}$) en MALDI-TOFMS (matrices SA, HCCA, et 2,5-DHB). Les résultats sont présentés ci-après en **Figure 59**.

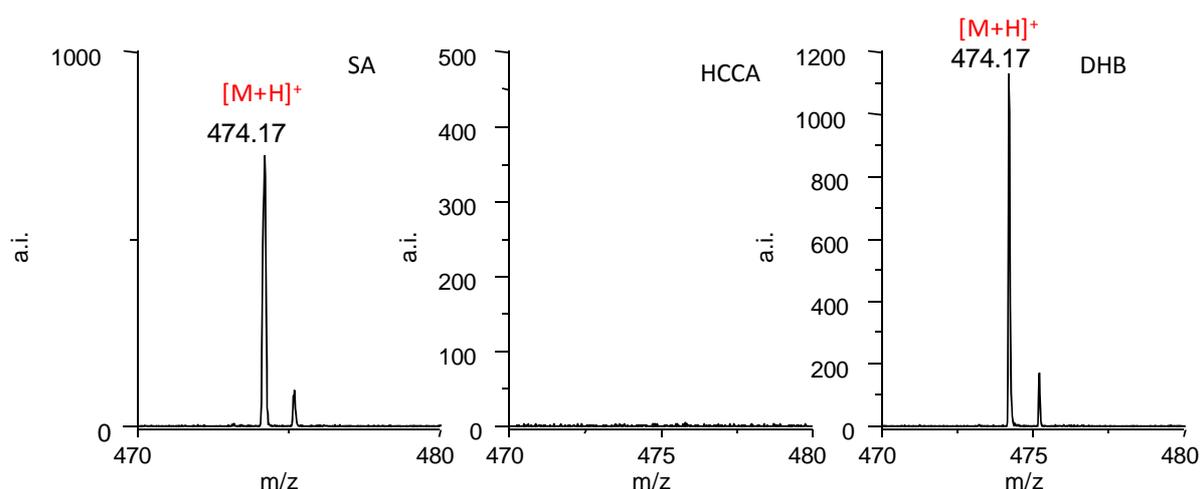


Figure 59 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à 1.10^{-5} M d'acide folinique avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)

Les résultats obtenus avec l'acide folinique sont différents de ceux obtenus pour l'acide folique. En effet, les signaux sont de bonne qualité avec les matrices SA et 2,5-DHB (écart de mesure en masse de l'ordre de 6 ppm) alors qu'aucun pic pseudomoléculaire n'est pas observé avec la matrice HCCA. Lorsque cette matrice est utilisée, d'autres pics sont observés (notamment à $[M-H_2O]^+$) et leur intensité est telle qu'ils nuisent à l'observation du pic pseudomoléculaire. Cela veut dire que l'affinité protonique de l'acide folinique est très élevée (ce qui explique que l'ionisation soit très bonne avec les matrices d'affinité protonique moyenne à haute de type 2,5-DHB et SA) et donc l'écart d'affinité protonique est très

important avec la matrice HCCA. Le transfert de proton est alors tellement énergétique qu'il induit des fragmentations intenses.

De plus, aucun effet de type « éponge à proton » n'est observé lors de l'analyse par MALDI-TOFMS de ce composé. Cela peut s'expliquer par le fait que l'acide folinique ne présente pas une conjugaison des ses électrons aussi importante que celle de l'acide folique (**Figure 40**). La matrice 2,5-DHB a ainsi été choisie pour l'analyse de l'acide folinique par MALDI-TOFMS.

iv. Analyse de l'aminoptérine en MALDI-TOFMS

Une solution aqueuse d'aminoptérine à 1.10^{-5} M ($MM= 440,1557 \text{ g.mol}^{-1}$) a été ensuite analysée en MALDI-TOFMS (matrices SA, HCCA, et 2,5-DHB) (**Figure 60**).

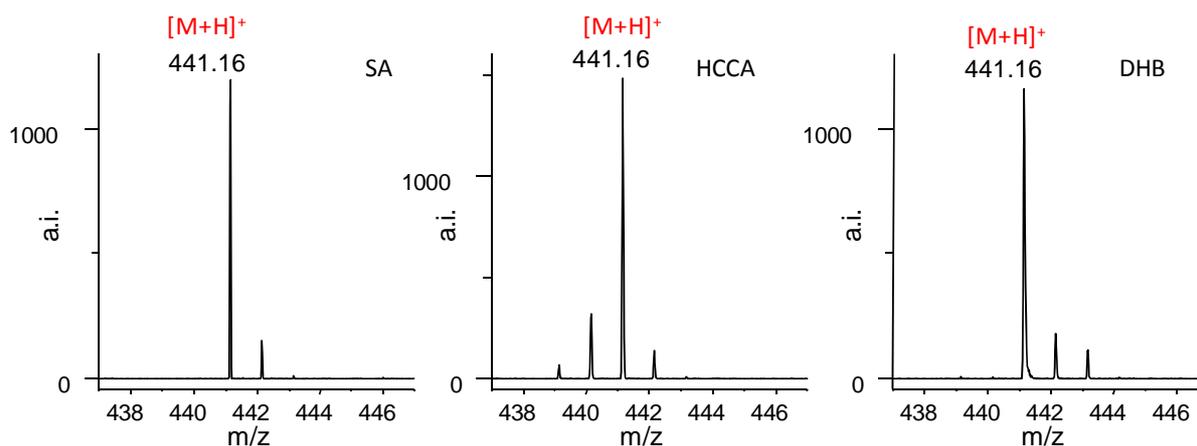


Figure 60 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à 1.10^{-5} M d'aminoptérine avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)

Les signaux obtenus en MALDI-TOFMS lors de l'analyse de l'aminoptérine avec la matrice SA sont de bonne qualité mais légèrement moins intenses que ceux obtenus avec la matrice HCCA ou la matrice 2,5-DHB (ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ $m/z = 441.16 \text{ Da}$). Lors de l'analyse avec la matrice HCCA un pic correspondant à l'ion M^+ est observé. Ceci va dans le sens d'un écart d'affinité protonique entre l'aminoptérine et la matrice relativement important. Les signaux obtenus avec le 2,5-DHB sont quand à eux de bonne qualité même si le massif isotopique de l'espèce est un peu perturbé (le pic à $m+3$ étant trop intense). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'aminoptérine présente un comportement de type « éponge à proton », sa structure ne différant de celle de l'acide folique que d'un groupement $-NH_2$.

Quoiqu'il en soit, l'attribution des pics se fait avec un écart moyen de 6,5 ppm par rapport à la masse théorique.

Comme précédemment, les matrices HCCA et 2,5-DHB ont été choisies pour mener à bien les études sur l'aminoptérine.

v. Analyse du méthotrexate en MALDI-TOFMS

De la même manière, nous nous sommes intéressés à l'analyse d'une solution aqueuse à 1.10^{-5} M de méthotrexate ($MM= 454,44 \text{ g.mol}^{-1}$) en MALDI-TOFMS (matrices SA, HCCA, et 2,5-DHB). Les résultats sont présentés ci-après (Figure 61).

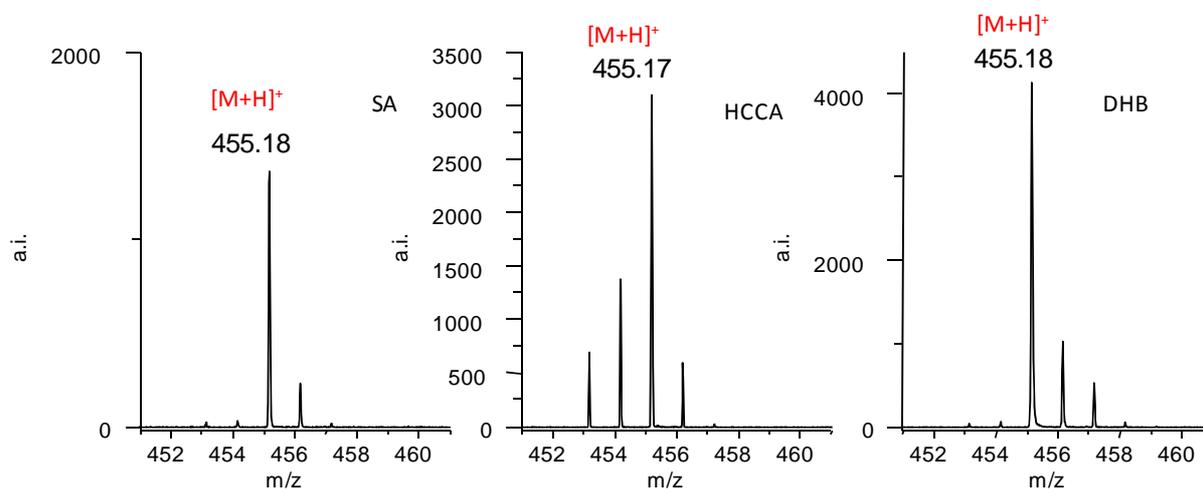


Figure 61 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à 1.10^{-5} M de Méthotrexate avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)

L'analyse du méthotrexate avec la matrice SA donne des signaux caractéristiques mais de relativement plus faible intensité qu'avec les deux autres matrices. Les signaux obtenus avec les matrices HCCA et 2,5-DHB présentent un pic pseudomoléculaire [M+H]⁺ du méthotrexate intense et bien résolu. La précision sur la mesure de masse moyenne est de 4,2 ppm. La présence de pics intenses à M⁺ et [M-H₂+H]⁺ avec la matrice HCCA provient sans doute d'un écart d'affinité protonique trop important entre l'analyte et la matrice. De plus, le fait que des signaux caractéristiques du méthotrexate puissent être obtenus avec l'acide sinapinique, ce qui sous-entend un écart d'affinité protonique suffisant, va dans le sens des hypothèses dégagées dans le chapitre précédent quant à l'affinité protonique importante de

cette molécule. L'affinité protonique du méthotrexate doit ainsi être du même ordre que celle de l'aminoptérine (en accord avec leur analogie structurale).

Là encore, les matrices HCCA et 2,5-DHB ont été choisies pour mener l'étude du méthotrexate par MALDI-TOFMS.

vi. Analyse de la pyriméthamine en MALDI-TOFMS

Enfin, une solution de pyriméthamine à 1.10^{-5} M ($MM= 248,0815 \text{ g.mol}^{-1}$) a été préparée et analysée en MALDI-TOFMS (matrices SA, HCCA, et 2,5-DHB). Les résultats sont présentés ci-après en **Figure 62**.

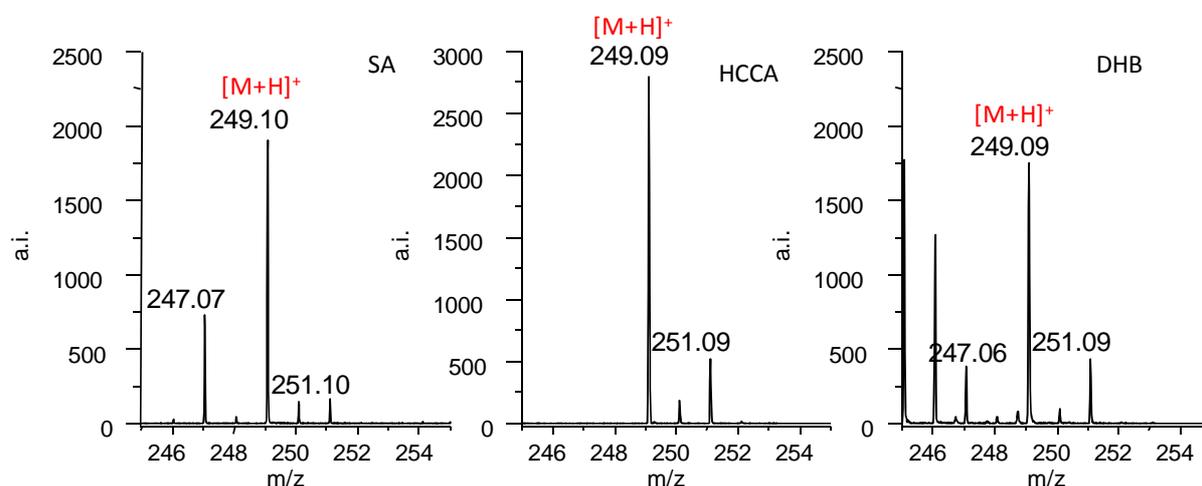


Figure 62 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à 1.10^{-5} M de pyriméthamine avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)

L'analyse de la pyriméthamine avec les matrices SA et 2,5-DHB donne des pics pseudomoléculaires caractéristiques de cette molécule chlorée $[M^{35}\text{Cl}+H]^+$ à 249,09 Th et $[M^{37}\text{Cl}+H]^+$ à 251,09 Th. Cependant, il est à noter la présence d'un pic à 247 Th pouvant correspondre à une espèce $[M-H_2+H]^+$ de la pyriméthamine. D'autre part, lors de l'analyse avec la matrice 2,5-DHB, un pic de matrice à 246 Th $[2\text{DHB}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2]^+$ est observé. Cette ion ne gêne cependant pas l'attribution des signaux de la pyriméthamine avec une précision sur la mesure de masse moyenne de l'ordre de 10 ppm. Des signaux correspondant, et sans interférences, sont obtenus lorsque l'HCCA est utilisé comme matrice.

Les matrices choisies pour l'analyse de la pyriméthamine dans la suite de nos études sont l'HCCA et le 2,5-DHB.

Ainsi nous avons pu déterminer les conditions d'analyse MALDI permettant d'obtenir des signaux caractéristiques des différentes molécules sur lesquelles a porté notre étude. Nous avons dans un premier temps optimisé la détection des molécules de hautes masses que sont les cibles moléculaires (**tubuline** et **DHFR**) utilisées pour le développement de nos tests. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'étude des différentes molécules s'y liant, utilisées comme témoins positifs lors de la mise au point de nos tests de criblage : la **colchicine**, la **vinblastine** et la **vincristine** pour l'étude de la liaison à la tubuline et l'**acide folique**, l'**acide folinique**, l'**aminoptérine**, le **méthotrexate** et la **pyriméthamine** pour la liaison à la DHFR. Nous avons dans tous les cas obtenus des **signaux caractéristiques** $[M+H]^+$ de ces molécules avec une précision de la mesure en masse moyenne souvent inférieure à 10 ppm. Nous avons ainsi choisi d'utiliser la **matrice SA pour l'étude des cibles moléculaires** et les **matrices HCCA et 2,5-DHB pour l'étude des ligands**. Le mode de dépôt que nous avons choisi est celui du **mélange intime**.

2. Protocole de criblage primaire

Une fois les conditions de détection MALDI-TOFMS de nos composés déterminées, nous avons pu continuer la mise en place des tests proprement dite. Dans ce paragraphe nous allons nous attacher à présenter les résultats obtenus lors de la mise en place et du développement des tests de criblage primaire des deux cibles moléculaires. **Le but d'un test de criblage primaire étant de faire un tri entre des molécules ayant ou n'ayant pas d'affinité pour la cible choisie**. Les informations générées à ce niveau sont donc uniquement qualitatives : oui ou non une molécule se lie à la cible. Nous allons ainsi présenter les résultats obtenus lors de l'analyse directe des molécules étalon (dont on connaît l'activité) liées ou non à leurs cibles. Dans un premier temps nous présenterons les résultats obtenus pour le criblage de la liaison de composés à la tubuline, puis à la DHFR. Nous nous intéresserons ensuite à la validation des résultats obtenus par l'évaluation de la spécificité, de la répétabilité, de la reproductibilité, de la robustesse et la détermination des facteurs de qualité propres à ces tests de criblages et permettant d'évaluer la qualité de la réponse.

a. Analyse directe des molécules liées à la tubuline

Le but de ce travail est d'**étudier si un composé montre une capacité à se lier à la tubuline** (cible impliquée dans le traitement de nombreux cancers). Nous avons développé un protocole basé sur trois étapes majeures qui sont illustrées dans le chapitre II. La première étape implique la mise en contact de la molécule à tester avec la tubuline. 100µL d'une solution aqueuse de tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M) et de colchicine ($5 \cdot 10^{-5}$ M), de vinblastine ($5 \cdot 10^{-5}$ M) ou de vincristine ($5 \cdot 10^{-5}$ M) sont incubés à 37°C pendant une heure. La deuxième étape concerne la séparation des espèces non liées à la cible. Cette étape est assurée par l'utilisation d'un microconcentrateur dont la membrane permet de retenir spécifiquement les composés dont la masse moléculaire est supérieure à 30000 g/mol. 100µL des différentes solutions incubées sont ajoutés dans le compartiment haut du dispositif et centrifugés à 12000 tours par minute pendant 12 minutes. Les membranes des filtres sont lavées trois fois par ajout de 100µL d'eau ultrapure suivi à chaque fois d'une centrifugation (12 min, 12000 rpm). Cela doit permettre de s'assurer de l'élimination des composés non liés. Tout signal d'une des molécules à tester, obtenu par MALDI-TOFMS à partir de cette étape, ne pourra donc qu'être relatif à des espèces préalablement liées à la tubuline. Les composés qui sont retenus sur la membrane au bout des trois lavages sont ensuite élués par 25 µL d'eau ultrapure.

Il apparaît ici que l'élimination des espèces non liées à la tubuline est une étape cruciale. Il a donc été essentiel de valider le fait qu'aucun composé retrouvé dans la solution après le cycle de lavage ne pouvait avoir été retenu de manière non spécifique sur la membrane du microconcentrateur. Ainsi, une série de lavages des membranes par 100µL d'eau ultrapure a été mise en œuvre pour différents microconcentrateurs ayant préalablement servi à filtrer des solutions de colchicine, vinblastine et vincristine à la même concentration ($5 \cdot 10^{-5}$ M). Les solutions obtenues en éluant les composés retenus sur les membranes des microconcentrateurs, à chaque étape, ont été analysées par MALDI-TOFMS avec le 2,5-DHB comme matrice. Les résultats sont présentés en Figure 63.

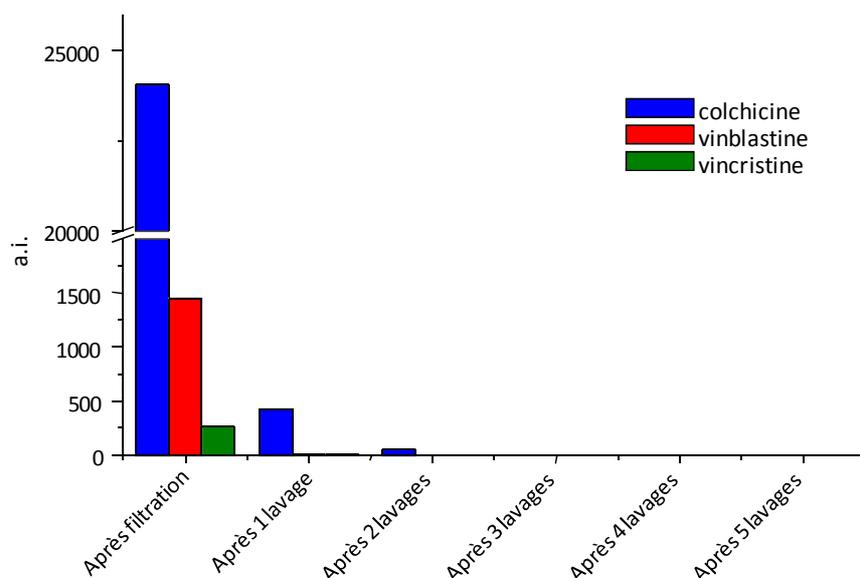


Figure 63 : Intensités absolues des pics pseudomoléculaires obtenus par MALDI-TOFMS pour les composés (colchicine, vinblastine ou vincristine) retenus sur les membranes des microconcentrateurs (mode réflectron, mode de dépôt par mélange intime, matrice 2,5-DHB)

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

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

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

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

Une fois la présence de la cible moléculaire protéique confirmée, notre étude a porté sur l'analyse directe par MALDI-TOFMS, en mode réflectron avec les matrices HCCA et 2,5-DHB, de la présence éventuelle de molécules y étant liées (colchicine, vinblastine ou vincristine). Les résultats obtenus sont présentés en Figure 64.

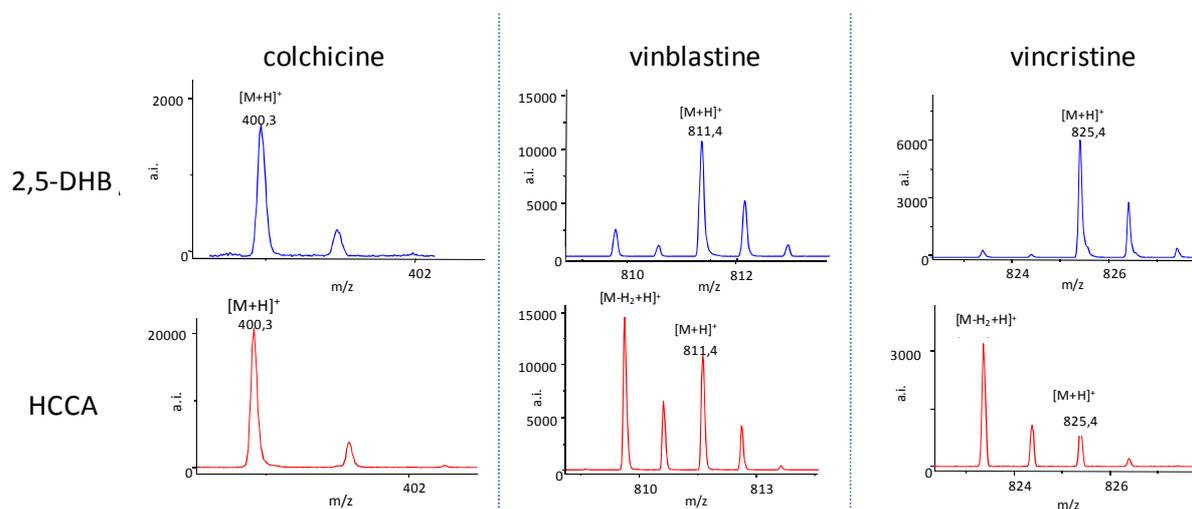


Figure 64 : Analyse directe par MALDI-TOFMS (mode réflectron) de molécules liées à la tubuline (2.10^{-5} M) (colchicine, vinblastine ou vincristine) (après incubation, filtration, lavages et élution) (dépôt par mélange intime avec le 2,5-DHB ou l'HCCA)

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

Pour comprendre le mécanisme permettant la détection de molécules jusque là liées à leur cible moléculaire, nous avons décidé de comparer différentes techniques d'ionisation. Les paramètres cruciaux à la détection des molécules liées pourront ainsi être mis en évidence. Ainsi, une solution de vinblastine (5.10^{-5} M) a été analysée par désorption/ionisation laser (laser desorption/ionization LDI) TOFMS à 337 nm (irradiance de l'ordre de 5.10^7 W.cm⁻²) avant (A) et après (B) incubation avec la tubuline (2.10^{-5} M), puis par MALDI-TOFMS avec deux modes de dépôts différents (couche mince (C) et mélange intime (D)) avec comme

matrice le 2,5-DHB, après incubation avec la tubuline. Les spectres obtenus sont présentés en **Figure 65**.

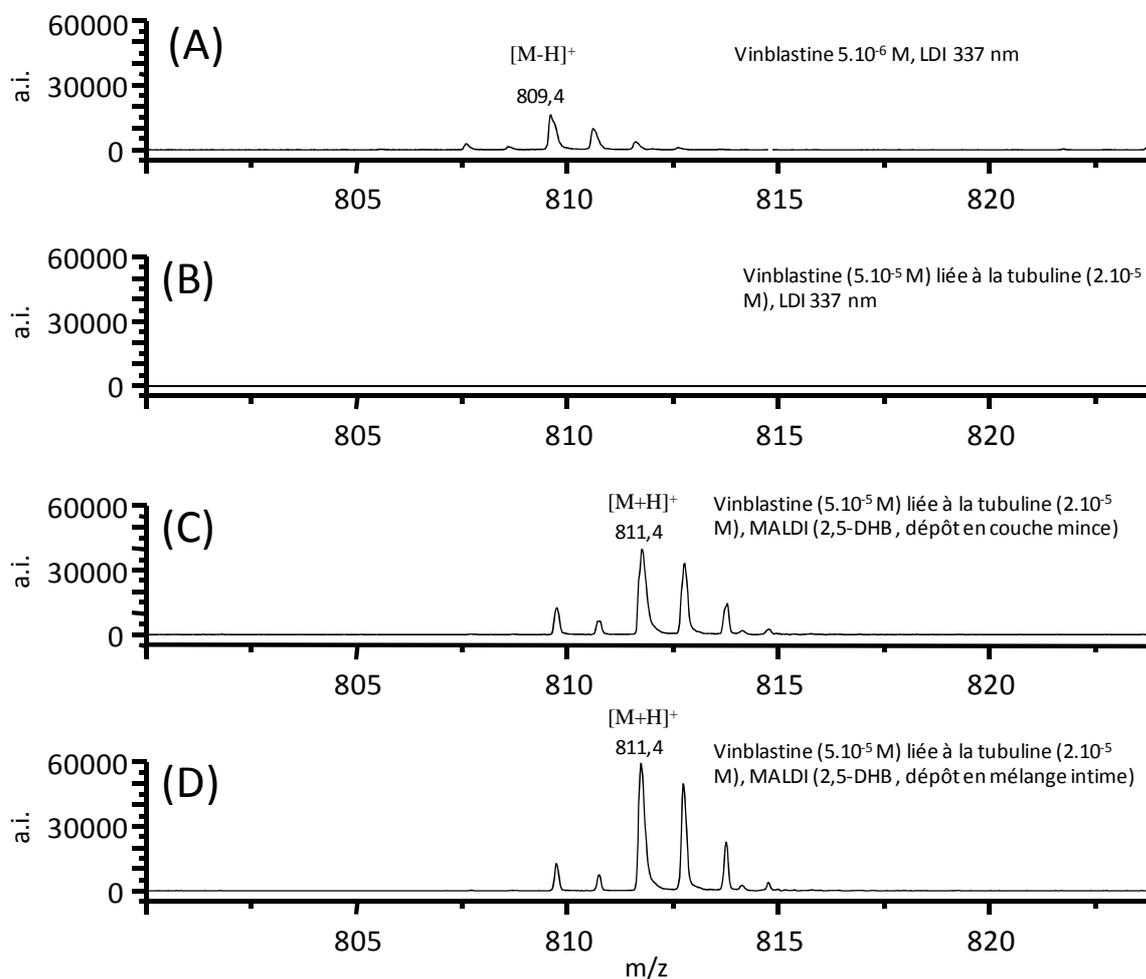


Figure 65 : (A) Vinblastine (5.10^{-6} M) analysée par LDI-TOFMS (mode reflectron, 337 nm); (B) analyse LDI-TOFMS (mode reflectron, 337 nm) de la vinblastine (5.10^{-5} M) liée à la tubuline (2.10^{-5} M); (C) analyse par MALDI-TOFMS de la vinblastine (5.10^{-5} M) liée à la tubuline (2.10^{-5} M) (2,5-DHB, dépôt en couche mince); (D) analyse par MALDI-TOFMS de la vinblastine (5.10^{-5} M) liée à la tubuline (2.10^{-5} M) (2,5-DHB, dépôt en mélange intime); irradiance de l'ordre de 5.10^7 W.cm⁻²

Le spectre de masse de la **Figure 65A**, obtenu lors de l'étude en LDI-TOFMS de la vinblastine seule, montre un ion caractéristique de cette molécule à $m/z=809$ $[M-H_2+H]^+$. Dans un deuxième temps, le spectre de masse LDI-TOFMS relatif à la vinblastine incubée avec la tubuline (après filtration, lavages et élution) (**Figure 65B**) ne montre aucun signal caractéristique. Les analyses en MALDI-TOFMS de cette même solution avec ajout de 2,5-DHB comme matrice en utilisant le mode de dépôt en couche mince (une couche de matrice, puis après séchage une couche d'échantillon) (**Figure 65C**), ou en utilisant le mode de dépôt en mélange intime (mélange v/v des solutions puis dépôt du mélange, ou dans notre cas, dépôt de

l'échantillon puis ajout de la matrice et reprise de l'échantillon et de la matrice déposée par plusieurs cycles d'aspiration refoulement) (Figure 65D) montrent quand à elles des signaux caractéristiques (ions à $[M+H]^+$) de la vinblastine liée à la tubuline. De plus les intensités des pics correspondant à la vinblastine augmentent (de 38000 à 60000 coups) lorsque le mode de dépôt par mélange intime est utilisé.

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

Nous avons alors voulu préciser l'importance des conditions dénaturantes de la solution de matrice dans la détection des composés liés aux cibles moléculaires. Ainsi, la même solution de vinblastine ($5 \cdot 10^{-5} M$) en présence de tubuline ($2 \cdot 10^{-5} M$) après incubation, filtration, lavages et élution a été déposée en mélange intime avec différentes solutions de matrice 2,5-DHB (acétonitrile/eau v/v) d'acidité croissante (0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 5% et 10% d'acide trifluoroacétique TFA). Les intensités absolues du pic pseudomoléculaire de la vinblastine obtenues lors de l'analyse directe de ces dépôts sont présentées en Figure 66.

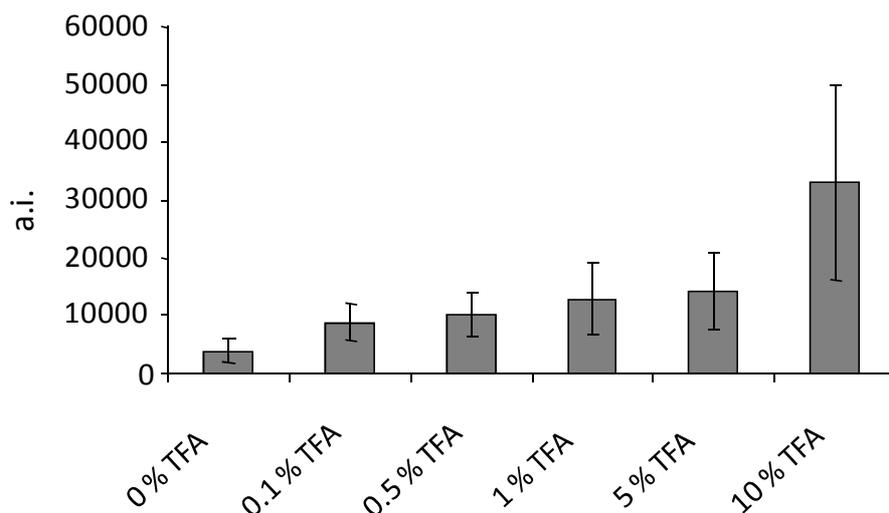


Figure 66 : Intensités absolues du pic pseudomoléculaire de la vinblastine ($[M+H]^+ = 811,42$ Da) lors de l'analyse directe par MALDI-TOFMS (après incubation avec la tubuline, filtration, lavages et élution) pour différentes solutions de matrices d'acidité croissante (2,5-DHB, mélange intime : 0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 5% et 10% de TFA)

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

Attachons nous à présent à prouver la faisabilité de notre test de criblage non plus dans le cas de solutions contenant un seul composé actif, mais dans le cas d'un mélange de plusieurs d'entre eux. Pour cela, une solution constituée de tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M), et de vinblastine, vincristine et colchicine ($5 \cdot 10^{-5}$ M) a été incubée une heure à 37°C , puis filtrée, lavée et élue. La solution obtenue a été analysée par MALDI-TOFMS avec les deux matrices utilisées précédemment (HCCA et 2,5-DHB). Les résultats sont présentés en Figure 67 ci-après.

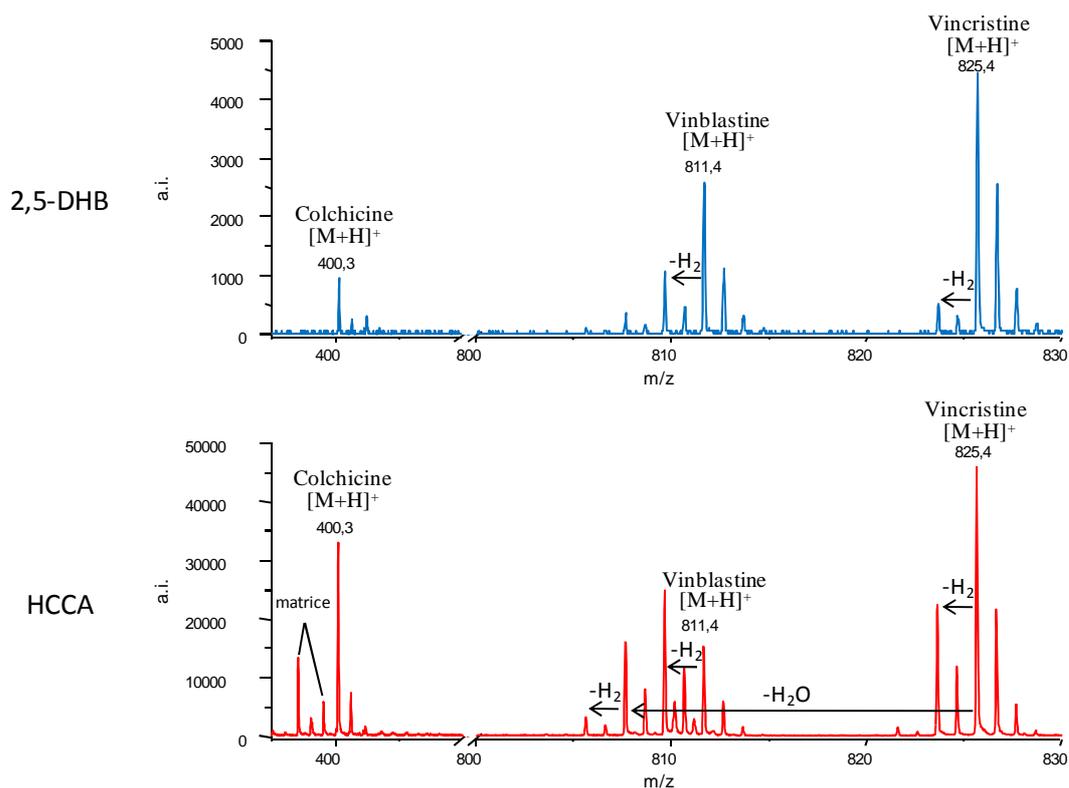


Figure 67 : Analyse directe par MALDI-TOFMS de la colchicine (5.10^{-5} M), vinblastine (5.10^{-5} M) et vincristine (5.10^{-5} M) liées simultanément à la tubuline (2.10^{-5} M) avec le 2,5-DHB ou l'HCCA comme matrice

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

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

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

b. Analyse directe des molécules liées à la DHFR

Nous allons à présent nous intéresser à montrer comment le protocole, développé initialement pour le criblage de la liaison de composés à la tubuline, peut être modifié pour étudier les composés liant la DiHydroFolate Reductase.

Ce protocole consiste en trois différentes étapes. Tout d'abord les composés à analyser sont incubés avec la DHFR. Cette solution est ensuite filtrée sur un microconcentrateur dont la membrane retient spécifiquement les composés dont la masse moléculaire est supérieure à 10000 g.mol^{-1} . Les molécules de masse inférieure vont passer au travers de la membrane durant l'étape de centrifugation. La membrane du dispositif est lavée trois fois pour enlever tout les composés non liés spécifiquement à la DHFR et cette cible moléculaire est ensuite éluée par de l'eau ultrapure. La solution de DHFR et de composés éventuellement liés à celle-ci est ensuite analysée directement par MALDI-TOFMS.

Pour mener à bien ce type de protocole, nous avons vu qu'il est très important de valider l'élimination des composés non liés, de manière à s'assurer qu'aucune liaison non spécifique des composés à tester sur la membrane des filtres ne peut se produire. Ainsi, $500 \mu\text{L}$ de différentes solutions de méthotrexate, pyriméthamine, aminoptérine, acide folique et acide folinique (1.10^{-5} M) ont été filtrées sur des microconcentrateurs MICROCON 10000. Les membranes des microconcentrateurs ont été lavées jusqu'à 5 fois successives par $500 \mu\text{L}$ d'eau ultrapure, avant une élution par $25 \mu\text{L}$ de ce même solvant. Les solutions ainsi obtenues ont été analysées, à chaque étape, par MALDI-TOFMS avec le 2,5-DHB comme matrice. Les résultats obtenus sont présentés en Figure 68.

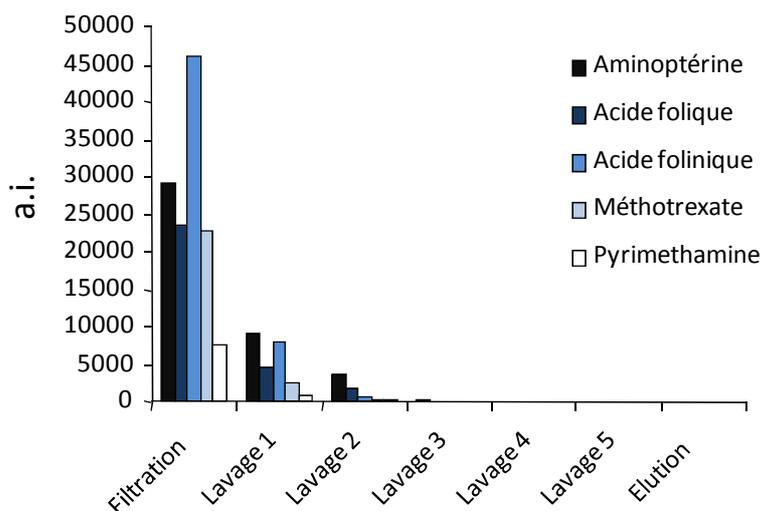


Figure 68 : Intensités absolues des pics pseudomoléculaires obtenus par MALDI-TOFMS pour les composés (aminoptérine, acide folique, acide folinique, méthotrexate ou pyriméthamine) retenus sur les membranes des microconcentrateurs (mode réflectron, dépôt par mélange intime, matrice 2,5-DHB)

Les signaux de chacune des molécules étudiées diminuent d'au moins trois fois lors du premier lavage. Lorsque trois lavages successifs sont mis en œuvre, aucun signal significatif (de rapport signal/bruit au moins supérieur à 3) correspondant à une des molécules étudiées n'est observable sur les spectres de masse MALDI-TOFMS. A partir de ces informations, il a été décidé que les composés retenus sur les microconcentrateurs seront élués après avoir effectué trois lavages successifs des membranes de ces dispositifs et que ce faisant, l'élimination des composés non spécifiquement liés à la DHFR sera assurée.

Dès lors, une incubation des cinq composés à tester est faite avec la DHFR. Les solutions ont été préparées en mélangeant 200 μL de DHFR ($1,5 \cdot 10^{-7}$ M) dans son tampon spécifique (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 5 μM NADPH, inhibiteurs des protéases et 50% de glycérol) avec 50 μL d'une solution de molécule à analyser (méthotrexate, aminoptérine, pyriméthamine, acide folique ou acide folinique) ($1 \cdot 10^{-4}$ M) dans de l'eau ultrapure et de 250 μL d'eau ultrapure. Ces solutions sont alors incubées une heure à 37°C. Après ce temps d'incubation, les solutions sont filtrées sur des dispositifs MICROCON 10000. Les membranes des filtres sont ensuite lavées trois fois par 500 μL d'eau ultrapure. Les composés retenus sont finalement élués par 25 μL d'eau ultrapure et analysés par MALDI-TOFMS avec différentes matrices (HCCA et 2,5-DHB).

Le lavage des composés étant validé, tout signal correspondant au méthotrexate, à l'aminoptérine, à l'acide folique, à l'acide folinique, ou à la pyriméthamine, détecté lors de l'analyse directe des solutions éluées, ne peut qu'être relatif à des espèces préalablement liées à la DHFR. Les résultats obtenus pour les différentes molécules sont présentés dans la Figure 69.

Les spectres obtenus montrent des signaux caractéristiques des différentes molécules mises en présence de la DHFR. Ainsi comme l'aminoptérine, l'acide folique, l'acide folinique, le méthotrexate et la pyriméthamine sont détectés par analyse directe des éluats, ces molécules ont une capacité à lier la DHFR faisant qu'ils ne sont pas éliminés lors des lavages.

Il est à noter également que des signaux caractéristiques des molécules étudiées (présence des pics $[M+H]^+$ correspondants) sont acquis quelle que soit la matrice utilisée (2,5-DHB ou HCCA). Cependant, lors de l'analyse avec l'HCCA la présence de pics de matrice proches de ceux des ions pseudomoléculaires des molécules testées (notamment dans le cas de l'aminoptérine et de la pyriméthamine) peut interférer avec l'attribution et l'étude de ces signaux caractéristiques. Cependant, la résolution de l'appareil (proche de 10000) permet d'attribuer les signaux quasi sans ambiguïté que ce soit par rapport aux pics de matrice ou aux pics d'adduits d'hydrogène suite à l'effet « éponge à proton » de cette classe de composés (aminoptérine et acide folique notamment). Les signaux obtenus pour les molécules testées avec le 2,5-DHB sont de bonne qualité pour l'ensemble d'entre elles, tant en terme de résolution que de précision de mesure de masse ou d'intensité. De plus, bien que les intensités moyennes soient plus importantes avec la matrice HCCA par rapport à la matrice 2,5-DHB, il peut résulter de son usage l'absence totale de signaux caractéristiques d'une molécule (comme c'est le cas pour l'acide folinique). Cela peut mener, lors d'une campagne de criblage, à un faux négatif, une molécule éliminée alors qu'elle présente une activité. Cela met en avant la nécessité de tester préalablement en MALDI-TOFMS les molécules qui vont être criblées, en vue de la sélection de la matrice la plus adaptée à leur ionisation.

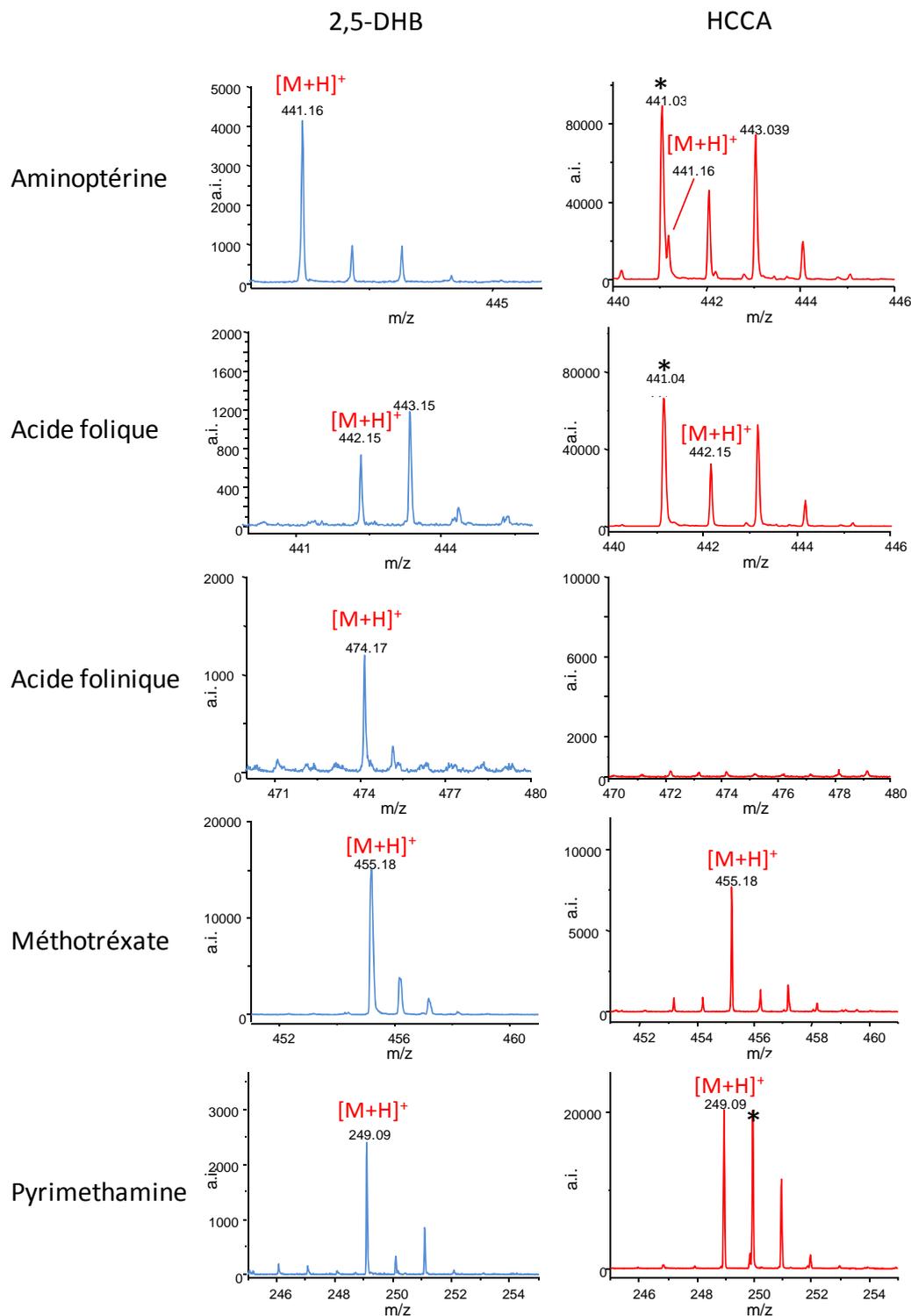


Figure 69 : Analyses directe en MALDI-TOFMS (mode reflectron) de molécules liées à la DHFR (6.10^{-8} M) (aminoptérine (1.10^{-5} M), acide folique (1.10^{-5} M), acide folinique (1.10^{-5} M), méthotrexate (1.10^{-5} M) ou pyriméthamine (1.10^{-5} M)) (dépôt par mélange intime avec le 2,5-DHB ou l'HCCA comme matrice) (* pics de matrice)

Le test de criblage de la liaison d'un composé à la DHFR par MALDI-TOFMS permet de déterminer si une molécule montre une affinité pour cette cible moléculaire, donnant ainsi une réponse « qualitative » : oui ou non une molécule se lie à la cible.

c. Validation des protocoles de criblage primaire

Après nous être penchés sur la mise en place de ces tests, nous allons étudier leur spécificité, leur précision (incluant la répétabilité et la précision intermédiaire), leur reproductibilité et leur robustesse. En dernier lieu nous évaluerons les paramètres permettant de déterminer leur qualité et leur intérêt en criblage (Z et Z'). Ces indicateurs permettent de caractériser la capacité du test à mener à l'identification de touches (hits) et permettent de comparer différents tests entre eux. Plus la valeur de Z est grande et plus la qualité des informations obtenues est grande. Les définitions de ces différents paramètres de validation sont extraites des référentiels Q2A et Q2B en vue de la validation des méthodes analytiques^{70,71}.

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

↳ Critères de positivité du test :

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

- L'étape de lavage de la membrane du microconcentrateur a été validée pour la molécule.
- Des signaux caractéristiques de la cible protéique de type $[M+H]^+$, $[2M+H]^+$ ou $[M+2H]^{2+}$ sont obtenus en MALDI-TOFMS en mode de détection linéaire avec la matrice SA lors de l'analyse directe des solutions après incubation, filtration, lavages et élution.

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

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

- Des signaux caractéristiques de la molécule de type $[M+H]^+$ sont obtenus en MALDI-TOFMS après incubation avec la protéine cible, filtration, lavages et élution avec un rapport signal/bruit supérieur ou égal à trois avec les matrices HCCA ou 2,5-DHB déposées en mélange intime.

↳ Critères de négativité du test :

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

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

i. La spécificité

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

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

Cette étude a été divisée en deux parties distinctes : en premier lieu, les molécules à tester, colchicine, vinblastine et vincristine d'une part et aminoptérine, acide folique, acide

folinique, méthotrexate et pyriméthamine d'autre part, ont été incubées avec une autre protéine de haute masse, l'ovalbumine (MM = 45000 g.mol⁻¹) théoriquement dénuée de tout site spécifiques sur lesquels ces molécules pourraient venir se lier⁷². Le but de cette démarche est d'étudier si les composés testés montrent une affinité non spécifique pour toute protéine de haute masse avec laquelle ils sont incubés.

Ainsi, 100 µL de solutions d'ovalbumine (2.10⁻⁵ M) et de colchicine, vinblastine ou vincristine (5.10⁻⁵ M) ont été incubés, filtrés, lavés et élués. En parallèle ces différentes molécules ont été incubées avec la tubuline (2.10⁻⁵ M), puis filtrées, lavées et éluées. Les différents éluats obtenus ont été ensuite analysés par MALDI-TOFMS avec le 2,5-DHB. Les résultats sont équivalents quelle que soit la molécule et les analyses directes de la colchicine incubée avec l'ovalbumine et la tubuline sont présentées en **Figure 70A** et **B** à titre d'exemple.

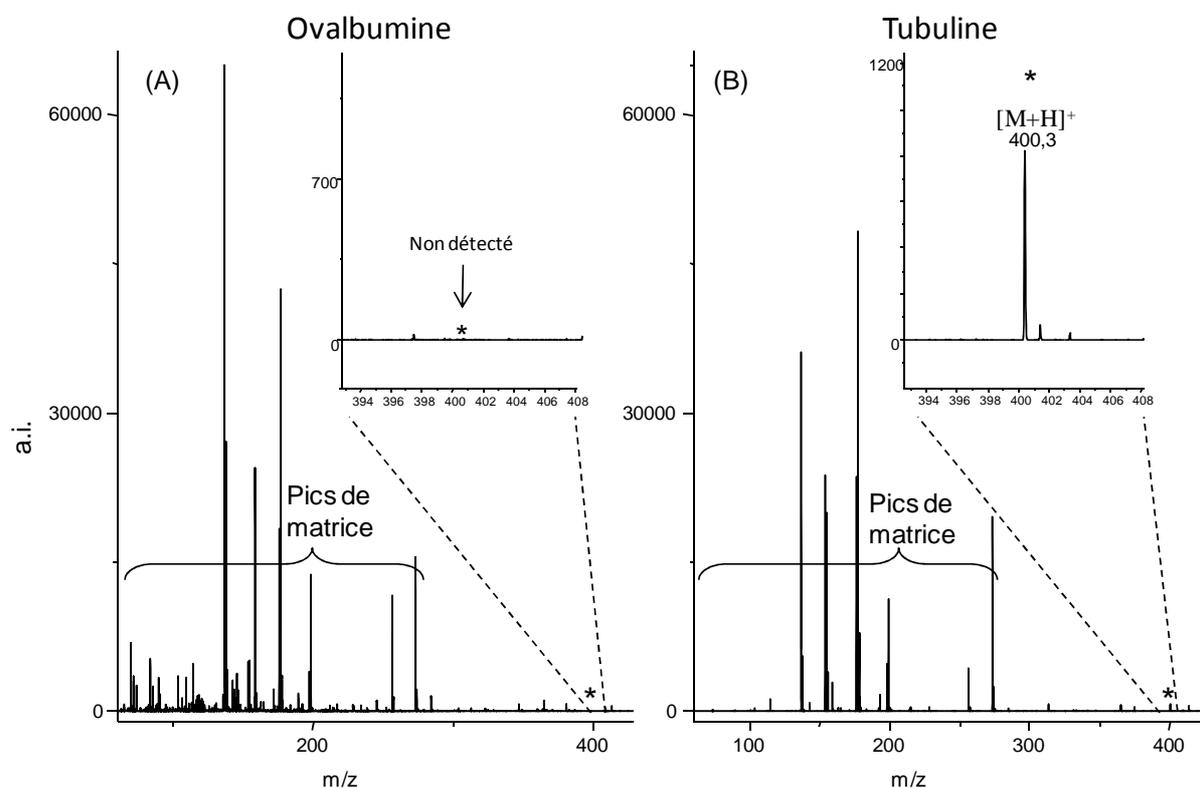


Figure 70 : (A) Analyse directe par MALDI-TOFMS (mode reflectron) de la colchicine (5.10⁻⁵ M) liée à l'ovalbumine (2.10⁻⁵ M) après incubation, filtration, lavage et élution ; (B) Analyse directe par MALDI-TOFMS (mode reflectron) de la colchicine (5.10⁻⁵ M) liée à la tubuline (2.10⁻⁵ M) après incubation, filtration, lavage et élution ; (mode de dépôt par mélange intime avec le 2,5-DHB) (* correspond au pic pseudomoléculaire [M+H]⁺ de la colchicine)

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

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

En second lieu, du méthotrexate, à titre d'exemple, a été incubé avec l'ovalbumine, protéine pour laquelle il n'a pas d'affinité spécifique connue⁷². Une solution contenant de l'ovalbumine (2.10^{-5} M) et du méthotrexate (1.10^{-5} M) dans de l'eau ultrapure a été incubée à 37°C pendant une heure. Après incubation, la solution a été filtrée, lavée trois fois et éluée avec de l'eau ultrapure avant une analyse en MALDI-TOFMS (Figure 71A). La même manipulation a été faite parallèlement pour une solution contenant du méthotrexate (1.10^{-5} M) et de la DHFR (6.10^{-8} M) (Figure 71B).

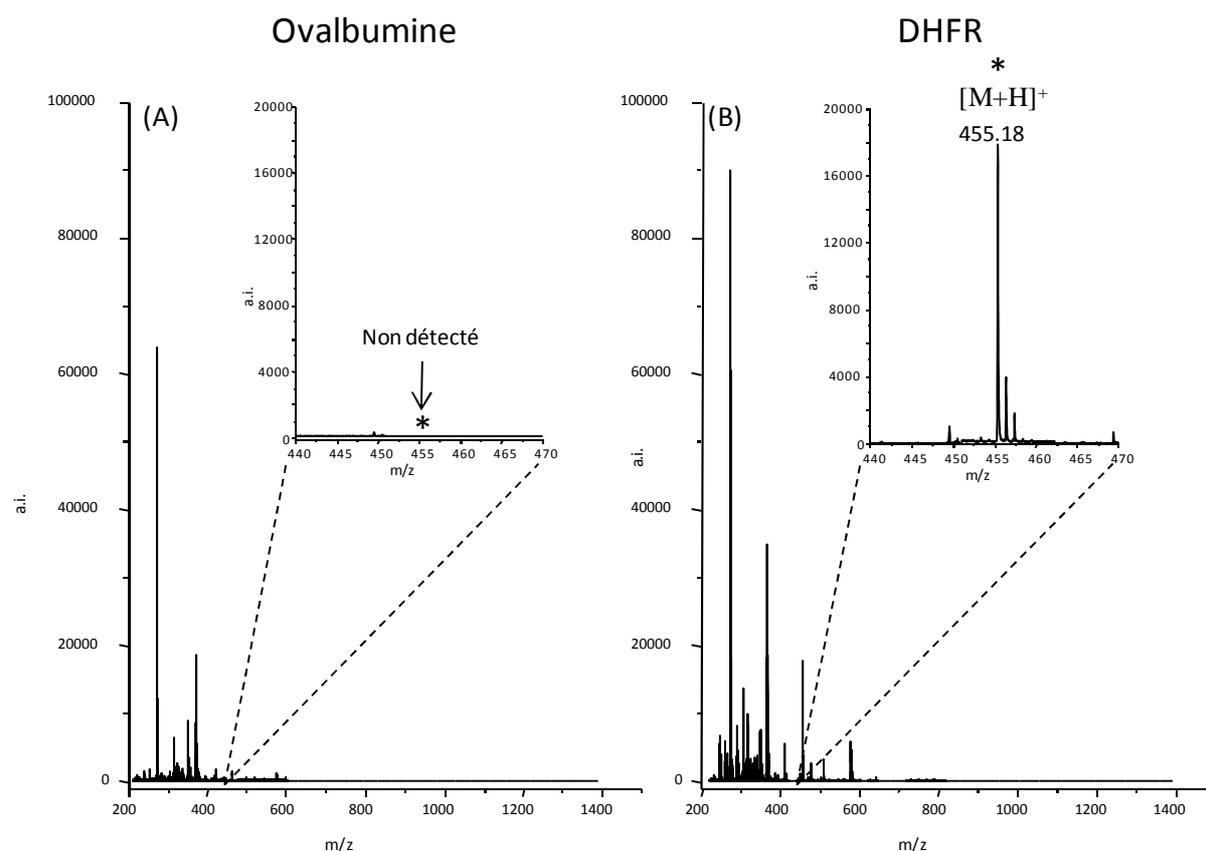


Figure 71 : (A) analyse directe par MALDI-TOFMS (mode reflectron) du méthotrexate (1.10^{-5} M) lié à l'ovalbumine (2.10^{-5} M) après incubation, filtration, lavage et élution ; (B) analyse directe par MALDI-TOFMS (mode reflectron) du méthotrexate (1.10^{-5} M) lié à la DHFR (6.10^{-8} M) après incubation, filtration, lavage et élution ; (mode de dépôt par mélange intime avec le 2,5-DHB) (* correspond au pic pseudomoléculaire $[M+H]^+$ du méthotrexate)

Comme le montre le spectre de masse MALDI-TOFMS, aucun signal correspondant au méthotrexate n'est obtenu lorsque celui-ci est incubé avec l'ovalbumine. Le méthotrexate, et par extension tous les composés se liant à la DHFR utilisés au cours de cette étude, ne se lient pas de manière non spécifique à n'importe quelle protéine de haute masse avec laquelle ils sont incubés.

Le deuxième aspect important pour évaluer la spécificité de nos tests était de prouver que les cibles moléculaires que nous utilisons n'offraient pas de sites actifs sur lesquels n'importe quelle molécule de basse masse viendrait se lier. Cette étude a été faite en utilisant de l'amiodarone, un antiarythmique puissant mais dénué de toute action anticancéreuse (antitubuline ou antimétabolique)⁷³(Figure 72A). Cette molécule nous a servi de témoin négatif au cours de la validation de nos tests. Ainsi une solution d'amiodarone (5.10^{-6} M) a d'abord été analysée en MALDI-TOFMS avec la matrice 2,5-DHB. Le spectre obtenu présente le signal caractéristique de l'amiodarone⁷⁴ $[M+H]^+$ $m/z = 646$ (Figure 72B).

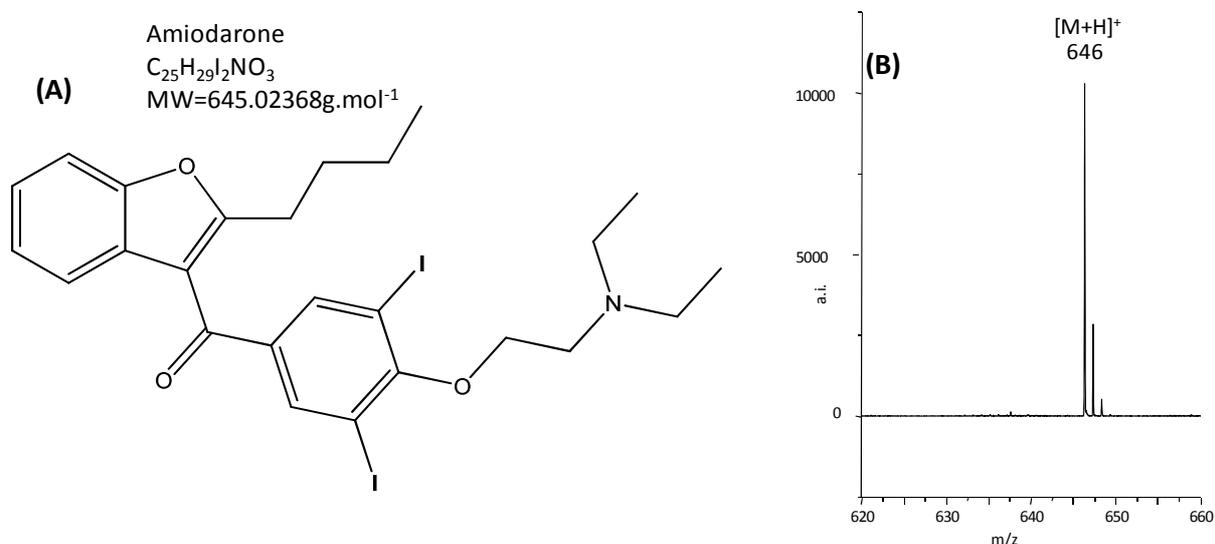


Figure 72 : (A) structure de l'amiodarone ; (B) analyse MALDI-TOFMS (mode reflectron) de l'amiodarone (5.10^{-6} M) (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB)

Après quoi, une solution de tubuline (2.10^{-5} M) et d'amiodarone (5.10^{-5} M), une solution d'ovalbumine (2.10^{-5} M) et d'amiodarone (5.10^{-5} M) et une solution de DHFR (6.10^{-8} M) et d'amiodarone (1.10^{-5} M) ont été incubées, filtrées, lavées et éluées comme décrit précédemment. Les composés élués ont été analysés par MALDI-TOFMS (Figure 73A, Figure 73B et Figure 73C respectivement).

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

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

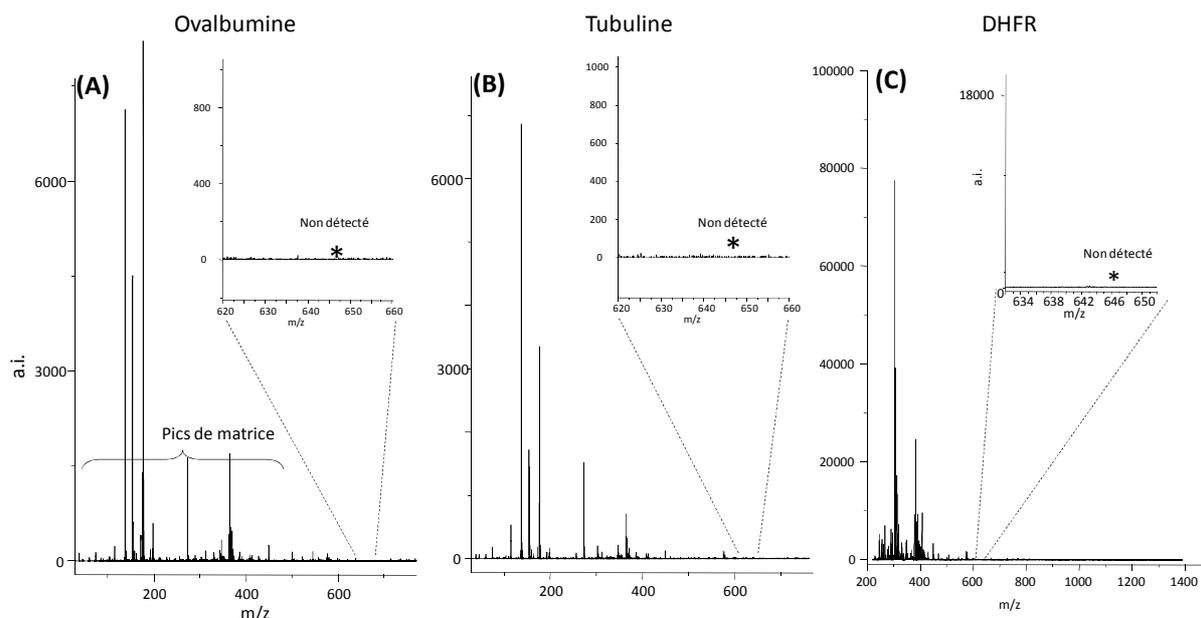


Figure 73 : (A) analyse MALDI-TOFMS de l'amiodarone ($5 \cdot 10^{-5}$ M) liée à l'ovalbumine ($2 \cdot 10^{-5}$ M) après incubation, filtration, lavages et élution (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB) ; (B) analyse MALDI-TOFMS de l'amiodarone liée à la tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M) après incubation, filtration, lavages et élution (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB) ; (C) analyse MALDI-TOFMS de l'amiodarone ($1 \cdot 10^{-5}$ M) liée à la DHFR ($6 \cdot 10^{-8}$ M) après incubation, filtration, lavages et élution (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB) ; (* correspond à l'ion $[M+H]^+$ de l'amiodarone)

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

Parallèlement, la colchicine étant une molécule photosensible pouvant s'isomériser à la lumière blanche en β - et γ -luminocolchicine, une étude a été menée sur une solution de colchicine isomérisée, théoriquement dénuée de toute activité biologique. En effet, cette

transformation, (Figure 74), induit une perte de l'activité biologique de la colchicine, par une forte diminution de son affinité pour son site actif⁷⁵.

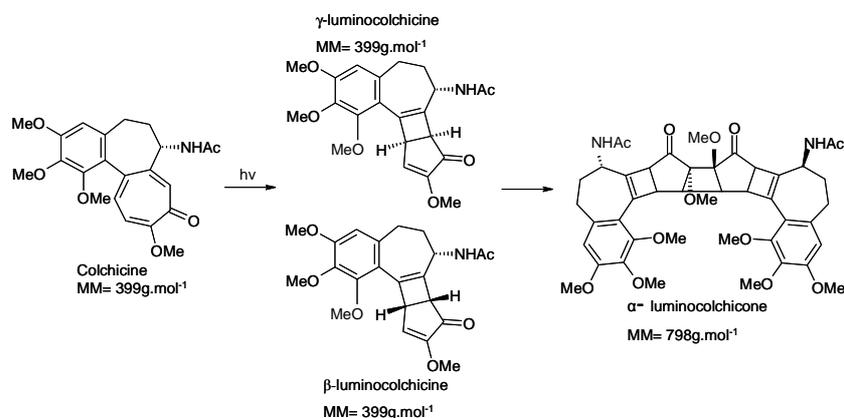


Figure 74 : photo-isomérisation de la colchicine

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

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

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

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

ii. La précision

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

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

1. La répétabilité

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

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

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

La même démarche a été faite avec deux échantillons de méthotrexate (1.10^{-5} M) incubé avec la DHFR (6.10^{-8} M), qui sont chacun déposés 5 fois avec deux matrices différentes (après incubation, filtration, lavages et élution). Là encore, les 20 dépôts donnent

des résultats positifs quand à la liaison du méthotrexate à la DHFR (la présence de la DHFR dans chaque échantillon et le lavage du méthotrexate étant validés par ailleurs). Le rapport signal/bruit moyen du pic pseudomoléculaire du méthotrexate était de 1808(\pm 26%) pour la matrice 2,5-DHB, et de 879(\pm 28%) pour la matrice HCCA.

Ces deux séries de mesures montrent que **les résultats obtenus à l'aide des protocoles que nous avons développés sont répétables en termes de positivité ou de négativité** et aucune réponse imprécise (faux positif ou faux négatif) n'a été enregistrée. Ces données permettent de garantir une bonne répétabilité dans les mesures. En effet, lors de l'étude des résultats, il faut tenir compte du fait que la technique MALDI-TOFMS ne permet qu'une approche semi quantitative des signaux caractéristiques des molécules présentes.

2. La précision intermédiaire

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

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

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

iii. La reproductibilité

La reproductibilité évalue la variabilité extra-laboratoire d'un test. Il convient alors de le mener à bien dans les mêmes conditions, dans différents laboratoires et par différents opérateurs. Cette donnée permet d'évaluer l'aisance avec laquelle un test développé

dans un laboratoire pourra être appliqué dans d'autres structures tout en assurant une qualité égale des résultats. Cet aspect de la validation de nos protocoles devra être mis en œuvre.

iv. La robustesse

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

Nous avons ainsi modifié délibérément différents paramètres que sont :

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

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

Une modification de la **température d'incubation** a également été envisagée. Ainsi un même échantillon a été incubé à température ambiante (20°C), à 37°C et à 40°C. Aucune de ces expériences n'a montré de différence significative quand à la qualité et l'intensité du signal obtenu et dans tous les cas les tests ont été positifs quand à la liaison du composé testé, la vinblastine, à la cible moléculaire, la tubuline. Cependant, la fenêtre de température pour laquelle les protéines sont sous leurs formes natives est relativement étroite et si leur dénaturation thermique se produit à 90°C, une altération de leurs structures est déjà constatée

à des températures moins élevées⁷⁶. Ainsi, si de petites variations de la température d'incubation n'ont pas d'influence sur la réponse obtenue, ce paramètre peut néanmoins entraver les résultats s'il varie de façon importante.

Les **concentrations des différentes molécules** mises en jeu lors de ce test ont aussi leur importance. En effet, il faut toujours s'assurer d'être en conditions d'excès de molécules à tester par rapport à la cible. Ces conditions sont dites « récepteur limitant » et permettent, dans le cadre d'une campagne de criblage pour découvrir de nouveaux médicaments de ne considérer comme « touches » que les molécules ayant une affinité assez élevée pour la cible⁷⁷. Une fois ces conditions assurées, il a été montré que le test fonctionne bien pour des concentrations en cibles moléculaires allant de 6.10^{-8} M à 2.10^{-5} M. Plus la cible est concentrée et plus la sensibilité de la détection sera élevée, mais sa gamme de concentration est surtout conditionnée par sa disponibilité et son coût. De même pour les molécules à tester, la gamme de concentration compatible avec le test est large est seulement limitée par la concentration de la cible en limite basse et par la solubilité du composé à tester dans l'eau ultrapure en limite haute. En effet, il ne faut pas que le composé à tester précipite durant l'étape de filtration car il restera alors fixé sur la membrane et pourra induire un faux positif. Cependant, la présence des lavages successifs permet de limiter cet effet. La gamme de concentration optimale pour les molécules à évaluer lors de nos tests va donc de 1.10^{-6} M à 5.10^{-5} M.

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

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

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

obtenus lors de l'analyse directe, aucune modification du caractère positif ou négatif de la réponse obtenue n'a été observée. De ce point de vue, le volume d'eau ultrapure utilisé pour l'élution n'est pas critique, mais il convient de le conserver constant pour les différents échantillons (à 25 ou 50 μL selon la concentration en cible moléculaire de la solution initiale) si une comparaison entre différents échantillons est souhaitée. De plus, travailler avec des volumes plus faibles d'élution limite à la fois le nombre de dépôts et les traitements d'échantillon pouvant être menées à partir de cette solution.

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

v. Evaluation des paramètres de qualité

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

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

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

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

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

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

Pour le méthotrexate (1.10^{-5} M) incubé avec la DHFR (6.10^{-8} M), l'intensité moyenne du signal obtenu lors de l'analyse directe en MALDI-TOFMS avec le 2,5-DHB est de 18737 ± 3408 , alors que le bruit moyen lors de ces analyses est de 30 ± 20 . Le facteur Z' correspondant est de :

$$Z'_{\text{méthotrexate 2,5-DHB}} = 0,45$$

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

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

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

Il est ainsi tout à fait envisageable d'étudier simultanément jusqu'à 5 molécules par échantillon, et il est possible de passer plusieurs échantillons en même temps dans la centrifugeuse. Cela peut ainsi permettre un débit intéressant de molécules dont on teste l'activité comme par exemple dans notre cas de **60 échantillons en 1h50 à 3h30**, plus le temps, très court, de l'analyse qui peut dès lors être automatisée.

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

3. Protocole de criblage secondaire

Les deux traitements d'échantillons que nous allons présenter ont été développés à l'origine pour permettre de libérer les molécules liées aux cibles moléculaires de manière à augmenter la sensibilité des tests. Dans un premier temps nous présenterons les résultats obtenus pour le test impliquant la tubuline puis pour celui mettant en jeu la DHFR. Comme nous l'avons présenté précédemment, le but d'un criblage secondaire est de caractériser plus finement la liaison de composés à leurs cibles moléculaires, notamment en quantifiant leur affinité. Cette détermination nécessite généralement de faire appel à des gammes de concentrations ou des séries de dilutions, testées sur d'autres protocoles et impliquant d'autres modes d'échantillonnage. Nous allons présenter en quoi notre approche est différente.

a. Criblage secondaire des composés liés à la Tubuline

Comme nous l'avons présenté précédemment, le protocole que nous avons développé peut inclure une étape de traitement de l'échantillon (ou éluat) obtenu par incubation, filtration, lavages et élution des solutions à tester. Cette étape est cette fois préalable à leur analyse par MALDI-TOFMS. Deux modes de traitement d'échantillon ont été développés à l'origine pour augmenter la sensibilité de nos tests. Ainsi nous allons d'abord décrire la libération des composés liés par digestion de la cible moléculaire, puis nous présenterons la libération des composés liés par dénaturation.

Le **premier traitement d'échantillon** mis au point pour étudier la libération des composés liés à la tubuline a été la **digestion trypsique** de cette cible moléculaire. Cette

stratégie a été développée pour augmenter la sensibilité du test qui peut être évaluée par l'intensité et le rapport signal/bruit des signaux caractéristiques des composés liés à la tubuline.

Dans ce cas, une digestion complète de la protéine est envisagée. Ainsi 10 μL d'une solution de trypsine (200 $\text{ng}/\mu\text{L}$) ont été ajoutés à 10 μL de la solution éluée à partir du microconcentrateur après incubation, filtration et lavages (précédemment utilisée lors de l'analyse directe des composés liés). La solution ainsi obtenue a été incubée à 37°C pendant une heure. Après ce temps de réaction, les sites actifs de la tubuline, dans lesquels les composés viennent se lier, seront détruits^{78,79}. Ainsi les molécules qui y étaient préalablement liées seront libérées. Cette solution digérée a été ensuite analysée en MALDI-TOFMS. La solution obtenue étant diluée de moitié par rapport à la solution initiale, il a été décidé de procéder à des dépôts de 2 μL de manière à pouvoir comparer les résultats obtenus après digestion à ceux obtenus lors de l'analyse directe des mêmes solutions. Les dépôts sont faits à l'aide des matrices HCCA et 2,5-DHB. Cette démarche a été faite sur les trois solutions précédemment étudiées en analyse directe de la colchicine, de la vinblastine et de la vincristine (Figure 75).

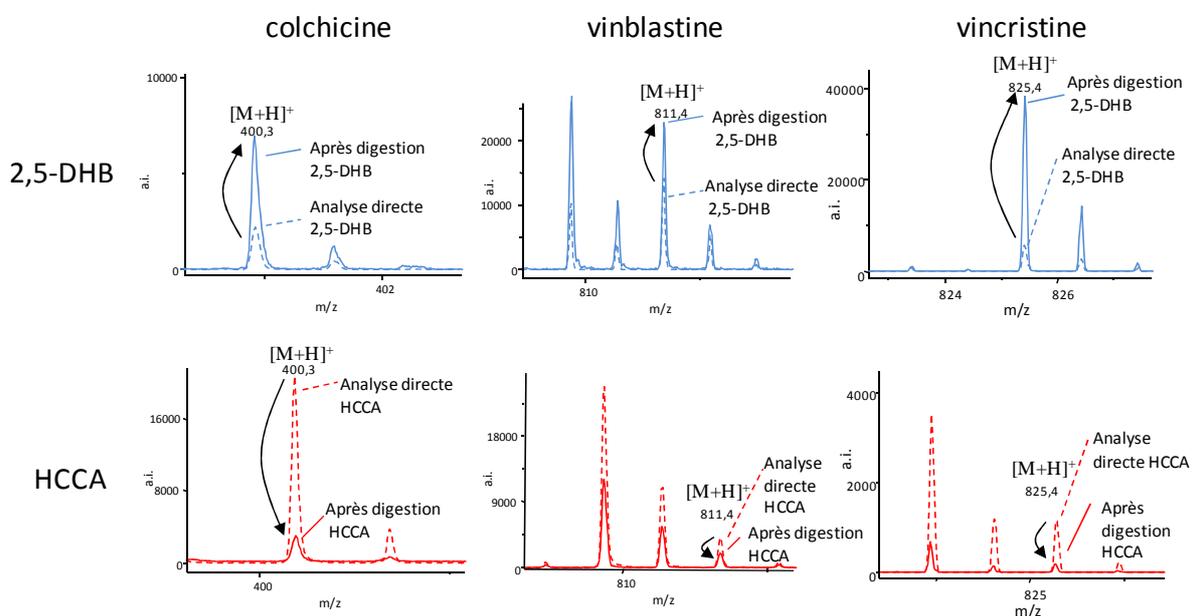


Figure 75 : Analyse MALDI-TOFMS (mode reflectron) de molécules liées à la tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M) (colchicine ($5 \cdot 10^{-5}$ M), vinblastine ($5 \cdot 10^{-5}$ M), vincristine ($5 \cdot 10^{-5}$ M)), avant et après digestion par une solution de trypsine (200 $\text{ng}/\mu\text{L}$) (dépôt de 2 μL de solution en mélange intime avec les matrices 2,5-DHB ou HCCA)

⁷⁸ (78) Okamoto, Y.; Sekine, T. *Journal of Biochemistry* **1978**, *38*, 1375.

⁷⁹ (79) May, J. M.; Qu, Z. C.; Beechem, J. M. *Biochemistry* **1997**, *32*, 9524.

Pour les trois molécules, les résultats sont comparables. Lors de l'analyse du milieu de digestion avec la matrice 2,5-DHB, le signal de la molécule liée est augmenté d'un facteur 2 pour la vinblastine, d'un facteur 3 pour la colchicine, jusqu'à un facteur 7 pour la vincristine par rapport à celui obtenu lors de l'analyse directe de ces mêmes composés. Ceci va dans le sens d'une libération des molécules fixées à la tubuline lors de la digestion de cette dernière.

Avec la matrice HCCA les signaux correspondants aux molécules d'intérêt sont moins importants après digestion. Il est possible alors d'émettre une hypothèse quand à une éventuelle compétition entre les molécules analysées et les fragments protéiques présents dans le milieu pour les protons des matrices. Les spectres obtenus lors de l'analyse globale des solutions digérées avec les deux matrices (2,5-DHB et HCCA) sont présentés ci-après en Figure 76.

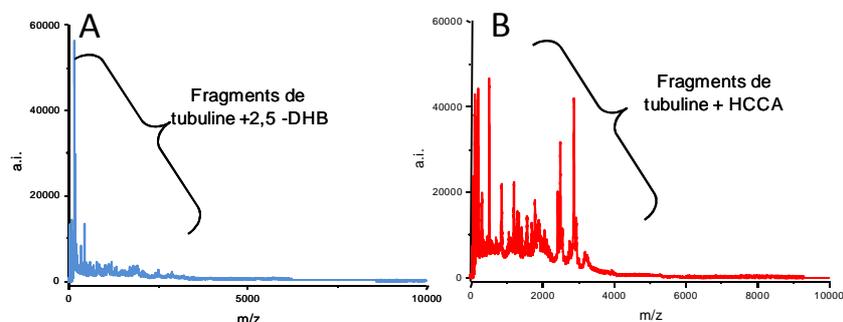


Figure 76 : Analyse MALDI-TOFMS de la tubuline après digestion trypsique (mode linéaire) (mode de dépôt en mélange intime, matrice 2,5-DHB (A) et HCCA (B))

Dans les deux cas, les spectres montrent la présence de pics correspondants aux fragments issus de la digestion de la tubuline (par comparaison à des dépôts ne contenant que les matrices). Cependant, les intensités des pics de fragments sont beaucoup plus importantes avec la matrice HCCA qu'avec la matrice 2,5-DHB. Il existe donc une très forte compétition à l'ionisation entre les fragments de tubuline et les molécules d'intérêt pour la capture des protons très labiles de l'HCCA, ce qui implique une diminution des signaux correspondants aux molécules d'intérêt. Ce phénomène, bien qu'également présent, est moins intense avec le 2,5-DHB.

La digestion de la tubuline par la trypsine permet donc de libérer les molécules y étant liées. Cette technique sera utile en criblage, lorsque les molécules à tester ne donneront pas de signaux satisfaisants en analyse directe, à la condition d'**utiliser la matrice 2,5-DHB.**

La **deuxième stratégie de traitement d'échantillon** que nous avons mise au point pour libérer les molécules liées à la tubuline est la **dénaturation** de cette cible par un solvant organique. Comme nous l'avons présenté précédemment, 10 μL des différentes solutions éluées à partir des membranes des microconcentrateurs ont été mélangés à 10 μL d'acétonitrile. Après un temps de contact de 10 minutes, la tubuline est dénaturée⁶⁷ et 2 μL des solutions obtenues sont déposés de manière à pouvoir être comparés aux signaux obtenus en analyse directe pour les mêmes solutions. Les spectres MALDI-TOFMS des solutions après dénaturation, pour les trois composés liés à la tubuline (colchicine, vinblastine et vincristine) sont présentés dans la Figure 77.

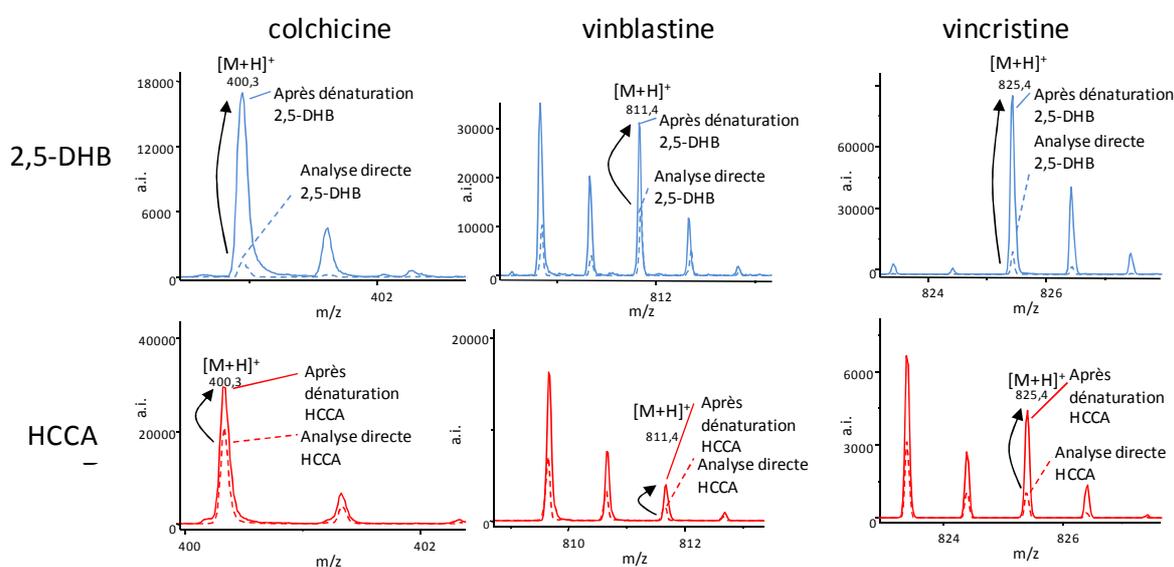


Figure 77 : Analyse MALDI-TOFMS (mode reflectron) de molécules liées à la tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M) (colchicine ($5 \cdot 10^{-5}$ M), vinblastine ($5 \cdot 10^{-5}$ M), vincristine ($5 \cdot 10^{-5}$ M)), avant et après dénaturation par de l'acétonitrile (v/v) (dépôt de 2 μL de solution en mélange intime avec les matrices 2,5-DHB ou HCCA)

En comparant les signaux avant et après dénaturation, il est possible de voir que les intensités des pics correspondants aux molécules liées à la tubuline augmentent (de 3 fois pour la vinblastine, 10 fois pour la colchicine et 12 fois pour la vincristine (dans le cas des dépôts utilisant le 2,5-DHB)). Ainsi, **la dénaturation permet de libérer les molécules liées sur leurs sites actifs**. Une fois de plus, et même si des signaux de très bonne qualité sont obtenus lors de l'analyse directe des solutions, il est possible par se traitement d'échantillons, d'augmenter de manière considérable la sensibilité des tests.

Par rapport à la digestion, la dénaturation présente l'avantage de donner des résultats probants (en termes d'augmentation de signal) avec les deux matrices utilisées et ne rajoute qu'une étape de 10 minutes par rapport au protocole d'analyse directe. Bien que les deux modes d'échantillonnage aient donné de bons résultats, nous avons choisi de **préférer la dénaturation**, plus rapide et plus aisée à mettre en œuvre et dont les résultats sont plus facilement exploitables.

Il est intéressant de noter que l'augmentation de l'intensité du signal des différents composés pour un traitement d'échantillon donné est différente d'un composé à l'autre. Il serait intéressant de pouvoir les comparer entre elles pour pouvoir **relier cette augmentation à une quantité de composé lié à la cible** par exemple.

Ainsi, si nous prenons le cas de l'augmentation des signaux des composés et que nous posons pour la quantifier un rapport noté R(X) pour un composé X tel que :

$$R(X) = \frac{A.I._{dénaturation}(X)}{A.I._{directe}(X)}$$

Où A.I._{dénaturation} (ou A.I._{digestion}) représente l'intensité absolue moyenne obtenue par MALDI-TOFMS pour un composé X après dénaturation (ou digestion) de l'éluat le contenant et A.I._{directe} représente l'intensité absolue moyenne obtenue par MALDI-TOFMS pour un composé X lors de l'analyse directe de ce même éluat (après incubation, filtration, lavages et élution).

En prenant la précaution de s'assurer que **les conditions laser et les solutions de matrices utilisées pour l'analyse de ces deux dépôts distincts sont les mêmes**, nous pouvons considérer que les intensités absolues moyennes obtenues pour un composé X peuvent s'écrire comme suit :

$$A.I.(X) = [X].K(X)$$

Où [X] est la concentration du composé X dans le dépôt et K(X) le coefficient de réponse du composé X dans les conditions MALDI utilisées (terme propre au composé X regroupant, entre autres, des paramètres tels que sa tenue au vide, son absorption UV propre, son affinité protonique par rapport à celle de la matrice utilisée...).

Ainsi nous obtenons :

$$A.I_{dénaturation}(X) = [X]_{total} \cdot R(X)$$

$$A.I_{directe}(X) = [X]_{libre} \cdot R(X)$$

où $[X]_{total}$ est la quantité totale de composé X liée à la cible et libérée après dénaturation complète de celle-ci. Or comme nous sommes en conditions de « cible limitante », la concentration maximale de composé X pouvant lier la cible est égale à la concentration de cible en solution (en considérant que les interactions sont spécifiques et donc que la cible n'offre qu'un seul site de liaison par molécule). D'autre par la concentration en cible de chaque échantillon est la même, ce qui nous donne $[X]_{total}=[cible]$, identique pour tous les échantillons. Ainsi, nous avons :

$$R(X) = \frac{[X]_{total}}{[X]_{libre}} = \frac{[cible]}{[X]_{libre}}$$

$[X]_{libre}$ est la quantité de composé X libre, analysée durant l'analyse directe. Cette quantité de composé X libre répond à l'équilibre suivant :



Et plus l'affinité du composé pour sa cible sera grande, plus $[X]_{libre}$ sera faible.

Ainsi, si Durant nos manipulations nous obtenons deux composés dont l'un (X) montre une augmentation plus importante après dénaturation qu'un autre (Y), nous obtenons :

$$R(X) > R(Y)$$

Ce qui peut alors s'écrire :

$$\frac{[cible]}{[X]_{libre}} > \frac{[cible]}{[Y]_{libre}}$$

Ou encore :

$$[X]_{\text{libre}} < [Y]_{\text{libre}}$$

Ce qui peut nous permettre de conclure que le composé X a une affinité plus forte pour la cible moléculaire que le composé Y. **Si le rapport R(X) d'un composé X est plus grand que celui R(Y) d'un composé Y, alors l'affinité de X doit être plus grande que celle de Y pour la même cible.**

Ainsi, par le calcul de **ratios propres à un composé et un traitement d'échantillon**, nous devons pouvoir obtenir une valeur représentative de l'affinité d'un composé pour sa cible moléculaire (en effet, le traitement d'échantillon joue un rôle dans la réponse obtenue en ceci que lorsque la digestion est utilisée, il peut y avoir des phénomènes de compétition à l'ionisation, rendant l'augmentation des intensités des composés moins importante).

Cette étude a été menée tout d'abord dans le cadre des composés liant la tubuline. Ainsi, 3 solutions différentes de chaque molécule (colchicine, vinblastine et vincristine), en présence de tubuline, ont été préparées comme décrit précédemment. Après incubation, filtration, lavages et élution, les solutions ont été analysées directement par MALDI-TOFMS et après digestion trypsique ou après dénaturation. Les 9 solutions ont été déposées trois fois chacune avec le 2,5-DHB comme matrice et 3 acquisitions différentes ont été faites sur chaque dépôt. A partir de ses informations, les valeurs moyennes des intensités obtenues ont été calculées et appelées $A.I._{\text{directe}}$, $A.I._{\text{digestion}}$ et $A.I._{\text{dénaturation}}$ pour l'analyse directe, la digestion et la dénaturation respectivement. Les données obtenues sont regroupées dans le **Tableau 5** ci-dessous.

échantillon 2,5-DHB	moyenne A.I.directe	moyenne A.I.dénaturation	R(X) dénaturation	incertitude maximale (GUM) dénaturation	R(X) dénaturation moyen	incertitude moyenne (GUM) dénaturation	incertitude expérimentale dénaturation
vinblastine 1	8690±2428	21725±4186	2.50	1.23	1.96	0.92	0.48
vinblastine 2	9904±5304	15517±5260	1.57	0.99			
vinblastine 3	4128±1020	7465±1343	1.81	0.55			
colchicine 1	1764±523	10588±2705	6.00	6.11	4.54	3.11	1.26
colchicine 2	1387±582	5304±2131	3.82	2.22			
colchicine 3	967±193	3673±624	3.80	1.00			
vincristine 1	3351±1146	36870±3984	11.00	8.26	8.71	4.74	2.45
vincristine 2	1214±461	10911±2194	8.98	3.86			
vincristine 3	1679±369	10298±2677	6.13	2.09			
		moyenne A.I.digestion	R(X) digestion	incertitude maximale (GUM) digestion	R(X) digestion moyen	incertitude moyenne (GUM) digestion	incertitude expérimentale digestion
		15642±1673	1.80	0.90	1.16	0.66	0.59
		10485±6494	1.06	0.87			
		2574±592	0.62	0.21			
		5294±840	3.00	1.49	2.00	1.00	1.21
		3234±1182	2.33	1.30			
		635±152	0.66	0.20			
		18770±1146	5.60	3.31	2.64	1.50	2.60
		1917±925	1.58	0.97			
		1244±261	0.74	0.23			

Tableau 5 : Intensités moyennes MALDI-TOFMS avec la matrice 2,5-DHB (avant et après dénaturation ou digestion) et les rapports R(X) correspondants à la colchicine, la vinblastine et la vincristine. Les incertitudes sur les mesures sont calculées selon la méthode GUM et selon les écart-types expérimentaux.

Les incertitudes ($S_{R(X)}$) sur les mesures des R(X) ont été évaluées par la méthode présentée dans le Guide pour l'expression de l'incertitude sur les mesures (Guide to the expression of Uncertainty in Measurements (GUM)) selon l'équation⁸⁰:

$$s_{R(X)} = \sqrt{\frac{s^2_{A.I.dénaturation}}{A.I.dénaturation} + \frac{s^2_{A.I.directe}}{A.I.directe} - \frac{2cov(A.I.dénaturation, A.I.directe)}{(A.I.dénaturation \cdot A.I.directe)}}$$

Cette méthode permet d'atteindre une valeur maximale de l'incertitude sur les résultats (pondérée par chaque valeur de R(X)) et ne tient pas compte des répétitions, à l'inverse de l'incertitude expérimentale correspondant à un écart-type sur les trois différentes valeurs de R(X) obtenues pour un même composé.

Les valeurs de R(X) des différentes molécules sont également présentées en Figure 78 avec les valeurs d'incertitude GUM et expérimentales.

⁸⁰ (80) ISO Guide to the expression of uncertainty in measurements Geneva, 1993.

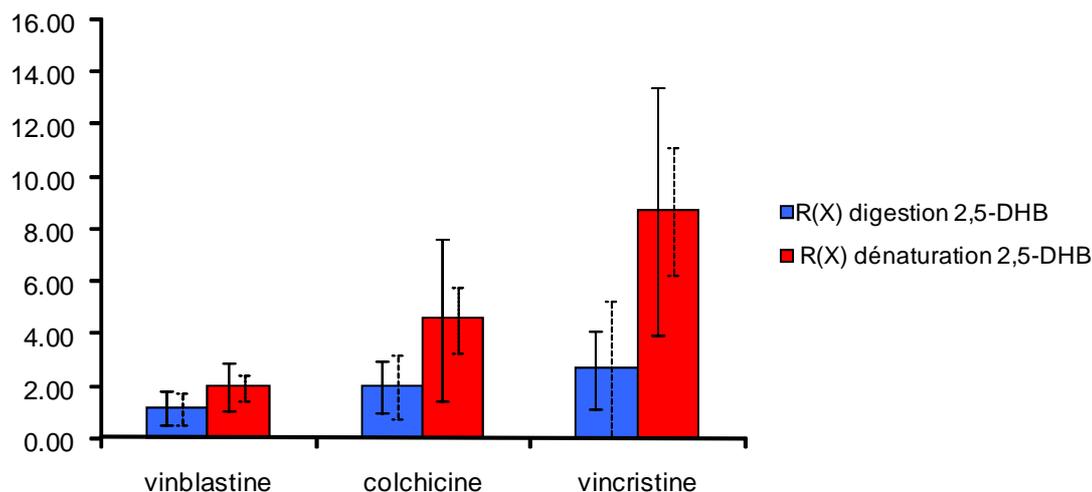


Figure 78 : R(X) moyens calculés pour la colchicine, la vinblastine et la vincristine suite à la digestion ou la dénaturation de la tubuline (incertitude évaluée par la méthode GUM en traits pleins ; incertitude expérimentale en traits hachurés)

Comme le montre cette figure, les valeurs des R(X) sont toujours plus intenses lorsque la dénaturation est utilisée par rapport à la digestion. Cela est dû dans le cas de la digestion, à la compétition à l'ionisation entre les fragments de tubuline et les molécules liées, qui entraîne une décroissance de l'intensité absolue observée pour les ions pseudomoléculaires de ces espèces. Ainsi nous préférons utiliser la dénaturation pour le calcul des R(X), mode d'échantillonnage qui est plus aisé à mettre en œuvre, plus rapide et pour lequel l'écart type sur la valeur moyenne des R(X) est plus faible comparé à celui obtenu lors de la digestion.

Ainsi, le classement en ordre croissant des $R(X)_{\text{dénaturation}}$ des différents composés est $R(\text{vinblastine}) = 1,96 \pm 0,92 < R(\text{colchicine}) = 4,54 \pm 3,11 < R(\text{vincristine}) = 8,71 \pm 4,74$. En prenant en compte les 3 répétitions, les valeurs d'incertitudes peuvent être divisées par deux et ramenées à $R(\text{vinblastine}) = 1,96 \pm 0,48 < R(\text{colchicine}) = 4,54 \pm 1,26 < R(\text{vincristine}) = 8,71 \pm 2,45$. Ces valeurs prenant en compte les incertitudes expérimentales plutôt que les valeurs maximales calculées par la méthode GUM sont bien meilleures et montrent l'intérêt de répéter les analyses par MALDI-TOFMS pour augmenter la précision des résultats.

Quoiqu'il en soit, les deux modes d'échantillonnage (digestion ou dénaturation) sont utilisables et permettent d'obtenir une classification de R(X) des composés tels que : $R(\text{vinblastine}) < R(\text{colchicine}) < R(\text{vincristine})$.

Cette classification est à rapprocher de la classification des affinités des composés pour la tubuline telle que : affinité (vinblastine) < affinité (colchicine) < affinité (vincristine)^{44,52,81,82}.

Il semblerait donc que **le calcul des ratios R(X) rend possible d'atteindre une valeur représentative de l'affinité d'une molécule pour sa cible moléculaire**. L'intérêt est d'obtenir des informations qui sont normalement obtenues lors d'un « criblage secondaire », mais sans nécessiter un nouvel échantillonnage ou une gamme de dilutions.

Ainsi, si les résultats obtenus lors de l'analyse directe sont de très bonne qualité et ne nécessitent pas l'utilisation d'un des traitements d'échantillons pour en augmenter l'intensité, les traitements d'échantillon que nous avons mis au point ont un autre intérêt qui est d'obtenir une valeur d'affinité relative des composés pour la cible.

b. Criblage secondaire des composés liés à la DHFR

La deuxième partie de ce travail va être dédiée à l'analyse des informations relatives à la valeur de l'affinité des composés liant la DHFR obtenues par l'usage de notre protocole de criblage par MALDI-TOFMS. Comme la dénaturation de la tubuline a donné de meilleurs résultats que sa digestion (en termes d'augmentation d'intensité des signaux des molécules liées et de calculs de R(X)) nous avons choisis de n'utiliser que ce traitement d'échantillon pour notre étude sur la DHFR.

Ainsi, un exemple de résultats obtenus avant et après la dénaturation de l'éluat (après incubation, filtration et lavages) dans le cas du méthotrexate (1.10^{-5} M) incubé avec de la DHFR (6.10^{-8} M) est présenté en Figure 79. La dénaturation de la DHFR a été réalisée en ajoutant (v/v) de l'acétonitrile à la solution éluée. Après 10 minutes de dénaturation 2 μ L de cette solution ont été déposés avec la matrice 2,5-DHB en vue de leur analyse en MALDI-TOFMS.

⁸¹ (81) Attard, G.; Greystoke, A.; Kaye, S.; Bono, J. D. *pathologie biologique* **2006**, 54, 72.

⁸² (82) Lobert, S.; Franfurter, A.; Correia, J. J. *cell motility and the cytoskeleton* **1998**, 39, 107.

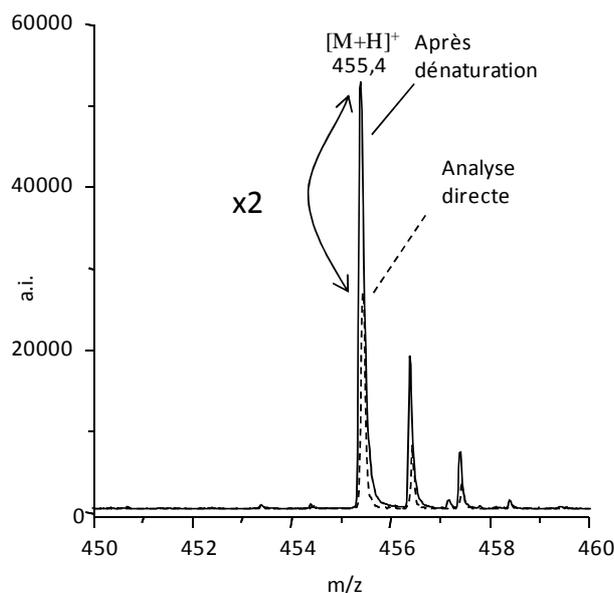


Figure 79 : Analyse MALDI-TOFMS (mode reflectron) du methotrexate (1.10^{-5} M) lié à la DHFR (6.10^{-8} M) avant et après dénaturation par de l'acétonitrile (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB)

L'intensité absolue du signal du méthotrexate est deux fois plus importante après la dénaturation par comparaison avec le signal obtenu lors de l'analyse directe du même éluat avec le 2,5-DHB comme matrice.

Le même type de résultats (augmentation des signaux correspondants aux pics pseudomoléculaires des molécules liées à la DHFR) est obtenu pour les quatre autres composés testés (aminoptérine, acide folique, acide folinique et pyriméthamine). 4 échantillons de chacune des 5 molécules ont été préparés comme précédemment et neuf acquisitions différentes par MALDI-TOFMS ont été faites pour chacun des échantillons pour l'analyse directe et pour l'analyse après dénaturation (soit un total de 360 spectres de masses). Les intensités absolues moyennes (A.I.) des pics des ions moléculaires $[M+H]^+$ ont été calculées et appelées $A.I._{directe}$ et $A.I._{dénaturation}$. Les ratios ont été calculés pour chaque molécule comme précédemment tels que $R(X) = \frac{A.I._{dénaturation}(X)}{A.I._{directe}(X)}$.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 6 ci-après.

échantillon 2,5-DHB	moyenne A.I.directe	moyenne A.I. dénaturation	R(X) dénaturation	incertitude maximale (GUM) dénaturation	R(X) dénaturation moyen	incertitude moyenne (GUM) dénaturation	incertitude expérimentale dénaturation
#1 folic acid	2349 ± 459	2299 ± 675	0.98	0.57	1.17	0.62	0.15
#2 folic acid	1267 ± 315	1529 ± 533	1.21	0.52			
#3 folic acid	478 ± 232	640 ± 179	1.34	0.75			
#4 folic acid	405 ± 192	462 ± 132	1.14	0.63			
#1 folinic acid	406 ± 59	507 ± 171	1.25	0.55	1.35	0.54	0.11
#2 folinic acid	388 ± 152	492 ± 132	1.27	0.60			
#3 folinic acid	478 ± 129	670 ± 235	1.40	0.62			
#4 folinic acid	518 ± 61	766 ± 183	1.48	0.39			
#1 pyrimethamine	6951 ± 2285	10648 ± 2897	1.53	0.95	1.59	0.67	0.12
#2 pyrimethamine	1696 ± 210	2568 ± 927	1.52	0.58			
#3 pyrimethamine	1955 ± 450	3043 ± 538	1.56	0.45			
#4 pyrimethamine	1711 ± 181	3024 ± 1127	1.77	0.68			
#1 methotrexate	27938 ± 10610	51377 ± 10239	1.84	1.18	1.86	0.68	0.16
#2 methotrexate	6327 ± 206	10614 ± 2436	1.68	0.39			
#3 methotrexate	8991 ± 501	16787 ± 2030	1.87	0.25			
#4 methotrexate	3853 ± 493	7927 ± 3342	2.06	0.91			
#1 aminopterin	16675 ± 6656	54442 ± 6638	3.26	1.73	3.35	1.55	0.43
#2 aminopterin	6846 ± 3039	24068 ± 4892	3.52	1.72			
#3 aminopterin	8272 ± 780	31499 ± 12654	3.81	1.57			
#4 aminopterin	8155 ± 1940	22843 ± 8087	2.80	1.19			

Tableau 6 : Intensités moyennes MALDI-TOFMS avec la matrice 2,5-DHB (avant et après dénaturation) et les rapports R(X) correspondants à l'acide folique, l'acide folinique, la pyriméthamine, le méthotrexate et l'aminoptérine. Les incertitudes sur les mesures sont calculées selon la méthode GUM et selon les écarts-types expérimentaux.

Les ratios moyens obtenus pour les 5 molécules liant la DHFR sont présentés également en **Figure 80**.

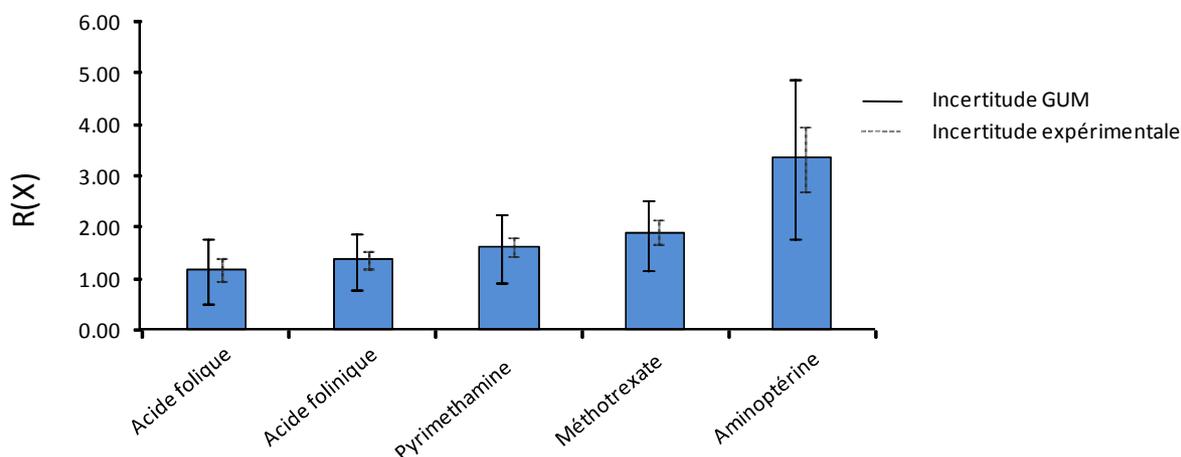


Figure 80 : R(X) moyens calculés à partir des informations obtenues par MALDI-TOFMS avec le 2,5-DHB comme matrice (avant et après dénaturation) pour l'acide folique, l'acide folinique, la pyriméthamine, le méthotrexate et l'aminoptérine

En comparant ces valeurs, il peut être vu que les ratios obtenus sont différents pour les 5 molécules testées. Le classement en ordre croissant de ces R(X) obtenus pour la dénaturation de la cible par l'acétonitrile est : $R(\text{acide folique}) = 1.17 \pm 0,62 < R(\text{acide folinique}) = 1.35 \pm 0,54 < R(\text{pyriméthamine}) = 1.59 \pm 0,67 < R(\text{méthotrexate}) = 1.86 \pm 0,68 <$

$R(\text{aminoptérine}) = 3.35 \pm 1.55$. Là encore, en prenant en considération les répétitions nous pouvons améliorer les valeurs d'incertitude et nous obtenons des valeurs trois fois plus précises telles que $R(\text{acide folique}) = 1,17 \pm 0,15 < R(\text{acide folinique}) = 1,35 \pm 0,11 < R(\text{pyriméthamine}) = 1,59 \pm 0,12 < R(\text{méthotrexate}) = 1,86 \pm 0,16 < R(\text{aminoptérine}) = 3,35 \pm 0,43$.

Les valeurs de K_i (la concentration d'une molécule donnée qui inhibe 50% de l'activité de l'enzyme) de ces différentes molécules sont de 830 nM, 320 nM, 38 nM, 2.3 nM et 1 nM respectivement pour l'acide folique, l'acide folinique, la pyriméthamine, le méthotrexate et l'aminoptérine³⁴. L'affinité d'un composé pour sa cible pouvant être estimée comme l'inverse de sa valeur de K_i , le classement en ordre croissant de l'affinité des composés testés pour la DHFR est : affinité (acide folique) < affinité (acide folinique) < affinité (pyriméthamine) < affinité (méthotrexate) < affinité (aminoptérine).

En comparant les deux classements, il peut être vu que celui obtenu expérimentalement à partir des $R(X)$ calculés par MALDI-TOFMS est identique à celui théorique, obtenu à partir des valeurs de K_i . Cette étude a été menée à bien plusieurs fois de manière à obtenir une bonne représentativité des résultats et cela prouve que **notre protocole de criblage de la liaison de composés à la DHFR impliquant une détection par MALDI-TOFMS permet d'obtenir des informations relatives à l'affinité des composés testés**.

De plus, cette étude a été accomplie pour du méthotrexate incubé avec la DHFR et analysé par MALDI-TOFMS avec différentes matrices (2,5-DHB, SA et HCCA) et pour différents modes de détection (positif et négatif), avant et après dénaturation. Les ratios obtenus sont présentés dans le tableau.

expérience	R(X) moyen
methotrexate, 2,5-DHB, mode positif	1.84±0.14
methotrexate, HCCA, mode positif	1.77±0.30
methotrexate, SA, mode positif	1.87±0.21
methotrexate, SA, mode négatif	1.90±0.22
R(X) moyen = 1.85±0.2	

Tableau 7 : R(X) moyen obtenu pour le méthotrexate incubé avec la DHFR, analysé avec différentes matrices (2,5-DHB, SA et HCCA) et différents modes de détection (positif et négatif)

Comme le montre le tableau, le ratio obtenu pour le méthotrexate n'est pas fortement modifié par le changement de matrice MALDI ou le changement du mode de détection. Ceci prouve bien que le fait de calculer ce $R(X)$, propre à chaque molécule, permet de s'affranchir des paramètres propres à leur ionisation. **Le seul point crucial lors du calcul des ratios $R(X)$ est d'utiliser la même solution de matrice, le même mode de détection et la même énergie laser pour l'analyse des molécules avant et après traitement des éluats (digestion ou dénaturation).**

Ainsi, par le calcul de ratios de différents composés d'affinités connues, il est possible d'obtenir des valeurs de référence indépendantes de la matrice et du mode de détection utilisés lors des analyses par MALDI-TOFMS.

Comme nous l'avons vu précédemment, il est cependant nécessaire de répéter plusieurs fois les analyses pour obtenir des résultats significatifs et réduire de manière importante l'écart type sur les mesures. Quoiqu'il en soit, dans tous les cas les ratios obtenus nous ont permis de faire la différence entre les composés de faible à moyenne affinité (acide folique, acide folinique et pyriméthamine) et ceux de haute affinité (méthotrexate et aminoptérine). Obtenir cette information sans qu'il soit nécessaire de refaire une ou plusieurs étapes d'échantillonnage représente un avantage substantiel de notre protocole par rapport à l'approche classique de criblage qui consiste à faire subir aux molécules à étudier un premier test et à reprendre celles qui ont montré une activité pour leur faire subir une autre série d'analyses pour en déterminer l'affinité (nécessitant généralement la mise en œuvre de plusieurs gammes de dilution).

CONCLUSION

Ainsi, nous avons vu comment nous avons optimisé la détection par MALDI-TOFMS de nos composés d'intérêt utilisés au cours de ces études (tant les cibles moléculaires, tubuline et DHFR, que leurs ligands respectifs colchicine, vinblastine et vincristine d'une part et acide folique, acide folinique, aminoptérine, méthotrexate et pyriméthamine d'autre part). Nous avons ensuite présenté et validé les résultats qui peuvent être obtenus par l'application de notre stratégie dans le cadre du criblage primaire de la liaison de composés à une cible moléculaire. **Les tests que nous avons mis au point ont ainsi prouvé pouvoir faire aisément la différence entre un composé se liant à une cible et un composé ne s'y liant**

pas et ce avec une spécificité, une précision une reproductibilité et une robustesse intéressantes. La qualité globale de nos tests a été évaluée par le calcul du facteur Z (chapitre I) et ainsi nos tests peuvent être considérés comme intéressants dans le cadre de la mise en place d'une campagne de criblage primaire. Enfin, nous avons présenté les résultats qui peuvent être acquis par l'application de nos stratégies, à partir des échantillons obtenus précédemment, dans le cadre du criblage secondaire des composés actifs. Cette étape, par la libération des composés liés sur les cibles moléculaires (par leur digestion ou leur dénaturation), permet de **calculer des ratios R(X) représentatifs de l'affinité relative des composés pour une cible et indépendants de la matrice ou du mode de détection.**

Ainsi, nos deux protocoles de criblages s'articulent parfaitement ensemble et permettent de mettre en place une stratégie globale de criblage avec une étape de criblage primaire suivie d'une étape de criblage secondaire. L'organisation générale de nos étapes de criblage (primaire et secondaire) est présentée en Figure 81.

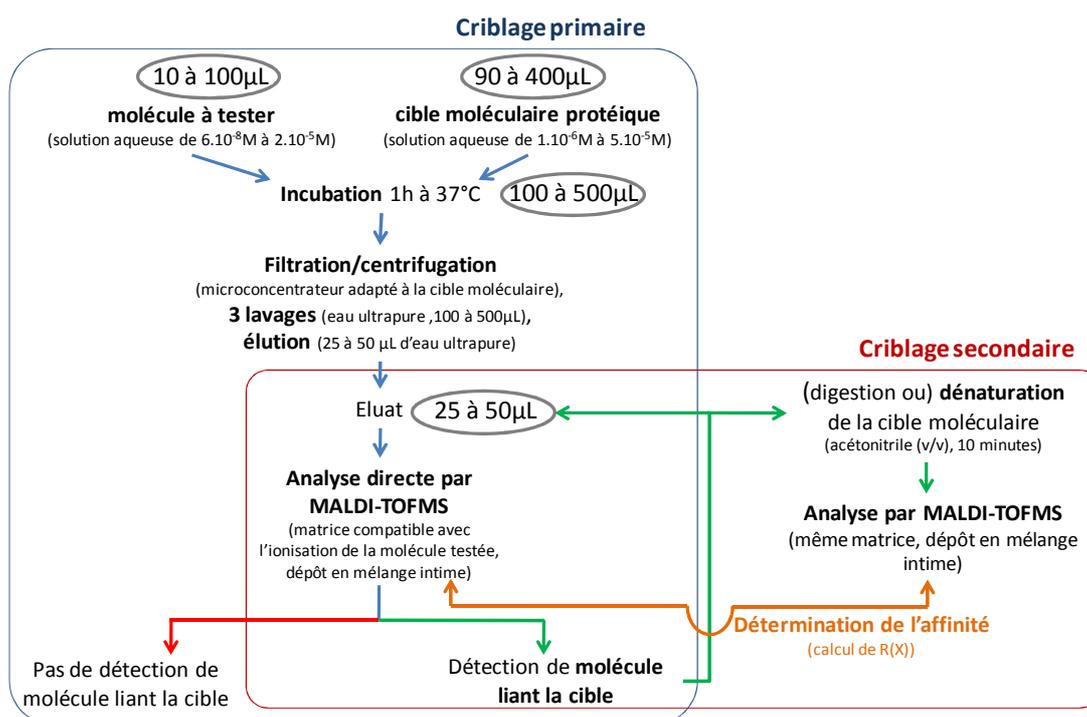


Figure 81 : Organisation générale de nos stratégies de criblage primaire et secondaire, impliquant une seule étape d'échantillonnage

Lorsqu'une touche est obtenue lors de l'analyse directe (détectée par MALDI-TOFMS après incubation, filtration, lavages et éluat), il est également possible de déterminer son affinité relative pour la cible moléculaire utilisée, en dénaturant cette dernière et en comparant le ratio R(X) obtenu à ceux obtenus pour des molécules étalon.

Ainsi, en appliquant notre protocole de criblage de la liaison de composés à des cibles moléculaires il est possible d'**obtenir aussi bien des informations qualitatives** (oui ou non une molécule se lie à la cible) **que quantitatives** (si une molécule se lie, quelle est la force de cette liaison).

En effet, s'il est très intéressant d'obtenir des informations sur la capacité de liaison d'un composé à une cible moléculaire, il est encore mieux d'en évaluer l'affinité en un seul test. Comme présenté précédemment, le protocole que nous avons développé présente la possibilité d'utiliser différents traitements d'échantillons. Après incubation, filtration, lavages et élution, la solution obtenue peut être analysée directement par MALDI-TOFMS ou digérée par une solution de trypsine ou encore dénaturée par de l'acétonitrile avant une analyse par MALDI-TOFMS. Il a été également démontré que par la digestion ou la dénaturation de la cible moléculaire, il est possible d'obtenir des signaux plus intenses des molécules liées à sa surface. Ces deux traitements d'échantillon permettent de libérer les molécules de leurs sites de liaison en détruisant la structure de la protéine cible moléculaire. Quoiqu'il en soit, la dénaturation a montré être plus rapide et donner de meilleurs résultats que la digestion.

Chapitre 4 : Application des tests au criblage d'extraits de plantes

INTRODUCTION

Dans ce dernier chapitre, nous allons nous intéresser aux résultats que nous avons obtenus dans le cadre de l'application de nos protocoles de criblage. Comme nous l'avons vu précédemment, les plantes sont, encore aujourd'hui, une des principales sources de molécules actives pouvant agir sur des pathologies intéressant l'homme. En effet, près de 60% des médicaments utilisés aujourd'hui ont pour origine directe ou indirecte une molécule naturelle et plus de la moitié de celles-ci sont extraites, ou ont été extraites, des plantes⁸³. Nous nous sommes proposé d'utiliser les plantes comme source de molécules nouvelles pouvant être soumises aux criblages. Ainsi, nous allons dans un premier temps nous intéresser au criblage de la liaison de composés à la tubuline en vue d'une potentielle activité anticancéreuse. Pour ce faire, nous avons fait porter nos expériences sur deux plantes, le Colchique et la Pervenche de Madagascar, dont sont déjà extraits de puissantes molécules anticancéreuses. Dans un deuxième temps nous avons envisagé le criblage de la liaison de composés naturels à la DHFR, là encore en vue d'une éventuelle activité anticancéreuse et nos recherches de composés antimétabolites naturels ont alors porté sur le thé vert.

1. Criblage de la liaison de composés naturels à la tubuline

Dans un premier temps nous allons présenter les résultats que nous avons obtenus dans le cadre du criblage d'extraits de plantes à la recherche de molécules montrant une capacité de liaison à la tubuline. Nous avons dans ce cadre étudié deux plantes, le Colchique d'automne et la Pervenche de Madagascar, dont sont déjà extraites des molécules actives par leur liaison à la tubuline. Le but ici est tout d'abord de valider le fait que nos protocoles sont utilisables pour le criblage d'extraits de plantes bruts, non fractionnés, puis de cribler ces extraits à la recherche de molécules actives minoritaires.

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

a. Criblage d'extraits de Colchique

Nous allons tout d'abord nous intéresser au criblage des extraits de colchique d'automne. Nous donnerons une description botanique de cette plante et de ses utilisations traditionnelles et médicinales. Nous décrirons ensuite le matériel végétal utilisé au cours de nos travaux et nous présenterons les molécules référencées contenues dans les extraits de cette plante. Nous présenterons la caractérisation par spectrométrie de masse que nous avons menée à bien sur les extraits que nous avons préparés. Enfin nous détaillerons les résultats que nous avons obtenus dans le cadre du criblage primaire des extraits de colchique par rapport à la liaison éventuelle de certains de leurs composés à la tubuline.

i. Description botanique du Colchique

Le nom latin du Colchique d'automne est *Colchicum autumnale* L. de la famille des Liliacées. Les autres noms populaires de cette plante sont : safran bâtard, safran des prés, tue-chien, mort-chien, chenarde, ail des prés, oignon de loup, tue-loup, femme nue, dame nue, dame sans chemise, veilleuse, veillote^{84,85}.

Cette plante est toxique du fait des alcaloïdes qu'elle contient. Certains de ces alcaloïdes, présents majoritairement dans les graines, sont utilisés comme médicaments. Par exemple la colchicine est traditionnellement utilisée dans le traitement des crises de goutte et le colchicoside (après transformation en thiocolchicoside) a des propriétés myorelaxantes^{86,87}. Un troisième alcaloïde important, le 3-demethylcochicine, n'a pas encore été exploité par l'industrie pharmaceutique⁸⁸. La concentration de ces différents alcaloïdes est de l'ordre de 0,7% en poids de matière sèche. Ces molécules sont des métabolites secondaires dont le rôle dans la plante n'est pas encore totalement élucidé mais qui doivent lui permettre de se protéger des prédateurs et des parasites⁸⁹.

⁸⁴ (84) Boullard, B. *Plantes médicinales du monde réalités & croyances*, 2001; pp 636 pages

⁸⁵ (85) Bernard, B. *l'herbier oublié, secrets de plantes retrouvés*, éditions plumes de carottes ed., 2003.

⁸⁶ (86) Bellet, P.; Delaveau, P.; Delourme-Houdé, J.; Fourneau, J. P.; Gagnault, J. C.; Gorget, C.; Gueunier, C.; Potier, P. *pérennité des alcaloïdes* **1985**, 119.

⁸⁷ (87) Bruneton, J. *pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, Lavoisier ed. Paris, 1995.

⁸⁸ (88) Gagnault, J. C. *l'actualité chimique* **1981**, 9, 13.

⁸⁹ (89) Robinson, T. *Alkaloids - The organic constituents of higher plants*; Cordus press: Amherst, 1991.

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

Le colchique d'automne est présenté en Figure 82.



Figure 82 : représentation schématique et photographie du Colchique d'automne ; (a) coupe transversale du fruit ; (b) fruit ; (c) graine ; (d) bulbe (cormus) ; (e) plante entière (feuilles et jeune fruit ou fleur) ; (f) fleur ; (g) style ; (h) étamine ; (i) coupe transversale du bulbe (cormus) et de l'embryon⁹⁰

Le Colchique est une plante herbacée vivace de 10 à 40 cm de haut, glabre, donnant ses jolies fleurs en automne, ses feuilles et ses fruits au printemps de l'année suivante⁹¹.

Les feuilles sont dressées, larges et lancéolées, longues (15-35 cm de long sur 2 à 7 cm de large), groupés par 4 ou plus autour du fruit (Figure 82e). Elles apparaissent au printemps et fanent bien avant l'apparition des fleurs à l'automne suivant⁹². Les feuilles de colchique sont parfaitement inodores ce qui permet le différencier de l'ail ou des poireaux sauvages⁹³.

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

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

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

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

Les fleurs (Figure 82f), rose lilas ou violet à blanc, poussent en groupe de 1 à 6 à partir d'un bulbe souterrain (cormus). Les fleurs sont grandes, à divisions oblongues, chaque pétale faisant de 3 à 4,5 cm, fusionnant en un tube allongé, rose lilas-blanc de 5 à 20 cm de haut. Chaque fleur contient 6 étamines de forme ovale (Figure 82h), 3 longues et 3 courtes et le pistil de 3 styles à stigmates fortement courbés en crochet dépassant longuement les étamines (Figure 82g). La floraison a lieu d'août à octobre⁹². Après fécondation, l'embryon reste en l'état au niveau du bulbe (Figure 82i). La fleur se flétrit et l'ovaire et le tubercule passent l'hiver sous terre. Au printemps suivant, les feuilles nouvelles se développent et emportent le jeune fruit.

Les fruits sont des capsules à 3 loges, oblongues à ovoïdes de la taille d'une noix, d'abord vertes, puis brunes (Figure 82a et b). Ils apparaissent avec les feuilles en avril-juin de l'année suivant la floraison. Chaque capsule contient entre 60 et 200 graines noires et irrégulières (Figure 82c) qui sont dispersées en juin-juillet par la déhiscence des 4 valves du fruit⁹².

La partie souterraine du colchique d'automne est un bulbe solide et vertical (ou cormus) de 2,5 à 6 cm de haut et 2 à 4 cm de large, entouré de tuniques minces et brunâtres (Figure 82d). Il est enterré très profondément (de 15 à 20 cm)⁹².

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

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

Toutes les parties du colchique d'automne sont violemment toxiques. L'ingestion de la plante produit des troubles généralement très graves et fréquemment mortels. Le bétail est souvent intoxiqué et une quantité de feuilles égale à 0,1% du poids de l'animal suffit à le tuer (soit 70 g de feuilles pour un homme de 70 kg). Chez l'homme l'intoxication donne des symptômes digestifs (hyper salivation, soif intense, coliques violentes, diarrhée, vomissements, constriction laryngopharyngée), cardiaques (hypotension), nerveux (paralysie) et respiratoires avec cyanose qui peuvent entraîner une mort par anoxie le lendemain ou le surlendemain, voir même 10 jours après l'intoxication^{94,95}.

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

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

Il n'y a pas d'antidote de la colchicine commercialisé jusqu'à présent mais un anticorps anticolchicine a donné de bons résultats au cours des intoxications⁹⁵.

ii. Utilisations traditionnelles et médicales du Colchique

Le nom de colchique vient du pays de Colchide, région célèbre pour ses plantes vénéneuses, aujourd'hui située en Géorgie. La célèbre Médée, fille du roi de Colchide prépara des filtres à base de Colchique pour aider Jason à conquérir la toison d'or⁸⁵.

Le bulbe de colchique était porté autrefois en amulette autour du cou pour éloigner les microbes et les virus. En Belgique, une racine portée autour du cou chassait les « sueurs nocturnes », une feuille de colchique placée dans une chaussure servait à soigner les cors au pied⁸⁵.

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

D'autres voies de traitements médicaux par la colchicine sont en développement. Ainsi, le premier essai au monde de traitement de la mucoviscidose à l'aide de la colchicine a été lancé en France par l'équipe du Professeur Gérard Lenoir (hôpital Necker-Enfants malades, Paris). En effet, des patients cancéreux ayant une mucoviscidose et traités dans le cadre de leur chimiothérapie par la colchicine ont vu leur capacité respiratoire s'améliorer de manière persistante. L'essai clinique a concerné 85 enfants de plus de 5 ans atteints de formes moyenne ou modérée de la maladie. Contrôlé contre placebo, il était destiné à évaluer l'efficacité clinique de la posologie de 1 mg de colchicine⁹⁶.

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

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

inhibition de la migration intracellulaire notamment des granules d'histamine (mis en jeu dans la réaction inflammatoire).

Ainsi, la colchicine est efficace dans le traitement de la goutte par le biais de son activité antitubuline et des essais ont été menés à bien pour en permettre son utilisation dans le cadre de la thérapie des cancers^{97,98}. Cependant, la colchicine n'a pas un large spectre d'action antitumorale contrairement aux alcaloïdes extraits de la pervenche. Son usage chez l'homme n'est approuvé par la FDA (Food And Drug Administration) que dans le cadre du traitement de la goutte. Elle est néanmoins utilisée comme agent anticancéreux en recherche sur des cultures cellulaires et en usage vétérinaire.

iii. Composition des extraits de Colchique

Les extraits de colchique d'automne contiennent notamment différentes molécules appartenant à la classe des alcaloïdes tricycliques. Ce sont ces molécules qui vont nous intéresser plus avant dans ce travail car c'est dans cette famille que se retrouve la colchicine, molécule antimototique se liant à la tubuline. Une trentaine de molécules de ce type ont été isolées mais seulement 2 ont été plus particulièrement étudiées : le **colchicoside** et surtout la **colchicine**^{87,99,100,101,102,103,104}. Les graines peuvent ainsi contenir jusqu'à 1,06% de colchicine. Les autres alcaloïdes mineurs sont l'**androcymbine**, l'**autumnaline**, la **colchicilline**, la **colchifoline**, la **cornigerine**, la **démecolcine**, la **colchiceine** et la **N-deacetyl-N-formylcolchicine** ainsi que leurs dérivés déméthylés : **2-déméthyl-démecolcine**, **3-déméthyl-démecolcine**, **2-déméthylcolchicine**, **3-déméthylcolchicine** ou acétylés : **O-acétylcolchicine**, **N-acétyl-démecolcine**, **2-acétyl-2-déméthyl-démecolcine** et **3-acétyl-3-déméthyl-démecolcine**. Ces molécules sont présentées dans la Figure 83 et le Tableau 8 ci-après.

-
- ⁹⁷ (97) Seliger, H. *Ther Umsch* **1958**, *15*, 158.
⁹⁸ (98) Dustin, P. *Rev Med Brux* **1989**, *10*, 385.
⁹⁹ (99) Ondra, P.; Vfilka, I.; ViCar, J.; Sfitltipinar, N.; gimfinek, V. *Journal of Chromatography A* **1995**, *704*, 351.
¹⁰⁰ (100) Ellington, E.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. *phytochem. Anal.* **2003**, *14*, 164.
¹⁰¹ (101) Santavy; Reichstein. *Helv. Chim. Acta.* **1950**, *33*, 1606.
¹⁰² (102) Potessilova. *Collect. Czech Chem Commun* **1967**, *32*, 141.
¹⁰³ (103) Gaillard, Y.; Pepin, G. *Journal of Chromatography B* **1999**, *733*, 181–229.
¹⁰⁴ (104) Yoshida, K.; Hayashi, T.; Sano, K. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 593.

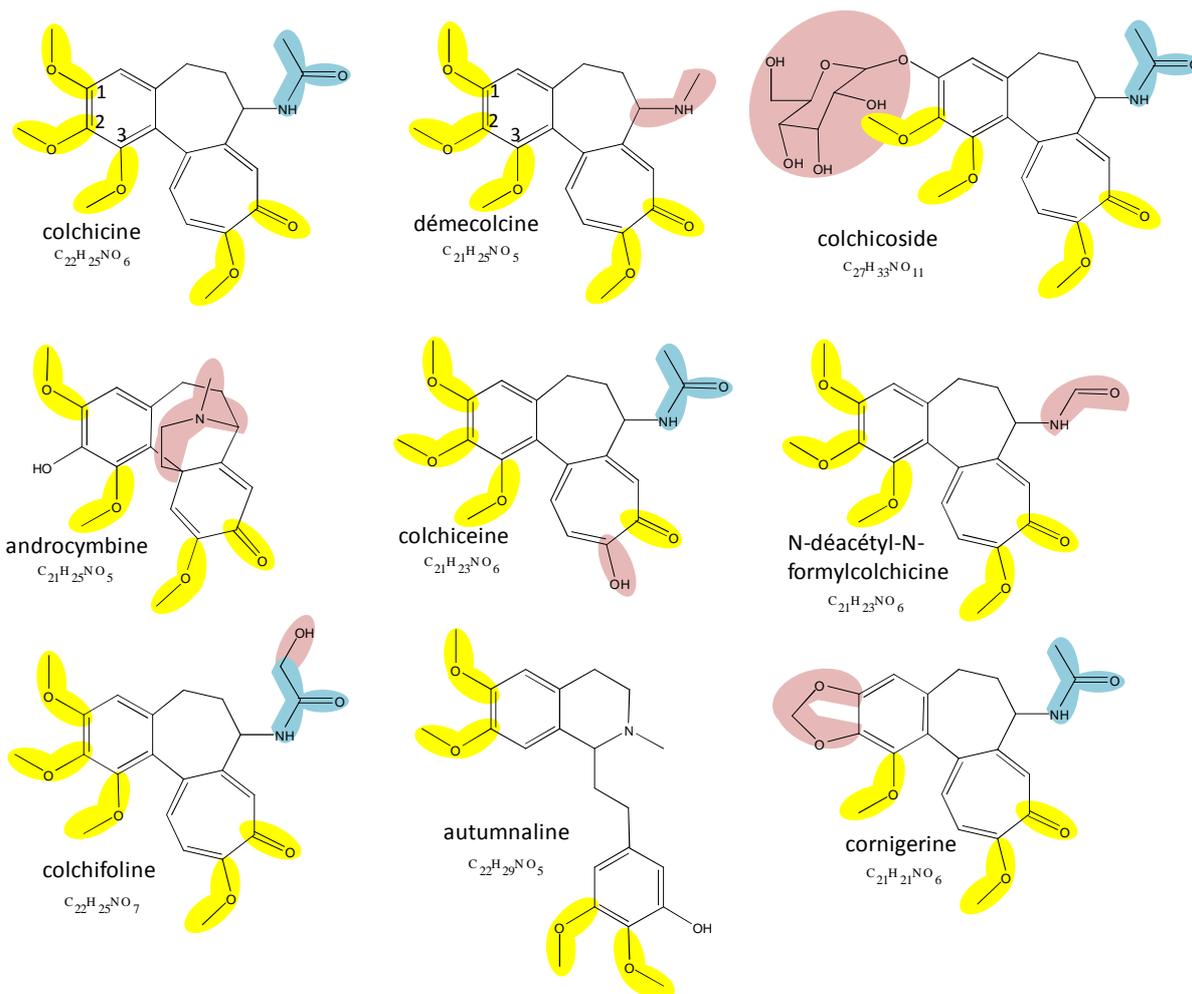


Figure 83 : structures des différents alcaloïdes du colchique d'automne

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

 Tableau 8 : formules brutes, masses molaires et ions pseudomoléculaires [M+H]⁺ théoriques des principaux alcaloïdes du Colchique d'automne

La présence de ces différents alcaloïdes dans les extraits de Colchique d'automne est dépendante de la phase du cycle au cours de laquelle a lieu la récolte. Ainsi, un des changements notables concerne la teneur du matériel végétal frais en colchicine et démecolcine au cours du cycle¹⁰⁵. Un autre point important à mettre en avant est que ces différentes molécules, présentes dans la plante fraîche, peuvent être relativement altérées lors des processus de séchage, de broyage et de stockage. C'est notamment le cas de la colchicine, de la N-déacétyl-N-formylcolchicine et de la démecolcine qui peuvent subir des dégradations enzymatiques telles que des O-déméthylations, provoquant une baisse significative de leurs teneurs lors du vieillissement¹⁰⁶. Ces différents éléments font qu'une grande variabilité de la composition des extraits obtenus à partir de matériel végétal sec et broyé peut être observée.

Enfin, parmi ces différentes molécules, certaines, outre la **colchicine**, ont montré une affinité pour la tubuline : c'est le cas de la **démecolcine**¹⁰⁷ et de la **cornigérine**¹⁰⁸ (majoritairement extraite de *Colchicum cornigerum*) qui se lient toutes deux au même site de liaison que la colchicine sur la tubuline. Leur interaction avec cette protéine est cependant très lente (plus d'une heure) bien que leurs affinités pour cette cible soient du même ordre que celle de la colchicine. Une autre molécule, la **colchicine**, se lie quand à elle au dimère de tubuline¹⁰⁹. Ces trois alcaloïdes sont cependant très minoritaires dans les extraits de colchique d'automne du fait d'une très faible teneur dans cette plante.

iv. Matériel végétal et préparation d'extraits de Colchique

Le matériel végétal que nous avons utilisé au cours de nos études de criblage d'extraits de colchique d'automne à la recherche de molécules liant la tubuline nous a été fourni par le Docteur Anne Poutaraud de l'INRA de Colmar. Ce matériel végétal a été récolté, séché et broyé entre 2001 et 2002. Le matériel à notre disposition contient des broyats des différents organes de la plante récoltés à différents moments du cycle. Les échantillons sont présentés dans la Figure 84 ci-après.

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

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

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

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

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

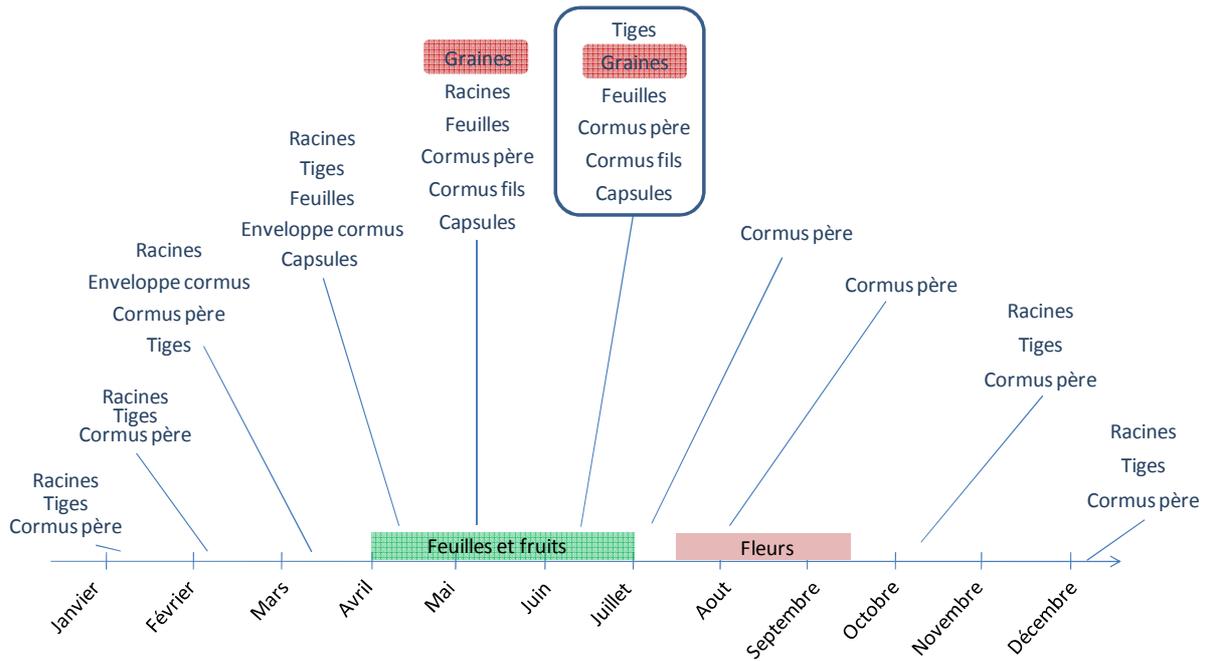


Figure 84 : Représentation schématique des dates de récoltes des différents échantillons de Colchique d'automne disponibles pour nos recherches

Comme nous l'avons vu précédemment, du fait du cycle particulier de cette plante, la composition en alcaloïdes des extraits dépend du moment de la récolte ainsi que de la qualité du séchage et du stockage. Il a cependant été prouvé que la teneur maximale en alcaloïdes (colchicine et apparentés) est rencontrée dans les graines pour des échantillons récoltés aux alentours du mois de juin¹¹⁰. Nous avons ainsi décidé de préparer des extraits des différentes parties de cette plante disponibles à cette date en recherchant notamment des différences en composition des différents alcaloïdes.

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

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

v. *Caractérisation par spectrométrie de masse des extraits de Colchique*

Les extraits des différentes parties de plantes (tiges, graines, feuilles, cormus père, cormus fils et capsules) ont été caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-TOF avec la matrice 2,5-DHB. Les résultats obtenus sont présentés ci-après (Figure 85).

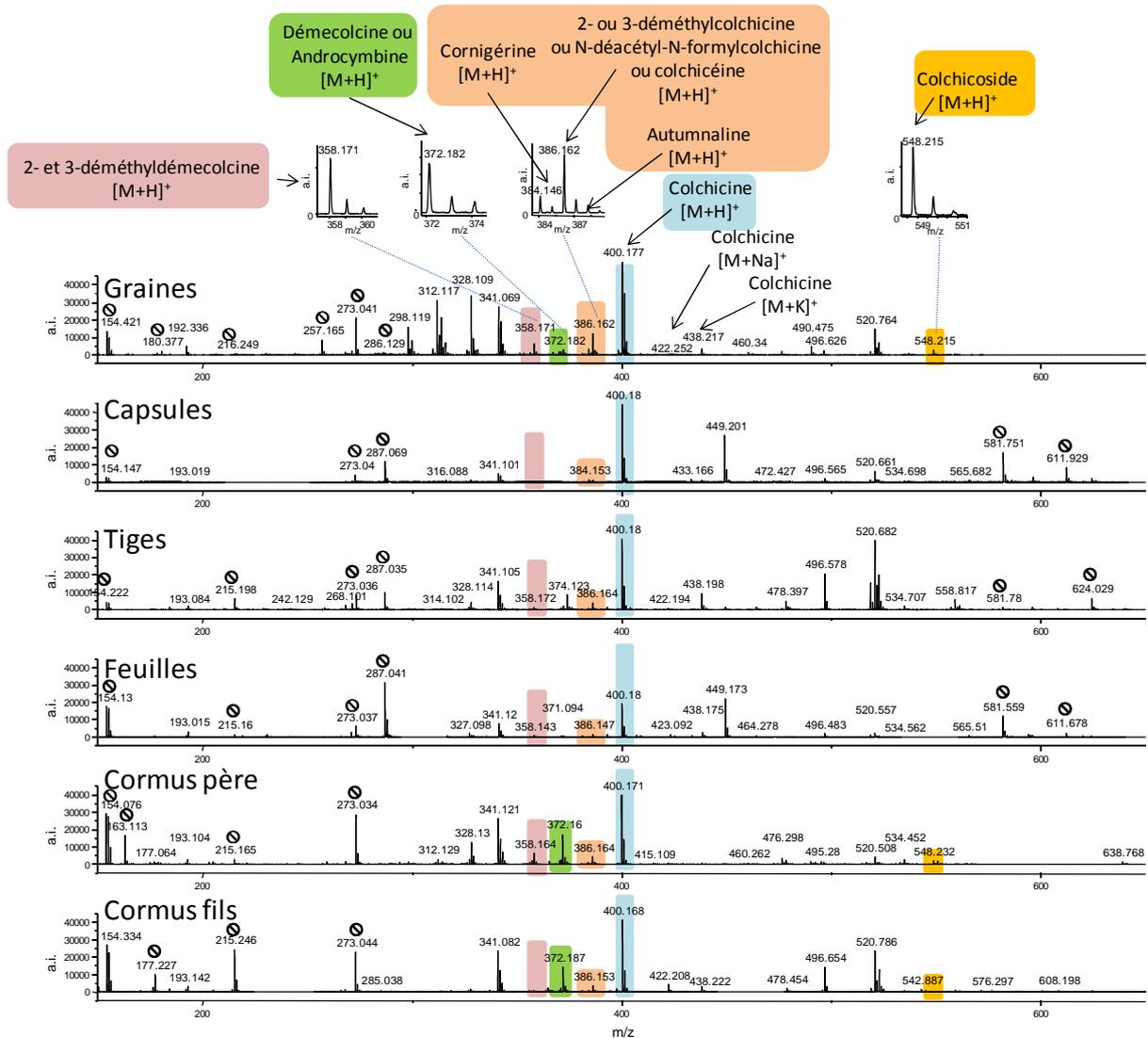


Figure 85 : Spectres MALDI-TOFMS (2,5-DHB, mélange intime) des extraits (dichlorométhane/méthanol v/v) de graines, capsules, tiges, feuilles, cormus père et cormus fils de Colchique d'automne (pics de matrice ⊙)

Des signaux caractéristiques (pics pseudomoléculaires $[M+H]^+$) de différents alcaloïdes sont retrouvés en MALDI-TOFMS pour les différents extraits de colchique d'automne. Ces alcaloïdes présents dans l'ensemble des extraits de graines, de capsules, de tiges, de feuilles et de cormus père et fils sont la colchicine $[M+H]^+_{\text{expérimental}} = 400,176$ Th (erreur de 1,3 ppm par rapport à la masse théorique), la 2-ou 3-déméthyl-démecolcine

$[M+H]^+$ expérimental = 358,162 Th (erreur de 6,7 ppm), la cornigérine $[M+H]^+$ expérimental = 384,149 Th (erreur de 13 ppm) et la 2- ou 3-déméthylcolchicine ou N-déacétyl-N-formylcolchicine ou colchicine $[M+H]^+$ expérimental = 386,158 Th (erreur de 4,6 ppm). Certaines espèces ne sont cependant présentes que dans des organes spécifiques. C'est le cas par exemple de la démeolcine ou Androcymbine $[M+H]^+$ expérimental = 372,1763 Th (erreur de 11,4 ppm) retrouvée uniquement dans les extraits de graines, cormus père et cormus fils. Le colchicoside n'est lui aussi détecté que dans les extraits de graines, cormus père et cormus fils $[M+H]^+$ expérimental = 548,2235 Th (erreur de 19 ppm). L'autumnaline quant à elle n'est détectée que dans l'extrait de graines de colchique d'automne $[M+H]^+$ expérimental = 388,193 Th (erreur de 21 ppm) (différent du pic de la [colchicine $^{13}C_2+H]^+$ à m/z théorique = 388.16652 Th, qui entraînerai une erreur de 70 ppm).

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

Le spectre MALDI-FTICRMS de l'extrait de graines de colchique d'automne avec la matrice 2,5-DHB est présenté en Figure 86.

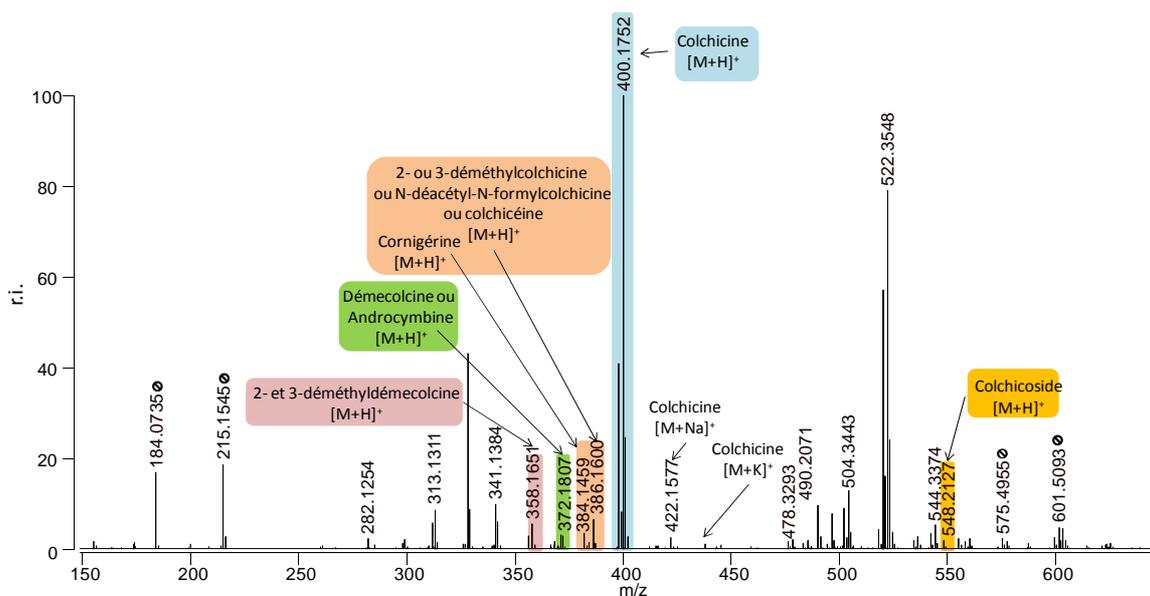


Figure 86 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) d'un extrait (dichlorométhane/méthanol v/v) de graines de Colchique d'automne (pics de matrice ☉)

Le spectre MALDI-FTICRMS de l'extrait de graines de colchique d'automne montre lui aussi des signaux caractéristiques de différents alcaloïdes : 2- ou 3-déméthylémecolcine $[M+H]^+_{\text{expérimental}} = 358,1651$ Th (erreur de 2,7 ppm par rapport à la masse théorique), émecolcine ou androcymbine $[M+H]^+_{\text{expérimental}} = 372,1807$ Th (erreur de 0,4 ppm), cornigérine $[M+H]^+_{\text{expérimental}} = 384,1459$ Th (erreur de 3,6 ppm), 2- ou 3-déméthylcolchicine, N-déacétyl-N-formylcolchicine ou colchicine $[M+H]^+_{\text{expérimental}} = 386,1600$ Th (erreur de 0,5 ppm), colchicine $[M+H]^+_{\text{expérimental}} = 400,1752$ Th (erreur de 0,6 ppm) et colchicoside $[M+H]^+_{\text{expérimental}} = 548,2127$ Th (erreur de 0,1 ppm). Ainsi, les attributions des pics correspondants aux alcaloïdes effectuées par MALDI-TOFMS sont validées à l'aide de la mesure de masse exacte atteinte lors d'une analyse de la même solution par MALDI-FTICRMS (avec une erreur moyenne de l'ordre de 1 ppm et une résolution moyenne aux alentours de 700000 ($m/\Delta m$)). Il est cependant à noter qu'une différence entre les deux spectres obtenus existe en ceci que l'automnealine n'est pas détectée par MALDI-FTICRMS. Ceci peut néanmoins s'expliquer par la plus faible sensibilité de cette technique par rapport au MALDI-TOFMS.

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

vi. Criblage primaire des extraits de Colchique

Nous avons ensuite criblé l'extrait dichlorométhane/méthanol (v/v), évaporé à sec et repris à l'eau ultrapure de graines de colchique d'automne. Pour ce faire, 10 μL d'extrait ont été incubés avec 90 μL de tubuline ($2 \cdot 10^{-5}$ M) à 37°C pendant une heure. La solution est ensuite filtrée sur Microconcentrateur 30000 et les membranes des filtres lavées 3 fois successivement par 100 μL d'eau ultrapure. Les molécules retenues sur la membrane du filtre sont ensuite éluées par 25 μL d'eau ultrapure. La solution obtenue est analysée en analyse directe par MALDI-TOFMS avec le 2,5-DHB comme matrice. Les résultats obtenus pour l'analyse MALDI-TOFMS de la solution de matrice 2,5-DHB seule, pour l'extrait de graines de colchique d'automne avant protocole et pour le même extrait élué à partir du microconcentrateur après le criblage par incubation avec la tubuline sont présentés en Figure 87.

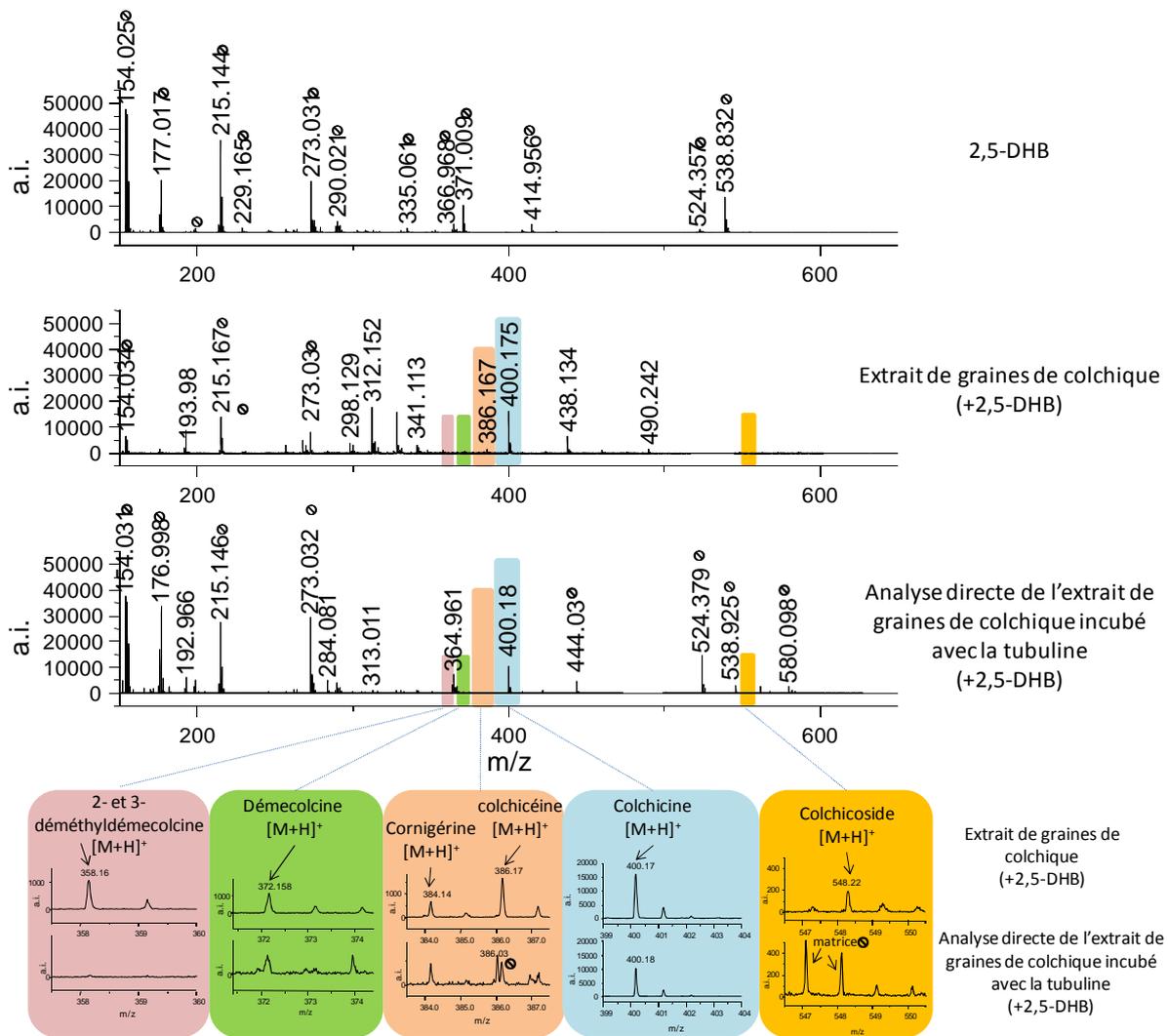


Figure 87 : Spectres MALDI-TOFMS obtenus lors de l'analyse de la matrice 2,5-DHB, de l'extrait de graines de colchique d'automne (avec le 2,5-DHB comme matrice) et de la solution obtenue à partir des microconcentrateurs après incubation du même extrait avec la tubuline, filtration, lavages et élution (matrice 2,5-DHB). En cartouche sont présentés les agrandissements des zones des spectres correspondantes aux différents alcaloïdes présents dans l'extrait de colchique d'automne (pics de matrice M)

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

Par différence entre les spectres obtenus pour l'extrait de graines avant et après incubation avec la tubuline il peut être vu que 4 alcaloïdes montrent une activité de type liaison à la tubuline en n'étant pas éliminés lors des lavages, la présence de tubuline dans les

éluats étant validée par ailleurs. C'est le cas notamment pour la **colchicine** dont la liaison à la tubuline est connue. Les spectres obtenus après le protocole montrent une intensité du pic pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de la colchicine de l'ordre de 10000 coups, presque aussi intense que dans l'extrait de graines brut.

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

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

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

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

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

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

b. Criblage des extraits de Pervenche de Madagascar

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

i. Description botanique de la Pervenche de Madagascar

La Pervenche de Madagascar est une plante endémique à l'île de Madagascar où elle pousse jusqu'à une altitude de 1600-1800 m. Du fait de sa résistance et de sa facilité de culture, elle a été vite disséminée par l'homme sur toutes les régions chaudes du globe¹¹¹.

Son nom scientifique actuellement utilisé est *Catharanthus roseus* (L.) G. Don mais du fait de multiples classifications contradictoires, elle est également appelée *Vinca rosea* ou *Vinca madagascarensis*. Cette plante est aussi connue sous les noms de Pervenche rose, catharanthe, rose amère ou encore en anglais old maid ou bright eyes¹¹¹.

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

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

La Pervenche de Madagascar est une plante vivace qui fleurit constamment pour peu qu'elle pousse dans un endroit ensoleillé. Elle est présentée en Figure 88.



Figure 88 : représentation schématique et photographie de la Pervenche de Madagascar *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. ; (a) partie aérienne de la plante ; (b) fruit ; (c) graine⁹⁰

La partie aérienne de cette plante consiste en un buisson de 20 à 60 cm généralement mais pouvant aller jusqu'à 90 cm de haut. Les tiges sont semi ligneuses rougeâtres et contiennent un latex (Figure 88a)¹¹¹.

Les feuilles sont persistantes, simples, spiralées et opposées. Elles sont ovales à lancéolées de 5 à 7 cm de long, à marge ondulée et avec un pétiole court. Elles sont glabres des deux côtés et leur face supérieure est brillante, vert moyen à sombre¹¹².

Les fleurs de 3 à 4 cm sont roses ou blanches ou blanches avec un œil rose au centre. Elles sont présentes toute l'année si le climat est approprié. Elles sont axillaires, tubulaires à corolle à 5 pétales spatulés¹¹².

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

Les fruits sont deux follicules cylindriques déhiscent (Figure 88b) contenant chacun 12 à 20 graines brunâtres et arrondies (Figure 88c)¹¹².

ii. Utilisations traditionnelles et médicales de la Pervenche de Madagascar

La Pervenche de Madagascar a été utilisée traditionnellement pour traiter de nombreuses maladies selon l'endroit de culture¹¹¹.

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

C'est cet aspect qui intéressa les chercheurs en 1950 qui s'attachèrent à démontrer l'activité hypoglycémiant de la plante à la recherche d'une éventuelle insuline végétale¹¹³. Cette étude s'avéra cependant peu fructueuse malgré une augmentation de la sécrétion d'insuline par le pancréas suite à la prise de préparations à base de Pervenche. Les patients traités montrèrent cependant une leucopénie importante (leur nombre de globules blancs était très diminué, ce qui est le signe majeur d'une activité antimittotique d'une substance : en effet, les globules blancs sont les cellules du corps humain qui subissent le plus de renouvellement, par divisions cellulaires, ou mitoses, et donc sont les cellules les plus sensibles aux cytotoxiques).

De là, les extraits de Pervenche de Madagascar ont été étudiés en vue d'une possible activité anticancéreuse, menant à la découverte majeure des alcaloïdes de la pervenche que sont la vinblastine et la vincristine. Ces deux molécules sont deux antimittotiques puissants utilisés seuls ou en association avec d'autres agents anticancéreux dans le cadre des

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

traitements de la maladie de hodgkin, des lymphomes, sarcomes et carcinomes mammaires (entre autres)¹¹⁴. Ces molécules sont d'ailleurs devenues un dénominateur commun de nombreux protocoles de chimiothérapie en servant notamment d'agents « synchronisateurs », permettant de renforcer l'activité des autres molécules anticancéreuses associées¹¹⁵.

D'autres molécules retrouvées dans les extraits de Pervenche ont trouvé des applications en thérapeutique. C'est le cas de la réserpine pour ses propriétés sédatives et hypotensives, et de la vincamine et de l'ajmalicine ou raubasine qui entrent dans la composition de médicaments destinés à améliorer la fonction cérébrale du sujet âgé notamment dans le cadre des troubles psychiques de la sénescence ou des suites d'accidents vasculaires-cérébraux. Les troubles sensoriels tels que les rétinopathies d'origine vasculaire ou les troubles de l'oreille interne (vertiges et acouphènes) en sont également des bonnes indications¹¹⁶.

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

Les extraits de Pervenche ont été très étudiés du fait de la découverte de leurs activités biologiques importantes. La Pervenche de Madagascar est ainsi considérée comme la plante médicinale la plus étudiée à l'heure actuelle. Elle présente un métabolisme complexe et plus de 150 alcaloïdes différents ont été référencés jusqu'ici¹¹⁷.

Les alcaloïdes sont des molécules qui induisent généralement des effets biologiques importants et nombre d'entre eux a trouvé une application en médecine¹¹⁸.

Les alcaloïdes extraits de la Pervenche de Madagascar appartiennent à la classe des alcaloïdes terpenoïdes indoliques. Les alcaloïdes majoritaires des extraits de Pervenche de Madagascar sont ainsi la **serpentine**, l'**ajmalicine**, la **catharanthine**, la **vindoline**, l'**anhydrovinblastine**, la **vinblastine** et dans une moindre mesure la **leurosine** et la

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

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

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

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

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

vincristine (dont le rendement d'extraction est de 0,0003% dans la matière végétale sèche, l'un des plus faible rendements d'extraction pour une molécule utilisée en médecine¹¹⁵).

Les alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar référencés sont présentés, de manière non exhaustive, dans le Tableau 9.

nom du composé	formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	[M+H] ⁺ théorique
tryptamine	C₁₀H₁₂N₂	160.10005	161.10733
B-carboline	C ₁₁ H ₈ N ₂	168.06875	169.07603
N,N-diméthyl-tryptamine	C ₁₂ H ₁₆ N ₂	188.13135	189.13863
Nb-acetyl-tryptamine	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O	202.11061	203.11789
apparicine	C ₁₈ H ₂₀ N ₂	264.16265	265.16993
pericalline	C ₁₈ H ₂₀ N ₂	264.16265	265.16993
ammocalline	C ₁₉ H ₂₂ N ₂	278.17830	279.18558
secodine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂	292.19395	293.20123
decussine	C ₂₀ H ₁₉ N ₃	301.15790	302.16518
malindine	C ₂₀ H ₂₂ N ₃	304.18137	305.18865
akuammicine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	322.16813	323.17541
pericyclivine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	322.16813	323.17541
pleiocarpamine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	322.16813	323.17541
rosicine	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃	324.14739	325.15467
akagerine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.18378	325.19106
cavincine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.18378	325.19106
kibine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.18378	325.19106
lochnerine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.18378	325.19106
tubotaiwine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₂	324.18378	325.19106
ajmaline	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₂	326.19943	327.20671
lochneridine	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₃	328.17869	329.18597
19-epi-vindolinine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₂	336.18378	337.19106
catharanthine	C₂₁H₂₄N₂O₂	336.18378	337.19106
tabersonine ou vincamine	C₂₁H₂₄N₂O₂	336.18378	337.19106
venalstonine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₂	336.18378	337.19106
vindolinine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₂	336.18378	337.19106
12-hydroxy-akuammicine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₃	338.16304	339.17032
fluorocarpamine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₃	338.16304	339.17032
lochrovicine	C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₃	338.16304	339.17032
vinervine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₃	338.16304	339.17032
coronaridine	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₂	338.19943	339.20671
vincadifformine	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₂	338.19943	339.20671
21-hydroxy-cyclolochnerine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₃	340.17869	341.18597
perivine	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₃	340.17869	341.18597
alstonine	C ₂₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	348.14739	349.15467
serpentine	C₂₁H₂₀N₂O₃	348.14739	349.15467
cathenamine	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	350.16304	351.17032
isovallesiachotamine	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	350.16304	351.17032
vallesiachotamine	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₃	350.16304	351.17032
19-epi Nb-oxide-vindolinine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
19-hydroxy-tabersonine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
ajmalicine	C₂₁H₂₄N₂O₃	352.17869	353.18597
akuammidine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
akuammigine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
epiajmalicine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
lochnericine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
minovincine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
Nb-oxide-vindolinine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
N-oxide-vindolinine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
O-deacetyl-akuammiline	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
preakuammicine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
rauniticine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
rosamine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
tetrahydroalstonine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
vobasine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃	352.17869	353.18597
N-oxide-fluorocarpamine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₄	354.15796	355.16524
perividine	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₄	354.15796	355.16524

Chapitre 4 : Application des tests au criblage d'extraits de plantes

isositsirikine	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	354.19434	355.20162
minovincinine	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	354.19434	355.20162
sitsirikine	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	354.19434	355.20162
yohimbine	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₃	354.19434	355.20162
dihydrositsirikine	C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₃	356.20999	357.21727
dihydro-sitsirikine	C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₃	356.20999	357.21727
perimivine	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₄	366.15796	367.16524
11-methoxy-tabersonine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₃	366.19434	367.20162
11-methoxy-tabersosine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₃	366.19434	367.20162
stemmadenine	C₂₂H₂₆N₂O₃	366.19434	367.20162
10-hydroxy-deacetyl-akuammiline	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	368.17361	369.18089
7-hydroxyindolenine-ajmalicine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	368.17361	369.18089
epimisiline	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	368.17361	369.18089
hörhammericine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	368.17361	369.18089
mitraphylline	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	368.17361	369.18089
pseudo-indoxyl-ajmalicine	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	368.17361	369.18089
vincoline	C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₄	368.17361	369.18089
vincolidine	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₃	378.19434	379.20162
19-hydroxy-11-methoxy-tabersosine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	382.18926	383.19654
akuammine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	382.18926	383.19654
lochnerinine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	382.18926	383.19654
lochnerinine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	382.18926	383.19654
lochrovidine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	382.18926	383.19654
virosine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	382.18926	383.19654
lochrovine	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₃	382.22564	383.23292
catharosine	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄	384.20491	385.21219
O-deacetyl-vindolidine	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄	384.20491	385.21219
secologanine	C₁₇H₂₃O₁₀	387.12912	388.13640
akuammiline	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄	394.18926	395.19654
11-methoxy-hörhammericine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₅	398.18417	399.19145
vincarodine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₅	398.18417	399.19145
vinosidine	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₅	398.18417	399.19145
deacetoxy-vindoline	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₄	398.22056	399.22784
19-acetoxy-11-hydroxy-tabersosine	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₅	410.18417	411.19145
deacetyl-vindoline	C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₅	414.21547	415.22275
19-acetoxy-11-methoxy-tabersosine	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₅	424.19982	425.20710
lochnerivine	C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₅	424.19982	425.20710
cathovaline	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₅	426.21547	427.22275
vindolidine	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₅	426.21547	427.22275
vindorosine	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₅	426.21547	427.22275
vindolicine	C ₂₅ H ₃₂ N ₂ O ₆	456.22604	457.23332
vindoline	C₂₅H₃₂N₂O₆	456.22604	457.23332
strictosidine	C ₂₇ H ₃₃ O ₇ N ₂	497.22878	498.23606
isovincoside	C ₂₇ H ₃₄ N ₂ O ₉	530.22643	531.23371
bannucine	C ₂₉ H ₃₆ N ₃ O ₇	538.25533	539.26261
reserpine	C ₃₃ H ₄₀ N ₂ O ₉	608.27338	609.28066
leurosivine	C ₄₁ H ₅₄ N ₃ O ₉	732.38601	733.39329
17-deacetoxy-leurosine	C ₄₄ H ₅₄ N ₄ O ₇	750.39925	751.40653
4-deacetoxy-vinblastine	C ₄₄ H ₅₆ N ₄ O ₇	752.41490	753.42218
deacetyl-vinblastine	C ₄₄ H ₅₆ N ₄ O ₈	768.40981	769.41709
pseudovinblastine-diol	C ₄₄ H ₅₆ N ₄ O ₈	768.40981	769.41709
3', 4'-anhydro-vinblastine	C₄₆H₅₆N₄O₈	792.40981	793.41709
vingramine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₈	792.40981	793.41709
4'-deoxy-vinblastine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₈	794.42546	795.43274
isoleurosine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₈	794.42546	795.43274
vinosidine	C ₄₄ H ₅₂ N ₄ O ₁₀	796.36384	797.37112
N-deformyl-vincristine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₉	796.40473	797.41201
N-demethyl-vinblastine	C ₄₅ H ₅₆ N ₄ O ₉	796.40473	797.41201
vincamidine	C ₄₅ H ₅₆ N ₄ O ₉	796.40473	797.41201
methylvingramine	C ₄₇ H ₅₈ N ₄ O ₈	806.42546	807.43274
catharanthamine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₉	808.40473	809.41201
leurosine	C₄₆H₅₆N₄O₉	808.40473	809.41201
vincathicine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₉	808.40473	809.41201
20'-epivinblastine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₉	810.42038	811.42766
leurosidine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₉	810.42038	811.42766
roseamine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₉	810.42038	811.42766
vinblastine	C₄₆H₅₈N₄O₉	810.42038	811.42766
vincovaline	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₉	810.42038	811.42766

catharicine	C ₄₆ H ₅₂ N ₄ O ₁₀	820.36834	821.37562
5'-oxo-leurosine	C ₄₆ H ₅₄ N ₄ O ₁₀	822.38399	823.39127
catharine	C ₄₆ H ₅₂ N ₄ O ₁₀	822.38399	823.39127
roseadine	C ₄₇ H ₅₈ N ₄ O ₉	822.42038	823.42766
carosine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀	824.39964	825.40692
Nb-oxide-leurosine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀	824.39964	825.40692
pleurosine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀	824.39964	825.40692
vinamidine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀	824.39964	825.40692
vincristine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₀	824.39964	825.40692
14'-hydroxy-vinblastine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₁₀	826.41529	827.42257
15'-hydroxy-vinblastine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₁₀	826.41529	827.42257
leurocolombine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₁₀	826.41529	827.42257
Nb-oxide-leurosidine	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₁₀	826.41529	827.42257
vincadioline	C ₄₆ H ₅₈ N ₄ O ₁₀	826.41529	827.42257
neoleurocristine	C ₄₆ H ₅₆ N ₄ O ₁₂	856.38947	857.39675
leurosine	C ₄₉ H ₆₀ N ₄ O ₁₀	864.43094	865.43822
neoleurosidine	C ₄₈ H ₆₂ N ₄ O ₁₁	870.44151	871.44879
Nb-oxide-neoleurosidine	C ₄₈ H ₆₂ N ₄ O ₁₂	886.43642	887.44370

Tableau 9 : formules brutes, masses molaires et ions pseudomoléculaires [M+H]⁺ théoriques des principaux alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar^{111,114,115,116,117,118,119,120,121}

Ces nombreux alcaloïdes indoliques font partie intégrante du métabolisme secondaire de la plante et leur rôle en son sein est notamment de la protéger des prédateurs par le goût amer et la toxicité qu'ils apportent¹¹⁸. De nombreuses voies de biosynthèse de ces différents alcaloïdes ont été élucidées et sont représentées schématiquement ci-après ainsi que les structures des principales molécules (Figure 89).

¹¹⁹ (119) Tikhomiroff, C.; Allais, S.; Klvana, M.; Hisiger, S.; Jolicoeur, M. *biotechnol Prog.* **2002**, *18*, 1003.
¹²⁰ (120) Johnson, I. S.; Wright, H. F.; Svoboda, G. H.; Vlantis, J. *cancer research* **1960**, *20*, 1016.
¹²¹ (121) Jossang, A.; Fodor, P.; Bodo, B. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7162.

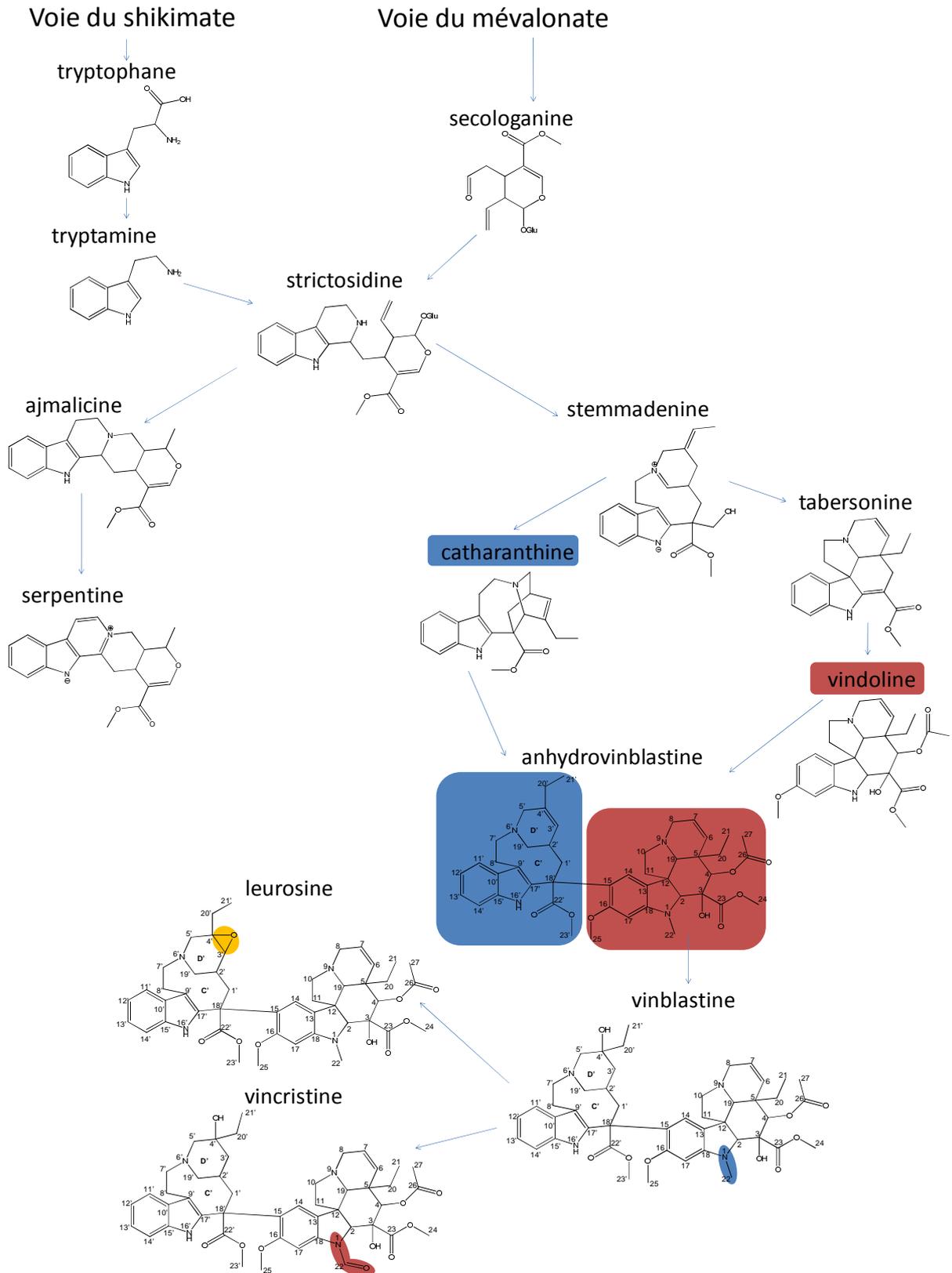


Figure 89 : représentation schématique de la biosynthèse et structures des principaux alcaloïdes indoliques de la Pervenche de Madagascar (avec numérotation IUPAC)^{53,122}

Ainsi, plus de 30 étapes sont nécessaires pour la synthèse des divers alcaloïdes d'intérêt (ajmalicine, serpentine, vinblastine, vincristine, vindoline et catharanthine). La **tryptamine** et la **secologanine** (issues respectivement de la voie de biosynthèse du shikimate et du mevalonate) sont condensées en **strictosidine** qui constitue la véritable plaque tournante de la biosynthèse de ces alcaloïdes. Cette espèce peut ensuite suivre deux voies biosynthétiques différentes et mener à l'**ajmalicine** puis à la **serpentine** d'une part, ou la **stemmadenine** d'autre part. Cette dernière est quand à elle métabolisée en **tabersonine** puis en **vindoline** ainsi qu'en **catharanthine**. C'est la condensation de ces deux dernières molécules qui permet de former l'**anhydrovinblastine** donnant par la suite accès à la **vinblastine**. De nombreux dérivés sont ensuite formés à partir de cette espèce dont la **leurosine** et la **vincristine**^{116,122}.

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

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

Les études menées sur la plante ayant montré que les extraits les plus actifs étaient réalisés à partir des feuilles¹¹⁴, nous avons décidé de centrer notre travail sur les extraits de parties aériennes de Pervenche de Madagascar.

D'autre part, des protocoles d'extraction très complexes ont été mis en œuvre afin d'extraire de cette plante des fractions d'alcaloïdes quasiment pures, ne contenant qu'une voire deux espèces. Dans le protocole initialement mis au point¹¹⁴ les feuilles sont extraites à l'éther de pétrole, puis l'extrait est repris dans du chloroforme après acidification. Le matériel végétal est ensuite repris dans du benzène acidifié par 2% d'acide tartrique. Suivent plusieurs étapes de séparation dans lesquelles la phase liquide subit une acidification et une extraction liquide/liquide au dichloroéthane puis une basification par de l'ammoniaque avant une

nouvelle extraction au dichloroéthane. Le matériel végétal est quand à lui successivement extrait par du benzène puis de l'éthanol, et chacun des extraits obtenus subit une extraction liquide/liquide au dichloroéthane. Ce protocole d'extractions différentielles mène ainsi à 7 fractions différentes qui doivent encore être à nouveau fractionnées en vue de leur caractérisation ultérieure. D'autres approches visent à remplacer le dichloroéthane par de l'eau basifiée lors des extractions liquide/liquide¹¹⁴.

Nous avons cependant voulu mettre en œuvre une méthode d'extraction beaucoup plus globale, sans nécessiter de fractionnement dans le but de disposer des solutions les plus riches possible en vue de leur criblage à la recherche d'agents se liant à la tubuline. Une alternative étant donc d'extraire le matériel végétal par du méthanol, de l'acétate d'éthyle ou du chloroforme, et ce à température ambiante ou à l'aide d'un dispositif de soxhlet¹²².

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

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

1 µL des différents extraits ont été déposés sur la cible porte échantillon du MALDI-TOFMS en mélange intime avec 1 µL de solution de matrice 2,5-DHB. Les spectres de masse des extraits de Pervenche de Madagascar avec différents solvants (méthanol, chloroforme, dichlorométhane, dichloroéthane ou dibromométhane) sont présentés en Figure 90.

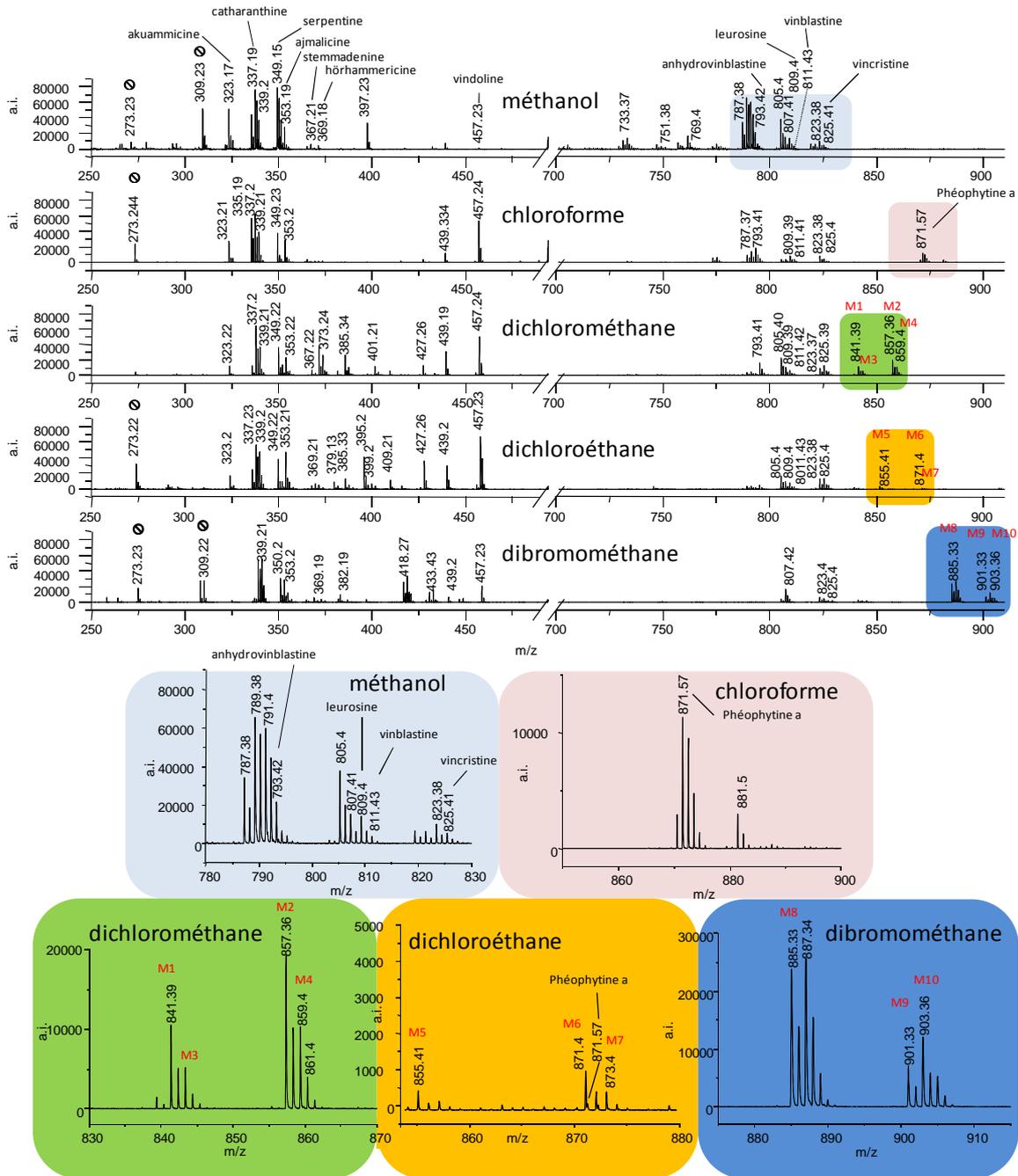


Figure 90 : Spectres MALDI-TOFMS (2,5-DHB mélange intime) d'extraits (méthanol, chloroforme, dichlorométhane, dichloroéthane, dibromométhane) de Pervenche de Madagascar. Les attributions des espèces connues se font par rapport à leurs pics pseudomoléculaires $[M+H]^+$ respectifs (pics de matrice \odot)

Comme le montre la Figure 90, les extraits de Pervenche de Madagascar ont des profils différents en fonction du solvant utilisé.

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

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

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

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

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

L'utilisation d'autres solvants ne modifie pas grandement le nombre et la nature des espèces extraites et la majorité des espèces citées précédemment sont retrouvées également dans les extraits de Pervenche de Madagascar préparés à partir de chloroforme, de dichlorométhane, de dichloroéthane ou de dibromométhane. Cependant, il est important de noter l'observation d'autres espèces, spécifiques au solvant utilisé (en encarts de la Figure 90).

Dans le cas de l'extrait au chloroforme un pic nouveau est observé à $m/z = 871,57$ Th. Ce pic peut être attribué à l'espèce pseudomoléculaire de la phéophytine-a (pigment chlorophyllien dépourvu de magnésium) de formule brute $C_{55}H_{74}N_4O_5$ ($[M+H]^+$ théorique = 871,57320, erreur de 3,6 ppm). En effet, le chloroforme est connu pour être un très bon solvant des pigments de plantes et d'algues, dont les chlorophylles et les phéophytines¹²³. D'ailleurs l'extrait obtenu est de couleur vert profond.

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

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

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

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

Ces dix pics correspondent à des espèces différentes de celles référencées précédemment et la précision sur la mesure de masse obtenue en MALDI-TOFMS ne permet pas de leur attribuer avec certitude une formule brute. Cependant, il est possible de remarquer sur les encarts de la Figure 90 que les massifs isotopiques de ces espèces sont atypiques, pouvant signer la présence de chlore dans les molécules M1, M2, M3, M4, M5, M6 et M7 et de brome dans les molécules M8, M9 et M10.

De manière à préciser les formules et les structures de ces molécules, les mêmes extraits ont été étudiés par MALDI-FTICRMS. Pour ce faire, 1 μL de l'extrait méthanolique de Pervenche de Madagascar a été déposé avec 1 μL de solution de matrice 2,5-DHB. Les résultats obtenus pour l'extrait méthanol sont présentés en Figure 91.

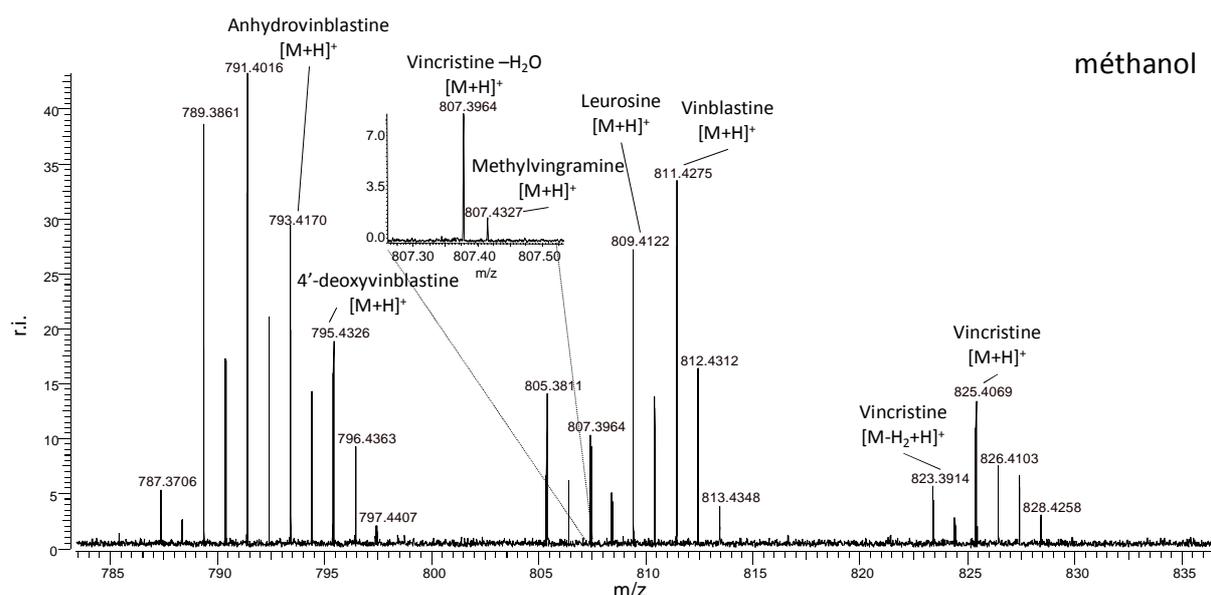


Figure 91 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) de l'extrait méthanol de la Pervenche de Madagascar

Comme le montre le spectre, les mêmes espèces sont détectées en MALDI-FTICRMS qu'en MALDI-TOFMS, cependant, la précision sur la mesure de masse (inférieure à 0,5 ppm dans ce cas) permet d'attribuer les pics avec certitude. De plus, comme le montre l'encart, la résolution moyenne proche de 600000 $m/\Delta m$, permet de séparer les molécules de masses proches comme c'est le cas du fragment de la vincristine -H₂O à $m/z = 807,39636$ Th et de la méthylvingramine à $m/z = 807,43274$ Th.

Pour valider les attributions des pics, notamment de la vinblastine et de la vincristine retrouvées dans l'extrait méthanolique de Pervenche de Madagascar, nous avons mené à bien des expériences de spectrométrie de masse de spectrométrie de masse (MS^2) en SORI-CID (cf. page 37). Durant ces expériences, les ions ont été excités pendant 20 ms. Les résultats obtenus en SORI-CID sont présentés en Figure 92a pour la vinblastine et Figure 92b pour la vincristine extraites de la Pervenche de Madagascar.

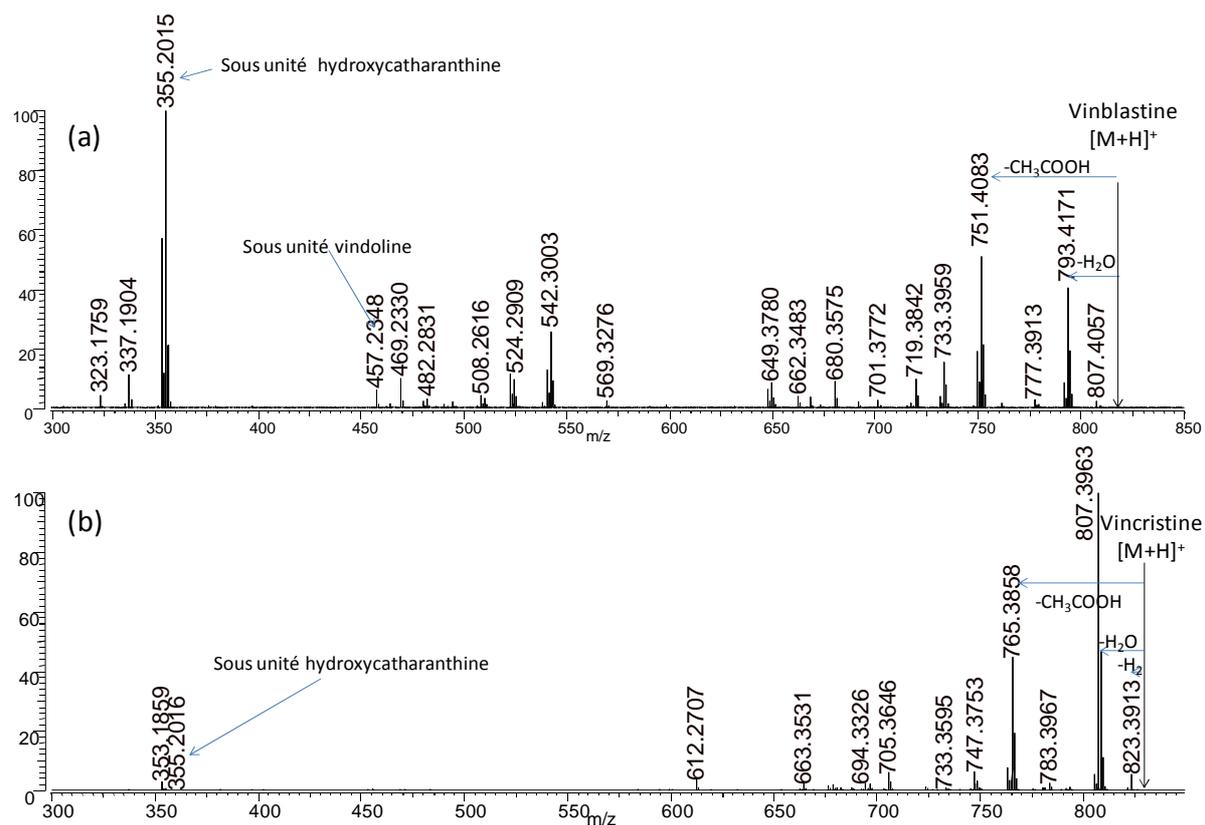


Figure 92 : Spectres SORI-CID MALDI-FTICRMS des pics attribués à la vinblastine (a) et à la vincristine (b) de l'extrait méthanol de Pervenche de Madagascar

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

retrouvées dans la bibliographie^{124,125}. Les schémas de fragmentation de la vinblastine et de la vincristine sont présentés en Figure 93 ci-après.

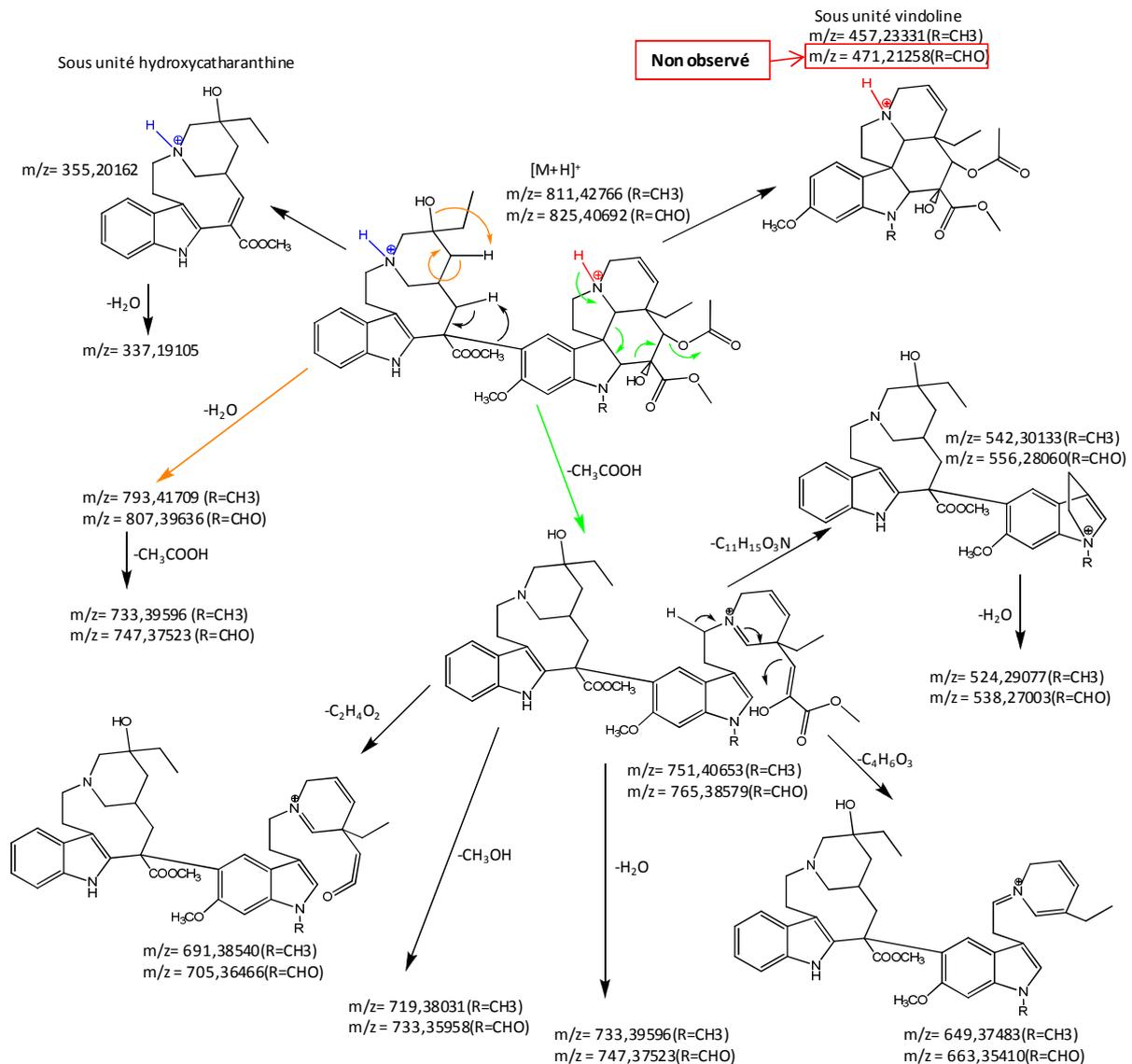


Figure 93 : schémas de fragmentation de la vinblastine (R=CH₃) et de la vincristine (R=CHO)

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

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

¹²⁴ (124) Favretto, D.; Piovan, A.; Cappelletti, E. M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 982.
¹²⁵ (125) Trim, P. J.; Avery, J. L.; McEwen, A.; Snel, M. F.; Claude, E.; Marshall, P. S.; West, A.; Princivalle, A. P.; Clench, M. "MALDI-ion mobility separation-MS imaging of vinblastine and its metabolites in rat tissues"; ASMS, 2008, Denver.

Pour ce faire 1 μL de l'extrait a été déposé avec 1 μL de matrice 2,5-DHB en mélange intime. Le spectre MALDI-FTICRMS de l'extrait chloroformique de la Pervenche de Madagascar est présenté en Figure 94 ci-après.

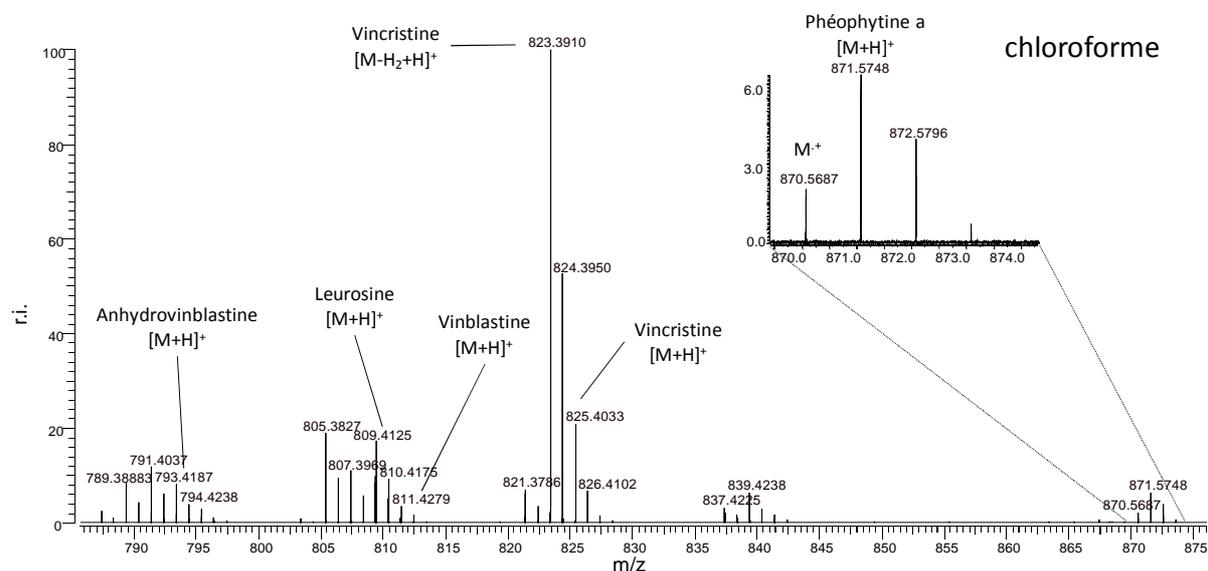


Figure 94 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) de l'extrait chloroforme de la Pervenche de Madagascar

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

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

Ainsi, 1 μL de l'extrait dichlorométhane de la Pervenche de Madagascar a été déposé sur la plaque avec 1 μL de solution de matrice 2,5-DHB en mélange intime. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 95(a)**.

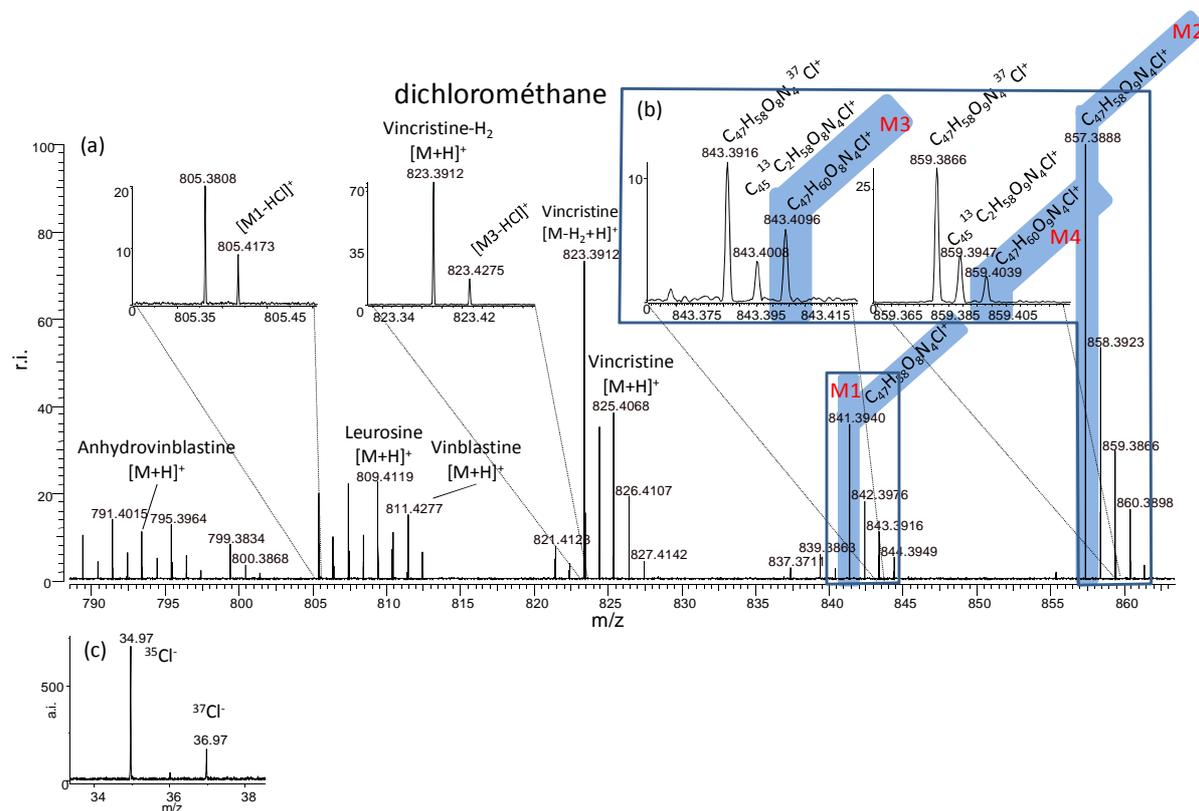


Figure 95 : (a) Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime, mode de détection positif) de l'extrait dichlorométhane de la Pervenche de Madagascar ; (b) agrandissements des pics à M+2 de M1 et M2 ; (c) Analyse MALDI-TOFMS (2,5-DHB, mélange intime, mode de détection négatif) de la présence de chlore dans l'extrait dichlorométhane de la Pervenche de Madagascar

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

En étudiant les pics attribués à M1 et M2 (à m/z = 841,3940 Th et m/z = 857,3888 Th), il est possible, dans ces conditions de précision sur les mesures de masse, de déterminer les formules brutes correspondantes. Les résultats possibles pour M1 (erreur maximale de 3 ppm) sont présentés à titre d'exemple dans le Tableau 10.

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

Tableau 10 : formules brutes probables pour la molécule M1 (erreur maximale 3 ppm)

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

De plus, l'hypothèse de la présence de chlore au sein de ces molécules est validée par l'étude des massifs isotopiques caractéristiques de ces deux molécules. D'autre part, du fait de la présence de chlore, les massifs isotopiques de ces molécules doivent présenter deux pics à M+2 (843 Th et 859 Th respectivement pour M1 et M2): l'un du fait de la présence de l'isotope 37 du chlore (^{37}Cl) et l'autre du fait de la présence de deux carbones 13 ($^{13}C_2$). Cependant, l'étude expérimentale des pics à M+2 se révèle plus complexe (**Figure 95(b)**). En effet, dans les deux cas, 3 pics sont présents là où 2 seulement étaient attendus. L'attribution des deux premiers pics est dans les deux cas conforme à celle attendue : M1 ^{37}Cl [$C_{47}H_{58}N_4O_8^{37}Cl$] $^+$ = 843,3916 Th (erreur de 0,9 ppm), M1 $^{13}C_2$ [$C_{45}^{13}C_2H_{58}N_4O_8Cl$] $^+$ = 843,4008 Th (erreur de 0,35 ppm) et M2 ^{37}Cl [$C_{47}H_{58}N_4O_9^{37}Cl$] $^+$ = 859,3866 Th (erreur de 1 ppm), M2 $^{13}C_2$ [$C_{45}^{13}C_2H_{58}N_4O_9Cl$] $^+$ = 859,3947 Th (erreur de 0,8 ppm).

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

En comparant les formules brutes obtenues pour ces 4 espèces avec celles des alcaloïdes référencés dans les extraits de Peruvénche de Madagascar, il advient que **les molécules M1, M2, M3 et M4 peuvent être respectivement des adduits $[M+CH_2Cl]^+$ de l'anhydrovinblastine, de la leurosine, de la 4'deoxyvinblastine et de la vinblastine** par le fait d'une réactivité de ces alcaloïdes avec le dichlorométhane (ce point sera développé plus loin). Ces adduits chargés positivement doivent présenter, selon ce mécanisme réactionnel, un atome de chlore comme contre anion. La présence d'une telle espèce en solution est validée

par l'analyse en basse masse en MALDI-TOFMS (mode de détection négatif) de ce même extrait (Figure 95(c)).

De même, 1 μL de l'extrait de Pervenche de Madagascar par le dichloroéthane a été déposé avec 1 μL de la solution de matrice 2,5-DHB puis analysé en MALDI-FTICRMS. Le spectre obtenu est présenté en Figure 96.

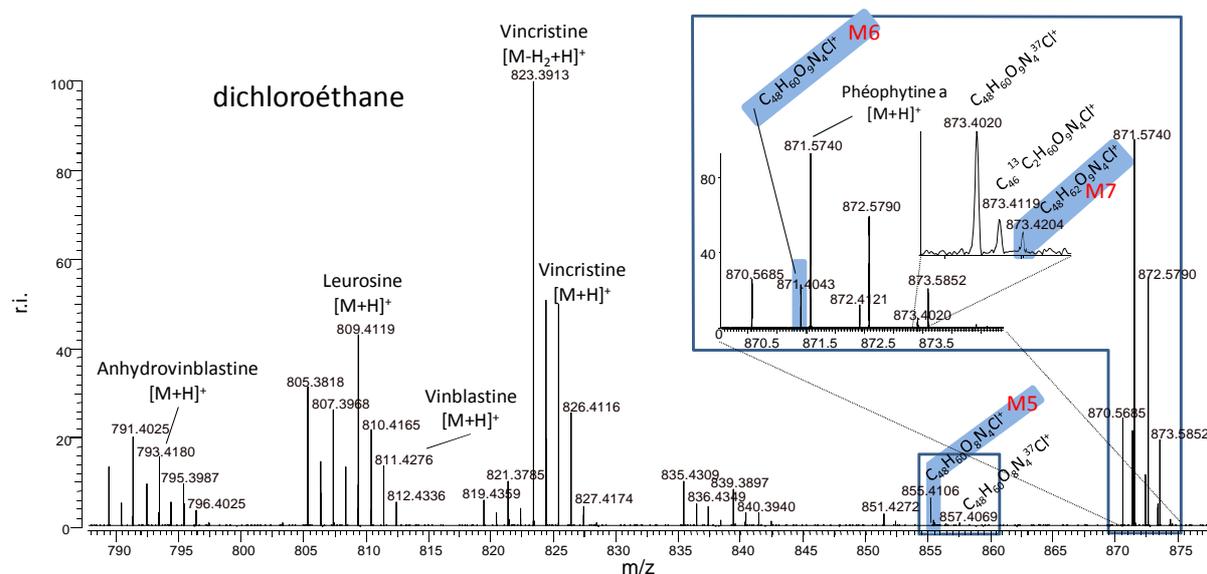


Figure 96 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) de l'extrait dichloroéthane de Pervenche de Madagascar

Comme le montre le spectre de masse, des signaux caractéristiques de l'**anhydrovinblastine**, de la **leurosine**, de la **vinblastine**, de la **vincristine** et de la **phéophytine a** sont observés lors de l'analyse de l'extrait dichloroéthane (erreurs inférieures à 0,5 ppm). Là encore, la précision sur la mesure de masse et la résolution (600000 $m/\Delta m$) atteintes permettent d'attribuer aux trois espèces M5, M6 et M7 des formules brutes probables. Ainsi, **M5**, observée à $m/z = 855,4106$ Th, a pour formule brute probable $\text{C}_{48}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_8\text{Cl}^+$ (erreur de 0,7 ppm). **M6**, observée à $m/z = 871,4043$ Th, a pour formule brute $\text{C}_{48}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_9\text{Cl}^+$ (erreur de 0,05 ppm) et **M7** observée à $m/z = 873,4204$ Th a pour formule brute $\text{C}_{48}\text{H}_{62}\text{N}_4\text{O}_9\text{Cl}^+$ (erreur de 0,5 ppm). Il est à noter que dans ce dernier cas, la résolution de l'appareil permet de faire nettement la différence entre les pics de la phéophytine-a ($m/z = 871,5740$ Th et $m/z = 873,5852$ Th) et ceux de M6 et M7 ($m/z = 871,4043$ Th et $m/z = 873,4204$ Th) là où seulement un épaulement était visible en MALDI-TOFMS.

Là encore, comme dans le cas de l'extrait au dichlorométhane, il pourrait s'avérer que **les trois espèces M5, M6 et M7 soient des adduits $[M+\text{C}_2\text{H}_4\text{Cl}]^+$ de l'anhydrovinblastine,**

de la leurosine et de la vinblastine. La 4'-deoxyvinblastine, bien que faiblement détectée dans l'extrait, ne semble pas réagir avec le dichloroéthane. Cependant, les espèces d'adduits sont moins intensément observées qu'avec le dichlorométhane, allant dans le sens d'une moindre réactivité des alcaloïdes avec ce solvant. Lors de l'analyse en basse masses par MALDI-TOFMS en mode de détection négatif, le chlore est là aussi détecté, signant la présence du contre anion.

Enfin, le dernier extrait de Pervenche de Madagascar à être analysé par MALDI-FTICRMS a été l'extrait dibromométhane. 1 µL de cet extrait a été déposé en mélange intime avec 1 µL de la solution de matrice 2,5-DHB. Le spectre de masse obtenu est présenté en Figure 97.

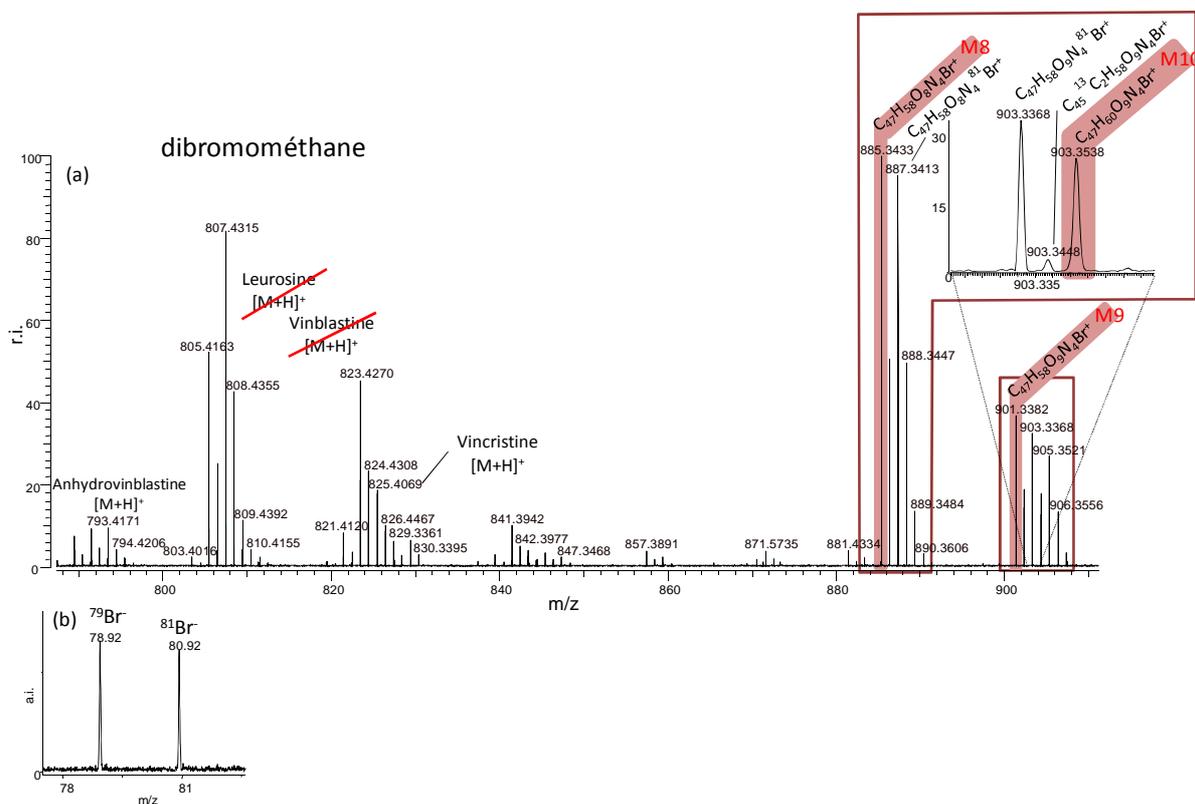


Figure 97 : (a) Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime, mode de détection positif) de l'extrait dibromométhane de Pervenche de Madagascar ; (b) Analyse MALDI-TOFMS (2,5-DHB, mélange intime, mode de détection négatif) de la présence de brome dans l'extrait dibromométhane de la Pervenche de Madagascar

Ce spectre est différent de ceux obtenus avec les autres solvants car les pics correspondants à la leurosine et la vinblastine ne sont ici pas observés. Le pic de l'**anhydrovinblastine** est lui bien présent (m/z = 793,4171 Th, erreur de 0,02 ppm), mais son

intensité relative est plus faible que précédemment. Le pic de la **vincristine** ($m/z = 825,4069$ Th, erreur de 0,03 ppm) est lui observé sans modification importante de son intensité.

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

Dans ce cas encore, par comparaison de formules brutes avec les alcaloïdes référencés dans les extraits de Pervenche de Madagascar, **les molécules M8, M9 et M10 pourraient être respectivement des adduits $[M+CH_2Br]^+$ de l'anhydrovinblastine, de la leurosine et de la vinblastine**. Ces molécules sont observées très intensément au point de ne plus pouvoir détecter de signaux correspondant aux molécules standard non modifiées (leurosine et vinblastine notamment), ceci allant dans le sens d'une réactivité importante des alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar pour le dibromométhane. Comme le montre la Figure 97(b), des signaux caractéristiques du brome sont détectés en mode négatif en MALDI-TOFMS, cela aussi allant dans le sens d'une réactivité des alcaloïdes avec le solvant impliquant, après réaction la présence d'un contre anion.

Le Tableau 11 ci-après présente l'ensemble des données relatives aux 10 nouvelles molécules que nous avons mises en évidence.

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

Tableau 11 : Récapitulatif des formules brutes et des M^+ théoriques et expérimentaux des 10 adduits d'alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar

Pour valider nos hypothèses de formation d'adduits d'alcoïdes avec différents solvants, nous avons effectué une expérience de vieillissement de molécules standards, pures, (la leurosine et la vinblastine) à 5.10^{-6} M dans du dichlorométhane. Les solutions obtenues sont indifféremment laissées vieillir 15 jours à température ambiante, avant d'être analysées par MALDI-FTICRMS (matrice 2,5-DHB en mélange intime) (Figure 98).

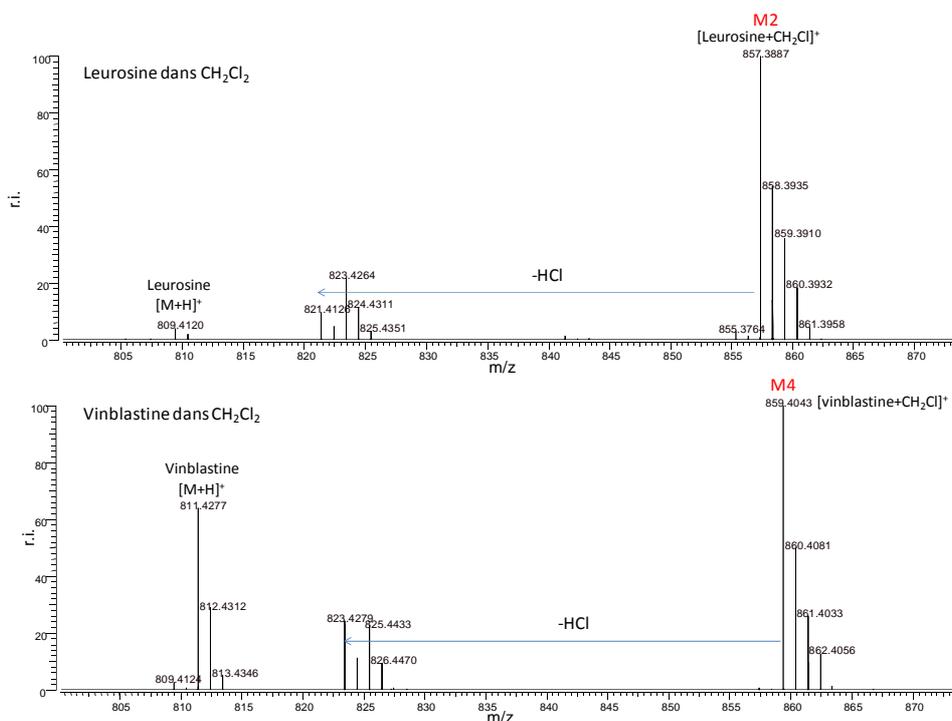


Figure 98 : Spectres MALDI-FTICRMS (2,5-DHB mélange intime) de la leurosine et de la vinblastine (5.10^{-6} M) en solution dans du dichlorométhane

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

La présence d'halogène (chlore ou brome) dans les molécules M1 à M10 a été également vérifiée par MSMS. Pour ce faire, les différents pics correspondants à ces

molécules ont été isolés puis fragmentés par SORI-CID au sein de la cellule d'analyse du FTICRMS. Les résultats obtenus pour les différents composés sont présentés en Figure 99.

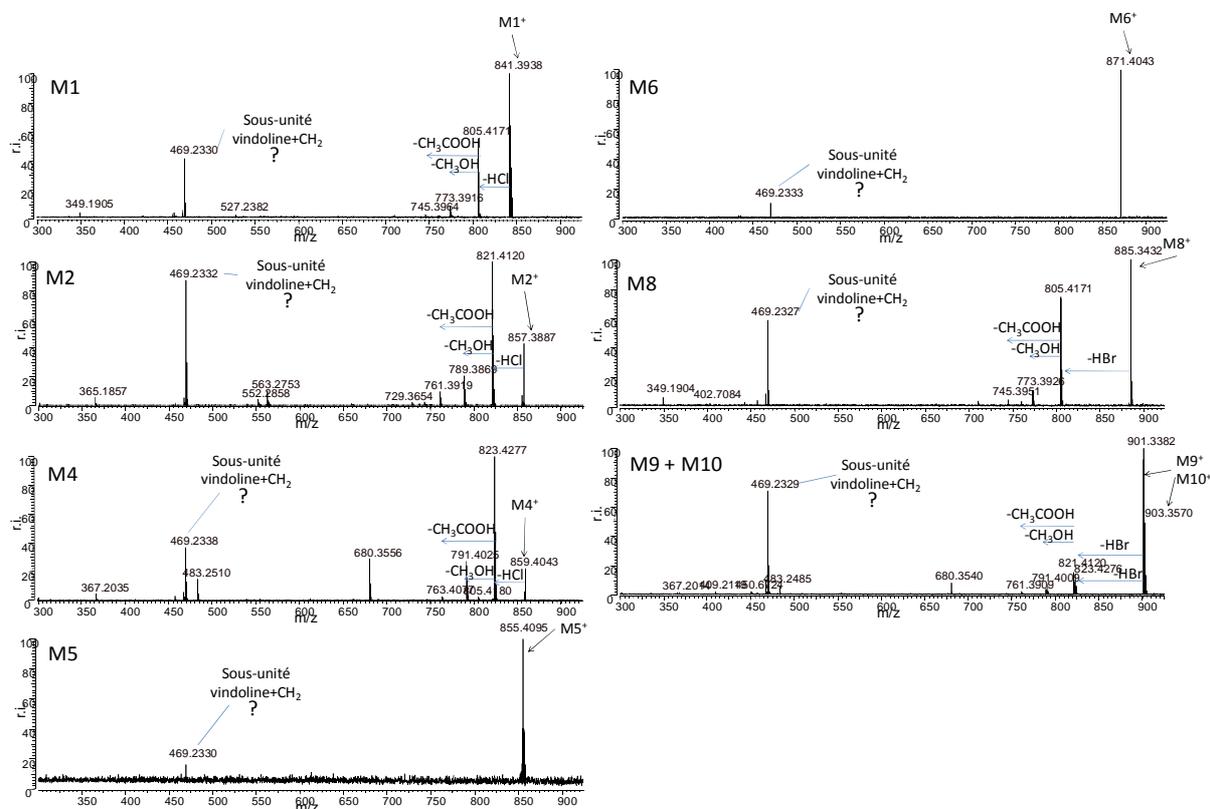


Figure 99 : Spectres SORI-CID-MALDI-FTICRMS (MS^2) de M1, M2, M4, M5, M6, M8, M9 et M10

Les spectres SORI-CID (MS^2) des différentes molécules d'adduits donnent tous des informations équivalentes. Il faut tout d'abord préciser qu'aucun spectre de qualité suffisante n'a pu être acquis, même en accumulant plusieurs expériences, pour les molécules M3 et M7 du fait que ces espèces ne sont pas présentes de manière assez intense dans les extraits. Les spectres de fragmentation présentent un premier pic intense correspondant à une perte moyenne de 35,9767 Th pour M1, M2 et M4 ou de 79,9262 Th pour M8, M9 et M10. Ces pics correspondent à la perte d'HCl ($mw = 35,97668 \text{ g.mol}^{-1}$, erreur de 0,5 ppm) pour M1, M2 et M4 (les adduits chlorés des alcaloïdes) d'une part ou d'HBr ($mw = 79,92616 \text{ g.mol}^{-1}$, erreur de 0,5 ppm) pour M8, M9 et M10 (les adduits bromés) d'autre part. Il est à noter que les adduits formés à partir du dichloroéthane (M5 et M6) ne donnent pas de fragments $-HCl$ lorsqu'étudiés en MS^2 . Ceci peut vouloir dire que la perte d'HCl nécessite la présence d'une chaîne courte (un seul maillon carbone), pour pouvoir être effective. Le mécanisme de cette fragmentation sera détaillé plus loin.

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

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

Le spectre MS^3 en mode SORI-CID de l'ion à 469,2332 Th est présenté en Figure 100.

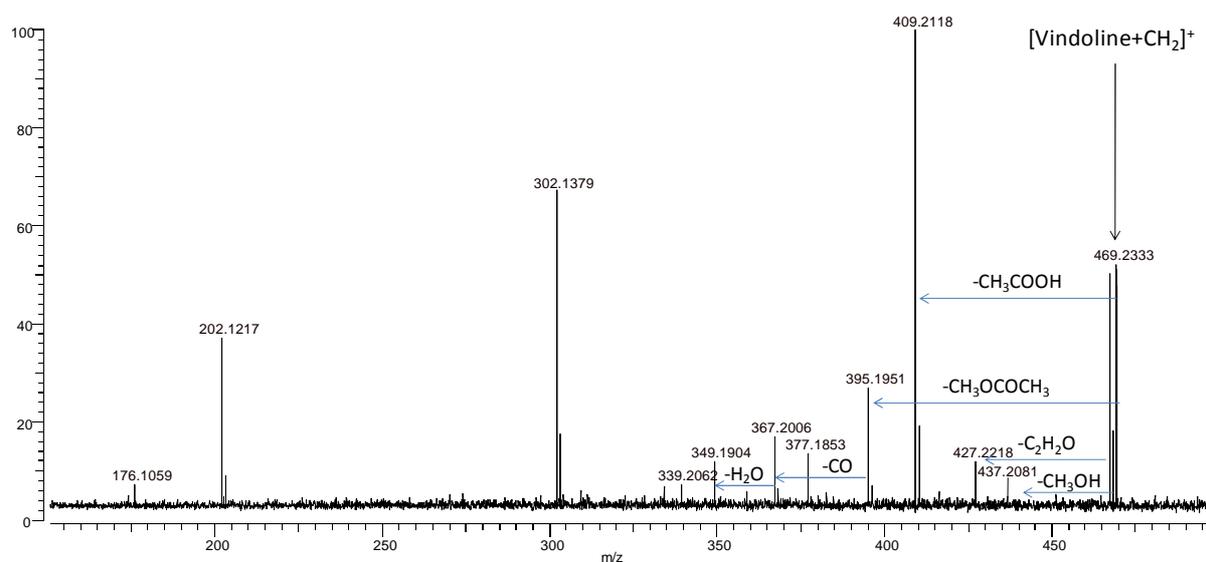


Figure 100 : Spectre MS^3 du fragment $[vindoline+CH_2]^+$ commun à tous les adduits (SORI-CID-MALDI-FTICRMS)

Le spectre MS^3 en mode SORI-CID de l'ion à $m/z = 469,2332$ Th donne des fragments à $-COOCH_3$, à $-CH_3OH$ et à $-CH_3OCOCH_3$. Ces données permettent de mettre en évidence la présence de fonctions $-COOCH_3$, $-OCOCH_3$, $-CH_3$ et ou $-OCH_3$ dans la structure de cet ion à $m/z = 469,23331$ Th. En première analyse, ces éléments sont compatibles avec l'attribution de cette espèce à une sous-unité vindoline modifiée comportant un $-CH_2$ supplémentaire. Par ailleurs, il faut remarquer que les spectres MS^2 de la vinblastine présente lui aussi ce fragment alors qu'il n'est pas observé lors de la fragmentation de la vincristine (Figure 92).

Il ressort de l'ensemble de ces informations que :

- **les molécules d'adduit possèdent un atome de chlore ou de brome** ($X = \text{Cl}$ ou Br)
- **leurs structures présentent toutes la même sous-unité vindoline, indépendamment de la nature de l'adduit** ($+\text{CH}_2\text{X}$ pour M1, M2, M3, M4, M8, M9 et M10 ou $+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{X}$ pour M5, M6 et M7, $+\text{H}$ pour la vinblastine). L'adduit doit donc avoir lieu sur la sous-unité catharathine de ces molécules (sous unité de gauche).
- **aucune déshydratation de ces molécules n'a été observée** lors de ces études MS². Or **le pic correspondant à la déshydratation est le fragment majoritaire observé pour les molécules non modifiées** (Figure 92). Il a été établi par ailleurs que le groupement mis en jeu lors de cette perte d'eau est l'hydroxyle en position 4' du cycle D' (Figure 89)¹²⁶. De ce fait, la présence de l'adduit, et la perte préférentielle de $-\text{HX}$ induite, semble diminuer cette possibilité de déshydratation en 4'-3' ou 4'-5'. **L'adduit doit donc être situé à proximité du point 4'-3' ou 4'-5', sur le cycle D' des alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar.**
- l'adduit doit être situé à une position d'où il **permet un départ favorisé de la sous-unité dérivée de la vindoline** car ce fragment est observé de manière très intense sur l'ensemble des spectres SORI-CID (Figure 99). La formation de ce fragment doit impliquer l'azote 1 (Figure 89) car une modification du groupement y étant lié ($-\text{CH}_3$ remplacé par un $-\text{CHO}$), comme dans le cas de la vincristine, empêche son observation.

L'hypothèse avancée de la formation d'adduits d'alcaloïdes par réaction avec le solvant semble donc être validée, d'autant plus que des phénomènes similaires ont déjà été décrits. En effet, des travaux relatent la formation de sels d'ammonium quaternaires d'alcaloïdes par action de solvants halogénés sur des amines tertiaires¹²⁷. Ces études ont d'abord porté sur l'iodure et le bromure de méthyle, puis sur le dibromométhane et le

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

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

diiodométhane et seulement peu d'exemples montrent une réactivité du dichlorométhane. Cependant, un certain nombre d'alcaloïdes, dont ceux de la Pervenche de Madagascar, réagissent suffisamment vite pour former des adduits. Divers travaux de caractérisation des adduits formés ont permis de placer le site de réaction sur l'azote tertiaire de la sous unité catharanthine des alcaloïdes et ont établi un ordre de réactivité tel que la leurosine réagirait plus vite que l'anhydrovinblastine et la vinblastine et en dernier lieu seulement la vincristine¹¹⁴. Une caractérisation par rayons X d'un adduit [leurosine+CH₃]⁺, formé par la mise en solution de leurosine en présence d'iodure de méthyle, a également été publiée et décrit l'adjonction d'un groupement -CH₃ sur l'azote 6' du cycle D' de la leurosine¹²⁸ (cf Figure 89).

Ces données valident nos hypothèses et il nous est possible de proposer une structure pour les différentes molécules M1 à M10 (Figure 101)

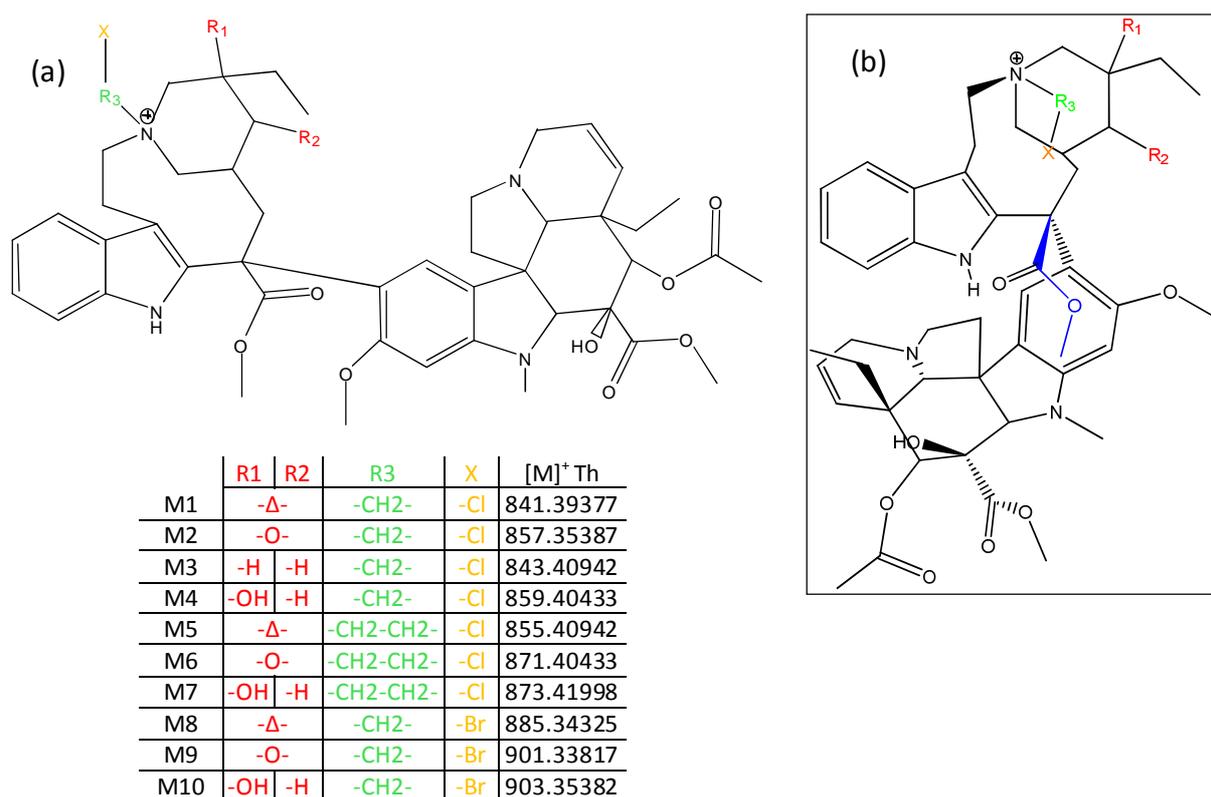


Figure 101 : (a) Proposition de structures des adduits d'alcaloïdes M1 à M10 ; (b) proposition de structure tridimensionnelle des adduits (inspirée de la structure de la leurosine+CH₃)¹²⁸

A partir de cette structure, il est possible d'établir un mécanisme probable de fragmentation MS² de ces espèces aboutissant à la formation d'un ion à m/z = 469,23331 Th

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

stabilisé par de nombreuses formes mésomères et pouvant présenter les fragmentations mises en évidence lors des expériences MS³ (Figure 102).

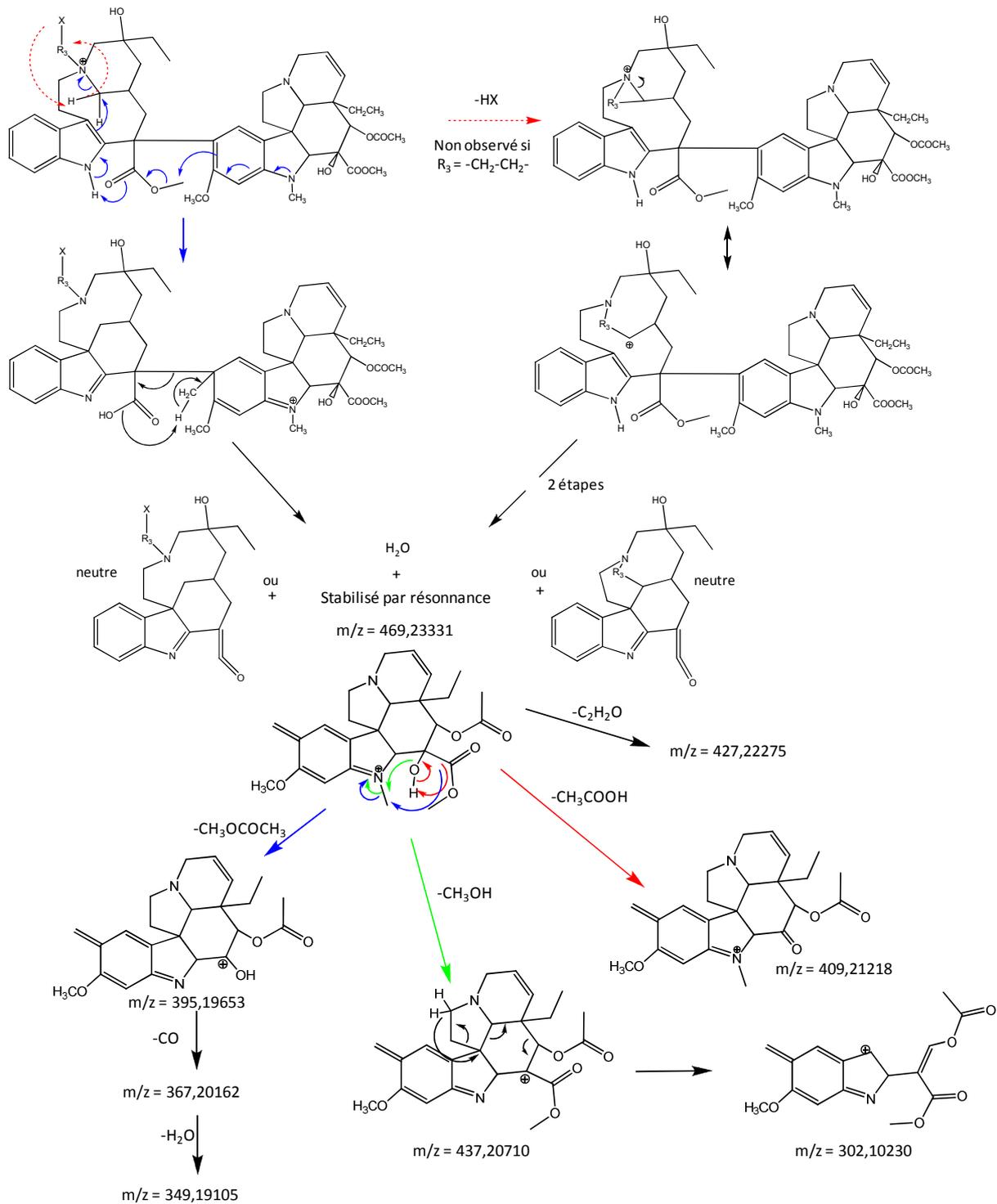


Figure 102 : Proposition de mécanisme de formation de l'ion à $m/z = 469,2332$ Th observé pour tous les adduits par MS² et hypothèse de fragmentation MS³

L'ensemble de ces données doit encore être validé. Les adduits feront ainsi l'objet d'une caractérisation fine par RMN de manière à valider leurs structures (en collaboration

avec le laboratoire de RMN de l'institut de recherche en chimie organique fine de l'Université de Rouen). D'autre part le mécanisme de formation de l'ion à $m/z = 469,23331$ Th sera étudié par la mise en œuvre de calculs de chimie théorique (en collaboration avec le laboratoire de chimie et biochimie théorique de l'Université Henri Poincaré de Nancy).

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

vi. Criblage primaire des extraits de Pervenche de Madagascar

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

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

Les éluats obtenus ont ensuite été analysés en analyse directe par MALDI-TOFMS (matrice 2,5-DHB en mélange intime). Les résultats obtenus sont présentés en Figure 103.

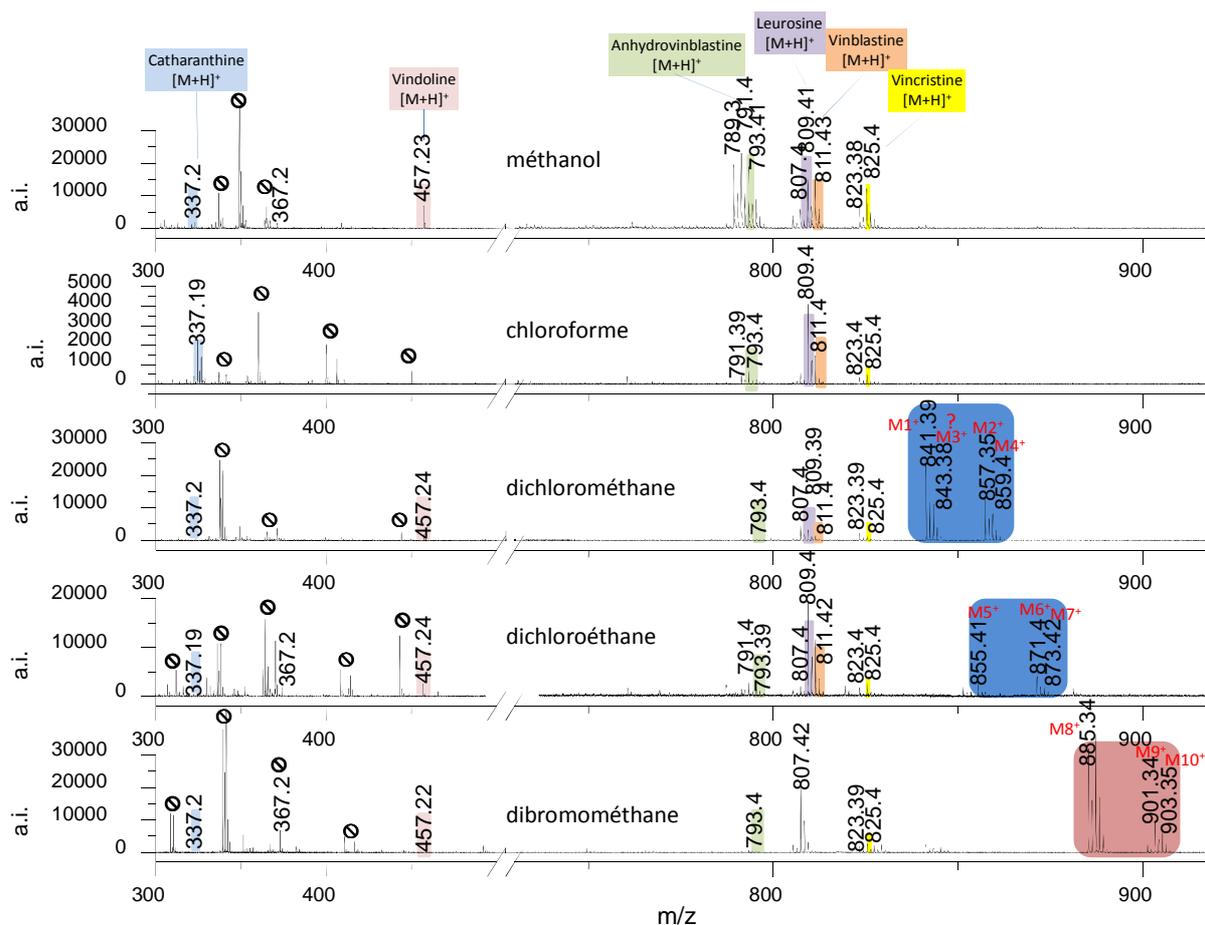


Figure 103 : Analyses directes par MALDI-TOFMS des éluats (après incubation avec la tubuline, filtration, lavages et élution) des différents extraits de Pervenche de Madagascar (méthanol, chloroforme, dichlorométhane, dichloroéthane, dibromométhane) (2,5-DHB, mélange intime) (pics de matrice ⊙)

En comparant les spectres MALDI-TOFMS obtenus en analyse directe à ceux des différents extraits bruts (Figure 90) il peut être vu que de nombreuses espèces extraites de la Pervenche de Madagascar sont éliminées lors de la mise en œuvre de notre protocole. Ces espèces ne montrent ainsi aucune capacité de liaison à la tubuline et sont éliminées durant l'étape de lavage. Cependant, quelque soit l'extrait, certaines molécules ne sont pas éliminées, faisant la preuve d'une activité intéressante.

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

polymérisation, sa mise en contact avec la tubuline entraîne la formation de structures polymériques non microtubulaires, dépourvues de toutes fonctions biologiques¹²⁹.

La deuxième molécule active mise en évidence par la mise en œuvre de notre protocole est la **vindoline** $[M+H]^+ = 457,24$ Th (erreur de 14 ppm). Sa liaison avec la tubuline, entraînant une légère inhibition de sa polymérisation. Elle est à peine détectable par d'autres techniques (telles que la spectroscopie de fluorescence)¹²⁹.

Les autres espèces détectées en analyse directe du fait de leur capacité de liaison à la tubuline sont l'**anhydrovinblastine** $[M+H]^+ = 793,41$ Th (erreur de 8 ppm), la **leurosine** $[M+H]^+ = 809,41$ Th (erreur de 2,5 ppm), la **vinblastine** $[M+H]^+ = 811,43$ Th (erreur de 3 ppm) et la **vincristine** $[M+H]^+ = 825,4$ Th (erreur de 8 ppm). L'activité antitubuline de ces espèces est bien connue et nos résultats concordent avec les données bibliographiques^{114,130}. En plus de ces espèces, leurs fragments typiques, $[M-H_2+H]^+$ et $[M-H_2O+H]^+$ notamment formés lors de l'ionisation MALDI, sont également observés sur le spectre de masse.

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

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

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

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

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

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

Ces données sont là encore en accord avec celles retrouvées dans la bibliographie puisque les adduits de leurosine et de vinblastine, formés suite à la réaction d'iodure de méthyle et d'iodure d'éthyle, ont montré des propriétés biologiques intéressantes en termes d'activité antimittotique. Notamment les adduits formés à partir de la leurosine se sont montrés plus actifs que la molécule parente. L'inverse a été observé pour la vinblastine dont les adduits « quaternaires » ont généralement fait preuve d'une activité anticancéreuse moindre¹¹⁴. Les adduits de leurosine à l'iodure de méthyle ont été testés en première phase d'essais cliniques et bien que montrant une activité supérieure et une absence totale de leucopénie induite, ces molécules ont été abandonnées à cause des effets secondaires très sévères que présentaient les patients traités¹¹⁴.

Ainsi, nous avons présenté la Pervenche de Madagascar et son contenu important en alcaloïdes uniques. Après avoir décrit la préparation de différents extraits nous en avons fait une caractérisation fine par spectrométrie de masse, notamment en mettant en évidence la formation d'adduits de type $[M+CH_2X]^+$ ou $[M+CH_2CH_2X]^+$ par quaternarisation de l'azote 6' du cycle D' en fonction du solvant organique halogéné utilisé. Une caractérisation de leurs structures a été menée à bien grâce à la spectrométrie de masse haute résolution et leur validation par RMN est envisagée.

Nous avons mené à bien un criblage primaire de ces extraits en vue de rechercher de nouveaux agents se liant à la tubuline, et pouvant dans ce cadre montrer des propriétés

intéressantes pour lutter contre le cancer. La catharanthine, la vindoline, l'anhydrovinblastine, la leurosine, la vinblastine et la vincristine ont ainsi montré leur activité en étant pas éliminées lors de l'étape de lavage lorsqu'incubées avec la tubuline. D'autre part, les adduits de l'anhydrovinblastine, de la leurosine et de la vinblastine : M1, M2, M4 (de type $[M+CH_2Cl]^+$), M5, M6, M7 ($[M+CH_2CH_2Cl]^+$) et M8, M9, M10 ($[M+CH_2Br]^+$) ont également montré une activité intéressante.

Il est par ailleurs très important de mettre ces travaux en parallèle avec d'autres expériences concernant la synthèse de nouveaux alcaloïdes, dont certains dérivés chlorés, qui montrent d'intéressantes activités antitumorales *in vitro* et *in vivo*, évaluées par d'autres protocoles^{53,131,132}. Ainsi, notre protocole de criblage par MALDI-TOFMS montre ici également son potentiel pour la découverte de nouveaux composés extraits de plantes se liant à des cibles moléculaires spécifiques. Un autre aspect intéressant à soulever ici est que l'échantillonnage mis en jeu lors du protocole est tout à fait compatible avec d'autres analyseurs tels que le MALDI-FTICRMS. Pouvoir coupler la sensibilité d'un protocole de criblage par TOFMS avec la résolution et la précision sur la mesure en masse d'un FTICRMS rend possible la caractérisation très fine des éventuelles « touches » obtenues.

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

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

2. Criblage de la liaison de composés naturels à la DHFR

Nous allons à présent nous intéresser au criblage de la liaison de composés naturels à la DiHydroFolate Réductase (DHFR). En effet, de telles molécules pourraient trouver des applications dans le cadre des traitements du cancer mais également des maladies parasitaires et ou bactériennes. Dans ce cadre, nous allons cribler un extrait de thé vert à la recherche de molécules ayant une activité antifolates (cf. chapitre 2).

a. Criblage des extraits de thé vert

Des travaux récents ont montré l'activité anticancéreuse anti-DHFR, par blocage de l'activité *in vivo* et *in vitro* de cette enzyme par des extraits de thé vert^{133,134,135,136}. Cette activité vient de composés présents dans la fraction polyphénoliques des extraits qui seraient à l'origine de l'activité prophylactique des extraits de thé vert par rapport au cancer. En effet, il a été démontré que les buveurs réguliers de thé vert ont un taux de cancer plus faible que celui de la population normale¹³⁴. C'est pourquoi nous nous sommes attachés à cribler de tels extraits à la recherche de nouveaux agents liant la DHFR non étudiés jusqu'alors. Ainsi, après une description botanique du thé vert, nous décrirons ses utilisations traditionnelles et médicales. Nous présenterons ensuite les différents composés majoritaires présents dans les fractions polyphénoliques des extraits de thé vert et nous décrirons le matériel végétal utilisé au cours de notre étude et la caractérisation que nous avons faite par spectrométrie de masse des extraits préparés au laboratoire. Enfin, nous présenterons les résultats que nous avons obtenus dans le cadre du criblage primaire, puis secondaire, des extraits de thé vert à l'aide du protocole que nous avons mis en place.

¹³³ (133) Yang, C. S.; Lambert, J. D.; Hou, Z.; Ju, J.; Lu, G.; Hao, X. *Mol. Carcinogen.* **2006**, *45*, 431.

¹³⁴ (134) Mukhtar, H.; Ahmad, N. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 1698.

¹³⁵ (135) Navarro-Peran, E.; Cabezas-Herrera, J.; Garcia-Canovas, F.; Durrant, M. C.; Thorneley, R. N. F.; Rodriguez-Lopez, J. N. *cancer res.* **2005**, *65*, 2059.

¹³⁶ (136) Mukhtar, H.; Ahmad, N. *Toxicol. Sci.* **1999**, *52*, 111.

i. Description botanique du théier

Le théier (thé, ou arbre à thé), *Camellia sinensis*, est un arbuste ou arbre originaire d'extrême orient appartenant à la famille des Theaceae. Le théier est un arbre à feuillage persistant pouvant atteindre 10 à 15 m, plus de 20 m pour certaines variétés. Il existe des arbres sauvages plusieurs fois centenaires faisant plus de 30 m mais cependant, leur hauteur est limitée par la taille lors de la mise en culture¹³⁷. Le théier est présenté en Figure 104.



Figure 104 : représentation schématique et photographie du théier ; (a) vue générale de la plante ; (b) coupe longitudinale de la fleur ; (c) fruit (capsule) ; (d) graine ; (e) coupe de graine ; (f) étamines ; (g) style ; (h) coupe transversale de l'ovaire⁹⁰

Les feuilles sont alternes, persistantes, de forme allongée à ovale de 4 à 15 cm de long et de 2 à 5 cm de large (Figure 104a). Elles sont brillantes, souples, avec une texture assez épaisse. Le pétiole est court (environ 10 mm) et le limbe est vert foncé, relativement coriace et à bords dentés.

Les fleurs du théier sont jaune claires (Figure 104b), et mesurent entre 2,5 et 4 cm de diamètre. Solitaires ou en petits groupes de 3 à 4, elles comptent cinq sépales, cinq pétales

¹³⁷ (137) Brown, M. D. *alternative medicine review* **1999**, 4, 360.

(parfois plus jusqu'à 7 ou 8), de couleur jaune clair ou blanc-crème, et de très nombreuses étamines jaunes souvent soudées entre elles (Figure 104f). L'ovaire est trilobulaire (Figure 104h).

Les fruits sont des capsules de 3 cm de diamètre environ (Figure 104c). Les graines (Figure 104d) et (Figure 104e) peuvent être pressées pour donner une huile.

Les différentes sortes de thé sont obtenues à partir de cette espèce. Simplement, les feuilles de thé sont traitées différemment. Ainsi, selon que les feuilles de thé ne sont pas fermentées, semi-fermentées ou fermentées avant d'être séchées, il est possible d'obtenir du thé vert (20% de la production mondiale), du thé oolong (2%) et du thé noir (78%)¹³⁶. La fermentation induit une oxydation enzymatique des polyphénols présents dans les feuilles en deux pigments majoritaires que sont les theaflavines et les thearubigines¹³⁸.

ii. Utilisations traditionnelles et médicales du thé vert

Le thé est la deuxième boisson la plus consommée au monde, juste derrière l'eau. Cette plante est cultivée dans plus de 30 pays. Elle a été découverte et cultivée pour la première fois en Asie de Sud Est par l'empereur chinois Shen Nung en 2737 avant J.C. Depuis, la popularité de cette boisson ne fait que croître et il a été calculé que 120 mL de thé sont consommés par personne et par jour dans le monde aujourd'hui¹³⁴.

L'activité promotrice de la santé du thé vert est connue depuis de nombreuses années et des études épidémiologiques relient la consommation régulière de thé à une réduction du risque d'atteintes cardiovasculaires et cancéreuses¹³⁸. Ainsi, le taux de polyphénols retrouvé dans le serum et les tissus de buveurs régulier de thé vert est compris entre 0,1 et 1 μM est peut être mis en parallèle avec l'effet prophylactique de cette plante pour certains cancers, allant même jusqu'à faire du thé vert une médecine alternative aux anticancéreux et à certains antibiotiques utilisés dans certaines affections¹³⁵, d'autant plus que jusque là aucun effet secondaire notable n'a été recensé¹³⁷. Cependant, des études récentes tendent à limiter l'usage du thé vert à la seule prévention des cancers, le traitement curatif de ces atteintes ne donnant pas de résultats probants¹³³.

¹³⁸ (138) Menet, M. C.; Sang, S.; Yang, C. S.; Ho, C. T.; Rosen, R. T. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2455.

Aujourd'hui de nombreux produits tels que des boissons, des crèmes glacées et des soins dermo-cosmétiques sont supplémentés en extraits de thé vert¹³⁴.

iii. Composition des extraits de thé vert

Les molécules majoritaires responsables des effets positifs du thé vert sur la santé sont les dérivés de la catechine¹³⁹. Ils sont retrouvés en plus ou moins grande quantité dans les fruits mais également le vin, la bière et le chocolat, bien que leur proportion la plus importante soit retrouvée dans les extraits de thé vert. La fraction polyphénolique du thé vert représente 30 à 40% des molécules extraites¹³⁷. Il y a 12 molécules de ce type retrouvées majoritairement dans le thé vert : l'**epiafzelechine (EZ)**, l'**epiafzelechine gallate (EZG)**, la **catechine (C)**, l'**epicatechine (EC)**, la **gallo catechine (GC)**, l'**epigallo catechine (EGC)**, la **catechine gallate (CG)**, l'**epicatechine gallate (ECG)**, l'**epicatechine methylgallate (ECMG)**, la **gallo catechine gallate (GCG)**, l'**epigallo catechine gallate (EGCG)** et l'**epigallo catechine methylgallate (EGCMG)**. Elles sont présentées ci-après (Figure 105, Tableau 12).

molécule	Formule brute	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	[M-H] ⁻ théorique
EZ	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	274,08412	273,07685
C	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,07904	289,07176
EC	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290,07904	289,07176
GC	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306,07395	305,06668
EGC	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	306,07395	305,06668
EZG	C ₂₂ H ₁₈ O ₉	426,09508	425,08781
CG	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	442,09000	441,08272
ECG	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	442,09000	441,08272
ECMG	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₀	456,10565	455,07763
GCG	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	458,08491	457,07763
EGCG	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	458,08491	457,07763
EGCMG	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₁	472,10056	471,09329

Tableau 12 : formules brutes, masses molaires et ions pseudomoléculaires [M-H]⁻ théoriques des principaux dérivés de la catechine du thé vert

¹³⁹ (139) Zeeb, D. J.; Nelson, B. C.; Albert, K.; Dalluge, J. J. *Anal. Chem.* **2000**, 72, 5020.

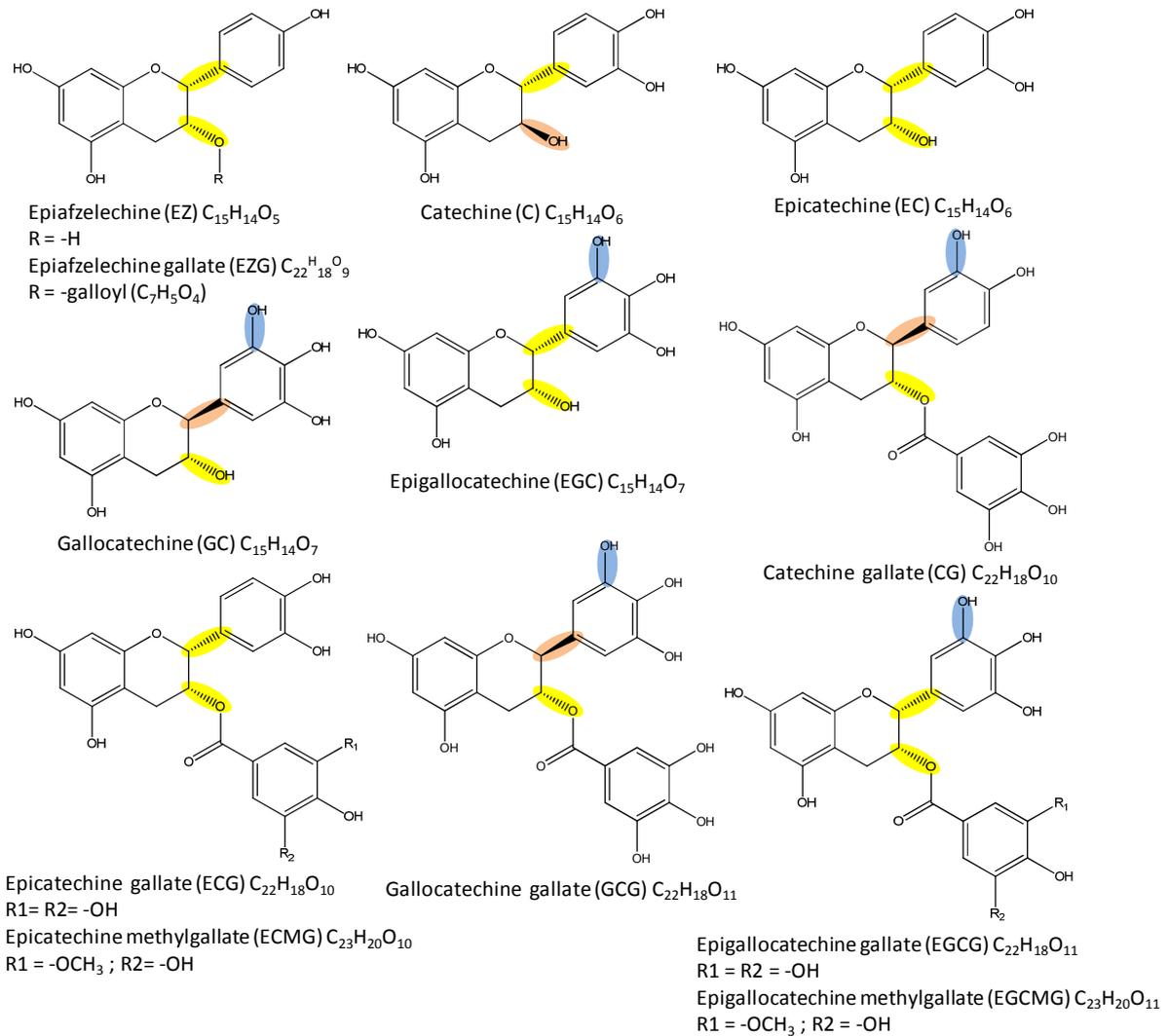


Figure 105 : Structures des 12 principaux dérivés de la catechin du thé vert (*Camellia sinensis*)

Parmi ces différentes molécules, seul l'EGCG a démontré jusqu'à présent une activité anticancéreuse par liaison à la DHFR. Il a été calculé qu'une tasse de thé vert contient environ 400 mg de polyphénols dont environ 200 mg d'EGCG¹³⁴. Les autres molécules sont cependant en quantités bien moindre dans l'extrait et présentent également des activités antioxydantes prononcées¹³⁵.

A côté de ces molécules susmentionnées d'autres polyphénols et glycosides sont également retrouvés tels que l'acide chlorogénique, l'acide coumaroylquinique, la théogalline, l'acide quinique ainsi que des caroténoïdes, de la lignine, de la chlorophylle, de la caféine, de la theophylline, de la théobromine et de la théamine¹³⁷.

iv. Matériel végétal et préparation d'extraits de thé vert

Le matériel végétal utilisé au cours de ces études de criblage d'extraits de thé vert a été du thé vert de type « gunpowder » disponible commercialement (R. Twinning & Co. Ltd, London, England).

L'extrait a été préparé en faisant macérer 400 mg de feuilles séchées de thé vert dans 10 mL d'eau ultrapure titrant 1 mM d'acide ascorbique (vitamine C), une journée à température ambiante. L'acide ascorbique utilisé au cours de ces études était pur à 99,5% (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). L'acide ascorbique a été ajouté aux extraits pour son activité antioxydante. Les composés intéressants (Tableau 12) présentent eux même des propriétés de ce type très marquées¹⁴⁰ et sont de ce fait également sensibles à des phénomènes d'autooxydation¹⁴¹. Un extrait de thé vert préparé dans les mêmes conditions mais sans acide ascorbique, n'a donné aucun signal de composés polyphénoliques lorsqu'analysé en MALDI-TOFMS avec l'acide sinapinique comme matrice.

Les extraits ainsi obtenus étaient donc directement compatibles avec notre protocole mais ont été avant toute chose caractérisés par MALDI-TOFMS et ESI-FTICRMS.

v. Caractérisation par spectrométrie de masse de masse des extraits de thé vert

L'extrait de thé vert a été analysé dans un premier temps en MALDI-TOFMS. Les analyses ont été menées en mode de détection négatif avec l'acide sinapinique utilisé comme matrice car cette méthode nous a permis d'atteindre les meilleurs résultats dans le cadre de l'analyse de composés polyphénoliques. Bien que la matrice SA ne soit généralement pas considérée comme pleinement compatible avec l'analyse de composés de basse masse (du fait de la présence de nombreux pics interférant), elle a donné dans le cadre de nos travaux de meilleurs résultats en termes de sensibilité que les autres matrices testées (2,5-DHB, HCCA, éponge à proton, HABA et dithranol) en mode de détection négatif. Ainsi, la solution de matrice utilisée est SA à saturation (20 mg/mL) dans un mélange acétonitrile/eau (v/v), ajusté à 0,1% d'ammoniaque.

¹⁴⁰ (140) Kerwin, J. L. *J. Mass. Spectrom.* **1996**, *31*, 1429.

¹⁴¹ (141) Tanaka, T.; Mine, C.; Kouno, I. *tetrahedron* **2002**, *58*, 8851.

Ainsi, 1 μ L de l'extrait de thé vert a été déposé avec 1 μ L de la matrice SA et les résultats obtenus lors de l'analyse par MALDI-TOFMS en mode de détection négatif sont présentés dans la Figure 106 ci-après.

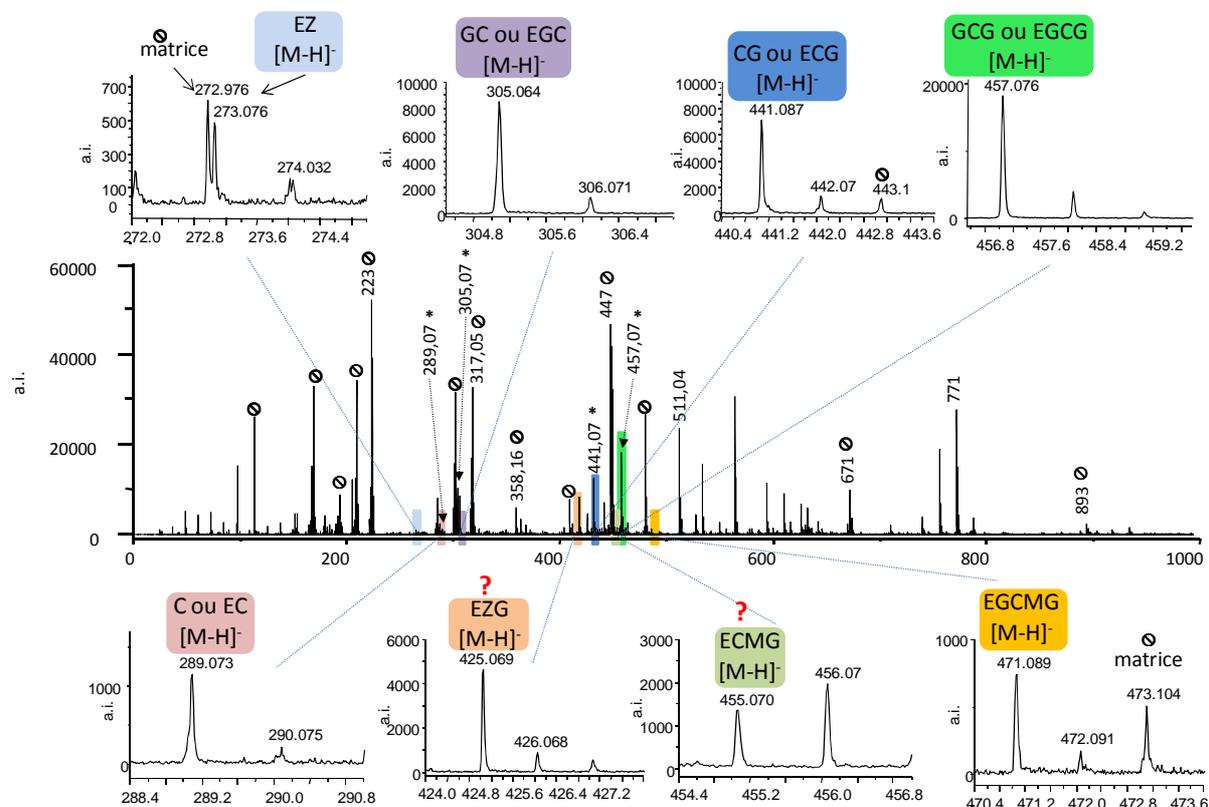


Figure 106 : Spectre MALDI-TOFMS d'un extrait aqueux de thé vert (matrice SA, mode de détection négatif) (pics de matrice ⊙)

Des signaux caractéristiques (pics pseudomoléculaires [M-H]⁻) de différentes espèces polyphénoliques sont retrouvés en MALDI-TOFMS pour l'extrait de thé vert. Ces molécules sont l'epiafzelechine (**EZ**) [M-H]⁻_{expérimental} = 273,076 Th (erreur de 3 ppm par rapport à la masse théorique), la cathechine ou l'epicatechine (**C ou EC**) [M-H]⁻_{expérimental} = 289,073 Th (erreur de 4,3 ppm), la gallocatechine ou l'epigallocatechine (**GC ou EGC**) [M-H]⁻_{expérimental} = 305,064 Th (erreur de 8,7 ppm), la catechine gallate ou l'epicatechine gallate (**CG ou ECG**) [M-H]⁻_{expérimental} = 441,087 Th (erreur de 3 ppm), la gallocatechine gallate ou l'epigallocatechine gallate (**GCG ou EGCG**) [M-H]⁻_{expérimental} = 457,076 Th (erreur de 3,5 ppm) et l'epigallocatechine methylgallate (**EGCMG**) [M-H]⁻_{expérimental} = 471,089 Th (erreur de 9 ppm). L'attribution de ces espèces se fait quasi sans ambiguïté du fait de la précision de la mesure et de la résolution suffisante pour les différencier des pics de matrice interférant. Pour deux espèces présentes dans l'extrait, l'attribution est cependant plus difficile. En effet, les pics pouvant correspondre à l'epiafzelechine gallate (**EZG**) [M-H]⁻_{expérimental} = 425,069 Th

présente une erreur de 40 ppm par rapport à la masse théorique attendue. De même pour le pic de l'epicatechine methylgallate (**ECMG**) $[M-H]^-$ $_{\text{expérimental}} = 455,070$ Th dont l'écart par rapport à la masse théorique est de 16 ppm.

Pour confirmer ou infirmer ces attributions en vue de la mise en œuvre de notre protocole de criblage sur les extraits de thé vert, la même solution a été analysée en ESI-FTICRMS compatible avec une ionisation efficace des polyphénols. En effet, l'analyse par MALDI-FTICRMS des extraits de thé vert à 355 nm avec l'acide sinapinique comme matrice en mode de détection négatif, n'a pas permis d'acquérir des signaux correspondants à des espèces polyphénoliques (sans doute du fait de la sensibilité moindre et de la longueur d'onde de laser employé). Le spectre de masse obtenu en ESI-FTICRMS pour l'extrait de thé vert est présenté en Figure 107.

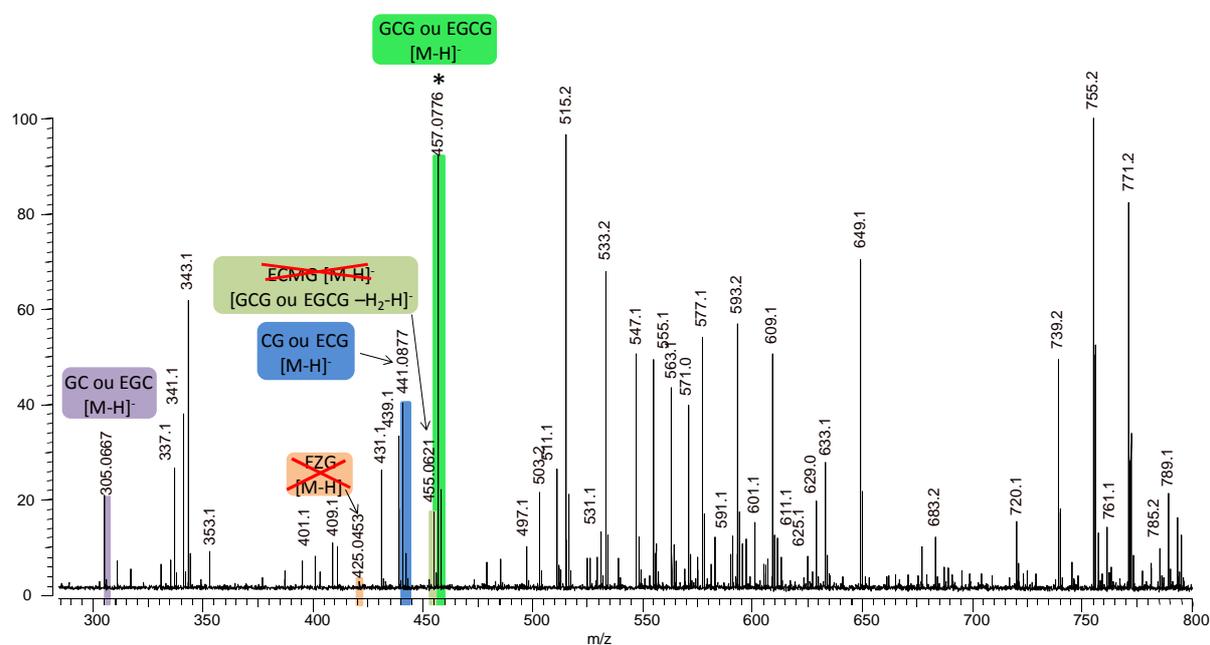


Figure 107 : Spectre ESI-FTICRMS d'un extrait aqueux de thé vert (mode de détection négatif)

Comme le montre le spectre le profil de l'extrait de thé vert obtenu par spectrométrie de masse ESI-FTICRMS est très différent de celui obtenu par MALDI-TOFMS. Ceci vient en majeure partie de la moindre sensibilité de la détection FTICRMS par rapport à l'analyseur en temps de vol mais également du processus d'ionisation propre à l'ESI. Ainsi, aucune des espèces situées sous 300 Da n'est détectée en ESI (**EZ** et **C ou EC**), de même que pour les espèces dont les signaux obtenus en TOFMS sont faibles telles que l'**EGCMG**. Cependant, les pics correspondants à la **GC ou l'EGC** $[M-H]^-$ $_{\text{expérimental}} = 305,0667$ Th (erreur de 0,6 ppm), à la **CG ou l'ECG** $[M-H]^-$ $_{\text{expérimental}} = 441,0877$ Th (erreur de 2 ppm) ainsi qu'à la **GCG ou**

l'EGCG $[M-H]^-$ expérimental = 457,0776 Th (erreur de 0,6 ppm) sont attribués sans ambiguïtés par la précision de mesure en masse permise par la détection FTICRMS.

D'autre part, le pic pouvant correspondre à l'EZG $[M-H]^-$ expérimental = 425,0453 Th, dont l'attribution par TOFMS était déjà douteuse, montre ici un écart de 100 ppm par rapport à la masse théorique de ce composé. Une telle valeur nous permet d'écarter cette attribution et de ne pas considérer cette espèce dans la suite de nos travaux. De même le pic initialement attribué à l'ECMG $[M-H]^-$ expérimental = 455,0621 Th montre un écart de 34 ppm avec la valeur théorique. Cependant, ce pic peut être attribué avec un écart de 0,2 ppm à une espèce correspondant à $[EGCG-H_2-H]^-$.

Des expériences de MSMS ont été menées sur les pics de polyphénols les plus intenses pour assurer leur attribution. Un exemple de résultat obtenu en SORI-CID-ESI-FTICRMS pour l'EGCG est présenté en Figure 108.

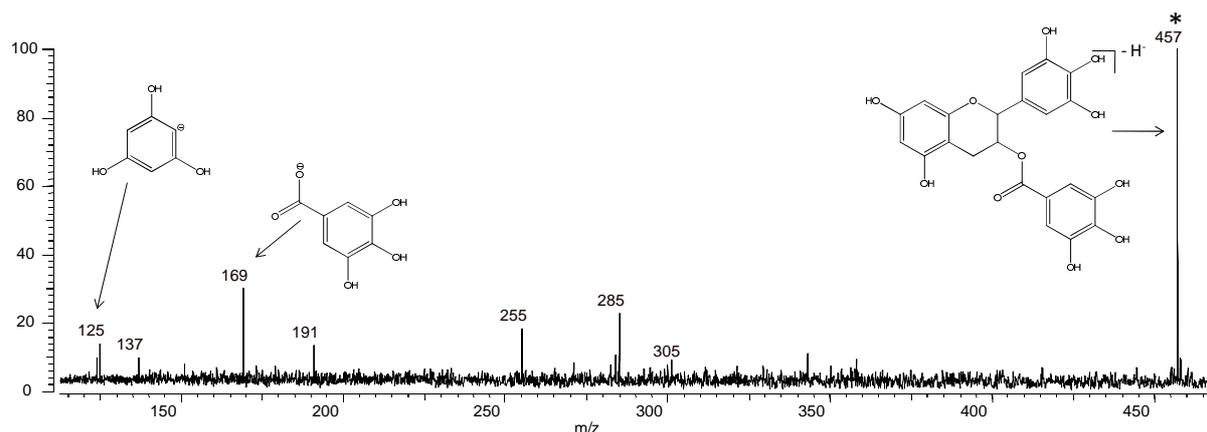


Figure 108 : Spectre de masse SORI-CID-ESI-FTICRMS du pic de l'extrait de thé vert attribué à l'EGCG ($[M-H]^- = 457,07$ Th)

Les fragmentations obtenues lors de l'étude MSMS en mode SORI-CID du pic attribué à l'EGCG sont en accord avec celles publiées par ailleurs pour ce type de composé¹⁴² (avec la présence notable d'un pic à $m/z = 169$ Th correspondant à l'acide gallique et un pic à $m/z = 125$ Th correspondant au « noyau A » (A ring), structure caractéristique des dérivés de la catechine). Le mécanisme de fragmentation proposé par ces auteurs est présenté ci-après (Figure 109).

¹⁴² (142) Miketova, P.; Schram, K. H.; Whitney, J.; Li, M.; Huang, R.; Kerns, E.; Valvic, S.; Timmermann, B. N.; Rourick, R.; Klohr, S. *Journal of mass spectrometry* **2000**, *35*, 860.

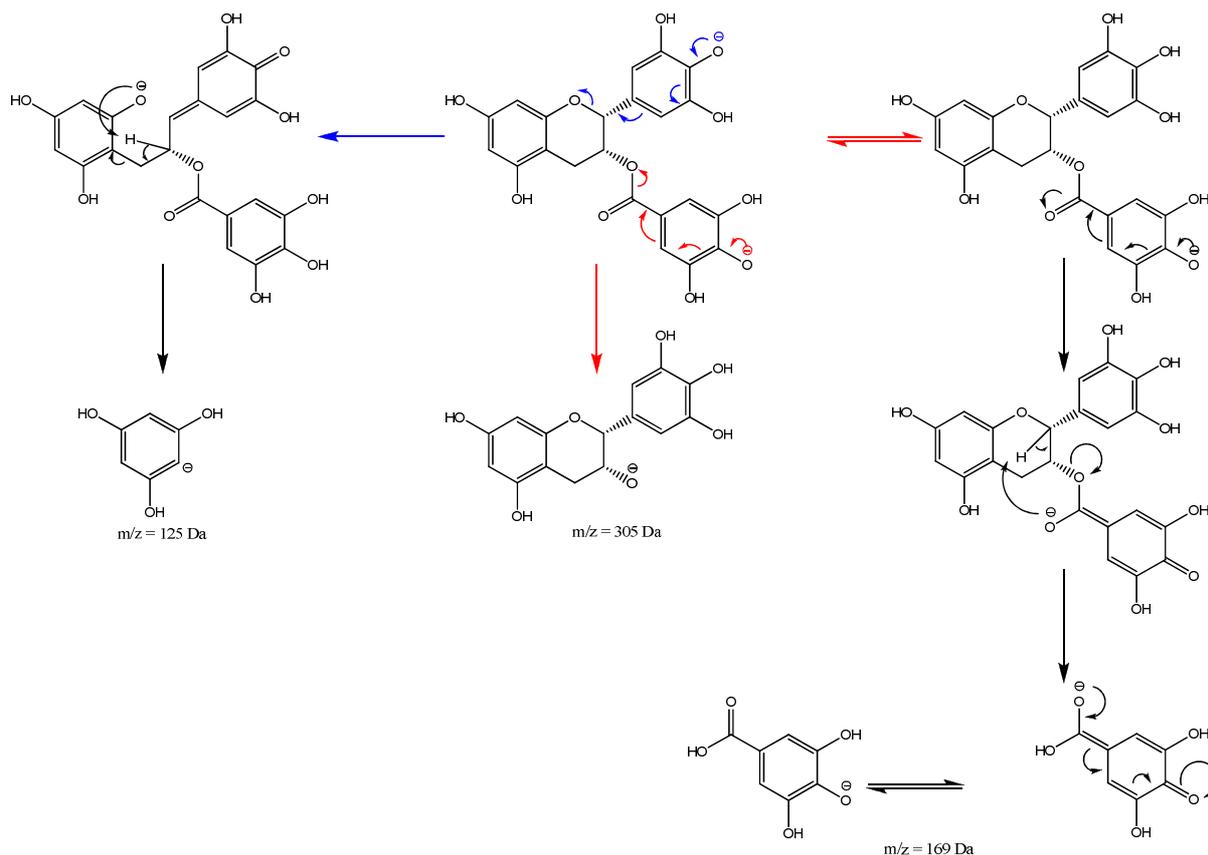


Figure 109 : mécanisme proposé pour la fragmentation de l'EGCG¹⁴²

Ainsi, comme le montrent ces résultats tant en MSMS qu'en spectrométrie de masse haute résolution, l'extrait que nous avons obtenu contient de façon certaine des molécules polyphénoliques dont l'activité anti-DHFR a déjà été mise en évidence. Il est donc très intéressant de mener à bien un criblage de ces extraits à la recherche des composés actifs pouvant être employés pour le traitement de cancers.

vi. Criblage primaire des extraits de thé vert

Cet extrait aqueux de thé vert contenant des molécules polyphénoliques a été ainsi incubé avec la DHFR (100 μL d'extrait de thé vert, 200 μL de la solution de DHFR (6.10^{-7} M) et 200 μL d'acide ascorbique (1 mM) en solution dans de l'eau ultrapure) pendant une heure à 37°C.

Cette solution a ensuite été filtrée sur microconcentrateur 10000 et la membrane du filtre lavée 3 fois par 500 μL d'une solution d'acide ascorbique (1 mM) dans de l'eau

ultrapure. Les composés retenus sur la membrane du filtre ont été alors élués à l'aide de 25 μ L de la solution d'acide ascorbique (1 mM).

L'analyse directe par MALDI-TOFMS de cette solution éluée a été menée à bien avec la matrice SA en mode de détection négatif et le spectre obtenu est comparé à celui de l'extrait de thé vert brut sans incubation avec la DHFR (Figure 110).

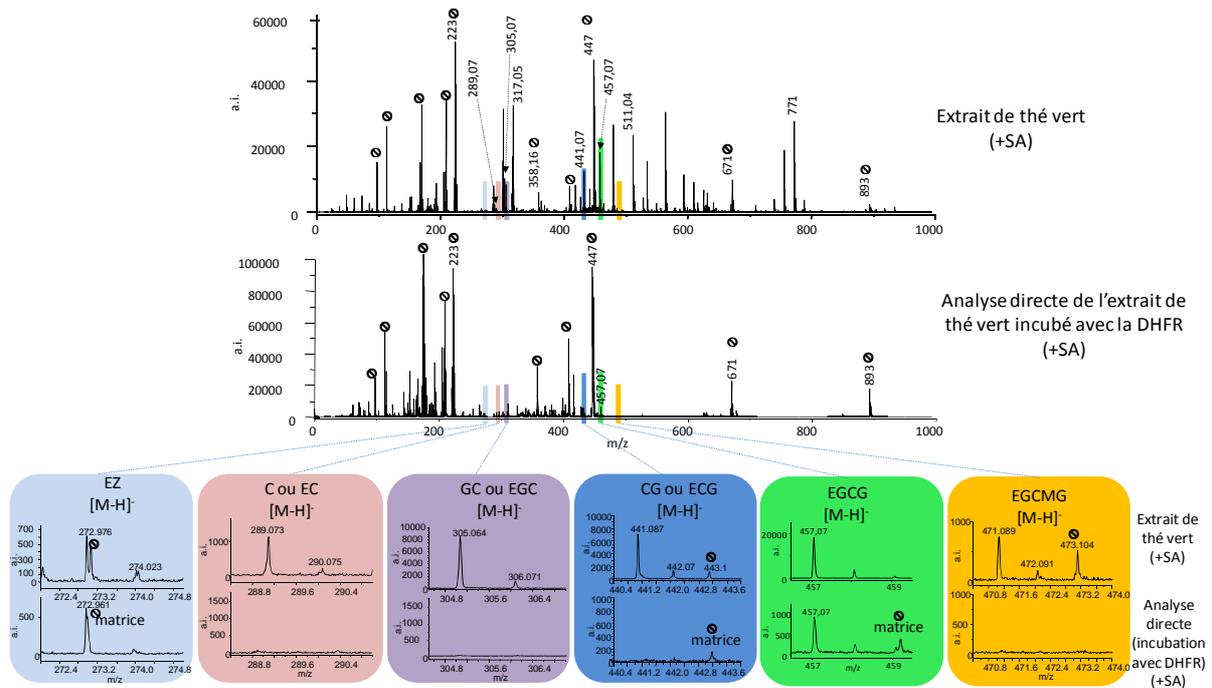


Figure 110 : Spectres MALDI-TOFMS obtenus lors de l'analyse de l'extrait de thé vert (matrice SA) et de la solution obtenue à partir des microconcentrateurs après incubation du même extrait avec la DHFR, filtration, lavages et élution (matrice SA). En cartouche sont présentés les agrandissements des zones des spectres correspondantes aux différents polyphénols présents dans l'extrait de thé vert (pics de matrice ⊙)

L'analyse directe par MALDI-TOFMS de la solution éluée montre qu'un grand nombre de molécules extraites du thé vert sont éliminées durant l'étape de lavage et ne montre ainsi aucune capacité de liaison à la DHFR. Outre les pics de matrice, la seule espèce de l'extrait de thé n'étant pas éliminée lors du protocole lorsque incubée avec la DHFR est l'EGCG comme le montre la présence significative de son pic pseudomoléculaire $[M-H]^-$ lors de l'analyse directe (la GCG, isobare de l'EGCG, est décrite comme dépourvue de toute activité de liaison¹³⁵). La présence de ce pic après que le protocole de criblage ait été mis en œuvre montre que **l'EGCG est un agent se liant à la DHFR**. Ainsi, là encore, notre protocole de criblage nous a permis de mettre en évidence une espèce se liant à la DHFR à partir d'un extrait brut de plante (le thé vert).

vii. Criblage secondaire des extraits de thé vert

Comme l'extrait de thé vert ne contient qu'une seule molécule active, il nous a été possible de mener à bien un criblage secondaire sur ce même extrait pour déterminer l'affinité relative de l'EGCG pour la DHFR.

Ainsi, une fois que cette molécule active a été mise en évidence lors de l'application de notre protocole en analyse directe (criblage primaire), 5 μL de la solution éluée ont été dénaturés 10 minutes par 5 μL d'acétonitrile. Après ce temps de dénaturation, des dépôts de 2 μL de cette solution ont été réalisés avec ajout de 1 μL de solution de matrice SA et analysés par MALDI-TOFMS en mode de détection négatif. Le spectre obtenu pour l'EGCG est comparé à celui obtenu lors de l'analyse directe et présenté en Figure 111.

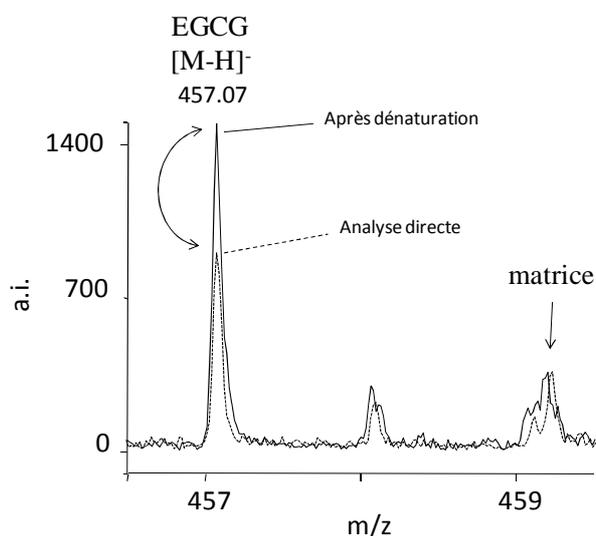


Figure 111 : Spectre MALDI-TOFMS de l'EGCG présent dans une solution de thé vert incubé avec la DHFR (après filtration, lavages et élution) avant et après dénaturation 10 minutes par de l'acétonitrile

Comme le montre la comparaison des deux spectres, l'intensité moyenne du pic correspondant à l'EGCG augmente après dénaturation par rapport à l'analyse directe. Cela va dans le sens d'une libération de cette molécule à partir de son site de liaison sur la DHFR lors de la dénaturation. Il est alors possible de calculer un rapport $R(\text{EGCG})$ et de le comparer à ceux obtenus pour les autres molécules se liant à la DHFR étudiées précédemment (acide folique, acide folinique, pyriméthamine, méthotrexate et aminoptérine) (cf. chapitre 3). Cette expérience a été faite 2 fois et 9 acquisitions différentes ont été enregistrées pour chacune d'elles avant et après dénaturation. Le rapport $R(\text{EGCG})$ calculé comme précédemment est égal à $1,75 \pm 0,33$ (l'incertitude expérimentale peut être diminuée à $\pm 0,11$ en prenant en

compte la répétition des expériences). En comparant ce rapport (dont la valeur est indépendante de la matrice et du mode de détection utilisé) avec ceux obtenus pour les molécules étalon, R(EGCG) peut être considéré comme se situant entre R(pyriméthamine) = $1,59 \pm 0,67$ et R(méthotrexate) = $1,86 \pm 0,68$. **En utilisant ces rapports l'affinité de l'EGCG pour la DHFR peut être déduite comme étant plus forte que celle de la pyriméthamine et plus faible que celle du méthotrexate.** Cette détermination expérimentale de l'affinité de l'EGCG pour la DHFR en utilisant des rapports calculés à partir des données MALDI-TOFMS est en accord avec les informations retrouvées dans la bibliographie¹³³.

Il a ainsi été démontré que par l'application de nos protocoles de criblage primaire et secondaire, directement sur des extraits de plantes, il était possible de faire un tri rapide des molécules se liant sur une cible moléculaire thérapeutique puis, à partir du même échantillonnage, d'en déterminer la gamme d'affinité. Dans ce cadre, le criblage du thé vert à la recherche de molécules liant la DHFR a montré que l'EGCG possédait des qualités intéressantes en étant détecté lors de l'analyse directe (après incubation de l'extrait aqueux de thé vert avec la DHFR, filtration, lavages et élution). Après avoir dénaturé la DHFR présente dans la solution éluée, un rapport propre à l'EGCG a pu être calculé et nous a permis de déterminer dans quelle gamme se situait son affinité pour cette cible.

CONCLUSION

Dans ce dernier chapitre, nous avons présenté l'application des protocoles que nous avons mis en place pour le criblage d'extraits de plantes. Cette démarche a prouvé pouvoir mener à la mise en évidence de nouvelles molécules potentiellement anticancéreuses. Nos deux protocoles de criblage ont été appliqués au criblage du colchique d'automne et de la pervenche de Madagascar pour ce qui est de la tubuline, et au thé vert en ce qui concerne la DHFR. Cette démarche a permis, à partir de différents extraits de ces plantes, de mettre en évidence **20 molécules actives**, se liant à l'une ou l'autre des cibles moléculaires utilisées (la tubuline ou la DHFR) : la **colchicine**, la **démécolcine**, la **colchiceine** et la **cornigérine** extraites du colchique ; la **catharanthine**, la **vindoline**, l'**anhydrovinblastine**, la **leurosine**, la **vinblastine**, la **vincristine** et les **9 différents adduits** (+CH₂CH₂Cl, +CH₂Cl, +CH₂Br de l'anhydrovinblastine, la leurosine et la vinblastine) extraits de la Pervenche de Madagascar ;

l'**EGCG** extrait du thé vert pour lequel une valeur d'affinité relative a également pu être calculée.

Nous nous sommes attachés à faire préalablement une description botanique précise de chaque plante, à établir une liste des produits ayant été référencés dans leurs différents extraits et à caractériser par spectrométrie de masse les extraits que nous avons préparés. Bien que ces étapes ne soient pas obligatoires en vue du criblage, elles permettent d'éviter par la suite tout problème de déréplication (une même molécule étant considérée plusieurs fois comme une touche car extraite de plusieurs plantes ou parties de plantes). Il est généralement acquis cependant, dans le cadre du criblage d'une plante par une industrie pharmaceutique, d'effectuer la démarche inverse, c'est-à-dire de cribler en premier lieu les extraits à la recherche d'une activité biologique et de ne s'intéresser à leur caractérisation que si une touche est mise en évidence¹⁴³.

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

Conclusion générale

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

Nous avons ainsi présenté l'intérêt de la mise en place de nouveaux tests de criblages pour la recherche de nouveaux médicaments tant la santé publique doit faire face, aujourd'hui encore, à des atteintes graves. Ainsi, après avoir décrit en détails « l'état de l'art » du criblage moléculaire par spectrométrie de masse, nous avons présenté l'intérêt de **développer une nouvelle approche, simple, fiable et potentiellement automatisable** pour étudier la liaison de composés à des cibles moléculaires. Nous avons donc décidé de mettre en place une nouvelle approche de criblage moléculaire par spectrométrie de masse MALDI-MS présentant toutes les qualités requises pour devenir une méthode intéressante en criblage.

Nous avons alors présenté l'organisation générale de notre protocole, s'articulant en **trois étapes successives** qui sont **l'incubation une heure à 37°C dans l'eau ultrapure** des molécules à tester avec la cible moléculaire protéique choisie (la tubuline ou la DHFR, décrites par ailleurs), **l'élimination des composés non liés par filtration/centrifugation sur microconcentrateurs** et enfin **l'analyse par MALDI-TOFMS des composés liés** directement sans traitement d'échantillon (**analyse directe**) ou après 1 heure de **digestion de la cible moléculaire par la trypsine**, ou après 10 minutes de **dénaturation par ajout d'acétonitrile**.

Après avoir présenté l'optimisation de la détection des composés d'intérêt (cibles moléculaires et témoins positifs) par MALDI-TOFMS nous avons décrit et validé les résultats qui peuvent être obtenus par l'application de notre protocole qui sont une **discrimination aisée entre une molécule active et une autre non active** avec une précision, une reproductibilité et une robustesse appréciables. Par le calcul des facteurs de qualités des tests, notre démarche a ainsi fait la preuve d'un **potentiel non négligeable dans le cadre de campagnes de criblages**, avec un débit pouvant être évalué à 60 échantillons en 1h50 à 3h30 soit de 18 à 32 échantillons à l'heure. Enfin, une démarche tout à fait innovante de calcul de ratios propres à chaque molécule active nous a permis de prouver que outre cet intérêt en criblage primaire, notre approche pouvait permettre d'**atteindre des informations relatives à**

l'affinité relative des composés pour leur cible moléculaire, et ce en une seule étape d'échantillonnage.

En dernier lieu, **l'application de notre approche à des extraits brutes de plantes** (Colchique d'Automne, Pervenche de Madagascar et Thé vert) à permis de mettre en évidence **20 molécules actives** se liant à l'une ou l'autre des cibles moléculaires utilisées (la tubuline ou la DHFR) et d'évaluer l'affinité relative de l'une d'entre elles.

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

Les perspectives de ces travaux sont nombreuses. En effet, actuellement de nombreux tests différents sont utilisés pour cribler des banques de molécules et de nombreuses techniques sont mises en œuvre. Compte tenu qu'il est bien souvent nécessaire pour les industries pharmaceutiques d'utiliser plusieurs tests pour avoir des informations complémentaires au sujet des molécules testées, l'intérêt de notre protocole est d'autant plus vif qu'il permet en une seule étape d'obtenir des réponses qualitatives et quantitatives. De plus ce dernier ne met pas en jeu de matériel très coûteux, avec un coût unitaire par molécule testée d'environ 65 centimes d'euro auquel il faut ajouter l'achat d'un spectromètre de masse à temps de vol et source MALDI (coût moyen d'environ 200000€). Il est à noter cependant que ce type d'équipement est largement répandu dans les laboratoires de recherches pharmaceutiques. De plus le protocole n'est pas sensible aux pollutions et ne nécessite pas d'étape de purification. Enfin, le risque de pollution croisée est minime du fait que le matériel n'est pas réutilisé d'une analyse à une autre.

La valorisation du protocole peut passer par de nombreuses applications au sein des industries pharmaceutiques en campagne de « criblage » de banques de molécules. La suite à donner à ces travaux est de les appliquer à d'autres cibles thérapeutiques intéressant d'autres pathologies que les atteintes cancéreuses. Ainsi il faut faire valoir ces travaux auprès d'industries pharmaceutiques pour y trouver des applications en relation avec les recherches de pointe actuelles. Ces dernières ont en effet recours à des techniques de criblage aux premiers stades de développement des médicaments de manière à sélectionner très vite les molécules intéressantes.

Une autre approche intéressante consisterait à faire un criblage inverse, c'est-à-dire, de partir d'une molécule active biologiquement mais dont la cible n'a pas encore été identifiée et de la mettre en contact avec différentes protéines isolées. Ce criblage inverse peut permettre de répondre à un besoin émergent des industries pharmaceutiques, qui cherchent à présent à valoriser des molécules déjà développées en élargissant leurs applications. Cette démarche permet en effet d'aboutir à de nouvelles indications, pour un coût de développement très réduit.

La deuxième stratégie envisagée pour la valorisation de ces travaux est la création d'une entreprise innovante, dédiée au criblage de molécules, notamment extraites des plantes, dans le cadre de la recherche de molécules actives sur différentes pathologies. Les campagnes de criblage pourront ainsi se faire sur la base de demandes d'industries ou à l'initiative de l'entreprise dans le but de découvrir des nouvelles molécules actives.

Bibliographie

- (1) Boyle, P.; Ferlay, J. *ann. oncol.* **2005**, *16*, 481.
- (2) Hannun, Y. A. *blood* **1997**, *89*, 1945.
- (3) Lee, M. S.; Kerns, E. H. *mass spectrometry reviews* **1999**, *18*, 187.
- (4) Tammela, P. screening methods for the evaluation of biological activity in drug discovery, University of Helsinki, 2004.
- (5) Banerjee, P. K.; Rosofsky, M. *script magazine* **1997**, 35.
- (6) Vistoli, G.; Pedretti, A.; Testa, B. *Drug discovery today* **2008**, *13*, 285.
- (7) Shoemaker, R. H.; Scudiero, D. A.; Melillo, G.; Currens, M. J.; Monks, A. P.; Rabow, A. A.; Covell, D. G.; Sausville, E. A. *current topics in medicinal chemistry* **2002**, *2*, 229.
- (8) Malpas, J. S.; Rohatiner, A. *advances in oncobiology* **1996**, *1*, 317.
- (9) CNRS, C. d. p. d. Pierre Potier, médaille d'or du CNRS, 2005.
- (10) Santoro, A.; Cavina, R.; Latteri, F.; Zucali, P. A.; Ginanni, V.; Campagnoli, E.; Ferrari, B.; Morengi, E.; Pedicini, V.; Roncalli, M.; Alloisio, M.; Ravasi, G.; Parra, H. J. S. *Annals of Oncology* **2004**, *15*, 33–37.
- (11) Horiatis, D.; Wang, Q.; Pinski, J. *cancer letters* **2004**, *210*, 119.
- (12) Enjalbal, C.; Martinez, J.; Aubagnac, J. L. *mass spectrometry reviews* **2000**, *19*, 139.
- (13) Vinh, J. étude et caractérisation structurale des modifications post-traductionnelles de la tubuline par spectrométrie de masse (Thèse présentée pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie- Paris 6), université Pierre et Marie Curie, 1999.
- (14) Wong, C. K. L.; So, M. A.; Chan, T. W. D. *Eur. J. Mass Spectrom.* **1998**, 223.
- (15) Kebarle P.; Tang L. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*.
- (16) Dempster, A. J. *Phys. Rev.* **1918**, *11*, 316.
- (17) Vestal, M. L.; Juhasz, P.; Martin, S. A. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2005**, *9*, 1044
- (18) Frache, G. développements instrumentaux et méthodologiques appliqués à l'étude de particules issues de moteurs diesel de dernière génération par désorption/ionisation laser couplée à la spectrométrie de masse (Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Metz), Université Paul Verlaine de Metz, 2006.
- (19) Hofstadler, S. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **1994**, *5*, 894.
- (20) Little, D. P. *Anal Chem* **1994**, *66*, 2809.
- (21) Siegel, M. M. *current topics in medicinal chemistry* **2002**, *2*, 13.
- (22) Potier, N.; Barth, P.; Tritsch, D.; Biellmann, J. F.; VanDorsselaer, A. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 274.
- (23) Allardyce, C. S.; Dyson, P. J.; Coffey, J.; Johnson, N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 933.
- (24) Papac, D. I.; Shahrokh, Z. *pharmaceutical research* **2001**, *18*, 131.
- (25) Wigger, M.; Eyler, J. R.; Benner, S. A.; Li, W.; Marshall, A. G. *J Am Soc Mass Spectrom* **2002**, *13*, 1162–1169.
- (26) Pinkse, M. W. H.; Heck, A. J. R. *J Am Soc Mass Spectrom* **2004**, *15*, 1392–1399.
- (27) Nedved, M. L.; Habibi-Goudarzi, S.; Ganem, B.; Henion, J. D. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4228.
- (28) Schriemer, D. C.; Bundle, D. R.; Li, L.; Hindsgaul, O. *Angew. Chem.* **1998**, *37*, 3383.
- (29) Ogata, Y.; Scampavia, L.; Carter, T. L.; Fan, E.; Turebeka, F. *Analytical Biochemistry* **2004**, *331*, 161.
- (30) DeBasil, V.; Haskins, N.; Organ, A.; Bateman, R.; Giles, K.; Jarvis, S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 1165.

- (31) Wieboldt, R.; Zweigenbaum, J.; Henion, J. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1683.
- (32) Siegel, M. M.; Tabei, K.; Bebernitz, G. A.; Baum, E. Z. *journal of mass spectrometry* **1998**, *33*, 264.
- (33) VanBreemen, R. B.; Huang, C. R.; Nikolic, D.; Woodbury, C. P.; Zhao, Y. Z.; Venton, D. L. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2159.
- (34) Nikolic, D.; Breemen, R. B. v. *Comb. Chem. and HTS* **1998**, *1*, 47.
- (35) Holzman, T. F.; Harlan, J. E.; Egan, D. A.; Buko, A. M.; Solomon, L. R.; Lador, U. S.; Tang, Q. *PCT Int. Appl.* **2000**, 57.
- (36) Dunayevskiy, Y. M.; Lai, J. J.; Quinn, C.; Talley, F.; Vouros, P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 1178.
- (37) Hillenkamp, F. *NATO Asi Ser Ser C* **1998**, *510*, 181.
- (38) Seibert, V.; Wiesner, A.; Buschmann, T.; Meuer, J. *Pathology – Research and Practice* **2004**, *200*, 83–94.
- (39) Merchant, M.; Weinberger, S. R. *electrophoresis* **2000**, *21*, 1164.
- (40) Little, D. P.; Cornish, T. J.; O'Donnell, M. J.; Braun, A.; Cotter, R. J.; Koester, H. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4540.
- (41) Yanes, O.; Villanueva, J.; Querol, E.; Aviles, F. X. *drug discovery today* **2004**, *3*, 23.
- (42) Speicher, A.; Hollemeyer, K.; Heinzle, E. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, *15*, 124.
- (43) Dumontet, C.; Sikic, B. I. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 1061.
- (44) Jordan, M. A. *Curr. Med. Chem. - Anti-cancer agents* **2002**, *2*, 1.
- (45) Hu, W.; Dong, H.; Li, Y. Z.; Hu, X. T.; Han, G. J.; Qu, Y. B. *Acto Pharmacol Sin* **2004**, *25*, 775.
- (46) Barron, D. M.; Chatterjee, S. K.; Ravindra, R.; Roof, R.; Baloglu, E.; Kingston, D. G. I.; Bane, S. *analytical biochemistry* **2003**, *315*, 49.
- (47) Potier, P.
- (48) Verdier-Pinard, P.; Lai, J. Y.; Yoo, H. D.; Yu, J.; Marquez, B.; Nagle, D. G.; Nambu, M.; White, J. D.; Falk, J. R.; Gerwick, W. H.; Day, B. W.; Hamel, E. *molecular pharmacology* **1998**, *53*, 53.
- (49) Hamel, E.; Blokhin, A. V.; Nagle, D. G.; Yoo, H. D.; Gerwick, W. H. *drug development research* **1995**, *34*, 110.
- (50) Banerjee, S.; Chakrabarti, G.; Bhattacharyya, B. *biochemistry* **1997**, *36*, 5600.
- (51) Vandecandelaere, A.; Martin, S. R.; Engelborghs, Y. *Biochem. J.* **1997**, *323*, 189.
- (52) Jordan, M. A.; Wilson, L. *nature reviews, cancer* **2004**, *4*, 253.
- (53) Duflos, A.; Kruczynski, A.; Barret, J. M. *Curr. Med. Chem. - Anti-cancer agents* **2002**, *2*, 55.
- (54) Rai, S. S.; Wolff, J. *the journal of biological chemistry* **1996**, *271*, 14707.
- (55) Schweitzer, B. I.; Dicker, A. P.; Bertino, J. R. *FASEB J.* **1990**, *4*, 2441.
- (56) Matthews, D. A.; Bolin, J. T.; Burrige, J. M.; Filman, D. J.; Volz, K. W.; Kraut, J. J. *Biol. Chem.* **1985**, *260*, 392.
- (57) Widemann, B. C.; Balis, F. M.; Adamson, P. C. *clin. chem.* **1999**, *45*, 223.
- (58) Hillcoat, B. L.; Nixon, P. F.; Blakely, R. F. *Anal Biochem* **1967**, *21*, 178.
- (59) Brown, L. F.; Johnson, G. F.; Witte, D. L.; Feld, R. D. *clin. chem.* **1980**, *26*, 335.
- (60) McCullough, J. L.; Weinstein, G. D.; Hynes, J. B. *J. Invest. Dermatol.* **1977**, *68*, 362.
- (61) Johnson, B. M.; Nikolic, D.; Breemen, R. B. v. *Mass Spectrom. Rev.* **2002**, *21*, 76.
- (62) Kaye, S. B. *Br J Cancer* **1998**, *78*, 1.
- (63) Jolivet, J.; Cowan, K. H.; Curt, G. A.; Clendeninn, N. J.; Chabner, B. A. *N. Eng. J. Med.* **1983**, *309*, 1094.
- (64) Vangapandu, S.; Jain, M.; Kaur, K.; Patil, P.; Patel, S. R.; Jain, R. *Inc. Med Res Rev* **2007**, *27*, 65.
- (65) Jiang, L.; Hea, L.; Fountoulakis, M. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1023*, 317–320.
- (66) Harris, W. A.; Reilly, J. P. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 4410.

- (67) Nguyen, R. T.; Harvey, H. R. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2001**, *65*, 1467–1480.
- (68) Dumontet, C.; Sikic, B. I. *J Clin Oncol* **1999**, *17*, 1061.
- (69) Calba, P. J. Contribution à l'étude du mécanisme MALDI par l'utilisation de sondes moléculaires photochromiques (Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Metz), Paul Verlaine de Metz, 1998.
- (70) ICH, c. "Text on validation of analytical procedures Q2A", 1994.
- (71) ICH, c. "validation of analytical procedures: methodology Q2B", 1996.
- (72) Rajaian, H.; Symonds, H. W.; Bowmer, C. J. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* **1997**, *20*, 421.
- (73) Vicken, R.; Vorperian, M. D.; Thomas, C.; Miller, S.; Craig, T. *Journal of the American College of Cardiology* **1997**, *30*, 791.
- (74) Myung, S. W. *Rapid communications in Mass Spectrometry* **2000**, *14*, 2046.
- (75) Bussotti, L.; Ccelli, I.; D'Auria, M.; Foggi, P.; Lesma, G.; Silvani, A.; Villani, V. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 9079.
- (76) Park, Z. Y.; Russell, D. H. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 2667.
- (77) Kaur, S.; McGuire, L.; Tang, D.; Dollinger, G.; Huebner, V. *Journal of Protein Chemistry* **1997**, *16*, 505.
- (78) Okamoto, Y.; Sekine, T. *Journal of Biochemistry* **1978**, *38*, 1375.
- (79) May, J. M.; Qu, Z. C.; Beechem, J. M. *Biochemistry* **1997**, *32*, 9524.
- (80) ISO *Guide to the expression of uncertainty in measurements* Geneva, 1993.
- (81) Attard, G.; Greystoke, A.; Kaye, S.; Bono, J. D. *pathologie biologique* **2006**, *54*, 72.
- (82) Lobert, S.; Franfurter, A.; Correia, J. J. *cell motility and the cytoskeleton* **1998**, *39*, 107.
- (83) Cordell, G. A.; Quinn-Beattie, M. L.; Farnsworth, N. R. *phytotherapy research* **2001**, *15*, 183.
- (84) Boullard, B. *Plantes médicinales du monde réalités & croyances*, 2001; pp 636 pages
- (85) Bernard, B. *l'herbier oublié, secrets de plantes retrouvés*, éditions plumes de carottes ed., 2003.
- (86) Bellet, P.; Delaveau, P.; Delourme-Houdé, J.; Fourneau, J. P.; Gagnault, J. C.; Gorget, C.; Gueunier, C.; Potier, P. *pérennité des alcaloïdes* **1985**, 119.
- (87) Bruneton, J. *pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, Lavoisier ed. Paris, 1995.
- (88) Gagnault, J. C. *l'actualité chimique* **1981**, *9*, 13.
- (89) Robinson, T. *Alkaloids - The organic constituents of higher plants*; Cordus press: Amherst, 1991.
- (90) Köhler, F. E. *Köhler's Medizinal Pflanzen*, 1887.
- (91) Jaeger, A.; Flesch, F. *Colchicum autumnale*, 1990.
- (92) Huxley, A. H. *The new Royal Horticultural Society dictionary of Gardening*, MacMillan ed. London, 1992; Vol. 1.
- (93) Thies, P. W. *Pharm Unserer Zeit* **1985**, *14*, 149.
- (94) Dehon, B.; Chagnon, J. L.; Vinner, E.; Pommery, J.; Mathieu, D.; Lhermitte, M. *Biomed. Chromatogr.* **1999**, *13*, 235.
- (95) Brvar, M.; Kozelj, G.; Mozina, M.; Bunc, M. *Wien Klin Wochenschr* **2004**, *116*, 205.
- (96) Lenoir, G.; Sermet, I.; Duhamel, J. F. *Journal de pédiatrie et de puériculture* **2001**, *14*, 437.
- (97) Seliger, H. *Ther Umsch* **1958**, *15*, 158.
- (98) Dustin, P. *Rev Med Brux* **1989**, *10*, 385.
- (99) Ondra, P.; Vfilka, I.; ViCar, J.; Sfitltipinar, N.; gimfinek, V. *Journal of Chromatography A* **1995**, *704*, 351.
- (100) Ellington, E.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Codina, C. *phytochem. Anal.* **2003**, *14*, 164.
- (101) Santavy; Reichstein. *Helv. Chim. Acta.* **1950**, *33*, 1606.
- (102) Potessilova. *Collect. Czech Chem Commun* **1967**, *32*, 141.
- (103) Gaillard, Y.; Pepin, G. *Journal of Chromatography B* **1999**, *733*, 181–229.
- (104) Yoshida, K.; Hayashi, T.; Sano, K. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 593.

- (105) Vicar, J.; Klusakova, L.; Simanek, V. *Acta. Univ. Palacki. Olomuc Fac. Med.* **1993**, *136*, 5.
- (106) Santavy, F.; Preiminger, V.; Simanek, V.; Potesilova, H. *Planta Med* **1981**, *43*, 153.
- (107) Ueno, Y. *Proceeding of the Japan Academy* **1953**, *6*, 264.
- (108) Hamel, E.; Ho, H. H.; Gil-Jong, K.; Lin, C. M. *Biochemical pharmacology* **1988**, *37*, 2445.
- (109) Hostie, S. B.; MacDonald, T. L. *biochemical pharmacology* **1990**, *39*, 1271.
- (110) Poutaraud, A.; Girardin, P. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants* **2002**, *9*, 63.
- (111) VanDerHeijden, R.; Jacobs, D. I.; Snoeijer, W.; Hallard, D.; Verpoorte, R. *curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 607.
- (112) Stearn, T. *The Catharanthus alkaloids*; Taylor and Farnsworth, 1975.
- (113) Nammi, S.; Boini, M. K.; Lodagala, S. D.; Behara, R. B. S. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2003**, *3*.
- (114) Johnson, I. S.; Armstrong, J. G.; Gorman, M.; Jr, J. P. B. *cancer research* **1963**, *23*, 1390.
- (115) Svoboda, G. H. "the role of the alkaloids of catharanthus roseus (L.) G. Don (vinca rosea) and their derivatives in cancer chemotherapy"; plants: the potentials for extracting protein, medicines, and other useful chemicals, 1977, indianapolis.
- (116) Shanks, J. V.; Bhadra, R.; Morgan, J.; Rijhwani, S.; Vani, S. *biotechnology and bioengineering* **1998**, *58*, 333.
- (117) McCoy, E.; O'Connor, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14276.
- (118) Irshad, A. isolation and structural studies on the alkaloids of *Catharanthus roseus* (thèse de Doctorat Université de Karachi) Karachi, 1985.
- (119) Tikhomiroff, C.; Allais, S.; Klvana, M.; Hisiger, S.; Jolicoeur, M. *biotechnol Prog.* **2002**, *18*, 1003.
- (120) Johnson, I. S.; Wright, H. F.; Svoboda, G. H.; Vlantis, J. *cancer research* **1960**, *20*, 1016.
- (121) Jossang, A.; Fodor, P.; Bodo, B. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 7162.
- (122) Tikhomiroff, C.; Jolicoeur, M. *journal of chromatography A* **2002**, *955*, 87.
- (123) Wood, L. W. *canadian journal of fisheries and aquatic sciences* **1985**, *42*, 38.
- (124) Favretto, D.; Piovan, A.; Cappelletti, E. M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 982.
- (125) Trim, P. J.; Avery, J. L.; McEwen, A.; Snel, M. F.; Claude, E.; Marshall, P. S.; West, A.; Princivalle, A. P.; Clench, M. "MALDI-ion mobility separation-MS imaging of vinblastine and its metabolites in rat tissues"; ASMS, 2008, Denver.
- (126) Miller, J. C.; Gutowski, G. E.; Poore, G. A.; Boder, G. B. *journal of medicinal chemistry* **1976**, *20*, 409.
- (127) Besselièvre, R.; Langlois, N.; Potier, P. *Bulletin de la société chimique de france* **1972**, *4*, 1477.
- (128) Hardouin, C.; Doris, E.; Rousseau, B.; Mioskowski, C.; Nierlich, M. *acta crystallogr C.* **1999**, *225*.
- (129) Prakash, V.; Timasheff, S. N. *Biochem. J.* **1991**, *30*, 873.
- (130) Himes, R. H. *pharmacology and therapeutics* **1991**, *51*, 257.
- (131) Duflos, A.; Fahy, J.; Boullay, V. T. d.; Barret, J. M.; Hill, B. vinca alkaloid antimitotic halogenated derivatives US, 2000.
- (132) Fahy, J. *current pharmaceutical design* **2001**, *7*, 1181.
- (133) Yang, C. S.; Lambert, J. D.; Hou, Z.; Ju, J.; Lu, G.; Hao, X. *Mol. Carcinogen.* **2006**, *45*, 431.
- (134) Mukhtar, H.; Ahmad, N. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 1698.
- (135) Navarro-Peran, E.; Cabezas-Herrera, J.; Garcia-Canovas, F.; Durrant, M. C.; Thorneley, R. N. F.; Rodriguez-Lopez, J. N. *cancer res.* **2005**, *65*, 2059.
- (136) Mukhtar, H.; Ahmad, N. *Toxicol. Sci.* **1999**, *52*, 111.
- (137) Brown, M. D. *alternative medicine review* **1999**, *4*, 360.

- (138) Menet, M. C.; Sang, S.; Yang, C. S.; Ho, C. T.; Rosen, R. T. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2455.
- (139) Zeeb, D. J.; Nelson, B. C.; Albert, K.; Dalluge, J. J. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5020.
- (140) Kerwin, J. L. *J. Mass. Spectrom.* **1996**, *31*, 1429.
- (141) Tanaka, T.; Mine, C.; Kouno, I. *tetrahedron* **2002**, *58*, 8851.
- (142) Miketova, P.; Schram, K. H.; Whitney, J.; Li, M.; Huang, R.; Kerns, E.; Valvic, S.; Timmermann, B. N.; Rourick, R.; Klohr, S. *journal of mass spectrometry* **2000**, *35*, 860.
- (143) Quetin-Leclerc, J. *journal de pharmacie de belgique* **2002**, *57*, 11.

Index des figures et des tableaux

Figure 1 : stratégie de découverte de nouveaux médicaments.....	5
Figure 2 : Schéma des facteurs impliqués dans le développement de tests de criblages moléculaires ciblés ⁴	11
Figure 3 : équations permettant le calcul des différents paramètres de qualité.....	13
Figure 4 : Éléments constitutifs d'un spectromètre de masse.....	16
Figure 5 : illustration de la courbe d'ablation et de la "fenêtre MALDI" en fonction de l'énergie du laser incident	18
Figure 6 : exemple de spectre MALDI-TOFMS d'une solution de vinblastine (810,3 g/mol) à 1.10^{-6} M (matrice utilisée 2,5-DHB 1 M)	23
Figure 7 : représentation schématique d'une source ESI.....	24
Figure 8 : Représentation graphique de la mesure de résolution à 50% de vallée.....	25
Figure 9 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse à temps de vol.....	28
Figure 10 : Influence de la durée d'impulsion laser sur l'élargissement des pics	29
Figure 11 : Influence de la distribution spatiale sur l'élargissement des pics.....	29
Figure 12 : Influence de la dispersion d'énergie cinétique sur la perte de résolution.....	30
Figure 13 : Principe de l'extraction pulsée (PIE : Pulsed Ion Extraction) (1 : impulsion laser à $t=t_0$; 2 : temps de retard à l'extraction ($t=\tau$) ; 3 : accélération des ion ($t=t_0+ \tau$).....	31
Figure 14 : Principe de la refocalisation des énergies cinétiques	32
Figure 15 : (a) réflecteur à 1 étage ; (b) réflecteur à 2 étages	33
Figure 16 : (a) spectre LDI-TOFMS de l'échantillon de particules de moteur diesel, le spectre de sélection de l'ion parent ($m/z = 234$) est présenté en encart ; (b) spectre LDI-PSD-TOFMS de l'ion sélectionné ($m/z = 234$) ¹⁸	34
Figure 17 : schéma de l'analyseur TOFMS utilisé au cours de cette étude (Bruker Reflex IV).....	35
Figure 18 : étude de l'écart type sur l'intensité moyenne du pic à $[M+H]^+$ de la vinblastine (solution à 1.10^{-6} M) obtenu par MALDI-TOFMS (1 série et 4 séries de X tirs laser ($10 < X < 100$))	36
Figure 19 : porte échantillon du MALDI-TOFMS	37
Figure 20 : Source externe du FT-ICRMS IonSpec Explorer, Champ magnétique de 9,4 Tesla.....	38
Figure 21 : schéma de la cellule d'analyse FTICRMS équipant notre spectromètre de masse (IonSpec-Varian)	38
Figure 22 : schéma de l'analyseur FTICRMS utilisé au cours de cette étude (Explorer FTMS 9.4T, module ProMALDI)	43
Figure 23 : Représentation schématique des différents paramètres mis en jeu lors d'une analyse MALDI-FTICRMS (Omega® Varian-IonSpec)	44
Figure 24 : Représentation schématique des différentes stratégies de criblage moléculaire par spectrométrie de masse.....	48
Figure 25 : spectre de masse ESI FTICR (9,4T) du récepteur SH2 (M) incubé avec une librairie de ligands peptidiques (L). Le spectre présente différents états de charge du récepteur et les complexes non covalents $[M+L]$ sont marqués par * ²⁵	49
Figure 26 : Schéma de principe de la chromatographie d'affinité couplée à la spectrométrie de masse ESI	51

Figure 27 : chromatogrammes d'affinité frontale d'un mélange de six oligosaccharides synthétiques mimant un polysaccharide de <i>Salmonella</i> se liant à des anticorps anti-salmonelle (Schriemer et al. 1998)	52
Figure 28 : Schéma illustrant le principe des tests utilisant l'ultrafiltration pulsée en criblage	55
Figure 29 : chromatogrammes HPLC-ESI MS des composés élués dans le cadre du criblage d'inhibiteurs de la COX II avec les valeurs des pics [M-H] ⁻ correspondants. En hachuré se trouve le témoin incubé sans cible moléculaire et en trait plein se trouve l'échantillon mis en présence de COX II	55
Figure 30 : spectres ESI-MS obtenus lors du criblage d'une librairie de 22 composés à la recherche de molécules liant la DHFR en présence et en absence de DHFR ³⁴	56
Figure 31 : Les différents types de traitement de surface des « sondes d'affinité » sur lesquelles les cibles moléculaires sont fixées	60
Figure 32 : spectres de masse MALDI-TOFMS de la salive de sangsue avant et après ajout de carboxypeptidase A (CPA) et analyse statistique des intensités des signaux de molécules montrant la présence d'un inhibiteur (LCI)	61
Figure 33 : protocole général de l'étude	65
Figure 34 : Arrangement des sous unités de tubuline en microtubules au sein des cellules eucaryotes et image de microscopie électronique de microtubules ¹³	67
Figure 35 : La mitose et la tubuline constituant le fuseau mitotique (en vert) ¹³	68
Figure 36 : Exemple de résultats du « test à la tubuline » en présence de deux types de molécules actives.....	69
Figure 37 : structure de la colchicine	71
Figure 38 : structures de la vinblastine et de la vincristine.....	72
Figure 39 : Représentation schématique de la réaction catalysée par la DHFR et de son rôle dans la voie métabolique de synthèse du thymidilate, des nucléotides puriques et de la méthionine. FH2 : 7,8-dihydrofolate ; FH4 : 5,6,7,8-tetrahydrofolate ; CH3FH4 : 5-methyltetrahydrofolate ; CHOFH4 : 5-formyltetrahydrofolate ; CHFH4 : 5-10-methenyltetrahydrofolate ; CH2FH4 : 5,10-methylenetetrahydrofolate ; S-AM : S-adenosylmethionine ⁵⁵	73
Figure 40 : structures de l'acide folique, de l'acide folinique, de l'aminoptérine, du méthotrexate et de la pyriméthamine. Les similitudes et les différences entre ces molécules sont mises en évidence en couleur.	76
Figure 41 : photographie d'un microconcentrateur (a) et son utilisation au sein d'un tube Eppendorf® (b).....	81
Figure 42 : Schéma général du protocole d'élimination des molécules non liées aux cibles protéiques	82
Figure 43 : photographie d'un cône de micropipette ZipTip®	86
Figure 44 : protocole Zip Tip® utilisé pour le passage en phase organique de la cible moléculaire.....	87
Figure 45 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à 2.10 ⁻⁵ M de tubuline avec les matrices SA, HCCA, 2,5-DHB.....	90
Figure 46 : Optimisation des tensions d'accélération des ions : (a) variation de l'intensité absolue du pic [M+H] ⁺ de la tubuline en fonction de la différence de potentiels appliquée ; (b) signal obtenu par MALDI-TOF-MS et intensité absolue du pic de la tubuline	91
Figure 47 : Optimisation de la tension du gain électronique du détecteur en mode linéaire pour le pic [M+H] ⁺ de la tubuline ; (a) signal MALDI-TOF-MS, (b) intensité absolue et (c) rapport signal sur bruit.....	92

Figure 48 : Analyse par MALDI-TOFMS (mode reflectron) d'une solution à 5.10^{-5} M de colchicine avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB).....	93
Figure 49 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à 5.10^{-5} M de vinblastine avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)	94
Figure 50 : intensités relatives MALDI-TOFMS de l'ion $[M+H]^+$ de la vinblastine ainsi que de son photofragment $[M-H_2+H]^+$ en fonction de l'énergie laser (dépôt en mélange intime, 2,5-DHB).....	95
Figure 51 : Hypothèse de formation de l'ion $[M-H_2+H]^+$ de la vinblastine	95
Figure 52 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à 5.10^{-5} M de vincristine avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)	96
Figure 53 : intensités relatives MALDI-TOFMS de l'ion $[M+H]^+$ de la vincristine ainsi que de son photofragment $[M-H_2+H]^+$ en fonction de l'énergie laser (dépôt en mélange intime, 2,5-DHB)	96
Figure 54 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à $1,5.10^{-7}$ M de DHFR avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)	97
Figure 55 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution d'acide folique à 1.10^{-5} M avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)	99
Figure 56 : Analyse par MALDI-FTICRMS d'une solution d'acide folique 1.10^{-5} M (matrice 2,5-DHB) et attribution des pics à des espèces polyhydrogénées (comparaison avec les valeurs théoriques des listes de pics des massifs isotopiques des composés).....	100
Figure 57 : Analyse par MALDI-FTICRMS d'une solution d'acide folique (1.10^{-5} M) dans de l'eau lourde (2H_2O) (matrice 2,5-DHB).....	101
Figure 58 : Représentation schématique de la forme moyenne de la conjugaison des électrons de l'acide folique	101
Figure 59 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à 1.10^{-5} M d'acide folinique avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)	102
Figure 60 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à 1.10^{-5} M d'aminoptérine avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)	103
Figure 61 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à 1.10^{-5} M de Méthotrexate avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)	104
Figure 62 : Analyse par MALDI-TOFMS d'une solution à 1.10^{-5} M de pyriméthamine avec différentes matrices (SA, HCCA, 2,5-DHB)	105
Figure 63 : Intensités absolues des pics pseudomoléculaires obtenus par MALDI-TOFMS pour les composés (colchicine, vinblastine ou vincristine) retenus sur les membranes des microconcentrateurs (mode réflectron, mode de dépôt par mélange intime, matrice 2,5-DHB)	108
Figure 64 : Analyse directe par MALDI-TOFMS (mode reflectron) de molécules liées à la tubuline (2.10^{-5} M) (colchicine, vinblastine ou vincristine) (après incubation, filtration, lavages et élution) (dépôt par mélange intime avec le 2,5-DHB ou l'HCCA)	109
Figure 65 : (A) Vinblastine (5.10^{-6} M) analysée par LDI-TOFMS (mode reflectron, 337 nm); (B) analyse LDI-TOFMS (mode reflectron, 337 nm) de la vinblastine (5.10^{-5} M) liée à la tubuline (2.10^{-5} M); (C) analyse par MALDI-TOFMS de la vinblastine (5.10^{-5} M) liée à la tubuline (2.10^{-5} M) (2,5-DHB, dépôt en couche mince); (D) analyse par MALDI-TOFMS de la vinblastine (5.10^{-5} M) liée à la tubuline (2.10^{-5} M) (2,5-DHB, dépôt en mélange intime); irradiance de l'ordre de 5.10^7 W.cm ⁻²	110
Figure 66 : Intensités absolues du pic pseudomoléculaire de la vinblastine ($[M+H]^+ = 811,42$ Da) lors de l'analyse directe par MALDI-TOFMS (après incubation avec la tubuline, filtration, lavages et élution) pour différentes solutions de matrices d'acidité croissante (2,5-DHB, mélange intime : 0%, 0,1%, 0,5%, 1%, 5% et 10% de TFA).....	112

Figure 67 : Analyse directe par MALDI-TOFMS de la colchicine (5.10^{-5} M), vinblastine (5.10^{-5} M) et vincristine (5.10^{-5} M) liées simultanément à la tubuline (2.10^{-5} M) avec le 2,5-DHB ou l'HCCA comme matrice	113
Figure 68 : Intensités absolues des pics pseudomoléculaires obtenus par MALDI-TOFMS pour les composés (aminoptérine, acide folique, acide folinique, méthotrexate ou pyriméthamine) retenus sur les membranes des microconcentrateurs (mode réflectron, dépôt par mélange intime, matrice 2,5-DHB)	115
Figure 69 : Analyses directe en MALDI-TOFMS (mode réflectron) de molécules liées à la DHFR (6.10^{-8} M) (aminoptérine (1.10^{-5} M), acide folique (1.10^{-5} M), acide folinique (1.10^{-5} M), méthotrexate (1.10^{-5} M) ou pyriméthamine (1.10^{-5} M)) (dépôt par mélange intime avec le 2,5-DHB ou l'HCCA comme matrice) (* pics de matrice).....	117
Figure 70 : (A) Analyse directe par MALDI-TOFMS (mode réflectron) de la colchicine (5.10^{-5} M) liée à l'ovalbumine (2.10^{-5} M) après incubation, filtration, lavage et élution ; (B) Analyse directe par MALDI-TOFMS (mode réflectron) de la colchicine (5.10^{-5} M) liée à la tubuline (2.10^{-5} M) après incubation, filtration, lavage et élution ; (mode de dépôt par mélange intime avec le 2,5-DHB) (* correspond au pic pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de la colchicine).....	120
Figure 71 : (A) analyse directe par MALDI-TOFMS (mode réflectron) du méthotrexate (1.10^{-5} M) lié à l'ovalbumine (2.10^{-5} M) après incubation, filtration, lavage et élution ; (B) analyse directe par MALDI-TOFMS (mode réflectron) du méthotrexate (1.10^{-5} M) lié à la DHFR (6.10^{-8} M) après incubation, filtration, lavage et élution ; (mode de dépôt par mélange intime avec le 2,5-DHB) (* correspond au pic pseudomoléculaire $[M+H]^+$ du méthotrexate)	121
Figure 72 : (A) structure de l'amiodarone ; (B) analyse MALDI-TOFMS (mode réflectron) de l'amiodarone (5.10^{-6} M) (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB).....	122
Figure 73 : (A) analyse MALDI-TOFMS de l'amiodarone (5.10^{-5} M) liée à l'ovalbumine (2.10^{-5} M) après incubation, filtration, lavages et élution (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB) ; (B) analyse MALDI-TOFMS de l'amiodarone liée à la tubuline (2.10^{-5} M) après incubation, filtration, lavages et élution (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB) ; (C) analyse MALDI-TOFMS de l'amiodarone (1.10^{-5} M) liée à la DHFR (6.10^{-8} M) après incubation, filtration, lavages et élution (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB) ; (* correspond à l'ion $[M+H]^+$ de l'amiodarone)	123
Figure 74 : photo-isomérisation de la colchicine	124
Figure 75 : Analyse MALDI-TOFMS (mode réflectron) de molécules liées à la tubuline (2.10^{-5} M) (colchicine (5.10^{-5} M), vinblastine (5.10^{-5} M), vincristine (5.10^{-5} M)), avant et après digestion par une solution de trypsine (200 ng/ μ L) (dépôt de 2 μ L de solution en mélange intime avec les matrices 2,5-DHB ou HCCA).....	132
Figure 76 : Analyse MALDI-TOFMS de la tubuline après digestion trypsique (mode linéaire) (mode de dépôt en mélange intime, matrice 2,5-DHB (A) et HCCA (B))	133
Figure 77 : Analyse MALDI-TOFMS (mode réflectron) de molécules liées à la tubuline (2.10^{-5} M) (colchicine (5.10^{-5} M), vinblastine (5.10^{-5} M), vincristine (5.10^{-5} M)), avant et après dénaturation par de l'acétonitrile (v/v) (dépôt de 2 μ L de solution en mélange intime avec les matrices 2,5-DHB ou HCCA).....	134
Figure 78 : R(X) moyens calculés pour la colchicine, la vinblastine et la vincristine suite à la digestion ou la dénaturation de la tubuline (incertitude évaluée par la méthode GUM en traits pleins ; incertitude expérimentale en traits hachurés)	139

Figure 79 : Analyse MALDI-TOFMS (mode reflectron) du methotrexate (1.10^{-5} M) lié à la DHFR (6.10^{-8} M) avant et après dénaturation par de l'acétonitrile (mode de dépôt en mélange intime avec le 2,5-DHB).....	141
Figure 80 : R(X) moyens calculés à partir des informations obtenues par MALDI-TOFMS avec le 2,5-DHB comme matrice (avant et après dénaturation) pour l'acide folique, l'acide folinique, la pyriméthamine, le méthotrexate et l'aminoptérine.....	142
Figure 81 : Organisation générale de nos stratégies de criblage primaire et secondaire, impliquant une seule étape d'échantillonnage.....	145
Figure 82 : représentation schématique et photographie du Colchique d'automne ; (a) coupe transversale du fruit ; (b) fruit ; (c) graine ; (d) bulbe (cormus) ; (e) plante entière (feuilles et jeune fruit ou fleur) ; (f) fleur ; (g) style ; (h) étamine ; (i) coupe transversale du bulbe (cormus) et de l'embryon.....	149
Figure 83 : structures des différents alcaloïdes du colchique d'automne.....	153
Figure 84 : Représentation schématique des dates de récoltes des différents échantillons de Colchique d'automne disponibles pour nos recherches.....	155
Figure 85 : Spectres MALDI-TOFMS (2,5-DHB, mélange intime) des extraits (dichlorométhane/méthanol v/v) de graines, capsules, tiges, feuilles, cormus père et cormus fils de Colchique d'automne (pics de matrice ☉).....	156
Figure 86 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) d'un extrait (dichlorométhane/méthanol v/v) de graines de Colchique d'automne (pics de matrice ☉).....	157
Figure 87 : Spectres MALDI-TOFMS obtenus lors de l'analyse de la matrice 2,5-DHB, de l'extrait de graines de colchique d'automne (avec le 2,5-DHB comme matrice) et de la solution obtenue à partir des microconcentrateurs après incubation du même extrait avec la tubuline, filtration, lavages et élution (matrice 2,5-DHB). En cartouche sont présentés les agrandissements des zones des spectres correspondantes aux différents alcaloïdes présents dans l'extrait de colchique d'automne (pics de matrice ☉).....	159
Figure 88 : représentation schématique et photographie de la Pervenche de Madagascar <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don. ; (a) partie aérienne de la plante ; (b) fruit ; (c) graine ⁹⁰	162
Figure 89 : représentation schématique de la biosynthèse et structures des principaux alcaloïdes indoliques de la Pervenche de Madagascar (avec numérotation IUPAC) ⁵³	168
Figure 90 : Spectres MALDI-TOFMS (2,5-DHB mélange intime) d'extraits (méthanol, chloroforme, dichlorométhane, dichloroéthane, dibromométhane) de Pervenche de Madagascar. Les attributions des espèces connues se font par rapport à leurs pics pseudomoléculaires $[M+H]^+$ respectifs (pics de matrice ☉).....	171
Figure 91 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) de l'extrait méthanol de la Pervenche de Madagascar.....	174
Figure 92 : Spectres SORI-CID MALDI-FTICRMS des pics attribués à la vinblastine (a) et à la vincristine (b) de l'extrait méthanol de Pervenche de Madagascar.....	175
Figure 93 : schémas de fragmentation de la vinblastine (R=CH ₃) et de la vincristine (R=CHO).....	176
Figure 94 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) de l'extrait chloroforme de la Pervenche de Madagascar.....	177
Figure 95 : (a) Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime, mode de détection positif) de l'extrait dichlorométhane de la Pervenche de Madagascar ; (b) agrandissements des pics à M+2 de M1 et M2 ; (c) Analyse MALDI-TOFMS (2,5-DHB, mélange intime, mode de détection négatif) de la présence de chlore dans l'extrait dichlorométhane de la Pervenche de Madagascar.....	178

Figure 96 : Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime) de l'extrait dichloroéthane de Pervenche de Madagascar	180
Figure 97 : (a) Spectre MALDI-FTICRMS (2,5-DHB, mélange intime, mode de détection positif) de l'extrait dibromométhane de Pervenche de Madagascar ; (b) Analyse MALDI-TOFMS (2,5-DHB, mélange intime, mode de détection négatif) de la présence de brome dans l'extrait dibromométhane de la Pervenche de Madagascar.....	181
Figure 98 : Spectres MALDI-FTICRMS (2,5-DHB mélange intime) de la leurosine et de la vinblastine ($5 \cdot 10^{-6}$ M) en solution dans du dichlorométhane.....	183
Figure 99 : Spectres SORI-CID-MALDI-FTICRMS (MS^2) de M1, M2, M4, M5, M6, M8, M9 et M10.....	184
Figure 100 : Spectre MS^3 du fragment $[vindoline+CH_2]^+$ commun à tous les adduits (SORI-CID-MALDI-FTICRMS)	185
Figure 101 : (a) Proposition de structures des adduits d'alcaloïdes M1 à M10 ; (b) proposition de structure tridimensionnelle des adduits (inspirée de la structure de la leurosine+ CH_3 ¹²⁸)	187
Figure 102 : Proposition de mécanisme de formation de l'ion à $m/z = 469,2332$ Th observé pour tous les adduits par MS^2 et hypothèse de fragmentation MS^3	188
Figure 103 : Analyses directes par MALDI-TOFMS des éluats (après incubation avec la tubuline, filtration, lavages et élution) des différents extraits de Pervenche de Madagascar (méthanol, chloroforme, dichlorométhane, dichloroéthane, dibromométhane) (2,5-DHB, mélange intime) (pics de matrice \odot).....	190
Figure 104 : représentation schématique et photographie du théier ; (a) vue générale de la plante ; (b) coupe longitudinale de la fleur ; (c) fruit (capsule) ; (d) graine ; (e) coupe de graine ; (f) étamines ; (g) style ; (h) coupe transversale de l'ovaire ⁹⁰	195
Figure 105 : Structures des 12 principaux dérivés de la catechin du thé vert (<i>Camellia sinensis</i>).....	198
Figure 106 : Spectre MALDI-TOFMS d'un extrait aqueux de thé vert (matrice SA, mode de détection négatif) (pics de matrice \odot)	200
Figure 107 : Spectre ESI-FTICRMS d'un extrait aqueux de thé vert (mode de détection négatif)	201
Figure 108 : Spectre de masse SORI-CID-ESI-FTICRMS du pic de l'extrait de thé vert attribué à l'EGCG ($[M-H]^- = 457,07$ Th)	202
Figure 109 : mécanisme proposé pour la fragmentation de l'EGCG ¹⁴²	203
Figure 110 : Spectres MALDI-TOFMS obtenus lors de l'analyse de l'extrait de thé vert (matrice SA) et de la solution obtenue à partir des microconcentrateurs après incubation du même extrait avec la DHFR, filtration, lavages et élution (matrice SA). En cartouche sont présentés les agrandissements des zones des spectres correspondantes aux différents polyphénols présents dans l'extrait de thé vert (pics de matrice \odot)	204
Figure 111 : Spectre MALDI-TOFMS de l'EGCG présent dans une solution de thé vert incubé avec la DHFR (après filtration, lavages et élution) avant et après dénaturation 10 minutes par de l'acétonitrile	205

Tableau 1 : catégorisation des tests de criblage en termes de qualité évaluée par le facteur Z.....	14
Tableau 2 : matrices MALDI couramment utilisées ¹³	20
Tableau 3 : Molécules liant la tubuline sur lesquelles a porté cette étude (avec présentation des formules brutes, des masses moléculaires et des m/z correspondants aux ions [M+H] ⁺ des différentes espèces).....	72
Tableau 4 : Molécules liant la DHFR sur lesquelles a porté cette étude (avec présentation des formules brutes, des masses moléculaires et des m/z correspondants aux ions [M+H] ⁺ des différentes espèces).....	77
Tableau 5 : Intensités moyennes MALDI-TOFMS avec la matrice 2,5-DHB (avant et après dénaturation ou digestion) et les rapports R(X) correspondants à la colchicine, la vinblastine et la vincristine. Les incertitudes sur les mesures sont calculées selon la méthode GUM et selon les écart-types expérimentaux.	138
Tableau 6 : Intensités moyennes MALDI-TOFMS avec la matrice 2,5-DHB (avant et après dénaturation) et les rapports R(X) correspondants à l'acide folique, l'acide folinique, la pyriméthamine, le méthotrexate et l'aminoptérine. Les incertitudes sur les mesures sont calculées selon la méthode GUM et selon les écart-types expérimentaux.....	142
Tableau 7 : R(X) moyen obtenu pour le méthotrexate incubé avec la DHFR, analysé avec différentes matrices (2,5-DHB, SA et HCCA) et différents modes de détection (positif et négatif)	143
Tableau 8 : formules brutes, masses molaires et ions pseudomoléculaires [M+H] ⁺ théoriques des principaux alcaloïdes du Colchique d'automne.....	153
Tableau 9 : formules brutes, masses molaires et ions pseudomoléculaires [M+H] ⁺ théoriques des principaux alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar ^{111,114,115,116,117,118,,}	167
Tableau 10 : formules brutes probables pour la molécule M1 (erreur maximale 3 ppm).....	179
Tableau 11 : Récapitulatif des formules brutes et des M ⁺ théoriques et expérimentaux des 10 adduits d'alcaloïdes de la Pervenche de Madagascar.....	182
Tableau 12 : formules brutes, masses molaires et ions pseudomoléculaires [M-H] ⁻ théoriques des principaux dérivés de la catechine du thé vert	197

Annexes

Publications associées à ces travaux :

Tubulin-binding drug screening by MALDI-TOFMS, P. Hannewald, B. Maunit, J.F. Muller, *Analytical Chemistry* 78(13) (2006)

DHFR binding drug screening by MALDI-TOFMS, P. Hannewald, B. Maunit, J.F. Muller, accepté pour publication dans *Analytical and bioanalytical chemistry* (12/09/2008)

MALDI-MS structural elucidation of tubulin-binding compounds, P. Hannewald, G. Frache, B. Maunit, J.F. Muller, en préparation

Autres publications :

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

Valorisation :

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

Résumé

Etude de l'interaction médicament/récepteur par spectrométrie de masse - Mise en place et validation de nouveaux protocoles de criblage moléculaire -

La découverte de nouveaux médicaments par le criblage biomoléculaire est au centre de la recherche pharmaceutique actuelle. La spectrométrie de masse, en tant que technique d'analyse fiable, reproductible, sensible, spécifique, compatible avec de nombreux types d'échantillons et permettant un débit d'analyse conséquent, trouve ainsi sa place dans les stratégies de recherche et développement de nouveaux médicaments. Le but de ce travail était de mettre en place et de valider une stratégie originale, impliquant la désorption/ionisation laser assistée par matrice couplée à la spectrométrie de masse (MALDI-MS) comme technique de détection, en vue du criblage de la liaison de composés à des cibles moléculaires applicable directement à des extraits de plantes. Le protocole que nous avons développé s'articule en trois étapes successives qui sont l'incubation des molécules à tester avec la cible moléculaire choisie (la tubuline ou la DHFR), l'élimination des composés non liés et enfin l'analyse par MALDI-TOFMS des composés liés. Notre démarche a fait l'objet d'une démarche de validation et les résultats pouvant être obtenus ont été discutés. Le débit pouvant être évalué à 60 échantillons en 1h50 à 3h30 soit de 18 à 32 échantillons à l'heure. Enfin, une démarche innovante nous a permis de prouver que notre approche pouvait être utile également en criblage secondaire. L'application de notre approche à des extraits bruts de plantes (Colchique d'Automne, Pervenche de Madagascar et Thé vert) à permis de mettre en évidence 20 molécules actives se liant à l'une ou l'autre des cibles moléculaires utilisées et d'évaluer l'affinité relative de l'une d'entre elles.

Mots clés : criblage moléculaire ; spectrométrie de masse ; MALDI ; TOFMS ; FTICRMS ; extraits de plantes ;