

# THESE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Ecole doctorale Biologie Santé de Lille

Discipline/S spécialité : Chimie Analytique

**Tiphaine ROGEZ FLORENT**

---

**Caractérisation d'inhibiteurs d'Anhydrase Carbonique IX, études de complexes supramoléculaires et interactions moléculaires par Résonance Plasmonique de Surface**

---

*5 Décembre 2014*

**Membres du jury**

**Rapporteurs**

Catherine PERRIN, Professeur des Universités, Montpellier 1

Carmelo DI PRIMO, Chargé de recherche, Institut Européen de Chimie et Biologie, Bordeaux

**Examineurs**

David LANDY, Professeur des Universités, ULCO

Eric PEYRIN, Professeur des Universités, Grenoble

**Directeur de thèse**

Jean-François GOOSSENS, Professeur des Universités, Lille 2

**Co-encadrante**

Catherine FOULON, Maitre de conférences, Lille 2

# REMERCIEMENTS

---

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté de Pharmacie de Lille.

Je remercie tout d'abord les membres du jury, Madame Catherine Perrin et Monsieur Carmelo Di Primo qui ont accepté d'être rapporteurs, ainsi que Monsieur Eric Peyrin et Monsieur David Landy pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail.

Je remercie d'abord les Professeurs Jean-Paul Bonte et Claude Vaccher, respectivement ancien et actuel Directeur du laboratoire de Chimie Analytique pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire, et m'avoir permis de préparer mon doctorat.

Cette thèse a été réalisée sous la direction du Professeur Jean-François Goossens. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour la confiance dont il a fait preuve à mon égard. Je lui adresse également mes sincères remerciements pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique et son enthousiasme qui m'ont permis de réaliser cette thèse.

Je remercie sincèrement Catherine Foulon pour ses précieux conseils, son soutien quotidien, ses qualités humaines et pour le temps consacré à nos nombreuses discussions. Merci d'avoir été présente pour moi.

Mes remerciements vont également à Cécile Danel pour tous ses conseils aussi bien personnels que professionnels, sa gentillesse et sa grande disponibilité. Merci de m'avoir soutenue.

Je tiens également à remercier Laurence Goossens, sans qui je n'aurais pas participé à cette aventure. Merci de m'avoir fait découvrir et partager son enthousiasme pour ce sujet.

Merci à Anne Sophie Drucbert et Pierre Marie Danze, de la plateforme d'interaction moléculaire pour leurs gentillesse et leurs précieux conseils en résonance plasmonique de surface.

Je remercie également le Professeur David Landy, pour sa sympathie, et pour ses conseils.

Je remercie également le Professeur Nathalie Azaroual, pour m'avoir formé à la RMN et pour ses conseils avisés concernant l'étude des complexes.

Merci à Sophie Duban, pour sa gentillesse et pour m'avoir fait connaître les études de western blot.

Je tiens sincèrement à exprimer mes remerciements à toute l'équipe de Chimie Analytique, notamment aux filles de Chimie Ana. Merci à Marie Lecoœur, pour ta joliesse, pour tes nombreux conseils scientifiques et personnels, et pour toutes tes astuces. Merci à Nadège Schifano de m'avoir supporté dans ton laboratoire. Merci pour ton écoute et ton enthousiasme. Merci à Emmanuelle Lipka, pour ta gentillesse et ton soutien. Merci à Fatiha, pour ta sympathie à mon égard. Merci à Florence Bourdon, de m'avoir soutenue dans les différentes étapes de la thèse. Merci pour ta gentillesse et ton écoute.

Un énorme Merci à toute l'équipe de Chimie Analytique de m'avoir soutenus, écouté (et ce n'est pas peu dire), conseillé, et de m'avoir transmis votre passion pour la recherche.

Bien entendu, je remercie ma famille, mes amis qui m'ont toujours soutenu et cela, quelques soient les situations dans lesquelles je me suis trouvée. Merci à mes parents et à ma sœur de croire en moi et de me porter autant d'attention.

Enfin, je ne remercierai jamais assez les deux hommes de ma vie, Benoit, pour son indéfectible soutien au cours de ces dix années, ta gentillesse et ton humour ont toujours su me remonter le moral dans les moments les plus difficiles, et Mael, notre plus beau cadeau, qui me remplit de joie et me motive chaque jour.

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>μapp</b>	Mobilité apparente
<b>μe</b>	Mobilité électrophorétique
<b>μeof</b>	Mobilité électroosmotique
<b>AC</b>	Anhydrase Carbonique
<b>AC II b</b>	Anhydrase Carbonique II bovine
<b>ACE</b>	Electrophorèse Capillaire d’Affinité
<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>AZA</b>	Acétazolamide
<b>BSA</b>	Sérum Albumine Bovine
<b>CBS</b>	Carboxybenzènesulfonamide
<b>CD</b>	Cyclodextrine
<b>CE-FA</b>	Analyse Frontale par Electrophorèse Capillaire
<b>CLHP</b>	Chromatographie Liquide Haute Performance
<b>CPS</b>	Chromatographie en phase Supercritique
<b>Da</b>	Dalton
<b>DEDL</b>	Détecteur Evaporatif à diffusion de la lumière
<b>DMSO</b>	Diméthylesulfoxyde
<b>E1</b>	Enantiomère 1
<b>E2</b>	Enantiomère 2
<b>EC</b>	Electrophorèse Capillaire
<b>ESI</b>	Electrospray
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>Fc</b>	Flow Cell
<b>FRET</b>	Fluorescence Resonance Energy Transfer
<b>HBS</b>	Hepes Buffer Saline
<b>Hept</b>	Heptane
<b>Hex</b>	Hexane
<b>HIF-1</b>	Hypoxie Inducible Factor
<b>HP-α ,β,γ-CD</b>	Hydroxypropyle-α ,β,γ-Cyclodextrine
<b>HTS</b>	High Throughput Screening
<b>IPA</b>	Isopropanol

<b>ITC</b>	Calorimétrie de Titration Isotherme
<b><math>k_a</math></b>	Constante cinétique d'association
<b><math>k_d</math></b>	Constante cinétique de dissociation
<b><math>K_A</math></b>	Constante thermodynamique d'association
<b><math>K_D</math></b>	Constante thermodynamique de dissociation
<b><math>K_i</math></b>	Constante d'inhibition
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>Me-<math>\beta</math>-CD</b>	Méthyle- $\beta$ -Cyclodextrine
<b>MST</b>	Thermophorèse à micro-échelle
<b>NH<sub>2</sub>-<math>\beta</math>-CD</b>	6-Monodeoxy-6-monamine- $\beta$ -Cyclodextrine
<b>NOE</b>	Effet Nucléaire Overhauser
<b>P</b>	Phosphate
<b>PBS</b>	Phosphate Buffer Saline
<b>pI</b>	Point Isoélectrique
<b>PSC</b>	Phase stationnaire Chirale
<b>PVDF</b>	polyFluorure de Vinylidène
<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>ROESY</b>	Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy
<b>RPS</b>	Résonance Plasmonique de Surface
<b><math>R_s</math></b>	Résolution
<b>SM</b>	Spectrométrie de Masse
<b>STD</b>	Saturation Transfer Difference
<b>TSA</b>	Thermal Shift Assay
<b>VHL</b>	Von Hippel-Lindau

# SOMMAIRE

---

LISTE DES ABREVIATIONS.....	i
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1 : Etudes bibliographiques.....	3
Partie 1 : Les anhydrases carboniques .....	3
I. STRUCTURE .....	3
II. L'ANHYDRASE CARBONIQUE DE TYPE IX.....	4
1. Expression .....	4
2. Cause de surexpression .....	4
3. Rôle de l'AC IX dans la tumorigenèse .....	5
4. Les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique IX .....	5
5. Conception d'inhibiteurs sélectifs de l'anhydrase carbonique IX.....	6
5.1. Etude des relations structure activité.....	6
5.2. Conception d'une chimiothèque d'inhibiteurs sélectifs de l'AC IX.....	7
Partie 2 : Les méthodes d'optimisation de la solubilité .....	9
I. LA FORMATION D'UNE <i>PRODROGUE</i> .....	9
II. LA VECTORISATION.....	9
III. LES CYCLODEXTRINES.....	11
Partie 3 : Etudes des interactions moléculaires.....	12
I. GENERALITES CONCERNANT LES COMPLEXES NON COVALENTS .....	12
1. Les différents types d'interaction mis en jeu .....	12
2. Approches mathématiques de l'interaction moléculaire .....	13
2.1. Les constantes thermodynamiques d'association $K_A$ et de dissociation $K_D$ .....	13
2.2. La constante d'inhibition $K_i$ .....	14
3. Les techniques d'analyse des interactions moléculaires .....	14
3.1. Méthodes utilisant des radio-éléments.....	15
3.2. Méthodes utilisant des composés fluorescents .....	15
3.3. Méthodes instrumentales .....	16
3.3.1. La spectrométrie de masse .....	16
3.3.2. La résonance magnétique nucléaire .....	17
3.3.3. L'électrophorèse capillaire .....	18

3.3.4. La thermophorèse .....	19
<b>II. INTERACTIONS LIGAND/ANHYDRASE CARBONIQUE .....</b>	<b>21</b>
<b>1. Technique mesurant l'(les) activité(s) enzymatique(s) de l'AC.....</b>	<b>21</b>
<b>2. La calorimétrie de titration isotherme.....</b>	<b>23</b>
2.1. Principe .....	23
2.2. Exploitation de l'isotherme d'interaction .....	25
2.3. Méthodologie .....	26
2.3.1. Méthode de titration directe .....	26
2.3.2. Méthode de titration indirecte .....	26
2.4. Avantages/ Inconvénients .....	26
2.5. ITC/Anhydrase Carbonique.....	27
<b>3. La thermal Shift Assay .....</b>	<b>28</b>
3.1. Principe .....	28
3.2. Exploitation des résultats .....	31
3.3. Avantages/Inconvénients .....	33
3.4. TSA/Anhydrase Carbonique.....	33
3.5. Comparaison ITC/TSA/spectrophotométrie pour l'étude de l'anhydrase carbonique.....	34
<b>4. La résonance plasmonique de surface .....</b>	<b>34</b>
4.1. Principe .....	35
4.2. Surface réactive-« lame de mesure » .....	37
4.3. Choix du taux d'immobilisation .....	39
4.4. Le transfert de masse .....	39
4.5. Le système Biacore : .....	41
4.6. Le sensorgramme .....	42
4.7. L'exploitation du sensorgramme .....	43
4.7.1. Détermination des constantes cinétiques d'association et de dissociation de complexe ligand-analyte.....	43
4.7.2. Détermination des constantes thermodynamiques de complexation du ligand et de l'analyte	45
4.8. Avantages/Inconvénients .....	46
4.9. RPS/anhydrase carbonique.....	47
4.9.1. Etude d'interactions protéine/protéine.....	47
4.9.2. Etude d'interactions protéine/molécule de bas poids moléculaire.....	48
<b>CHAPITRE 2 : Etude de la complexation entre les dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles et les cyclodextrines.....</b>	<b>51</b>

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>51</b>
<b>1.</b>	<b>Généralités sur les cyclodextrines .....</b>	<b>51</b>
1.1.	Définition, structure et nomenclature.....	52
1.2.	Propriétés physico-chimiques des cyclodextrines .....	53
1.2.1.	Cyclodextrines natives.....	53
1.2.2.	Cyclodextrines modifiées .....	54
1.2.3.	Propriétés complexantes.....	56
1.2.4.	Propriétés énantiosélectives .....	57
1.2.5.	Applications .....	58
<b>2.</b>	<b>Techniques utilisées .....</b>	<b>59</b>
2.1.	La résonance magnétique nucléaire.....	59
2.1.1.	Détermination de la stœchiométrie du complexe .....	59
2.1.2.	Détermination de la constante apparente de complexation.....	60
2.1.3.	Etude structurale du complexe .....	61
2.2.	L'électrophorèse capillaire.....	62
2.2.1.	Principe de l'électrophorèse capillaire .....	62
2.2.2.	Détermination de la constante apparente d'association analyte/cyclodextrine.....	63
<b>II.</b>	<b>ETUDES EXPERIMENTALES .....</b>	<b>65</b>
<b>1.</b>	<b>Complexes étudiés .....</b>	<b>65</b>
<b>2.</b>	<b>Etude de la complexation par RMN .....</b>	<b>66</b>
2.1.	Conditions expérimentales .....	66
2.2.	Caractérisation des deux partenaires par RMN .....	67
2.3.	Discrimination chirale .....	69
2.4.	Détermination de la stœchiométrie du complexe.....	73
2.5.	Détermination des constantes d'association par RMN .....	75
2.5.1.	Complexe Alica 87/NH <sub>2</sub> -β-CD .....	75
2.5.2.	Complexe Alica 76/NH <sub>2</sub> -β-CD .....	77
2.5.3.	Complexes Alica 87/CDs neutres.....	79
2.5.4.	Comparaison des constantes d'association obtenues pour les complexes formés.....	79
2.6.	Etude de la complexation de divers composés avec la β-CD.....	80
2.7.	Etude structurale .....	81
<b>3.</b>	<b>Etude de complexation par électrophorèse capillaire.....</b>	<b>84</b>
3.1.	Conditions expérimentales .....	84
3.2.	Détermination des constantes de complexation par EC.....	84



3.2.1. Revêtement de capillaire : « Coating » .....	85
3.2.2. Evaluation de la performance du « coating » .....	87
3.2.3. Etude qualitative de la complexation.....	88
<b>4. Comparaison des deux techniques pour l'étude des complexes .....</b>	<b>90</b>
<b>CHAPITRE 3 : Développement de méthodes séparatives chromatographique et électrophorétique pour la séparation des énantiomères de dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles .....</b>	<b>93</b>
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>93</b>
1. Chromatographie en phase supercritique (CPS).....	94
2. Séparation chirale par chromatographie .....	95
3. Phases stationnaires chirales .....	95
<b>II. ETUDES EXPERIMENTALES .....</b>	<b>96</b>
1. Optimisation des séparations chirales à l'échelle analytique.....	96
1.1. Analytes étudiés.....	96
1.2. PSC chirales utilisées .....	97
1.3. Optimisation des séparations chirales en CLHP.....	98
1.3.1. Screening des PSC.....	99
1.3.2. Optimisation de la phase mobile.....	99
1.3.3. Conditions optimisées pour la séparation chirale en CLHP.....	100
1.4. Optimisation des séparations chirales en CPS .....	101
1.4.1. Optimisation de la phase mobile.....	101
1.4.2. Optimisation de la pression.....	102
1.4.3. Optimisation de la température.....	103
1.4.4. Conditions optimales pour la séparation chirale en CPS.....	103
2. Optimisation des séparations chirales à l'échelle semi-préparative.....	104
2.1. Comparaison CLHP/CPS .....	104
2.2. Transposition à l'échelle semi-préparative en CPS.....	105
2.2.1. Etude de la surcharge en concentration .....	106
2.2.2. Etude de la surcharge en volume .....	107
3. Séparation chirale des composés à l'échelle semi-préparative en CPS.....	108
3.1. Séparation chirale de l'Alica 87.....	108
3.2. Séparations chirales des dérivés de la série chimique.....	108
4. Détermination des puretés énantiomériques .....	110

4.1. Détermination des LD et LQ en CPS.....	110
4.1. Détermination des LD et LQ en CLHP.....	111
4.2. Détermination des puretés énantiomériques en CLHP-UV .....	112
<b>5. Séparation chirale des dérivés par électrophorèse capillaire .....</b>	<b>114</b>
5.1. Etudes préliminaires .....	114
5.2. Plan d'expériences .....	120
5.3. Fidélité de la méthode .....	124
5.4. Robustesse du « coating » .....	125
5.5. Pureté énantiomérique des composés préparés par CPS semi-préparative .....	125
<b>CHAPITRE 4 : Etude d'interaction moléculaire pour évaluer l'affinité des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles pour l'AC.....</b>	<b>127</b>
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>127</b>
<b>II. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>127</b>
<b>1. Analytes étudiés.....</b>	<b>127</b>
<b>2. Protéines étudiées.....</b>	<b>129</b>
<b>3. Résonance plasmonique de surface.....</b>	<b>130</b>
3.1. Appareil.....	130
3.2. Surfaces réactives .....	130
3.3. Solutions tampons .....	130
3.4. Préparation des analytes .....	131
3.5. Préparation des solutions de protéine .....	132
3.5.1. Solutions mères : .....	132
3.5.2. Solutions filles pour immobilisation .....	132
3.5.3. Protocole de biotinylation avec le sulfo-NHS-biotine .....	133
3.5.4. Protocole de biotinylation avec le pentylaminebiotine .....	133
3.6. Immobilisation de la protéine.....	134
3.6.1. Immobilisation sur une lame CM5 ou CM7.....	134
3.6.2. Immobilisation sur une de type streptavidine .....	135
3.7. Protocole d'analyse .....	135
3.8. Protocole d'exploitation des résultats.....	136
<b>4. Calorimétrie de titration isotherme.....</b>	<b>137</b>
4.1. Appareil.....	137
4.2. Tampon d'analyse.....	137
4.3. Préparation des analytes .....	137

4.3.1. Préparation de l'AC II b.....	138
4.3.2. Préparation des solutions analysées .....	138
<b>5. Thermal Shift Assay .....</b>	<b>138</b>
5.1. Appareil.....	138
5.2. Tampon d'analyse.....	138
5.3. Fluorophore : le Sypro Orange.....	139
5.4. Préparation des analytes .....	139
5.5. Préparation de la protéine.....	139
5.6. Protocole analytique.....	139
<b>6. Western blot .....</b>	<b>140</b>
6.1. Préparation des protéines .....	140
6.2. Préparation du gel .....	140
6.3. Transfert sur membrane.....	140
6.4. Révélation du western blot.....	141
<b>III. RESULTATS .....</b>	<b>141</b>
<b>PARTIE 1 : Choix de la méthode de mesure.....</b>	<b>141</b>
<b>1. La résonance plasmonique de surface .....</b>	<b>141</b>
1.1. Validation de la méthode .....	142
1.1.1. Immobilisation de l'AC II bovine.....	142
1.1.2. Affinité AZA/AC II b.....	143
1.1.3. Affinité d'un dérivé sulfonamidodiarylpyrazole : Alica 13/AC II b .....	145
1.2. Affinités des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles pour l'AC II b.....	147
<b>2. La calorimétrie à titration isotherme.....</b>	<b>149</b>
2.1. Evaluation de l'affinité de l'AZA pour l'AC II b par titration directe .....	149
2.2. Affinité des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles par titration indirecte .....	150
2.3. Détermination de la variation des capacités calorifiques ( $\Delta C_p$ ) des complexes formés .....	152
<b>3. La Thermal Shift Assay.....</b>	<b>153</b>
3.1. Optimisation des conditions d'évaluation de la température de fusion .....	153
3.1.1. Optimisation de la concentration en Sypro Orange.....	153
3.1.2. Optimisation de la concentration en protéine.....	154
3.1.3. Influence de la composition de la solution tampon.....	155
3.2. Affinité de l'AZA et des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles pour l'AC II b.....	156
<b>4. Discussion .....</b>	<b>159</b>
<b>PARTIE 2 : Etude des interactions par Résonance Plasmonique de Surface.....</b>	<b>163</b>

<b>5. Lames de dextran carboxyméthylé.....</b>	<b>163</b>
5.1. lame CM5.....	163
5.1.1. Immobilisation des différentes isoformes sur la lame CM5.....	163
1.1.1.1. Anhydrase carbonique II humaine (AC II h) .....	163
1.1.1.2. Anhydrase carbonique IX humaine (AC IX h) .....	165
5.1.1.3. Anhydrase carbonique XII h (AC XII h) .....	167
5.1.2. Optimisation des conditions opératoires pour les études d'interaction analyte/AC .....	168
5.1.2.1. Choix de la cellule de référence .....	168
5.1.2.2. Influence du débit .....	170
5.1.3. Interaction des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles et des différentes isoformes de l'AC.....	172
5.2. lame CM7.....	175
5.2.1. Immobilisation des différentes isoformes sur la lame CM7.....	175
5.2.2. Interaction des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles et des différentes isoformes de l'AC.....	175
5.2.2.1. Optimisation du débit d'analyse .....	176
5.2.2.2. Affinité des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles pour AC IX h, l'AC XII h et AC II h.....	179
5.2.2.3. Comparaison lame CM5/CM7.....	186
5.2.2.4. Etude de relation structure affinité .....	187
<b>6. Lames de type streptavidine .....</b>	<b>190</b>
6.1. Biotinylation de la protéine .....	191
6.2. Agents de biotinylation.....	191
6.3. Evaluation de la réactivité des isoformes de l'AC et des agents de biotinylation .....	193
6.4. Optimisation de la biotinylation des AC .....	193
6.4.1. Optimisation de la procédure de purification .....	194
6.4.2. Répétabilité de la biotinylation et de l'immobilisation de la protéine biotylée sur la lame de type streptavidine .....	195
6.4.3. Optimisation de la fraction molaire agent de biotinylation/AC.....	196
6.4.3.1. Sulfo-NHS-biotine.....	196
6.4.3.2. Pentylamine-biotine.....	198
6.4.4. Contrôle de la biotinylation de l'AC .....	200
6.5. Interaction Analyte/AC .....	202
6.6. Immobilisation des molécules de bas poids moléculaire .....	204
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>206</b>
<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>210</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>212</b>

<b>ANNEXE 1 : Etude de la complexation par spectroscopie UV-Visible.....</b>	<b>222</b>
<b>ANNEXE 2 : Détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL) .....</b>	<b>230</b>
<b>ANNEXE 3 : Résonance plasmonique de surface .....</b>	<b>232</b>

## INTRODUCTION GENERALE

---

Le cancer est l'une des premières causes de mortalité dans le monde, constituant de ce fait un véritable problème de santé publique. Le développement des cancers est composé de nombreuses étapes résultant entre autres d'une perte des mécanismes de régulation de la prolifération cellulaire ou de l'apoptose. Bien que des traitements existent (la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie), il est nécessaire de développer de nouvelles thérapies plus efficaces contre ces cancers afin d'éviter les effets secondaires et les phénomènes de résistance.

L'environnement extracellulaire au centre de la masse tumorale se trouve modifié au cours du processus tumorigène, car, les cellules au centre de la tumeur deviennent hypoxiques. Or, l'hypoxie est fréquemment associée à la progression tumorale, à la radio et/ou la chimiorésistance et entraîne la libération d'enzymes comme l'anhydrase carbonique IX (AC IX). Cette enzyme est en partie responsable de l'acidification plus importante de l'environnement extracellulaire des cellules tumorales ( $\text{pH}_e \approx 6,8$ ) en catalysant la réaction de formation de protons. Par sa capacité à acidifier le  $\text{pH}_e$  des cellules tumorales, l'AC IX contribue à favoriser la progression tumorale en particulier par stimulation de facteurs de croissance, de protéases et par la modification de l'adhésion cellulaire. De plus, l'AC IX pourrait contribuer à la chimiorésistance induite aux anticancéreux à caractère basique, tel que la doxorubicine, en modifiant leur pourcentage d'ionisation, diminuant ainsi son passage membranaire et réduisant sa cytotoxicité.

L'anhydrase carbonique IX est très peu exprimée dans les cellules saines mais elle est par contre, surexprimée dans les cellules cancéreuses suggérant la possibilité d'une action thérapeutique cellulaire sélective. Une approche consisterait à inhiber l'activité enzymatique de l'AC IX par l'intermédiaire d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques et sélectifs.

Divers composés, potentiellement inhibiteurs de l'anhydrase carbonique IX ont été conçus et synthétisés à l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol de Lille, travaux auxquels j'ai pu participer pendant mes deux années de Master. Ces composés originaux possèdent un squelette sulfonamidodiarylpyrazole substitué par un groupement aromatique et une fonction alcool primaire ou secondaire.

Le travail de thèse a été consacré à la fois à l'étude de la complexation des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles avec des cyclodextrines dans le but d'améliorer leur solubilité et leur

biodisponibilité et également au développement de méthodes permettant de caractériser l'interaction moléculaire inhibiteur-anhydrase carbonique.

Le premier chapitre, qui concerne la partie bibliographique de ce manuscrit, décrit l'intérêt thérapeutique des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles étudiés au laboratoire et les différentes approches permettant l'amélioration de leur solubilité aqueuse afin de sélectionner un candidat médicament. Ensuite, après avoir rappelé les méthodes permettant l'étude des interactions analyte-cible moléculaire, nous décrirons celles spécifiques à l'étude des ligands de l'anhydrase carbonique qui sont développées dans ce travail.

Le deuxième chapitre rapporte les résultats expérimentaux qui concernent l'étude de la complexation de nos dérivés avec différentes cyclodextrines, utilisées comme outils permettant une amélioration de la solubilité des composés. Les études de complexation en présence des cyclodextrines ont été réalisées à l'aide de deux techniques complémentaires. La Résonance Magnétique Nucléaire et l'Electrophorèse Capillaire ont permis d'obtenir des informations sur les constantes de complexation, les stœchiométries et les études structurales caractérisant les complexes.

Parmi les composés étudiés, certains possèdent un centre d'asymétrie ainsi, notre objectif, a été la préparation de composés optiquement purs afin d'évaluer leurs affinités pour l'enzyme. Le troisième chapitre présente alors, les résultats expérimentaux consacrés aux méthodes séparatives, la chromatographie liquide haute performance, la chromatographie en phase supercritique et l'électrophorèse capillaire.

Le dernier chapitre est dédié à l'évaluation de l'affinité de quatre composés par différentes méthodes biophysiques : la résonance plasmonique de surface, la calorimétrie de titration isotherme et la thermal shift assay. Ces méthodes permettent, de façon complémentaire, de caractériser l'interaction moléculaire par ces aspects thermodynamiques et cinétiques. Une comparaison de ces trois approches a permis de sélectionner la résonance plasmonique de surface comme la méthode de choix permettant la détermination de l'affinité de l'ensemble de nos dérivés. L'optimisation des paramètres de la méthode a été réalisée pour les trois isoformes de l'anhydrase carbonique (AC II, IX et XII). Les affinités de quinze composés pour ces trois isoformes ont été déterminées et comparées.

# CHAPITRE 1 : Etudes bibliographiques

---

## Partie 1 : Les anhydrases carboniques

Les anhydrases carboniques (ACs) sont des métalloenzymes omniprésentes impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. En plus du rôle bien établi des inhibiteurs d'AC comme diurétiques et médicaments anti-glaucome, il a été montré récemment que les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique pourraient être une cible potentielle pour la découverte d'anticancéreux (Supuran, 2008 ; Winum *et al*, 2009). Jusqu'ici 16 isoformes de l'AC ont été mises en évidence. Elles se distinguent par des localisations subcellulaires et tissulaires différentes, ainsi que par une variation de leurs activités catalytiques. Plusieurs ACs sont cytosoliques (AC I, II, III, VII, XIII), cinq sont transmembranaires (AC IV, IX, XII, XIV, XV), deux mitochondriales (AC VA et VB) et une est sécrétée (AC VI). Les anhydrases carboniques catalysent la réaction d'hydratation du dioxyde de carbone en anion bicarbonate et proton, selon la réaction (Supuran et Scozzafava, 2007) :



Elles sont impliquées dans plusieurs processus biologiques comme la régulation des échanges gazeux, la respiration, la calcification, la résorption osseuse, la sécrétion de fluides ou encore la régulation des échanges ioniques rénaux.

Les isoformes I et II sont principalement responsables des rôles physiologiques alors que d'autres isoformes sont impliquées dans des phénomènes pathologiques comme, le cancer (AC IX et XII), l'épilepsie (AC VII), l'obésité (AC IX), la diurèse (AC II, AC IV, AC XII and AC XIV) ou l'ostéoporose (AC IV et AC XIV) (Thiry *et al*, 2006 ; Supuran, 2008).

### I. Structure

La structure globale des isoformes des anhydrases carboniques est similaire. Le site actif est en forme de cône avec à son sommet l'ion zinc II, coordonné à trois résidus d'histidine. A proximité du zinc, une poche à résidus hydrophiles et une poche à résidus hydrophobes sont définies. Leur composition en acides aminés est proche d'une isoforme à une autre (Supuran et Scozzafava, 2007 ; Whittington *et al*, 2001).

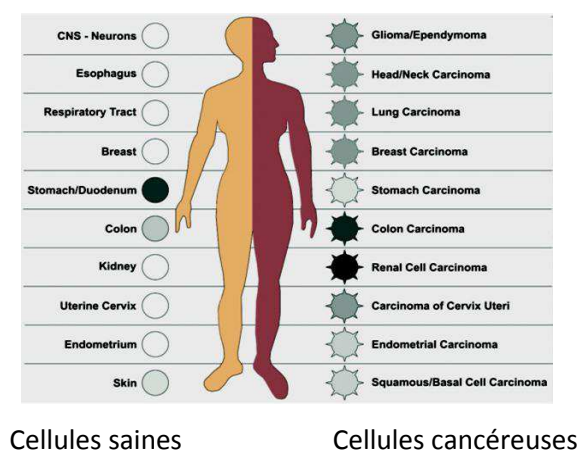


## II. L'anhydrase carbonique de type IX

### 1. Expression

Deux isoformes d'AC sont surexprimées dans certains cancers. La première est l'AC IX, caractérisée par Pasterokeva et son équipe en 1992 ; la seconde est l'AC XII (Thiry *et al*, 2007 et Pastorekova *et al*, 1992).

L'AC IX est très peu exprimée dans les cellules saines, par contre, elle est surexprimée dans les cellules cancéreuses (notamment dans les tumeurs solides), suggérant la possibilité d'une action thérapeutique sélective (Pastorekova et Pastorek, 2004), (figure 1). Sa surexpression a été reportée dans des carcinomes cellulaires de plusieurs organes, dont l'œsophage, le poumon, le rein, le côlon, le sein,...



**Figure 1 :** Représentation de l'expression de l'AC IX dans les tissus sains et cancéreux (plus le gris est prononcé plus l'AC IX est surexprimée)

### 2. Cause de surexpression

Les cellules cancéreuses formant une tumeur solide sont caractérisées par un état d'hypoxie. Les cellules situées au centre de la masse cancéreuse se retrouvent éloignées des capillaires sanguins les approvisionnant en oxygène et en glucose. L'hypoxie régule ainsi l'expression de différents gènes comme celui de l'AC IX (Thiry *et al*, 2006). Deux facteurs sont impliqués dans l'expression de l'AC IX :

la protéine suppressive de tumeurs VHL (Von Hippel-Lindau : régulation négative) et HIF-1 (Hypoxie Inducible Factor : régulation positive) (Thiry *et al*, 2006 ; Swietach *et al*, 2007). En raison de sa surexpression en milieu hypoxique, l'AC IX a été proposée comme marqueur de l'hypoxie tumorale (Swietach, 2009).

### **3. Rôle de l'AC IX dans la tumorigenèse**

L'AC IX catalyse la réaction d'hydratation du dioxyde de carbone. Lors de cette réaction, elle favorise les phénomènes d'invasion et de migration cellulaire. Par ailleurs, elle participe à l'acidification du milieu extracellulaire ce qui contribue à l'induction d'une chimiorésistance en diminuant l'efficacité des agents anticancéreux, comme certains inhibiteurs de topoisomères (doxorubicine, bléomycine, mitomycine, irinotécan,...), (Betof *et al*, 2012).

En effet, certains médicaments (tels que des anthracyclines) étant des bases faibles, le milieu extracellulaire acide augmente la proportion de formes ionisées et réduit ainsi leur passage membranaire passif. Une étude récente démontre que, chez des patientes atteintes d'un cancer du sein précoce et traitées par la doxorubicine, l'expression de l'AC IX est corrélée à un mauvais pronostic thérapeutique.

De façon générale, la surexpression de l'AC IX est souvent associée à une réponse faible des thérapies classiques de radiothérapie ou de chimiothérapie. Dans des modèles de tumeurs du sein, une diminution de la croissance tumorale et du processus métastatique a été observée lors de l'inhibition de l'AC IX (Lou *et al*, 2011).

En conséquence, l'AC IX a été proposée comme une cible thérapeutique potentielle et une des approches possibles serait d'inhiber son activité enzymatique avec des « petites molécules » inhibitrices (Rogez-Florent *et al*, 2013 ; Supuran *et al*, 2007).

### **4. Les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique IX**

La littérature montre que l'AC IX, comme les 16 isoformes de l'anhydrase carbonique, est inhibée par plusieurs grandes classes de composés : de bas poids moléculaire comme les anions (Ruconi *et al*, 2004), les sulfonamides et leurs isostères (sulfamates,...) (Supuran, 2008 ; Supuran *et*

al, 2003), les phénols (Innocenti *et al*, 2008), les coumarines (Maresca *et al*, 2009) et des biomolécules tel que des anticorps (Girantuximab, Rencarex<sup>®</sup>) (McDonald *et al*, 2012).

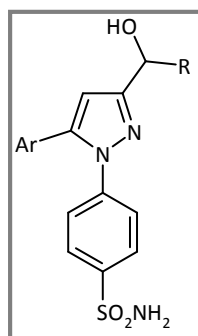
Les sulfonamides correspondent à la famille la plus représentée d'inhibiteurs d'AC. Ils sont caractérisés par une constante d'inhibition ( $K_i$ ) de l'ordre du nanomolaire. Afin de limiter les effets secondaires, une inhibition sélective est nécessaire envers les autres isoformes de l'AC, en particulier pour l'AC II, qui est ubiquitaire.

Ces dernières années, de nombreux dérivés sulfonamides affins pour l'AC IX ont été identifiés, avec des  $K_i$  de l'ordre du nanomolaire. Ces inhibiteurs sont très peu sélectifs et inhibent différentes isoformes de l'AC, susceptibles de provoquer de nombreux effets secondaires comme des calculs rénaux et des troubles digestifs.

## 5. Conception d'inhibiteurs sélectifs de l'anhydrase carbonique IX

### 5.1. Etude des relations structure activité

Lors de travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire de l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol (ICPAL), divers composés ont été synthétisés permettant de déterminer des relations structure activité. Ces études ont permis de mettre en évidence un pharmacophore affiné pour le site actif de l'AC IX. Celui-ci possède un squelette sulfonamidodiarylpyrazole constitué des groupements suivants :



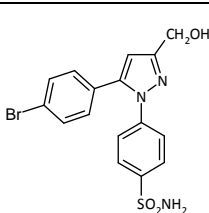
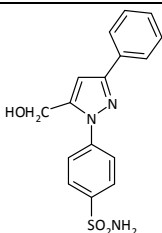
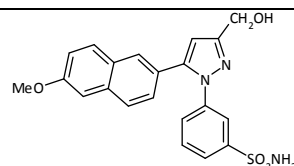
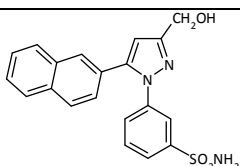
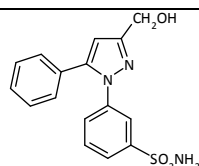
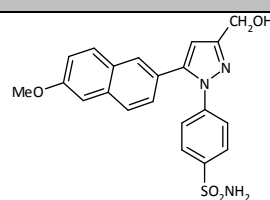
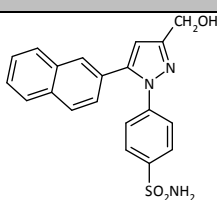
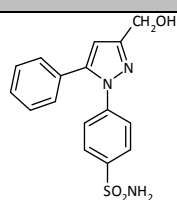
- Une fonction sulfonamide portée par un aryle qui interagira sous sa forme anionique avec le zinc.
- Un hétérocycle de type pyrazole permettant de rigidifier la structure et ainsi orienter les substituants.
- Un groupement aryle (Ar) substitué ou non par des halogènes ou des fonctions éthers, nécessaire à l'interaction avec les résidus de la poche hydrophobe.
- Une fonction alcool (primaire, secondaire ou tertiaire) interagissant avec l'acide aminé Tryptophane 5 du site actif de l'AC IX.

Les travaux effectués au laboratoire de l'ICPAL ont ainsi abouti à diverses séries de composés. Par la suite, différentes modulations autour de ces produits ont été réalisées afin d'améliorer leur activité et leur sélectivité et d'élargir les relations structure activité.

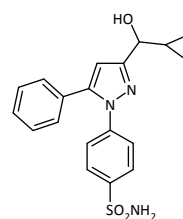
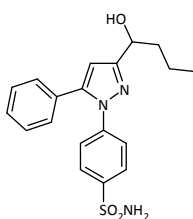
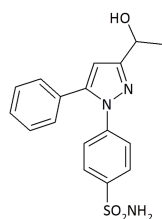
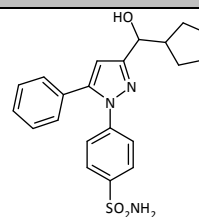
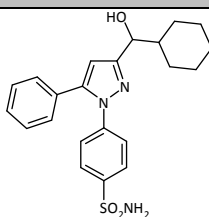
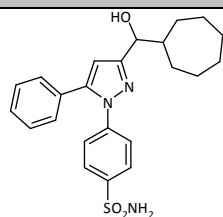
## 5.2. Conception d'une chimiothèque d'inhibiteurs sélectifs de l'AC IX

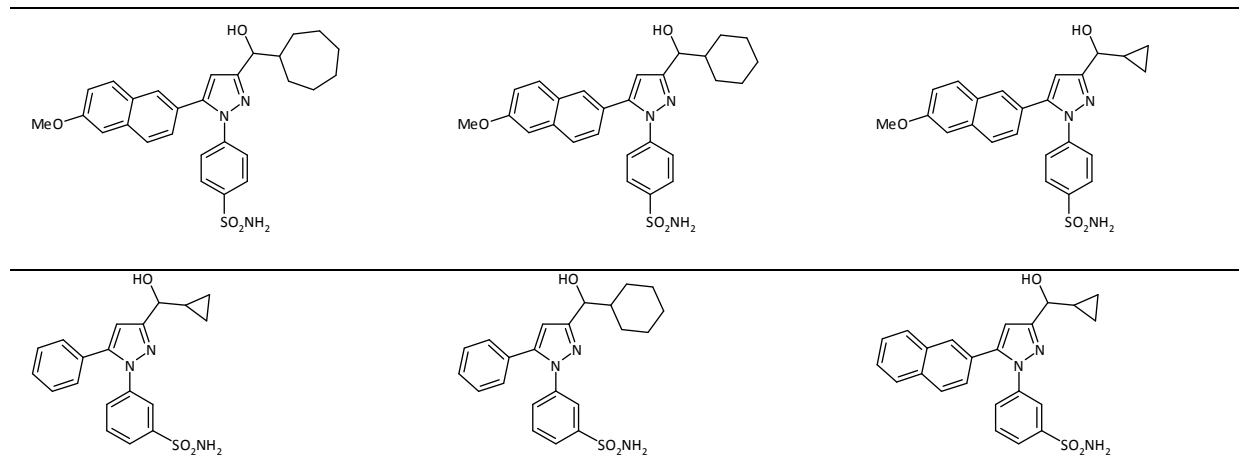
De nouvelles séries de composés ont été synthétisées. Ces composés se distinguent par la nature de l'aromatique, la classe de l'alcool et la nature de ses substituants, ou par la position du sulfonamide sur le phényle. Les divers composés étudiés au cours de nos travaux sont répertoriés dans le tableau suivant :

### Dérivés alcool primaire



### Dérivés alcool secondaire





**Tableau 1** : Chimiothèque de certains composés synthétisés au laboratoire de l'ICPAL

Ces différents composés originaux sont caractérisés par une solubilité aqueuse de l'ordre de 40  $\mu\text{M}$ , valeur jugée faible pour le développement des études pharmacologiques. Pour améliorer cette propriété, différentes approches sont rapportées dans la littérature et seront détaillées ci-après. Dans cette partie généralités, nous détaillerons également les méthodes d'interaction moléculaire permettant la mesure des affinités de ces composés et leur cible protéique.

## Partie 2 : Les méthodes d'optimisation de la solubilité

La limite principale de l'utilisation de composés en tant qu'agents thérapeutiques est liée à leur manque de solubilité dans les conditions physiologiques. En effet, pour être de bons candidats médicaments, les dérivés doivent être lipophiles pour permettre le passage des membranes cellulaires et doivent également posséder une solubilité suffisante dans les conditions physiologiques pour être pharmacologiquement actifs. Dans le but d'augmenter leur solubilité aqueuse ainsi que leur biodisponibilité, différentes approches peuvent être envisagées.

### I. La formation d'une *prodrogue*

La formation d'une *prodrogue* peut également être envisagée. Une *prodrogue* désigne toute molécule qui doit subir une biotransformation, après son administration dans l'organisme, pour que s'exerce une activité pharmacologique. La formation d'une *prodrogue* peut augmenter la lipophilie ou l'hydrosolubilité d'un composé, mais également sa durée d'action et son effet pharmacologique. Des *prodrogues* sont par ailleurs décrites dans la littérature pour leur faible toxicité et leurs effets secondaires réduits. La *prodrogue* s'obtient par condensation de la structure active, en général par liaison covalente, à un groupement temporaire. Cette molécule, dépourvue d'activité pharmacologique, doit être clivable *in vivo* à une vitesse supérieure à celle de son propre métabolisme, et à celle du métabolisme de la molécule libérée. En outre, le groupement temporaire libéré ne doit pas posséder pas d'activité pharmacologique propre ni de toxicité.

Des sulfonamides glycoconjugués affins pour différentes isoformes de l'AC ont été synthétisés par l'équipe de Moeker (2012). Ces dérivés présentent un double intérêt : leur imperméabilité pour la membrane cellulaire qui induit une sélectivité pour les isoformes extra-membranaires d'intérêts (AC IX et AC XII), vis-à-vis des isoformes ubiquitaires cytosoliques (AC II et AC I). De plus, les *prodrogues* présentent une solubilité supérieure à leur homologue.

### II. La vectorisation

La vectorisation met en jeu des vecteurs de différents types (viraux ou synthétiques) permettant de transporter des principes actifs (PA) au sein de l'organisme directement au niveau des cellules malades afin d'éviter aux cellules saines d'être affectées par le PA. La vectorisation a pour

objectif de contrôler et de moduler la distribution d'un principe actif vers une cible. La vectorisation permet d'augmenter la solubilité aqueuse et/ou de diminuer la toxicité des PA.

On distingue trois types de nanovecteurs :

- les liposomes, vésicules biodégradables, qui sont composés de deux couches de lipides et d'un compartiment aqueux situé au centre du nanovecteur. Leur taille est voisine de 100 nm (70 fois plus petit qu'un globule rouge). Lorsque le principe actif est hydrophile, il est placé dans le compartiment aqueux, mais lorsqu'il est lipophile, il est placé dans la bicouche de lipides.
- les nanosphères, polymères biodégradables de forme sphérique. Le principe actif est dispersé dans la matrice de polymères. Il sera libéré lors de la dégradation de la nanosphère.
- les nanocapsules, paroi fine de polymère biodégradable qui entoure le principe actif. On parle alors de "réservoir" de principe actif.

Il existe différentes générations de nanovecteurs. La première génération correspond aux nano-objets qui sont préparés par assemblage de monomères (liposomes, micelles, nano-émulsions). Cette première génération est rapidement reconnue comme substance étrangère et est prise en charge par les macrophages du foie afin d'être éliminée (ce type de nanovecteur est notamment utilisé dans les cancers du foie, car il y a libération du PA lors de l'interaction du nanovecteur avec les macrophages). La deuxième génération correspond aux nano-objets greffés par un polymère hydrophile, appelé PolyEthylèneGlycol (PEG). Rendus alors «furtifs», ces nanovecteurs passent alors la barrière des macrophages et peut ainsi atteindre d'autres organes que le foie. La troisième génération de vecteurs porte, en plus du PEG, une molécule de ciblage, qui peut être par exemple le ligand d'un récepteur, ou un anticorps dirigé contre une protéine surexprimée (cette génération peut être utilisée afin de cibler des cellules cancéreuses à l'aide de marqueurs connus des cellules cancéreuses).

Les nanovecteurs, sont actuellement très utilisés dans de nombreuses formulations médicamenteuses, telles que l'Ambisome® (formulation liposomale d'amphotéricine B, antifongique). Des nanoparticules sont utilisées actuellement afin d'augmenter la solubilité des molécules tumorales, ainsi que leur sélectivité pour les cellules cancéreuses tout en limitant leur toxicité sur les tissus sains (Horcajada *et al*, 2010 ; Shapira *et al*, 2011). L'Abraxane® a obtenu une AMM en 2008, pour le traitement du cancer du sein. Le Doxil®/Caelyx® (PEG-liposome de doxorubicine), est quant à lui utilisé pour le traitement de nombreux cancers.

### III. Les cyclodextrines

Les agents complexants, tels que les cyclodextrines (CDs) permettent également d'augmenter la solubilité de nombreux composés. Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques constituées d'un assemblage d'unités D-glucopyranoses liées entre elles par des liaisons  $\alpha$ -(1,4). Les cyclodextrines possèdent une structure en forme de cône tronqué présentant une cavité plutôt hydrophobe capable d'accueillir des molécules hydrophobes. La complexation de molécules peu solubles en solution aqueuse par des CDs permet d'améliorer leur solubilité mais aussi de modifier leur biodisponibilité, de réduire leur toxicité ou encore d'améliorer leur stabilité (Loftsson *et al*, 2005).

Zhang (2013) utilise des cyclodextrines pour améliorer la solubilité du brinzolamide, un inhibiteur de l'anhydrase carbonique utilisé dans le traitement du glaucome. L'auteur a étudié la formation d'un complexe entre le brinzolamide et l'hydroxypropyle- $\beta$ -cyclodextrine dans le but d'augmenter l'effet thérapeutique du dérivé. La formation du complexe PA/CD a été contrôlée par des études de spectroscopie infrarouge et de RMN. Une constante de complexation de  $32 \text{ M}^{-1}$  a été obtenue pour le complexe brinzolamide/HP- $\beta$ -CD. Le brinzolamide complexé présente une solubilité aqueuse dix fois supérieure à celle de la forme libre. Ces résultats suggèrent que le complexe inhibiteur/cyclodextrine est une formulation prometteuse pour le traitement du glaucome.

Une étude récente menée par Garcia-Fernandez *et al* (2013), décrit l'utilisation de polymères de cyclodextrines, obtenus par réticulation des CDs à l'aide de l'acide citrique, pour augmenter la solubilité de l'éthoxzolamide, un inhibiteur spécifique de l'anhydrase carbonique.



## Partie 3 : Etudes des interactions moléculaires

Dans le domaine de la recherche pharmaceutique, il est crucial de comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu lors des processus biologiques pour élaborer des stratégies thérapeutiques. Les études d'interactions moléculaires peuvent aider à la compréhension de la fonction biologique en révélant des précisions mécanistiques, et de ce fait à l'identification de cibles et plus important encore, permettre l'identification de nouveaux ligands qui peuvent moduler l'activité biologique de la cible.

L'étude des interactions moléculaires peut porter sur des interactions de type protéine/protéine, ADN/protéine, ADN/lipide, lipide/lipide (interactions impliquées dans processus biologique), mais aussi sur des interactions protéine/molécule de bas poids moléculaires (interactions entre une cible et un principe actif) et cyclodextrine/molécule de bas poids moléculaires (interactions entre un principe actif et un agent de formulation).

Dans un premier temps, un bref rappel des différents types d'interactions non-covalentes mises en jeu lors de la formation de complexe sera réalisé. Dans un second temps, les méthodes principales de caractérisation des interactions moléculaires seront présentées.

### I. Généralités concernant les complexes non covalents

#### 1. Les différents types d'interaction mis en jeu

Il existe quatre types d'interactions non-covalentes communément admises : les interactions ioniques, les forces de Van der Waals, les liaisons hydrogènes qui sont des interactions électrostatiques et les interactions issues de l'effet hydrophobe.

L'**interaction ionique** est un phénomène observé entre deux groupements portant chacun une charge nette positive ou négative (soit au sein d'une seule molécule soit entre deux molécules). Ces interactions peuvent conduire à un effet attractif ou répulsif.

Des interactions entre molécules neutres se forment à partir d'interactions électrostatiques entre dipôles permanents et/ou dipôles induits. Les forces résultantes, sont responsables d'interactions multiples entre atomes voisins non liés et sont appelées communément **forces de Van der Waals**.

L'origine de la **liaison hydrogène** est essentiellement électrostatique et de type dipôle-dipôle induit. Un hydrogène porté par un atome fortement électronégatif va porter une fraction de charge positive qui polarisera fortement une autre molécule possédant un doublet non liant.

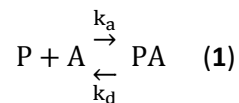
L'**effet hydrophobe** est le nom donné à l'ensemble des facteurs qui permettent aux substances non polaires de minimiser leurs contacts avec l'eau. L'aggrégation de molécules non polaires minimise la surface de contact avec l'eau.

## 2. Approches mathématiques de l'interaction moléculaire

La constante d'équilibre de dissociation ( $K_D$ ) et la constante d'inhibition ( $K_i$ ) sont parmi les paramètres les plus couramment calculés pour évaluer l'interaction d'un analyte à une macromolécule (Krihnamurthy *et al*, 2008).

### 2.1. Les constantes thermodynamiques d'association $K_A$ et de dissociation $K_D$

L'équation décrivant la formation réversible d'un complexe binaire (ici protéine-analyte) est la suivante :



Avec P : protéine, A : analyte et PL : complexe protéine/analyte

L'équilibre est atteint quand la vitesse d'association du ligand à la protéine est égale à la vitesse de dissociation du complexe. Dans ces conditions :

$$K_A = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[PA]}{[A][P]} \quad (2)$$

$K_A$  est la constante thermodynamique d'association, elle s'exprime dans la dimension d'une concentration molaire.  $K_A$  exprime indirectement l'affinité du ligand pour la protéine. Quand la concentration en ligand est égale au  $K_A$ , 50% de la protéine est complexée.

On peut également exprimer  $K_D$ , la constante thermodynamique de dissociation, qui caractérise la réaction de dissociation du complexe.  $K_D$  est inversement proportionnel à l'affinité d'une protéine pour un ligand.

$$K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{[A][P]}{[AP]} = \frac{k_d}{k_a} \quad (3)$$

## 2.2. La constante d'inhibition $K_i$

La constante d'inhibition,  $K_i$  est déterminée à partir d'une  $CI_{50}$  afin de standardiser les données à partir de l'équation de Cha (Cha *et al*, 1975).

La  $CI_{50}$  est une mesure de l'efficacité d'un composé donné pour inhiber de moitié une fonction biologique ou biochimique spécifique.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[A]}{K_M}} \quad (4)$$

Avec  $CI_{50}$ : concentration inhibitrice ;  $[A]$  : concentration de l'analyte et  $K_M$  : constante de Michaelis du substrat qui correspond à la concentration du substrat nécessaire pour avoir une activité égale à la moitié de l'activité maximale.

## 3. Les techniques d'analyse des interactions moléculaires

Les technologies basées sur l'étude de l'affinité sont devenues des outils pertinents pour détecter et caractériser les interactions moléculaires lors du processus de découverte de médicament.

La sélection de la technologie appropriée est une étape clé dans ce processus dans la mesure où chacune d'elles permet d'obtenir des informations parfois différentes. Outre les avantages incontestables de ces technologies, elles affichent naturellement diverses restrictions qui sont très souvent liées au système cible à étudier, mais aussi à la solubilité et à la masse molaire des ligands ainsi qu'à la valeur de l'affinité mesurée. Ces critères permettent de sélectionner la technologie la plus adéquate.

On distingue deux grandes familles de techniques, à savoir des techniques avec et sans marquage préalable d'au moins un des partenaires. Les techniques avec marquage reposent sur la capacité d'un des partenaires à fluorescer ou à émettre des rayonnements  $\gamma$  ou  $\beta$  (désintégration). De ce fait, dans ce chapitre, nous développerons, les différentes techniques classiquement utilisées pour les études d'interactions moléculaires et tout d'abord les dosages utilisant un marquage préalable.

L'importance et la généralisation des méthodes de dosages immunologiques sont attribuées à leur spécificité et à leur grande sensibilité pour l'analyse d'une large gamme d'analytes dans des échantillons biologiques. Ces méthodes de dosage nécessitent le plus souvent un marquage d'un des partenaires. Le terme de « marquage » décrit le fait qu'une substance soit liée chimiquement à un antigène ou à un anticorps afin de pouvoir le détecter et le quantifier. Les étiquettes immunochimiques comprennent des molécules fluorescentes, des radio-isotopes, des molécules chimioluminescentes, qui déterminent la catégorie spécifique de chaque méthode. Deux types de marquage utilisés classiquement dans les études d'interactions moléculaires seront détaillés ici.

### **3.1. Méthodes utilisant des radio-éléments**

Ces méthodes consistent à incorporer dans des composés d'intérêt, des isotopes radioactifs ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ ...) qui en se désintégrant, émettent des rayons gamma et/ou bêta. Les méthodes de dosage radioactif ont été utilisées avec succès pour la caractérisation d'un nombre important de composés en recherche pharmaceutique dans les fluides biologiques (Darwish, 2006). L'avantage majeur d'un dosage radioactif est son extrême sensibilité.

Le radio-marquage des molécules est une méthode de première intention qui reste une des plus sensibles pour l'étude des interactions moléculaires. Cependant, le travail avec des radioéléments nécessite des précautions particulières, notamment dans l'utilisation et dans l'élimination des déchets. De plus, des temps de demi-vie courts pour certains isotopes (14 jours pour le  $^{32}\text{P}$ ) et l'instrumentation coûteuse pour la mesure de la radioactivité, sont les inconvénients majeurs de cette méthodologie.

### **3.2. Méthodes utilisant des composés fluorescents**

Une molécule fluorescente a la capacité d'absorber de l'énergie lumineuse et de la restituer immédiatement sous forme d'une émission de photons. Depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle, les techniques utilisant la fluorescence se sont considérablement diversifiées. On peut citer par exemple l'ELISA, acronyme de « Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay ». Cette technique est souvent employée pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène en solution (Lequin, 2005). On peut également s'intéresser à d'autres techniques, telles que le FRET.

Le FRET (« Fluorescence Resonance Energy Transfer ») est une technologie qui permet de suivre des interactions intermoléculaires entre deux partenaires. Pour cela deux fluorophores sont

utilisés simultanément ; un fluorophore donneur est excité à une longueur d'onde spécifique qui transmet ensuite son énergie à un fluorophore accepteur qui émettra alors la fluorescence. Ce phénomène n'est possible que lorsque les deux fluorophores sont situés à moins de 100 Å. Ainsi, le donneur et l'accepteur sont greffés sur deux molécules différentes et si celles-ci interagissent, l'accepteur émet de la fluorescence.

Ces techniques immunologiques sont classiquement utilisées pour la mise en évidence d'une interaction entre deux macromolécules, comme pour une interaction protéine/protéine ou protéine/ADN.

A notre connaissance ces méthodes nécessitant un marquage préalable n'ont pas été utilisées pour l'étude de l'affinité d'inhibiteur de l'anhydrase carbonique, elles ne seront pas d'avantage développées.

### **3.3. Méthodes instrumentales**

A l'heure actuelle, il existe un panel de méthodes d'analyse qui permettent de caractériser l'affinité potentielle d'un ligand pour une cible. Une liste non exhaustive des méthodes instrumentales permettant de caractériser l'interaction entre deux partenaires est développée ci-dessous.

#### **3.3.1. La spectrométrie de masse**

L'utilisation de la spectrométrie de masse (SM) pour la caractérisation de ligands potentiels a été largement développée ces vingt dernières années. En effet, les années 80 marquent le début d'une nouvelle tendance dans les applications de la spectrométrie de masse. L'apparition du mode électrospray (ESI) a apporté de nouvelles applications dans le domaine de la biologie et permet une ionisation douce des structures moléculaires sans rupture des liaisons non covalentes établies entre deux biomolécules (protéine/ligand).

La spectrométrie de masse supramoléculaire a lieu dans des conditions non dénaturantes ayant pour objectif de garder intact le complexe ligand/protéine lors du transfert en phase gaz. La spectrométrie de masse supramoléculaire fournit des données informatives sur la stœchiométrie, la spécificité et l'affinité d'un complexe formé en solution.

La méthode de titration d'un ligand souvent utilisée avec un système ESI-MS implique la détection des ions appartenant à la protéine liée par rapport à ceux appartenant à la protéine non

liée qui sont facilement distingués par le changement de masse caractéristique correspondant à la liaison non covalente du ligand. La valeur de la constante thermodynamique de dissociation du complexe  $K_D$  peut alors être calculée à partir du rapport des intensités du signal de l'ion correspondant à la protéine liée sur celui correspondant à la protéine non liée en fonction de la concentration de ligand introduite en solution. On suppose qu'aucune dissociation n'a lieu au cours de la transmission à travers le spectromètre de masse et que le ligand (petite molécule) lié à la protéine n'altère pas l'efficacité d'ionisation du complexe non covalent (Daniel *et al*, 2002).

L'avantage de l'ESI-MS par rapport aux techniques biophysiques est de fournir directement des données sur toutes les espèces présentes en solution, grâce à la mesure précise de leur masse. La limitation de cette technique concerne son incompatibilité avec de nombreuses solutions tampons (Ashcroft, 2005).

Jecklin *et al* (2009) ont menés une étude comparative de trois méthodes biophysiques, à savoir la spectrométrie de masse, la résonance plasmonique de surface et la calorimétrie de titration isotherme, pour l'évaluation de l'affinité d'inhibiteurs de l'anhydrase carbonique. Au cours de ces travaux, huit inhibiteurs reconnus de l'AC I ont été étudiés. Des constantes thermodynamiques de dissociation ( $K_D$ ) équivalentes ont été obtenues avec les trois techniques pour cinq composés. En raison de la détermination directe de la stœchiométrie de l'interaction, de l'automatisation et de la faible consommation d'échantillon, l'ESI-SM semble d'après les auteurs, être une méthode permettant l'étude de ligands potentiels de l'AC I.

### 3.3.2. La résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique spectroscopique basée sur l'interaction entre un champ magnétique et les spins des noyaux atomiques. Grâce au développement des études RMN basées sur les signaux de résonance de la protéine ou des ligands, des études d'interactions protéine/ligand par RMN peuvent être menées. Afin d'étudier l'interaction entre deux partenaires, il est possible, en théorie, d'étudier différents paramètres spectroscopiques de la RMN (tels que le déplacement chimique, le temps de relaxation, l'effet NOE ou encore les constantes de diffusion). Deux méthodes sont classiquement utilisées, la première exploite la variation du déplacement chimique de la protéine cible induite par le ligand, et la seconde approche consiste à cibler les signaux de RMN du ligand et notamment à regarder l'effet NOE transféré de la protéine au ligand.

Ces dernières années, la RMN a évolué pour devenir un outil puissant lors du criblage de ligands potentiels (Shuker *et al*, 1996). Cette technique présente néanmoins un inconvénient : la

nécessité d'une vitesse de dissociation des complexes protéine/ligand doit être suffisamment rapide, ce qui ne permet d'analyser que des interactions avec une affinité de l'ordre du millimolaire ou du micromolaire. De plus, des quantités importantes de protéine sont nécessaires, typiquement 0,5 mg pour étudier l'affinité d'un ligand avec une protéine de l'ordre de 30 kDalton.

Des études de RMN ont été réalisées (Culf *et al*, 1997 ; Dugad *et al*, 1988 et 1989 ; Kanamori et Roberts, 1983) avec les isoformes I et II de l'anhydrase carbonique et des inhibiteurs spécifiques afin de caractériser le type d'interactions moléculaires (stœchiométrie et/ou site de liaison). Ces études ont permis de démontrer que la liaison des dérivés arylsulfonamides s'effectue sous la forme anionique ( $\text{ArSO}_2\text{NH}^-$ ) à l'atome de zinc II du site actif de l'anhydrase carbonique I.

Par ailleurs, la RMN du proton est une technique très souvent utilisée afin de déterminer les interactions physico-chimiques lors de la formation d'un complexe ligand/cyclodextrine (Bratu *et al*, 2005 ; Schneider *et al*, 1998). La RMN permet non seulement d'évaluer la stœchiométrie du complexe et de déterminer sa constante d'association mais aussi d'en étudier la géométrie. Des études de complexation entre un inhibiteur connu de l'AC, le brinzolamide et une cyclodextrine (hydroxypropyle- $\beta$ -CD) ont été réalisées par l'équipe de Zhang (2013), (*c.f.* paragraphe cyclodextrine chapitre 2).

### 3.3.3. L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique séparative qui offre de nombreux avantages puissants tels que la précision et la faible consommation de réactifs, ce qui la rend particulièrement attractive et bien adaptée à l'analyse de complexes non covalents. Les méthodes les plus classiques permettant la détermination de constantes d'affinité par EC sont l'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE) et l'analyse frontale (CE-FA).

L'électrophorèse capillaire d'affinité, l'ACE, est basée sur la variation de la mobilité électrophorétique d'un des deux partenaires observée lors de l'injection de ce dernier dans un électrolyte de séparation contenant une concentration croissante de ligand (Chu *et al*, 1992). Cependant cette méthode n'est valide que pour les systèmes possédant une cinétique rapide, car elle nécessite l'existence d'un équilibre dynamique au sein du capillaire. De plus, bien qu'elle présente l'avantage de ne pas nécessiter la connaissance exacte de la concentration du partenaire injecté en solution à concentration croissante, elle implique de disposer d'une quantité importante de ligand (Rundlett *et al*, 2001). L'ACE est classiquement utilisée lors de l'étude de complexes protéine/petite molécule mais aussi cyclodextrines/petite molécule (Danel *et al*, 2011).

Diverses expériences en ACE avec différentes isoformes de l'AC et des inhibiteurs spécifiques de l'AC ont été décrites (Krishnamurthy *et al*, 2008 ; Colton *et al*, 1998). Ces études ont montré la capacité de l'ACE à déterminer simultanément les valeurs des constantes  $K_D$  pour plusieurs isoformes de l'AC (AC I et AC II).

L'analyse frontale (CE-FA) consiste à injecter un volume d'échantillon comportant un mélange protéine/ligand pré-incubé dans un capillaire rempli de l'électrolyte de séparation. Cette méthode exige que la mobilité électrophorétique du ligand soit différente de celle de la protéine et de celle du complexe protéine/ligand. Lors de l'application du champ électrique, le ligand libre se sépare de la zone d'échantillon pour former un large plateau, qui se distingue du plateau correspondant à la protéine et au complexe protéine/ligand. La hauteur du plateau, qui correspond au ligand libre, est proportionnelle à son degré de complexation. L'étude de mélanges contenant des concentrations croissantes de protéine conduit à l'obtention d'un isotherme d'interaction qui permet d'évaluer la constante d'interaction. Cette méthode permet d'étudier tout type de système (rapide ou lent) dès lors que l'équilibre est maintenu pendant l'analyse. Cependant, les méthodes de mesure d'interactions moléculaires en électrophorèse capillaire restent délicates à mettre en œuvre, notamment en raison de la capacité d'adsorption des protéines sur la surface du capillaire.

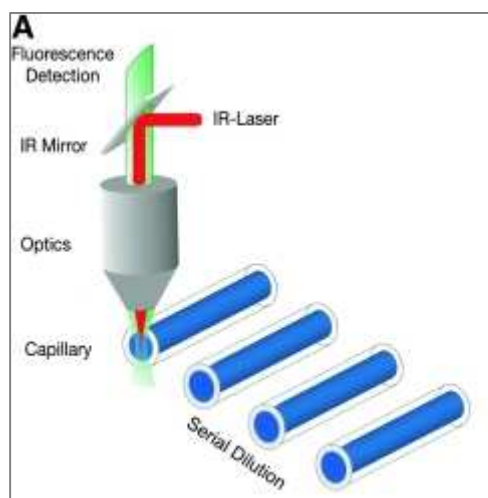
#### **3.3.4. La thermophorèse**

La thermophorèse à micro-échelle (MST) est une méthode récente qui permet l'analyse quantitative d'interactions moléculaires en solution à l'échelle du microlitre. La méthode est basée sur le mouvement de molécules dans un gradient de température, effet appelé "thermophorèse". Si l'on crée un gradient de température en irradiant un échantillon par un laser infra rouge ( $\Delta T = 2-3^\circ\text{C}$ ), on observe un déplacement des molécules du chaud vers le froid, ce qui engendre une diminution de la concentration de molécule au centre du gradient. Le phénomène de thermophorèse est intimement lié à la charge, la taille et à la solvatation des molécules. Comme l'interaction entre deux partenaires modifie au moins une de ces propriétés, la liaison d'un ligand à une biomolécule peut être quantifiée par mesure de ces changements thermophorétique. Le phénomène de thermophorèse est suivi par une mesure de fluorescence. Il est donc nécessaire qu'un des deux partenaires soit capable de fluorescer, soit à l'état natif, soit après marquage.

La technique est applicable à des échantillons en solution dans des tampons classiques ou à des échantillons biologiques comme le sang ou les lysats cellulaires. La MST permet d'accéder à des informations relatives à la stœchiométrie, à la constante thermodynamique de dissociation, à



l'enthalpie de deux ou plusieurs partenaires en interaction mais aussi de visualiser d'éventuels changements de conformation (figure 2).



**Figure 2:** Représentation schématique d'un système de thermophorèse

Les avantages de la thermophorèse à micro-échelle sont la faible consommation d'échantillon et la possibilité d'étudier une gamme étendue de constantes thermodynamiques de dissociation entre le sub-nanomolaire et le millimolaire.

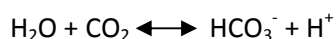
Parent (2011) a étudié l'affinité obtenue par MST pour quatre inhibiteurs connus de l'anhydrase carbonique de type II. Cette étude compare les résultats obtenus en MST avec et sans marquage de l'anhydrase carbonique. L'étude sans marquage utilise la fluorescence intrinsèque des résidus tryptophanes de l'anhydrase carbonique, et celle avec marquage est réalisée par couplage covalent d'un fluorophore (Dye NT-647) à l'anhydrase carbonique II. Quatre inhibiteurs connus de l'AC ont été étudiés, le 4-Carboxybenzenesulfonamide, le sulfanilamide, le furosemide et le l'acide 4-sulfamoybenzoïque (par exemple, AC II/4-Carboxybenzenesulfonamide,  $K_D$  (MST avec marquage) = 1,3  $\mu$ M et  $K_D$  (MST sans marquage) = 0,40  $\mu$ M). L'affinité du sulfanilamide n'a pas pu être étudiée en MST sans marquage, en raison de sa propre émission de fluorescence dans la gamme spectrale utilisée.

## II. Interactions ligand/anhydrase carbonique

Après avoir décrit la méthode enzymatique permettant de caractériser l'activité des inhibiteurs d'AC, les trois techniques utilisées dans ce travail seront présentées.

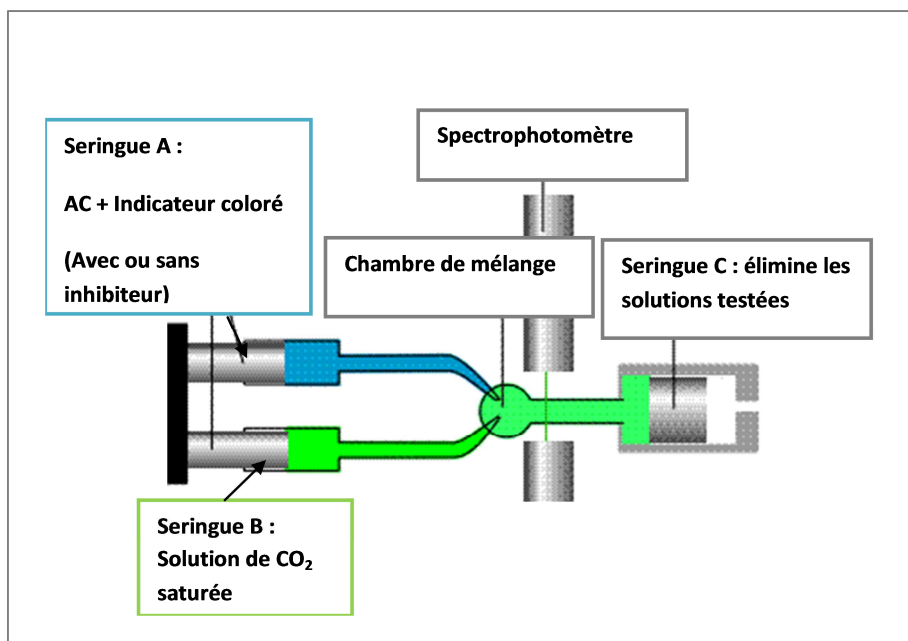
### 1. Technique mesurant l'(les) activité(s) enzymatique(s) de l'AC

Les AC catalysent la réaction d'hydratation du dioxyde de carbone selon l'équation :



Cette réaction conduit à la libération de protons dans le milieu. Une des méthodes de mesure de l'activité enzymatique de l'AC consiste donc en l'étude des variations du pH lors de l'addition d'inhibiteurs potentiels. Typiquement, l'utilisation d'indicateurs colorés ou d'électrodes de pH permet de suivre ces variations. C'est ce qui a été mis à profit pour développer la méthode actuelle de référence, utilisant la spectrophotométrie dite de « stop-flow » (Khalifa, 1971).

L'enzyme est incubée à température ambiante dans une solution saturée en dioxyde de carbone, servant de substrat, en présence d'un indicateur coloré. Les protons produits par l'enzyme vont acidifier le milieu, provoquant un changement de couleur de l'indicateur coloré. Les variations de pH dans le milieu sont alors suivies par mesure de l'absorbance à l'aide d'un appareil de type « stop-flow » couplé à une cellule photosensible UV-Visible (figure 3).



**Figure 3 :** Appareil de type « stop-flow » utilisé pour la détermination du potentiel inhibiteur de dérivés issus de la synthèse vis-à-vis de l'anhydrase carbonique.

La technique de stop-flow permet un mélange rapide de l'indicateur coloré et de la solution saturée en dioxyde de carbone. L'activité résiduelle, exprimée en pourcentage, est calculée par le rapport de l'activité en présence de l'inhibiteur sur celle en absence de l'inhibiteur. L'ensemble des valeurs obtenues à différentes concentrations en inhibiteur permet de représenter le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en inhibiteur. La constante d'inhibition,  $K_i$  est alors déterminée à partir de l' $CI_{50}$  (concentration inhibant de moitié l'activité enzymatique) afin de standardiser les données à partir de l'équation de Cha (Cha *et al*, 1975).

Cette technique est classiquement utilisée par les chercheurs dont les travaux portent sur l'étude d'inhibiteurs de l'anhydrase carbonique. Les membres de l'équipe du Professeur Supuran rattachés au laboratoire de Chimie Inorganique et Bioinorganique de l'Université de Florence, utilisent notamment cette technique pour évaluer le potentiel inhibiteurs de molécules originales, (Supuran *et al*, 2003 ; Temperini *et al*, 2007).

Cette technique nécessite des quantités non négligeables en enzyme, ce qui reste un problème notamment pour certaines isoformes, telle que l'isoforme IX (AC IX), dont la production reste encore assez difficile.

Il est également possible d'évaluer l'activité enzymatique de l'AC en mesurant la quantité de CO<sub>2</sub> consommée ou encore en évaluant l'activité estérase de l'AC par l'utilisation de méthodes

spectrophotométriques basées sur l'hydrolyse de l'acétate de *p*-nitrophényle (p-NPA) (Verpoorte *et al*, 1967).

## 2. La calorimétrie de titration isotherme

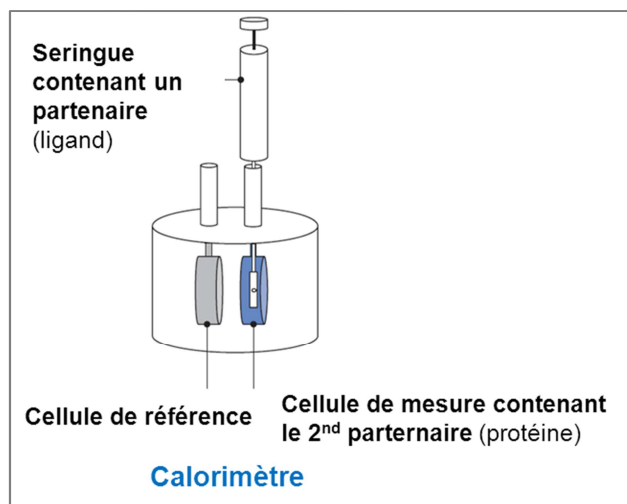
Depuis dix ans la calorimétrie de titration isotherme (ITC) est considérée comme la méthode « en or » (« gold-méthod ») pour la mesure directe à la fois de l'affinité et des paramètres thermodynamiques de liaison entre deux partenaires (Freyer et Lewis, 2008). Cette technique permet de déterminer en plus de l'affinité, l'enthalpie,  $\Delta H$  et la stœchiométrie caractérisant l'interaction en une seule expérience (Baranauskiene *et al*, 2009). L'ITC est maintenant largement utilisée dans le domaine de la découverte de médicaments pour mesurer les paramètres thermodynamiques de l'interaction moléculaire, y compris pour l'étude d'un composé « lead » en interaction avec une protéine (Ward et Holdgate, 2001 ; Wintgens et Amiel, 2010 ; Danel *et al*, 2011).

Contrairement à certaines méthodes non calorimétriques qui ne font qu'estimer les paramètres thermodynamiques par le biais de l'analyse de Van't Hoff (Heerklotz et Seelig, 2000), l'ITC mesure directement ces paramètres. Un profil thermodynamique complet est obtenu en un temps d'analyse restreint.

### 2.1. Principe

Le système d'ITC est constitué de deux cellules identiques, placées dans une enceinte adiabatique (figure 4). La première cellule est utilisée comme référence, alors que la seconde correspond à la cellule de mesure. Une seringue complète le dispositif et permet d'injecter une solution différente de celle contenue dans la cellule (Schwarz *et al*, 2008).

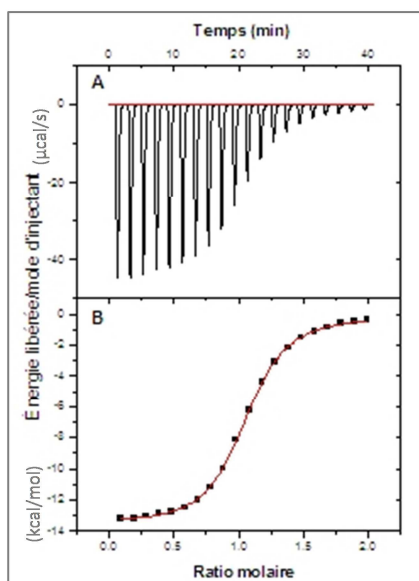
Une thermopile reliant les deux cellules va permettre de détecter toute différence de température entre celles-ci, afin d'estimer la puissance (et donc la chaleur) à apporter par effet Peltier pour maintenir une température identique dans les deux cellules.



**Figure 4** : Schéma simplifié de l'ITC

La cellule de référence contient la solution tampon seule et la cellule de mesure contient habituellement la macromolécule (protéine, lipide, acide nucléique,...) dans la même solution tampon. Après avoir équilibré le système à la température d'étude, l'analyte est injecté dans la cellule d'analyse par petites injections successives. La seringue d'injection munie d'une pale permet une agitation dans la cellule d'analyse.

A chaque ajout d'analyte correspond un échange thermique résultant de l'interaction ligand-analyte, qui est proportionnel à la quantité de complexe formé. L'énergie échangée, calculée indirectement en mesurant la puissance apportée à la cellule de mesure pour maintenir sa température identique à celle de la cellule de référence, est rapportée sur un thermogramme (figure 5, A). Si la réaction de complexation est exothermique, la puissance à apporter à la cellule d'analyse diminue, ce qui se traduit par un signal négatif sur le thermogramme, comme l'illustre la figure 5. Inversement, si la réaction est endothermique, la puissance à apporter augmente et le signal obtenu sera positif.



**Figure 5 :** Exemple de (A) thermogramme et (B) d'isotherme d'interaction permettant la détermination de la stœchiométrie du complexe formé et des paramètres thermodynamiques de l'interaction

Grâce à un logiciel de traitement de données, une deuxième courbe est générée par intégration des pics de variation d'énergie pour obtenir l'évolution de la variation d'enthalpie ( $\Delta H$ ) en fonction du rapport molaire ligand/macromolécule appelé « isotherme d'interaction » (figure 5, B).

## 2.2. Exploitation de l'isotherme d'interaction

L'isotherme d'interaction permet de déterminer la stœchiométrie de la réaction de complexation ( $n$ , obtenue sur l'axe des abscisses, au point d'inflexion de la courbe), la constante d'affinité ( $K_A$ ) et les paramètres thermodynamiques de l'interaction (variations d'enthalpie libre  $\Delta G$ , d'enthalpie  $\Delta H$ , d'entropie  $\Delta S$ ) par traitement mathématique d'un système d'équation à l'aide d'une procédure algorithmique. De plus, l'évaluation de l'enthalpie de complexation à différentes températures permet de calculer la variation de capacité calorifique  $\Delta C_p$  de cette réaction.

## 2.3. Méthodologie

### 2.3.1. Méthode de titration directe

Classiquement, le partenaire ayant la plus forte concentration est placé dans la seringue (molécule titrante), alors que l'autre partenaire (molécule titrée) est placé dans la cellule de mesure. Les injections conduisent alors à la mise en présence des deux espèces, ce qui implique la formation des complexes (Zhang *et al*, 2007).

Si les solubilités des espèces étudiées ne permettent pas une étude en titration directe (ratio analyte/ligand ne pouvant être supérieur à 10), ou si les variations d'enthalpie induites par la réaction de complexation ne sont pas significatives, une méthode par compétition peut permettre d'étudier indirectement cette réaction.

### 2.3.2. Méthode de titration indirecte

Le principe de la méthode compétitive consiste à observer l'influence d'un analyte compétiteur (analyte C) sur la complexation de l'analyte à étudier (analyte 1 appelé ligand), dont le complexe avec le ligand d'intérêt a préalablement été étudié. Dans le cas de la compétition, deux réactions vont avoir lieu, la dissociation du complexe analyte 1-ligand, et la formation du complexe analyte C-ligand entre le ligand et l'analyte C. Une évolution complexe des intensités va alors être observée, puisque dépendante des stabilités et des chaleurs de complexation des deux analytes (Illapakurthy *et al*, 2005 ; Zhang et Zhang, 1998 ; Chen *et al*, 2011).

En pratique, deux expériences sont nécessaires, à savoir la titration directe du ligand par l'analyte compétiteur, puis l'expérience de compétition à proprement parler (Campoy et Freire, 2005).

## 2.4. Avantages/ Inconvénients

L'ITC est une méthode en solution, directe ou indirecte, ne nécessitant ni marquage, ni immobilisation. Les expériences d'ITC nécessitent généralement des concentrations en protéine de l'ordre de 5 à 10  $\mu\text{M}$ . Ainsi pour une protéine de l'ordre de 50 kDalton, 0,1 mg de protéines sont nécessaires pour réaliser une expérience de titration à l'aide des instruments les plus récents, utilisant des faibles volumes (microCAL<sup>®</sup>), ou jusqu'à 1 mg de protéine par titration avec les instruments possédant une cellule dont le volume est plus important. Ces quantités relativement

élevées de protéines ont tendance à limiter l'application de l'ITC à l'étude d'un nombre limité de composés d'intérêt dans le cadre des projets de découverte de principes actifs. Cependant, dès lors que de grandes quantités de protéines purifiées sont disponibles et grâce aux récents progrès dans l'instrumentation, une série de composés peut être testée afin d'établir des relations structure activité. Par ailleurs, une des limites connues de l'ITC est la détermination de l'affinité de ligand possédant une affinité très forte pour la cible. En effet, lorsqu'un ligand se lie à une cible avec une affinité de quelques nanomolaires ( $K_D < 10$  nM), l'ajustement de l'isotherme de liaison entraîne un biais important lors de la détermination de la constante d'affinité en raison de l'obtention d'une courbe de titration ayant une pente trop « raide ». Dans ce cas, il est donc difficile de déterminer, avec précision l'affinité de ce ligand par calorimétrie de titration isotherme par méthode directe.

## 2.5. ITC/Anhydrase Carbonique

De nombreuses études d'ITC impliquant différentes isoformes de l'anhydrase carbonique ont été menées par le passé. Les travaux de l'équipe de Matulis avaient pour objectifs d'une part de développer une technique permettant d'évaluer l'affinité d'inhibiteurs potentiels de l'anhydrase carbonique et d'autre part d'étudier les paramètres thermodynamiques caractérisant une réaction (Baranauskiene *et al*, 2008 ; Zubriène *et al*, 2009).

Les travaux de Dudutiène *et al* (2007) ont utilisés l'ITC pour la détermination de la constante d'affinité d'une série de ligands potentiels de l'anhydrase carbonique I et II. Alors que les affinités obtenues pour les différents composés sont assez proches, les enthalpies de liaison pour cette série de composé sont assez différentes. De plus, les enthalpies de liaison mesurées pour l'AC II sont supérieures en valeur absolue à celles mesurées pour l'AC I. La liaison de ces composés à l'AC est donc plus exothermique dans le cas de l'isoforme II.

En raison de la limite de l'ITC à déterminer la constante thermodynamique de dissociation d'un ligand possédant une forte affinité pour l'AC, Zubriène *et al* (2009), utilisent alors une méthode alternative. Ils ont déterminé l'affinité de ces ligands par méthode indirecte, en mettant à profit le déplacement de la titration d'un ligand de faible affinité (Zubriène *et al*, 2009).

L'équipe de Matulis comparent dans d'autres publications, les résultats obtenus lors de la mesure de l'affinité de ligands potentiels de l'anhydrase carbonique par ITC avec d'autres méthodes biophysiques, telles que la résonance plasmonique de surface (Day *et al*, 2002 ; Navratilova *et al*, 2007 ; Jekclin *et al*, 2009) et la thermal shift assay (Zubriene *et al*, 2009 ; Sudzius *et al*, 2010 ; Capkauskaite *et al*, 2010, 2012, 2013 ; Dudutiene *et al*, 2013 ; Jogaité *et al*, 2013). Des études



comparatives ont également été réalisées avec la technique spectrophotométrique dite de « stop-flow », lors de l'étude d'inhibiteurs potentiels de l'anhydrase carbonique, (Dudutiène *et al*, 2013). Comme l'ITC est considérée comme une méthode de référence, elle est utilisée comme méthode de confirmation des résultats obtenus par d'autres techniques, permettant ainsi leur validation. Ces études comparatives seront décrites dans les parties suivantes.

L'enthalpie de dénaturation (« unfolding ») de l'anhydrase carbonique II ( $\Delta_uH$ ) a été évaluée par titration de la protéine en présence d'acide (« acide-unfolding ») en ITC, par Baranauskienė *et al* (2008). Il s'agit d'une donnée nécessaire à l'exploitation des résultats lors de la détermination des constantes d'affinité par des techniques telles que la Thermal shift assay. Afin de valider la méthodologie, l'enthalpie  $\Delta_uH$  obtenue par ITC a été comparée à celle obtenue par DSC (calorimétrie différentielle à balayage), qui est la technique classiquement utilisée pour ce type d'application. Ces valeurs obtenues selon les deux techniques sont estimées comme proches.

### **3. La thermal Shift Assay**

La thermal Shift Assay, connue aussi sous le nom de ThermoFluor<sup>®</sup>, ou étude de la thermostabilité des protéines, est une technique basée sur la mesure de l'émission de fluorescence d'un fluorophore interagissant de façon non sélective (molécule rapporteur) avec la protéine d'intérêt.

#### **3.1. Principe**

La stabilité d'une protéine est liée à la composition du milieu dans lequel elle se trouve, mais aussi aux paramètres physiques tels que la température et la pression. Toute variation de l'un de ces paramètres peut conduire à une modification de cette stabilité. Elle peut être altérée en modifiant la composition du milieu dans lequel elle se trouve ou en augmentant la pression ou la température au sein de ce milieu (Holdgate *et al*, 2010). La technique appelée Thermostabilité des Protéines par Fluorescence (TPF) ou Fluorescence-based Thermal Shift Assay (TSA), repose sur l'utilisation d'un agent fluorescent, afin de déterminer la température de fusion d'une protéine utilisée, caractérisant sa stabilité thermique. L'approche est classiquement utilisée pour la caractérisation de la stabilité des protéines dans diverses solutions et en présence de divers excipients (Cimpmperman *et al*, 2008). La TSA permet par ailleurs de caractériser l'interaction d'une protéine et d'une petite molécule. Ceci est en effet possible dans la mesure où la stabilité thermique de la protéine est modifiée lors de son interaction avec une petite molécule. Cette technique est donc couramment utilisée pour le

screening des banques de composés chimiques afin de découvrir de nouveaux ligands potentiels pour des protéines cibles dont le site de liaison n'a pas encore été élucidé.

La technique repose sur l'utilisation d'agents fluorescents, dont l'émission de fluorescence est sensible à leur environnement, tels que le Sypro Orange utilisé dans le cadre de notre étude. En effet, lorsque l'agent fluorescent est ajouté à une protéine native en solution, l'émission de fluorescence est faible. Lorsque la température augmente, la protéine subit une déstructuration et expose des régions hydrophobes. L'agent fluorescent se lie alors à ces régions, ce qui conduit à une augmentation de l'intensité de fluorescence. L'analyse des variations de l'intensité de fluorescence en fonction de la température permet d'obtenir une représentation sous la forme d'une sigmoïde dont le point d'inflexion permet de définir la température de fusion de la protéine ( $T_m$ ), c'est-à-dire la température pour laquelle 50% de la protéine existe à l'état dénaturé (figure 6).

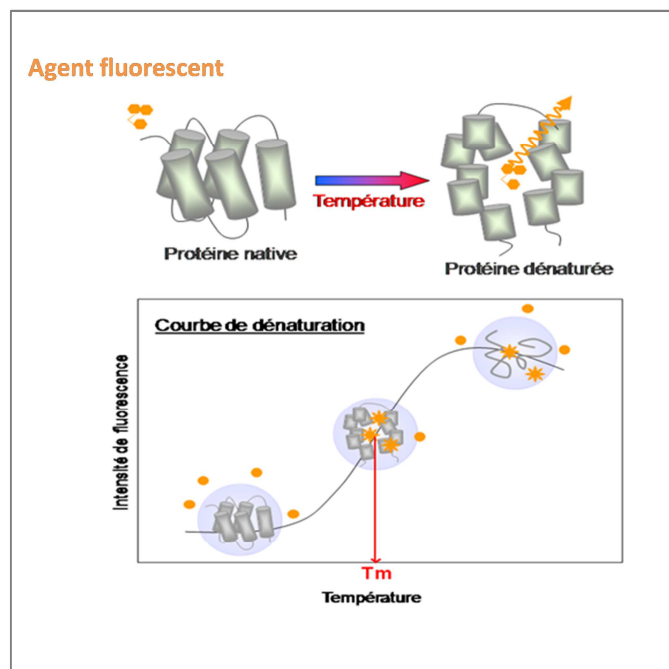


Figure 6 : Courbe de dénaturation thermique d'une protéine

La température de fusion ( $T_m$ ) de la protéine peut être déterminée à l'aide du modèle de Boltzmann (équation 5) qui décrit les variations de l'intensité de fluorescence en fonction de la température (Ericsson *et al*, 2006).

$$I = \left( A + \frac{(B - A)}{1 + e^{\frac{T_m - T}{C}}} \right) \quad (5)$$

Avec,

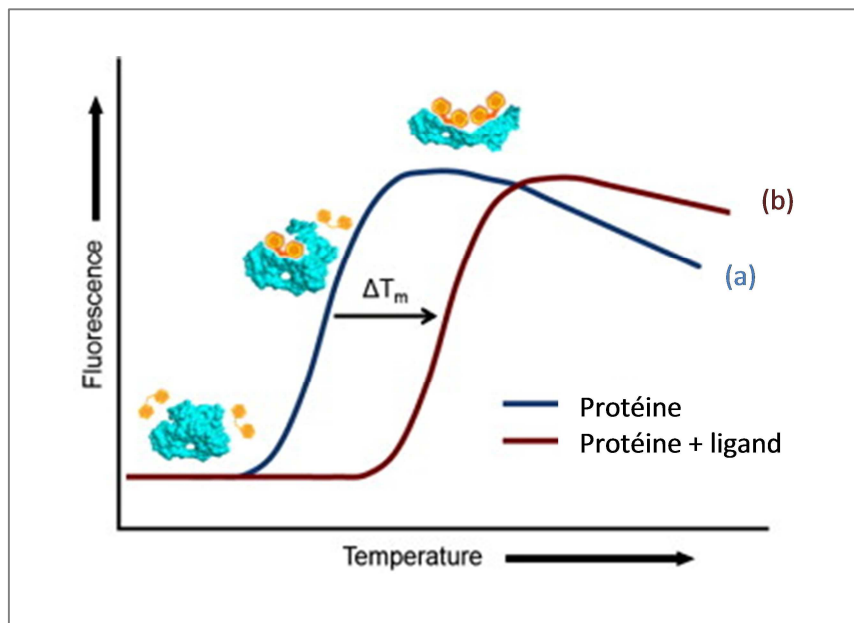
I : intensité de fluorescence à la température T,

A et B correspondent aux intensités de fluorescence avant et après la transition

C : facteur pente

On procède par ajustement de la courbe de dénaturation à ce modèle grâce au logiciel MATLAB® TmTool™.

Lorsqu'une protéine interagit spécifiquement avec un analyte, on observe généralement une stabilisation de la protéine. Cette stabilisation se traduit par un retard à la dénaturation en fonction de la température et par conséquent à une augmentation de la valeur de  $T_m$ . La variation de  $T_m$  observée ( $\Delta T_m$ ) permet ainsi de rendre compte de l'interaction moléculaire de l'analyte et de la protéine (Cimpmperman *et al*, 2008) (figure 7).



**Figure 7** : Schéma représentant (a) la courbe de dénaturation thermique d'une protéine et (b) une interaction protéine-ligand induisant une modification de la thermostabilité des protéines.

Des valeurs de  $\Delta T_m$  de l'ordre de 1 à 20 °C peuvent être observées, ces valeurs dépendent de l'énergie de la liaison de l'analyte, de l'affinité et de l'enthalpie de liaison. Ces valeurs sont dépendantes du degré de complexation de la protéine. Ainsi l'étude de  $\Delta T_m$  pour différentes concentrations d'analyte permet d'évaluer soit le degré de complexation de la protéine, soit la constante d'interaction protéine-ligand (figure 7).

### 3.2. Exploitation des résultats

Un modèle mathématique décrivant la stabilité de la protéine par formation d'un complexe avec le ligand a été développé par Cimperman en 2008 (Cimperman *et al*, 2008). Le modèle est basé sur l'hypothèse d'une perturbation de la stabilité thermique des protéines lors de l'interaction avec l'analyte. Ce modèle thermodynamique décrit ainsi les effets de la stabilisation ou de la déstabilisation des protéines par les ligands et tient compte de trois phénomènes : liaison analyte-protéine native, liaison analyte-protéine dénaturée et dénaturation de la protéine libre (unfolding). Chaque phénomène est décrit par trois grandeurs thermodynamiques que sont les variations de la capacité calorifique ( $\Delta C_p$ ), de l'enthalpie ( $\Delta H$ ) et de l'entropie ( $\Delta S$ ). Le modèle relie ainsi la température de fusion à la concentration totale de ligand selon :

$$L_t = \left( e^{-\frac{(\Delta_U H_{Tr} + \Delta_U C_p(T_m - T_r) - T_m(\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U C_p \ln(T_m/T_r)))/RT_m}{RT_m}} - 1 \right) \times \left[ \frac{P_t}{2} \frac{1}{e^{-\frac{(\Delta_U H_{Tr} + \Delta_U C_p(T_m - T_r) - T_m(\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U C_p \ln(T_m/T_r)))/RT_m}{RT_m}}} + \frac{1}{e^{-\frac{(\Delta_b H_{T_0} + \Delta_b C_p(T_m - T_0) - T_m(\Delta_b S_{T_0} + \Delta_b C_p \ln(T_m/T_0)))/RT_m}{RT_m}}} \right]$$

(6)

Avec  $L_t$  : concentration totale en analyte

$b$  : pour liaison

$P_t$  : concentration totale en protéine

$\Delta_U H_{Tr}$  : variation d'enthalpie d'unfolding de la protéine à  $T_r$

$T_r$  : température de fusion de la protéine en absence analyte

$T_m$  : température de fusion de la protéine en présence d'analyte

$\Delta_U S_{Tr}$  : variation d'entropie d'unfolding de la protéine à  $T_r$

$\Delta_U C_p$ : variation de la capacité calorifique d'unfolding de la protéine (supposée indépendante de la température)

$\Delta_b H_{T_0}$ : variation d'enthalpie de liaison de l'analyte à la protéine à  $T_0$

$T_0$ : température de référence (298 K)

$\Delta_b S_{T_0}$ : variation d'entropie de la liaison de l'analyte à la protéine à  $T_0$

$\Delta_b C_p$ : variation de la capacité calorifique du complexe analyte/protéine (supposé indépendante de la température)

La détermination de la constante d'interaction par TSA se fait à l'aide de cette équation grâce à un algorithme de calcul.

Les paramètres  $\Delta_U H_{Tr}$ ,  $\Delta_U S_{Tr}$ ,  $\Delta_U C_{pTr}$  sont les données thermodynamiques caractérisant la dénaturation de la protéine (unfolding), elles sont donc constantes. Elles peuvent être issues de la littérature ou déterminées expérimentalement.  $\Delta_b H_{T_0}$ ,  $\Delta_b S_{T_0}$  et  $\Delta_b C_p$  caractérisent la liaison de l'analyte avec la forme native de la protéine. Dans notre cas, les valeurs  $\Delta_b H_{T_0}$  et le  $\Delta_b C_p$  ont été obtenues par ITC.

Une valeur hypothétique de  $\Delta_b S_{T_0}$  est fixée afin de calculer la concentration totale en analyte,  $L_t$ , pour l'ensemble des solutions contenant différentes concentrations en analyte pour une concentration constante en protéine. L'algorithme de Newton-Raphson est alors employé pour minimiser la différence entre les valeurs expérimentales et simulées de  $L_t$ , en faisant varier la valeur de  $\Delta_b S_{T_0}$ . La valeur optimale de  $\Delta_b S_{T_0}$  est ainsi obtenue lorsque l'écart entre les valeurs expérimentales et simulées de  $L_t$  est minimal.

$\Delta_b S_{T_0}$  étant déterminé par ITC, la constante de liaison de l'analyte à la protéine à la température de référence  $T_0$  est déterminée en utilisant l'équation (6), qui permet ensuite de calculer la constante thermodynamique de dissociation du complexe protéine- analyte,  $K_D$ .

$$K_{b,T_0} = e^{-(\Delta_b H_{T_0} - T_0 \Delta_b S_{T_0})/RT_0} \quad (7)$$

$$K_D = 1/K_{b,T_0} \quad (8)$$

### 3.3. Avantages/Inconvénients

La méthode offre des avantages reconnus de screening rapide de composés. Des études de screening en TSA ont été réalisées par Lo *et al* (2004) mettant en avant la simplicité et l'applicabilité générale de cette technique pour l'identification de candidats médicaments à partir d'une série de composés.

Toutefois, l'évaluation précise des constantes thermodynamiques de dissociation ( $K_D$ ) exige la connaissance de données thermodynamiques comme l'enthalpie de l'interaction qui doivent être déterminées par d'autres techniques. C'est la raison pour laquelle la TSA est le plus souvent utilisée en première intention pour évaluer si oui ou non l'analyte est capable de se lier à la protéine. Une étude complémentaire est ensuite menée à l'aide d'une autre méthode telle que la calorimétrie de titration isotherme ou la résonance plasmonique de surface pour évaluer les paramètres caractérisant l'interaction. La TSA n'est pas applicable à toutes les cibles, notamment aux composés auto-fluorescents ou aux composés qui interagissent avec les sondes fluorescentes hydrophobes.

Malgré ces inconvénients, la TSA est de plus en plus populaire pour le criblage à haut débit de chimiothèques de composés (HTS) en recherche pharmaceutique.

### 3.4. TSA/Anhydrase Carbonique

A notre connaissance, il n'y a pas de publications sur des études de screening à haut débit d'inhibiteurs potentiels de l'AC. En revanche, de nombreux travaux portant sur l'étude des interactions moléculaires impliquant l'anhydrase carbonique ont été réalisés par l'équipe de Matulis et Cimperman. Ces études ont porté principalement sur la détermination de l'affinité potentielle de ligands pour diverses isoformes de l'AC (Matulis *et al*, 2005 ; Cimperman *et al*, 2008 ; Zubriène *et al*, 2009 ; Sudzius *et al*, 2010 ; Capkauskaite *et al*, 2010, 2012, 2013 ; Cimperman et Matulis, 2011 ; Dudutiene *et al*, 2013 et Jogaitė *et al*, 2013).

Une étude fondamentale visant à développer un modèle mathématique permettant de calculer la constante thermodynamique de dissociation du complexe protéine/ligand à partir des variations de la température de fusion de la protéine en fonction de la concentration de ligand est décrite par Cimperman *et al* (2008). L'étude réalisée a notamment porté sur la modélisation de l'interaction d'inhibiteurs spécifiques de l'anhydrase carbonique II avec cette dernière. Cimperman démontre que les inhibiteurs spécifiques de l'anhydrase carbonique, tel que les sulfonamides se lient fortement à la protéine native et ne se lient que faiblement voire pas du tout à la protéine dénaturée. Par conséquent, lors de la détermination de l'affinité des composés pour l'AC, il est

possible de simplifier le modèle mathématique en éliminant les termes relatifs à l'interaction entre le ligand et la protéine dénaturée.

### 3.5. Comparaison ITC/TSA/spectrophotométrie pour l'étude de l'anhydrase carbonique

Différentes isoformes de l'AC sont décrites comme cibles thérapeutiques dans le cadre de diverses pathologies telles que : le cancer, le glaucome, l'hypertension et le diabète de type II. De ce fait, des études d'interactions moléculaires ont été menées afin d'évaluer des inhibiteurs potentiels de ces isoformes (Zubruière *et al*, 2009 ; Capkauskaitė *et al*, 2010 ; Sudzius *et al*, 2010 ; Capkauskaitė *et al*, 2012 ; Capkauskaitė *et al*, 2013 ; Dudutiène *et al*, 2013). Au cours de ces études, afin de valider les résultats obtenus, diverses techniques décrites précédemment ont été comparées (calorimétrie de titration isotherme, thermal shift assay et la méthode spectrophotométrique de « stop-flow »). De manière générale, une bonne adéquation entre les résultats obtenus en ITC et en TSA a pu être observée. Dans certains cas, les constantes d'affinités déterminées par ITC sont plus élevées que celles obtenues par TSA, notamment dans le cas de ligands possédant une forte affinité pour l'AC.

Lors des études comparatives de la TSA et de la méthode spectrophotométrique dite de « stop-flow », une bonne corrélation entre les résultats a été observée. Pour une série de dérivés, les auteurs comparent les valeurs des constantes thermodynamiques de dissociation des complexes  $K_D$  obtenues par TSA avec les valeurs de constantes d'inhibition  $K_i$  obtenues par la méthode de « stop-flow » (Maryanoff *et al*, 2005), bien qu'elles ne soient pas équivalentes. Les auteurs mettent en avant l'obtention d'une échelle d'affinité relativement cohérente entre ces deux techniques. Cette différence pourrait être due à des conditions expérimentales différentes, à la nature différente des méthodes et à l'erreur expérimentale des deux techniques, notamment à la différence de température utilisée entre les deux méthodologies utilisées (constantes calculées à 25 °C en stop-flow et à la valeur de  $T_m = 37^\circ\text{C}$  en TSA) (Capkauskaitė *et al*, 2013 ; Dudutiène *et al*, 2013).

## 4. La résonance plasmonique de surface

La Résonance Plasmonique de Surface (RPS) est une méthode de mesure en temps réel couramment utilisée pour la caractérisation d'interactions biomoléculaires, ainsi que pour les interactions entre les protéines et les molécules de bas poids moléculaire (Rich *et al*, 2010).

La RPS utilise une technologie optique couplée à un système microfluidique permettant de suivre en temps réel les interactions entre des partenaires moléculaires. Cette technique a l'avantage de ne pas nécessiter le marquage des molécules à étudier.

A l'origine, la RPS repose sur un phénomène optique de diffraction anormale de la lumière découvert par Wood en 1902. Le phénomène de diffraction anormale de la lumière a été identifié par Hessel et Onliner en 1965 comme étant un phénomène de résonance plasmonique de surface. Il a été démontré quelques années plus tard par Kretschmann, que ce phénomène est observable sur un prisme recouvert d'une fine couche métallique ; il s'agit de la configuration dite de Kretschmann (Kretschmann *et al*, 1968).

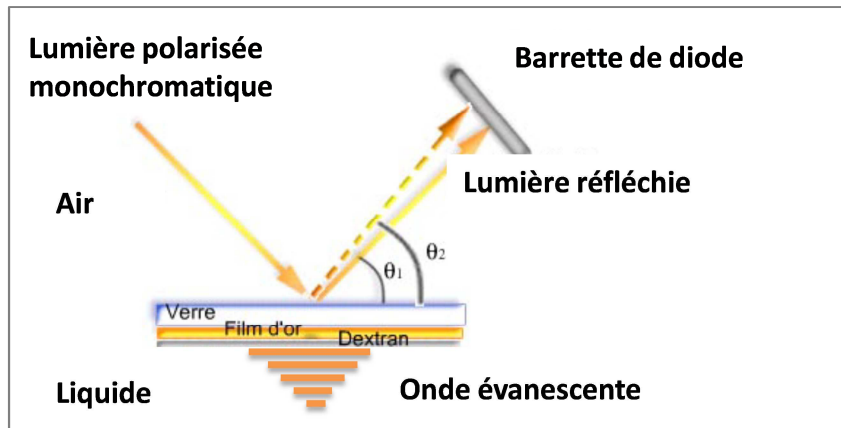
Le premier exemple d'application dans la littérature en tant que biosenseur de la résonance plasmonique de surface date de 1980 (Liedberg et Lundström, 1993). Actuellement, la RPS est principalement utilisée comme méthode de mesure en temps réel de la liaison d'un ligand avec un récepteur.

#### 4.1. Principe

Le principe de la RPS repose sur l'immobilisation de l'un des partenaires sur une surface réactive constitué d'une couche métallique telle que l'or ou l'argent (Kodoyianni *et al*, 2011). Le second partenaire, placé en solution, est ensuite amené, à l'aide d'un système microfluidique, dans un flux continu de solution tampon au niveau de la surface comportant le premier partenaire immobilisé. Leur interaction aboutira donc à un signal qui permettra une analyse cinétique et quantitative.

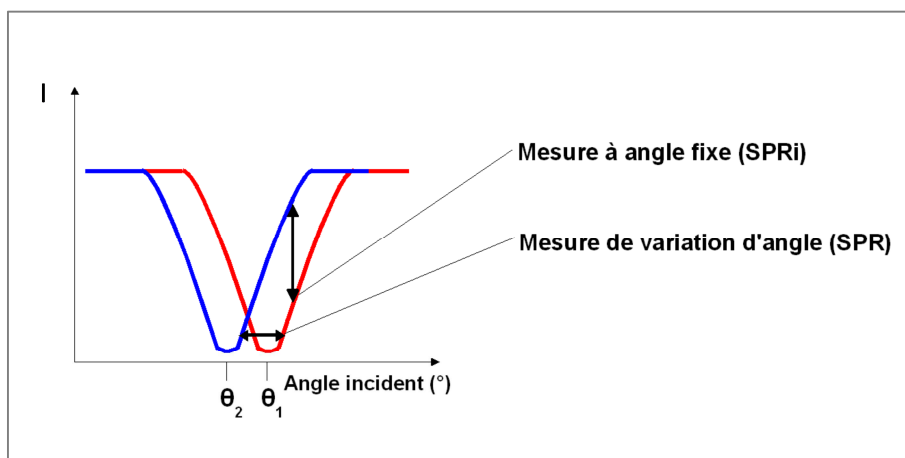
Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique est envoyé à travers un prisme sur une surface recouverte d'un film métallique, cette lumière est réfléchi par ce film se comportant comme un miroir. Si l'on modifie l'angle d'incidence, il est possible de constater en mesurant l'intensité de la lumière réfléchi, que celle-ci passe par un minimum. A cet angle d'incidence, la lumière excite les plasmons de surface : les photons du faisceau incident interagissent avec les électrons libres de la couche métallique. Ce phénomène est à l'origine de la résonance plasmonique de surface. Ceci se traduit par l'apparition d'une onde évanescente et donc par une diminution de l'intensité de la lumière réfléchi à cet angle, mesurée à l'aide d'une barette de diode. Cet angle de résonance dépend de l'indice de réfraction du milieu à proximité de la surface réactive et de la masse des solutés présents sur cette surface. Tout évènement modifiant la surface métallique (interaction moléculaire) va induire des changements de l'angle de résonance (figure 8).





**Figure 8** : Dispersion de la lumière et création d'une onde évanescente

Deux stratégies sont alors envisageables (figure 9). La première est de suivre les variations d'angle de résonance au cours du temps, il s'agit des systèmes basés sur la résonance plasmonique de surface dite classique (appareil de type Biacore). La seconde approche est de travailler à angle fixe et de mesurer les variations de réflectivité induites par la variation d'angle au cours du temps, on parle alors de Résonance Plasmonique de Surface par imagerie (SPRi).



**Figure 9** : Variation de l'intensité en fonction de l'angle d'incidence

Ce phénomène est mis à profit pour détecter et étudier en temps réel des interactions entre deux partenaires : l'un des deux partenaires, appelé ligand, est immobilisé de façon covalente ou non sur une surface réactive (surface à base d'or). Le second partenaire, appelé analyte, est ensuite injecté à l'aide d'un système microfluidique dans un flux continu de tampon sur cette surface réactive. L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance, qui est directement proportionnelle à la masse d'analyte interagissant sur la surface réactive, permet de suivre en temps

réel la fixation des molécules injectées sur le biocapteur. Le signal observé permet d'obtenir des informations sur la cinétique d'interaction et sur l'affinité de l'analyte pour le ligand (figure 10).

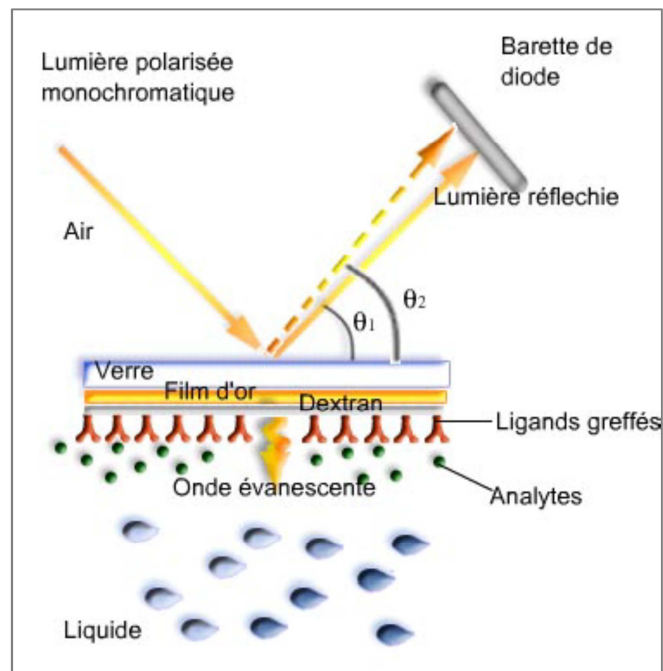
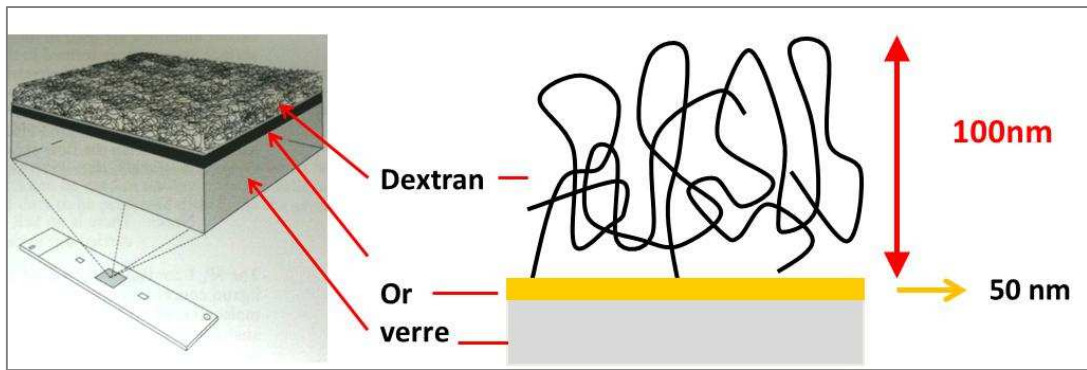


Figure 10 : Schéma représentant le fonctionnement de la résonance plasmonique de surface

#### 4.2. Surface réactive-« lame de mesure »

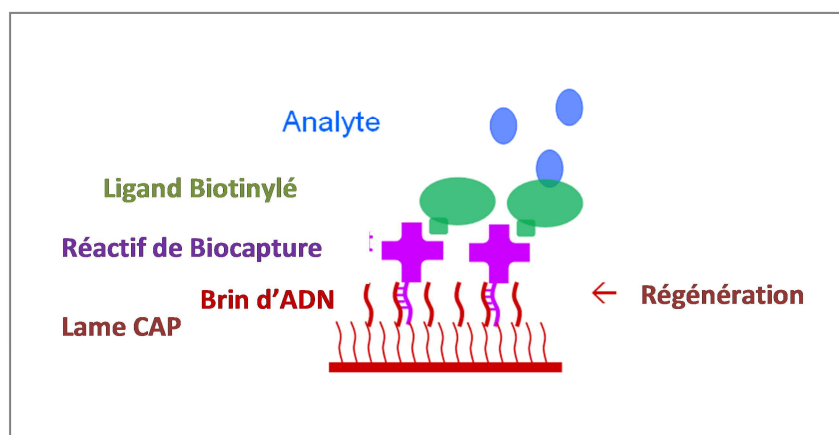
La lame de mesure est une lame de verre recouverte d'un film d'or le plus souvent fonctionnalisé par des groupements permettant l'immobilisation covalente ou non des ligands à étudier. La société Biacore commercialise notamment des lames :

- d'or (lame Au)
- d'or recouvertes de dextran carboxyméthylé fixé de manière covalente à la surface du film d'or (lames CM3, 4, 5, 7) caractérisée par des densités croissantes (figure 11). Les molécules à étudier sont immobilisées de manière covalente à la surface du capteur par couplage peptidique, c'est-à-dire par réaction d'une fonction amine de la molécule à immobiliser à un groupement carboxylique du dextran présent sur la lame. Cette lame présente une capacité de liaison élevée, donnant une réponse importante, avantageuse pour les études d'interactions impliquant de petites molécules.



**Figure 11 :** Exemple d'une lame recouverte de dextran

- d'or recouvertes de dextran carboxyméthylé greffé par :
  - o de la streptavidine (lame SA), permettant l'immobilisation irréversible de partenaires biotinylés,
  - o un oligonucléotide simple brin d'ADN (lame CAP) permettant une immobilisation réversible (capture) d'un brin complémentaire d'ADN porteur de la streptavidine. L'avantage de cette lame réside dans le fait qu'elle peut être complètement régénérée à l'aide d'une solution de régénération (mélange de chlorhydrate de guanidine et de soude) et réutilisée (figure 12, Johnsson et al, 1991). Toute molécule préalablement biotinylée (protéine ou petit molécule) injectée à la surface de la lame sera alors immobilisée par formation du complexe streptavidine/biotine. Peu d'études décrivent l'utilisation de cette lame (Suenaga et al, 2012 a et b, Rouhana et al, 2013).



**Figure 12 :** Schéma d'une lame de type CAP.

En rouge : lame réactive recouverte de dextran carboxyméthylé greffé par un simple brin d'ADN, en violet : brin d'ADN complémentaire porteur de streptavidine, en vert : ligand biotinylé et en bleu : analyte.

- de l'acide nitrilotriacétique (lame NTA), permettant la capture de molécules « taggées » Histidine via une chélation par les ions métalliques.

Une condition nécessaire pour l'étude d'interactions moléculaires par RPS est de réussir à immobiliser la cible dans une conformation active à la surface du capteur. Cependant, certaines macromolécules peuvent être modifiées lors de leur immobilisation sur la surface réactive, ce qui nécessite d'utiliser différentes méthodes d'immobilisation afin de s'assurer que celle-ci n'a pas altéré le partenaire immobilisé.

#### 4.3. Choix du taux d'immobilisation

Le signal RPS est directement proportionnel à la quantité de ligand immobilisé sur la surface et à la taille de l'analyte qui va interagir avec ce ligand. Afin d'évaluer l'intensité des signaux obtenus lors de l'étude de l'interaction, il est possible de calculer le  $R_{\max}$  théorique, correspondant à la réponse maximale attendue lors de l'étude de l'interaction. Elle est dépendante des masses molaires des deux partenaires, du taux d'immobilisation de la protéine et de la stoechiométrie de l'interaction.

Pour une interaction de type 1:1, le  $R_{\max}$  peut être déterminé par l'équation :

$$R_{\max} = \frac{M_{\text{Analyte}}}{M_{\text{Protéine}}} \times R_{\text{Protéine}} \quad (9)$$

Avec,

$M_{\text{Analyte}}$  : la masse molaire de l'analyte et  $M_{\text{Protéine}}$  : la masse molaire de la protéine et  $R_{\text{Protéine}}$  : le taux d'immobilisation de la protéine.

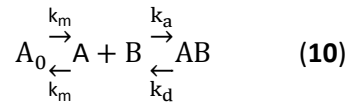
Le taux d'immobilisation de la protéine doit donc être suffisant pour observer un signal d'interaction, mais il ne doit pas être excessif au risque de la rendre inaccessible en raison d'une densité trop élevée, de favoriser des interactions multiples ou encore d'engendrer une modification de la cinétique d'interaction par l'intervention d'un phénomène de transfert de masse limitant.

#### 4.4. Le transfert de masse

Lors de l'injection d'une solution d'analyte, celle-ci circule à vitesse constante ; il existe à la surface de la lame une couche de solution statique car le flux y est nul. Dans cette couche, appelée

couche de diffusion, l'analyte va se déplacer par diffusion, c'est à dire sous l'effet d'un gradient de concentration, jusqu'à atteindre la protéine immobilisée avec laquelle il pourra alors interagir.

L'ensemble du processus peut être décrit par l'équilibre (10) :



Avec  $k_a$  et  $k_d$ , les constantes cinétiques intrinsèques d'association et de dissociation et  $k_m$ , le coefficient du transfert de masse.

Pour qu'une interaction entre le ligand immobilisé et l'analyte présent dans le système microfluidique puisse avoir lieu, il faut que ce dernier soit transporté du système microfluidique jusqu'à la surface réactive où se situe le ligand et où l'interaction va avoir lieu (figure 13).

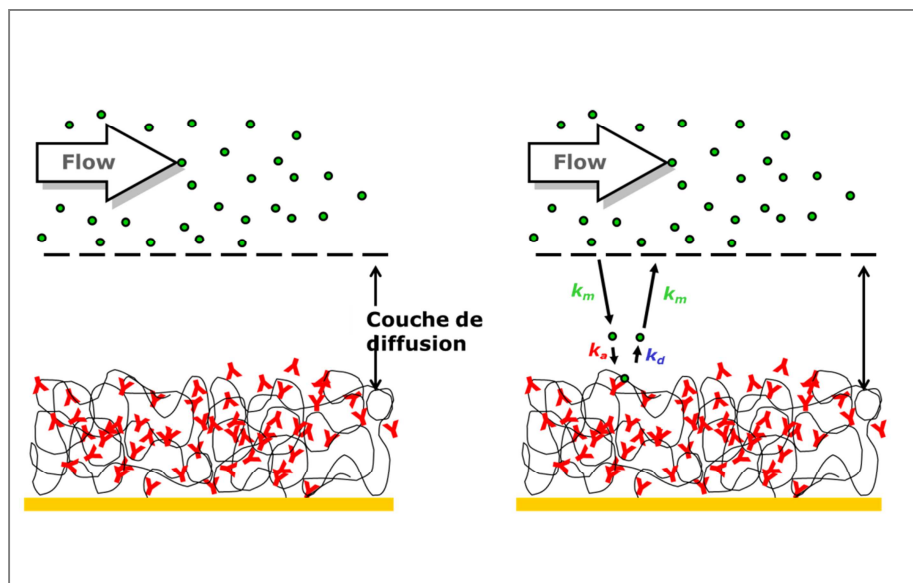


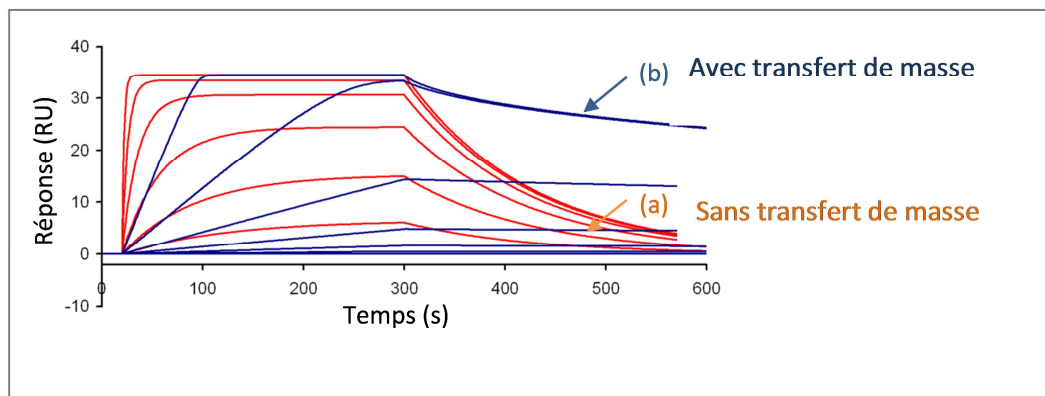
Figure 13 : Schéma représentant le « transfert de masse »

La vitesse de réaction mesurée est généralement la vitesse de réaction la plus lente, le transfert de masse doit être rapide et donc non limitant si l'on veut déterminer les constantes cinétiques d'association  $k_a$  et dissociation  $k_d$  caractéristiques de l'interaction ligand/analyte. Quand le transport de l'analyte vers la cible a une cinétique plus rapide que la cinétique de l'interaction, un modèle classique sans transfert de masse peut être utilisé pour la détermination des constantes

cinétiques. Inversement, lorsque la cinétique de l'interaction est rapide, il faut alors tenir compte du transfert de masse.

Deux possibilités sont envisageables afin de limiter ce transfert de masse. Il faut travailler à un débit élevé, pour réduire l'épaisseur de la couche de diffusion et/ou réduire le taux d'immobilisation afin de limiter la quantité d'analyte à apporter à l'interface. Ainsi, si le débit maximal applicable ne permet pas de s'affranchir de ce phénomène, il est recommandé de réaliser une nouvelle immobilisation de la protéine à un taux plus faible.

Lors du développement d'une méthode, il est donc intéressant d'évaluer si le transfert de masse est limitant ou non par injection de la solution d'analyte à différents débits. En effet, en présence d'un phénomène de transfert de masse limitant, les courbes d'association sont linéaires et leur pente dépend du débit (figure 14).



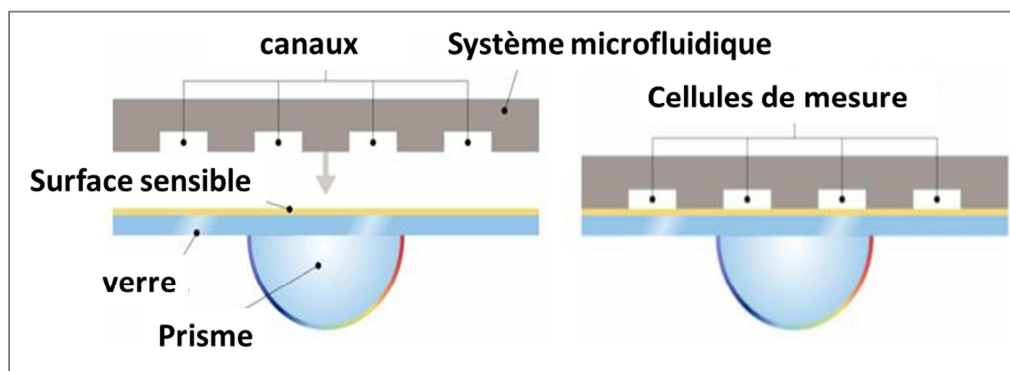
**Figure 14** : Sensorgrammes obtenus (a) sans transfert de masse (orange) et (b) avec transfert de masse (bleu).

Il est possible de déterminer les constantes de dissociation du complexe protéine/analyte pour différents taux d'immobilisation de la protéine. Si le transfert de masse n'est pas limitant, la valeur de la constante de dissociation est indépendante du taux d'immobilisation de la protéine.

#### 4.5. Le système Biacore :

Dans le système Biacore, le système microfluidique est conçu de telle sorte qu'après insertion de la lame dans l'appareil, quatre cellules ou canaux (appelée flow cells) sont mis en place artificiellement sur la surface réactive. Ceux-ci peuvent être reliés en série ou non et parcourus par le

tampon de course en présence ou non de l'analyte à étudier (figure 15). Trois des cellules peuvent être utilisées afin d'immobiliser des ligands de natures différentes. Sur la dernière cellule aucun ligand n'est immobilisé afin de servir de cellule référence pour l'étude des interactions moléculaires (évaluation des modifications de l'indice de réfraction du milieu en présence d'analyte sans qu'aucune interaction ne soit mise en jeu). La RPS permet alors l'étude simultanée de trois interactions distinctes impliquant un même analyte.



**Figure 15** : Représentation des quatre canaux de la lame en résonance plasmonique de surface

#### 4.6. Le sensorgramme

Les changements de masse induits par l'association ou la dissociation de l'analyte et du ligand modifient la réfringence du milieu et la position de l'angle de résonance. Ainsi, l'injection de l'analyte sur la surface réactive à débit constant et pendant une durée déterminée, va induire une modification de l'angle de résonance  $\theta$  dont l'enregistrement en fonction du temps est appelé sensorgramme (figure 16). Celui-ci est exprimé en unités de résonance (RU). Une variation de 1000 RU correspond à une déviation de l'angle de 0,1 degré, ainsi qu'à une fixation d'environ 1 ng de protéine par  $\text{mm}^2$  de surface.

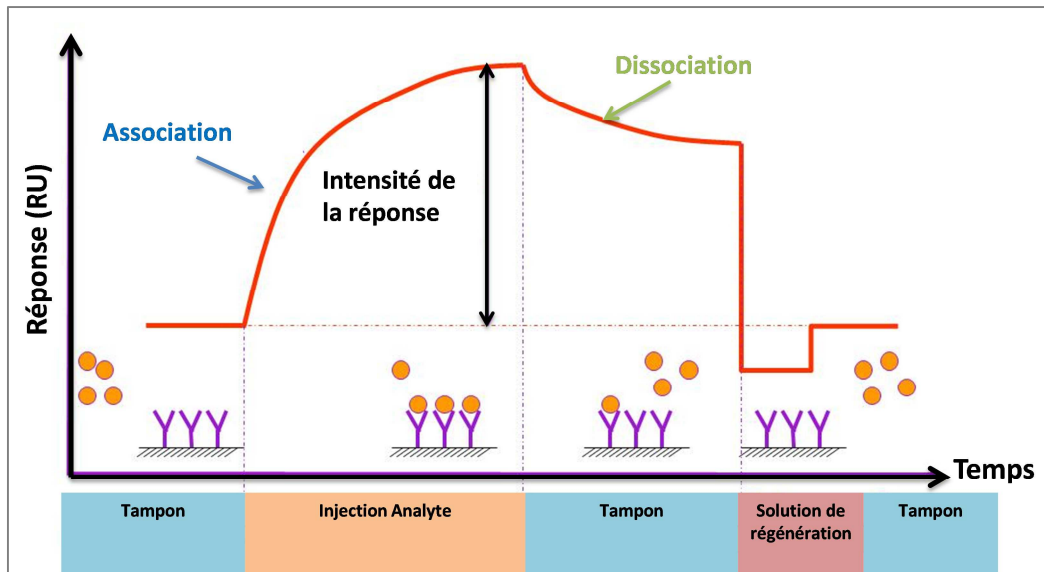


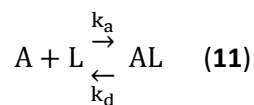
Figure 16 : Différentes phases d'un sensorgramme

Avant l'injection de l'analyte, la lame de mesure est mise en contact avec le tampon de course. Lors de l'injection de l'analyte, son association au ligand entraîne une augmentation de l'angle de résonance qui atteint ensuite une valeur constante traduisant l'obtention d'un état d'équilibre entre la vitesse d'association et de dissociation de l'analyte et témoigne de la spécificité de l'interaction. Une fois que l'injection de l'analyte est réalisée, le tampon de course est à nouveau injecté, permettant ainsi de suivre la dissociation spontanée de l'analyte. Si celle-ci n'est pas totale, l'injection d'une solution de régénération est finalement réalisée afin d'obtenir une surface dans son état initial.

#### 4.7. L'exploitation du sensorgramme

##### 4.7.1. Détermination des constantes cinétiques d'association et de dissociation de complexe ligand-analyte

La réaction de formation du complexe entre le ligand et l'analyte peut être explicitée par l'équation (11) :





Les vitesses cinétiques d'association et de dissociation sont caractérisées par les équations (12) et (13).

$$\frac{d[AL]}{dt} = k_a[A][L] \quad (12)$$

$$-\frac{d[AL]}{dt} = k_d[AL] \quad (13)$$

Avec [A] : concentration de l'analyte libre

[AL] : concentration du complexe formé

[L] : concentration du ligand libre,  $[L] = [L]_{\text{total}} - [AL]$

$k_a$  : constante cinétique d'association ( $M^{-1}s^{-1}$ )

$k_d$  : constante cinétique de dissociation ( $s^{-1}$ )

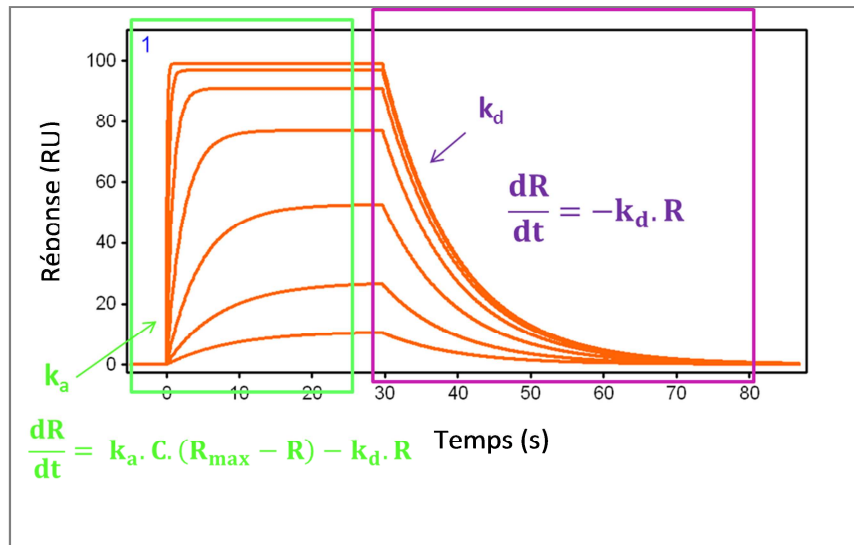
De ces deux équations, il résulte la vitesse nette de l'interaction :

$$\frac{d[AL]}{dt} = k_a[A][L] - k_d[AL] \quad (14)$$

En résonance plasmonique de surface, la réponse R enregistrée est l'angle de résonance exprimé en RU. Celle-ci est proportionnelle à la quantité de complexe analyte/ligand formée sur la surface réactive. On peut alors assimiler la concentration du complexe formé à la réponse. De ce fait la concentration du ligand libre correspond à la différence entre la réponse maximale obtenue à saturation du ligand et la réponse R correspondant à la réponse du complexe formé, soit  $R_{\text{max}} - R$  (en RU). Par ailleurs, la concentration en analyte libre peut être considérée égale à la concentration en analyte initialement introduite dans le système microfluidique notée C (on suppose que la quantité de complexe formé est négligeable). L'équation (14) devient alors :

$$\frac{dR}{dt} = k_a C(R_{\text{max}} - R) - k_d R \quad (15)$$

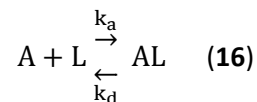
La détermination des constantes cinétiques d'association et de dissociation à partir de cette équation est illustrée par la figure 17.



**Figure 17** : Détermination des constantes cinétiques d'association et de dissociation en fonction de la réponse en RPS.

La constante cinétique de dissociation  $k_d$  est tout d'abord déterminée à partir du profil obtenu lors de la dissociation spontanée de l'analyte. Il est ensuite possible de déterminer la constante cinétique d'association  $k_a$  à partir du profil obtenu lors de la phase d'injection de l'analyte.

#### 4.7.2. Détermination des constantes thermodynamiques de complexation du ligand et de l'analyte



La constante thermodynamique d'association  $K_A$  exprimée en  $M^{-1}$  et qui caractérise la réaction (16) de formation du complexe est définie par :

$$K_A = \frac{[AL]}{[A][L]} \quad (17)$$

Elle est vérifiée lorsque la réaction (16) atteint un état d'équilibre, c'est-à-dire lorsque la vitesse d'association est égale à la vitesse de dissociation :

$$k_a[A][L] = k_d[AL] \quad (18)$$

La constante thermodynamique d'association  $K_A$  qui caractérise donc l'affinité de l'analyte pour le ligand peut être calculée selon :

$$K_A = \frac{k_a}{k_d} \quad (19)$$

La constante thermodynamique de dissociation du complexe  $K_D$  exprimée en molaire permet également de caractériser l'affinité de l'analyte pour le ligand. Elle est définie par la relation (20) :

$$K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{k_d}{k_a} \quad (20)$$

Cette première méthode de détermination des constantes thermodynamiques  $K_A$  ou  $K_D$  se fait à partir des données cinétiques et repose donc sur une exploitation globale du profil d'association et de dissociation. Une seconde approche dite à l'équilibre est possible. Elle repose sur la mesure de la réponse obtenue à l'équilibre pour différentes concentrations de l'analyte.

En effet en RPS, les concentrations du ligand libre et complexé peuvent être exprimées selon la réponse obtenue à l'équilibre sur les sensorgrammes. On peut de ce fait écrire :

$$K_A = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AL]}{[A][L]} = \frac{R}{C(R_{\max}-R)} \quad (21)$$

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[A][L]}{[AL]} = \frac{C(R_{\max}-R)}{R} \quad (22)$$

Le tracé des variations de la réponse en fonction de la concentration en analyte permet d'obtenir, par ajustement de la courbe selon le modèle d'interaction de type 1:1, la constante thermodynamique de dissociation  $K_D$ .

#### 4.8. Avantages/Inconvénients

La RPS permet l'étude d'une large gamme de composés de poids moléculaire varié (anticorps, protéines, sucres, lipides, petites molécules,...). Elle permet aussi la mesure des constantes thermodynamiques de dissociation des complexes ( $K_D = 1 \text{ pM} - 1 \text{ mM}$ ), et des paramètres cinétiques caractérisant l'interaction (Kemp *et al*, 2012). Ces études peuvent être réalisées à haut débit, avec de multiples partenaires immobilisés permettant des études simultanées. Conventionnellement, la RPS est employée pour l'étude des interactions de macromolécules (Myszka *et al*, 1999), cependant, elle a été utilisée en routine pour l'étude de la liaison de petites molécules à des cibles macromoléculaires pour la découverte de médicaments (Myszka *et al*, 1997, 1999 ; Rich et Myszka, 2010).

Comme la RPS ne nécessite qu'un minimum d'informations concernant la protéine, elle est considérée comme une méthode de mesure d'affinité attractive. Sa faible consommation en protéine (de l'ordre du microgramme) est aussi un facteur clé quant à son utilisation en routine.

Les inconvénients de la technique de RPS sont liés en partie à l'immobilisation d'un des deux partenaires de l'interaction (Holdgate *et al*, 2010). L'immobilisation de la protéine sur la surface réactive, soit par capture basée sur l'affinité ou par liaison covalente, peut masquer les sites d'interaction ou limiter les changements de conformation de la protéine qui peuvent se produire lors de la liaison de l'analyte. Un inconvénient supplémentaire est le coût associé à cette technique, car un instrument spécifique onéreux est nécessaire pour exécuter des études d'interaction en RPS (Kemp *et al*, 2012).

#### **4.9. RPS/anhydrase carbonique**

L'anhydrase carbonique a été largement étudiée par résonance plasmonique de surface, notamment en tant que modèle pour la comparaison de méthodes biophysiques (Day *et al*, 2002).

Deux types d'études ont été réalisées ; des études relatives à l'interaction protéine/protéine et des études relatives à l'interaction protéine/molécule de bas poids moléculaire.

##### **4.9.1. Etude d'interactions protéine/protéine**

Des études d'interactions protéine/protéine ont été réalisées par l'équipe de Murri- Plesko sur l'isoforme IX de l'anhydrase carbonique (Murri-Plesko *et al*, 2011). Cette équipe utilise la résonance plasmonique de surface pour caractériser l'affinité d'anticorps anti AC IX pour cette protéine. Dans cette étude, des fragments d'anticorps dirigés contre l'AC IX humaine ont été sélectionnés et testés pour déterminer leur pouvoir inhibiteur sur l'activité catalytique de l'AC IX. L'AC IX a été immobilisée sur une surface de dextran carboxyméthylé (CM5), classiquement utilisée en RPS. Une faible densité d'immobilisation de l'AC IX sur la surface réactive a été obtenue. Des affinités variant de 1,9 nM à 66 nM ont été obtenue pour les anticorps étudiés. Ces anticorps présentent des affinités plus élevées pour l'AC IX que certaines molécules de bas poids moléculaire décrites comme inhibiteurs de l'AC (par exemple l'acétazolamide, ou la carboxybenzenesulfonamide, dont les  $K_D$  sont respectivement,  $K_D$  AC IX = 26 nM,  $K_D$  AC IX = 760 nM). De plus, les constantes d'affinités mesurées pour les anticorps étudiés sont corrélées avec les valeurs d'EC obtenues lors des études *in vivo* et *in vitro* réalisées par cette équipe.

D'autres études d'interaction protéine/protéine impliquant plusieurs isoformes de l'AC (AC I-XV), constituant des cibles thérapeutiques pour le traitement de pathologies telles que le glaucome, le cancer et l'épilepsie, ont été menées par Durdagi *et al* (2012). Des protéines dérivées de la famille de la transferrine ont été immobilisées sur une lame de dextran carboxyméthylée (CM5) afin d'étudier l'interaction avec les isoformes de l'anhydrase carbonique (AC I, II, II, IV, VA, VB, VI, VII, IX, XII, XIV et XV). Des affinités de l'ordre du nanomolaire voir du sub-nanomolaire ont été obtenues pour ces différentes protéines, mais aucune sélectivité vis-à-vis d'une isoforme n'a pu être montrée.

#### **4.9.2. Etude d'interactions protéine/molécule de bas poids moléculaire**

Les études des interactions anhydrase carbonique/molécules de bas poids moléculaire décrites dans la littérature reposent en majorité sur l'utilisation d'une lame de type CM5, la lame la plus utilisée en RPS. L'approche la plus courante consiste en l'immobilisation de la protéine (Myszka *et al*, 2003 ; Cannon *et al*, 2004 ; Papalia *et al*, 2006 ; Navratilova *et al*, 2007 ; Jecklin *et al*, 2009, Navratilova *et al*, 2010). Il est alors possible d'étudier un panel de composés en réalisant une seule immobilisation, ce qui est particulièrement intéressant dans le domaine du développement de médicaments. Ainsi, l'AC II bovine (AC II b) a été largement étudiée au cours de travaux collaboratifs pilotés par l'équipe de Myszka, dont l'objectif principal était de mettre en avant les performances de cette technologie et les précautions à prendre pour l'obtention de résultats de qualité. Ces éléments sont importants notamment pour l'étude d'interaction protéine/molécule de bas poids moléculaire où l'amplitude des réponses obtenues est faible. Cette étude a été réalisée à l'aide d'un système de référence, l'AC II b et le 4-carboxybenzenesulfonamide (CBS). Les constantes d'affinités obtenues pour les 60 participants présentent une variabilité de l'ordre de 20%, ce qui est remarquable compte tenu du panel d'instruments utilisés et du niveau des opérateurs. Au cours de cette étude, l'interaction de l'AC II b avec le CBS a également été étudiée par ITC afin de valider les résultats obtenus, et de démontrer que l'immobilisation de la protéine ne modifie pas l'interaction. En effet, les affinités du CBS pour l'AC II b obtenues par ITC et RPS sont statistiquement identiques ( $K_{D\ ITC} = 1000 \pm 220$  nM et  $K_{D\ RPS} = 900 \pm 220$  nM). De plus, l'enthalpie de liaison obtenue en RPS à l'aide de la loi de Van't Hoff est identique à celle obtenue en ITC. Les auteurs ont proposé d'utiliser le modèle AC II b/CBS comme outil de validation des nouveaux utilisateurs ou de nouvelles technologies dédiées à l'évaluation d'interaction moléculaire.

Une autre étude réalisée par Jecklin *et al* (2009) a porté sur la comparaison des constantes d'affinité de molécules référencées comme inhibiteurs de l'AC I, obtenus par RPS, ITC et spectrométrie de masse. Les affinités obtenues par ITC et spectrométrie de masse sont en

adéquation avec celles obtenues en RPS, excepté pour un des composés étudiés, à savoir l'acétazolamide, qui présente une affinité nettement supérieure en RPS. Cette différence pourrait être due au transfert de masse limitant car la cinétique d'association est très rapide. Ce phénomène n'ayant pas été pris en compte lors de l'exploitation des résultats, il en résulte un ajustement médiocre du profil expérimental et une valeur de constante d'affinité entachée d'une erreur élevée.

L'immobilisation de l'AC II b sur une lame CM5 a également été mise à profit par Navratilova et Hopkins (2010) pour développer une méthode de criblage de fragments dans l'objectif de développer ultérieurement de nouveaux candidats médicaments. L'approche RPS permet une consommation de protéines de 10 à 100 fois plus faible que les techniques classiques de biochimie ou biophysique comme la cristallographie par rayon X et la résonance magnétique nucléaire. Elle permet par ailleurs un développement plus rapide et l'obtention d'informations concernant les paramètres cinétiques et thermodynamiques de liaison.

D'autres études ont été réalisées sur lame CM5, selon une approche consistant à immobiliser la petite molécule pour étudier l'affinité d'une série de protéines. On peut citer les travaux de Svedhem *et al* (2001) qui ont étudié l'interaction de deux dérivés de type benzenesulfonamide avec une isoforme de l'anhydrase carbonique II humaine pseudo sauvage (AC II h<sub>pwt</sub>, Cys206→Ser) et des mutants de cette isoforme (mutation à distance du site actif). Dans un premier temps, les deux dérivés benzenesulfonamide qui se différencient par la présence d'un bras espaceur ont été immobilisés sur une lame CM5. Lors de l'étude de l'affinité de l'AC II h<sub>pwt</sub>, il a été montré que le composé comportant un bras espaceur était plus affiné pour l'AC II h<sub>pwt</sub>. Cette différence d'affinité pourrait être liée soit à une affinité intrinsèque supérieure du composé, soit à des effets stériques, dans la mesure où le site actif se trouve dans une cavité située à l'intérieur de la protéine. La présence du bras espaceur facilite l'accès dans la cavité de la protéine et donc l'interaction. Dans un second temps, l'AC II h<sub>pwt</sub> a été immobilisée et les deux dérivés benzenesulfonamide en solution ont été injectés dans le système microfluidique. Bien que des affinités plus grandes soient observées lorsque la protéine est immobilisée, l'échelle d'affinité pour les deux dérivés est la même. Cette différence serait due à des effets stériques en lien avec la matrice de dextran. Une étude a ensuite été réalisée avec les mutants de l'AC II h<sub>pwt</sub> supposés présenter une configuration identique à l'AC II h<sub>pwt</sub> mais moins stables en raison d'une flexibilité structurale supérieure. Cette étude a été réalisée après immobilisation du composé comportant un bras espaceur. La dissociation des complexes formés entre ce dérivé et les AC II h<sub>pwt</sub> mutantes est beaucoup plus rapide que pour l'AC II h<sub>pwt</sub>. Les auteurs ont montré qu'il existait une corrélation entre la vitesse de dissociation et la flexibilité des protéines qui impacte leur stabilité : plus la protéine est flexible donc instable, plus la dissociation est rapide.

Des études d'interaction impliquant l'AC après immobilisation sur d'autres types de surfaces réactives sont également présentées dans la bibliographie. Papalia *et al* (2010) a mené une étude en mettant à profit l'interaction biotine/streptavidine pour immobiliser l'AC II b. Il a pour cela étudié une lame incluse dans un kit commercialisé sous le nom de BioCAPture kit, dont la principale caractéristique est la possibilité d'une régénération totale de la surface réactive. Cette régénération permet d'immobiliser de nombreuses fois le partenaire biotinylé facilitant ainsi l'optimisation du protocole d'immobilisation. Les auteurs ont ainsi pu optimiser les conditions de biotinylation de l'AC II b et le protocole de purification de l'AC II b biotinylée, permettant d'obtenir une immobilisation optimale.

## CHAPITRE 2 : Etude de la complexation entre les dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles et les cyclodextrines

---

### I. Introduction

Tous les composés de la série chimique des sulfonamidodiarylpyrazoles présentent une faible solubilité aqueuse (de l'ordre de 40  $\mu\text{M}$ ), responsable de leur faible perméabilité membranaire aboutissant à une perte de leur efficacité (Davis *et al*, 2004). Bien que, la plupart des drogues ont besoin d'être suffisamment lipophiles pour traverser les membranes biologiques, elles doivent également être solubles en milieu aqueux pour être pharmacologiquement actives. Dans le but d'augmenter leur solubilité aqueuse, différentes méthodologies peuvent être employées comme la réduction de la taille des particules, la formation de sels ou encore l'utilisation d'agents complexants comme les cyclodextrines (CDs). Celles-ci sont couramment utilisées dans les formulations pharmaceutiques afin d'augmenter la solubilité et la biodisponibilité des drogues (Berglund *et al*, 1997 ; Platzer *et al*, 1999).

Ce chapitre présente l'étude de la complexation entre des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles et diverses CDs. La détermination des constantes d'association de ces complexes sera réalisée par résonance magnétique nucléaire et par électrophorèse capillaire. Les performances de la RMN seront mises à profit pour déterminer la stœchiométrie et la structure des complexes étudiés. Dans ce travail, la résonance magnétique nucléaire, l'électrophorèse capillaire et la spectroscopie UV-Visible ont été utilisées pour l'étude de complexation de nos composés. Seul le développement des méthodes de détermination de constante de complexation par résonance magnétique nucléaire et par électrophorèse capillaire, seront exposées dans ce chapitre. En effet, la faible solubilité des composés étudiés induit des différences spectrales trop faibles pour déterminer une constante d'association par spectroscopie UV-Visible. Cependant, l'optimisation des études de complexation sur un composé de référence avec deux cyclodextrines ( $\beta\text{-CD}$  et  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$ ) est présentée en annexe 1.

#### 1. Généralités sur les cyclodextrines

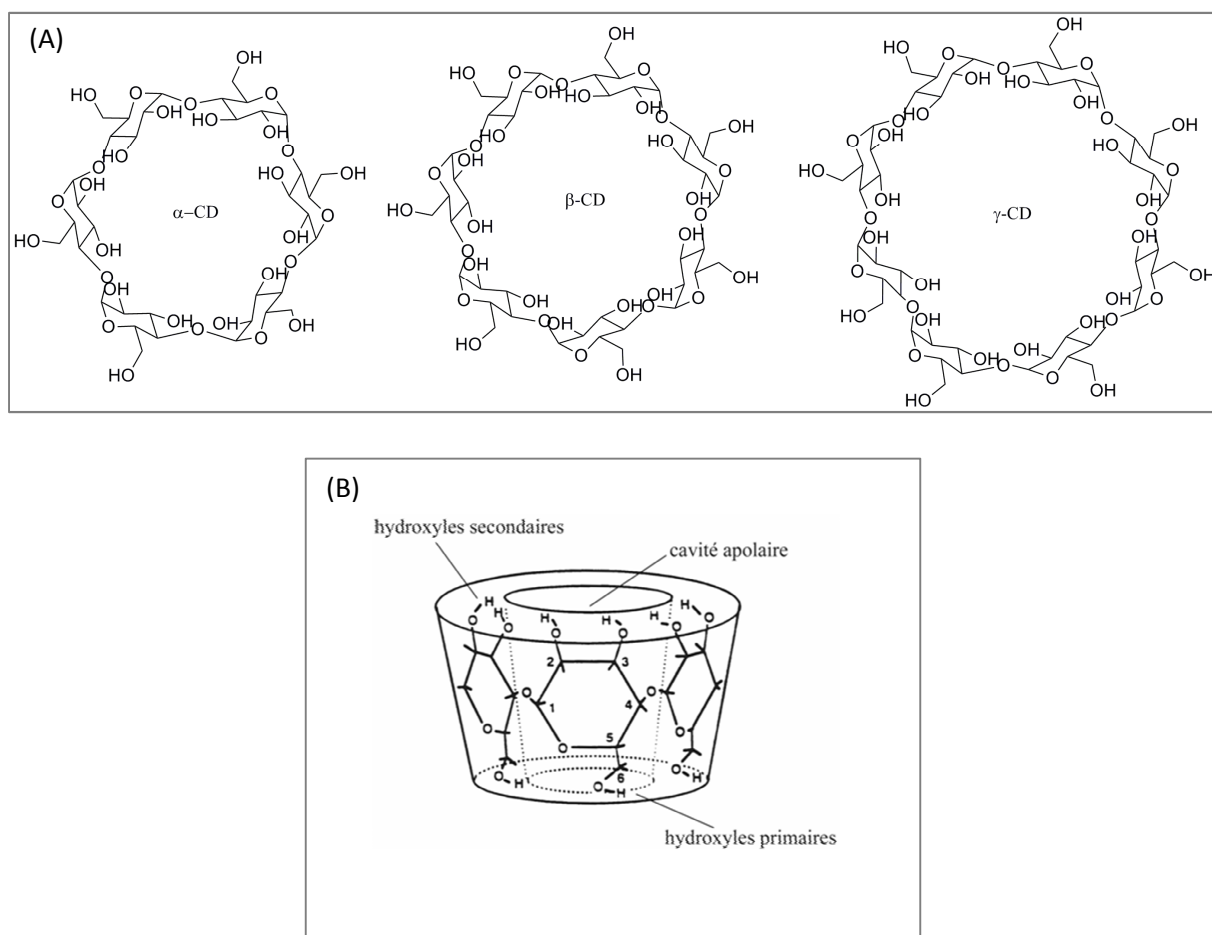
En 1891, Villiers isole un groupe d'oligosaccharides non réducteurs à partir de la dégradation de l'amidon (Villiers, 1891). Il nomme ces produits « cellulose », en raison de leurs particularités physico-chimiques proches de celles de la cellulose (résistance à l'hydrolyse acide et absence de propriétés réductrices). Vingt ans plus tard, Schardinger isole la souche microbienne responsable de



la formation de ces « cellulosines », qu'il dénomme *Bacillus Macerans* et décrit le mode de purification de ces oligosaccharides (Schardinger *et al*, 1904 et 1905). Il met aussi en lumière la capacité de ces dextrines (appellation générale des produits de dégradation de l'amidon) à former des adduits particuliers avec les molécules de diiode. Même si leur capacité à complexer diverses substances est remarquée relativement tôt, la structure des cyclodextrines n'est établie que dans les années 1940 (French et Rundle, 1942).

### 1.1. Définition, structure et nomenclature

Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques composés d'unités D-glucopyranose, reliées entre elles par liaisons  $\alpha_{1,4}$ . Les trois CDs naturelles les plus utilisées sont la  $\alpha$ , la  $\beta$  et la  $\gamma$ -CD formées de 6, 7 ou 8 sous-unités glucose, respectivement (figure 18, (A)). D'un point de vue tridimensionnel, les CDs adoptent une forme conique tronquée (figure 18, (B)).



**Figure 18** : (A) Structure plane des trois CDs natives, (B) Forme tronquée d'une cyclodextrine et numérotation des atomes de carbone.

Cette structure implique l'existence de deux extrémités hydrophiles : la première, bordée par les groupements hydroxyles primaires portés par les atomes de carbone en position 6 (OH<sub>6</sub>), constitue la périphérie la plus étroite, tandis que la seconde, délimitée par les groupements hydroxyles secondaires OH<sub>2</sub> et OH<sub>3</sub>, correspond à la face la plus large. Si la présence de ces fonctions alcools explique le caractère hydrophile de l'extérieur du cône, l'existence des deux séries de protons H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub>, disposés en anneaux à l'intérieur du macrocycle, confère à la cavité un caractère relativement apolaire et donc relativement hydrophobe. Cette combinaison de zones hydrophile et hydrophobe est à l'origine même du phénomène d'inclusion en solution aqueuse.

## 1.2. Propriétés physico-chimiques des cyclodextrines

### 1.2.1. Cyclodextrines natives

Les  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -CDs diffèrent principalement par la dimension de leur cavité, il en résulte des capacités d'inclusion différentes pour chaque CD (tableau 2). La distance entre les deux types d'hydroxyles secondaires (OH<sub>2</sub> et OH<sub>3</sub>) de deux sous-unités différentes de la  $\beta$ -CD conduit à la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires, ce qui limite la solvatation aqueuse de la  $\beta$ -CD par rapport à ses analogues à 6 et 8 unités glucose.

	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
<b>Nombre d'unité glucose</b>	6	7	8
<b>Masse molaire (g/mol)</b>	972	1135	1297
<b>Solubilité dans l'eau à 25°C (g/l)</b>	145	18,5	232
<b>Diamètre de la cavité (Å)</b>	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
<b>Hauteur de cône (pm)</b>	790	790	790
<b>Nombre de molécules d'eau contenues dans la cavité</b>	6-8	11-12	13-17
<b>Température de fusion (°C)</b>	275	280	275
<b>pKa à 25°C</b>	12,3	12,2	12,1

**Tableau 2** : Propriétés physico-chimiques des  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD et  $\gamma$ -CD

Sur le plan de la toxicité, aucune des CDs natives ne présente de nocivité majeure pour l'homme, que ce soit sous forme orale ou cutanée (Szejtli, 1982 et 1996). Néanmoins, les cyclodextrines natives peuvent être néphrotoxiques à partir d'une certaine dose puisque la complexation du cholestérol du système sanguin aboutit à son accumulation et à sa précipitation dans les reins. De fait, certaines cyclodextrines modifiées qui ne présentent pas cette propriété sont préférées aux cyclodextrines natives dans le cadre de la formulation pharmaceutique (CDs alkylées).

### 1.2.2. Cyclodextrines modifiées

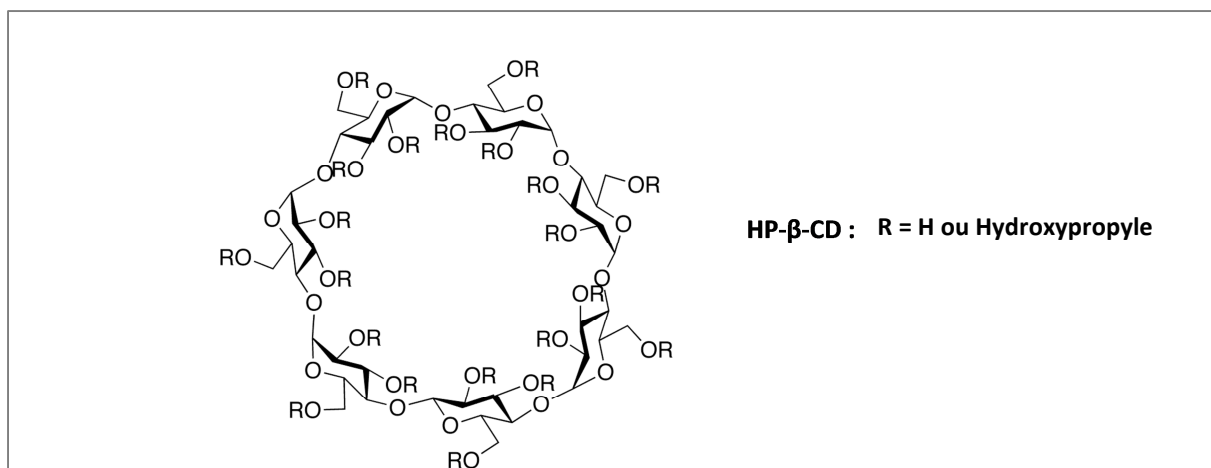
La présence de groupements hydroxyles potentiellement réactifs permet des substitutions variées sur les cyclodextrines, modifiant ainsi les caractéristiques existantes (solubilité, capacité d'inclusion, stabilité,...). Les groupements hydroxyles peuvent être sélectivement fonctionnalisés par des substituants neutres (alkyles...) ou ionisables (carboxyméthyle, sulfate, amine,...). Deux éléments caractérisent ces substitutions : leur localisation (en C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> ou C<sub>6</sub> de l'unité D-glucopyranose) et le nombre moyen de groupements hydroxyles substitués par unité de CD appelé degré de substitution (DS).

Les cyclodextrines modifiées (neutres ou ionisables) peuvent posséder un meilleur pouvoir complexant. En effet, les substituants modifient, d'une part, la dimension de la cavité, et d'autre part, la stabilité des complexes formés par l'établissement de nouvelles interactions (Pinho *et al*, 2014).

Seules les trois cyclodextrines modifiées choisies pour notre étude de complexation sont décrites ci-dessous.

- **Hydroxypropyl-β-cyclodextrine**

L'hydroxypropyl-β-cyclodextrine (HP-β-CD) correspond à un mélange de la β-CD native substituée en position 2, 3 et/ou 6 de l'unité glucosidique par un groupement hydroxypropyle (figure 19). La HP-β-CD présente une solubilité aqueuse élevée et, associée à son profil d'innocuité, présente le profil idéal pour des applications pharmaceutiques (Pinho *et al*, 2014). Elle est, par exemple, utilisée dans des préparations buvables ou injectables à base d'Itraconazole, un antifongique à large spectre de la classe des triazoles (Abdel-Rahman *et al*, 2007).



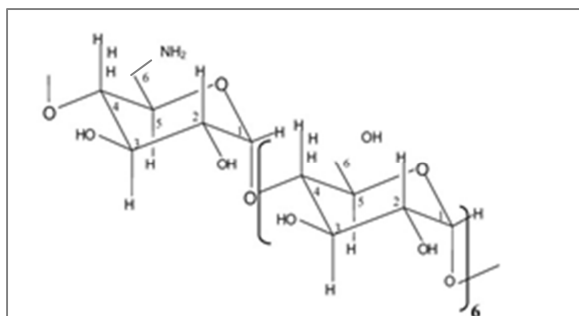
**Figure 19 :** Structure de l'Hydroxypropyle- β-cyclodextrine

- **Méthyl-β-cyclodextrine**

La méthyl-β-cyclodextrine (Me-β-CD) contient en moyenne quatre groupements méthyle par molécule de β-CD. Les premières études de toxicité indiquent que cette CD est peu toxique et donc possède un grand potentiel dans les applications pharmaceutiques. Tout comme la HP-β-CD, en raison de sa haute solubilité aqueuse, la Me-β-CD est une des cyclodextrines les plus courantes dans le domaine pharmaceutique (Figueiras *et al*, 2007).

- **6-Monodéoxy-6-monoamine-β-cyclodextrine**

La 6-monodéoxy-6-monoamine-β-CD présente un degré de substitution contrôlé, une seule unité glucosidique de la β-CD est substituée par une fonction amine primaire en position 6 (figure 20). Selon le pH de l'étude, la NH<sub>2</sub>-β-CD peut être sous la forme moléculaire ou sous la forme cationique, ammonium quaternaire (pK<sub>a</sub> = 11). La 6-monodéoxy-6-monoamine-β-CD (NH<sub>2</sub>-β-CD) a beaucoup été utilisée dans les années 1990, en tant que sélecteur chiral cationique (Terabe, 1989 ; Nardi et Eliseev, 1993 ; Chankvetadze *et al*, 1996). Lelièvre a décrit que la NH<sub>2</sub>-β-CD est un bon agent chiral pour la séparation d'énantiomères neutres (Lelièvre *et al*, 1997 (a) et (b)). Etant donné que la formation du complexe d'inclusion implique principalement les interactions hydrophobes hôte/invité à l'intérieur de la cavité et les liaisons hydrogène avec les hydroxyles secondaires situés sur le bord large de la CD, l'énantioselectivité de la NH<sub>2</sub>-β-CD est souvent rapportée comme similaire à celle de la β-CD.



**Figure 20** : Structure de la 6-monodéoxy-6-monoamine-β-CD

### 1.2.3. Propriétés complexantes

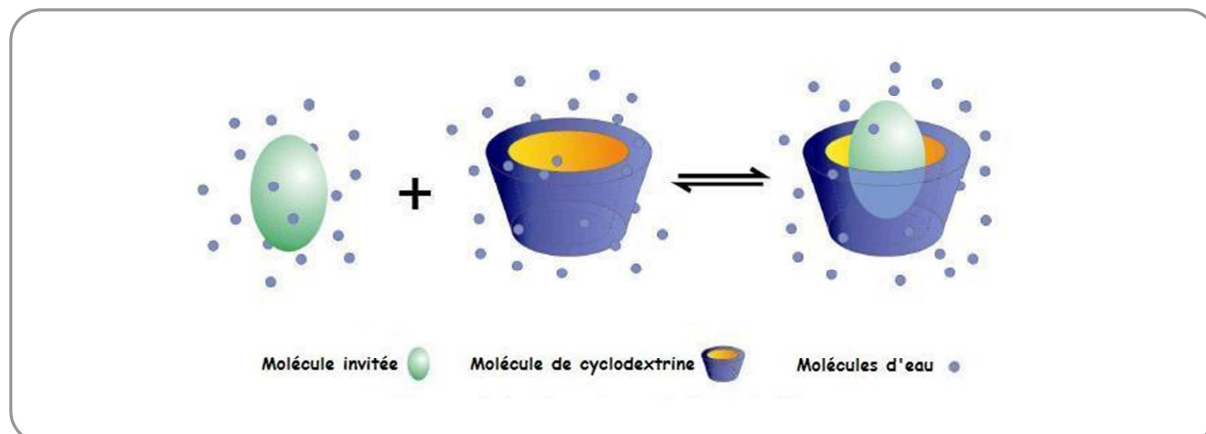
De part leur structure tridimensionnelle, les CDs peuvent former des complexes d'inclusion avec un grand nombre de molécules. La formation d'un complexe suppose une bonne adéquation entre la taille de la molécule hôte et celle de la CD. L'intérieur de la cavité apporte un microenvironnement lipophile dans lequel peuvent se placer des molécules peu polaires. La résultante de cette complexation est la solubilisation de molécules hydrophobes très insolubles dans la phase aqueuse (Hedges *et al*, 1998).

La possibilité de formation d'un complexe entre une CD et une molécule invitée dépend principalement des interactions qui peuvent se former entre ces deux molécules. Les interactions entre la CD hôte et son invité n'impliquent pas de liaisons covalentes. Le mécanisme de formation du complexe fait intervenir des interactions hydrophobes, des interactions dipôles-dipôles, des liaisons hydrogène voire même des interactions électrostatiques. Les CDs peuvent ainsi inclure partiellement ou en totalité un composé invité, ce qui donne lieu à la formation de complexes comportant éventuellement plusieurs molécules de CD ou de molécules invitées. Le rapport stœchiométrique 1 : 1 (hôte : invité) est fréquemment rencontré même si une ou plusieurs CD peuvent piéger un ou plusieurs invités et être à l'origine d'associations plus complexes (Kobetic *et al*, 2001).

La taille de la cavité et de la molécule invitée jouent donc un rôle important dans le processus de complexation. L'inclusion est un phénomène dynamique qui implique l'existence d'un équilibre entre les formes libres et complexées. La formation et la dissociation du complexe sont généralement rapides.

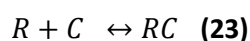
Outre la taille, des facteurs tels que l'encombrement stérique, la charge et la polarité de la molécule invitée sont à prendre en considération lors de la formation de complexes d'inclusion. Il existe ainsi une corrélation directe entre le caractère hydrophobe de la molécule ou de certaines parties de celle-ci et la stabilité du complexe formé (Szejtli, 1998).

La principale force provoquant la formation des complexes est la stabilisation énergétique du système par le remplacement dans la cavité des molécules d'eau à haute enthalpie par la molécule hydrophobe qui crée des associations apolaires-apolaires (figure 21) (Del Valle, 2004).



**Figure 21** : Représentation schématique de l'équilibre s'établissant, en solution aqueuse, entre les formes libres et complexées d'une molécule invitée et une CD.

Ce processus réversible (les molécules complexées sont en équilibre avec les molécules libres en solution) peut être quantifié par une constante d'équilibre appelée constante d'association ( $K$ ) (de formation, d'affinité, de stabilité, ou encore de complexation, Loftsson *et al*, 2005; Brewster et Loftsson, 2007) :



$$K = \frac{[RC]}{[R][C]} \quad (24)$$

Les analyses qui permettent de mettre en évidence l'existence d'un complexe d'inclusion en solution se basent sur les caractéristiques physico-chimiques de la substance complexée. Un certain nombre d'études physico-chimiques décrites dans la littérature utilise la résonance magnétique nucléaire, la spectroscopie UV-Visible, l'électrophorèse capillaire, la calorimétrie, la potentiométrie ou encore la fluorimétrie pour déterminer la constante d'association (Loftsson *et al*, 2005).

#### 1.2.4. Propriétés énantiosélectives

Outre leurs propriétés complexantes, la présence de cinq atomes de carbone asymétriques sur chaque unité glucopyranose confère aux CDs des capacités énantiosélectives reconnues. Ainsi, ce sont des sélecteurs chiraux de choix pour réaliser des séparations énantiomériques de composés,

notamment par électrophorèse capillaire et/ou par chromatographie liquide haute performance (Juvancz *et al*, 2008).

### 1.2.5. Applications

L'utilisation des cyclodextrines repose principalement sur leur capacité à former des complexes d'inclusion puisque le substrat voit ses propriétés modifiées lors de la complexation. Ainsi, l'inclusion peut induire une solubilité accrue, une diminution de volatilité ou encore une modulation de réactivité donnant lieu à des applications dans de nombreux domaines.

- Domaine pharmaceutique : Les principes actifs contenus dans les médicaments sont souvent des molécules hydrophobes, ce qui peut poser des problèmes d'assimilation par différentes voies (Loftsson *et al*, 2007). La solubilisation de principes actifs hydrophobes peut être réalisée par leur inclusion dans les cyclodextrines, qui remplacent alors avantageusement les co-solvants organiques et les surfactants parfois à l'origine d'effets secondaires. La stabilité du médicament peut également s'en trouver améliorée. A l'inverse, l'utilisation de CDs insolubles telles que les dérivés éthylés peut ralentir la diffusion de principes actifs trop hydrophiles. Il est à noter qu'en plus d'améliorer la solubilité des molécules invitées, les CDs peuvent, par ce phénomène d'inclusion, modifier leur biodisponibilité, réduire leur toxicité ou encore améliorer leur stabilité (Loftsson *et al*, 2005). De ce fait, les CDs sont utilisées comme excipient dans la formulation de médicaments (Brewster et Loftsson, 2007 ; Tiwari *et al*, 2010). La complexation d'actifs thérapeutiques a été appliquée à différentes voies d'administration (par exemple, voie orale : HP- $\beta$ -CD/carvédidol ; voie parentérale : HP- $\beta$ -CD/oméprazole ; voie locale :  $\beta$ -CD/méloxicam), (Cappello *et al*, 2006 ; Holvoet *et al*, 2007 ; Jain *et al*, 2008).
- Domaine agroalimentaire : Les CDs contribuent à masquer des odeurs déplaisantes, à stabiliser des émulsions et des arômes (par exemple dans le cas de la mayonnaise) et à conserver les aliments. Elles sont utilisées comme exhausteur de goût et pour fixer des molécules trop volatiles prolongeant ainsi la durée de vie gustative de certains produits alimentaires comme le chewing-gum.
- Domaine environnemental : Les CDs présentent de bonnes caractéristiques pour être utilisées pour la dépollution des sols (Wan *et al*, 2009). La solubilisation des polluants dans les sols permet par exemple de les rendre plus accessibles aux micro-organismes et donc de les dégrader. Elles permettent également le traitement des eaux par encapsulation et adsorption de contaminants (Allabashi *et al*, 2007).

- Domaine cosmétique : Les CDs sont consacrées à la diminution de la volatilité des parfums et réduisent certaines mauvaises odeurs. Elles offrent aussi une libération prolongée des molécules odorantes.
- Utilisation diverses : Les CDs sont apparues dans divers produits commerciaux, tels que des désodorisants, des shampoings, des bains de bouche...

## 2. Techniques utilisées

### 2.1. La résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est un outil précieux pour les chimistes, pouvant les renseigner sur la structure, les mouvements et les réactions chimiques des molécules.

La RMN du proton est une technique très souvent utilisée afin de déterminer les interactions physico-chimiques lors de la formation d'un complexe (Bratu *et al*, 2005 ; Schneider *et al*, 1998). La RMN permet non seulement d'évaluer la stœchiométrie du complexe et de déterminer la constante d'association d'un complexe mais aussi d'en étudier la géométrie.

#### 2.1.1. Détermination de la stœchiométrie du complexe

A l'origine, la méthode des variations continues (ou méthode de Job) a été décrite en spectroscopie d'absorption UV-Visible afin de déterminer la stœchiométrie d'un complexe formé entre deux espèces A et B (Job, 1928). Par la suite, cette méthode a été adaptée à d'autres techniques comme la RMN.

Plusieurs solutions de complexes sont préparées par mélange de différents volumes  $V_A$  et  $V_B$  de deux solutions équimolaires [A] et [B]. La concentration totale étant constante, chaque solution peut être caractérisée par une fraction molaire  $r$  variant de 0 à 1 ( $r = [A] / ([A] + [B])$ ). La réponse étudiée en RMN est la différence de déplacement chimique ( $\Delta\delta$ ) entre les formes libres et complexées. En RMN, la détermination de la stœchiométrie se fait par l'enregistrement d'une série de spectres  $^1\text{H}$  en 1D correspondant à chaque mélange puis les variations des déplacements chimiques des protons de la CD ou de la molécule invitée sont mesurées.

Le tracé de la variation continue (« Job plot ») correspondant aux variations du produit de la différence de déplacement chimique par la fraction molaire en fonction de la fraction molaire (soit



$r \cdot \Delta\delta = f(r)$  permet la détermination de la stœchiométrie. L'existence d'un complexe 1 : 1 est mise en évidence par l'existence d'un maxima de la courbe pour une valeur d'abscisse 1/2.

De nombreuses études portant sur les interactions « hôte-invité » ont utilisé cette méthode afin de déterminer la stœchiométrie des complexes formés (Chankvetadze *et al*, 1996, 1999, 2000 (a), 2000 (b) ; Lambert *et al*, 2001; Laverde *et al*, 2002).

### 2.1.2. Détermination de la constante apparente de complexation

Le modèle mathématique de Benesi et Hildebrand (Benesi *et al*, 1949) permet de calculer les constantes de formation des complexes. Ce modèle est valable dans le cas où la stœchiométrie du complexe est de type 1 : 1 et lorsque la molécule hôte se trouve en très large excès face à l'invité (Danel *et al*, 2011 ; Asensi-Bernaid *et al*, 2013).

Lors de la complexation, le déplacement chimique ( $\delta_i$ ) du soluté R en présence de la cyclodextrine (C) est fonction des déplacements chimiques du soluté sous forme libre ( $\delta_l$ ) et sous forme complexée ( $\delta_c$ ), pondérés par chaque fraction des deux formes (25).

$$\delta_i = \frac{[R]}{[R]+[RC]} \delta_l + \frac{[RC]}{[R]+[RC]} \delta_c \quad (25)$$

Par combinaison des équations (24) et (25), le déplacement chimique de l'espèce peut s'exprimer de la manière suivante (26) :

$$\delta_i = \frac{\delta_l + \delta_c K[C]}{1+K[C]} \text{ soit } (\delta_i - \delta_l) = \frac{(\delta_c - \delta_l)K[C]}{1+K[C]} \quad (26)$$

La détermination expérimentale de  $\delta_c$  est fastidieuse, voire impossible. Un réarrangement mathématique de l'équation (26) (linéarisation), permet d'obtenir les équations (27), (28) ou (29); elles sont respectivement appelées les équations double-réciproque, y-réciproque et x-réciproque (tableau 3).

Equations	Graphique	K	$\delta_c$
<p><b>(27) Double-réiproque :</b></p> $\frac{1}{(\delta_i - \delta_l)} = \frac{1}{(\delta_c - \delta_l)K} \times \frac{1}{[C]} + \frac{1}{(\delta_c - \delta_l)}$	$\frac{1}{(\delta_i - \delta_l)} = f\left(\frac{1}{[C]}\right)$	$\frac{\text{ordonnée}}{\text{pente}}$	$\frac{1}{\text{ordonnée}} + \delta_l$
<p><b>(28) <math>\gamma</math>-réiproque :</b></p> $\frac{[C]}{(\delta_i - \delta_l)} = \frac{1}{(\delta_c - \delta_l)} \times [C] + \frac{1}{(\delta_c - \delta_l)K}$	$\frac{[C]}{(\delta_i - \delta_l)} = f([C])$	$\frac{\text{pente}}{\text{ordonnée}}$	$\frac{1}{\text{pente}} + \delta_l$
<p><b>(29) <math>x</math>-réiproque :</b></p> $\frac{(\delta_i - \delta_l)}{[C]} = -K(\delta_i - \delta_l) + K(\delta_c - \delta_l)$	$\frac{(\delta_i - \delta_l)}{[C]} = f(\delta_i - \delta_l)$	$-\text{pente}$	$\frac{\text{ordonnée}}{K} + \delta_l$

**Tableau 3** : Méthodes graphiques permettant l'obtention de la constante K et de  $\delta_c$ .

Dans la suite de l'étude  $(\delta_i - \delta_l)$  est notée  $\Delta\delta$ .

Ainsi, les paramètres  $\delta_i$ ,  $\delta_l$  et  $[C]$  étant connus, l'étude des variations des déplacements chimiques en fonction de la concentration en CD doit permettre, si le modèle est vérifié, l'obtention de droite dont l'équation permet de déterminer les valeurs de la constante d'association K et du déplacement chimique du complexe  $\delta_c$  (tableau 3).

### 2.1.3. Etude structurale du complexe

La RMN est un des outils les plus performants permettant d'obtenir des informations sur les complexes formés entre les solutés et les cyclodextrines. Outre les informations concernant la stœchiométrie et la constante d'association des complexes, évoquées précédemment, cette technique renseigne sur la géométrie du complexe et notamment sur l'orientation du soluté dans la cavité de la cyclodextrine.

Des informations concernant la géométrie de complexes de type « hôte-invité » en solution peuvent notamment être obtenues à l'aide de l'analyse des effets NOE (Nuclear Overhauser Effect).

Ces effets, démontrant la présence d'interactions dipolaires, permettent d'étudier la proximité spatiale de certains noyaux pour des distances inférieures à 4 Å (effets intramoléculaires ou intermoléculaires) (Fernandes *et al*, 2003).

Les méthodes utilisées pour observer les interactions dipolaires sont généralement les séquences NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) et ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy). Cependant, la séquence ROESY est plus appropriée pour l'étude de molécules de poids moléculaire de l'ordre de 1000 g/mol (Amato *et al*, 1998 ; Gosnat *et al*, 2000).

## 2.2. L'électrophorèse capillaire

### 2.2.1. Principe de l'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique qui permet d'analyser aussi bien les biomolécules que tous types de composés de faible masse moléculaire.

L'électrophorèse capillaire est une méthode séparative basée sur la migration d'espèces électriquement chargées dans un tube capillaire rempli d'une solution électrolytique, sous l'effet d'un champ électrique intense (figure 22). Le capillaire utilisé est, le plus souvent, un tube en silice fondue de diamètre variant de 25 à 100 µm et de longueur comprise entre 20 et 100 cm.

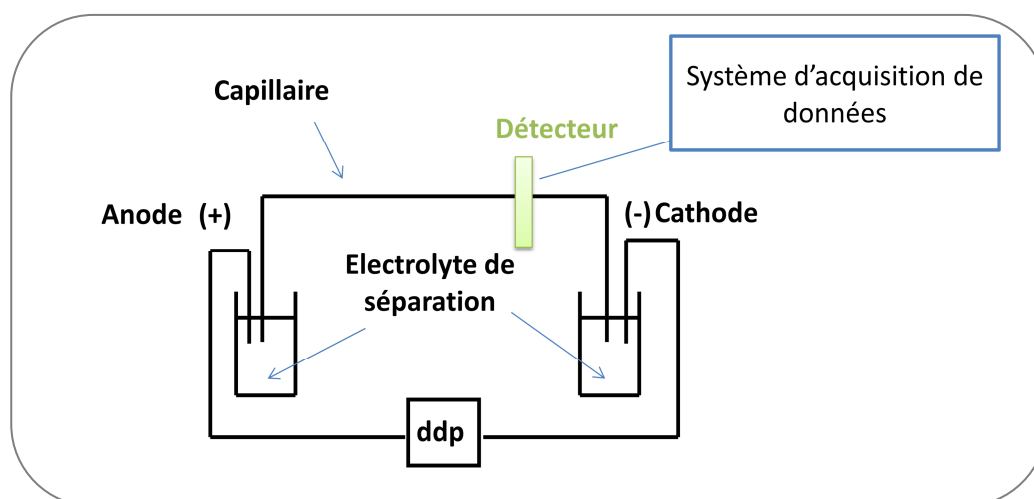


Figure 22 : Schéma d'un appareillage d'électrophorèse capillaire

Les constituants d'un mélange migrent sous l'effet de deux phénomènes principaux :

- Le flux électroosmotique qui règle le déplacement de toutes les espèces présentes dans l'échantillon. La paroi interne du tube capillaire est constituée de groupements silanols (SiOH) qui peuvent être déprotonés lorsque le pH de la solution électrolytique se trouve

supérieur à 4. Dans ce cas, les groupements  $\text{SiO}^-$  sont capables de former des paires d'ions avec les espèces cationiques en surface du capillaire et les ordonnent en deux couches en établissant une différence de potentiel zeta dont la valeur dépend de la concentration du tampon et du pH. Lors de l'application d'un champ électrique, les cations de la couche la plus éloignée de la paroi du capillaire (sites anioniques) sont attirés par la cathode, entraînant avec eux les molécules d'eau qui les solvatent. Un flux électroosmotique prend alors naissance et se déplace vers la cathode. Ce flux emmène toutes les espèces présentes à la même vitesse et ne contribue donc pas à leur séparation.

- Le flux électrophorétique concerne les espèces chargées. La mobilité électrophorétique ( $\mu_e$ ) est propre à chaque molécule et dépend directement des critères de charge et de taille des analytes, ce qui permet leur séparation. Les espèces neutres ont une mobilité électrophorétique nulle et ne peuvent donc pas être séparées entre elles.

La mobilité apparente ( $\mu_{app}$ ) résulte de la contribution des flux électroosmotique et électrophorétique (30) :

$$\mu_{app} = \mu_e + \mu_{eof} = \frac{Ll}{t_M V} \quad (30)$$

Avec : L : longueur totale du capillaire (cm)

l : longueur effective du capillaire (cm)

$t_M$  : temps de migration (s)

V : tension appliquée (kV)

Les mobilités sont généralement exprimées en  $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ .

### 2.2.2. Détermination de la constante apparente d'association analyte/cyclodextrine

La méthode consiste à réaliser une série d'expériences en augmentant la concentration de l'agent complexant dans l'électrolyte (BGE) alors que la concentration en substance à analyser reste constante et beaucoup plus faible que la concentration de l'agent complexant. La constante d'association est alors déterminée à partir de la mobilité électrophorétique de l'analyte en fonction de l'augmentation de la concentration de l'agent de complexation dans l'électrolyte (Benes *et al*, 2012 ; Tanaka et Terabe, 2002).

Tout comme dans le cas de la détermination des constantes de complexation par RMN, la méthode utilisée en EC est dérivée de la méthode de Scott (Scott, 1956), elle-même issue de la méthode de Benesi et Hildebrand (Benesi *et al*, 1949).

Pour les complexes de stœchiométrie 1 : 1, la méthode de Scott permet de calculer les constantes apparentes de formation des complexes par EC à partir des méthodes de calcul x-réciproque, y-réciproque et double-réciproque, semblables à celles utilisées en RMN. Alors qu'en RMN, la réponse étudiée est le déplacement chimique, en EC, la réponse étudiée est la mobilité électrophorétique.

Les méthodes double-réciproque, y-réciproque, x-réciproque, utilise les équations présentées dans le tableau 4.

Equations	Graphique	K	$\mu c$
<p><u>Double-réciproque :</u></p> $\frac{1}{(\mu_i - \mu_l)} = \frac{1}{(\mu_c - \mu_l)K} \times \frac{1}{[C]} + \frac{1}{(\mu_c - \mu_l)}$	$\frac{1}{(\mu_i - \mu_l)} = f\left(\frac{1}{[C]}\right)$	$\frac{\text{ordonnée}}{\text{pente}}$	$\frac{1}{\text{ordonnée}} + \mu_l$
<p><u>y-réciproque :</u></p> $\frac{[C]}{(\mu_i - \mu_l)} = \frac{1}{(\mu_c - \mu_l)} \times [C] + \frac{1}{(\mu_c - \mu_l)K}$	$\frac{[C]}{(\mu_i - \mu_l)} = f([C])$	$\frac{\text{pente}}{\text{ordonnée}}$	$\frac{1}{\text{pente}} + \mu_l$
<p><u>x-réciproque :</u></p> $\frac{(\mu_i - \mu_l)}{[C]} = -K(\mu_i - \mu_l) + K(\mu_c - \mu_l)$	$\frac{(\mu_i - \mu_l)}{[C]} = f((\mu_i - \mu_l))$	<p>-pente</p>	$\frac{\text{ordonnée}}{K} + \mu_l$

**Tableau 4 :** Méthodes graphiques, correspondant aux trois équations, permettant l'obtention de la constante K et de  $\mu c$ .

Ainsi, les paramètres  $\mu_i$ ,  $\mu_l$  et  $[C]$  étant connus, l'étude des variations des mobilités électrophorétiques en fonction de la concentration en CD doit permettre, si le modèle est vérifié, l'obtention de droite dont l'équation permet de déterminer les valeurs de la constante d'association K et du déplacement chimique du complexe  $\delta c$  (tableau 4).

## II. Etudes expérimentales

### 1. Complexes étudiés

Six sulfonamidodiarylpyrazoles se différenciant par la substitution au niveau du carbone asymétrique ont été choisis pour cette étude (tableau 5).

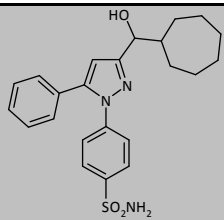
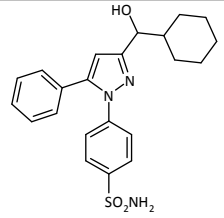
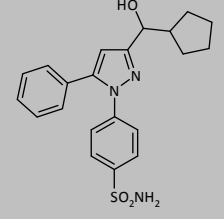
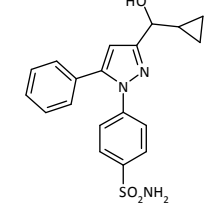
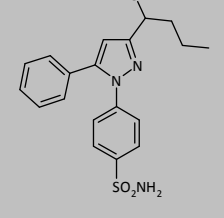
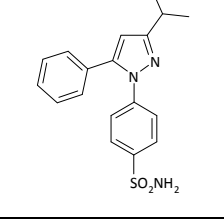
Structures	Noms
	ALICA 87
	ALICA 76
	ALICA 203
	ALICA 94
	ALICA 23
	ALICA 15

Tableau 5 : Structure des composés étudiés.

Les six cyclodextrines utilisées provenant de différents fournisseurs, sont répertoriées dans le tableau 6.

Nom	Degré de substitution	Fournisseur
$\alpha$ -CD	-	Sigma-Aldrich
$\beta$ -CD	-	Roquette
$\gamma$ -CD	-	Sigma-Aldrich
HP- $\beta$ -CD	0,61	Roquette
Me- $\beta$ -CD	0,57	Roquette
NH <sub>2</sub> - $\beta$ -CD	1	Cyclolab

Tableau 6 : Cyclodextrines étudiées.

## 2. Etude de la complexation par RMN

### 2.1. Conditions expérimentales

Les expériences de RMN <sup>1</sup>H 1D et 2D ont été réalisées à 500 MHz sur un spectromètre Bruker avance 500 équipé d'une sonde TXI à une température de 25°C.

Les solutions sont préparées dans une solution tampon phosphate deutérée à 67 mM (pH = 7,4) préparée à partir de phosphate monosodique (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) et de phosphate disodique (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). En raison de la faible solubilité de nos composés, la présence de DMSO *d*<sub>6</sub> (30%) est nécessaire pour préparer une solution de concentration 1 mM permettant l'étude par RMN. Les solutions des tubes RMN ont été préparées en mélangeant la CD et le composé en différentes proportions tout en conservant un volume total constant de 500  $\mu$ L.

#### Remarque :

L'ajout de DMSO introduit un biais sur la valeur de la constante apparente d'association composé/CD lié à une interaction possible entre le DMSO et le composé et/ou une compétition entre le DMSO et la molécule invitée pour la CD. Dans la littérature, des études ont également été réalisées en présence de solvant organique tel que le méthanol (Danel *et al*, 2011) ou le DMSO (Swiech *et al*, 2012 ; Chipem *et al*, 2013 ; Qiu *et al*, 2014). Notons que les travaux de Berglund *et al* (1997) n'ont montré qu'une très faible interaction entre le DMSO et la CD.

## 2.2. Caractérisation des deux partenaires par RMN

Dans le but de caractériser les deux partenaires en RMN, l'attribution des signaux a été réalisée à l'aide de différentes expériences RMN monodimensionnelles ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ ) ou bidimensionnelles : étude de corrélations homonucléaires  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY : Correlated Spectroscopy) ou hétéronucléaires  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Coherence et HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence).

Les spectres  $^1\text{H}$  du composé Alica 87 et de la cyclodextrine ont été enregistrés. Une numérotation arbitraire des protons de l'Alica 87 est présentée dans la figure 23.

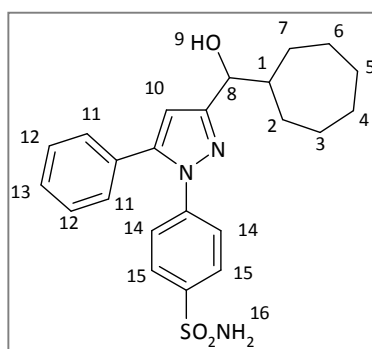


Figure 23 : Numérotation des protons de l'Alica 87.

La numérotation conventionnelle des protons de la  $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD est rappelée ci-dessous dans la figure 24.

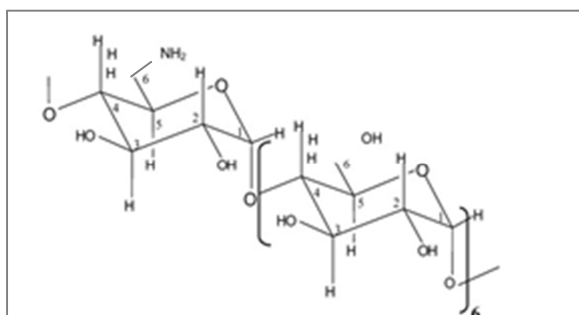
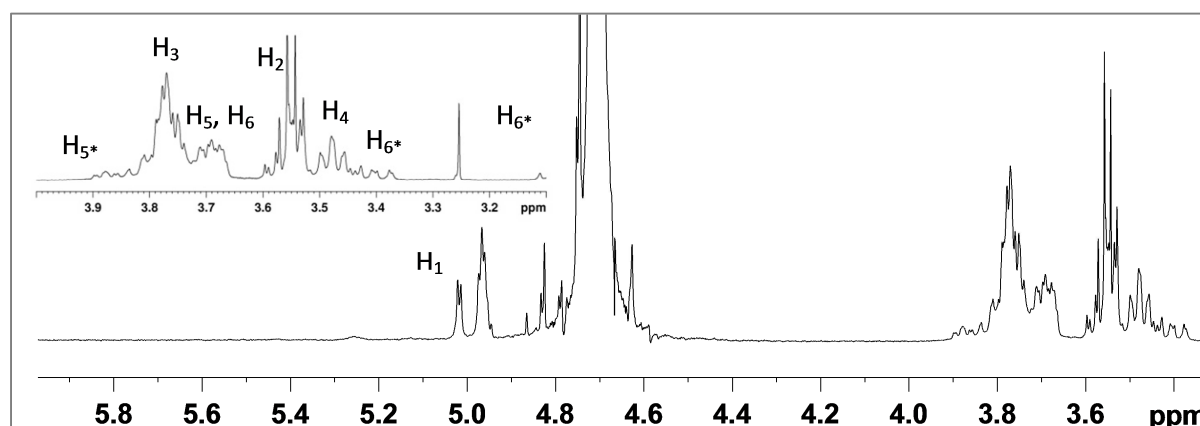


Figure 24 : Numérotation des protons de la  $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD

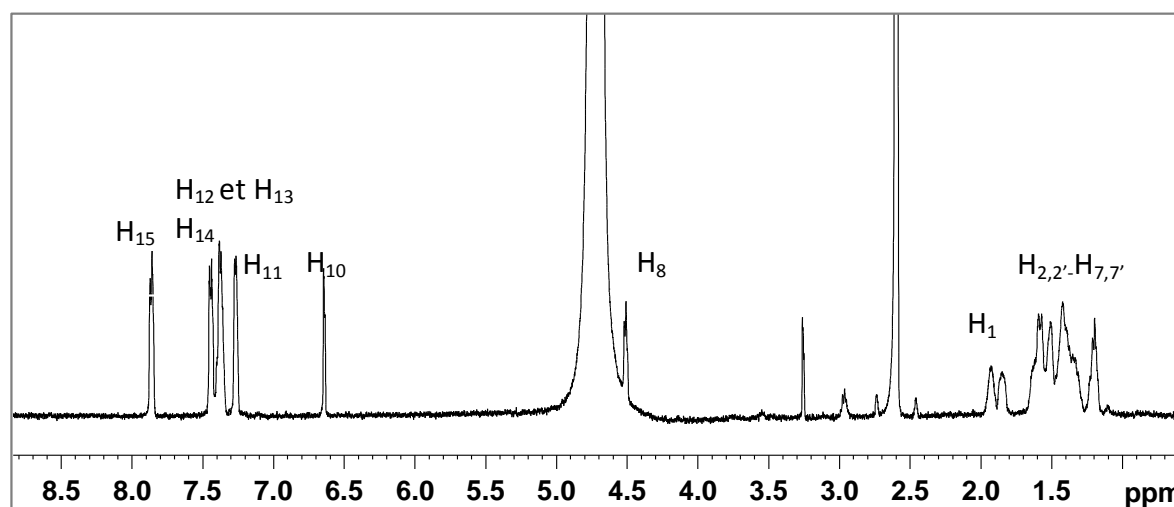


Les spectres RMN  $^1\text{H}$  de la  $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD et de l'Alica 87 sont présentés dans les figures 25 et 26.



**Figure 25 :** Spectre  $^1\text{H}$  de la  $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD à 3 mM, dans le tampon phosphate deutéré pH 7,4 (67 mM) contenant 30% de DMSO  $d_6$ .

\* : protons de la sous-unité de la CD substituée par  $\text{NH}_2$ .



**Figure 26 :** Spectre  $^1\text{H}$  de l'Alica 87 à 0,6 mM, dans le tampon phosphate deutéré pH 7,4 (67 mM) contenant 30% de DMSO  $d_6$

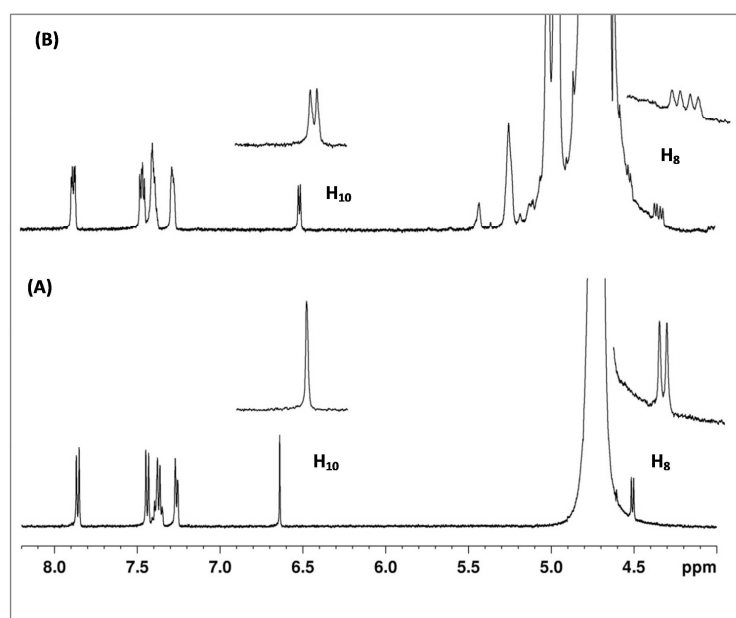
Le tableau 7 reprend les déplacements chimiques des différents signaux de l'Alica 87, ainsi que leur intégration et leur multiplicité.

Proton H	$\delta$ (ppm)	Intégration	Multiplicité
1	1,90	1	Massif
Protons du cycloheptyle	entre 1,20 et 1,70	12	Massif
8	4,51	1	Doublet
10	6,64	1	Singulet
11	7,26	2	Doublet
12, 13	entre 7,34 et 7,39	3	Massif
14	7,44	2	Doublet
15	7,86	2	Doublet

**Tableau 7** : Déplacements chimiques des protons de l'Alica 87.

### 2.3. Discrimination chirale

Les premières expériences de RMN portant sur l'étude du complexe Alica 87/ $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD ont montré qu'en présence de CD certains signaux correspondant aux protons du composé sont dédoublés (figure 27).



**Figure 27** : Extrait des spectres  $^1\text{H}$  de (A) l'Alica 87 seul (0,5 mM en Alica 87) et du (B) complexe  $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD/ Alica 87 (0,5 mM en Alica 87 et 3 mM  $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD), tampon phosphate deutéré pH 7,4 (67 mM) contenant 30% en DMSO  $d_6$ .

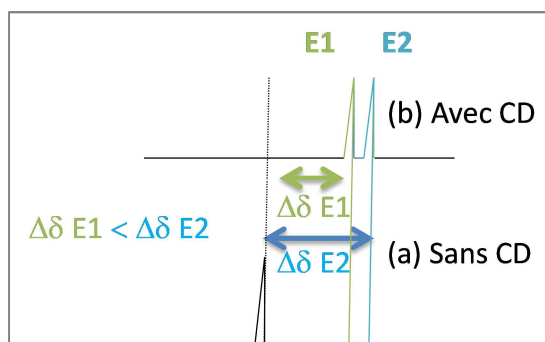
Deux hypothèses peuvent être proposées (Smith *et al*, 2003):

- le dédoublement de pic correspond à la discrimination chirale des énantiomères du composé pour la CD, expliqué par une reconnaissance énantiosélective du composé pour la CD et/ou que les complexes diastéréoisomériques formés ont des spectres RMN différents. La combinaison de ces deux effets a souvent été visualisée (Chankvetadze *et al*, 1996).
- le dédoublement de pic correspond à la visualisation du composé sous sa forme libre et sous sa forme complexée.

Comme l'échange entre la forme libre et la forme complexée du composé est plus rapide que la vitesse d'acquisition en RMN, il est rare de visualiser sur le spectre RMN les deux formes du composé. La première hypothèse étant alors la plus probable, des expériences portant sur l'analyse du mélange racémique, d'un énantiomère pur (E2) et d'un mélange 1/3 de l'énantiomère (E1) et 2/3 de l'énantiomère (E2) en présence de CD ont été réalisées.

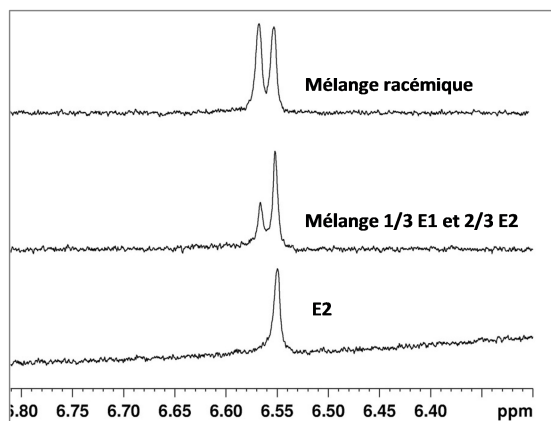
Remarque :

Arbitrairement, nous avons choisi de nommer E1, l'énantiomère qui possède la différence de déplacement chimique ( $\Delta\delta$ ) la plus faible en présence de CD et E2, l'énantiomère qui possède la différence de déplacement chimique la plus grande (figure 28).



**Figure 28 :** Schéma de la notation des deux énantiomères lors de l'ajout de CD dans le milieu

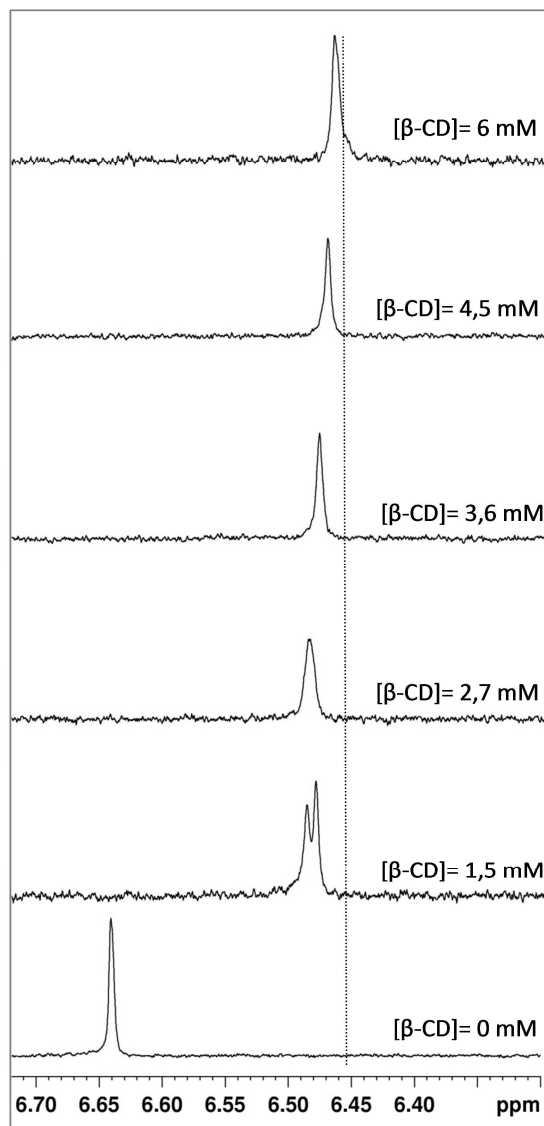
Un extrait des trois spectres illustrant les signaux du proton H<sub>10</sub> est présenté sur la figure 29.



**Figure 29** : Extrait des spectres RMN <sup>1</sup>H de l'Alica 87 (0,6 mM, racémique, E2 pur, et mélange 1/3 E1 et 2/3 E2 en présence de 3 mM de NH<sub>2</sub>-β-CD, (signal du H<sub>10</sub>)

L'absence d'un signal dédoublée dans le cas de l'énantiomère pur confirme qu'il s'agit d'un phénomène de discrimination chirale. La discrimination chirale en RMN, correspondant à la variation non équivalente des déplacements chimiques de chaque énantiomère en présence de cyclodextrine, peut-être le résultat de plusieurs mécanismes ; elle peut être causée par la nature différente des complexes diastéréoisomériques et/ou par les différences des constantes d'association de chaque énantiomère. Ce phénomène de discrimination chirale a été observé lors de l'étude de plusieurs complexes : Alica 76/NH<sub>2</sub>-β-CD, Alica 87/β-CD, Alica 76/β-CD, Alica 203/β-CD, Alica 76/β-CD et Alica 203/β-CD.

En ce qui concerne l'étude du complexe Alica 87/β-CD, les résultats s'avèrent particulièrement intéressants (figure 30).



**Figure 30** : Superposition d'extraits de spectre RMN de l'Alica 87 (0,3 mM) en présence de  $\beta$ -CD, à des concentrations croissantes dans le tampon phosphate deutéré pH 7,4 (67 mM) en présence de 30% DMSO d6.

En effet, alors qu'une discrimination chirale est observée lors de l'ajout d'une faible concentration en  $\beta$ -CD (1,5 mM), elle n'apparaît plus pour des concentrations  $\beta$ -CD plus élevées. Ceci suggère qu'en présence d'un excès de  $\beta$ -CD dans la solution, le nombre de CD est trop important pour discriminer l'interaction d'un énantiomère par rapport à l'autre.

Grâce à ce phénomène de discrimination chirale, l'étude de complexation sur le mélange racémique permet d'obtenir dans certain cas, les constantes de complexation des 2 énantiomères.

## 2.4. Détermination de la stœchiométrie du complexe

La stœchiométrie des complexes formés entre les composés et les cyclodextrines a été étudiée par RMN. La détermination de la stœchiométrie a été réalisée uniquement pour le complexe NH<sub>2</sub>-β-CD/Alica 87 E2, en raison de la consommation importante en composé et en cyclodextrine.

La stœchiométrie du complexe a été évaluée selon la méthode des variations continues (méthode de JOB).

- **Préparation des solutions :**

Deux solutions équimolaires de NH<sub>2</sub>-β-CD (1 mM) et d'Alica 87 E2 (1 mM) dans une solution tampon phosphate deutéré 67 mM (pH = 7,4) sont préparées. Les solutions des tubes RMN ont été préparées en mélangeant la NH<sub>2</sub>-β-CD et l'Alica 87 en différentes proportions, la concentration totale correspondant à la somme des deux espèces est maintenue constante à 1 mM. Par mélange des deux solutions, la fraction molaire *r* varie de 0 à 1 (tableau 8).

n° tube	[Alica 87] (mM)	[CD] (mM)	V Analyte (μL)	V CD (μL)	r
1	1	0	500	0	1
2	0,9	0,1	450	50	0,9
3	0,8	0,2	400	100	0,8
4	0,6	0,4	300	200	0,6
5	0,5	0,5	250	250	0,5
6	0,4	0,6	200	300	0,4
7	0,2	0,8	100	400	0,2
8	0,1	0,9	50	450	0,1
9	0	1	0	500	0

**Tableau 8** : Conditions expérimentales pour la détermination de la stœchiométrie,

$$\text{avec } r = \frac{[\text{Alica 87}]}{[\text{Alica 87}] + [\text{CD}]}$$

Les signaux sur le spectre RMN <sup>1</sup>H de la NH<sub>2</sub>-β-CD n'ont pas pu être suivis en raison du chevauchement de certains pics (perte de la symétrie liée à la substitution de l'alcool primaire d'une unité glucosidique par une amine primaire), nous n'avons donc suivi que certains protons (H<sub>8</sub> et H<sub>10</sub>) de l'Alica 87.

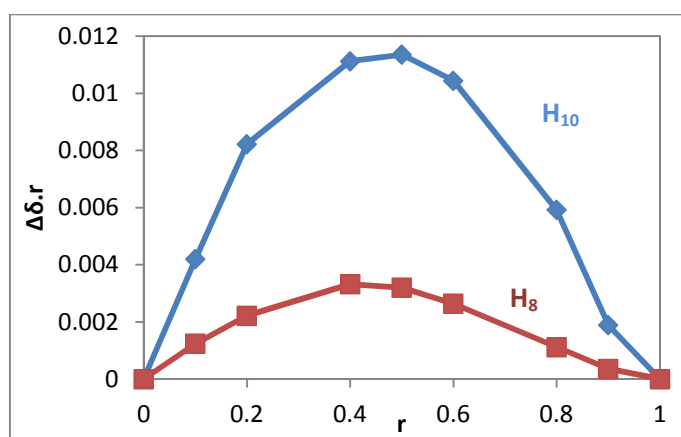
En présence de CD dans la solution, on observe une variation du déplacement chimique des protons H<sub>8</sub>, H<sub>10</sub> et des H<sub>aromatiques</sub> du composé Alica 87. Les signaux du proton H<sub>8</sub> porté par le carbone asymétrique et du proton H<sub>10</sub> porté par le pyrazole ont été étudiés en raison de leur forte variation de déplacement chimique en présence de CD (tableau 9).

ratio	H <sub>8</sub>		H <sub>10</sub>	
	δ (ppm)	Δδ (ppm)	δ (ppm)	Δδ (ppm)
1	4,5176	0	6,6388	0
0,9	4,5180	0,0004	6,6367	0,0021
0,8	4,5190	0,0014	6,6314	0,0074
0,6	4,5220	0,0044	6,6214	0,0174
0,5	4,5240	0,0064	6,6150	0,0238
0,4	4,5259	0,0083	6,6090	0,0298
0,2	4,5287	0,0111	6,5977	0,0411
0,1	4,5300	0,0124	6,5968	0,042
0	0	0	0	0

**Tableau 9 :** Variation des déplacements chimiques des protons H8 et H10 en fonction de la fraction molaire de l'Alica 87.

avec  $r = \frac{[Alica\ 87]}{[Alica\ 87] + [CD]}$

La figure 31 illustre les courbes de JOB correspondant à ces résultats.



**Figure 31 :** Courbes de JOB du complexe NH<sub>2</sub>-β-CD/Alica 87, H<sub>8</sub> et H<sub>10</sub>

La courbe en arc d'hyperbole centrée sur la valeur 0,5 caractérise un complexe de stœchiométrie 1 : 1.

## 2.5. Détermination des constantes d'association par RMN

L'affinité de l'Alica 87 vis-à-vis de six CDs a été évaluée à partir de la mesure des constantes apparentes d'association. Dans cette première partie, les constantes d'association ont été déterminées par RMN  $^1\text{H}$ , en suivant la variation des déplacements chimiques de  $\text{H}_8$  et  $\text{H}_{10}$  (méthode de Scott, décrite précédemment).

### Préparation des solutions :

Une série de solutions contenant une concentration constante en composé (mélange racémique) et une concentration variable en cyclodextrine a été préparée pour chaque complexe (tableau 10). Les solutions sont préparées dans un milieu similaire à celui utilisé lors de l'étude de la stœchiométrie du complexe Alica 87/ $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD.

CD	[Alica 87] (mM)	Gamme [CD] (mM)	Gamme de ratio [CD]/[Soluté]
$\alpha$ -CD	0,5	3-18	6-36
$\beta$ -CD	0,3	1,5-7	5-23
$\gamma$ -CD	0,5	3-18	6-36
HP- $\beta$ -CD	0,5	3-18	6-36
Me- $\beta$ -CD	0,5	3-18	6-36
$\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD	0,6	3-18	5-30

**Tableau 10 :** Concentrations de l'Alica 87 et des CDs utilisées lors de l'étude RMN des constantes d'association.

### 2.5.1. Complexe Alica 87/ $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD

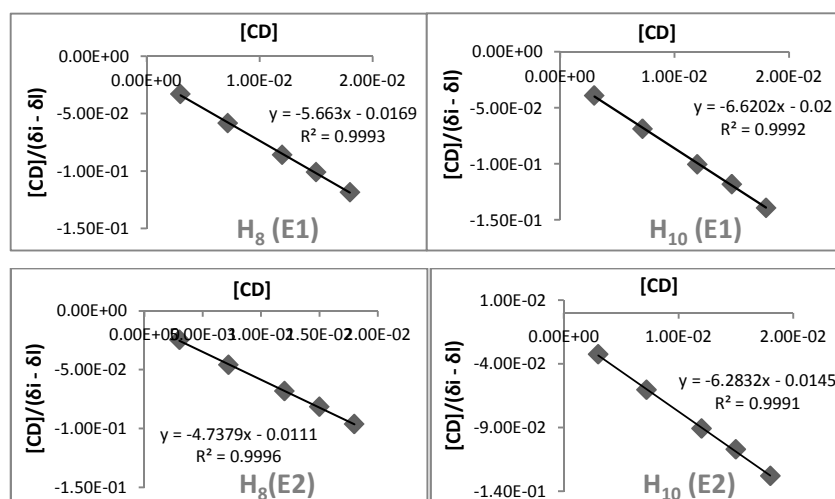
Pour chaque énantiomère de l'Alica 87, les résultats relatifs aux variations des déplacements chimiques des protons  $\text{H}_8$  et  $\text{H}_{10}$  en présence de  $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD (rapports  $[\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD]/[Alica 87] variant de 5 à 30) sont rassemblés dans le tableau 11.



[Alica 87] (mM)	[NH <sub>2</sub> -β-CD] (mM)	Alica 87 (E1)		Alica 87 (E2)	
		Δδ (ppm)	Δδ (ppm)	Δδ (ppm)	Δδ (ppm)
		H <sub>8</sub>	H <sub>10</sub>	H <sub>8</sub>	H <sub>10</sub>
0,6	3	-0,0907	-0,0770	-0,1213	-0,0918
0,6	5,4	-0,1050	-0,0884	-0,1379	-0,1027
0,6	7,2	-0,1230	-0,1047	-0,1569	-0,1188
0,6	9	-0,1266	-0,1065	-0,1612	-0,1202
0,6	12	-0,1396	-0,1194	-0,1758	-0,1319
0,6	15	-0,1486	-0,1271	-0,1838	-0,1399
0,6	18	-0,1516	-0,1292	-0,1868	-0,1406

**Tableau 11** : Différences de déplacement chimique des protons H<sub>8</sub> et H<sub>10</sub> des énantiomères de l'Alica 87 en présence de NH<sub>2</sub>-β-CD à diverses concentrations.

La figure 15 présente les résultats obtenus selon la méthode γ-réciproque.



**Figure 15** : Résultats obtenus selon l'équation γ-réciproque pour le complexe Alica 87/NH<sub>2</sub>-β-CD, H<sub>8</sub> et H<sub>10</sub>.

En raison des différences possibles liées aux incertitudes relatives des variables avant et après transformation, les constantes de complexation apparentes ont été déterminées selon les trois méthodes graphiques de linéarisation (tableau 12), (Platzer *et al*, 1999).

Méthode graphique	Alica 87 E1				Alica 87 E2			
	pente	ordonnée	R <sup>2</sup>	K (M <sup>-1</sup> )	pente	ordonnée	R <sup>2</sup>	K (M <sup>-1</sup> )
<b>H<sub>8</sub></b>								
<b>y-réciproque</b>	-5,663	-0,0169	0,9993	<b>335</b>	-4,7379	-0,0111	0,9996	<b>426</b>
<b>x-réciproque</b>	-354,2	-61,75	0,9912	<b>354</b>	-452,19	-94,477	0,9922	<b>452</b>
<b>double-réciproque</b>	-0,016	5,7746	0,9968	<b>363</b>	-0,0104	-4,8091	0,9964	<b>462</b>
<b>H<sub>10</sub></b>								
<b>y-réciproque</b>	-6,620	-0,02	0,9992	<b>331</b>	-6,2832	-0,0145	0,9991	<b>433</b>
<b>x-réciproque</b>	-347,7	-51,927	0,9911	<b>347</b>	-454,65	-71,695	0,9888	<b>454</b>
<b>double-réciproque</b>	-0,019	-6,7442	0,9968	<b>356</b>	-0,0137	-6,3758	0,9954	<b>465</b>

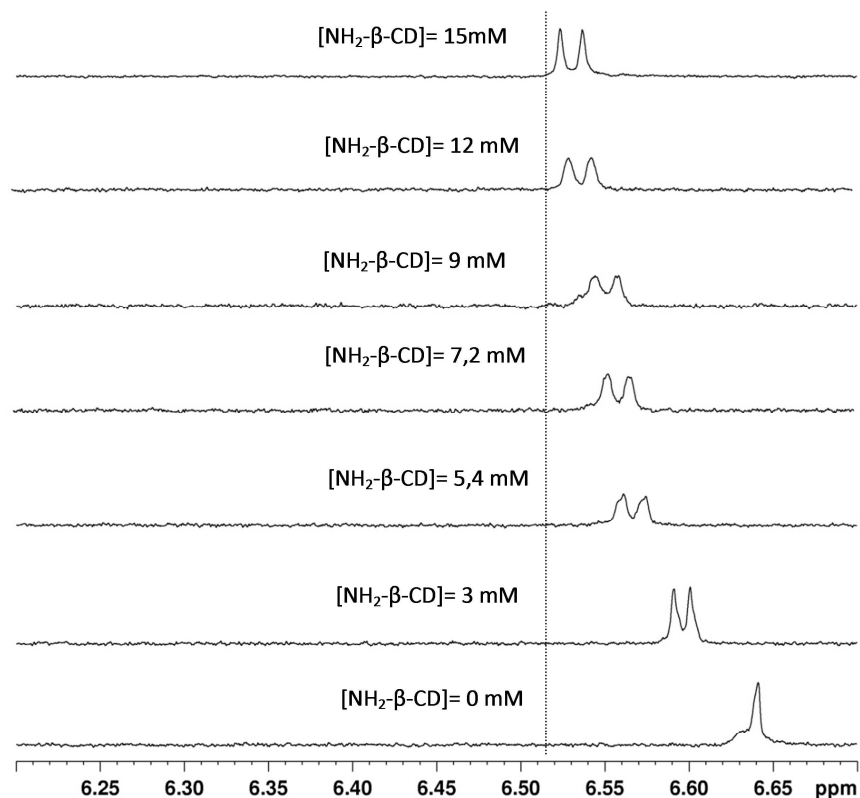
**Tableau 12** : Constantes de complexation des énantiomères de l'Alica 87 avec la NH<sub>2</sub>-β-CD selon les 3 méthodes graphiques

Les constantes de complexation apparentes obtenues pour l'Alica 87 et la NH<sub>2</sub>-β-CD selon les 3 méthodes de calcul sont proches (tableau 11, CV < 3,5 %), tous les résultats présentés par la suite dans cette étude sont déterminés en utilisant l'équation y-réciproque.

La méthode RMN nous a permis d'étudier simultanément les constantes d'affinité des 2 énantiomères de l'Alica 87, la constante d'affinité de l'énantiomère E1 ( $K_{E1} = 348 \text{ M}^{-1}$ ) est inférieure à celle de l'énantiomère E2 ( $K_{E2} = 445 \text{ M}^{-1}$ ).

### 2.5.2. Complexe Alica 76/NH<sub>2</sub>-β-CD

L'étude de la constante de formation du complexe Alica 76/NH<sub>2</sub>-β-CD a été réalisée dans les conditions opératoires définies précédemment (figure 32).



**Figure 32** : Superposition d'extraits de spectre RMN de l'Alica 76 en présence de concentration croissante en CD ( $[Alica\ 76] = 0,6\text{ mM}$ ), signal  $H_{10}$ .

Comme pour l'Alica 87, une discrimination chirale de l'Alica 76 a été observée. Pour chaque énantiomère de l'Alica 76. Les valeurs des constantes d'association apparentes obtenues par la méthode  $\gamma$ -réciproque sont données dans le tableau 13.

Méthode	Alica 76 $E_1$				Alica 76 $E_2$			
	pente	ordonnée	$r^2$	$K\ (M^{-1})$	pente	ordonnée	$r^2$	$K\ (M^{-1})$
<b><math>\gamma</math>-réciproque</b>	-6,009	-0,0527	0,9925	<b>114</b>	-5,915	-0,0389	0,9922	<b>152</b>

**Tableau 13** : Constantes de complexation des énantiomères de l'Alica 76 avec la  $NH_2$ - $\beta$ -CD selon la méthode  $\gamma$ -réciproque

Par ailleurs, on constate que la constante d'association de l'Alica 76 avec la  $NH_2$ - $\beta$ -CD est environ trois fois plus faible que celle de l'Alica 87.

### 2.5.3. Complexes Alica 87/CDs neutres

Lors de l'étude de la complexation entre l'Alica 87 et la  $\alpha$ -CD, la solution, la variation observée des déplacements chimiques de certains protons de l'Alica 87 révèle une interaction entre le composé et la  $\alpha$ -CD. Cependant ces variations étant trop faibles, la constante d'affinité de ce complexe n'a pas pu être déterminée.

Lors de l'étude du complexe Alica 87/Me- $\beta$ -CD, une variation ainsi qu'un dédoublement de certains pics des déplacements chimiques des protons de l'Alica 87 sont également observés en présence de CD, ce qui démontre une interaction énantiosélective entre cette CD et l'Alica 87. Cependant, en raison d'une variation trop faible des déplacements chimique en fonction des concentrations en CD, la constante d'association n'a pas pu être déterminée.

### 2.5.4. Comparaison des constantes d'association obtenues pour les complexes formés

Les constantes d'association obtenues pour les complexes de l'Alica 87 avec diverses CDs ont été déterminées selon la méthodologie décrite précédemment et sont rassemblées dans le tableau 14.

Type de CD	$K_{\text{Alica 87/CD}} \text{ (M}^{-1}\text{)}$
NH <sub>2</sub> - $\beta$ -CD	335/ 426 (E <sub>1</sub> /E <sub>2</sub> )
$\alpha$ -CD	*
$\beta$ -CD	764
$\gamma$ -CD	139
HP- $\beta$ -CD	588/668 (E <sub>1</sub> /E <sub>2</sub> )
Me- $\beta$ -CD	(*)

**Tableau 14** : Constantes d'association apparentes obtenues pour les complexes formés.

\*La constante de complexation n'a pu être déterminée car  $\Delta\delta$  trop faible pour déterminer K.

(\*) Interaction prouvée par la discrimination chirale obtenue mais  $\Delta\delta$  trop faible pour déterminer K.

Cette étude nous a permis de discuter de l'influence de la taille et de la substitution de la CD sur l'affinité de l'Alica 87 envers la molécule hôte.

La constante d'association de ce composé avec la  $\gamma$ -CD est environ 5 fois plus petite que celle avec la  $\beta$ -CD. Cette différence de stabilité peut-être expliquée par la taille de la cavité de la cyclodextrine qui est plus importante pour la  $\gamma$ -CD (7,5-8,3 Å) que pour la  $\beta$ -CD (6,0-6,5 Å). Si la cavité est trop grande, les interactions entre le composé et la cyclodextrine ne sont pas suffisantes pour stabiliser le

complexe. La constante d'association entre l'Alica 87 et la  $\alpha$ -CD n'a pu être déterminée : la cavité de la  $\alpha$ -CD serait trop petite (4,7-5,3 Å) pour établir des complexes stables avec l'Alica 87. Il semblerait donc que la cavité de la  $\beta$ -CD soit la plus adaptée pour accueillir notre composé.

L'affinité la plus importante pour l'Alica 87 est obtenue avec la  $\beta$ -CD (764 M<sup>-1</sup>). La substitution de la  $\beta$ -CD par des groupements plus ou moins polaires diminue la stabilité du complexe avec une perte de 13 % lors de la complexation avec la HP- $\beta$ -CD, et une perte de 44 % lors de la complexation avec la NH<sub>2</sub>- $\beta$ -CD. Ceci peut être expliqué par une moins bonne accessibilité du composé et/ou par une diminution des liaisons stabilisant le complexe. En effet, la NH<sub>2</sub>- $\beta$ -CD étant sous la forme cationique au pH de l'étude, la sphère de solvatation importante située autour de l'ammonium quaternaire risque de gêner l'interaction.

Cette étude menée par RMN a permis de montrer que la NH<sub>2</sub>- $\beta$ -CD et la HP- $\beta$ -CD sont énantiosélectifs vis-à-vis de l'Alica 87. Les affinités respectives des 2 énantiomères pour ces deux CDs ont été déterminées. Le composé présente une affinité supérieure pour la HP- $\beta$ -CD, il semblerait que la substitution de la CD par une fonction amine minimise la stabilité du complexe, une interaction entre le composé et la fonction alcool primaire semble nécessaire pour améliorer l'affinité du composé envers la CD.

La constante d'association maximale ayant été obtenue pour l'Alica 87 avec la  $\beta$ -CD (K = 764 M<sup>-1</sup>), l'affinité des composés appartenant à la même série chimique que l'Alica 87 a été évaluée avec cette CD.

## 2.6. Etude de la complexation de divers composés avec la $\beta$ -CD

Les composés étudiés appartiennent à la même série chimique mais se différencient par leur substitution au niveau de l'alcool secondaire.

Les constantes de complexation apparentes de l'Alica 94, 23 et 15 n'ont pas pu être déterminées. En effet, même si lors de l'ajout de CD dans la solution, des variations de déplacements chimiques de certains protons (H<sub>8</sub>, H<sub>10</sub> et H<sub>aromatique</sub>) sont observées, celles-ci sont trop faibles et ne permettent pas le calcul de la constante d'affinité. Pour les autres composés, les constantes d'affinité obtenues sont présentées dans le tableau 15.

Composés	Substitution C*	K E <sub>1</sub> /E <sub>2</sub> (M <sup>-1</sup> )
Alica 87	cycloheptyle	764
Alica 76	cyclohexyle	367/561
Alica 203	cyclopentyle	178/199
Alica 94	cyclopropyle	*
Alica 23	Propyle linéaire	*
Alica 15	méthyle	*

**Tableau 15** : Constantes de complexation apparentes de différents composés avec la  $\beta$ -CD

\*La constante de complexation n'a pas pu être déterminée car  $\Delta\delta$  trop faible pour déterminer K.

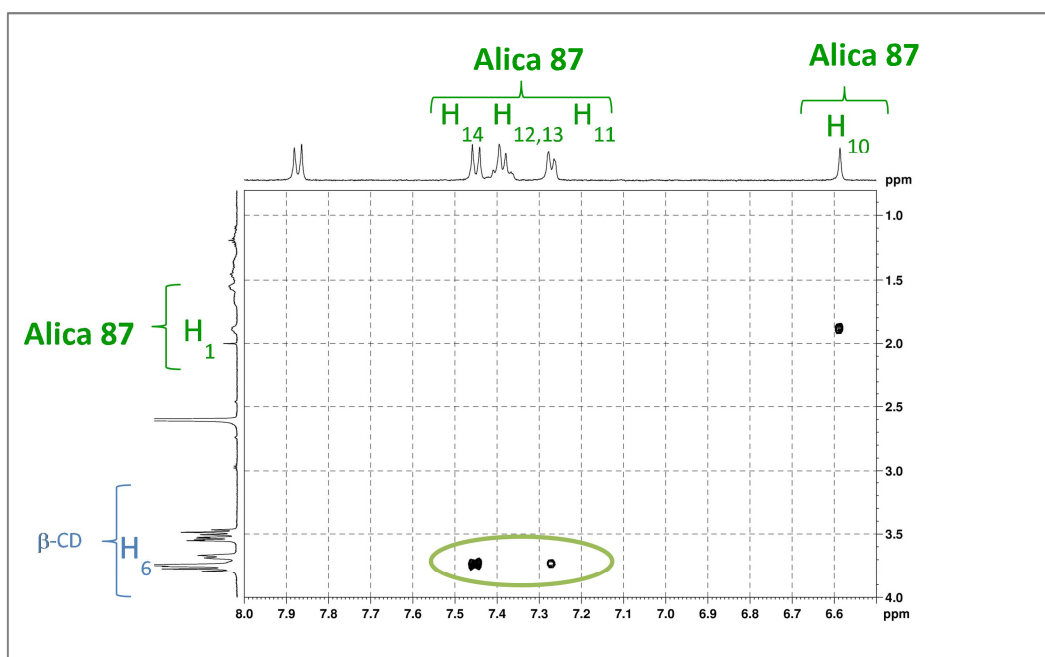
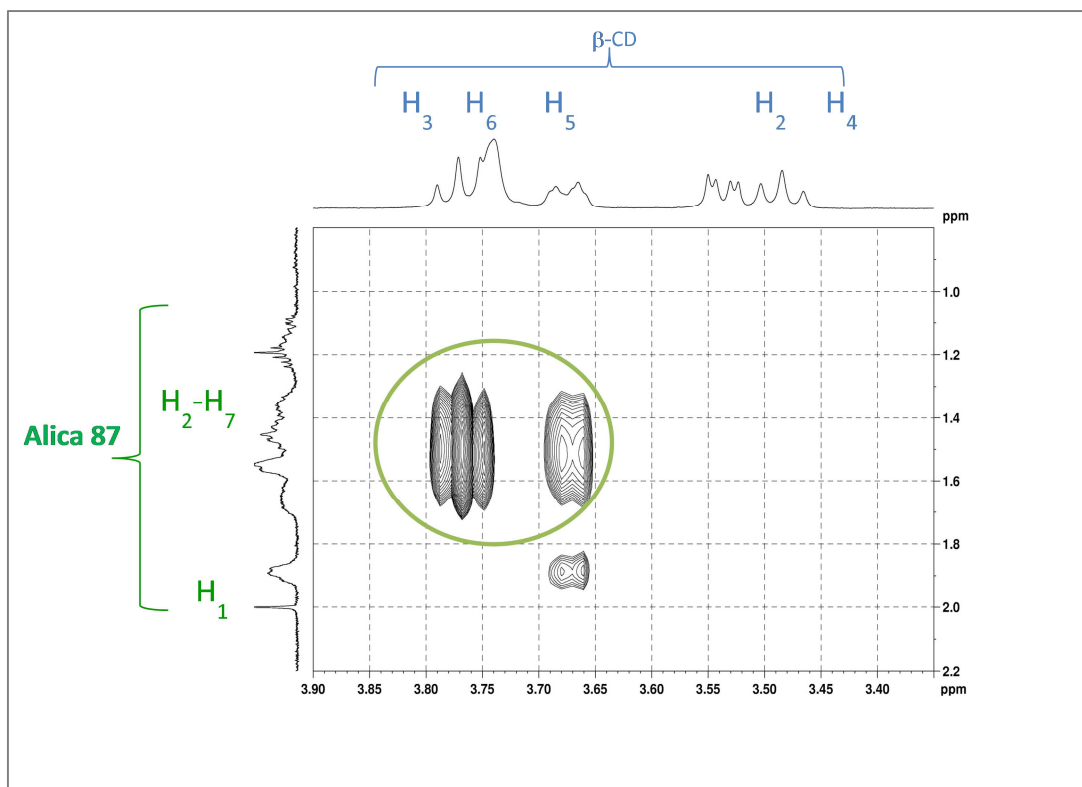
Si on compare l'affinité des différents composés pour la  $\beta$ -CD, il semble y avoir une corrélation entre la constante d'association et l'encombrement stérique par des groupements alkyles linéaire ou cyclique au niveau du carbone asymétrique. En effet, la présence d'un cycloheptyle semble être la plus adéquate pour stabiliser le complexe. Ces résultats pourraient laisser présager que l'inclusion impliquerait les groupements aliphatiques de la molécule. Des études structurales ont donc été réalisées afin d'évaluer la géométrie de l'interaction molécules/ $\beta$ -CD.

## 2.7. Etude structurale

Afin de prouver l'existence du complexe d'inclusion et de démontrer que les variations de déplacements chimiques ne résultent pas de simples interactions de surface, nous avons effectué une expérience de RMN ROESY 2D sur le complexe Alica 87/ $\beta$ -CD (figure 33).

### Préparation des solutions :

Pour étudier la structure des complexes par des expériences 2D ROESY, une solution équimolaire (0,5 mM) de l'Alica 87 avec la  $\beta$ -CD a été préparée dans un tampon phosphate 67 mM deutéré (pH 7,4), contenant 30 % de DMSO *d*<sub>6</sub>.



**Figure 33** : Extrait des spectres Roesy 2D pour le complexe Alica 87/ $\beta$ -CD, dans un tampon phosphate deutéré pH 7,4 (67 mM) contenant 30% de DMSO d<sub>6</sub>, [Alica 87]= 0,5 mM et [ $\beta$ -CD] = 0,5 mM.

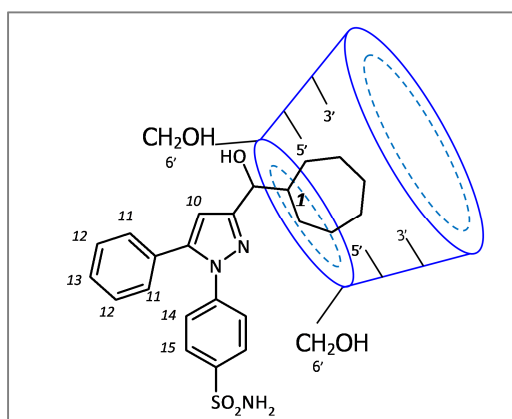
Le phénomène d'interaction, en plus d'être mis en évidence par la variation des déplacements chimiques des protons de l'Alica 87, est démontré par la présence de taches de corrélations dipolaires entre les protons du composé et ceux de la cyclodextrine.

Le spectre ROESY 2D du complexe Alica 87/ $\beta$ -CD ne montre aucune tache de corrélation entre les protons aromatiques de l'Alica 87 et les protons H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub> de la CD, orientés vers l'intérieur de la cavité. L'hypothèse d'une inclusion du composé par les substituants aromatiques est donc réfutée.

Cependant, des taches de corrélation correspondant à des interactions dipolaires entre les protons H<sub>3</sub> et H<sub>5</sub> de la  $\beta$ -CD et les protons du cycle heptyle de l'Alica 87 sont observées. De plus, on remarque une interaction entre les protons H<sub>5</sub> de la  $\beta$ -CD avec le proton H<sub>1</sub> de l'Alica 87 et une absence d'interaction entre les protons H<sub>3</sub> de la  $\beta$ -CD avec le proton H<sub>1</sub> de l'Alica 87. Ceci met donc en évidence un phénomène d'inclusion du cycloheptyle de l'Alica 87 par le côté le plus étroit de la cavité de la CD.

Sur le spectre ROESY, on observe également une interaction dipolaire entre les protons aromatiques H<sub>14</sub> et H<sub>11</sub> de l'Alica 87 et les protons H<sub>6</sub> de la  $\beta$ -CD, situés à l'extérieur de la cavité étroite de la CD, ce qui confirme l'inclusion du composé par le côté le plus étroit de la cavité de la  $\beta$ -CD.

De plus, nous avons observé que la substitution de la  $\beta$ -CD en H<sub>6</sub> par une fonction amine primaire réduit la valeur de la constante de complexation ( $K_{\text{Alica87}/\beta\text{-CD}} = 764 \text{ M}^{-1}$  et  $K_{\text{Alica}/\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}} = 335/426 \text{ M}^{-1}$ ), ce qui peut être expliqué par une moins bonne stabilité du complexe (encombrement stérique lié à la substitution en position 6 par une amine primaire et/ou perte de liaisons hydrogène). Un schéma représentant la complexation de l'Alica 87 dans la  $\beta$ -CD a été proposé à partir de ces observations (figure 34).



**Figure 34 :** Représentation schématique du complexe Alica 87/ $\beta$ -CD



### 3. Etude de complexation par électrophorèse capillaire

#### 3.1. Conditions expérimentales

Les analyses électrophorétiques ont été réalisées à l'aide d'un appareil BECKMAN P/ACE MDQ, muni d'un détecteur UV à barrette de diodes et piloté par un système informatique utilisant le logiciel 32 Karat Software 5.0.

Les analyses ont eu lieu dans un capillaire de silice vierge (Composite Metal Service (Hallow, UK)) dont les dimensions géométriques sont les suivantes : longueur totale : 50,2 cm ; longueur effective : 40 cm et diamètre interne : 50  $\mu\text{m}$ . Tout capillaire neuf est conditionné successivement avec solutions de NaOH 1 M (15 min, 20 psi), de NaOH 0,1 M (15 min, 20 psi) et d'H<sub>2</sub>O (2 min, 20 psi).

L'électrolyte de séparation est une solution tampon phosphate à 67 mM pH 7,4 (BGE 2) préparée à partir d'une solution d'acide phosphorique (1 M) en ajustant le pH par addition de NaOH 1 M.

#### 3.2. Détermination des constantes de complexation par EC

L'étude des différents complexes est réalisée au pH physiologique (pH 7,4). Compte tenu des valeurs de  $pK_a$  des composés étudiés ( $pK_a \approx 9,5$ ), les analytes se présentent sous forme moléculaire au pH d'analyse. Or les études d'interaction menée par EC requièrent qu'un des deux partenaires soit chargé. Ainsi, l'étude de la complexation des composés d'intérêt avec des CDs neutres ne peut pas être réalisée. Par conséquent, des études préliminaires avec des CDs chargées anioniques hautement sulfatées (HS- $\beta$ -CD) et cationiques (NH<sub>2</sub>- $\beta$ -CD) ont été réalisées afin de déterminer la présence ou non d'interaction. Les résultats ayant révélé une interaction plus importante des analytes envers la NH<sub>2</sub>- $\beta$ -CD, les études d'affinité ont été réalisées avec cette CD cationique.

Comme décrit dans la littérature (Terabe *et al*, 1989 ; Garcia-Ruiz *et al*, 2003), les cyclodextrines cationiques ont tendance à s'adsorber sur la paroi interne du capillaire. Ce phénomène altère l'homogénéité de la charge en surface, ce qui entraîne des modifications du flux électroosmotique, à l'origine du déplacement des espèces dans le capillaire. Les conséquences majeures qui en résultent sont une diminution des capacités de séparation, une mauvaise répétabilité des résultats et surtout la perte partielle en cyclodextrine à la surface du capillaire. De ce fait, la concentration en cyclodextrine n'est pas constante empêchant une exploitation correcte des résultats.

Dans la littérature, différentes approches sont décrites pour résoudre le problème d'adsorption souvent rencontré avec les CDs cationiques ou lors de l'analyse de biomolécules, telles que des peptides et des protéines (Ghosal, 2004).

Afin de réduire l'adsorption de la  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$  à la surface du capillaire, deux approches classiques sont envisageables:

- l'utilisation d'électrolyte de pH acide, afin de reculer l'ionisation des groupements silanol du capillaire
- le revêtement du capillaire, plus couramment appelé « coating », qui peut être de nature dynamique ou covalent (Jong *et al*, 2012 ; Liu *et al*, 2012).

En raison de la volonté de travailler au pH physiologique et de la grande variété de substances chimiques utilisables, cette dernière approche semble être la plus appropriée.

L'objectif de l'étude est de développer une méthodologie conduisant à l'obtention d'un capillaire « coaté » de manière dynamique, permettant la détermination des constantes d'association des complexes formés entre nos composés et la  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$ .

### **3.2.1. Revêtement de capillaire : « Coating »**

Le « coating » covalent est obtenu par dérivation des groupements silanols à la surface du capillaire. Le « coating » dynamique correspond à l'utilisation de polymères adsorbés physiquement sur le capillaire. Il s'agit d'un procédé efficace, rapide et économique pour réduire l'adsorption (Lucy *et al*, 2008 ; Liu *et al*, 2012). Plusieurs polymères, dont le poly-oxyde d'éthylène (PEO), le polydiméthylacrylamide, les dérivés de cellulose et divers polyélectrolytes sont largement utilisés pour la réalisation de « coating » dynamiques afin de réduire l'adsorption. Les polyélectrolytes de haut poids moléculaire ont été décrits et permettent d'obtenir des « coating » uniformes et reproductibles. L'utilisation de polyélectrolytes de charges opposées, additionnées en couches successives dans le capillaire, conduit à une bonne stabilité du coating. En effet, les fortes interactions entre ces différentes couches de polyélectrolytes sont à l'origine d'une meilleure répétabilité des mobilités électroosmotiques (Decher et Schmitt, 1992 ; Dubas et Schlenoff, 1999 ; Castelnovo et Joanny, 2000 ; Dolnik *et al*, 2008).

Le « coating » doit permettre de maintenir un flux électroosmotique élevé et constant de manière à avoir des temps de migration répétables et des temps d'analyse courts. D'après Nehmé *et al* (Nehmé *et al*, 2008), l'utilisation d'un « coating » multicouche cationique (alternance de couches de polyélectrolyte cationique (poly(diallyldiméthylammonium, PDADMAC) et anionique (polystyrène

sulfonate, PSS)) est optimale pour des séparations en présence de cyclodextrines anioniques (HS-CD) à pH 2,5 (Nehmé *et al*, 2009). Dans notre cas, l'utilisation d'une cyclodextrine cationique a orienté notre étude vers un « coating » de multicouches à base de ces mêmes polyélectrolytes mais en appliquant une dernière couche cationique. L'utilisation d'un « coating » cationique semble être la stratégie la plus appropriée pour prévenir l'adsorption de la cyclodextrine cationique (NH<sub>2</sub>-β-CD), grâce à la force de répulsion électrostatique entre la CD et le PDADMAC.

### **Préparation des solutions :**

Afin de réaliser un coating dynamique du capillaire, différentes solutions ont été préparées conformément aux protocoles décrits par Nehmé *et al* (Nehmé *et al*, 2008). Une solution tampon Tris de pH 8,3 a été préparée à partir d'une solution de Tris 20 mM dont le pH a été ajusté par addition d'HCl 1M. La force ionique de la solution tampon a été fixée à 1,5 M par addition de NaCl. Les solutions de PSS et de PDADMAC à 0,2% (m/v) utilisées pour le « coating » du capillaire ont été préparées par dilution des solutions commerciales de PSS et de PDADMAC dans un tampon 20 mM Tris (pH 8,3), de force ionique de 1,5.

Une solution tampon (BGE 1) contenant 74 mM de Tris et 100 mM de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2,5) a également été préparée.

### **Procédure de coating**

La préparation du capillaire « coaté » a été réalisée à 25°C et nécessite le dépôt alternatif de couches de polyélectrolytes cationiques et anioniques. Les étapes de « coating » sont donc :

- 1- Rinçage à l'eau (2 min, 20 psi)
- 2- Rinçage par la solution de polyélectrolyte cationique PDADMAC 0,2 % (10 min, 20 psi)
- 3- Rinçage par BGE 1 (2 min, 20 psi)
- 4- Rinçage par la solution de polyélectrolyte anionique PSS 0,2 % (10 min, 20 psi)
- 5- Rinçage au BGE 1 (2 min, 20 psi)

Dans le cas de la préparation d'un capillaire « coaté » par une série de couches de polymères cationiques et anioniques, il est nécessaire de répéter les étapes 2, 3, 4 et 5 pour chaque couche de polyélectrolyte ajoutée. Dans notre cas, les étapes 2, 3, 4 et 5 ont été répétées deux fois afin d'obtenir deux bicouches puis les étapes 2 et 3 ont une dernière fois été réalisées afin d'obtenir un

capillaire « coaté » 5 couches successives. Enfin, le « coating » est stabilisé par application d'un voltage de 10 kV en présence de BGE 1 pendant 10 minutes (Nehmé *et al*, 2008).

### **Conditions de stockage et de régénération du capillaire « coaté »**

Un rinçage à l'eau en appliquant une pression de 20 psi pendant 10 min est réalisé avant de stocker le capillaire dans l'eau. Lors de la réutilisation du capillaire, celui-ci doit être régénéré par un rinçage successif à l'eau (5 min, 20 psi), au BGE 1 (5 min, 20 psi), puis un voltage de 10 kV est appliqué pendant 10 min. Les conditions expérimentales sont données tableau 16.

### **Conditions expérimentales pour l'étude des complexes** (tableau 16)

<b>Capillaire en silice fondue « coaté » cationique L = 50,2 cm, l = 40 cm, d.i. = 50 µm (5 couches)</b>	
<b>Température d'analyse</b>	25 °C
<b>Tension appliquée</b>	15 kV
<b>Electrolyte de séparation</b>	tampon phosphate 67 mM, pH 7,4 (BGE 2)
<b>Injection hydrodynamique</b>	Cathodique 5 s, 0,5 psi
<b>Marqueur de flux</b>	DMSO
<b>[analyte]</b>	28 µM (0,3% DMSO)
<b>Longueur d'onde de détection :</b>	201 nm

**Tableau 16 :** Conditions expérimentales utilisées pour l'étude de complexation en EC.

### **3.2.2. Evaluation de la performance du « coating »**

L'évaluation de l'efficacité du « coating » consiste à mesurer et comparer la valeur du flux électroosmotique dans un capillaire avant et après utilisation d'un tampon contenant de la NH<sub>2</sub>-β-CD. L'obtention d'un flux électroosmotique élevé et surtout stable est le témoin d'une adsorption minimale de la NH<sub>2</sub>-β-CD sur le capillaire.

Le flux électroosmotique a été évalué en réalisant des injections cathodiques successives de DMSO (marqueur neutre, n = 10) dans un capillaire rempli de l'électrolyte de séparation (BGE 2) en absence de CD. La mobilité électroosmotique étant stable ( $\mu_{\text{eof}} = -0,011 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et répétable (CV = 0,20 %, n = 10), cela a permis de conclure quant à la stabilité du coating. Notons que le flux

électroosmotique avec un « coating » cationique est inversé par rapport à un capillaire de silice vierge et sa mobilité  $\mu_{eof}$  est supérieure à celle calculée dans le cas d'un capillaire non coâté à pH 7,4.

Des expériences similaires ont été réalisées avec un capillaire rempli de l'électrolyte de séparation contenant 20 mM de  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$ . On constate que la valeur du flux électroosmotique reste inchangée ( $\mu_{eof} = -0,012 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Toutefois une chute de la répétabilité est observée (CV = 4,6%) en raison de l'adsorption résiduelle de la CD sur la paroi du capillaire. Afin d'améliorer la répétabilité du flux électroosmotique, un « coating » intermédiaire, incluant des procédures de rinçage entre chaque injection a été réalisé afin de régénérer la dernière couche cationique. Avant chaque injection, la procédure de rinçage est devenue la suivante :

- 1- Rinçage à l'eau (0,5 min, 20 psi)
- 2- Rinçage par BGE 1 (1 min, 20 psi)
- 3- Rinçage par la solution de polyélectrolyte cationique PDADMAC 0,2% (2 min, 20 psi)
- 4- Rinçage au BGE 2 (2 min, 20 psi)

Avec cette procédure, le flux électroosmotique mesuré ( $\mu_{eof} = -0,014 \text{ cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ , CV = 0,18 %, n = 10) dans un capillaire rempli de l'électrolyte de séparation contenant 20 mM de  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$  est stable. Ainsi, le « coating » 5 couches cationiques optimisé a donc pu être utilisé lors des études de complexation.

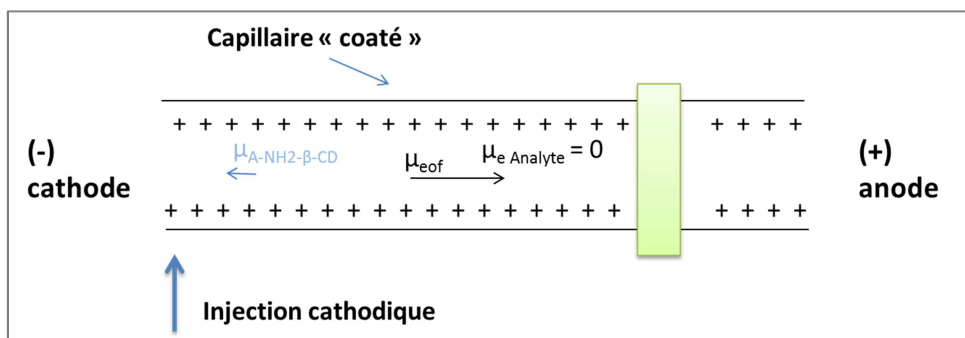
### 3.2.3. Etude qualitative de la complexation

Nous avons étudié la complexation de 4 composés : Alica 87, Alica 76, Alica 94 et Alica 23, se différenciant par la substitution au niveau du carbone asymétrique, avec la  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$ .

#### Préparation des solutions :

Comme pour l'étude de complexation en RMN, nous avons préparé différentes solutions de concentration croissante en CD dans le tampon BGE 2 ( $[\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}] = 20, 30, 40 \text{ et } 50 \text{ mM}$ , tampon phosphate 67 mM, pH 7,4). La concentration en analyte (28  $\mu\text{M}$ ) reste constante et négligeable par rapport à celle des CDs.

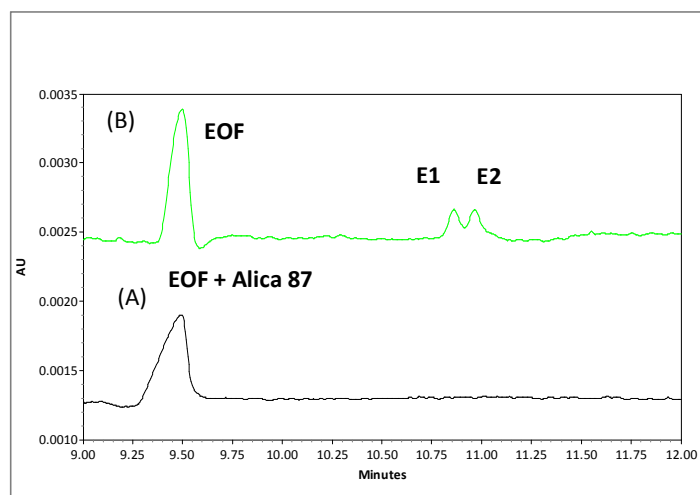
L'injection des composés est réalisée à la cathode, la figure 35 représente le schéma de migration prédictif des espèces dans les conditions d'analyse.



**Figure 35 :** Schéma de la migration des espèces dans les conditions expérimentales de l'étude de complexation (coating 5 couches, pH 7,4).

### Etude de l'interaction

Lors de l'addition de la NH<sub>2</sub>-β-CD dans le BGE, une prise en charge des composés par la CD est observée. En absence de NH<sub>2</sub>-β-CD dans le BGE, l'Alica 87 co-migre avec le flux électroosmotique comme observé sur l'électrophérogramme (figure 36, (A)).



**Figure 36 :** Electrophérogramme de l'Alica 76, (A) en absence de NH<sub>2</sub>-β-CD, (B) en présence de 20 mM de NH<sub>2</sub>-β-CD, BGE 2, pH 7,4

Lors de l'ajout de NH<sub>2</sub>-β-CD dans le tampon, l'Alica 87 subit un phénomène de pseudorétention, et migre respectivement à 10,82 min (énantiomère 1) et 11,02 min (énantiomère

2), (figure 20, (B)). Un phénomène similaire a été observé pour les composés Alica 76, Alica 23 et Alica 94, ce qui prouve l'interaction des composés avec la CD.

Pour les quatre composés étudiés, quelle que soit la concentration en  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$  dans le tampon, une amorce de séparation entre les énantiomères est observée. Même si une interaction est visible lors de l'addition de concentrations croissantes en  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$  (de 1 mM à 40 mM), seules de faibles augmentations des temps de migration sont obtenues ( $\Delta t_m < 0,6$  min). Ces faibles variations des mobilités électrophorétiques ne permettent pas de déterminer la constante de complexation de ces composés avec la CD. Néanmoins, l'analyse qualitative permet de suggérer que le composé détecté en premier dans ces conditions de « pseudorétention » est moins affin pour la  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$ .

En conclusion de l'étude de complexation des composés avec la  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$ , l'évolution des temps de migration en fonction de la concentration en CD dans l'électrolyte de séparation a permis de montrer une interaction entre les composés et la  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$ . De plus, cette interaction est suffisante pour permettre une énantiomérisation partielle de cette série de composé. Cependant, les constantes de complexation des quatre composés étudiés n'ont pas pu être déterminées.

#### **4. Comparaison des deux techniques pour l'étude des complexes**

L'EC et la RMN ont permis d'identifier et de caractériser la présence d'interactions entre les CDs et les composés étudiés. Par RMN, les constantes de complexation de huit complexes (Alica 87/ $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$ , Alica 76/ $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$ , Alica 87/ $\beta\text{-CD}$ , Alica 87/ $\gamma\text{-CD}$ , Alica 87/HP- $\beta\text{-CD}$ , Alica 87/Me- $\beta\text{-CD}$ , Alica 76/ $\beta\text{-CD}$  et Alica 203/ $\beta\text{-CD}$ ) ont pu être déterminées. Par RMN, l'étude plus complète menée pour le complexe Alica 87/ $\beta\text{-CD}$  a permis en plus de déterminer sa constante d'association, de déterminer sa stœchiométrie et d'obtenir des informations sur sa structure.

Les études menées en EC ont permis de mettre en évidence une interaction entre les composés et la  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$ . Cependant en raison de la variation non significative des mobilités électrophorétiques, l'interaction entre les composés et la CD n'a pas pu être quantifiée.

D'un point de vue qualitatif, les résultats obtenus selon les deux techniques sont en accord. En effet, en EC, l'énantiomère E1 à un temps de migration plus faible que l'énantiomère E2, et comme la  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$  est dans des conditions de « pseudorétention », on peut en déduire que l'énantiomère E1 est moins affin pour la CD que l'énantiomère E2, ce qui est en accord avec les constantes d'association obtenues en RMN pour les deux énantiomères.

Les avantages et inconvénients des deux techniques utilisées pour l'étude des complexes analytes/CD sont présentés dans le tableau 17.

	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>RMN</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Informations structurales (RMN 2D)</li> <li>-Stœchiométrie</li> <li>-Etude de complexation possible entre une CD neutre et un composé neutre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Consommation élevée en analyte et en CD.</li> <li>-Concentration en analyte élevée et recours à un pourcentage important de solvant organique (pour la solubilisation).</li> </ul>
<b>Electrophorèse Capillaire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Consommation en analyte et en CD très faible</li> <li>-Pourcentage faible de solvant organique dans l'échantillon (pour la solubilisation).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Nécessité d'avoir un des deux partenaires de l'interaction chargé</li> <li>-Adsorption possible des CDs sur le capillaire (étape supplémentaire de « coating » obligatoire)</li> </ul>

**Tableau 17** : Avantages et inconvénients de la RMN et de l'électrophorèse capillaire lors de d'étude de complexation.



# CHAPITRE 3 : Développement de méthodes séparatives chromatographique et électrophorétique pour la séparation des énantiomères de dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles

---

## I. Introduction

La nécessité de générer des énantiomères purs est une priorité dans la recherche pharmaceutique. En effet, de nombreux processus biologiques ont un degré élevé de stéréosélectivité, soulignant des différences dans les profils toxicologiques et pharmacologiques des énantiomères. Pour cette raison, l'étude des activités biologiques et des effets de chaque énantiomère est une étape importante dans le processus de développement de « principes actifs ». Il existe deux approches courantes pour obtenir des énantiomères purs : la synthèse asymétrique de l'énantiomère désiré et la séparation des énantiomères. Bien que la synthèse asymétrique soit le principal choix quand de grosses quantités sont en jeu, deux synthèses indépendantes sont nécessaires pour l'obtention des deux énantiomères purs (catalyseurs asymétriques). Parmi les différentes méthodes les plus communes pour séparer les énantiomères (recristallisation, résolution enzymatique ou chromatographie), les techniques de chromatographie à l'échelle préparative sont les plus souvent utilisées dans le développement pharmaceutique (Francotte, 2001 ; Andersson et Allenmark, 2002). La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est la technique de séparation chirale la plus répandue depuis les années 1980 (Subramanian *et al*, 1994, Tachibana *et al*, 2001 et Andersson *et al*, 2003). Récemment, la chromatographie en phase supercritique (CPS) recueille un regain d'intérêt et devient une technique de premier choix pour l'étude des séparations chirales. L'instrumentation relative à la CPS sera brièvement exposée dans ce chapitre.

L'objectif de ce chapitre est la préparation d'énantiomères optiquement purs. L'obtention des deux énantiomères purs va permettre de déterminer l'affinité de chaque énantiomère pour divers isoformes de l'anhydrase carbonique par résonance plasmonique de surface. Dans ce contexte, les performances des techniques CLHP et CPS ont été étudiées, puis les énantiomères issus des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles ont été isolés. Le contrôle des puretés énantiomériques a été effectué par ces mêmes techniques analytiques mais aussi en utilisant l'électrophorèse capillaire avec des cyclodextrines comme agents chiraux.

## 1. Chromatographie en phase supercritique (CPS)

Klesper *et al* (Klesper *et al*, 1962), ont été les premiers à proposer l'utilisation de fluides supercritiques comme éluants pour les séparations chromatographiques en 1962. L'état supercritique est un état physico- chimique d'une substance qui se produit lorsque la température et la pression sont au-dessus du point critique thermodynamique, comme représenté sur la figure 37 (Carey *et al*, 2006).

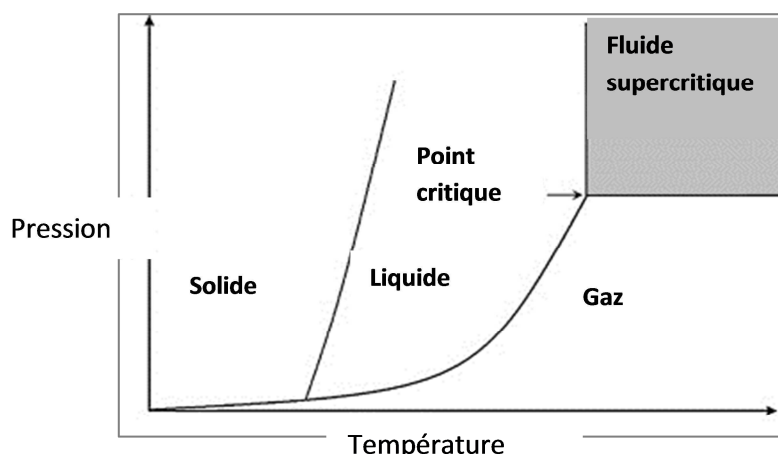


Figure 37 : Diagramme de phase d'une substance neutre.

Un fluide supercritique possède des caractéristiques uniques par rapport à l'état liquide ou gazeux. Sa densité est supérieure à l'état gazeux, ce qui implique que le fluide supercritique a un pouvoir de solvation élevé ; sa viscosité est plus faible et sa diffusivité est supérieure à l'état liquide, ce qui induit une pression inférieure et une circulation plus rapide à travers une colonne (Wang *et al*, 2011).

En CPS, le dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) est utilisé presque exclusivement comme éluant (Wang *et al*, 2001 ; Smith *et al*, 1999). Le point critique du  $\text{CO}_2$  est à une température de  $31^\circ\text{C}$  et une pression de 73 bars. Au-dessus de ce point, le  $\text{CO}_2$  est sous forme supercritique, sa faible viscosité et sa grande diffusivité permettent de travailler à de hauts débits, réduisant ainsi les temps d'analyse.

Bien que le  $\text{CO}_2$  supercritique ait un pouvoir de solvation élevé, la plupart des molécules pharmaceutiques sont modérément polaires et le  $\text{CO}_2$  seul ne permet pas une élution satisfaisante de ces analytes. Le  $\text{CO}_2$  a une force d'élution approximativement égale à l'hexane (Berger *et al*, 1992 ;

Deye *et al*, 1990). Dans la plupart des cas, un modificateur polaire tel que le méthanol doit être ajouté (Smith *et al*, 1997). D'autres modificateurs comme l'éthanol, l'isopropanol et l'acétonitrile sont couramment utilisés. Notons que dans la plupart des cas, l'addition d'un modificateur organique entraîne des conditions de fonctionnement dites « sous-critiques ». Cependant même dans ces conditions, de nombreux avantages décrits précédemment sont encore notables (Miller *et al*, 2012).

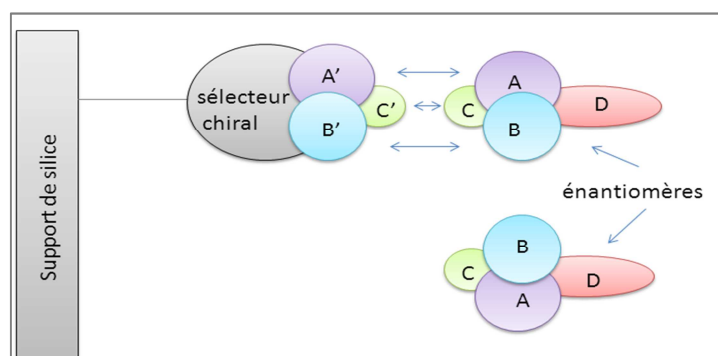
L'augmentation de la vitesse de la phase mobile en CPS a beaucoup moins d'impact sur l'efficacité qu'en CLHP en raison de la faible viscosité. L'augmentation des débits se traduit souvent par des productivités plus élevées par rapport à la CLHP. La productivité accrue permet de purifier des composés dans un laps de temps plus court, ce qui réduit le temps requis pour obtenir des composés purs.

## **2. Séparation chirale par chromatographie**

Le principe de séparation des énantiomères repose sur la formation de diastéréoisomères dans un environnement chiral. Deux approches différentes permettent le dédoublement des énantiomères par la formation de diastéréoisomères : la méthode indirecte qui nécessite la dérivation des énantiomères avant leur analyse et la méthode directe qui consiste en la formation de diastéréoisomères labiles entre les énantiomères et le sélecteur chiral. La deuxième approche étant la plus souvent utilisée tant à l'échelle analytique que préparative, et du fait de l'existence d'une grande variété de phases stationnaires chirales (PSC) différentes permettant la séparation chirale de nombreux composés, cette dernière a été choisie pour notre étude.

## **3. Phases stationnaires chirales**

Il existe un nombre important de phases stationnaires chirales (PSC) commercialement disponibles. Dans la plupart des cas, le sélecteur chiral est greffé ou déposé sur un support de silice. La stéréosélectivité provient de la différence de stabilité des complexes formés entre le sélecteur chiral et chaque énantiomère. La règle des trois points d'interaction, dite règle de Dalgliesh, mentionne que deux énantiomères seront séparés s'ils forment au moins trois interactions simultanées (AA', BB', CC') entre le sélecteur chiral et l'énantiomère et dont l'une d'entre elles est stéréosélective (figure 38). Cette règle est assez restrictive puisqu'elle ne s'applique que pour des interactions bimoléculaires et ne tient pas compte des changements de conformation des deux entités en fonction de la nature du milieu de solubilisation (De Klerck *et al*, 2012).



**Figure 38** : Modèle des trois points d'interaction de Dalgliesh.

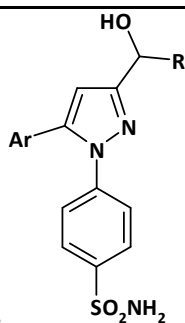
En raison de leurs nombreux avantages, les PSC de type polysaccharidiques ont été choisies pour cette étude. Les PSC polysaccharidiques sont des polymères linéaires naturels ou synthétiques et comptent parmi les sélecteurs chiraux qui permettent la séparation d'un grand nombre de composés. Elles présentent, en plus de nombreux centres asymétriques, des cavités chirales. Les PSC polysaccharidiques possèdent de nombreux avantages en termes d'efficacité, de reproductibilité, de capacité de surcharge (lors d'étude à l'échelle préparative, ce paramètre est à prendre en considération) et de coût (Francotte *et al*, 2001).

## II. Etudes expérimentales

### 1. Optimisation des séparations chirales à l'échelle analytique

#### 1.1. Analytes étudiés

Les séparations analytiques des énantiomères de sept inhibiteurs de l'anhydrase carbonique, dont les structures sont présentées tableau 18, ont été menées à la fois en CLHP et en CPS. La technique la plus performante a ensuite permis la séparation préparative de six composés.

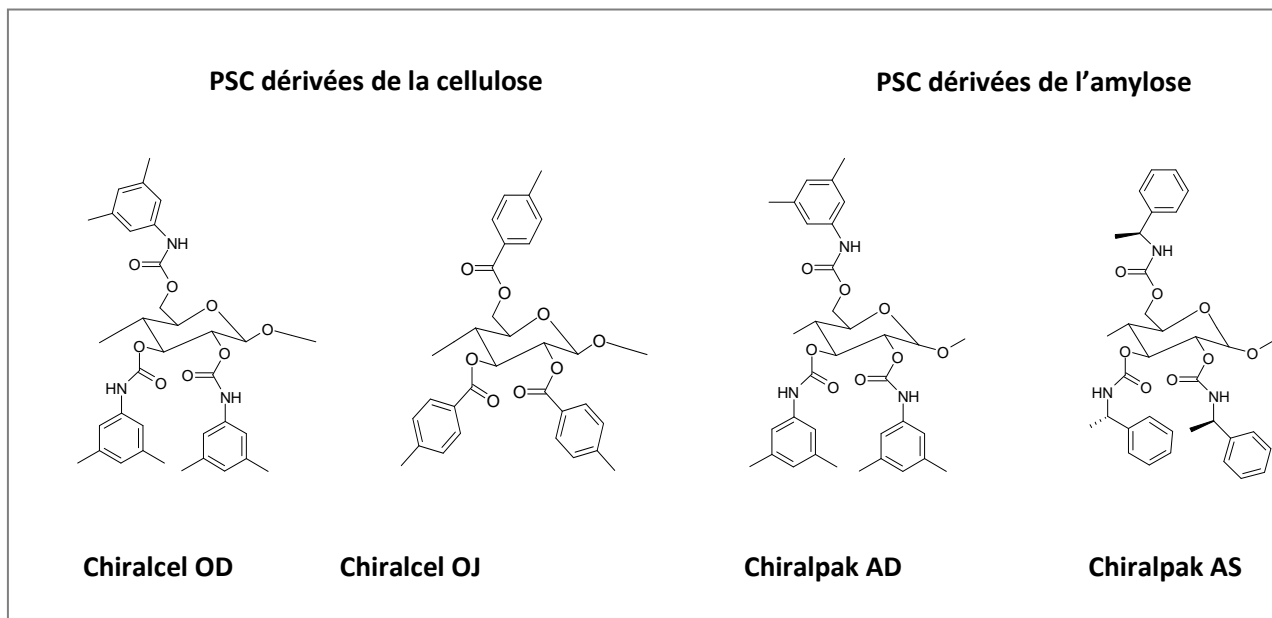


Composés	Ar	R
<b>Alica 87</b>	Phényle	Cycloheptyle
<b>Alica 76</b>	Phényle	Cyclohexyle
<b>Alica 203</b>	Phényle	Cyclopentyle
<b>Alica 94</b>	Phényle	Cyclopropyle
<b>Alica 23</b>	Phényle	Propyle
<b>Alica 15</b>	Phényle	Méthyle
<b>Alica 99</b>	Naphtyle	Cycloheptyle

**Tableau 18** : Composés étudiés à l'échelle analytique.

### 1.2. PSC chirales utilisées

Les PSC polysaccharidiques choisies pour cette étude sont de deux types : celles dérivées de la cellulose et celles dérivées de l'amylose. Quatre de ces PSC sont couramment utilisées et rapportées dans la littérature en raison de leurs performances : les PSC Chiralpak® AD (substituée par un groupement 3,5-diméthylphénylcarbamate) et AS (substituée par un groupement (S)-phényléthylcarbamate), et les PSC Chiralcel® OD (substituée par un groupement 3,5-diméthylphénylcarbamate) et OJ (substituée par un groupement 4-méthylbenzoate) (figure 39). En raison des mécanismes de reconnaissance multiples et complexes (différences de conformation qu'adoptent les polysaccharides en fonction de la nature et de la teneur en modificateur organique dans la phase mobile), il est difficile de prévoir quelle PSC permettra de séparer au mieux les énantiomères d'un composé donné. C'est pour ces raisons que le choix d'une PSC ne peut s'effectuer qu'après avoir effectué un « screening » sur les différentes colonnes.



**Figure 39** : Structure chimique des PSC dérivées de la cellulose et de l'amylose.

Trois PSC polysaccharidiques disponibles au laboratoire à l'échelle analytique ont été utilisées ; leurs caractéristiques sont les suivantes :

- dérivées de la cellulose (Chiralcel<sup>®</sup>) :

**OD**, longueur 25 cm, diamètre intérieur 4,6 mm, granulométrie 10 µm

**OD-H**, longueur 25 cm, diamètre intérieur 4,6 mm, granulométrie 5 µm

- dérivées de l'amylose (Chiralpak<sup>®</sup>) :

**AD-H**, longueur 25 cm, diamètre intérieur 4,6 mm, granulométrie 5 µm

### 1.3. Optimisation des séparations chirales en CLHP

Dans le but de mettre au point les conditions de séparation chirale de nos dérivés, la nature de la phase stationnaire et la composition de la phase mobile ont été étudiées.

La phase mobile est composée d'un mélange d'heptane et d'éthanol. L'étude est réalisée en mode isocratique à une température de 40°C. Le débit est de 0,8 mL/min. Les composés à analyser sont solubilisés dans l'éthanol à 0,5 mM. Dans un premier temps, la détection UV (barrette de diodes) permet de détecter les analytes.

Le composé Alica 87 a été choisi pour illustrer l'optimisation de la séparation chirale à travers le choix de la PSC et les proportions des constituants de la phase mobile.

### 1.3.1. Screening des PSC

Dans un premier temps, une étude de screening de PSC a été réalisée pour la séparation de l'Alica 87 avec une phase mobile contenant 80% d'heptane et 20% de méthanol (tableau 19).

Colonne	Phase mobile	Temps de rétention (min)		Résolution $R_s$
		$tr_1$	$tr_2$	
<b>AD-H</b>	Hept/EtOH (80/20)	31,7	42,8	5,94
<b>OD-H</b>	Hept/EtOH (80/20)	12,8	19,6	4,47
<b>OD</b>	Hept/EtOH (80/20)	11,8	16,2	2,63

**Tableau 19** : Screening des PSC pour la séparation chirale de l'Alica 87.

Le mélange racémique est séparé quelle que soit la PSC testée. L'analyse des temps de rétention et des valeurs de résolution permettent de sélectionner la PSC AD-H pour laquelle la résolution est la plus importante. Les temps de rétention relativement élevés pourront être réduits en utilisant une phase mobile possédant un pouvoir éluant plus important.

### 1.3.2. Optimisation de la phase mobile

L'optimisation de la proportion en modificateur polaire pour le mélange binaire heptane/éthanol afin de réduire le temps de rétention est illustrée tableau 20 pour la PSC AD-H.

Phase mobile (Heptane/Ethanol) (V(%) / V(%))	Temps de rétention (min)		Résolution $R_s$
	$tr_1$	$tr_2$	
<b>80/20</b>	31,7	42,8	5,94
<b>70/30</b>	16,1	20,6	4,98
<b>60/40</b>	11,5	14,4	4,76
<b>50/50</b>	9,0	10,7	3,68

**Tableau 20** : Optimisation de la composition de la phase mobile sur PSC AD-H pour l'Alica 87.

L'augmentation du pourcentage d'alcool dans la phase mobile rend la force d'élution plus grande, conduisant ainsi à une nette diminution des temps de rétention. Notre objectif étant de passer à l'échelle préparative, une phase mobile contenant 50% d'heptane et 50% d'éthanol, et permettant d'obtenir des temps de rétention inférieurs à 11 minutes avec une valeur de résolution supérieure à 2, semble être la plus adéquate pour la séparation énantiomérique de l'Alica 87.

### 1.3.3. Conditions optimisées pour la séparation chirale en CLHP

Comme pour l'Alica 87, les conditions de séparation des différents composés ont été optimisées (nature PSC et composition de la phase mobile) en se fixant des critères de résolution supérieure à 2 et de temps de rétention  $t_r$  courts. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le tableau 21. Seule la séparation chirale du composé Alica 99 n'a pas été satisfaisante ( $R_s < 2$ ) pour envisager la séparation chirale à l'échelle préparative.

Composés	Colonne	Phase Mobile	$R_s$	$tr_2$ (min)
<b>Alica 87</b>	AD-H	Heptane/Ethanol (50/50)	3,68	10,7
<b>Alica 76</b>	AD-H	Heptane/Ethanol (60/40)	3,30	12,9
<b>Alica 203</b>	AD-H	Heptane/Ethanol (60/40)	6,38	13,8
<b>Alica 94</b>	AD-H	Heptane/Ethanol (60/40)	8,97	18,9
<b>Alica 23</b>	AD-H	Heptane/Ethanol (80/20)	2,12	36,9
<b>Alica 15</b>	AD-H	Heptane/Ethanol (80/20)	4,18	32,4
<b>Alica 99</b>	AD-H	Heptane/Ethanol (80/20)	1,51	57,9

**Tableau 21** : Conditions optimales pour la séparation énantiomérique des différents composés, (0,8 mL/min, 35°C).



La colonne AD-H, substituée par des groupements diméthylphénylcarbamate, offre des résultats optimaux pour cette série de composé.

#### 1.4. Optimisation des séparations chirales en CPS

L'étude à l'échelle analytique en CPS a été réalisée pour les sept composés présentés précédemment.

La phase mobile est constituée d'un mélange de dioxyde de carbone à l'état supercritique et d'un modificateur polaire. Deux alcools ont été testés : l'éthanol et le méthanol, dans différentes proportions. Les paramètres tels que le débit, la pression et la température ont également été optimisées. L'étude est réalisée en mode isocratique. Les composés sont solubilisés dans du méthanol à 0,5 mM. Dans un premier temps, la détection UV (barrette de diodes) permet de détecter les analytes.

L'optimisation de la séparation chirale de nos composés a été réalisée paramètre par paramètre.

Comme pour les études en CLHP, le composé Alica 87 a été choisi pour illustrer l'optimisation de la séparation. En fonction des résultats de CLHP, seule la PSC AD-H a été retenue.

##### 1.4.1. Optimisation de la phase mobile

L'influence de la nature et de la teneur en modificateur organique sur la séparation énantiomérique de l'Alica 87 est illustrée tableau 22.

Pourcentage d'alcool	Temps de rétention (min)		Résolution $R_s$
	$tr_1$	$tr_2$	
30% EtOH	3,95	4,53	1,04
20% EtOH	8,55	9,91	1,65
30% MeOH	4,35	5,76	2,62
20% MeOH	9,42	12,8	2,55

Tableau 22 : Etude de la variation de la phase mobile de l'Alica 87, AD-H, 35°C, 150 bars, 3 mL/min.

La diminution du pourcentage d'alcool rend la phase mobile moins polaire, conduisant ainsi à une augmentation des temps de rétention. La résolution est fonction du pourcentage de modificateur organique et du type d'alcool. La meilleure valeur de résolution a été obtenue avec 30% de méthanol en un temps d'analyse court.

Lors de l'optimisation de la phase mobile, un débit de 3 mL/min a été utilisé. Comme la valeur de résolution était supérieure à 2 avec des temps de rétention des énantiomères courts ( $tr_2 = 5,76$  min), il n'a pas semblé judicieux d'étudier la variation du débit de la phase mobile sur ce composé. Un débit de 3 mL/min a alors été jugé optimal pour la séparation des énantiomères de l'Alica 87.

#### 1.4.2. Optimisation de la pression

L'influence de la variation de la pression de CO<sub>2</sub> dans une gamme de 100 à 200 bars sur la séparation des énantiomères de l'Alica 87 est illustrée tableau 23.

Pression CO <sub>2</sub>	Temps de rétention (min)		Résolution R <sub>s</sub>
	tr <sub>1</sub>	tr <sub>2</sub>	
100 bars	4,98	5,94	2,32
150 bars	4,35	5,76	2,62
200 bars	3,97	4,58	2,04

**Tableau 23** : Etude de la variation de la pression de CO<sub>2</sub> de la colonne de l'Alica 87, AD-H, 30% en MeOH, 3 mL/min, 35°C.

On constate que, comme décrit dans la littérature, plus la contre pression est élevée plus la rétention est faible, le temps de rétention  $tr_2$  passe de 5,94 min à 100 bars à 4,58 min à 200 bars. En effet, une pression plus élevée augmente la densité et la puissance de solvation des solvants supercritiques, et donc réduit la rétention du soluté (Wang *et al*, 2013). Cependant, dans la gamme de pression étudiée, la pression a un assez faible impact sur la séparation des énantiomères de l'Alica 87. La résolution maximale ayant été obtenue pour une valeur de 150 bars, cette contre pression a donc été choisie.

### 1.4.3. Optimisation de la température

L'influence de la température sur l'énantiosélectivité a été étudiée entre 25 et 45°C (avec des incréments de 5°C). La température minimale dépend des caractéristiques du système de régulation, tandis que la limite supérieure a été fixée par la température maximale recommandée par le fabricant de la PSC.

Alors que les mécanismes de rétention lors d'études énantiosélectives sont connus pour être affectés par la température, les résultats de l'étude de la variation de la température sur la séparation énantiomérique de l'Alica 87 montrent dans notre cas, que la température n'influence que très faiblement les temps de rétention ( $\Delta t_r < 0,5$  min) et les résolutions ( $\Delta R_s < 0,3$ ). Une température de 35°C a donc été choisie pour notre étude.

### 1.4.4. Conditions optimales pour la séparation chirale en CPS

La séparation chirale des différents composés a été optimisée, les meilleures conditions pour l'ensemble des composés étudiés en CPS sont regroupées dans le tableau 24.

Composés	Colonne	Phase Mobile	Débit	$R_s$	$t_{r_2}$ (min)
Alica 87	AD-H	30 % MeOH	3 mL/min	2,62	5,76
Alica 76	AD-H	30 % MeOH	2 mL/min	2,60	8,18
Alica 203	AD-H	30 % MeOH	2 mL/min	4,50	11,2
Alica 94	AD-H	30 % MeOH	2 mL/min	2,87	7,55
Alica 23	AD-H	30 % MeOH	3 mL/min	1,88	5,52
Alica 99	AD-H	30 % MeOH	2 mL/min	1,77	23,1

**Tableau 24 :** Conditions optimales pour la séparation énantiomérique des différents composés, (35 °C, 150 bars).

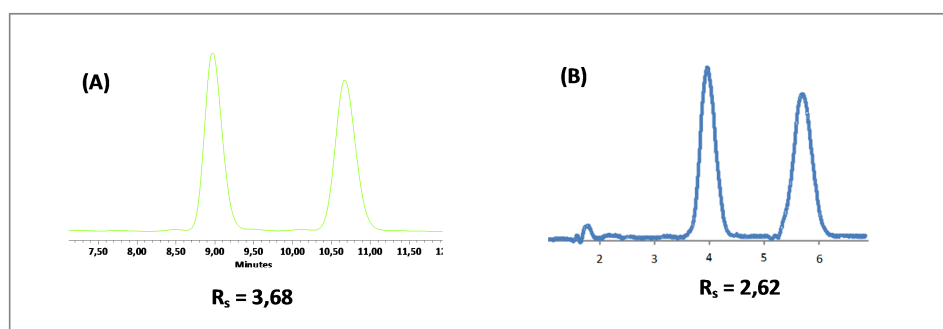
En raison d'une valeur de résolution inférieure à 2, la séparation à l'échelle semi-préparative de l'Alica 99 n'a pas été réalisée.

## 2. Optimisation des séparations chirales à l'échelle semi-préparative

### 2.1. Comparaison CLHP/CPS

La séparation des racémates à l'échelle semi-préparative a pour objectif d'obtenir une quantité de l'ordre du milligramme de composé optiquement pur, afin de pouvoir ultérieurement étudier l'affinité de chacun des énantiomères pour la cible, l'anhydrase carbonique, par résonance plasmonique de surface.

L'objectif de l'étude à l'échelle analytique était de comparer les performances de la CLHP et de la CPS dans le cadre de la séparation énantiomérique de nos dérivés afin de choisir la technique utilisée pour l'échelle semi-préparative. Les chromatogrammes obtenus pour la séparation énantiomérique de l'Alica 87 dans les conditions optimales en CLHP et en CPS sont illustrés dans la figure 40.



**Figure 40** : Chromatogrammes de la séparation énantiomérique de l'Alica 87 dans les conditions optimales décrite dans le tableau X (A) : en CLHP ; (B) : en CPS.

Même si une énantiomérisation légèrement plus faible est obtenue en CPS, en raison des temps de rétention inférieurs, la CPS a été choisie comme technique pour l'étude séparative de notre série de composés.

En effet, en raison de la faible viscosité du fluide supercritique, des débits plus élevés peuvent être utilisés en CPS ; ce qui permet d'obtenir des quantités raisonnables de produit en un minimum de temps. De plus, l'avantage de la CPS préparative *versus* CLHP préparative est l'utilisation minimale de solvant organique. Après l'analyse, le  $\text{CO}_2$  est éliminé par dépressurisation, ne laissant plus que de faibles volumes de modificateur organique à évaporer. Les volumes de solvants organiques globaux sont environ de 2 à 10 fois plus grands en CLHP préparative qu'en CPS

préparative. Enfin, le dioxyde de carbone est moins coûteux et plus sûr (non inflammable, inerte et inoffensif pour l'homme) par rapport à des solvants non polaires tels que l'hexane ou l'heptane utilisés en CLHP. Ainsi, la CPS est considérée comme une technologie verte.

## 2.2. Transposition à l'échelle semi-préparative en CPS

Dans un premier temps, en raison de l'utilisation d'une colonne de diamètre plus important lors du passage à l'échelle semi-préparative, des études de surcharge en concentration et en volume ont été réalisées afin de déterminer la quantité maximale de produit injectable permettant de conserver la qualité de séparation obtenue à l'échelle analytique.

Le passage de l'échelle analytique à l'échelle semi-préparative implique la modification du débit de la phase mobile selon le facteur de transposition K.

$$K = \frac{D_{\text{semi-prep}}^2 \times L_{\text{semi-prep}}}{D_{\text{analytique}}^2 \times L_{\text{analytique}}} \quad (31)$$

Avec

$D_{\text{analytique}}$  : diamètre de la colonne analytique

$D_{\text{semi-prep}}$  : diamètre de la colonne semi-préparative

$L_{\text{analytique}}$  : longueur de la colonne analytique

$L_{\text{semi-préparative}}$  : longueur de la colonne semi-préparative

Cette transposition va permettre de conserver la vitesse linéaire de la phase mobile identique à celle utilisée à l'échelle analytique et donc de garder les mêmes performances de la séparation.

Le facteur de transposition calculé pour la colonne AD-H en CPS est de l'ordre de 5, un débit de 15 mL/min va alors être utilisé à l'échelle semi-préparative. Les conditions sont décrites ci-dessous (tableau 25).

### Remarque :

En CPS, à l'échelle semi-préparative, une pompe additionnelle est ajoutée à la sortie de la vanne de régulation de la pression. En effet, la dépressurisation qui permet d'éliminer le CO<sub>2</sub> présent

dans la phase mobile, entraîne une réduction importante du volume permettant de solubiliser le composé dont la concentration est alors élevée. La solubilité des dérivés étudiés étant faible, du méthanol à un débit de 0,5 mL/min est alors ajouté, permettant de diluer notre échantillon et ainsi éviter une précipitation ou cristallisation dans les tubulures.

	Echelle analytique	Echelle semi-préparative
<b>Caractéristique de la colonne AD-H</b>	25 x 0,46 cm 5 µm	25 x 1 cm 5 µm
<b>Débit</b>	3 mL/min	15 mL/min
<b>Modificateur organique</b>	30 % MeOH	30 % MeOH
<b>Contre Pression</b>		150 bars
<b>Température</b>		35°C
<b>Pompe additionnelle :</b>		
<b>Débit de MeOH</b>	0 mL/min	0,5 mL/min

Tableau 25 : Conditions expérimentales.

### 2.2.1. Etude de la surcharge en concentration

Une étude de surcharge en concentration a été menée en injectant des solutions de concentration croissante (1 à 10 mM) en Alica 87 mis en solution dans du méthanol (figure 41). La boucle d'injection utilisée ici est de 20 µL.

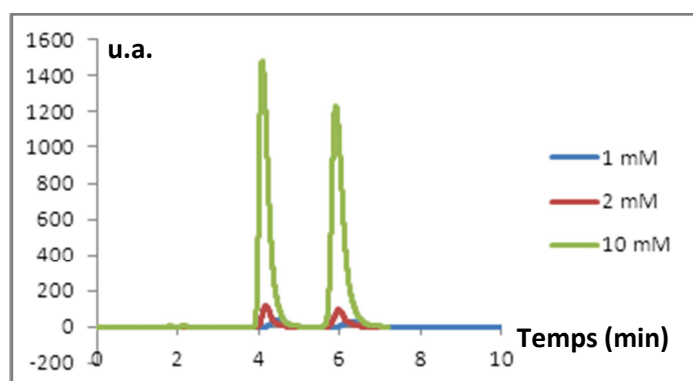
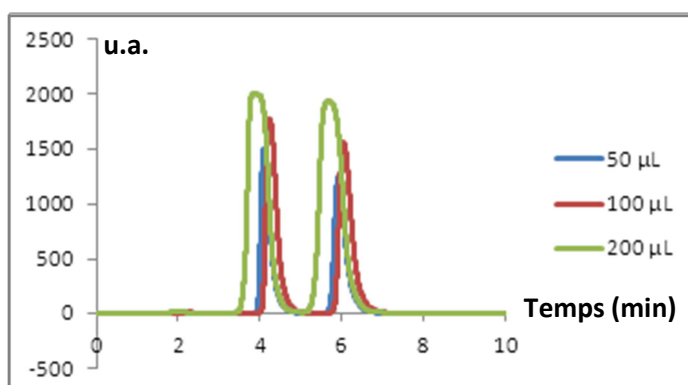


Figure 41 : Chromatogrammes illustrant l'étude de surcharge en concentration en CPS de l'Alica 87, sur colonne AD-H semi-préparative, 30% MeOH, 15 mL/min, 35°C, 150 bars.

Une concentration de 10 mM a été retenue concernant l'Alica 87. La résolution n'est pas affectée de façon significative lors de l'augmentation de la concentration. Une limite de 10 mM est fixée en raison de la solubilité du composé.

### 2.2.2. Etude de la surcharge en volume

Une étude de surcharge en volume a été menée à la concentration définie préalablement à l'aide de boucles d'injection de différents calibres : 20, 50, 100 et 200  $\mu\text{L}$  (figure 42).



**Figure 42 :** Chromatogrammes représentant l'étude de surcharge en volume en CPS de l'Alica 87, sur colonne AD-H semi-préparative, 10 mM MeOH, 30% MeOH, 15 mL/min, 35°C, 150 bars.

La surcharge en volume entraîne un élargissement des pics mais à 200  $\mu\text{L}$  la résolution reste suffisante. Un volume d'injection de 200  $\mu\text{L}$  a donc été choisi pour cette étude.

Les conditions optimales pour la séparation énantiomérique de l'Alica 87 sont décrites ci-dessous (tableau 26).

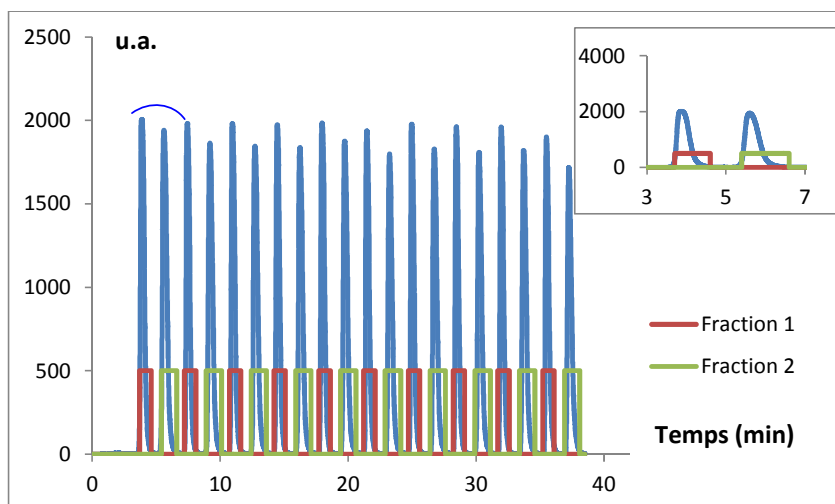
PSC	Débit	PM	[Alica 87]	$V_{\text{boucle}}$	$P_{\text{CO}_2}$	Température	Pompe additionnelle :
AD- H	15 mL/min	30% MeOH	10 mM (MeOH)	200 $\mu\text{l}$	150 bars	35°C	0,5 mL/min (MeOH)

**Tableau 26 :** Conditions optimales de la séparation énantiomérique de l'Alica 87 à l'échelle semi-préparative par CPS.

### 3. Séparation chirale des composés à l'échelle semi-préparative en CPS

#### 3.1. Séparation chirale de l'Alica 87

Afin d'obtenir quelques milligrammes de chaque énantiomère pur, 10 injections successives de 200  $\mu$ L d'Alica 87 à 10 mM dans le méthanol ont été réalisées (figure 43) dans les conditions décrites précédemment.



**Figure 43 :** Chromatogramme représentant 10 injections répétées de l'Alica 87, colonne AD-H semi-préparative, 30% MeOH, 15 mL/min, 35°C, 150 bars.

Après évaporation du méthanol, le produit est obtenu sous forme d'une poudre blanche. Des masses de 2,11 mg et de 2,01 mg ont été récoltées respectivement pour les énantiomères E1 et E2 de l'Alica 87.

#### 3.2. Séparations chirales des dérivés de la série chimique

La séparation des six composés a été réalisée dans les conditions optimales rapportées dans le tableau 27.



Composé	Débit (mL/min)	% MeOH	Concentration (MeOH)	Température	Vbouce (μL)
<b>Alica 87</b>	15	30%	10 mM	35°C	200
<b>Alica 76</b>	15	30%	10 mM	35°C	200
<b>Alica 94</b>	10	30%	10 mM	35°C	400
<b>Alica 23</b>	8	20%	10 mM	35°C	200
<b>Alica 203</b>	10	30%	10 mM	35°C	200
<b>Alica 15</b>	8	30%	10 mM	35°C	100

**Tableau 27 :** Conditions optimales des séparations énantiomériques des six composés à l'échelle semi-préparative, colonne AD-H, 150 bars, pompe additionnelle : 0,5 mL/min (MeOH).

Les masses récoltées et les rendements massiques de séparation du mélange racémique pour les six composés sont rapportés dans le tableau 28.

Composé	Masse récupérée	Rendement de séparation
<b>Alica 87 E1</b>	2,11 mg	84%
<b>Alica 87 E2</b>	2,01 mg	80%
<b>Alica 76 E1</b>	2,25 mg	82%
<b>Alica 76 E2</b>	2,03 mg	78%
<b>Alica 94 E1</b>	2,29 mg	92%
<b>Alica 94 E2</b>	2,32 mg	91%
<b>Alica 23 E1</b>	2,30 mg	92%
<b>Alica 23 E2</b>	2,35 mg	94%
<b>Alica 203 E1</b>	2,09 mg	84%
<b>Alica 203 E2</b>	2,03 mg	80%
<b>Alica 15 E1</b>	1,95 mg	78%
<b>Alica 15 E2</b>	1,90 mg	76%

**Tableau 28 :** Rendements des énantiomères des composés séparés par CPS à l'échelle semi-préparative.

Douze composés optiquement purs avec des rendements supérieurs à 76% ont été obtenus en CPS. Une masse d'environ 2 mg a été obtenue pour chaque énantiomère.

#### 4. Détermination des puretés énantiomériques

Les puretés des isomères ont été évaluées par la mesure des puretés énantiomériques à partir des surfaces des pics chromatographiques.

##### 4.1. Détermination des LD et LQ en CPS

Les valeurs des puretés énantiomériques ont été calculées à l'aide de deux détecteurs distincts : détecteur UV et détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL). Dans un premier temps les valeurs des limites de détection et de quantification ont été estimées pour chaque détection.

La limite de détection est définie comme la concentration en analyte correspondant à un rapport signal sur bruit de 3 ( $S/B = 3$ ), et la limite de quantification est définie comme la concentration en analyte correspondant à un rapport signal sur bruit de 10 ( $S/B = 10$ ).

Des injections de concentrations décroissantes en Alica 87 (2 à 0,625 mM) ont été réalisées dans les conditions optimales décrites précédemment. La hauteur du bruit de fond a été déterminée en injectant du méthanol dans les mêmes conditions.

Les conditions expérimentales utilisées pour la détermination des LD et LQ sont données tableau 29.

<b>Colonne</b>	<b>AD-H</b>
<b>Débit</b>	3 mL/min
<b>Phase mobile</b>	30% MeOH
<b>Température</b>	35°C
<b>Volume d'injection</b>	20 µL
<b>Longueur d'onde de détection</b>	215 nm
<b>Contre Pression</b>	150 bars

**Tableau 29** : Conditions optimales pour la détermination des LD et LQ en CPS.

Plusieurs paramètres, tel que le gain, la température du tube évaporatif, la température du nébuliseur et la pression du gaz nébuliseur peuvent influencer la réponse des analytes. Les paramètres du DEDL en CPS sont une température du tube évaporatif de 35°C et une pression du gaz nébuliseur de 3 bars.

Les limites de quantification et de détection calculées sont données dans le tableau 30. Notons que les limites de détection sont obtenues par extrapolation des limites de quantification calculées.

	LD	LQ
<b>UV</b>	24 µM	80 µM
<b>DEDL</b>	30 µM	100 µM

**Tableau 30** : Limite de détection et de quantification de l'Alica 87 obtenues en CPS avec un détecteur UV ou DEDL.

En CPS, les LD et LQ selon les deux détecteurs utilisés sont comparables et ne nous permettent pas d'améliorer l'intensité du signal.

Dans le but d'améliorer l'intensité de nos signaux, des études comparatives sur la limite de détection ont été étudiées en CLHP.

#### 4.1. Détermination des LD et LQ en CLHP

Les limites de détection et de quantification ont été déterminées en CLHP UV et en CLHP-DEDL selon le même protocole décrit précédemment.

Les conditions expérimentales en CLHP sont donnés tableau 31.

Colonne	AD-H
<b>Débit</b>	0,8 mL/min
<b>Phase mobile</b>	Heptane/Ethanol (50%/50%)
<b>Température</b>	30°C
<b>Volume d'injection</b>	20 µL
<b>Longueur d'onde de détection</b>	215 nm

**Tableau 31** : Conditions optimales pour la détermination des LD et LQ en CLHP.

Les paramètres du DEDL en CLHP sont une température du tube évaporatif de 35°C, une température du nébuliseur de 35°C et une pression du gaz nébuliseur de 2,07 bars.

Les limites de quantification et de détection calculées sont données dans le tableau 32. Notons que comme pour les études réalisées en CPS, les limites de détection sont obtenues par extrapolation des limites de quantification calculées.

	LD	LQ
UV	1,1 µM	3,7 µM
DEDL	4,9 µM	16,4 µM

**Tableau 32 :** Limite de détection et de quantification de l'Alica 87 obtenues en CLHP avec un détecteur UV ou DEDL.

En CLHP, les LD et LQ sont quatre fois meilleures avec un détecteur UV qu'un détecteur DEDL.

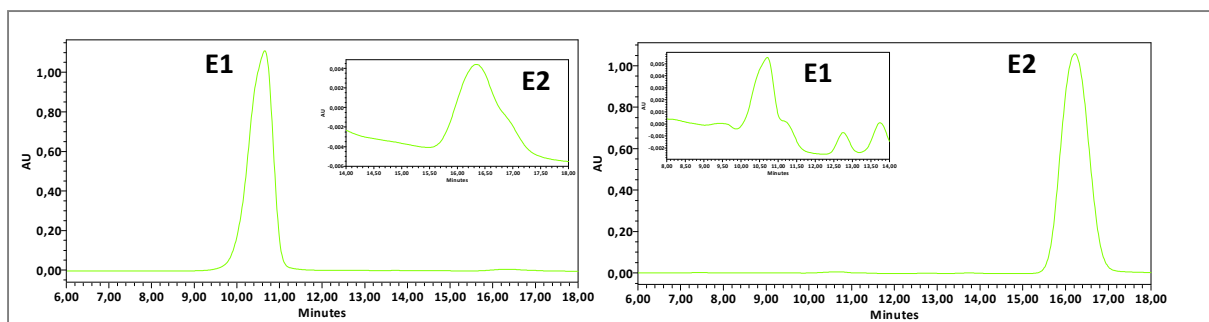
Par comparaison des tableaux 31 et 32, il apparaît que la valeur de la limite de détection UV en CPS est 22 fois plus grande qu'en CLHP. Ces résultats montrent que le détecteur UV utilisé lors des études en CLHP est beaucoup plus sensible que le détecteur UV utilisé en CPS.

Pour nos composés, dont les coefficients d'absorbance molaires sont pourtant faibles, la détection DEDL ne permet pas d'obtenir pour une même concentration, une intensité de signal supérieure à celle obtenue en UV.

Les limites de détection en CLHP-UV étant meilleures, les puretés énantiomériques des douze énantiomères obtenus par CPS semi-préparative ont été déterminées par CLHP-UV.

#### **4.2. Détermination des puretés énantiomériques en CLHP-UV**

Les chromatogrammes des deux énantiomères obtenus après séparation semi-préparative du mélange racémique de l'Alica 87 par CPS sont représentés figure 44.



**Figure 44** : Chromatogrammes des deux énantiomères de l'Alica 87 obtenus par CLHP-UV, AD-H, Heptane/Ethanol (60/40), 40°C, 0,8 mL/min.

Les puretés énantiomériques des énantiomères des six dérivés sont rassemblées dans le tableau 33.

Composé	Pureté énantiomérique
Alica 87 E1	99,3%
Alica 87 E2	99,2%
Alica 76 E1	98,9%
Alica 76 E2	97,1%
Alica 94 E1	99,2%
Alica 94 E2	99,3%
Alica 23 E1	99,1%
Alica 23 E2	99,3%
Alica 203 E1	99,1%
Alica 203 E2	97,3%
Alica 15 E1	99,2%
Alica 15 E2	99,0%

**Tableau 33** : Puretés énantiomériques des énantiomères isolés à l'échelle semi-préparative.

Douze composés optiquement purs ont été obtenus en CPS avec une pureté énantiomérique supérieure à 97,1%, dans tous les cas étudiés, l'impureté déterminée est supérieure à la limite de détection.

Afin de détecter d'éventuelles impuretés non séparées en chromatographie une autre technique séparative, l'électrophorèse capillaire utilisant un mécanisme de séparation différent, a été utilisée pour contrôler la pureté de nos composés.

## 5. Séparation chirale des dérivés par électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique très utilisée dans le domaine des séparations chirales, notamment par addition de sélecteur chiral dans le tampon de séparation, telles que les cyclodextrines (CDs).

Le développement de la méthodologie est illustré par l'optimisation de la séparation énantiomérique de l'Alica 87, puis la méthode optimale a été appliquée pour notre série de composés.

### 5.1. Etudes préliminaires

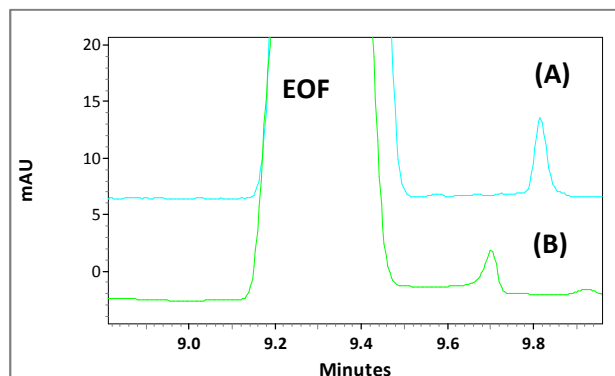
L'électrophorèse capillaire est une méthode séparative basée sur la migration d'espèces électriquement chargées, sous l'effet d'un champ électrique intense. Le  $pK_a$  des composés étudiés étant de l'ordre de 9,5, les analytes sont donc sous la forme neutre à pH physiologique. Puisqu'en séparation chirale, il est nécessaire qu'un des deux partenaires soit chargé, l'étude utilisant des CDs neutres a été réalisée à un pH élevé permettant l'ionisation anionique du composé.

Un tampon borate a été sélectionné afin d'évaluer les qualités de séparation avec six CDs neutres, 3 natives ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD et  $\gamma$ -CD) et les trois dérivées hydroxypropyles (HP- $\alpha$ -CD, HP- $\beta$ -CD et HP- $\gamma$ -CD) à deux concentrations (5 et 10 mM). Les conditions expérimentales utilisées sont décrites dans le tableau 34.

<b>Capillaire en silice fondue</b>	<b>L = 50,2 cm, l = 40 cm, D = 50 <math>\mu</math>m</b>
<b>Température d'analyse</b>	25 °C
<b>Tension appliquée</b>	5 kV
<b>Electrolyte de séparation</b>	tampon borate 5 mM (pH 9,5)
<b>Injection hydrodynamique</b>	Anodique 5 s, 0,5 psi
<b>Marqueur de flux</b>	DMSO
<b>[analyte]</b>	28 $\mu$ M (0,3% DMSO)
<b>Longueur d'onde de détection :</b>	201 nm

Tableau 34 : Conditions expérimentales utilisées en électrophorèse capillaire.

Quelle que soit la nature de la CD ajoutée dans l'électrolyte de séparation, aucune énantiomérisation n'est observée. Cependant, une interaction entre la CD et l'analyte est observée par la variation du temps de migration (figure 45).



**Figure 45 :** Electrophérogrammes illustrant l'interaction de la  $\beta$ -CD pour l'Alica 87, (A) sans CD, (B) avec 5 mM  $\beta$ -CD.

La cavité de la  $\beta$ -CD semble être la plus appropriée pour l'inclusion de l'Alica 87 alors que les cavités de la  $\alpha$ -CD et la  $\gamma$ -CD sont probablement respectivement trop petites et trop larges pour favoriser la complexation.

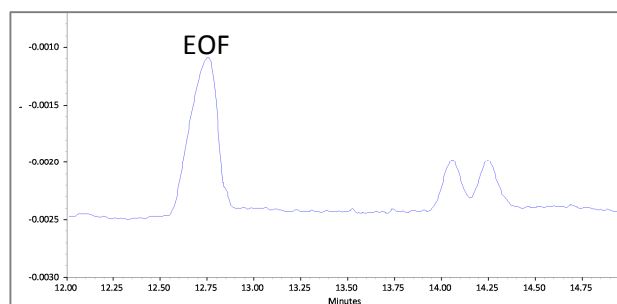
Dans un second temps, comme aucune énantiomérisation n'a été obtenue avec les CDs neutres, nous avons testé la  $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD (CD cationique) dans les mêmes conditions de pH (pH 9,5, tampon borate).

Comme décrit dans le chapitre précédent, la  $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD a tendance à s'adsorber sur le capillaire, engendrant des problèmes de répétabilité et une diminution des capacités de séparation. L'utilisation d'un « coating » cationique 5 couches nous a permis de prévenir l'adsorption de la cyclodextrine cationique ( $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD), grâce à la force de répulsion électrostatique entre la CD et le PDADMAC.

Une gamme de concentrations de 0 à 20 mM en  $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD a été testée. Alors qu'entre 1 et 5 mM, seule une interaction est observée, à 10 mM une énantiomérisation partielle est obtenue ( $R_s = 0,35$ ). Une concentration de 20 mM en CD conduit à une valeur de résolution égale à 0,5, mais l'énantiomérisation reste insuffisante.

Une étude sur les variations de pH de l'électrolyte de séparation a été réalisée. Comme la CD est chargée, l'état d'ionisation du composé n'est pas un facteur limitant pour la séparation des énantiomères. L'étude de l'influence du pH a été réalisée entre 7,2 (le composé est alors 100% sous forme moléculaire) et 9,5 (50% sous forme anionique), en présence de 20 mM de  $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD. Afin de

couvrir la gamme de pH étudiée, deux tampons ont été utilisés : le tampon borate et le tampon phosphate. Une augmentation de la résolution est observée lors de la diminution de pH, mais dans cette gamme de pH, la résolution reste insuffisante (pas de retour à la ligne de base). La meilleure résolution observée est obtenue à pH 7,4 avec un tampon phosphate de concentration égale à 67 mM ( $R_s = 1,04$ ). Le pH 7,4 a donc été choisi dans le cadre de nos études d'optimisation des séparations (figure 46).



**Figure 46 :** Illustration de la séparation énantiomérique de l'Alica 87 à pH 7,4 en présence de 20 mM de  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$ .

Le composé étudié étant neutre à pH 7,4, des études avec une CD anionique ( $\text{HS-}\beta\text{-CD}$ ) ont été réalisées à 10 mM. Malgré la présence d'une interaction ( $\Delta T_m = 1,7$  min), aucune énantioséparation n'a été observée.

Ces résultats préliminaires obtenus par utilisation de CDs neutres ou chargées, montrent une incapacité à obtenir une énantioséparation satisfaisante en utilisant une seule CD (mode mono-CD). Nous nous sommes donc orientés vers un mode dual-CD (système utilisant deux cyclodextrines). Ce système de double CD (mode dual-CD) est souvent utilisé, et consiste le plus souvent en l'association d'une CD neutre et d'une CD chargée permettant l'amélioration de la résolution notamment si les deux CDs ont une influence différente sur la mobilité de l'analyte, par exemple, quand une des CDs accélère, alors que l'autre ralentit l'analyte (Lelievre et Gareil, 1997 (a) et (b) ; Garcia-Ruiz *et al*, 2003 ; Danel *et al*, 2007 ; Servais et Fillet, 2013 ).

Dans le but de déterminer les conditions optimales de la séparation de nos composés, une approche multivariée a été envisagée. En effet, cette approche permet d'optimiser les paramètres de séparation en un nombre minimum d'expériences contrairement à l'étude monovariée (modification d'un paramètre à la fois) (Liu et Kang, 2012). L'utilisation d'une approche multivariée permet d'évaluer l'importance de chaque paramètre ainsi que leur interaction. Cette approche est d'autant plus justifiée dans notre cas qu'une interaction entre les deux cyclodextrines peut être supposée. Nous avons alors choisi d'utiliser un plan composite centré (CCC) afin d'optimiser la séparation



chirale de l'Alica 87 en mode dual-CD. Les conditions expérimentales utilisées sont présentées tableau 35.

<b>Capillaire en silice fondue « coaté » cationique</b>	<b>L = 50,2 cm, l = 40 cm, D = 50 µm</b>
<b>Température d'analyse</b>	15-35 °C
<b>Tension appliquée</b>	15 kV
<b>Electrolyte de séparation</b>	BGE : tampon phosphate 67 mM, pH 7,4
<b>Injection hydrodynamique</b>	Cathodique 5 s, 0,5 psi
<b>Marqueur de flux</b>	DMSO
<b>[analyte]</b>	28 µM (0,3 % DMSO)
<b>Longueur d'onde de détection :</b>	201 nm

**Tableau 35 :** Conditions expérimentales utilisées lors des études préliminaires de la séparation de l'Alica 87.

Avant la mise en place du plan d'expériences, une étude préliminaire a été réalisée afin de choisir les différents facteurs et de déterminer leur domaine d'étude. D'après les premiers résultats, la CD chargée (NH<sub>2</sub>-β-CD) et les CDs neutres (HP-β-CD et β-CD) ont été sélectionnées. Des interactions avec des cyclodextrines avaient été mises en évidence par les variations de temps de migration.

Des solutions contenant la NH<sub>2</sub>-β-CD et la β-CD (ou la HP-β-CD) à différents ratios dans le BGE sont étudiées. Les valeurs de R<sub>s</sub> obtenues pour ces différents mélanges sont indiquées dans le tableau 36.

<b>CD<sub>1</sub></b>	<b>CD<sub>2</sub></b>	<b>Resolution R<sub>s</sub></b>
NH <sub>2</sub> -β-CD (10 mM)	-	0,36
NH <sub>2</sub> -β-CD (20 mM)	-	1,04
NH <sub>2</sub> -β-CD (10 mM)	HP-β-CD (5 mM)	0,31
NH <sub>2</sub> -β-CD (10 mM)	β-CD (5 mM)	0,95
NH <sub>2</sub> -β-CD (20 mM)	β-CD (5 mM)	1,20

**Tableau 36 :** Influence des concentrations en CDs sur la résolution des énantiomères de l'Alica 87.

L'ajout de HP- $\beta$ -CD (5 mM) dans la solution de NH<sub>2</sub>- $\beta$ -CD (10 mM) entraîne une perte de résolution. Par ailleurs, l'addition de  $\beta$ -CD (5 mM) dans la solution de NH<sub>2</sub>- $\beta$ -CD entraîne une augmentation de la résolution ( $R_s$  de 0,36 à 0,95). De plus, pour une concentration en  $\beta$ -CD fixée à 5 mM, une augmentation de la concentration en NH<sub>2</sub>- $\beta$ -CD a entraîné une augmentation de la résolution. La meilleure résolution a été obtenue pour un mélange de 20 mM de NH<sub>2</sub>- $\beta$ -CD et de 5 mM en  $\beta$ -CD ( $R_s= 1,20$ ).

D'après ces résultats préliminaires, la concentration en NH<sub>2</sub>- $\beta$ -CD a été sélectionnée comme premier facteur (gamme de 0 à 20 mM) et la concentration en  $\beta$ -CD comme second facteur (gamme 0 à 10 mM) pour l'approche multivariée. De plus, plusieurs études ont démontré l'intérêt de l'addition de modificateur organique dans le tampon de séparation (Terabe *et al*, 1989) lors de l'optimisation de séparations chirales. En effet, l'addition de modificateur organique peut influencer plusieurs paramètres, comme l'inclusion (compétition entre le soluté et le modificateur organique), la solubilité des énantiomères, et/ou la viscosité du BGE. Trois modificateurs organiques, le méthanol, l'éthanol et l'acétonitrile ont été ajoutés dans le tampon de séparation (5%). Quelle que soit la nature du modificateur organique utilisé, une augmentation des temps de migration a été observée, et pour l'acétonitrile et l'éthanol une perte d'énantioséparation a été observée. Par conséquent, le MeOH a donc été choisi comme le troisième facteur (0-10%) du plan d'expériences.

#### **Choix des facteurs :**

Trois facteurs ont été choisis :

Concentration en NH<sub>2</sub>- $\beta$ -CD (0-20 mM)

Concentration en  $\beta$ -CD (0-10 mM)

Pourcentage de méthanol (0-10%)

#### **Remarque :**

L'effet de la température a été étudié de 15 à 35 °C (par incrément de 5 °C), une température de 15°C a conduit à la plus haute résolution et a été retenue pour le reste de l'étude. La variation du voltage appliqué a été étudiée de 5 kV à 15 kV (par incrément de 5 kV), une diminution des temps de migration associée à une faible variation de la résolution a été observée. Comme le voltage a peu d'influence sur la résolution, ce paramètre n'a pas été utilisé comme facteur du plan d'expérience. Un voltage de 15 kV a finalement été choisi, valeur pour laquelle les temps de migrations sont les plus courts.

Les volumes injectés varient en fonction de la pression et du temps d'injection. La variation de volume injecté n'a pas d'influence significative sur la résolution de l'Alica 87. Nous avons donc décidé d'injecter un volume de 36 nL d'échantillon en appliquant une pression de 0,5 psi pendant 5 s. Ces études préliminaires ont permis de définir les conditions opératoires du plan d'expérience (tableau 37).

<b>Capillaire en silice fondue « coaté » cationique</b>	<b>L = 50,2 cm, l = 40 cm, D = 50 µm</b>
<b>Température d'analyse</b>	15 °C
<b>Tension appliquée</b>	15 kV
<b>Electrolyte de séparation</b>	BGE : tampon phosphate 67 mM, pH 7,4
<b>Injection hydrodynamique</b>	Cathodique 5 s, 0,5 psi
<b>Marqueur de flux</b>	DMSO
<b>[analyte]</b>	28 µM (0,3 % DMSO)
<b>Longueur d'onde de détection :</b>	201 nm

**Tableau 37 :** Conditions expérimentales utilisées lors de la séparation de l'Alica 87 par approche multivariée.

### Choix du plan d'expériences :

Un plan composite centré (CCC) a été choisi pour l'optimisation de la séparation des énantiomères de l'Alica 87 en mode dual CD.

Ce modèle est adapté pour évaluer l'importance de chaque facteur, pour détecter les interactions éventuelles entre les différents facteurs et pour déterminer les conditions optimales grâce à la modélisation de la surface de réponse. Un plan composite centré est composé de deux niveaux factoriels complets (codé +1, -1), d'un point au centre du domaine (codé 0) et de points en étoiles disposés symétriquement sur les axes à une distance  $\alpha$  du centre du domaine (codé +  $\alpha$  (-1,68), -  $\alpha$  (1,68)). Par conséquent, le CCC est caractérisé par cinq niveaux pour chaque facteur (- $\alpha$ , -1, 0, +1, +  $\alpha$ ), comme illustré dans le tableau X. Le CCC a été construit à partir de huit points d'angle, six points axiaux et un point central. Chaque point est répété deux fois et huit répétitions du point central ont été effectuées afin d'évaluer la qualité de l'ajustement du modèle mathématique. Le CCC est alors composé de 36 points, 36 expériences (tableau 38). La conception du plan d'expériences a été réalisée à l'aide du logiciel MODDE<sup>®</sup> programme expérimental statistique (version 2009, Umetrics, Malmö, Suède).

Niveaux	[NH <sub>2</sub> -β-CD] (mM)	[β-CD] (mM)	%MeOH
-α	0,0	0,0	0,0
-1	4,0	2,0	2,0
0	10,0	5,0	5,0
+1	16,0	8,0	8,0
+α	20,0	10,0	10,0

**Tableau 38:** Valeurs des différents niveaux (-α, -1, 0, +1, +α) pour chaque facteur.

## 5.2. Plan d'expériences

La matrice du plan d'expériences et les résultats associés à chaque expérience sont détaillés dans le tableau 39. Les manipulations ont été randomisées. Les réponses étudiées sont les temps de migration et la résolution. Notons que l'optimisation ne portera que sur la résolution.

N°	[NH <sub>2</sub> -β-CD]	[β-CD]	%MeOH	t <sub>M1</sub> (min)	t <sub>M2</sub> (min)	R <sub>s</sub>
1	4,0	8,0	8,0	15,99	15,99	0,00
2	16,0	8,0	8,0	17,07	17,30	1,73
3	10,0	5,0	5,0	15,52	15,71	1,53
4	10,0	5,0	0,0	13,87	14,06	1,48
5	4,0	2,0	8,0	16,69	16,89	0,99
6	16,0	8,0	2,0	14,59	14,6	1,48
7	10,0	5,0	5,0	15,55	15,76	1,98
8	10,0	5,0	10,0	16,91	17,14	1,57
9	20,0	5,0	5,0	16,37	16,65	2,16
10	10,0	10,0	5,0	15,47	15,65	0,97
11	10,0	0,0	5,0	16,70	16,94	1,65
12	16,0	2,0	8,0	17,33	17,59	2,35
13	16,0	2,0	2,0	16,00	16,28	1,94
14	16,0	2,0	8,0	17,58	17,87	2,30
15	10,0	10,0	5,0	15,38	15,55	1,10
16	0,0	5,0	5,0	14,85	14,85	0
17	10,0	5,0	10	16,91	17,14	1,30
18	20,0	5,0	5,0	16,51	16,92	1,87
19	4,0	2,0	8,0	15,54	16,79	1,30
20	4,0	8,0	2,0	15,71	15,71	0
21	16,0	8,0	8,0	17,25	17,52	1,64
22	10,0	5,0	5,0	15,60	15,81	1,86
23	4,0	8,0	8,0	17,12	17,12	0
24	0,0	5,0	5,0	16,17	16,17	0
25	16,0	2,0	2,0	16,12	16,31	2,20
26	4,0	2,0	2,0	14,01	14,22	1,20
27	4,0	2,0	2,0	14,12	14,31	1,42
28	16,0	8,0	2,0	14,52	14,91	1,79
29	10,0	5,0	5,0	15,69	15,87	1,75
30	10,0	5,0	0,0	16,77	17,09	1,43
31	10,0	5,0	5,0	16,42	16,68	1,86
32	10,0	5,0	5,0	15,81	16,02	1,67
33	10,0	0,0	5,0	16,61	16,87	1,75
34	10,0	5,0	5,0	15,48	15,67	1,72
35	10,0	5,0	5,0	15,45	15,66	1,90
36	4,0	8,0	2,0	14,98	14,98	0

**Tableau 39** : Matrice d'expériences et résultats obtenus.

Un polynôme de second ordre a été choisi pour modéliser la surface de réponse de la résolution. Avant de pouvoir utiliser ce modèle quadratique pour prédire la résolution en fonction des différents facteurs, le modèle doit être validé. Quatre indicateurs de performance appelés qualité d'ajustement ( $R^2$ ), pouvoir de prédiction ( $Q^2$ ), validité du modèle et répétabilité sont contrôlés. Toutes les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 40.

Réponse	R <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup>	Validité du modèle	Répétabilité
R <sub>s</sub>	0,92	0,88	0,27	0,93

**Tableau 40** : Indicateurs de performance du plan d'expériences.

R<sup>2</sup> représente la qualité d'ajustement du modèle mathématique, donnée permettant de contrôler que le modèle de régression correspond bien aux données brutes, R<sup>2</sup> doit être supérieure à 0,8. R<sup>2</sup> seul n'est pas un indicateur suffisant pour évaluer la validité du modèle. Une meilleure indication de l'utilité du modèle de régression est donnée par le paramètre Q<sup>2</sup> qui estime le pouvoir de prédiction du modèle mathématique. Il s'agit d'un indicateur de performance qui reflète l'objectif final des prévisions de modélisation. Q<sup>2</sup> doit être supérieur à 0,5. Pour qu'un modèle soit valide, la différence R<sup>2</sup> moins Q<sup>2</sup> doit être inférieure à 0,3. Les valeurs de R<sup>2</sup> et de Q<sup>2</sup> dans notre étude sont de 0,92 et 0,88, respectivement, ce qui indique que le modèle mathématique a un bon pouvoir de prédiction. La validité du modèle permet de vérifier que le modèle de régression choisi est adéquat (quadratique dans notre cas). Le modèle est valide si ce paramètre a une valeur supérieure à 0,25 ; dans notre étude, la validité du modèle est de 0,27.

La répétabilité du modèle permet d'évaluer la variabilité du modèle. Plus sa valeur numérique est élevée (> 0,5), plus l'erreur de répétition est faible. La répétabilité du modèle est de 0,93. Les coefficients de la régression ainsi que leur *p-value* sont répertoriés dans le tableau 41.

Termes de l'équation	Coefficients (p-value)
[NH <sub>2</sub> -β-CD]	0,63 (1,49.10 <sup>-15</sup> )
[β-CD]	-0,34 (2,79.10 <sup>-9</sup> )
[NH <sub>2</sub> -β-CD] <sup>2</sup>	-0,22 (2,67.10 <sup>-6</sup> )
[β-CD] <sup>2</sup>	-0,10 (0,009)
[NH <sub>2</sub> -β-CD][β-CD]	0,17 (0,003)

**Tableau 41** : Valeurs et p-value des coefficients des différents termes de l'équation.

Selon le modèle polynomial du second ordre, la variation de la résolution est illustrée comme suit:

$$R_s = 0,63 [\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}] - 0,22 [\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}]^2 - 0,34 [\beta\text{-CD}] - 0,10 [\beta\text{-CD}]^2 + 0,17 [\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}][\beta\text{-CD}] \quad (29)$$

L'analyse de variance va permettre de comparer la variabilité du système introduite par le modèle de régression par rapport à la variabilité résiduelle due aux erreurs expérimentales, c'est-à-dire d'évaluer la significativité du modèle mathématique au risque statistique de 5%. Comme prévu, les deux concentrations en CD présentent une forte influence sur la résolution (valeur de  $p < 0,05$ ). Cependant la teneur en méthanol n'a pas affecté significativement la séparation (valeur  $p > 0,05$ ). Ce paramètre a donc été supprimé du modèle. Une interaction entre les 2 CDs est obtenue, cela justifie à *posteriori* l'optimisation par plan d'expériences. L'étude des surfaces de réponses permet de visualiser plus facilement l'influence de chaque facteur sur la résolution (figure 47). Le graphique tridimensionnel présente la réponse (résolution) en fonction des concentrations en CD.

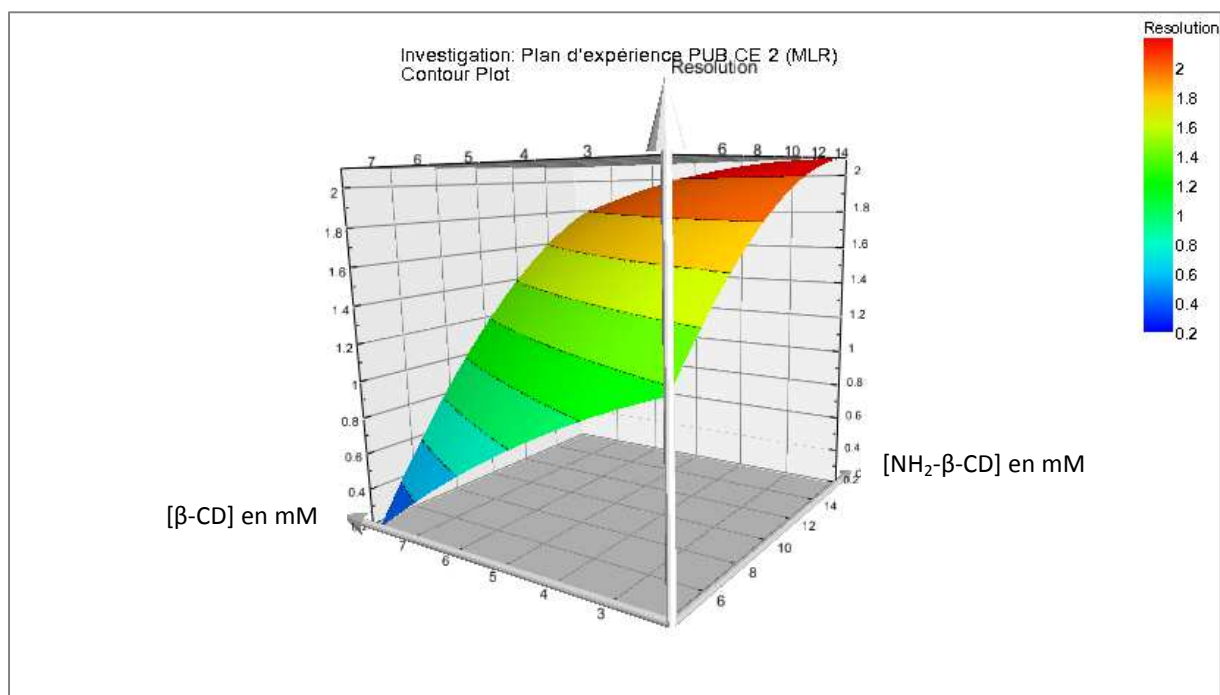
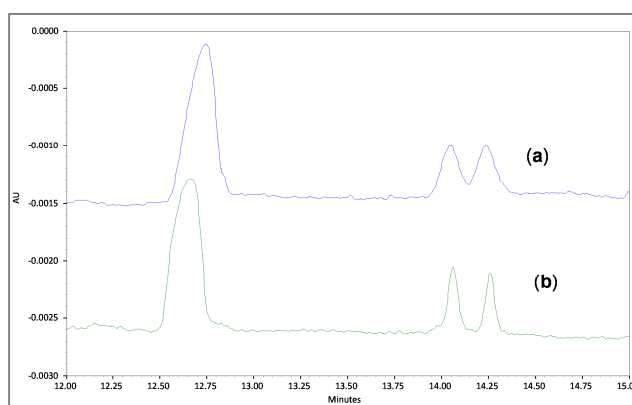


Figure 47 : Surface de réponse de la résolution en fonction des concentrations en CDs.

Les meilleures valeurs de  $R_s$  sont obtenues pour des concentrations élevées en  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$  et faibles en  $\beta\text{-CD}$ .

Le logiciel MODDE nous permet de déterminer les conditions expérimentales optimales à l'énantioséparation de l'Alica 87. Il s'agit d'une concentration en  $\text{NH}_2\text{-}\beta\text{-CD}$  de 16,6 mM, en  $\beta\text{-CD}$  de 2,6 mM et de 0% de MeOH. Le logiciel nous prédit une résolution de 2,10 dans les conditions optimales. Nous avons réalisé la séparation de l'Alica 87 dans ces conditions, une résolution expérimentale proche de celle prédite a été obtenue ( $R_s = 2,08$ ).

La figure 48 montre les électrophérogrammes correspondant à la séparation des énantiomères de l'Alica 87, avant (a) et après (b), l'optimisation des conditions expérimentales.



**Figure 48 :** Electrophérogramme illustrant la séparation des énantiomères de l'Alica 87 avant (a) et après optimisation (b) de la séparation.

Après avoir déterminé les conditions optimales de la séparation chirale de l'Alica 87, nous avons réalisé des études de fidélité de la méthode et de robustesse du « coating ».

### 5.3. Fidélité de la méthode

Afin d'étudier la répétabilité de la méthode optimisée, 10 injections de l'Alica 87 ont été effectuées dans les conditions optimales, un coefficient de variation inférieur à 2% sur la résolution et les temps de migration nous permet de conclure à une bonne répétabilité de notre méthode. De plus, afin d'évaluer la reproductibilité de notre méthode, nous avons comparé la résolution obtenue lors de l'injection de l'Alica 87 dans les conditions optimales obtenue par le plan d'expériences en utilisant trois capillaires différents. Le coefficient de variation obtenu étant inférieur à 4%, nous pouvons conclure à une bonne reproductibilité inter-capillaire.

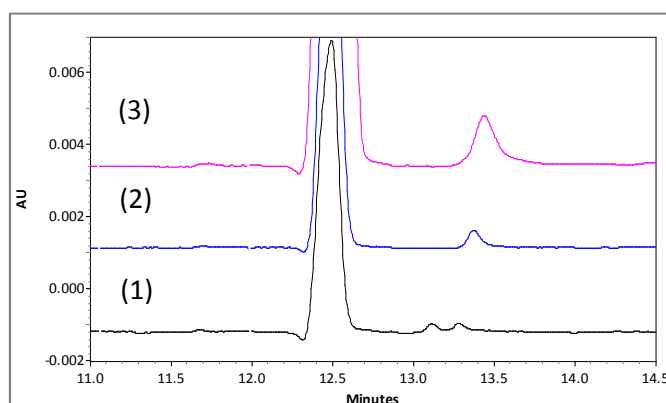


#### 5.4. Robustesse du « coating »

D'autre part, pour tester la robustesse du « coating », nous avons étudié l'influence de la variation de la concentration (0,1 à 0,3% de PDADMAC et PSS) des solutions de polyélectrolyte utilisées lors du « coating ». Dans cette zone de concentration, aucune influence sur les temps de migration ou sur la résolution n'a été observée après 10 injections répétées de l'Alica 87 dans les conditions optimales, ( $CV_{R_s} = 1,9\%$ ,  $CV_{t_m} = 2,5\%$ ). Ces résultats montrent que la méthode de « coating » employée est robuste pour des concentrations en polyélectrolyte comprises entre 0,1 et 0,3%.

L'objectif de cette partie était d'optimiser dans un premier temps la séparation de l'Alica 87 en électrophorèse capillaire. Dans un second temps, nous avons testé les conditions optimales déterminées à l'aide du plan d'expériences sur les mélanges racémiques des autres composés étudiés par CPS.

Malheureusement, excepté pour l'Alica 76 ( $R_s = 1,55$ ), des énantiométries satisfaisantes n'ont pas été obtenues dans ces conditions pour les autres composés de la série (figure 49).

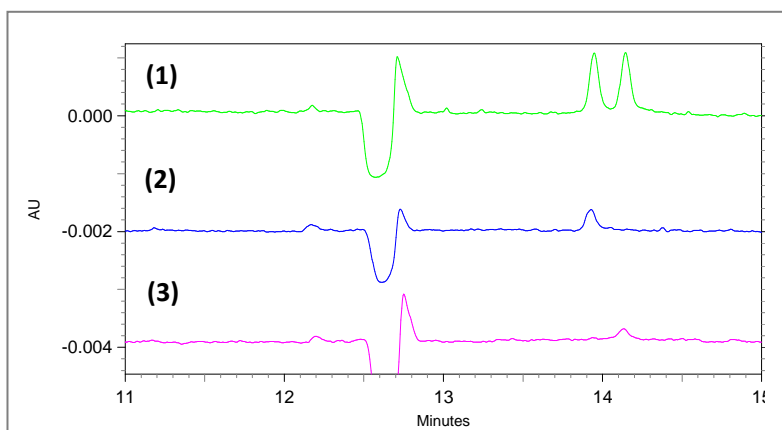


**Figure 49 :** Electrophérogrammes obtenus pour les composés Alica 76 (1), Alica 94 (2) et Alica 23 (3) dans les conditions optimales du plan d'expériences.

#### 5.5. Pureté énantiomérique des composés préparés par CPS semi-préparative

La limite de détection de l'Alica 87 a été déterminée à l'aide du même protocole que celui utilisé lors de la détermination de la limite de détection en chromatographie. Une limite de détection de 5  $\mu\text{M}$  a été obtenue en EC-UV.

Dans le but de contrôler la pureté des énantiomères séparés par CPS, des solutions des énantiomères purs issus du mélange racémique de l'Alica 87 ont été analysées dans les conditions optimales de séparation décrites précédemment. Les électrophérogrammes obtenus pour les énantiomères isolés de l'Alica 87 sont présentés figure 50.



**Figure 50** : Electrophérogramme (1) du mélange racémique d'Alica 87, et (2) et (3) des énantiomères isolés des composés Alica 87 dans les conditions optimales, BGE, pH 7,4.

L'analyse en EC des deux énantiomères de l'Alica 87 purifiés par CPS, dans les conditions optimales permet de déterminer la pureté énantiomérique des énantiomères à la limite de détection près. En effet, l'impureté énantiomérique n'est pas détectée en EC, en raison d'une limite de détection trop faible (5  $\mu$ M).

## CHAPITRE 4 : Etude d'interaction moléculaire pour évaluer l'affinité des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles pour l'AC

---

### I. Introduction

L'objectif de ce travail a été de mettre en place une méthode permettant de déterminer l'affinité d'une série de sulfonamidodiarylpyrazoles pour 3 isoformes de l'anhydrase carbonique (AC II, AC IX et AC XII). Les principales méthodes permettant d'étudier des interactions moléculaires ont été décrites dans le chapitre bibliographique. Trois techniques biophysiques ont été évaluées, la résonance plasmonique de surface, permettant un accès aux paramètres cinétiques, la calorimétrie de titration isotherme, permettant un accès aux paramètres thermodynamiques et la Thermal Shift Assay (TSA). Ces méthodes orthogonales fournissent des données complémentaires sur la protéine cible et sur l'interaction avec l'analyte (Holdgate *et al*, 2010 ; Kemp *et al*, 2012).

### II. Matériels et méthodes

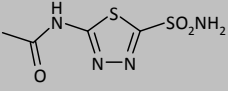
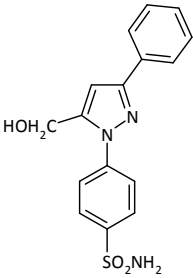
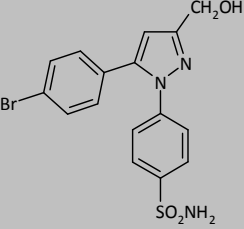
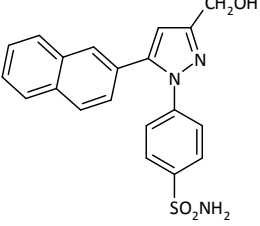
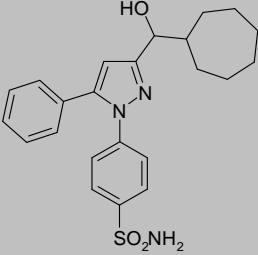
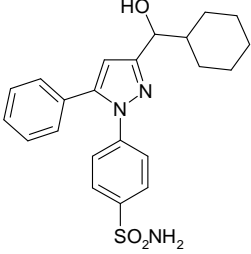
L'optimisation et la validation des méthodes biophysiques, RPS, ITC et TSA ont été mises en œuvre pour l'étude des interactions entre l'anhydrase carbonique bovine de type II et une molécule de référence, l'acétazolamide (AZA) ainsi que trois dérivés sulfonamidodiarylpyrazole originaux. Ceci fera l'objet de la première partie de ces résultats.

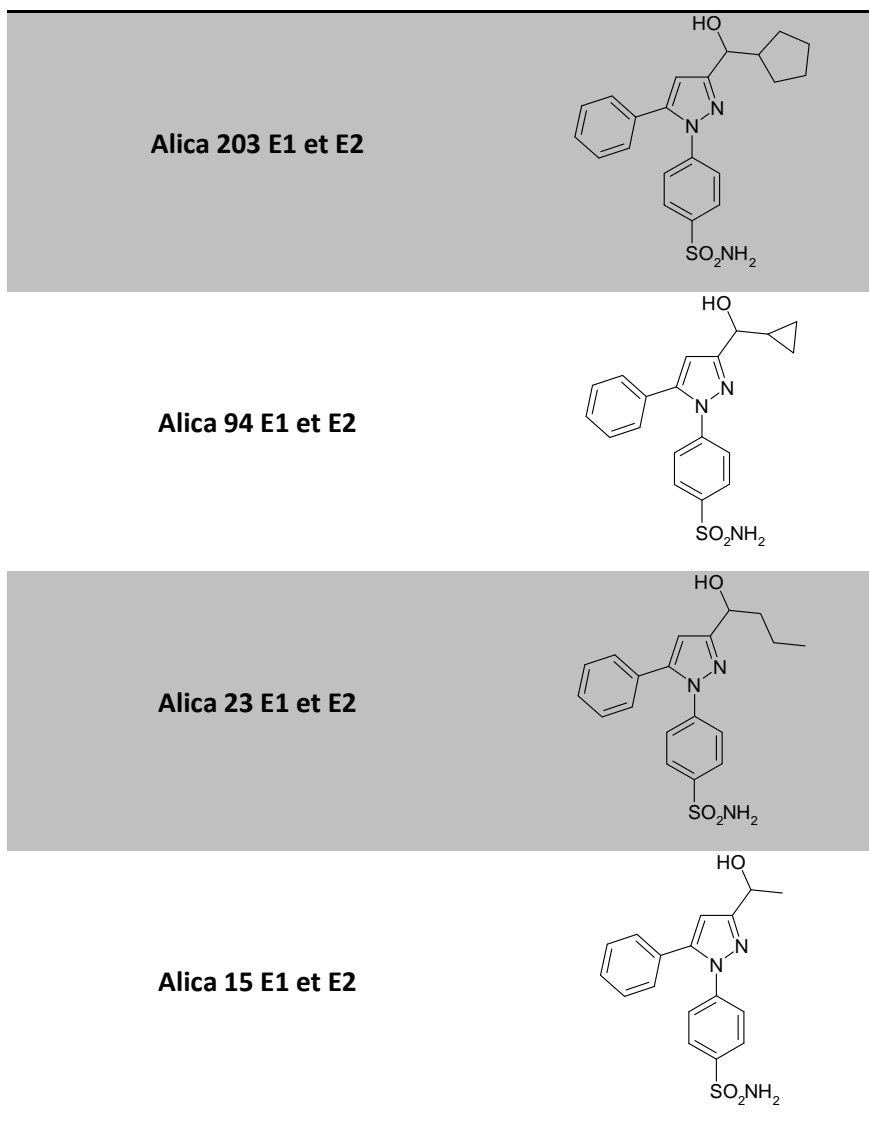
Les performances des méthodes ainsi développées ont été comparées afin de sélectionner la méthode la plus adaptée pour l'étude de l'affinité de notre série de composés avec les trois isoformes de l'anhydrase carbonique humaine (AC II, AC IX et AC XII). Ces travaux seront présentés en seconde partie.

#### 1. Analytes étudiés

Le tableau 42 présente la structure des composés étudiés, à savoir l'acétazolamide et les dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles. Les composés Alica 13, Alipk 177 et Alipk 41 ont été sélectionnés dans la première partie de l'étude (tableau 42). Notons que pour les composés présentant un centre

de chiralité, chaque énantiomère pur obtenu par CPS a été étudié dans la seconde partie de ce chapitre.

Composés	Structure
<b>Acétazolamide</b>	
<b>Alica 13</b>	
<b>Alipk 177</b>	
<b>Alipk 41</b>	
<b>Alica87 E1 et E2</b>	
<b>Alica 76 E1 et E2</b>	



**Tableau 42** : Composés étudiés

E1 : énantiomère 1 et E2 : énantiomère 2, obtenus par CPS

## 2. Protéines étudiées

Dans cette étude, trois isoformes de l'anhydrase carbonique ont été étudiées (annexe 3). L'isoforme II, qui est ubiquitaire, l'isoforme IX et XII qui sont surexprimées dans les cellules cancéreuses et peu présentes dans les cellules saines. L'objectif est de déterminer l'affinité de ces composés pour ces trois isoformes, afin de définir si ces dérivés présentent une sélectivité AC IX *versus* AC II et AC XII *versus* AC II.

### 3. Résonance plasmonique de surface

#### 3.1. Appareil

L'appareil utilisé est un système BIACORE 3000, de la société GEHealthcare (Vélizy-Villacoublay, France), constitué d'un système microfluidique (IFC), d'une sensor chip (lame réactive), de pompes reliées à des seringues de 500 µL permettant l'aspiration des échantillons et du tampon de course, et d'un système de détection, piloté par le logiciel Biacore. Le traitement des données s'effectue à l'aide du logiciel Biaeval.

Avant de débiter une étude, le Biacore 3000 est thermostaté à 298 K. La maintenance classique du Biacore est décrite annexe 3.

Après avoir introduit la lame d'intérêt, plusieurs « primes » sont réalisés avec le tampon de course. Ces « primes » ont pour but d'amorcer les pompes et le circuit microfluidique en tampon de course et de stabiliser la ligne de base du sensorgramme.

#### 3.2. Surfaces réactives

Trois types de lame comportant quatre cellules ont été étudiés au cours de ces travaux :

- une lame de type CM5, lame d'or recouverte de dextran carboxyméthylé fixé de manière covalente à la surface d'or,
- une lame de type CM7, semblable à la lame CM5, avec un degré supérieur de résidus carboxyles et une matrice de dextran plus dense, offrant une capacité d'immobilisation environ trois fois plus élevée. Cette lame est idéale pour des études utilisant des molécules de bas poids moléculaire et des fragments.
- une lame de type streptavidine commercialisée sous le nom de lame CAP, recouverte de dextran carboxyméthylé sur lequel est pré-immobilisé un oligonucléotide simple brin d'ADN permettant l'immobilisation réversible (capture) d'un brin complémentaire d'ADN porteur de la streptavidine.

#### 3.3. Solutions tampons

Des solutions tampons acétate 100 mM, allant d'un pH 3,5 à un pH 6, nécessaires pour l'immobilisation des isoformes de l'anhydrase carbonique sur les lames CM5 et CM7, ont été

préparées par dilution d'une solution d'acétate de sodium 1 M et ajuster au pH par addition de d'acide chlorhydrique 1 M.

Un tampon phosphate (PBS) a été utilisé dans le système microfluidique (tampon de course) pour les études menées sur les lames CM5 et CM7 et un tampon Hepes (HBS-P) a été utilisé à la fois comme tampon d'immobilisation et comme tampon de course pour les études menées sur la lame de type streptavidine :

- Tampon phosphate à 0,2 M, pH 7,4, à 1,5 M en NaCl (PBS 10X) préparé à partir de dihydrogénophosphate de sodium ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), d'hydrogénophosphate de sodium ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) et de chlorure de sodium. Le tampon de course utilisé pour les analyses est un tampon PBS 1X obtenu par dilution du tampon PBS 10X.
- Tampon HBS-P 1X (0,01 M HEPES, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,005% v/v Surfactant P20) obtenu par dilution du tampon HBS-P 10X commercial (GEHealthcare®).

Ces tampons sont filtrés sur membrane (0,45  $\mu\text{M}$ ) et dégazés aux ultrasons pendant quinze minutes.

En raison de la faible solubilité de nos dérivés, les solutions tampons PBS 1X et HBS-P 1X contiennent 1% de DMSO. De plus, en raison de la possible adsorption de l'anhydrase carbonique, du surfactant P20 (GEHealthcare®) a été également ajouté à la solution tampon PBS 1X (0,005% P20).

### 3.4. Préparation des analytes

Une solution mère d'acétazolamide à 10 mM est préparée dans l'eau ultra pure avant d'effectuer des dilutions dans le tampon de course. En revanche, des solutions mères des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles à 10 mM ont été préparées dans le DMSO en raison de leur faible solubilité dans les solutions aqueuses.

Des solutions d'analyte à 10  $\mu\text{M}$  ont ensuite été préparés dans le PBS 1X à 1% de DMSO pour les études avec la CM5 et la CM7 et dans l'HBS-P 1X à 1% de DMSO pour les études avec la lame de type streptavidine. Pour chaque analyte, une série de solutions de concentrations variables ont été injectées sur la surface immobilisée. Les concentrations des solutions étudiées pour chaque analyte seront détaillées dans les paragraphes correspondants.

### 3.5. Préparation des solutions de protéine

#### 3.5.1. Solutions mères :

Dans un premier temps, des solutions mères d'anhydrase carbonique AC II b, AC II h et AC XII h à  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  ont été préparées dans l'eau pour les études sur les lames CM5 et CM7 et dans du HBS-P 1X pour les études sur la lame de type streptavidine.

Dans le cas de l'AC IX h, la solution commerciale (solution à  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) contenant du tampon Tris nous a conduit à réaliser une étape d'élimination du tampon. Le protocole optimisé comporte deux « dessalages » successifs afin de réduire au maximum la quantité résiduelle de Tris. Il est le suivant : dans un premier temps,  $495 \mu\text{L}$  d'eau ultra pure sont ajoutée à  $5 \mu\text{L}$  d'AC IX à  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  et les  $500 \mu\text{L}$  de solutions sont ensuite introduits dans un filtre Amicon Ultra placé dans un premier tube eppendorf et centrifugés pendant 15 minutes à 12000 tours/minutes à  $4^\circ\text{C}$ . Le filtre est introduit dans un nouveau tube eppendorf,  $478 \mu\text{L}$  d'eau sont ajoutés ; l'ensemble est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 12000 tours/minutes à  $4^\circ\text{C}$ . Pour finir, le filtre est retourné dans un nouveau tube eppendorf, centrifugé 2 minutes à 3200 tours/minutes afin de récupérer l'AC IX purifiée. Celle-ci est ensuite stockés à  $4^\circ\text{C}$  pendant 1 nuit afin de laisser le temps à la protéine de se « refolder ». Les  $22 \mu\text{L}$  récupérés sont ensuite dilués pour dans le tampon d'immobilisation pour atteindre une concentration de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### 3.5.2. Solutions filles pour immobilisation

- **Lame CM5/CM7**

Pour une immobilisation sur les lames CM5 et CM7, les solutions mères de protéine sont utilisées pour préparer des solutions de concentration variable en protéine dans les solutions tampons acétate  $0,01 \text{ M}$  de pH allant de 3,5 à 6.

- **Lame de type streptavidine**

Pour une immobilisation sur la lame de type streptavidine, il est nécessaire de biotinyler préalablement l'AC dans la mesure où l'immobilisation met en jeu la formation d'un complexe très stable (constante d'association très élevée de l'ordre de  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ ) entre la streptavidine et le groupement biotine. La procédure de biotinylation consiste à mettre en solution la protéine avec



l'agent de biotinylation pendant environ 16 heures à 4°C dans le tampon HBS-P 1X (choix de la température et du temps de réaction en accord avec la littérature (Papalia *et al*, 2010)). Le protocole de biotinylation pour les deux agents de biotinylation utilisés (sulfo-NHS-biotine et pentylaminebiotine est décrit ci-dessous.

Notons que les ratios molaires AC/agent de biotinylation ont été optimisés pour chacune des isoformes et chacun des agents de biotinylation.

### **3.5.3. Protocole de biotinylation avec le sulfo-NHS-biotine**

Des biotynylations ont été réalisées en utilisant des fractions molaires sulfo-NHS-biotine/AC allant de 0,25/1 à 100/1.

Chaque solution est préparée en mélangeant :

- 10 µL de la solution d'AC à 30 µM dans le tampon HBS-P 2X
- 10 µL de la solution de sulfo-NHS-biotine à différentes concentrations allant de 3 mM à 7,5 µM dans l'eau.

### **3.5.4. Protocole de biotinylation avec le pentylaminebiotine**

Des biotynylations ont été réalisées en utilisant des fractions molaires pentylaminebiotine/AC allant de 1/1 à 1000/1, alors que le ratio molaire EDC/AC est toujours resté fixe à 10000/1.

Chaque solution a été préparée en mélangeant :

- 10 µL de la solution d'AC à 30 µM dans le tampon HBS-P 3 X
- 10 µL de la solution de pentylamine-biotine à 300 µM dans l'eau
- 10 µL de solution d'EDC à 0,3 M

Après la réaction de biotinylation, la solution doit être purifiée sur un système d'ultrafiltration par centrifugation, afin d'éliminer l'agent de biotinylation qui n'a pas réagi. Le protocole de purification a été optimisé. Un cycle de purification se fait selon la procédure suivante :

- Ajout de 480 µL de tampon HBS-P 1X aux 20 µL de solution issue de la réaction de biotinylation\*
- Introduction des 500 µL de solution dans un filtre d'un premier tube
- Centrifugation pendant 15 minutes à une vitesse de 12000 tours/min

- Mise en place du filtre à l'envers dans un second tube
- Centrifugation pendant 2 minutes à 3200 tours/min afin de récupérer l'échantillon concentré

\* En présence de BSA : aux 20  $\mu\text{L}$  issus de solution obtenus après la réaction de biotinylation, ajouter 430  $\mu\text{L}$  de tampon HBS-P 1 X et 50  $\mu\text{L}$  de BSA à 15  $\mu\text{M}$ .

### 3.6. Immobilisation de la protéine

Le taux d'immobilisation de la protéine dépend notamment de la concentration en protéine, du pH, du débit et de la durée d'injection ainsi que de la température. Ces différents paramètres ont donc fait l'objet d'une optimisation pas à pas. Pour chaque isoforme de l'AC, des études à différentes concentrations en protéine, à différents pH (sur lame CM5 et CM7 uniquement), à différents débit et à différentes températures ont été réalisées afin de déterminer les conditions optimales permettant d'obtenir le taux d'immobilisation désiré.

Le suivi du signal en RU obtenu en fonction du temps permet de visualiser en temps réel le taux d'immobilisation de la protéine.

Ci-dessous les protocoles expérimentaux utilisés pour mener à bien l'immobilisation de l'AC.

#### 3.6.1. Immobilisation sur une lame CM5 ou CM7

Après conditionnement de la lame (*c.f.* annexe), l'immobilisation de la protéine comporte 3 étapes :

- Etape d'activation des surfaces réactives (au minimum une cellule de mesure et une cellule de référence) par injection d'un mélange de EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) à 0,4 M et de NHS (N-hydroxysuccinimide) à 0,1 M, à un débit de 10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  pendant 7 minutes.
- Etape de couplage par injection de la solution protéique à 5 ou 10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  pendant 7 minutes au plus (cellule de mesure).
- Etape de désactivation par injection d'une solution d'éthanolamine (1 M, pH 8,5) à un débit de 10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  pendant 7 minutes.

Les concentrations optimales déterminées pour l'immobilisation des différentes isoformes sur les lames CM5 et CM7 sont répertoriées dans le tableau 43.

	CM5	CM7
AC II b	30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	-
AC II h	45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
AC IX h	60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
AC XII h	45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

**Tableau 43 :** Concentrations d'AC optimales pour l'immobilisation des différentes isoformes sur les lames CM5 et CM7.

### 3.6.2. Immobilisation sur une de type streptavidine

L'immobilisation de la protéine biotinylée comporte trois étapes :

- Circulation du tampon de course HBS-P 1X (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% P20, pH 7,4) jusqu'à stabilisation de la ligne de base,
- Injection du réactif de biocapture (streptavidine conjuguée à l'oligonucléotide simple brin complémentaire de l'ADN pré-immobilisé sur la lame) à  $2 \mu\text{L.min}^{-1}$  pendant 5 minutes (étape d'activation de la surface de la cellule de mesure),
- Injection de la solution de protéine biotinylée à 600 nM sur les cellules activées à  $2 \mu\text{L.min}^{-1}$  pendant 30 minutes.

Notons que pour une lame, une cellule est réservée pour servir de référence (aucune immobilisation) et permettre l'évaluation de l'interaction non spécifique.

### 3.7. Protocole d'analyse

Avant de réaliser l'analyse proprement dite de la série de solutions de concentration variable en analyte étudié, cinq injections de tampon de course appelé « tampon de chauffe » ont été réalisées, permettant une stabilisation (ou vérification de la stabilité) du système. Les solutions d'analyte ont ensuite été injectées de manière randomisée et à trois reprises sur la cellule de référence et sur la ou les cellules de mesure (cellule immobilisée). Toutes les dix injections, trois injections de tampon de course ont été réalisées, servant de « blanc » pour l'analyse.

Les conditions opératoires telles que le débit microfluidique, la durée des injections et de la phase de dissociation seront renseignées dans les paragraphes correspondants.

### 3.8. Protocole d'exploitation des résultats

A chaque analyse correspondant à l'étude d'un composé à une concentration donnée, est associée une à quatre courbes de réponse (un à quatre sensorgrammes par cellule), selon le protocole d'injection utilisé.

Dans la majorité des essais réalisés, la cellule Fc 1 a servi de référence permettant l'évaluation de la fixation non spécifique : les différences entre les signaux mesurés sur chacune des trois cellules de mesure (Fc 2, 3 et 4) et la cellule de référence (Fc 1) ont été calculées automatiquement par les logiciels Biacore.

Le logiciel Bieval a ensuite été utilisé afin de retraiter les données brutes ainsi obtenues. Un ajustement en X en Y a tout d'abord été réalisé sur l'ensemble des courbes dans la mesure où un faible décalage des courbes peut être visualisé au début de la phase d'association. Ceci est dû au fait que les différentes cellules sont parcourues en série par les solutions analysées et que le niveau de la ligne de base n'est pas équivalent sur les différentes cellules. Une dernière étape consiste en la soustraction à chacune des courbes précédentes de la réponse obtenue lors de l'injection du tampon de course, ainsi appelé blanc. Ce traitement appelé « double référence » permet de s'affranchir des variations du signal ne relevant pas de l'interaction spécifique entre l'analyte et la protéine.

Les sensorgrammes ainsi obtenus ont été exploités pour calculer les constantes cinétiques d'association  $k_a$  et de dissociation  $k_d$  ainsi que la constante thermodynamique de dissociation  $K_D$ . Dans un premier temps, le type d'interaction mise en jeu a été sélectionné : on définit notamment la stœchiométrie de la réaction et on évalue le phénomène de transfert de masse limitant est mis en jeu. L'ensemble des sensorgrammes obtenus pour différentes concentrations d'analyte sont modélisés simultanément. Notons que les sensorgrammes pour lesquels la saturation est atteinte, c'est-à-dire les courbes superposées pour les concentrations hautes en analyte ne sont pas prises en compte. Le logiciel ajuste les paramètres du modèle mathématique qui décrit la réaction de complexation sélectionnée et qui permettent de faire correspondre au mieux les résultats expérimentaux. Pour réaliser l'ajustement global, le début et la fin de l'injection, la zone correspondant à l'association et celle correspondant à la dissociation doivent être au préalable définis. La qualité de l'ajustement est réalisée à l'aide des paramètres précédents en examinant la répartition homogène des résidus autour de l'axe des abscisses.

Le logiciel utilisé, nous permet également de déterminer la constante thermodynamique de dissociation à l'équilibre  $K_D$  à partir de la réponse moyenne obtenue à l'équilibre, c'est-à-dire à partie

du signal stabilisé sous forme d'un plateau. Ne sont pris en compte que les sensorgrammes obtenus à des concentrations pour lesquelles on a atteint l'équilibre lors de la phase d'association. Rappelons que les concentrations du ligand libre et complexé peuvent être exprimées selon la réponse obtenue à l'équilibre sur les sensorgrammes (c.f. chapitre généralités). On peut de ce fait écrire :

$$K_A = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AL]}{[A][L]} = \frac{R}{C(R_{\max} - R)} \quad (21)$$

$$K_D = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[A][L]}{[AL]} = \frac{C(R_{\max} - R)}{R} \quad (22)$$

Le tracé des variations de la réponse en fonction de la concentration en analyte permet d'obtenir, par ajustement de la courbe selon le modèle d'interaction de type 1:1, la constante thermodynamique de dissociation  $K_D$ .

## 4. Calorimétrie de titration isotherme

### 4.1. Appareil

Le calorimètre utilisé est un ITC<sub>200</sub>, fourni par la société Microcal, constitué de deux cellules identiques placées dans une enceinte adiabatique et d'une seringue qui complète le dispositif. Le volume de la cellule de mesure est de 204  $\mu\text{L}$  et celui de la seringue de 40  $\mu\text{L}$ . Le traitement des données s'effectue à l'aide du logiciel MicroCal Origin 7.0.

### 4.2. Tampon d'analyse

Toutes les expériences d'ITC ont été réalisées avec le tampon PBS 1X (pH 7,4) dégazé 20 min aux ultrasons.

### 4.3. Préparation des analytes

Une solution d'acétazolamide à 240  $\mu\text{M}$  a été préparée directement dans le tampon PBS 1X (1% de DMSO), tandis que des solutions mères à des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles 7 mM ont été préparées dans 100% de DMSO.

#### **4.3.1. Préparation de l'AC II b**

Une solution d'AC II b à 14  $\mu\text{M}$  à 1% en DMSO a été préparée dans le tampon PBS 1X.

#### **4.3.2. Préparation des solutions analysées**

Dans le cas de l'AZA, la solution préparée à une concentration de 240  $\mu\text{M}$  a été directement introduite dans la seringue de l'appareil.

Pour les autres composés, chaque solutions a été préparée dans la solution d'anhydrase carbonique II bovine à 14  $\mu\text{M}$  et introduits dans la cellule de mesure.

### **5. Thermal Shift Assay**

#### **5.1. Appareil**

Les expériences de TSA ont été réalisées sur un appareil de PCR quantitative en temps réel ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems) muni de microplaques de 96 puits. Il s'agit d'un système couplé permettant de faire varier rapidement la température et de détecter une émission de fluorescence. L'appareil mesure ainsi la variation de fluorescence en fonction de la température. Ces mesures ont été réalisées toutes les minutes sachant que la montée en température de 40 à 80 °C est de 1°C/minute (Matulis *et al*, 2005).

#### **5.2. Tampon d'analyse**

La composition de la solution tampon a été étudiée de manière à obtenir des intensités de fluorescence maximales, pour une évaluation précise de  $T_m$  et des valeurs de  $T_m$  reproductibles.

Deux solutions tampon ont été évaluées, le tampon Mes à 100 mM et 400 mM en NaCl, utilisé pour une gamme de pH allant de 5,7 à 6,7 et le tampon Pipes à 100 mM et 400 mM en NaCl, pour une gamme de pH allant de 6,1 à 7,5. Le pH des différentes solutions tampon a été ajusté par ajout de soude 5 M.

Ces solutions tampon sont diluées dans de l'eau ultra pure à 25 mM (1% en DMSO).

### 5.3. Fluorophore : le Sypro Orange

La longueur d'onde d'excitation de la source étant de  $\lambda = 470 \pm 20$  nm, nous avons choisi le Sypro Orange ( $\lambda_{\text{excitation}} = 470$  nm) comme fluorophore dont la variation d'émission de fluorescence dépend de la polarité du milieu.

Le Sypro Orange 5000X commercial est dilué 2,5 fois dans une solution de DMSO afin d'obtenir une solution intermédiaire de Sypro Orange à 2000X dans le DMSO ; cette solution est ensuite diluée dans les différentes solutions tampon utilisées pour l'analyse (tampon Mes ou Pipes) afin d'obtenir des solutions à une concentration de 20X à 1% en DMSO.

#### Remarque :

X est une concentration non communiquée par le fournisseur.

### 5.4. Préparation des analytes

Des solutions mères à 10 mM de composés ont été préparées dans 100% de DMSO, puis diluées dans le tampon Pipes ou Mes afin d'obtenir des solutions en analyte à 40  $\mu\text{M}$  (1% en DMSO).

### 5.5. Préparation de la protéine

Une solution d'anhydrase carbonique II bovine à 1200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a été préparée par dissolution de la protéine dans l'eau ultra pure.

Une solution en AC II b à 600  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans le tampon 25 mM (1% en DMSO) a été préparée à partir de la solution d'AC II b à 1200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  diluée dans le tampon Pipes ou Mes 100 mM et dans de l'eau ultra pure.

### 5.6. Protocole analytique

Un protocole de préparation des échantillons spécifique permet de minimiser les erreurs lors de manipulation. Il comporte deux étapes :

**Etape N°1** : préparation de deux solutions (A) et (B) :

(A) 25 mM en Mes ou Pipes (1% en DMSO) contenant : 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  en AC II bovine, 100  $\mu\text{M}$  en analyte et 10X en Sypro Orange.

(B) 25 mM en Mes ou Pipes (1% en DMSO) contenant : 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  en AC II bovine, et 10X en Sypro Orange.

**Etape N°2** : mélange de différents volumes de solutions (A) et (B) pour un volume total constant égal à 100  $\mu\text{L}$ , de concentration croissante en analyte (0-100  $\mu\text{M}$ ).

20  $\mu\text{L}$  des différentes solutions, sont introduites dans les puits d'une microplaque.

Ces microplaques sont préalablement centrifugées à 2000 tours/min pendant 3 minutes avant chaque analyse.

## 6. Western blot

### 6.1. Préparation des protéines

Les solutions d'AC biotinylées ont été diluées dans du tampon Laemmli (65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8 ; 2,1% SDS ; 26,3% (w/v) glycerol ; 0,01% de bleu de bromophénol).

### 6.2. Préparation du gel

Les solutions d'AC obtenues ainsi qu'un marqueur de masse ont ensuite été déposées (45  $\mu\text{L}$ ) sur le gel de polyacrylamide à 12% (12% Criterion™ TGX™ Gel, 12+12 well, 45 $\mu\text{L}$ , BIORAD 567-1043). Le tableau 66 schématise les dépôts de solution d'AC réalisés sur le gel de polyacrylamide.

La cuve d'électrophorèse est ensuite remplie de tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8,3). La migration des protéines s'effectue pendant une durée de 30 minutes par application d'une tension de 200 V.

### 6.3. Transfert sur membrane

Après migration, les protéines sont transférées du gel vers la membrane de PVDF ( , Immun-Blot PVDF Membrane, BIORAD, 162-0177) préalablement activée dans le méthanol, puis imprégnée dans le tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol). Le transfert est réalisé en



plaçant la membrane face au gel par un montage spécifique par application d'une tension de 100 V pendant 1 heure à 4°C. Les protéines chargées migrent ainsi depuis le gel vers la membrane sans modification de l'ordre de migration de celles-ci.

#### 6.4. Révélation du western blot

Une fois le transfert effectué, la membrane est saturée par immersion dans une solution de TBST/lait (Tris Buffer saline-Tween/lait ; 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5, 0,1% de Tween-20, 5% de poudre de lait écrémé) pendant 1 heure à température ambiante. Pour cela, la membrane a été immergée, sous agitation et pendant 30 minutes, dans une solution d'Avidine-AP au 1/1000 dans le tampon TBST/lait. Elle a ensuite été lavée 3 fois par immersion dans le TBST pendant 5 minutes puis une fois par immersion dans le TBS pendant 5 minutes.

### III. Résultats

#### PARTIE 1 : Choix de la méthode de mesure

Le but de cette première partie est donc la comparaison des performances des trois méthodes biophysique (RPS, ITC, TSA), afin de sélectionner la méthode la plus adaptée à l'étude de l'interaction de nos dérivés et de l'anhydrase carbonique II b. Cette comparaison a nécessité une étape de mise au point et de validation.

Après optimisation, chaque méthode a été appliquée à l'étude de quatre composés : l'acétazolamide, l'Alica 13, l'Alipk 41 et l'Alipk 177. L'acétazolamide est utilisé comme composé de référence, car il s'agit d'un inhibiteur reconnu de l'anhydrase carbonique (inhibiteur non sélectif).

#### 1. La résonance plasmonique de surface

Différentes méthodes permettant de mesurer les interactions entre l'acétazolamide (AZA) et l'AC II bovine (AC II b) sont proposées dans la littérature. En première approche, l'interaction de l'AZA et de l'AC II b a été étudiée selon le protocole proposé par Cannon (Cannon *et al*, 2004).

## 1.1. Validation de la méthode

### 1.1.1. Immobilisation de l'AC II bovine

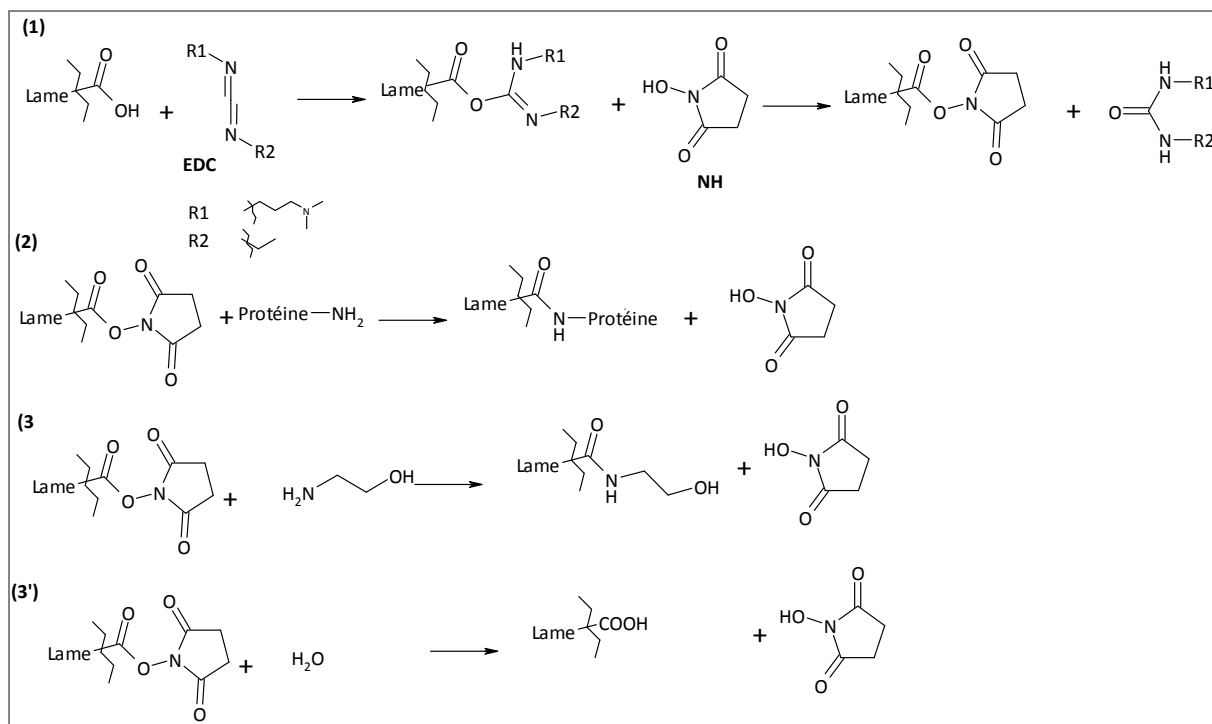
L'AC II b en solution dans un tampon acétate pH 5 est immobilisée sur une lame d'or recouverte de dextran carboxyméthylé, de type CM5, lame classiquement utilisée lors d'études portant sur les interactions protéine- molécules de bas poids moléculaire. Une étude préliminaire a donc été réalisée sur une lame CM5 afin de déterminer le taux d'immobilisation de l'AC II b optimal.

Dans ce but, trois solutions distinctes d'AC II b ont été préparés (3, 30 et 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) dans le tampon acétate à pH 5.

Parmi les quatre cellules disponibles sur la surface réactive, la première a été utilisée comme cellule de référence (Fc1) (pas d'immobilisation de la protéine) et trois autres cellules ont été utilisées pour immobiliser l'ACII b en solution à des concentrations différentes (3, 30 et 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). La cellule 1 sert ainsi à l'évaluation de la fixation non spécifique sur la lame de type CM5.

L'immobilisation de la protéine est obtenue par couplage peptidique de la fonction carboxyle du dextran carboxyméthylé et la fonction amine de la protéine, après activation des groupements carboxyles de la surface réactive par un mélange *N*-Hydroxysuccinimide (NHS)/1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) (figure 51).

Après sept minutes d'activation de la surface par le mélange NHS/EDC (1), les différentes solutions d'AC II b sont injectées sur les trois cellules (Fc 2, 3 et 4) à 10  $\mu\text{L.min}^{-1}$  pendant sept minutes (2), avant désactivation de la surface par injection d'éthanolamine pendant sept minutes (3). Seules les étapes 1 et 3 sont réalisées sur la cellule de référence (Fc 1).



**Figure 51** : Schéma de synthèse de la réaction chimique du couplage peptidique lors de l'immobilisation de la protéine sur la lame CM5.

Lors de l'immobilisation, le suivi du signal en RU obtenu en fonction du temps permet de visualiser le greffage de la protéine. Les taux d'immobilisation obtenus pour les cellules 2, 3 et 4 sont respectivement de 222, 4730 et 7525 RU. Comme attendu, la concentration a une influence importante sur le taux d'immobilisation de la protéine sur la surface réactive.

Afin d'évaluer l'influence de la densité d'immobilisation sur la constante thermodynamique de dissociation, l'affinité de deux composés, l'acétazolamide et l'Alica 13 pour l'AC II b a été déterminée aux trois densités d'immobilisation d'AC II b obtenues précédemment.

### 1.1.2. Affinité AZA/AC II b

Ces surfaces immobilisées ont été utilisées pour étudier l'affinité du composé de référence, l'acétazolamide avec l'AC II b. Dans ce but, une gamme de solution d'AZA de 1 à 0,00136  $\mu\text{M}$  a été préparée par dilutions successives dans le tampon de course.

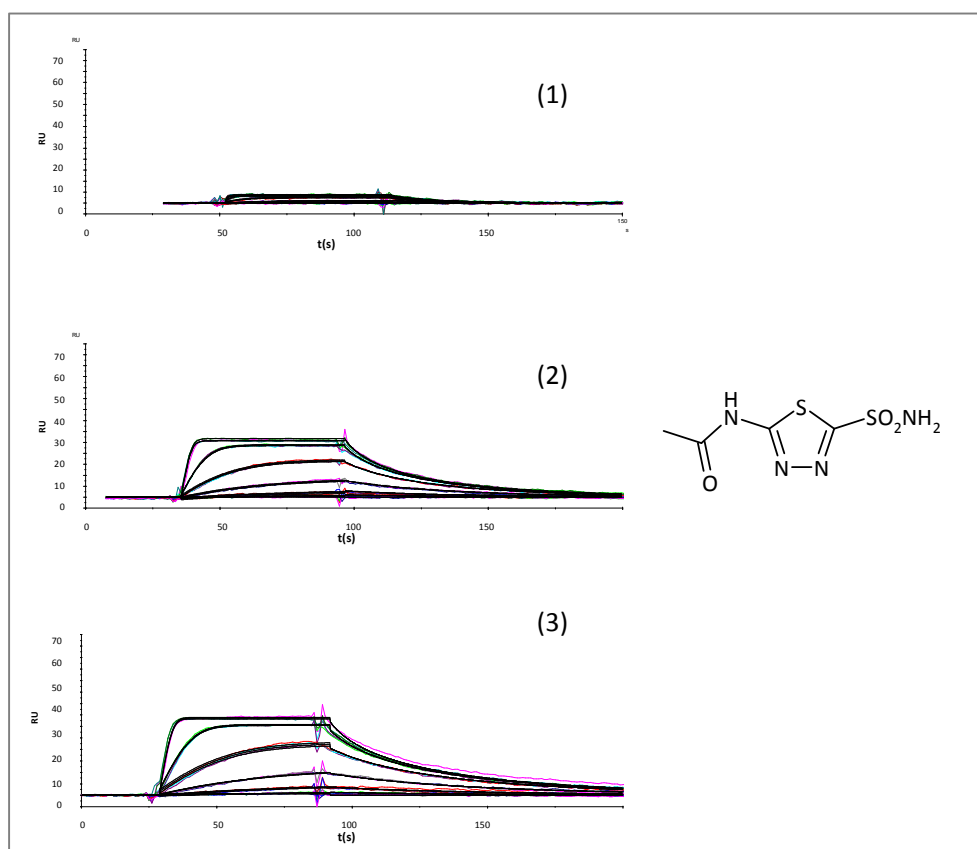
Chaque solution a été injectée en triple et de manière randomisée en utilisant le protocole présenté tableau 44.

<b>Température</b>	<b>298 K</b>
<b>Injection et détection</b>	Fc1, 2, 3, 4 (circulation en série des échantillons)
<b>Débit</b>	100 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$
<b>Mode d'injection</b>	Kinject
<b>(1) Injection du tampon de course</b>	2,5 min (ligne de base ; avant l'injection de l'analyte)
<b>(2) Injection de l'analyte</b>	1 min (étape d'association)
<b>(3) Injection du tampon de course</b>	7 min (étape de dissociation après l'injection de l'analyte)

**Tableau 44** : Conditions expérimentales pour l'étude de l'affinité analyte/AC II b sur lame CM5.

Aucune procédure de régénération n'a été utilisée au cours de cette étude. Le passage du tampon de course à 100  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  est suffisant pour dissocier le ligand ayant interagit spécifiquement ou non avec la surface immobilisée (retour à la ligne de base).

Les sensorgrammes obtenus pour l'étude de l'interaction AZA/AC II b, avec 3 taux d'immobilisation différents en AC II b, sont regroupés sur la figure 52.



**Figure 52** : Profils cinétiques d'interaction de l'AZA à différentes concentration (0,00136 - 1  $\mu\text{M}$ ) avec l'AC II b immobilisée à différents taux : (1) 222 RU, (2) 4730 RU et (3) 7527 RU ; tampon PBS 1X. En couleur : profils expérimentaux ; en noir : ajustements.

Pour chaque taux de greffage, une augmentation de la réponse en RU est observée lorsque la concentration de l'AZA augmente, jusqu'à saturation de la surface qui se traduit par la superposition des courbes. Ce phénomène atteste de la spécificité de l'interaction AZA/AC II b. Le plateau observé lors de la phase d'association montre que l'équilibre est atteint. Pour chaque cellule, un retour à la ligne de base est observé après la phase de dissociation, ce qui prouve que la dissociation du complexe AZA/AC II b est totale. La superposition des trois courbes obtenues lors de l'injection d'une même concentration en AZA en triple, prouve que l'AC II conserve une capacité de liaison constante au cours de l'analyse et atteste donc de la répétabilité de la mesure. Les réponses maximales obtenues pour les cellules 2, 3 et 4 sont respectivement de 5, 26 et 35 RU ; ces valeurs sont corrélées au taux d'immobilisation des différentes cellules respectivement égaux à 222, 4730 et 7525 RU.

Les sensorgrammes ont été modélisés à l'aide du logiciel biaeval, selon le protocole explicité dans la partie « matériels et méthodes » en utilisant un modèle d'interaction de type 1 : 1 afin de déterminer les constantes cinétiques et thermodynamique caractérisant l'interaction étudiée (ajustement global des profils cinétiques avec transfert de masse limitant). Ce modèle a été choisi d'après les travaux de J. Cannon (Cannon *et al*, 2004).

La valeur moyenne de  $K_D$  calculée est de 29 +/- 7 nM pour l'interaction AZA/AC II b. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature ( $K_D = 26$  nM) (Cannon *et al*, 2004), ce qui permet de valider la procédure analytique.

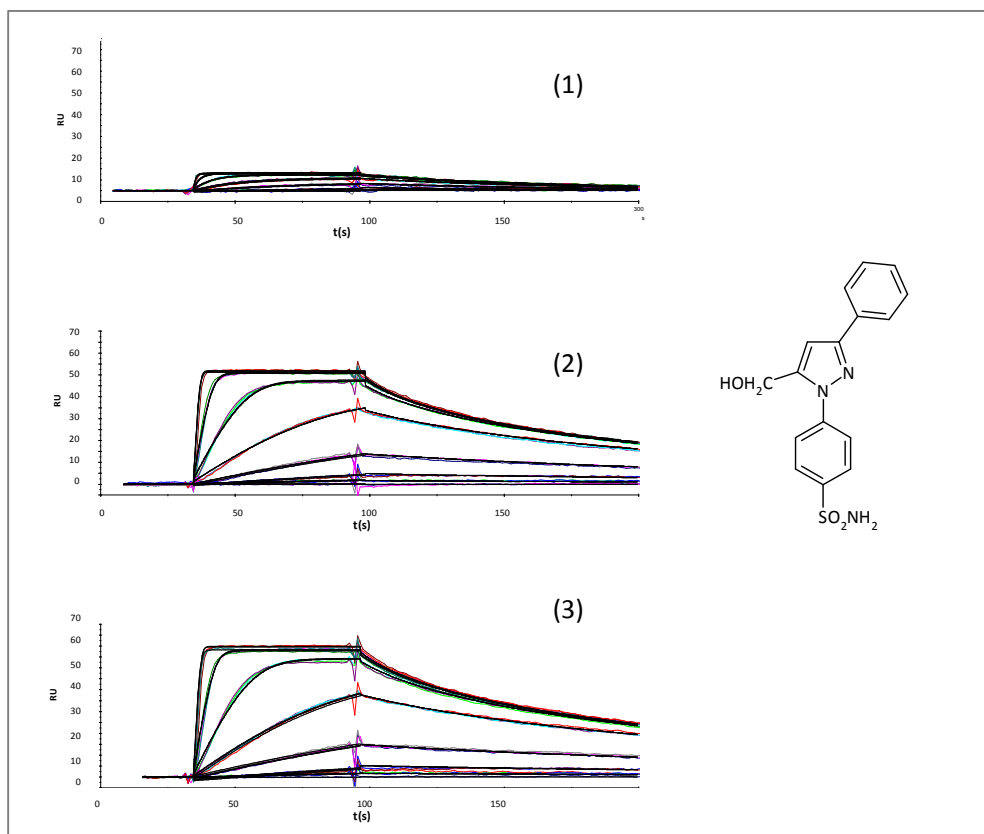
Les constantes de dissociation ne sont pas significativement différentes pour des taux d'immobilisation de la protéine variables en utilisant un modèle incluant le transfert de masse. Ce modèle a donc permis de s'affranchir du transfert de masse potentiellement limitant aux taux d'immobilisation élevés.

### **1.1.3. Affinité d'un dérivé sulfonamidodiarylpyrazole : Alica 13/AC II b**

En raison de la faible solubilité des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles, les mesures d'interaction ont été réalisées dans un tampon PBS 1X (1% en DMSO). Ce pourcentage de DMSO sera maintenu constant lors des études menées à l'aide des différentes techniques utilisées (ITC et TSA).

Pour chaque dérivé sulfonamidodiarylpyrazole, une gamme de concentration a été choisie de manière à obtenir la saturation de la surface.

Les sensorgrammes obtenus pour l'étude d'interaction entre l'Alica 13 et l'AC II b sur des surfaces immobilisées à des taux différents sont présentés figure 53 (lame identique à celle utilisée pour l'AZA).



**Figure 53** : Profils cinétiques d'interaction de l'Alica 13 à différentes concentration (0- 0,33 $\mu$ M) avec l'AC II b immobilisée à différents taux : (1) 222 RU, (2) 4730 RU et (3) 7527 RU ; tampon PBS 1X, 1% DMSO. En couleur : profils expérimentaux ; en noir : ajustements.

Contrairement à l'AZA, les réponses maximales  $R_{max}$ , correspondant à la saturation de la surface, ne sont pas directement dépendante du taux d'immobilisation. En effet, les réponses maximales obtenues pour les cellules 2, 3 et 4 sont respectivement 10, 50 et 58 RU. Elles sont donc équivalentes pour les taux d'immobilisation de l'AC II b moyen et haut. Ce phénomène peut s'expliquer par une moins bonne accessibilité des sites de liaisons de l'AC II b pour l'analyte.

La constante de dissociation caractérisant l'interaction Alica 13/AC II b a été calculée sur les trois surfaces à l'aide du modèle incluant ou non un transfert de masse limitant. La qualité des ajustements obtenus avec un modèle incluant un transfert de masse limitant s'est avérée supérieure. Ce modèle a donc été retenu. Pour les différents taux d'immobilisation, des valeurs équivalentes de

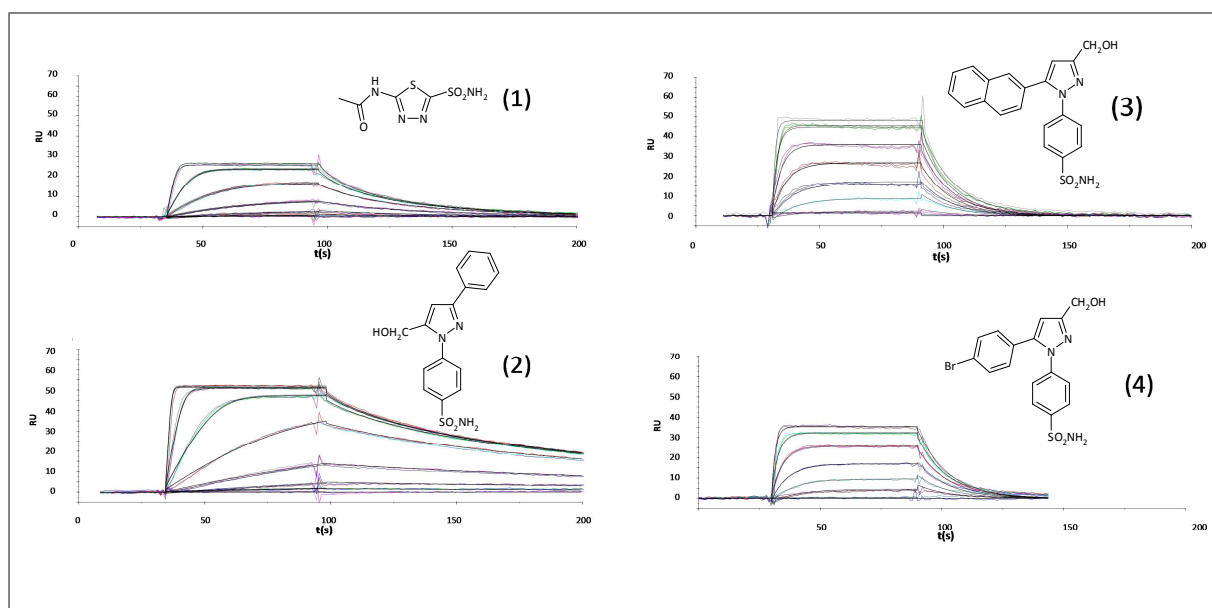
$K_D$  ont été obtenues ( $K_D = 9 \pm 3$  nM), confirmant ainsi que l'utilisation du modèle incluant le transfert de masse permet d'obtenir une valeur de constante thermodynamique de dissociation non impactée par ce phénomène.

Compte tenu des résultats des cellules 3 et 4, un taux d'immobilisation moyen de 4500 RU est suffisant lors des immobilisations ultérieures, afin d'obtenir un  $R_{max}$  voisin de 50, pour une consommation réduite en protéine.

### 1.2. Affinités des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles pour l'AC II b

Quatre composés (l'AZA, l'Alica 13, l'Alipk 41 et l'Alipk 177) ont été analysés sur une même lame sur laquelle l'AC II b a été immobilisée au taux de 4118 RU (cellule 2). La cellule 1 a été utilisée comme cellule de référence.

Les sensorgrammes obtenus après traitement par le logiciel Biaeval, sont représentés sur la figure 54.



**Figure 54 :** Sensorgrammes représentant l'interaction entre l'AC II b (taux d'immobilisation = 4118 RU) et quatre composés, (1) : AZA (0-0,33  $\mu$ M), (2) : Alica 13 (0-0,33  $\mu$ M), (3) : Alipk 41 (0-1,5  $\mu$ M) et (4) : Alipk 177 (0-1  $\mu$ M) ; tampon PBS 1X, 1% DMSO. En couleur : profils expérimentaux ; en noir : ajustements.

Lors de l'étude d'interaction de l'AZA et de l'AC II b en présence de 1% de DMSO, les sensorgrammes obtenus sont identiques à ceux en absence de DMSO (résultat précédent), ce qui permet de conclure que la présence de 1% de DMSO n'a pas d'influence sur l'interaction AZA/AC II b.

Pour l'AZA, l'Alipk 41 et l'Alipk 177, quelles que soient les concentrations évaluées, un plateau est obtenu lors de la phase d'association ; il traduit l'obtention d'un état d'équilibre qui est atteint pendant la phase d'association. Un retour à la ligne de base est également observé pendant la phase de dissociation. En revanche pour l'Alica 13, l'état d'équilibre n'est atteint qu'aux concentrations les plus hautes. Malgré une dissociation lente, elle est complète après sept minutes de passage du tampon de course (données non présentées sur la figure 54) ; une étape de régénération n'est donc pas nécessaire entre chaque injection d'échantillon.

Au fur et à mesure des injections de concentrations croissantes en analyte, la réponse en RU augmente jusqu'à atteindre une valeur seuil, traduisant la saturation de la surface. La comparaison visuelle des profils des différents composés permet d'observer des différences au niveau des cinétiques d'association et de dissociation des différents composés.

Après traitement des réponses, les sensorgrammes ont été analysés par le logiciel Biaeval en utilisant le modèle 1 :1 d'interaction incluant un phénomène de transfert de masse limitant. Les constantes cinétiques d'association et de dissociation et les constantes thermodynamiques obtenues à l'équilibre ou à partir des constantes cinétiques sont données dans le tableau 45.

Composé	$k_a (10^6 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1})$	$k_d (10^{-2} \cdot s^{-1})$	$K_D = k_d/k_a (nM)$	$K_D \text{ équilibre (nM)}$
<b>AZA</b>	$3,1 \pm 0,1$	$9,0 \pm 2,0$	$29 \pm 7$	$30 \pm 8$
<b>Alica 13</b>	$2,0 \pm 0,6$	$1,8 \pm 0,2$	$9 \pm 3$	nd
<b>Alipk 41</b>	$0,5 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,8$	$157 \pm 46$	$156 \pm 7$
<b>Alipk 177</b>	$0,6 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,4$	$125 \pm 25$	$120 \pm 10$

**Tableau 45** : Constantes cinétiques d'association et de dissociation et constantes thermodynamiques de dissociation caractéristiques de l'interaction AC II b/analyte.

nd : non déterminée, saturation non atteinte.



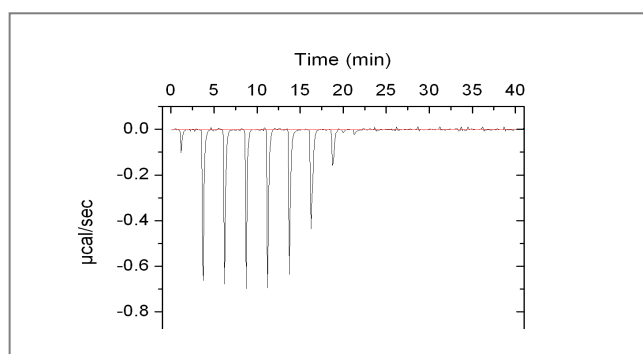
L'ensemble des composés présentent des affinités de l'ordre du nanomolaire pour l'isoforme II de l'AC bovine. L'Alipk 41 et l'Alipk 177 sont moins affins pour la protéine que l'Alica 13 (affinité environ 10 fois plus faible). Cette différence s'explique par une constante cinétique de dissociation plus faible pour l'Alica 13 que pour les autres composés, due à des profils cinétiques différents, notamment en ce qui concerne les pentes correspondantes à la dissociation des analytes.

## 2. La calorimétrie à titration isotherme

Les manipulations en ITC décrites par la suite ont été réalisées et traitées en collaboration avec l'unité de chimie environnementale et interaction sur le vivant de Dunkerque (Pr. David Landy).

### 2.1. Evaluation de l'affinité de l'AZA pour l'AC II b par titration directe

Dans un premier temps, l'affinité de l'AZA pour l'AC II b a été évaluée par un protocole de titration directe, l'AC II b étant placée dans la cellule de mesure ( $14 \mu\text{M}$ ,  $V_{\text{cellule}} = 204 \mu\text{L}$ ) et l'AZA ( $240 \mu\text{M}$ ,  $V_{\text{seringue}} = 40 \mu\text{L}$ ) étant introduit dans la seringue à afin de réaliser son addition progressive (20 injections,  $1,8 \mu\text{L}/\text{injection}$ ) dans la cellule de mesure. L'isotherme de liaison obtenue pour l'étude de l'AZA avec l'AC II b est présenté figure 55.



**Figure 55 :** Thermogramme de liaison AZA/ AC II b,  $[\text{AZA}] = 240 \mu\text{M}$ ,  $[\text{AC II b}] = 14 \mu\text{M}$ .

Interaction AZA/AC II b	
$K_D$	32 nM
$\Delta H$	-16600 cal.mol <sup>-1</sup>
$T\Delta S$	-6371 cal.mol <sup>-1</sup>

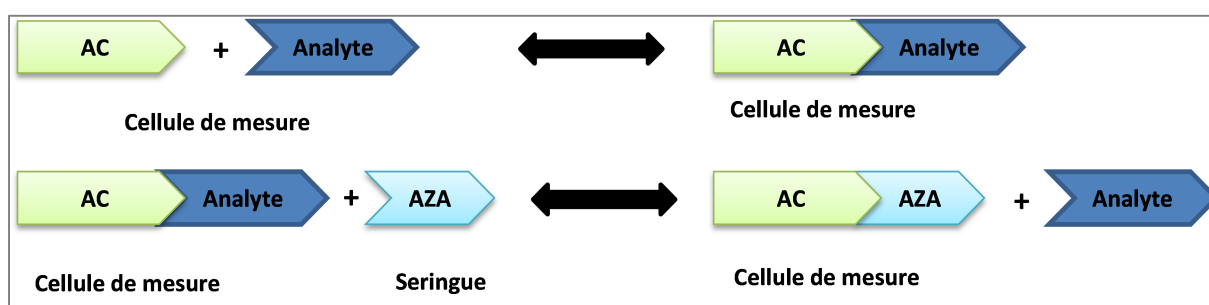
**Tableau 46** : Paramètres déterminés par ITC lors de l'étude de l'interaction AZA/AC II b.

Les isothermes d'interactions ont été analysés selon le protocole présenté dans la partie « matériels et méthodes ». La constante de dissociation thermodynamique calculée (32 nM) est en accord avec celle issue de la littérature et celles obtenus en RPS, ce qui confirme la validité méthodes ITC et RPS (Cannon *et al*, 2004).

## 2.2. Affinité des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles par titration indirecte

Dans un second temps, l'affinité des trois dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles a été étudiée par ITC. La solubilité aqueuse des dérivés est insuffisante pour atteindre une concentration suffisante lors d'une titration directe. Afin de pallier cet inconvénient, la détermination des constantes d'affinité a été réalisée par compétition, avec l'acétazolamide comme composé compétiteur.

Le protocole compétitif repose dans un premier temps, sur l'introduction dans la cellule de mesure du complexe analyte-protéine ([Analyte] = 7  $\mu$ M ; [AC II b] = 14  $\mu$ M). Puis dans un second temps, l'addition progressive de la solution d'AZA présent dans la seringue à une concentration de 240  $\mu$ M, va induire la dissociation du complexe analyte/AC II b par compétition de l'AZA, comme illustré sur la figure 56.

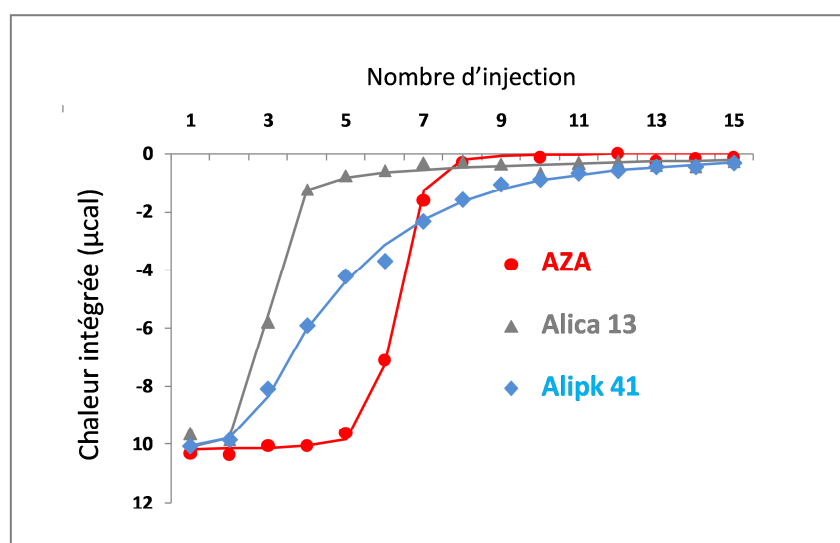


**Figure 56** : Représentation schématique de la titration par compétition.

AZA : Analyte compétiteur appelé Analyte C dans le chapitre 1 : Etude bibliographique.

Par conséquent, le thermogramme et l'isotherme d'interaction vont dépendre des paramètres thermodynamiques caractéristiques de la formation du complexe AZA/AC II b ainsi que de ceux du complexe Analyte/AC II b. Les paramètres thermodynamiques caractéristiques de la complexation des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles par l'AC II b, notamment la constante de dissociation du complexe, l'enthalpie et l'entropie de complexation pourront être évaluées à partir des isothermes obtenus par compétition, en prenant en compte les paramètres thermodynamiques caractéristiques de la formation du complexe AZA/AC II b précédemment évalués.

Les isothermes obtenus par compétition pour l'étude de l'interaction de l'AC II b avec les dérivés sulfonamidodiarylpyrazole RPS sont significativement différents de celui obtenu par titration directe pour l'AZA. Cette différence est illustrée sur la figure 57 pour l'Alica 13 et l'Alipk 41. Pour plus de clarté de la figure, l'isotherme de liaison obtenue pour l'Alipk 177 n'est pas représenté, il est proche de celui de l'Alipk 41.



**Figure 57 :** Isothermes de liaisons observées lors de l'association de l'AC II b avec l'AZA (rouge) et de l'Alica 13 (gris) et de l'Alipk 41 (bleu).

L'isotherme de liaison pour l'Alica 13 montre des variations de quantités de chaleur plus importantes que celle de l'Alipk 41 et de l'Alipk 177, pour une même quantité d'AZA ajoutée. Ces variations ont permis le traitement des données sur la base d'un équilibre 1 : 1. Les valeurs des constantes thermodynamiques caractérisant la dissociation des différents complexes analyte / AC II b sont présentés dans le tableau 47.

	<b>AZA</b>	<b>ALICA 13</b>	<b>ALIPK 41</b>	<b>ALIPK 177</b>
<b>K<sub>D</sub> (nM)</b>	32 ± 5	8 ± 5	111 ± 26	139 ± 33
<b>ΔH (cal.mol<sup>-1</sup>)</b>	-16600 ± 415	-8794 ± 1231	-1742 ± 802	-2251 ± 1013
<b>TΔS (cal.mol<sup>-1</sup>)</b>	-6371 ± 427	2257 ± 1361	7750 ± 817	7107 ± 1026

**Tableau 47** : K<sub>D</sub>, ΔH, TΔS caractérisant l'interaction inhibiteur/AC II bovine.

Alors que l'Alipk 41 et l'Alipk 177 sont caractérisés par des affinités pour l'AC II b plus faibles que celle de l'AZA, une affinité plus élevée a été obtenue pour l'Alica 13. Il est à noter que les trois dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles présentent des valeurs d'enthalpies d'association plus faibles que celle de l'AZA. Il est également intéressant de souligner que si les protocoles par titration directe avaient été utilisés pour ces composés, ces faibles valeurs d'enthalpie auraient induits des échanges de chaleur négligeables, empêchant ainsi toute caractérisation de l'affinité de la protéine pour nos composés. Cette observation renforce le choix de l'utilisation d'une titration par compétition.

### 2.3. Détermination de la variation des capacités calorifiques (ΔCp) des complexes formés

La connaissance de ΔH à la température ambiante et de la variation de la capacité calorifique ΔCp peut être obtenu à partir du calcul de l'enthalpie pour chaque température expérimentale, ce qui constitue une condition préalable pour un traitement non-biaisé de données de TSA.

Pour réaliser cette étude, la procédure analytique (titration directe de l'AZA et titration indirecte des 3 composés) a été répétée à une température de 13°C et de 37°C. Le tracé des variations de l'enthalpie ΔH en fonction de la température T a conduit à l'obtention d'une droite (coefficient de détermination supérieur à 0,990), dont la pente correspond à la variation de la capacité calorifique ΔCp caractéristique de chacun des complexations étudiées (tableau 48).

	<b>AZA</b>	<b>ALICA 13</b>	<b>ALIPK 41</b>	<b>ALIPK 177</b>
<b><math>\Delta C_p</math> (cal.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>)</b>	-52	-485	-294	-303

**Tableau 48** : Valeurs des variations des capacités calorifiques caractéristiques de la complexation des composés étudiés avec l'AC II b.

Considérons les valeurs absolues de  $\Delta C_p$  : tandis qu'une valeur très faible de  $\Delta C_p$  a été obtenue pour l'interaction de l'AZA/AC II b, des valeurs supérieures ont été observées pour les trois dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles.

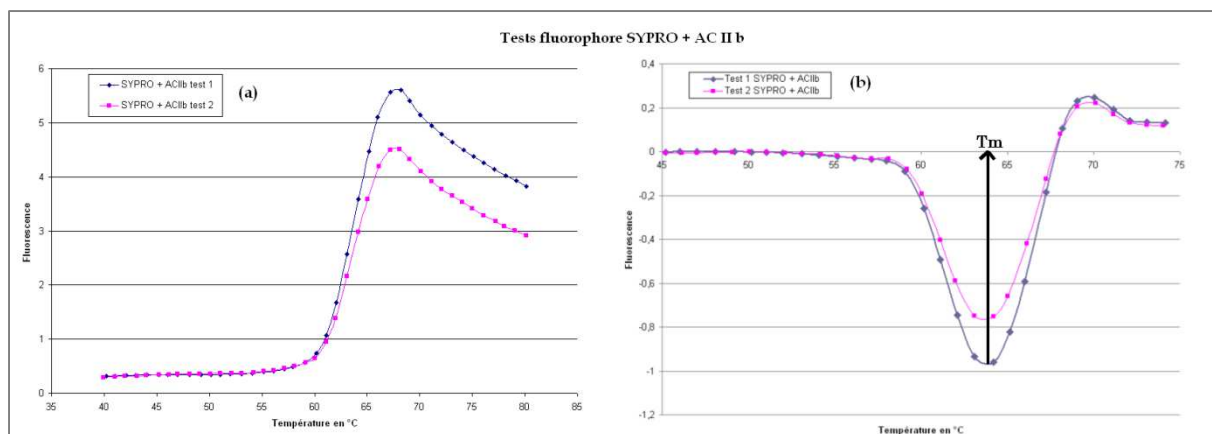
### 3. La Thermal Shift Assay

#### 3.1. Optimisation des conditions d'évaluation de la température de fusion

Des études préliminaires ont été réalisées dans le but d'optimiser les conditions expérimentales pour la détermination de la température de fusion de l'AC II b. L'influence des concentrations en Sypro Orange, en protéine ainsi que la composition du tampon d'étude ont été évaluées.

##### 3.1.1. Optimisation de la concentration en Sypro Orange

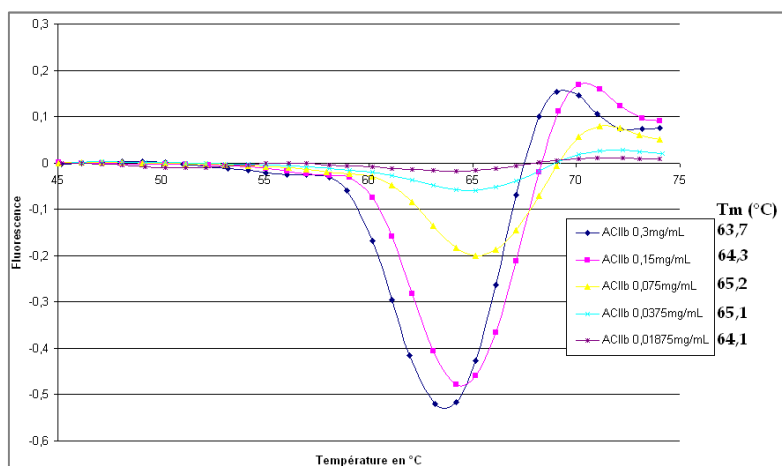
Dans un premier temps, l'influence de la concentration du Sypro Orange a été étudiée dans le tampon Pipes 25 mM, 100 mM NaCl, pH 6,9, (1% en DMSO). Deux concentrations ont ainsi été évaluées : 2X et 5X. Chaque essai a été réalisé en double. Dans le cas d'une concentration finale de Sypro Orange égale à 2X, les variations de l'émission de fluorescence mesurées se sont révélées trop faibles pour permettre l'évaluation de la température de fusion (variations de la fluorescence non significatives). Les courbes de dénaturation obtenues avec le Sypro Orange à une concentration finale de 5X (figure 58) présentent des variations significatives de fluorescence en fonction de la température, permettant ainsi la détermination de la température de fusion ( $T_m$ ). Celle-ci correspond au point d'inflexion de la courbe et peut être déterminée précisément à partir de la courbe dérivée (minimum de la courbe) ou à l'aide du modèle de Boltzman, selon le protocole décrit dans la partie « matériels et méthodes ». Dans le cas présent, la température de fusion est de 63,9°C. Une concentration en Sypro Orange à 5X a été retenue pour étudier les interactions Analyte/AC II b.



**Figure 58 :** Représentation des courbes de fluorescence (a) et des dérivées (b) enregistrées pour une concentration d'AC II b de  $0,6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  et une concentration en Sypro Orange de 5X ; tampon Pipes 25 mM, 100 mM NaCl, pH 6,9, à 1% en DMSO ; deux réplicats.

### 3.1.2. Optimisation de la concentration en protéine

Dans un second temps, l'influence de la concentration en protéine a été étudiée dans les mêmes conditions décrite précédemment. Une gamme de concentration en AC II b allant de  $0,019$  à  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  a été utilisée. Les courbes dérivées obtenues à partir des courbes de dénaturation sont présentées figure 59.



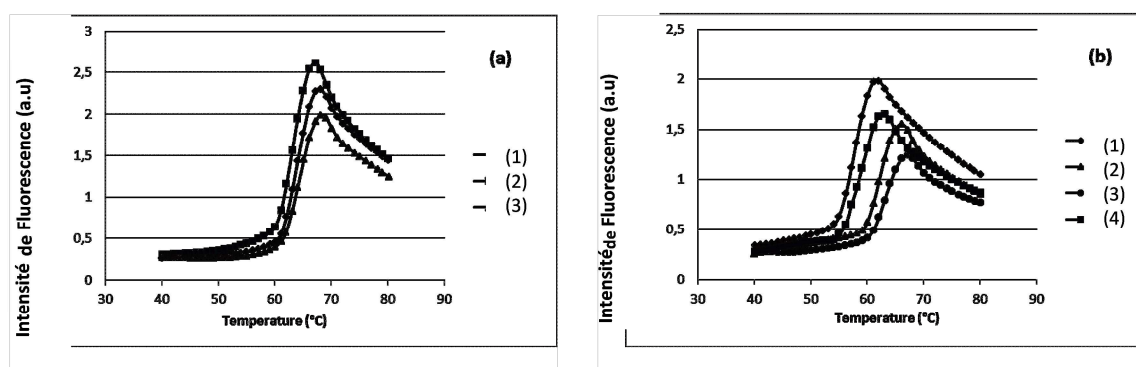
**Figure 59 :** Courbes dérivées des courbes de dénaturation obtenues pour différentes concentrations d'AC II b (de  $0,019$  à  $0,3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ; Sypro Orange 5X ; tampon Pipes 25 mM, 100 mM NaCl, pH 6,9, à 1% en DMSO.

Les températures de fusion mesurées sont comprises entre  $63,7$  et  $65,1 \text{ }^\circ\text{C}$  et peuvent être considérée comme constantes. Ainsi la température de fusion peut être considérée comme

indépendante de la concentration en protéine. Cette observation peut s'expliquer par un degré d'agrégation de la protéine constant ou absence dans cette gamme de concentration (Cimpmperman et Matulis, 2011). Néanmoins, l'amplitude des courbes augmente avec la concentration d'AC II, permettant une évaluation de la température de fusion avec plus de justesse. Une concentration en AC II égale à  $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$  a donc été retenue pour l'étude des interactions analyte/AC II b, en effet la fluorescence mesurée à cette concentration est équivalente à celle obtenue à  $0,30 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

### 3.1.3. Influence de la composition de la solution tampon

Dans un troisième temps, afin de déterminer la nature de la solution tampon et son pH optimal permettant d'observer des intensités de fluorescence maximales et des valeurs de  $T_m$  reproductibles, des essais ont été réalisés à l'aide de tampon Mes et Pipes de pH variable. Les solutions tampon suivantes ont été évaluées : tampon Mes 25 mM, pH 5,7/5,9/6,4 et 6,8 et tampon Pipes 25 mM, pH 6,9/6,6 et 7,5 à 1 % de DMSO. Les courbes de dénaturation obtenues sont présentées figure 60.



**Figure 60** : Etude de l'influence du pH sur la fluorescence, (a) avec le tampon Pipes (1) pH 6,9 ; (2) pH 6,6 ; (3) pH 7,4. et (b) avec le tampon Mes (1) pH 6,4 ; (2) pH 5,7 ; (3) pH 5,9 ; (4) pH 6,8.

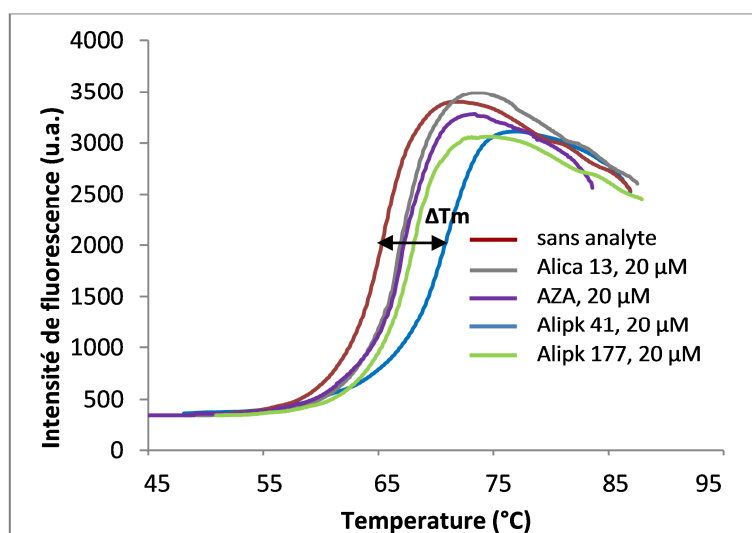
Alors que pour le tampon Pipes, une variation de pH d'une unité conduit à une augmentation de la température de fusion de  $1^\circ\text{C}$ , pour le tampon Mes, la même variation de pH conduit à une augmentation de  $5^\circ\text{C}$ . Par conséquent, une faible variation de pH lorsqu'on utilise du tampon Mes peut entraîner une augmentation de la température de fusion, qui pourrait être faussement attribuée à une interaction entre l'analyte et la protéine. Par conséquent, le tampon Pipes à pH 7,4 a été choisi afin de réaliser les études d'interaction au pH physiologique.

Ces conditions optimales, concentration en AC II égale à  $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$ , tampon pipes 25 mM, et pH 7,4, ont été utilisées pour mesurer la variation de la température de fusion de la protéine,  $T_m$ , en absence et en présence d'analyte.

### 3.2. Affinité de l'AZA et des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles pour l'AC II b

L'affinité de différents composés de type sulfonamide a été évaluée en mesurant la température de fusion de l'AC II b pour des concentrations croissantes d'analyte (de 0 à  $100 \mu\text{M}$ ).

La figure 61 présente, à titre d'exemple, les courbes de dénaturation de la protéine pour différents analytes à la concentration de  $20 \mu\text{M}$ .



**Figure 61 :** Courbes de dénaturation obtenues lors de l'ajout de différents analytes à une concentrations de  $20 \mu\text{M}$  dans la solution d'AC II b à  $5 \mu\text{M}$  .

L'augmentation de la température de fusion en présence d'analyte s'explique par un phénomène de stabilisation de la protéine en raison de l'interaction entre les deux partenaires (Cimpmperman *et al*, 2008). Les valeurs distinctes obtenues pour les différents analytes qui sont regroupées dans le tableau 49, reflètent des interactions d'amplitude différentes.



Composés	$\Delta T_m$
AZA	2,8
Alica 13	5,8
Alipk 41	1,6
Alipk 177	1,4

**Tableau 49** : Valeurs de  $\Delta T_m$  caractéristiques de l'interaction Analyte/AC II b, avec une concentration en analyte à 20  $\mu$ M.

Rappelons que le modèle relie la température de fusion à la concentration totale de ligand selon :

$$L_t = \left( e^{-\frac{(\Delta_U H_{Tr} + \Delta_U Cp(Tm-Tr)) - Tm(\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U Cp \ln(Tm/Tr))}{RTm}} - 1 \right) \times \left[ \frac{P_t}{2} \frac{1}{e^{-\frac{(\Delta_U H_{Tr} + \Delta_U Cp(Tm-Tr)) - Tm(\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U Cp \ln(Tm/Tr))}{RTm}}} + \frac{1}{e^{-\frac{(\Delta_b H_{T_0} + \Delta_b Cp(Tm-T_0)) - Tm(\Delta_b S_{T_0} + \Delta_b Cp \ln(Tm/T_0))}{RTm}}} \right]$$

(6)

Avec  $L_t$  : concentration totale en analyte

$P_t$  : concentration totale en protéine

$\Delta_U H_{Tr}$  : variation d'enthalpie d'unfolding de la protéine à  $T_r$

$T_r$  : température de fusion de la protéine en absence d'analyte

$T_m$  : température de fusion de la protéine en présence d'analyte

$\Delta_U S_{Tr}$  : variation d'entropie d'unfolding de la protéine à  $T_r$

$\Delta_U Cp$  : variation de la capacité calorifique d'unfolding de la protéine (supposé indépendante de la température)

$\Delta_b H_{T_0}$  : variation d'enthalpie de liaison d'analyte à la protéine à  $T_0$

$T_0$  : température de référence (298 K)

$\Delta_b S_{T_0}$  : variation d'entropie de la liaison de l'analyte à la protéine à  $T_0$

$\Delta_b Cp$  : variation de la capacité calorifique du complexe analyte/protéine (supposé indépendante de la température)

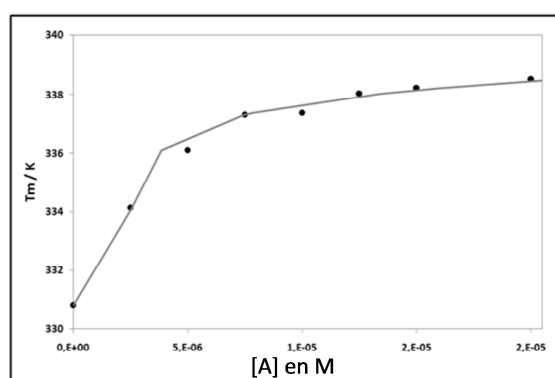
Comme illustré sur la figure X dans le cas de l'interaction de l'AC II b avec l'Alica 13, la température de fusion de la protéine augmente avec la concentration de l'Alica 13 puis est stabilisée aux concentrations élevées, reflétant une interaction spécifique entre les deux partenaires (Cimpmperman *et al*, 2008).

L'exploitation détaillée des données de TSA a ensuite été réalisée par le Pr. David Landy à l'aide de l'équation de Cimpmperman (6) et de l'algorithme de Newton et Raphson décrits précédemment.

### Quantification de l'interaction :

La température de fusion observée pour une solution donnée d'AC II b dépend des paramètres thermodynamiques caractérisant la réaction de dénaturation (unfolding) et la complexation de l'analyte à la protéine native et dénaturée. Nous avons, à l'instar de Matulis, fait l'hypothèse que la protéine dénaturée n'interagit pas avec l'analyte. Les valeurs de l'enthalpie, de l'entropie et de la chaleur spécifique de dénaturation de l'AC II b ont été obtenues dans la littérature (Matulis *et al*, 2005). Par conséquent, les paramètres thermodynamiques caractérisant la réaction de complexation de l'analyte par l'AC II b sous sa forme native (foldée) sont les seules données inconnues influençant la température de fusion. Afin de modéliser l'évolution expérimentale de  $T_m$ , les valeurs de l'enthalpie  $\Delta H_{T_0}$  et la chaleur calorifique  $\Delta C_p$  déterminée lors de l'étude menée en ITC ont été utilisées.

Les variations expérimentales et théoriques (ajustement) de  $T_m$  obtenues en TSA pour l'AC II b en fonction de la concentration de l'Alica 13 sont représentées sur la figure 62.



**Figure 62 :** Courbes représentant la variation de la température de fusion de l'AC II b en fonction de la concentration en Alica 13 ; points : valeurs expérimentales ; courbe noire : le fit obtenu.

Les données expérimentales et théoriques sont cohérentes, ce qui confirme une association de type 1 :1, permettant l'estimation de la constante de dissociation  $K_D$  à 25°C, sur la base de l'équation (-). Les résultats obtenus pour les études de l'interaction des quatre analytes avec l'AC II b sont donnés dans le tableau 50.

Composés	$\Delta T_m$	$K_D$ (nM)
AZA	2,8	$9 \pm 2$
Alica 13	5,8	$1 \pm 1$
Alipk 41	1,6	$231 \pm 46$
Alipk 177	1,4	$352 \pm 70$

**Tableau 50 :** Valeur de  $\Delta T_m$  (obtenues à une concentration en analyte à 20  $\mu$ M) et constantes thermodynamiques de dissociation obtenues lors de l'interaction avec l'AC II b.

Dans un premier temps, il est important de noter que l'échelle d'affinité de nos composés pour l'AC II b obtenue après traitement algorithmique suit la même tendance que celle des  $\Delta T_m$  calculés. Plus la protéine est stable, plus l'interaction entre l'analyte et l'AC II b est grande, se traduisant alors par une augmentation de  $\Delta T_m$ .

La valeur de la constante d'interaction de l'AZA est proche de celle de la littérature. Les constantes de dissociation mesurées pour l'AZA et l'Alica 13 sont proches. Il en est de même pour l'Alipk 41 et l'Alipk 177. Par ailleurs, les affinités de l'AZA et de l'Alica 13 pour l'AC II b sont nettement supérieures à celles l'Alipk 41 et de l'Alipk 177.

#### 4. Discussion

Après avoir optimisé les méthodologies des trois techniques choisies (RPS, ITC, TSA), les affinités de l'AZA, de l'Alica 13, de l'Alipk 41 et de l'Alipk 177 pour l'AC II b ont été déterminées. Les valeurs des constantes thermodynamiques de dissociation des différents complexes étudiés sont répertoriées dans le tableau 51.

Composés	K <sub>D</sub> (nM)		
	RPS	ITC	TSA
AZA	29 ± 7	32 ± 5	9 ± 2
Alica 13	9 ± 3	8 ± 5	1 ± 1
Alipk 41	157 ± 46	111 ± 26	231 ± 46
Alipk 177	125 ± 25	139 ± 33	352 ± 70

**Tableau 51** : Constantes thermodynamique de dissociation de l'interaction Analyte/AC II b.

Les valeurs de K<sub>D</sub> calculées pour chaque technique pour le couple AZA/AC II b sont en accord avec la littérature (Cannon *et al*, 2004), ce qui nous a permis de valider les trois méthodologies. La cohérence des résultats obtenus en RPS avec ceux obtenus en ITC, qui est la méthode de référence dans le domaine de l'étude des interactions moléculaires, permet d'affirmer que l'immobilisation de l'AC II b en RPS ne perturbe pas la conformation active de la protéine et ne modifie pas le mode de reconnaissance de l'analyte. Bien que les valeurs de constantes d'affinité obtenue par TSA soient différentes de celles obtenues par les deux autres méthodes, les échelles d'affinité obtenues pour les quatre analytes étudiés sont concordantes. L'ordre d'affinité pour l'AC II b est le suivant : Alica 13 > AZA > Alipk 41 ≈ Alipk 177. En considérant l'écart type associé au résultat, l'Alipk 41 et l'Alipk 177 sont caractérisé par des affinités non significativement différentes.

Afin de déterminer la méthode la plus adaptée pour les études de l'interaction de nos dérivés avec les isoformes de l'anhydrase carbonique, il est intéressant de dresser un bilan des méthodologies développées reprenant leurs avantages et inconvénients qui sont résumés dans le tableau 52.

	<b>ITC</b>	<b>TSA</b>	<b>RPS</b>
<b>Immobilisation</b>	non	non	Oui
<b>Consommation en protéine</b>	0,1 mg/composé	0,06 mg/composé	0,01 mg/10-15 composés
<b>Informations</b>	$\Delta H, \Delta S, \Delta G,$ $K_A, K_D$	$\Delta T_m$ $(K_A, K_D, \Delta G)$	$K_A, K_D, k_a, k_d$ (+ éventuellement $\Delta H, \Delta S, \Delta G$ par Van't Hoff)
<b>Points positifs</b>	<b>Paramètres thermodynamiques</b>	<b>Screening à haut débit possible</b>	<b>Constantes cinétiques</b> Volume échantillon faible Mesure en temps réel
<b>Points négatifs</b>	Volume d'échantillon important Réactifs nécessairement purs Mesure de hautes affinités difficile	Mesure indirecte Réactifs doivent être obligatoirement purs	Un des deux partenaires immobilisés Partenaire immobilisé doit être pur

**Tableau 52 :** Avantages et inconvénients des trois techniques biophysiques utilisées pour l'étude de l'interaction avec l'AC II b.

La **RPS** est une technique qui permet l'utilisation de différentes approches expérimentales (chimie d'immobilisation très variée) en consommant une faible quantité du partenaire immobilisé (10-15  $\mu\text{g}$  d'AC II b dans le cas présent) pour un grand nombre d'essais (environ 300 analyses pour 1 immobilisation). De plus, comme la surface réactive contient quatre cellules de mesure, les trois isoformes d'intérêt (AC II, IX et XII) peuvent être étudiées en parallèle en une même analyse. En plus de l'information essentielle concernant l'affinité d'un ligand ( $K_A$ ) pour la protéine, la RPS renseigne sur les constantes cinétiques d'association et de dissociation. L'inconvénient majeur de la RPS est l'immobilisation d'un des partenaires, car elle peut engendrer une modification et/ou une hétérogénéité du site d'interaction (accessibilité, conformation).

L'**ITC** nous a permis de décrire les interactions AC II/Analyte d'un point de vue thermodynamique sans utiliser de marquage ou d'immobilisation. De plus, il a été possible de

déterminer la chaleur spécifique de l'interaction par des études réalisées à différentes températures. La détermination de ce paramètre était nécessaire à l'interprétation de nos données de TSA. L'inconvénient principal de l'ITC est sa consommation importante en protéine et en analyte. Cette technique n'est pas applicable pour des études de screening, mais elle est considérée comme la méthode de choix pour les études thermodynamiques approfondies. Les études préliminaires ont permis de démontrer que les constantes déterminées par RPS pour nos quatre composés avec l'AC II b, sont identiques à celles obtenues par des techniques dites en solution, tel que l'ITC.

La concordance entre les valeurs des échelles des  $\Delta T_m$  et des constantes d'affinité calculées pour les différents composés étudiés pour l'AC II b, font de la **TSA** une technique qui est facilement utilisable pour des études de screening. En effet, des études à une seule concentration en analyte vont permettre, à travers la mesure de  $\Delta T_m$ , d'obtenir rapidement une information sur l'affinité d'un composé pour une cible. L'inconvénient de la TSA pour des études plus approfondies (notamment avec la détermination des constantes d'affinité) est sa consommation élevée en protéine (100-150  $\mu\text{g}$ ) et la complexité de la méthode de calcul nécessitant de disposer de données thermodynamiques caractéristiques notamment de la dénaturation de la protéine ou encore de la chaleur spécifique de complexation qui ne peut être déterminée que par le biais d'une autre technique comme l'ITC.

La RPS est la technique la moins consommatrice en protéine, en effet elle consomme plus de 10 fois moins que l'ITC, une immobilisation en RPS nécessitant environ 10  $\mu\text{g}$  de protéine permet environ 300 analyses. De plus, la RPS nous donne des informations sur les constantes cinétiques d'association et de dissociation de l'interaction qui peuvent s'avérer pertinente pour le choix d'un composé « lead ».

En vue des résultats obtenus et des avantages et des inconvénients de chacune des techniques utilisées, la résonance plasmonique de surface a été choisie comme la méthode la plus adaptée pour l'étude de l'interaction des dérivés sulfonamidodiazolopyrazoles et des isoformes II, IX et XII de l'anhydrase carbonique humaine.

## **PARTIE 2 : Etude des interactions par Résonance Plasmonique de Surface**

L'objectif de cette partie est de mettre en place une méthode permettant de mesurer les constantes cinétiques d'association et de dissociation et la constante thermodynamique de dissociation des inhibiteurs potentiel d'anhydrase carbonique avec les différentes isoformes humaine d'anhydrase carbonique (AC II, IX et XII). L'approche retenue est fondée sur l'immobilisation de l'AC sur une surface réactive. Dans un premier temps nous avons optimisé l'immobilisation des différents isoformes sur la surface réactive. Les premières études d'interaction Analyte/AC ont été réalisées sur des lames de dextran carboxyméthylé. En parallèle, l'interaction de ces mêmes composés avec les différents isoformes de l'AC a été étudiée à l'aide d'une lame de type streptavidine recouverte de dextran carboxyméthylé et pré-immobilisée avec un oligonucléotide simple brin d'ADN, qui permet l'immobilisation de protéines biotinylées en deux étapes via la formation d'un complexe Streptavidine-Biotine. Cette étude va nous permettre de comparer les performances et les constantes d'interaction obtenues selon les deux modes d'immobilisation, soit par liaison covalente, soit par capture, suivant le type de greffage utilisé.

### **5. Lames de dextran carboxyméthylé**

L'optimisation de l'immobilisation des différentes isoformes de l'AC a été réalisée pour l'AC II h, l'AC IX et l'AC XII (isoformes humaines).

#### **5.1. Lame CM5**

##### **5.1.1. Immobilisation des différentes isoformes sur la lame CM5**

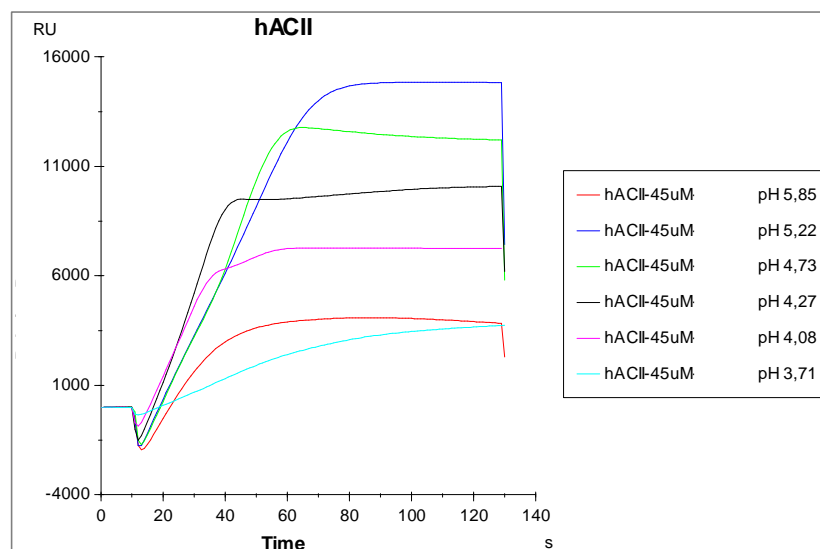
###### 1.1.1.1. Anhydrase carbonique II humaine (AC II h)

L'immobilisation d'une protéine sur une lame de type CM5 est réalisé par réaction des groupements carboxyles de la surface réactive et des groupements amino de la protéine. D'après Johnson (Johnson *et al*, 1991), l'immobilisation est favorisée, lorsque ces groupements sont fortement ionisés (formes carboxylate et ammonium quaternaire, respectivement), de sorte que les interactions électrostatiques entre ces groupements soient maximales et induisent de ce fait un phénomène de préconcentration sur la surface réactive qui favorise alors la réaction de couplage. Le pH de la solution tampon utilisée pour réaliser l'immobilisation est donc un facteur clé car il va influencer le degré d'ionisation des groupements carboxylate de la surface ( $pK_a \approx 4-5$ ) et des fonctions amine de la protéine. L'ionisation de la protéine est liée à son point isoélectrique de la

protéine qui dépend de sa structure propre. Celui de l'anhydrase carbonique de type II humaine a un pI de 7,13 alors que celui de l'AC II bovine est de 5,88 (Lecoeur *et al*, 2011). Le pH optimal choisi par J. Cannon pour immobiliser l'AC II b (pH 5), ne semble pas être le pH le plus adapté pour l'immobilisation de l'AC II h.

La première étape lors de l'immobilisation de l'AC II h sur la lame CM5 consiste donc en l'évaluation du pH optimal de la solution de protéine à immobiliser. Une procédure de « pH scouting » a été réalisée : des solutions à 45  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de protéine préparées dans des solutions tampons acétate 0,01 M de pH variables (3,71 à 5,85) ont été injectées pendant 2 minutes à 20  $\mu\text{L.min}^{-1}$  sur la cellule 4 d'une lame CM5, sans activation préalable de la surface. Ceci permet de visualiser les interactions électrostatiques entre la protéine et la surface réactive, sans qu'il ait modification de la surface, puisque ces interactions sont réversibles.

La réponse obtenue, en RU, est mesurée après le passage de chaque solution, ce qui permet de déterminer le degré d'interaction entre la protéine et la lame en fonction du pH. Les résultats obtenus pour l'AC II h sont présentés sur la figure 63.



**Figure 63 :** Etude de l'influence du pH sur la quantité d'interaction électrostatique entre l'AC II h et la lame CM5.

La réponse maximale en RU, correspondant aux interactions électrostatiques maximales entre la protéine et le dextran carboxyméthylé, est obtenue pour un pH 5,22.



Bien que les deux isoformes présentent des points isoélectriques différents, le pH optimal pour l'immobilisation est assez similaire (pH 5 pour l'AC II b et pH 5,22 pour l'AC II h). Ce qui peut être expliqué comme suit : il est connu que l'immobilisation est optimale si les interactions électrostatiques entre la protéine et les groupements carboxylates de la surface réactive sont maximales. C'est le cas lorsque la forme cationique de la protéine est prédominante et que les groupements carboxylates de la lame CM5 restent sous la forme ionisée. Si à pH 5,22, la proportion de forme cationique présente pour l'AC II h est maximale, compte tenu du  $\Delta pI$  entre les deux isoformes (= 1,33), cette proportion devrait être maximale pour l'AC II b à pH 3,90 et par conséquent, l'immobilisation devrait être plus facile au pH 3,90 plutôt qu'à pH 5. Mais à pH 3,90, le pourcentage de groupements carboxylates est plus faible qu'à pH 5, et les conditions favorables aux interactions électrostatiques ne sont pas respectées. Pour cette raison, la différence des points isoélectriques ( $\Delta pI$ ) ne peut pas être directement corrélée à la différence de pH optimal pour l'immobilisation ( $\Delta pH_{\text{immobilisation}}$ ).

Le pH 5,22 a été sélectionné pour l'immobilisation de l'AC II h. Une solution en AC II h à 45  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  est préparée dans le tampon acétate à 0,01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  à pH 5,22 et injectée à 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  pendant cinq minutes de manière à atteindre le taux d'immobilisation attendu (4500 RU). Le taux d'immobilisation obtenue est de 4460 RU.

Pour s'assurer de la répétabilité de l'immobilisation, l'AC II a été immobilisée sur trois lames CM5 différentes ; des taux d'immobilisation très proches ont été obtenus (taux d'immobilisation moyen pour l'AC II h : 4480 RU, avec un coefficient de variation inférieur à 5%).

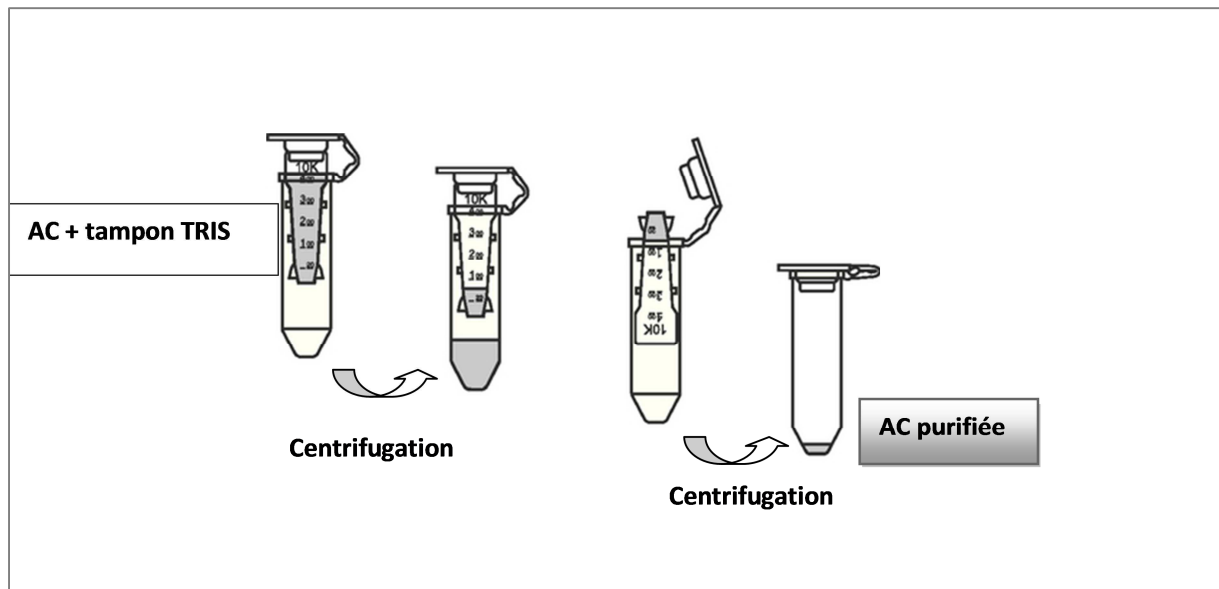
#### 1.1.1.2. Anhydrase carbonique IX humaine (AC IX h)

##### **i. Etape préliminaire : « dessalage » de la solution d'AC IX**

Avant d'optimiser l'immobilisation de l'AC IX sur la lame CM5, une étape d'élimination du tampon Tris contenant dans la solution commerciale est nécessaire afin d'éviter une compétition entre le Tris et la protéine lors de l'immobilisation sur la lame.

Le « dessalage » est réalisé à l'aide d'un système d'ultrafiltration par centrifugation commercialisé sous le nom d'Amicon Ultra<sup>®</sup> par la société Millipore (Figure 64). Il s'agit de microtubes de centrifugation composés de filtres laissant passer les composés de masse moléculaire inférieure au seuil sélectionné et d'appendorfs pouvant contenir un volume maximum de 500  $\mu\text{L}$ . Compte tenu de la masse molaire de l'AC II h, des microtubes ayant un seuil de 10 kDalton ont été

utilisés. Durant l'opération, un tube sert à collecter le filtrat et un second tube sert à récupérer l'échantillon concentré.



**Figure 64 :** Schéma d'un cycle de « dessalage » sur microtubes de purification utilisée pour la purification de l'AC IX : (AMICON Ultra<sup>®</sup> 10 kDa).

Le protocole optimisé, présenté dans la partie « matériels et méthodes », comporte deux étapes successives afin de réduire au maximum la quantité résiduelle de Tris. La protéine récupérée est ensuite diluée pour atteindre une concentration de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

## ii. Optimisation de l'immobilisation de l'AC IX h

### • Optimisation du pH d'immobilisation

Une série de solutions d'AC IX h, à une concentration constante de  $45 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , dans un tampon acétate 0,01 M de pH allant de 3,55 à 5,30, ont été réalisées à partir de la solution à  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  d'AC IX h. Après stabilisation de la ligne de base en présence de tampon de course, les différentes solutions de protéine sont successivement injectées sur la lame pendant deux minutes à  $20 \mu\text{L.min}^{-1}$ .

La réponse en RU, est mesurée après passage de chaque solution, ce qui permet de déterminer le degré d'affinité entre la protéine et la lame en fonction du pH. Les réponses obtenues ont montrées qu'un pH de 3,55 permet de maximiser les interactions électrostatiques entre la

surface de dextran carboxyméthylé et les fonctions amino de l'AC IX h. L'immobilisation de l'AC IX h par liaison covalente a donc été réalisée dans un premier temps à un pH de 3,55, à un débit de 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Ainsi, après activation de la surface par passage de solutions de NHS et d'EDC pendant sept minutes, une solution d'AC IX à 45  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  à pH 3,55 a été mise en contact avec la cellule d'intérêt pendant sept minutes à 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Pour finir, une solution d'éthanolamine est injectée pendant sept minutes. Un taux d'immobilisation de 1900 RU a été obtenu. Ce taux est largement inférieur au taux souhaité de 4500 RU permettant d'obtenir une réponse maximale de l'ordre de 35 RU pour les analytes étudiés. Le  $R_{\text{max}}$  théorique pour l'étude de l'interaction entre l'AC IX et l'AZA attendu est de 10 RU. Comme le  $R_{\text{max}}$  théorique est assez faible, il était intéressant d'augmenter le taux d'immobilisation de l'AC IX afin d'obtenir des réponses plus importantes lors des études d'interactions.

- **Optimisation des autres paramètres expérimentaux**

Afin d'obtenir un taux d'immobilisation de l'AC IX h supérieur, un essai de liaison covalente a été réalisé en faisant varier les paramètres influant le taux d'immobilisation pas à pas. Dans un premier temps, une solution d'AC IX h à une concentration de 45  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans le tampon acétate à pH 3,55 a été injectée pendant sept minutes à un débit de 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  à la température de 32°C. Une faible amélioration du taux d'immobilisation a pu être observée (2170 RU). Dans un second temps, un essai a été réalisé dans des conditions opératoires similaires, par injection d'une solution d'AC IX h plus concentrée, soit à 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Un taux d'immobilisation équivalent de 2300 RU a été obtenu.

En conclusion, les conditions retenues pour immobiliser au mieux l'AC IX h sur la lame CM5 sont les suivantes : une température de 32°C, une concentration d'AC IX h de 45  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (afin de maximiser le taux d'immobilisation en minimisant la consommation de protéine) à un pH 3,55.

La répétabilité des immobilisations a été évaluée sur trois lames CM5 différentes ; un taux d'immobilisation moyen de 2300 RU (CV < 5%) a alors été obtenu.

#### 5.1.1.3. Anhydrase carbonique XII h (AC XII h)

Le point isoélectrique de l'anhydrase carbonique de type XII a été évalué à 7,93 par Lecoer *et al* (Lecoer *et al*, 2011). Pour les mêmes raisons que précédemment, une étude de l'influence du pH sur l'amplitude des interactions électrostatiques entre la surface de dextran carboxyméthylée et l'AC XII h a été réalisée. Une série de solution à 45  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  d'AC XII humaine préparée dans des

solutions tampon acétate de pH compris entre 3,5 et 6 ont été injectées pendant deux minutes à 20  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Les réponses les plus élevées ont été obtenues pour les pH 5,03 et 4,50. A pH 4,50 le plateau est plus vite atteint en raison d'une cinétique d'interaction plus importante. Ce pH a donc été sélectionné pour l'immobilisation de l'AC XII h. Une solution en AC XII h à 45  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a été préparée dans le tampon acétate à 0,01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  à pH 4,50, puis injectée pendant trois minutes à un débit de 5  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Un taux d'immobilisation moyen de 3100 RU (CV < 5 %, 3 lames différentes) a été obtenu.

### **5.1.2. Optimisation des conditions opératoires pour les études d'interaction analyte/AC**

#### **5.1.2.1. Choix de la cellule de référence**

Afin de s'affranchir des variations de l'angle de résonance non liées à une reconnaissance moléculaire. Plusieurs choix peuvent être faits lors de la préparation de la cellule de référence. Le premier choix consiste à ne rien immobiliser sur la cellule de référence tout en faisant subir à cette cellule le même traitement que les autres cellules de mesure (étapes d'activation et de désactivation, sans que la protéine ne soit injectée). Cette approche utilisée pour l'étude de l'AC II b en accord avec les recommandations de J. Cannon, est largement décrite dans la littérature (Day *et al*, 2002, Papalia *et al*, 2006, Navratilova *et al*, 2007, Cannon *et al*, 2004). La seconde approche consiste en l'immobilisation dans le cas présent de la protéine dénaturée ou d'une protéine mutante afin de s'affranchir des interactions non spécifiques. Notons que la première approche, qui est la plus simple, est suffisante lorsqu'aucune interaction non spécifique avec la protéine n'est mise en jeu.

Afin de mener à bien l'étude des interactions spécifiques des composés d'intérêts avec les isoformes de l'AC, deux cellules de référence distinctes ont été utilisées. La première obtenue selon le protocole reposant sur une activation/désactivation simple de la surface et la seconde sur l'immobilisation de l'AC II h dénaturée. L'AC II h dénaturée a été obtenue par chauffage pendant cinq minutes à 100°C de la solution d'AC II h native à 45  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dans le tampon acétate 0,01 M à pH 5,5.

Le tableau X présente le schéma d'immobilisation mis en œuvre sur la lame CM5 pour mener à bien cette étude. Les différents taux d'immobilisation atteints sont précisés tableau 53.

Cellules	Protéines immobilisées (Taux d'immobilisation)
Fc 1	Cellule de référence N°1 : cellule non immobilisée
Fc 3	Cellule de référence N°2 : AC II h dénaturée (4609 Ru)
Fc 4	AC II h native (4460 Ru)

**Tableau 53:** Lame CM5 utilisée pour l'étude sur le choix de la référence.

Une série de solutions d'AZA et d'Alica 13 de concentration allant de 0 à 0,25  $\mu\text{M}$  ont été préparée par dilutions successives, dans le tampon de course, des solutions mères à 10 mM préparées dans le DMSO. Chaque solution a été injectée en triple et de manière randomisée en utilisant le protocole suivant (tableau 54).

<b>Température</b>	<b>298 K</b>
<b>Injection et détection</b>	Fc 1, 2, 3, 4 (circulation en série des échantillons)
<b>Débit</b>	100 $\mu\text{L. min}^{-1}$
<b>Mode d'injection</b>	Kinject
<b>(1) Injection du tampon de course</b>	2,5 min (ligne de base ; avant l'injection de l'analyte)
<b>(2) Injection de l'analyte</b>	1 min (étape d'association)
<b>(3) Injection du tampon de course</b>	7 min (étape de dissociation après l'injection de l'analyte)

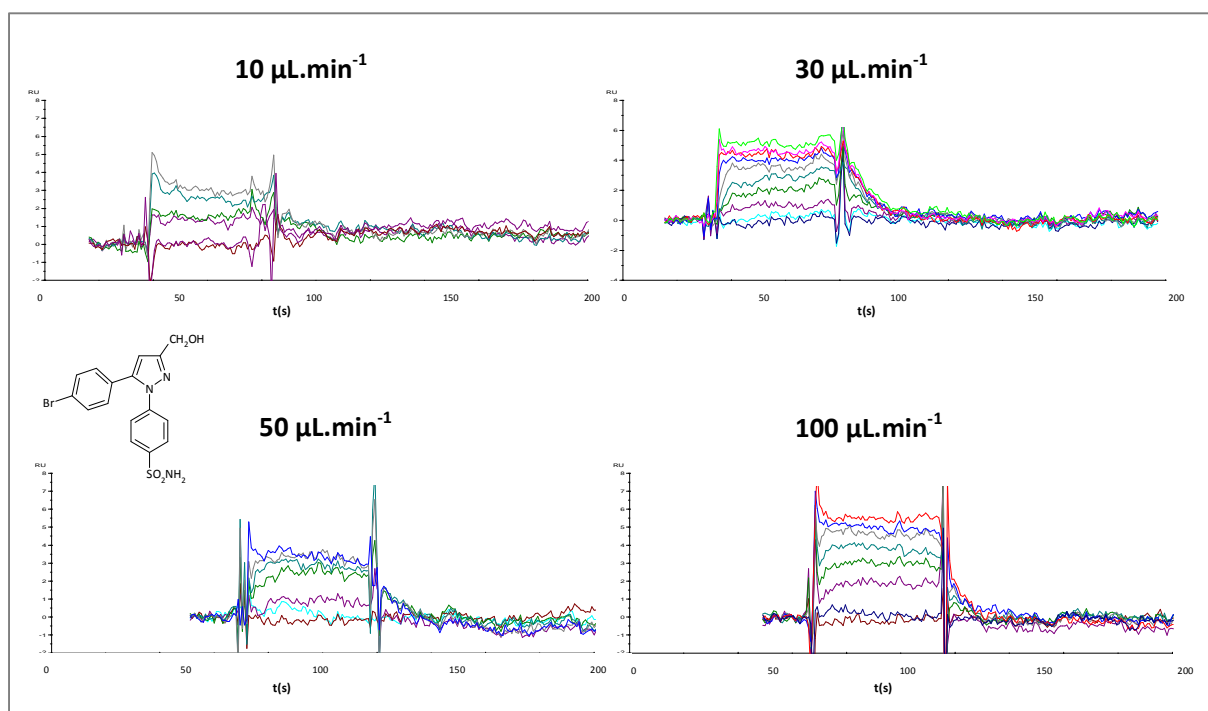
**Tableau 54 :** Conditions opératoire pour l'étude sur le choix de la référence sur lame CM5.

Les réponses brutes obtenues sur la cellule de mesure (Fc4) ont été retraitées selon le protocole classique après soustraction des réponses obtenues soit sur la cellule de référence N°1 (Fc1) ou N°2 (Fc3). Les sensorgrammes obtenus (Fc4-Fc1 et Fc4-Fc3) ne sont significativement différents en ce qui concerne les réponses maximales ( $R_{\text{max}}$ ), la forme des courbes ou encore en terme de corrélation concentration de l'analyte/réponse. De plus, la saturation de la cellule 4 a été obtenue dans les deux cas. Ces résultats confirment la spécificité de l'interaction entre les composés étudiés et l'AC II h.

La référence N°1 a finalement été sélectionnée pour l'étude des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles et des trois isoformes de l'AC. Elle permet de réduire la consommation d'AC et sa mise en œuvre est plus simple et reproductible.

#### 5.1.2.2. Influence du débit

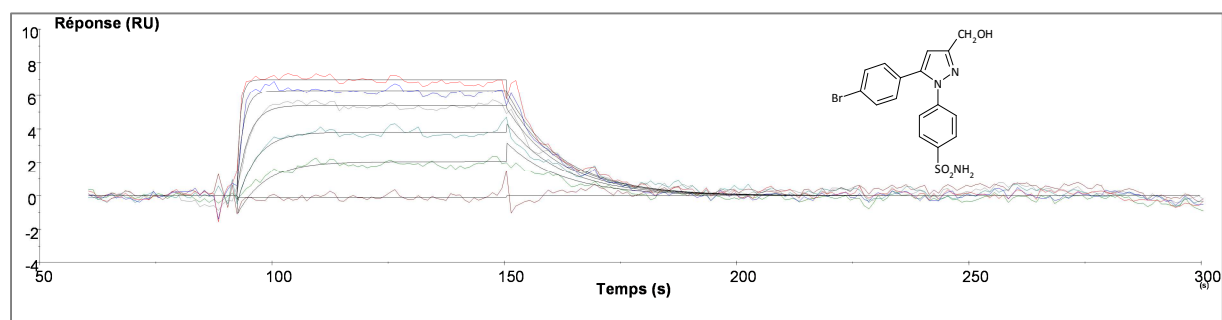
Dans un premier temps, les études d'affinités pour les trois isoformes ont été étudiées au même débit utilisé pour les études de l'AC II b ( $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Or, lors des premiers essais réalisés, il a été noté la présence d'artefacts au niveau des signaux correspondant à l'association et à la dissociation, néfaste pour le traitement mathématique, notamment dans le cas de l'AC IX (en raison d'un taux d'immobilisation relativement faible). Une étude préliminaire a donc été réalisée afin de définir le débit de travail optimal permettant d'obtenir les meilleurs profils d'interaction. L'influence du débit d'analyse sur l'allure des sensorgrammes a été étudiée dans le cas de l'AC IX h immobilisée à un taux de 2300 RU. L'Alipk 177 a été utilisée comme molécule de référence pour cette étude. Les sensorgrammes obtenus à  $10, 30, 50$  et  $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  sont donnés figure 65.



**Figure 65** : Sensorgrammes obtenus à différents débits lors de l'étude de l'affinité de l'Alipk 177 (gamme de concentration :  $0 - 1 \mu\text{M}$ ) avec l'AC IX h (taux d'immobilisation de 2300 Ru).

A 50  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  des pics parasites persistent à l'association et la dissociation. A 10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , un pic en fin d'injection est observé.

Le meilleur profil d'interaction a été obtenu pour un débit de 30  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ . Les constantes cinétiques d'association et de dissociation de l'Alipk177/AC IX ont été déterminées à ce débit (figure 66 et tableau 55).



**Figure 66 :** Sensorgrammes obtenus lors de l'étude de l'interaction de l'Alipk 177 / AC IX à un débit de 30  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , 2300 RU.

Débit	$k_a$ ( $10^6 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$k_d$ ( $10^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	$K_D = k_d/k_a$ (nM)
30 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	$0,99 \pm 0,2$	$6,34 \pm 2,2$	$69,7 \pm 8$

**Tableau 55 :** Constantes cinétique caractéristiques de l'interaction Alipk 177/AC IX déterminée à un débit de 30  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , taux d'immobilisation : 2300 RU.

Une constante thermodynamique de dissociation de 69,7 nM a été obtenue pour l'interaction de Alipk 177/AC IX à partir des constantes cinétiques. Cette valeur est en accord avec celle déterminée à l'équilibre.

Un débit de 30  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  sera alors utilisé par la suite pour les études d'interaction entre les quatre analytes et les trois isoformes.

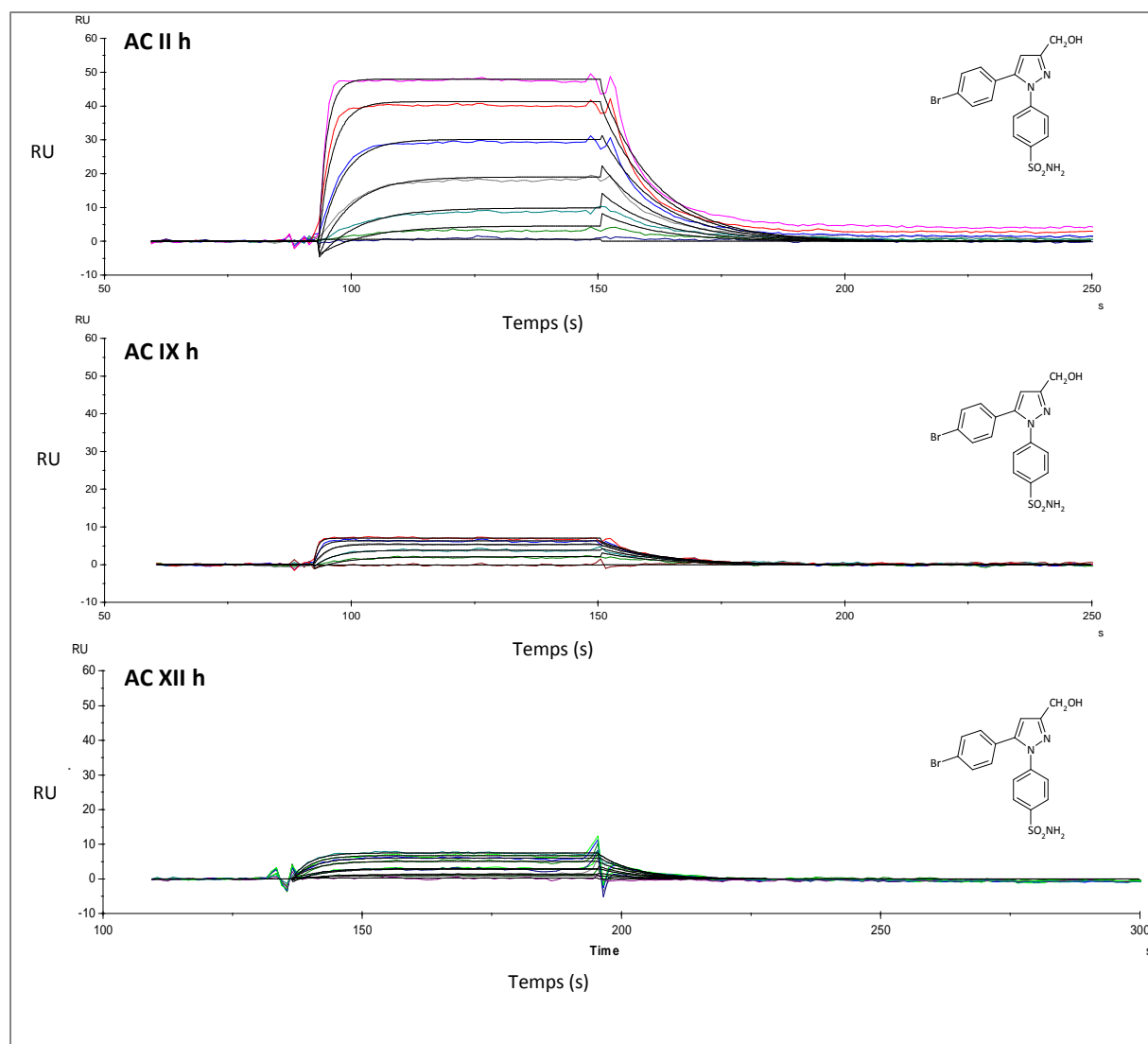
### 5.1.3. Interaction des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles et des différentes isoformes de l'AC

Afin d'étudier simultanément l'affinité des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles pour les trois isoformes de l'Anhydrase Carbonique, l'AC IX h, l'AC II h et l'AC XII h ont été immobilisées sur une même lame CM5, selon les conditions décrites précédemment (taux d'immobilisation : AC II h-4480 RU ; AC IX h-2100 RU ; AC XII h-3100 RU).

Les quatre composés étudiés dans la première partie de ce chapitre ont fait l'objet de l'étude d'interaction avec les trois isoformes de l'AC. Pour chaque analyte, une série de solutions a été préparés par dilutions successives dans le tampon de course : AZA et Alica 13 : 0-0,25  $\mu\text{M}$  ; Alipk 41 : 0-0,075  $\mu\text{M}$  et Alipk 177 : 0-1  $\mu\text{M}$ . Chaque solution a été injectée en triple et de manière randomisée en utilisant le protocole décrit précédemment (page 170) à l'exception du débit fixé à 30  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  (tableau 56).

A titre d'exemple, les sensorgrammes obtenus pour l'interaction de l'Alipk 177 avec l'AC II h, l'AC IX h et l'AC XII h sont présentés figure 67. Les profils expérimentaux sont présentés en couleur, alors que les ajustements résultant du traitement mathématique global de l'ensemble des profils avec un modèle incluant le transfert de masse limitant (voir chapitre 1), apparaissent en noire sur les sensorgrammes. Les sensorgrammes des autres composés étudiés sont donnés annexe 3.





**Figure 67** : Sensorgrammes obtenus pour l'Alipk 177 avec l'AC II h, l'AC IX h, et l'AC XII h ; tampon PBS 1X, 1% DMSO. En couleur : profils expérimentaux ; en noir : ajustements.

Les profils d'interaction varient selon les composés et l'isoforme étudiée. Comme attendu, étant donné que l'AC IX h (2100 RU) et l'AC XII h (3100 RU) ont un taux d'immobilisation plus faible que l'AC II h (4480 RU), les  $R_{\max}$  obtenus pour l'AC IX h ( $R_{\max} = 5,4$  RU) et l'AC XII h ( $R_{\max} = 8,2$  RU) sont beaucoup plus faibles que pour l'AC II h ( $R_{\max} = 48,7$  RU).

Bien que les réponses obtenues pour l'AC IX h et l'AC XII h soient faibles, les constantes cinétiques d'association et de dissociation et les constantes thermodynamiques de dissociation des complexes analyte/AC ( $K_D = K_d/k_a$ ) ont pu être déterminées. Pour ce faire, les courbes obtenues aux concentrations les plus basses pour l'AC IX h et l'AC XII h ont été exclues lors du traitement

mathématique car trop proche du bruit de fond. Les constantes obtenues sont données dans le tableau 56 pour les quatre composés étudiés.

Composé	AC II h			AC IX h			AC XII h		
	$k_a$ ( $10^6 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$k_d$ ( $10^{-2} \cdot s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)	$k_a$ ( $10^6 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$k_d$ ( $10^{-2} \cdot s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)	$k_a$ ( $10^6 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$k_d$ ( $10^{-2} \cdot s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)
<b>AZA</b>	1,7 ± 0,7	3,4 ± 2,0	20 ± 15	1,2 ± 0,5	9,5 ± 1,1	48 ± 9	1,4 ± 0,2	9 ± 0,9	66 ± 8
<b>Alica 13</b>	5,0 ± 0,9	2,9 ± 0,7	6 ± 4	1,0 ± 0,3	5,5 ± 0,9	54 ± 11	0,6 ± 0,2	42 ± 10	756 ± 300
<b>Alipk 41</b>	0,8 ± 0,2	14,5 ± 1,0	177 ± 44	1,2 ± 0,9	8,7 ± 1,3	700 ± 54	0,5 ± 0,05	21 ± 10	400 ± 83
<b>Alipk 177</b>	0,4 ± 0,1	10,9 ± 0,6	299 ± 25	1,3 ± 0,7	8,5 ± 0,8	66 ± 23	0,2 ± 0,04	7 ± 2	305 ± 144

**Tableau 56 :** Constantes cinétiques et thermodynamiques caractéristiques de l'interaction des composés étudiés avec les trois isoformes de l'AC immobilisées sur la lame CM5.

L'ensemble des composés présentent des constantes thermodynamiques de dissociation ( $K_D$ ) de l'ordre du nanomolaire pour les trois isoformes. Les constantes cinétiques d'association sont comprises entre 0,2 à  $1,7 \cdot 10^6 M^{-1} \cdot s^{-1}$ , les constantes cinétiques de dissociation entre 2,9 à  $10,9 \cdot 10^{-2} s^{-1}$  et les constantes thermodynamiques de dissociation entre 6 et 756 nM. On peut noter que les valeurs de  $K_D$  obtenues pour l'AZA, l'Alica 13 et l'Alipk 41 avec l'AC II h sont proches des valeurs obtenues pour ces mêmes composés avec l'AC II b, respectivement de  $29 \pm 7$ ,  $9 \pm 3$  et  $157 \pm 46$  nM. Seule la constante obtenue pour l'Alipk 177 est différente ( $125 \pm 25$  nM avec l'AC II b). Cependant l'échelle d'affinité des quatre composés est inchangée.

Une sélectivité AC IX *versus* AC II est obtenue pour l'Alipk 177. Une sélectivité non recherchée, AC II *versus* AC IX est obtenue pour les trois autres composés : AZA, Alica 13 et Alipk 41.

Cependant, les incertitudes sur les constantes sont relativement élevées, surtout pour les composés ayant peu d'affinité pour certaines isoformes de l'AC. C'est le cas par exemple de l'Alica 13 et de l'AC XII h ( $K_D = 756 \pm 300$ ). L'immobilisation d'une quantité d'AC plus importante pourrait pallier à ce problème grâce à l'obtention de réponses supérieures. C'est dans ce but que l'utilisation d'une lame CM7 ayant une capacité d'immobilisation plus élevée que la lame CM5, a été proposée.

## 5.2. lame CM7

### 5.2.1. Immobilisation des différentes isoformes sur la lame CM7

La nature de la lame CM7 étant équivalente à celle de la lame CM5 (dextran carboxyméthylé), nous avons choisi de réaliser l'immobilisation des trois isoformes de l'anhydrase carbonique aux pH optimaux retenus pour chaque isoforme sur la lame CM5, soit respectivement à pH 5,22 ; 3,55 et 4,50 pour l'AC II h, AC IX h et AC XII h. La température a été fixée à 32°C. La concentration des solutions d'AC II h, AC IX h et d'AC XII h a été fixée à 45 µg.mL<sup>-1</sup>. Le tableau 57 regroupe les conditions et les taux d'immobilisation pour les différentes isoformes (tableau 57).

	AC II h	AC IX h	AC XII h
<b>Cellule</b>	Fc4	Fc2	Fc3
<b>Concentration</b>	45 µg.mL <sup>-1</sup>	45 µg.mL <sup>-1</sup>	45 µg.mL <sup>-1</sup>
<b>pH d'immobilisation</b>	5,22	3,55	4,50
<b>Débit</b>	5 µL.min <sup>-1</sup>		
<b>Temps d'injection</b>	3 minutes		
<b>Taux d'immobilisation</b>	6041 RU	8448 RU	6734 RU

**Tableau 57 :** Conditions optimales d'immobilisation et taux d'immobilisation obtenus lors de l'immobilisation des 3 isoformes sur la lame CM7.

Pour l'ensemble des isoformes, les taux d'immobilisation obtenus après une injection de 3 minutes sont supérieurs aux taux d'immobilisation moyens obtenus sur CM5 respectivement égaux à 4600, 2300 et 3100 RU pour l'AC II h, l'AC IX h et l'AC XII. Ainsi, dans le cas de l'AC IX h et l'AC XII h, les taux d'immobilisation sur CM7 sont plus de deux fois supérieurs. A titre d'exemple, de tels taux d'immobilisation devraient permettre d'obtenir pour l'AZA, des R<sub>max</sub> théoriques d'environ 45 RU pour les trois isoformes.

### 5.2.2. Interaction des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles et des différentes isoformes de l'AC

L'immobilisation de l'AC IX h, l'AC XII h et l'AC II h sur une même lame CM7 respectivement sur les cellules, Fc2, Fc3 et Fc4 (Fc1 = cellule de référence) a permis d'étudier simultanément

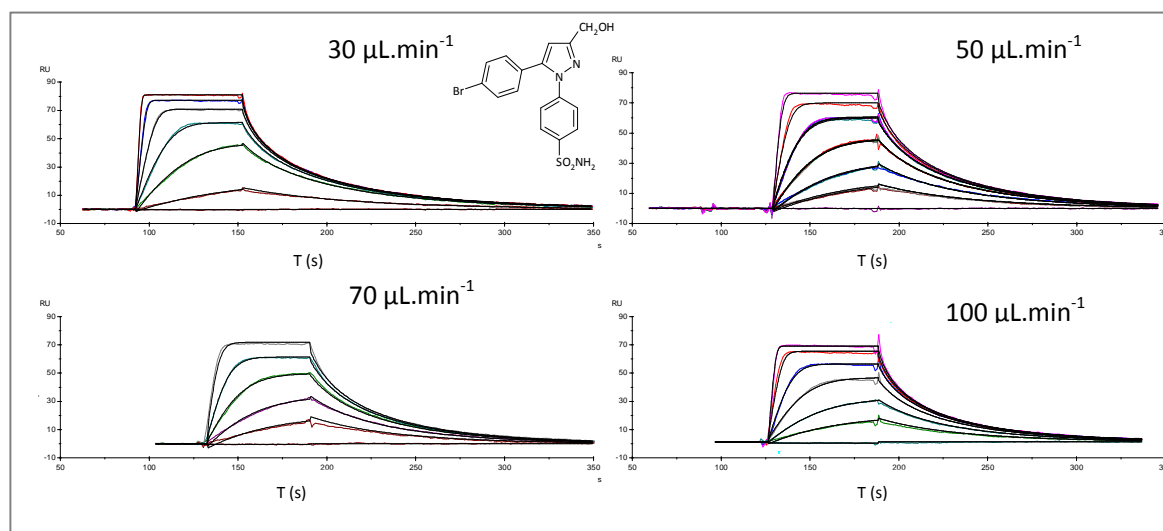
l'interaction d'une série de neuf dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles avec ces isoformes. Parmi ceux-ci, certains possèdent un centre d'asymétrie. Chaque isomère a donc été étudié afin d'évaluer le caractère énantiosélectif de l'interaction

La structure des différents composés étudiés est donnée dans la partie « matériels et méthodes ».

### 5.2.2.1. Optimisation du débit d'analyse

Les conditions opératoires ont été optimisées pour que le transfert de masse ne soit pas limitant. Or, le transfert de masse peut devenir d'autant plus limitant que le taux d'immobilisation est élevé, ce qui est le cas sur la lame CM7. Une étude préliminaire a donc été réalisée afin de définir le débit de travail optimal.

L'influence du débit d'analyse sur l'allure des sensorgrammes a été étudiée dans le cas de l'AC IX h dont le taux d'immobilisation est le plus élevé (transfert de masse potentiellement le plus limitant). L'Alipk 177 a été utilisée comme molécule de référence pour cette étude. Les sensorgrammes obtenus à 30, 50, 70 et 100  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  sont donnés figure 68.

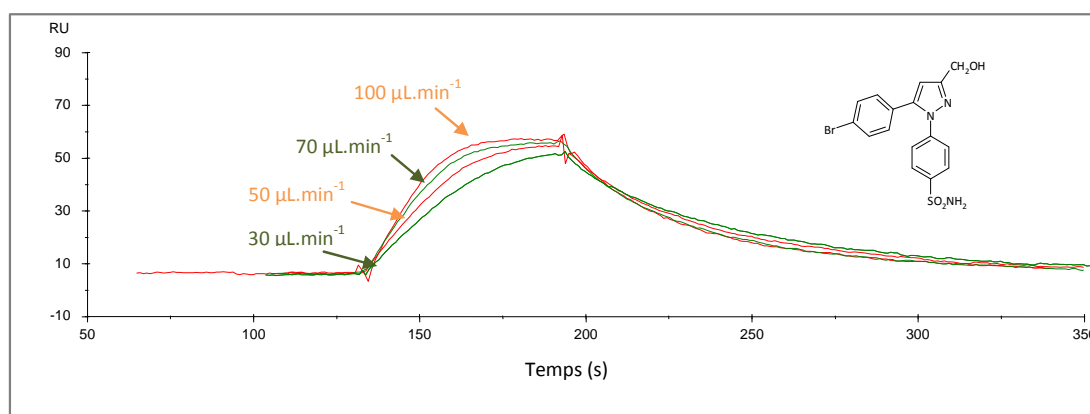


**Figure 68:** Sensorgrammes obtenus lors de l'étude de l'affinité de l'Alipk 177 avec l'AC IX à différents débits, 8448 RU d'immobilisation ; gamme de concentration : 0,015 à 4  $\mu\text{M}$ .

Les sensorgrammes obtenus montrent un cycle complet d'interaction avec un plateau atteint lors de l'association aux concentrations les plus hautes et une dissociation complète après le passage du tampon de course et.

Pour les concentrations les plus élevées, les profils obtenus aux débits les plus faibles (30 et 50  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) sont « carrés », contrairement à ceux obtenus aux débits plus élevés. Ceci semble présager d'un phénomène de transfert de masse limitant qui est plus important aux faibles débits en raison de l'épaisseur plus importante de la couche de diffusion.

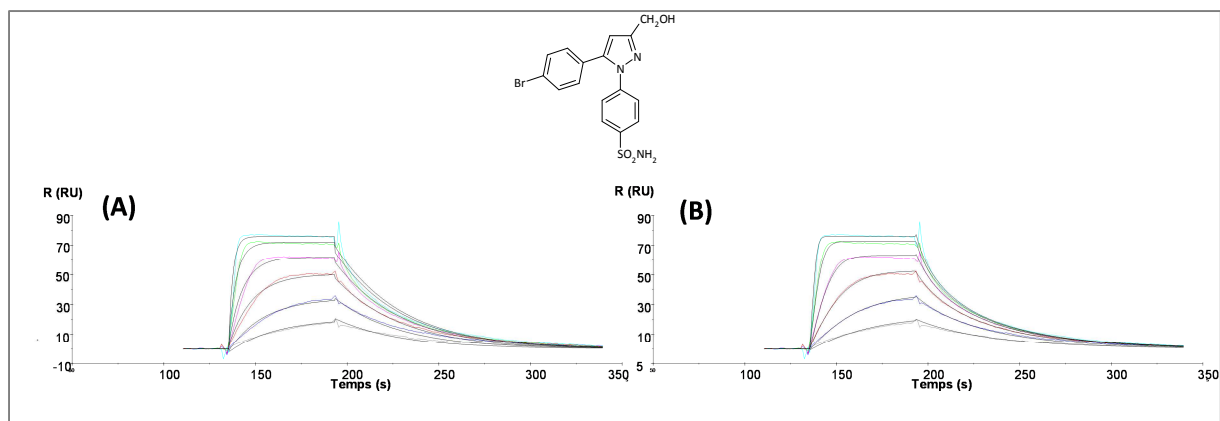
Si l'on superpose les sensorgrammes obtenus lors de l'injection de l'Alipk 177 à 4  $\mu\text{M}$ , aux quatre débits étudiés (figure 69), il apparaît clairement que les profils ne sont pas superposables, donc qu'un phénomène de transfert de masse limitant est mis en jeu. Bien que les profils obtenus à 70 et 100  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  soient relativement proches, il n'est pas possible d'affirmer qu'un débit de 100  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  permette de s'affranchir complètement de ce phénomène.



**Figure 69** : Superposition des sensorgrammes obtenus lors l'injection de 4  $\mu\text{M}$  d'Alipk 177 à 4 débits différents, 30, 50, 70 et 100  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Un débit de 100  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  sera utilisé afin de diminuer au maximum l'épaisseur de la couche de diffusion et de minimiser au maximum l'impact de ce phénomène puisqu'il s'agit du débit maximal que peut atteindre l'appareil.

Pendant, afin de vérifier si le transfert de masse est toujours limitant au débit maximal de 100  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , les données ont été traitées avec les modèles incluant ou non le transfert de masse. Les profils de l'ajustement obtenus avec les deux modèles sont donnés figure 70 ; les sensorgrammes apparaissent en couleurs, alors que les ajustements apparaissent en noirs.



**Figure 70:** Sensorgrammes obtenus lors de l'étude de l'affinité de l'Alipk 177 avec l'AC IX, (A) traitement mathématique n'incluant pas le transfert de masse, (B) traitement mathématique incluant le transfert de masse,  $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , 8448 RU d'immobilisation ; gamme de concentration : 0,015 à  $4 \mu\text{M}$ .

Si le transfert de masse n'est pas pris en compte, la qualité de l'ajustement obtenu entre les profils expérimentaux et le modèle est « moins bon » (écart plus important entre les courbes théoriques et les courbes expérimentales). Il semblerait donc qu'à  $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  le transfert de masse reste limitant. Il devra donc être pris en compte lors du traitement des données par le logiciel Bieval.

Dans le cas présent, les constantes obtenues aux différents débits en incluant le transfert de masse lors du traitement des résultats par Bieeval sont données tableau 58.

Débit	$k_a (10^6 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$k_d (10^{-2} \cdot \text{s}^{-1})$	$K_D = k_d/k_a \text{ (nM)}$
$30 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	3,23	1,32	41
$50 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	1,57	0,63	40
$70 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	3,37	1,17	35
$100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$	2,16	0,81	38

**Tableau 58 :** Constantes cinétiques et thermodynamiques de l'interaction Alipk 177/AC IX déterminées à différents débits.

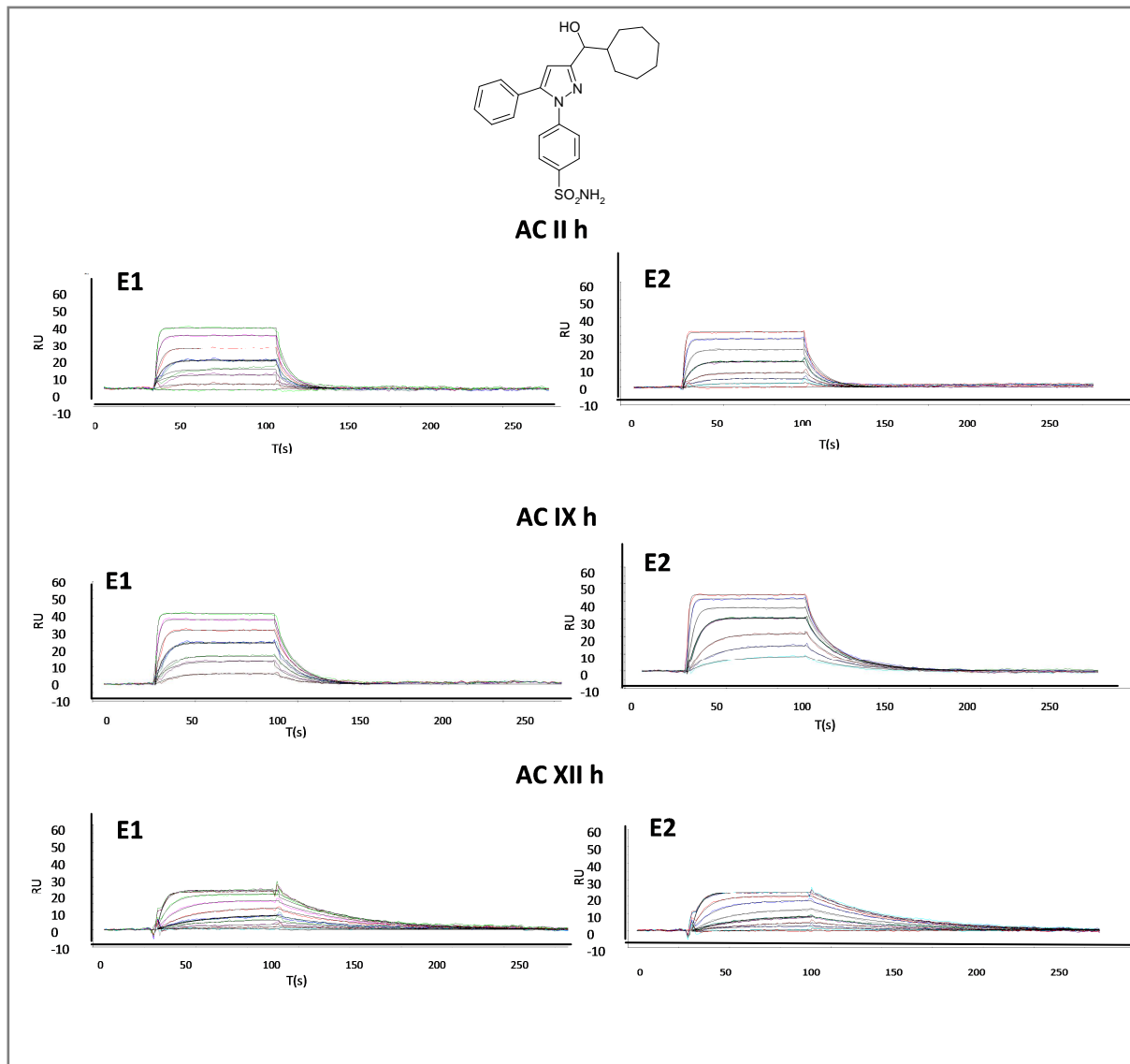
Lorsque le modèle incluant le transfert de masse est utilisé, les constantes thermodynamiques de dissociation ( $K_D$ ) du complexe Alipk 177/AC IX peuvent être considérées équivalentes et donc indépendantes du débit car le coefficient de variation obtenu ( $CV = 13\%$ ) est de l'ordre de l'incertitude de la méthode.

#### 5.2.2.2. Affinité des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles pour AC IX h, l'AC XII h et AC II h

Les gammes de concentration ont été choisies de sorte que la saturation des trois surfaces immobilisées soit atteinte, elles sont regroupées en annexe 3. Notons que des concentrations élevées (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ) sont injectées pour atteindre la saturation des surfaces, compte tenu des taux d'immobilisation importants sur la lame CM7.

Pour l'ensemble des analytes, chaque solution a été injectée en triple et de manière randomisée en utilisant le protocole décrit précédemment (page 170).

A titre d'exemple, les sensorgrammes et les ajustements obtenus pour les énantiomères de l'Alica 87 avec les trois isoformes de l'AC sont présentés sur la figure 71. Dans le cas présent, la saturation de la surface a été atteinte pour les trois isoformes étudiées pour des concentrations supérieures ou égales à  $1 \mu\text{M}$ .



**Figure 71** : Sensorgrammes (en couleur) et ajustements (en noir) obtenus pour les études d'affinité des composés Alica 87 E1 (à gauche) et E2 (à droite) et avec l'AC II, IX et XII.; gamme de concentration : 0,03 à 2  $\mu$ M.

Comme attendu, pour chaque isoforme, la réponse maximale mesurée est identique pour les deux énantiomères. En revanche, les pentes des profils ne sont pas toujours équivalentes, traduisant ainsi des cinétiques d'interaction différentes. C'est notamment le cas pour les deux énantiomères de l'Alica 87 interagissant avec l'AC IX h, pour lesquels les profils cinétiques de dissociation sont graphiquement distincts. Ce résultat a été confirmé par le calcul de constantes cinétiques de dissociation (tableau 59).



Pour un même énantiomère, la réponse maximale,  $R_{max}$ , obtenue à saturation varie selon l'isoforme considérée (52 RU, 49 RU et 31 RU pour l'AC II h, AC IX h et AC XII h, respectivement). Les profils cinétiques montrent par ailleurs des pentes différentes.

Les constantes cinétiques d'association et de dissociation ont été déterminées à l'aide du logiciel Biaeval selon une approche globale, à partir des sensorgrammes pour lesquels la saturation n'avait pas été atteinte. Les constantes thermodynamiques de dissociation du complexe ont ensuite été calculées à partir des constantes cinétiques. L'ensemble des résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 59.

Composés	AC II h			AC IX h			AC XII h		
	$k_a (10^6 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1})$	$k_d (10^{-2} \cdot s^{-1})$	$K_D$ (nM)	$k_a (10^6 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1})$	$k_d (10^{-2} \cdot s^{-1})$	$K_D$ (nM)	$k_a (10^6 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1})$	$k_d (10^{-2} \cdot s^{-1})$	$K_D$ (nM)
<b>AZA</b>	1,03 ± 0,10	0,02 ± 0,01	20 ± 3	1,98 ± 0,21	0,05 ± 0,0	24 ± 4	1,40 ± 0,12	0,09 ± 0,01	69 ± 9
<b>Alica 13</b>	3,61 ± 0,95	0,02 ± 0,01	6 ± 2	4,27 ± 0,32	0,15 ± 0,01	36 ± 5	0,65 ± 0,04	0,42 ± 0,05	786 ± 29
<b>Alipk 177</b>	0,38 ± 0,08	0,08 ± 0,02	212 ± 21	1,20 ± 0,22	0,04 ± 0,01	34 ± 4	0,21 ± 0,04	0,07 ± 0,02	340 ± 15
<b>Alica 87 E1</b>	0,18 ± 0,04	0,06 ± 0,01	352 ± 33	0,21 ± 0,04	0,04 ± 0,01	165 ± 26	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	725 ± 58
<b>Alica 87 E2</b>	0,19 ± 0,05	0,05 ± 0,01	242 ± 45	0,24 ± 0,04	0,08 ± 0,01	339 ± 56	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	520 ± 76
<b>Alica 76 E1</b>	0,29 ± 0,03	0,09 ± 0,03	308 ± 43	0,76 ± 0,12	0,13 ± 0,03	166 ± 32	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,01	487 ± 48
<b>Alica 76 E2</b>	0,24 ± 0,04	0,07 ± 0,02	315 ± 45	0,28 ± 0,04	0,09 ± 0,02	311 ± 27	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	611 ± 69
<b>Alica 203 E1</b>	0,45 ±	0,11 ± 0,02	246 ± 33	0,41 ± 0,06	0,07 ± 0,01	165 ± 15	0,07 ± 0,02	0,02 ± 0,01	363 ± 31
<b>Alica 203 E2</b>	0,44 ± 0,05	0,06 ± 0,01	145 ± 24	0,43 ± 0,06	0,10 ± 0,02	229 ± 16	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01	303 ± 57
<b>Alica 94 E1</b>	0,66 ± 0,08	0,15 ± 0,03	221 ± 35	1,20 ± 0,10	1,04 ± 0,12	86 ± 13	0,13 ± 0,03	2,92 ± 0,55	219 ± 42
<b>Alica 94 E2</b>	0,95 ± 0,10	0,12 ± 0,02	132 ± 24	1,94 ± 0,07	0,12 ± 0,02	60 ± 5	0,12 ± 0,02	0,03 ± 0,01	214 ± 34
<b>Alica 23 E1</b>	0,97 ± 0,12	0,10 ±	98 ± 12	0,90 ± 0,04	0,10 ± 0,03	108 ± 17	0,10 ± 0,01	0,02 ± 0,01	246 ± 25
<b>Alica 23 E2</b>	0,17 ± 0,03	0,13 ± 0,01	743 ± 65	0,37 ± 0,03	0,05 ± 0,01	147 ± 25	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,01	572 ± 75
<b>Alica 15 E1</b>	0,97 ± 0,02	0,33 ± 0,05	336 ± 23	0,63 ± 0,07	0,10 ± 0,01	164 ± 12	0,09 ± 0,03	0,07 ± 0,02	725 ± 54
<b>Alica 15 E2</b>	0,37 ± 0,05	0,27 ± 0,06	734 ± 65	0,75 ± 0,05	0,06 ± 0,01	83 ± 6	0,08 ± 0,02	0,04 ± 0,01	469 ± 3

**Tableau 59** : Constantes cinétiques et thermodynamiques caractéristiques de l'interaction des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles et des trois isoformes de l'AC immobilisées sur la lame CM7.

Les composés d'intérêt étudiés présentent des constantes de dissociation distinctes allant de 33,9 à 339 nM pour l'AC IX (facteur 10), de 214 à 786 nM pour l'AC XII (facteur 4) et de 5,63 à 743 nM pour l'AC II (facteur 130). La gamme d'affinité de ces composés pour l'AC II est ainsi la plus étendue.

Pour l'ensemble des composés, l'affinité mesurée pour l'AC XII h est plus faible que pour l'AC IX h et l'AC II h. Seuls les composés Alica 94 E1 et E2 présentent des affinités inférieures à 220 nM pour cette isoforme.

Les affinités des composés pour l'AC IX h et l'AC II h semblent quant à elles varier de manière aléatoire. Par ailleurs, si l'on établit une classification des composés selon leur affinité respective pour chacune des isoformes, les échelles obtenues pour les trois isoformes ne sont pas identiques.

Les composés originaux présentant les meilleures affinités pour l'AC IX sont l'Alipk 177 ( $K_D=33,9$  nM) et l'Alica 13 ( $K_D=35,9$  nM) qui se distinguent des autres composés au niveau du noyau pyrazole. Ces composés sont substitués par un alcool primaire au niveau du pyrazole, contrairement aux autres dérivés substitués par un alcool secondaire. Les composés Alica 94 E1 et E2 et Alica 15 E2 présentent également des affinités intéressantes pour l'AC IX avec une constante thermodynamique de dissociation inférieure à 100 nM.

Si l'on s'intéresse à l'influence de la configuration absolue des composés sur l'affinité, il apparaît que pour certaines isoformes des affinités différentes sont obtenues pour les énantiomères d'un même couple. Pour un même couple, l'énantiosélectivité n'est pas forcément observée pour les trois isoformes. Par exemple, les deux énantiomères de l'Alica 23 présentent une affinité proche pour l'AC IX ( $K_D$  de 108 et 147 nM pour E1 et E2) alors qu'une énantiosélectivité élevée (facteur 7) est observée pour l'AC II ( $K_D$  de 98 nM pour l'E1 et 743 nM pour l'E2). Pour l'AC IX, les composés Alica 87, Alica 76 et Alica 15 présentent une énantiosélectivité d'environ de 2. Les composés étant moins affins pour l'AC XII, l'énantiosélectivité est donc moins marquée pour cette isoforme. Cette étude montre donc l'intérêt de déterminer les affinités des différents énantiomères.

Rappelons qu'en raison de sa surexpression dans les cellules cancéreuses et de son absence dans les cellules saines, l'AC IX est l'isoforme d'intérêt, soit la cible thérapeutique à atteindre, contrairement à l'AC II qui est ubiquitaire. Des composés ayant une affinité sélective pour l'AC IX *versus* l'AC II sont donc recherchés afin de réduire les effets secondaires. Il est donc nécessaire d'évaluer la sélectivité des composés pour ces deux isoformes par le calcul du ratio  $K_{D\ AC\ II}/K_{D\ AC\ IX}$ . Le tableau 60 regroupe les sélectivités calculées pour les différents composés.

Composé	Alica 13	Alica 203 E2	Alica 87 E2	AZA	Alica 23 E1	Alica76 E2	Alica 76 E1	Alica 203 E1	Alica 15 E1	Alica 87 E1	Alica 94 E2	Alica 94 E2	Alica 23 E2	Alipk 177	Alica 15 E2
Sélectivité AC II/AC IX	0,16	0,63	0,71	0,86	0,97	1,01	1,90	1,94	2,05	2,10	2,20	2,60	5,05	5,80	8,84

**Tableau 60** : Sélectivités AC IX versus AC II calculées pour la série de composés étudiés.

Ainsi, les composés Alica 15 E1 et E2, Alica 87 E1, Alica 94 E1 et E2, l'Alica 23 E2 et l'Alipk 177 présentent une sélectivité AC IX versus AC II supérieur à 2.

Quatre dérivés semblent donc les plus prometteurs en terme d'affinité pour l'AC IX et de sélectivité AC IX versus AC II : l'Alipk 177, les deux énantiomères de l'Alica 94, et l'énantiomère E2 de l'Alica 15. Ces composés ont un  $K_D$  inférieur à 83 nM et une sélectivité AC IX versus AC II au moins égale à 2,2. Parmi ces composés, l'énantiomère E2 de l'Alica 15 présente la meilleure sélectivité AC IX versus AC II (8,8) avec une affinité de 83 nM pour l'AC IX. L'Alipk 177 présente la meilleure affinité pour l'AC IX ( $K_D = 33,9$  nM) et une sélectivité AC IX versus AC II intéressante de 5,8.

Les deux composés (Alipk 177 et énantiomère 2 de l'Alica 15) émergent de notre série de dérivés. L'Alipk 177 est plus affin ( $K_D = 34$  nM) que l'énantiomère 2 de l'Alica 15 ( $K_D = 83$  nM) pour l'AC IX. Pour aller plus loin dans le choix du « lead », deux critères peuvent être pris en compte : le premier porte sur l'affinité de ces composés pour l'AC XII. En effet, l'AC XII est elle aussi surexprimée dans les cellules cancéreuses, mais son potentiel thérapeutique est moins décrit et moins connu que celui de l'AC IX. Il serait donc intéressant d'obtenir des composés affins pour ces 2 isoformes évitant ainsi une suractivation d'une des 2 isoformes dans le cas où un composé inhiberait uniquement l'une ou l'autre. L'Alipk 177 présente une affinité supérieure pour l'AC XII que l'énantiomère E2 de l'Alica 15. Le second porte sur la cinétique d'association et de dissociation de ces composés pour l'AC IX. L'Alipk 177 présente une vitesse d'association plus grande et une vitesse de dissociation équivalente à celle de l'énantiomère E2 de l'Alica 15. Il interagit donc plus rapidement et reste plus longtemps associé à l'AC IX. L'Alipk 177 a donc été retenu comme « lead » de notre série de composés.

Au final, la mesure de l'affinité de l'ensemble de nos composés a nécessité l'utilisation de deux lames CM7 distinctes comportant les trois isoformes immobilisées de manière équivalente.

Notons qu'après le changement de lame, deux composés étudiés sur la lame N°1 (Alica 13 et Alipk 177) ont servi de contrôle pour valider la lame N°2. Les résultats équivalents obtenus, nous ont permis de valider notre protocole d'immobilisation.

En conclusion, neuf composés ont été étudiés sur les lames CM7, chaque solution a été injectée en triple, des solutions de tampon de course ont été injectées entre chaque gamme de solution et de façon aléatoire afin de contrôler d'éventuelles interférences. Environ 400 injections ont été réalisées sur chacune des deux lames CM7.

### 5.2.2.3. Comparaison lame CM5/CM7

Deux des composés de la série (Alica 13 et Alipk 177) ont été étudiés sur les deux types de lame (CM5 et CM7), les constantes thermodynamiques de dissociation de ces quatre composés évaluées à l'aide de deux lames sont données dans le tableau 61.

Composés	$K_D$ (nM)					
	CM5			CM7		
	AC II h	AC IX h	AC XII h	AC II h	AC IX h	AC XII h
Alica 13	6 ± 4	54 ± 11	756 ± 300	6 ± 2	36 ± 5	786 ± 29
Alipk 177	299 ± 25	66 ± 23	305 ± 144	212 ± 21	34 ± 4	340 ± 15

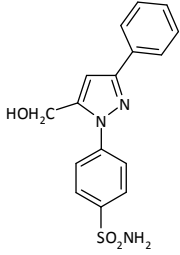
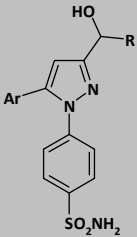
**Tableau 61 :** Comparaison des constantes thermodynamiques de dissociation caractéristiques de l'interaction de quatre dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles et des trois isoformes de l'AC immobilisées sur une lame CM5 et une lame CM7.

Les constantes thermodynamiques de dissociation des deux dérivés étudiés sont du même ordre de grandeur pour les deux lames. Comme décrit précédemment, ce résultat montre que le taux d'immobilisation n'a pas d'impact sur l'affinité des composés pour la cible immobilisée. Pour un même mode d'immobilisation, pour un maillage différent et une densité d'immobilisation différente, des valeurs de  $K_D$  équivalentes sont obtenues. De plus, la lame CM7 a été utilisée dans le but

d'améliorer l'incertitude élevée obtenue lors des études sur la lame CM5. Prenons l'exemple de l'Alipk 177 qui avait une incertitude relative de l'ordre de 34 et 47% pour les isoformes IX et XII sur la lame CM5, ce même composé présente sur la lame CM7, a une incertitude de 11 et 5% pour les mêmes isoformes. Le même phénomène est observé lors de l'étude de l'affinité de l'Alica 13 pour les trois isoformes. Cette comparaison permet de mettre en avant l'intérêt de la lame CM7 pour la mesure de l'affinité de nos analytes. En effet, par le biais d'une densité d'immobilisation plus grande pour les isoformes de l'AC, l'utilisation de la lame CM7 a permis d'une part, d'augmenter la réponse  $R_{max}$ , et d'autre part d'améliorer l'incertitude sur les constantes thermodynamique de dissociation déterminées.

#### 5.2.2.4. Etude de relation structure affinité

Les structures des composés étudiées sont rappelées tableau 62, afin de réaliser des relations structure affinité.

Composés	K <sub>D</sub> (nM)				
	AC II h	AC IX h	AC XII h		
<b>Alica 13</b> 	6 ± 5	36 ± 5	786 ± 29		
	-	-	-		
	<b>Ar</b>	<b>R</b>			
<b>Alipk 177</b>	3-Bromo-phényle	H	212 ± 21	34 ± 14	340 ± 22
<b>Alipk 41*</b>	Naphtyle	H	171 ± 44	700 ± 54	400 ± 83
<b>Alica 87 E1</b>	Phényle	Cycloheptyle	352 ± 33	165 ± 26	725 ± 58
<b>Alica 87 E2</b>	Phényle	Cycloheptyle	242 ± 45	339 ± 56	520 ± 76
<b>Alica 76 E1</b>	Phényle	Cyclohexyle	308 ± 43	166 ± 32	487 ± 48
<b>Alica 76 E2</b>	Phényle	Cyclohexyle	315 ± 45	311 ± 27	611 ± 69
<b>Alica 203 E1</b>	Phényle	Cyclopentyle	246 ± 33	165 ± 15	363 ± 31
<b>Alica 203 E2</b>	Phényle	Cyclopentyle	145 ± 24	229 ± 16	303 ± 57
<b>Alica 94 E1</b>	Phényle	Cyclopropyle	221 ± 35	86 ± 13	219 ± 42
<b>Alica 94 E2</b>	Phényle	Cyclopropyle	132 ± 24	60 ± 5	214 ± 34
<b>Alica 23 E1</b>	Phényle	Propyle	98 ± 12	108 ± 17	246 ± 25
<b>Alica 23 E2</b>	Phényle	Propyle	743 ± 65	147 ± 25	572 ± 75
<b>Alica 15 E1</b>	Phényle	Méthyle	336 ± 23	164 ± 12	725 ± 54
<b>Alica 15 E2</b>	Phényle	Méthyle	734 ± 65	83 ± 6	469 ± 3

**Tableau 62** : Composés étudiés en RPS.

Les constantes thermodynamiques de dissociation présentées sont issues des études sur CM7 excepté pour le composé Alipk 41, issue des études sur CM5.

Les relations structure affinité seront traitées isoforme par isoforme.

- **RSA AC II h**

Quatre composés montrent une affinité intéressante pour l'AC II h, inférieure à 150 nM. Le composé qui présente la meilleure affinité est l'Alica 13 ( $K_D = 6$  nM), qui se distingue de la série de composés étudiée par son isomérisation de position, l'Alica 13 est un isomère 1,3 contrairement aux autres dérivés étudiés qui sont des isomères 1,5. Si on compare l'affinité des composés incluant un centre d'asymétrie, l'augmentation de la taille de la chaîne aliphatique linéaire (Alica 15, méthyle et Alica 23, propyle) n'a pas d'influence significative. Alors que les analogues Alica 23 (propyle) et Alica 94 (cyclopropyle) montrent des affinités similaires, l'augmentation de la taille du cycle aliphatique diminue significativement l'affinité ( $K_D = 132$  nM pour l'Alica 94 et  $K_D = 352$  nM pour l'Alica 87). Par ailleurs, l'affinité des composés pour l'AC II est dépendante de la configuration absolue du carbone porteur de l'alcool secondaire. On peut notamment citer l'énantiomère E1 de l'Alica 23 qui présente une affinité sept fois supérieure à celle de l'énantiomère E2. Notons que les énantiomères nommés E1 ne sont pas systématiquement plus affins. En effet, la configuration absolue des énantiomères n'ayant pas été déterminée par cristallographie RX, il est possible que l'énantiomère E1 d'un composé ne soit pas de la même configuration que l'énantiomère E1 d'un autre composé.

- **RSA AC XII h**

Concernant l'affinité de l'AC XII, une reconnaissance assez similaire à celle de l'isoforme II avec des affinités plus faibles a été mise en évidence.

- **RSA AC IX h**

Sept composés présentent des affinités pour l'AC IX inférieure à 150 nM. Dans la série alcool secondaire, l'affinité des composés présentant une chaîne aliphatique linéaire méthyle ou propyle au niveau de l'alcool (Alica 15 et Alica 23) ont des affinités équivalentes. Dans le cas de la substitution par un propyle ( $K_D$  Alica 23 E1 = 108 nM), le fait d'augmenter la contrainte stérique par cyclisation permet d'améliorer l'affinité du composé ( $K_D$  Alica 94 E2 = 60 nM). Cependant, l'augmentation de la taille du cycle (cyclopentyle, cyclohexyle et cycloheptyle) engendre une perte d'affinité beaucoup plus marquée que dans le cas de l'AC II. Dans la série alcool primaire, l'Alipk 177 et l'Alipk 41 se différencient par la substitution de l'aromatique (bromophényle et naphtyle). Une chute d'affinité a été obtenue lors de la substitution du pyrazole par un groupement naphtyle. Si on compare les densités électroniques et l'encombrement stérique des deux substituants aromatique du noyau pyrazole, on constate une plus faible densité électronique et un encombrement moindre pour l'Alipk 177 par rapport à l'Alipk 41. L'affinité supérieure pour l'Alipk 177 montre que les éléments suivants



sont importants : une faible densité électronique et un faible encombrement stérique. De plus, l'isomérisation de position ne semble affecter significativement l'affinité (Alica 13,  $K_D = 36$  nM et Alipk 177,  $K_D = 34$  nM). D'après l'ensemble de ces résultats, une affinité supérieure pour l'AC IX est observée lorsque l'encombrement stérique au niveau de l'alcool est faible, comme dans le cas d'un méthyle pour l'Alica 15, ou par absence de substitution dans le cas d'un alcool primaire. Comme pour l'AC II, l'interaction entre les dérivés et le site actif de l'AC IX est dépendant de la configuration des molécules. Dans cette série, une énantiosélectivité a été démontrée.

- **RSA sélectivité AC IX versus AC II**

Comme décrit précédemment, l'objectif de notre étude était de développer des composés affins AC IX mais aussi sélectifs AC IX *versus* AC II. Alors que l'Alipk 177 et l'Alica 13 présentent des affinités élevées sur l'AC IX et des affinités faibles pour l'AC II, l'Alica 87 E2, présente quant à lui des affinités équivalentes AC II et AC IX. D'après les constantes thermodynamiques de dissociation, une sélectivité AC IX *versus* AC II est obtenue en réduisant l'encombrement stérique au niveau de la fonction alcool.

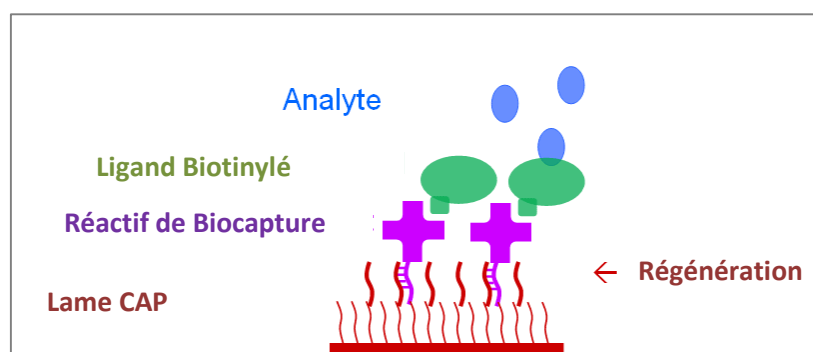
Les études de relation structure affinité ont permis de mettre en évidence un pharmacophore affiné et sélectif pour le site actif de l'AC IX *versus* AC II, qui possède :

- un noyau tenseur pyrazolique permettant de rigidifier la structure et ainsi orienter les substituants,
- une fonction sulfonamide portée par le N- aryle qui interagira sous sa forme anionique avec le zinc du site actif de la métalloenzyme,
- une fonction alcool et un encombrement limité en position 3
- un groupement aryle en position 5 substitué ou non.

## **6. Lames de type streptavidine**

En parallèle des études réalisées avec les lames de dextran carboxyméthylé, une approche utilisant un mode d'immobilisation différent, par capture de la protéine biotinylée a été réalisée. Cette approche ne consiste pas en un couplage par liaison covalente mais par interaction, permettant une régénération complète de la lame après chaque essai, et une optimisation facilitée de l'ensemble des paramètres.

Des molécules biotinylées peuvent être immobilisées sur des lames de type streptavidine en mettant à profit la formation du complexe streptavidine/biotine dont la stabilité est très élevée (constante de complexation de l'ordre de  $10^{15} \text{ M}^{-1}$ , Figure 72).



**Figure 72 :** Représentation schématique d'une lame de type streptavidine

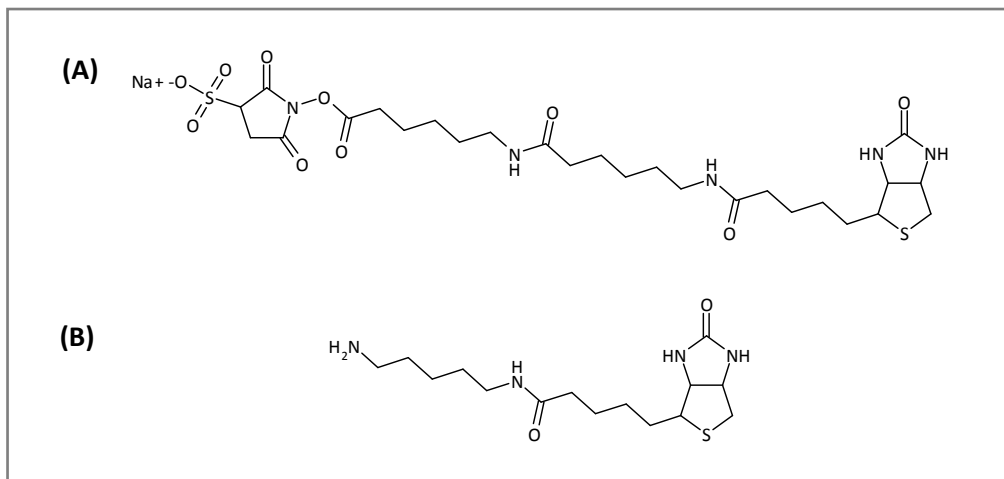
En rouge : lame réactive recouverte de dextran carboxyméthylé greffé par un simple brin d'ADN, en violet : brin d'ADN complémentaire porteur de la streptavidine, en vert : ligand biotinylé et en bleu : analyte.

### 6.1. Biotinylation de la protéine

L'immobilisation reposant sur l'interaction streptavidine-biotine, il est donc nécessaire que l'un des partenaires dont on désire caractériser l'interaction soit biotinylé. Deux approches sont donc possibles, à savoir la biotinylation de la protéine ou celle de l'analyte d'intérêt. Alors que l'immobilisation d'une molécule de bas poids moléculaire biotinylée implique de réaliser des études en compétition pour une série de molécules, l'immobilisation de la protéine permet une évaluation directe de cette série. Bien que les deux approches aient été examinées, une étude plus complète de la biotinylation des trois isoformes (II, IX et XII) de l'anhydrase carbonique a été menée afin de comparer nos résultats avec ceux obtenus avec les lames CM5 et CM7.

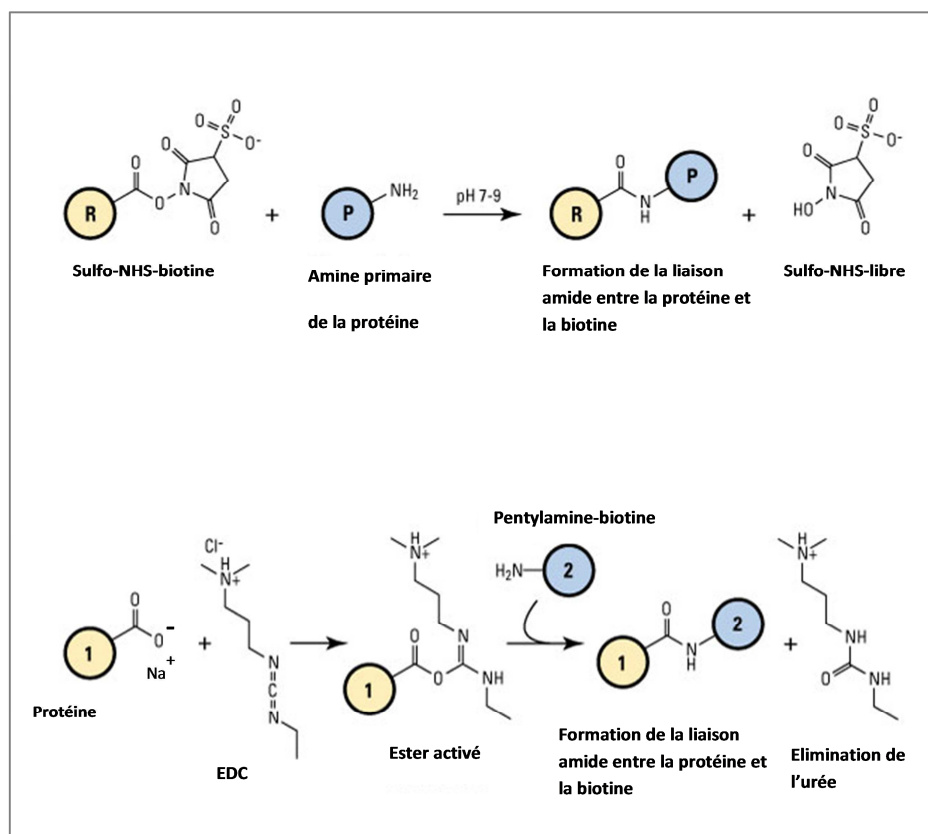
### 6.2. Agents de biotinylation

Deux agents de biotinylation ont été évalués au cours de notre étude, la Sulfo-NHS-biotine et la pentylamine-biotine (figure 73).



**Figure 73 :** Structure des deux agents de biotinylation utilisés, (A) : Sulfo-NHS-biotine et (B) : pentylaminebiotine.

Le premier agent permet une biotinylation sur des fonctions amine primaire et le second sur les fonctions carboxylique. Dans le cas de la biotinylation d'une protéine, les mécanismes mis en jeu sont présentés sur la figure 74.



**Figure 74 :** Mécanismes réactionnels mis en jeu entre une protéine avec la Sulfo-LC-LC-NHS-biotine (A) et avec la pentylamine-biotine (B).

### 6.3. Evaluation de la réactivité des isoformes de l'AC et des agents de biotinylation

Les séquences protéiques des isoformes II, IX et XII de l'anhydrase carbonique ont donc été examinées afin d'évaluer la capacité des différentes isoformes à réagir avec les deux agents de biotinylation. Elles ont été obtenues à l'aide de la base de données NCBI. L'alignement des séquences, présenté en annexe X, a été réalisé à l'aide de Blast® <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. Il a montré que les pourcentages d'homologie entre ces isoformes sont relativement faibles (AC II/AC IX : 34% ; AC II/AC XII : 36% ; AC IX/AC XII : 37%).

Selon les mécanismes de réaction décrits précédemment, la Sulfo-NHS-biotine devrait réagir sur les acides aminés comportant une amine primaire réactive (Lysine). La pentylamine-biotine peut réagir sur les groupements carboxyles de la protéine (acide aspartique et glutamique). Le tableau 63 répertorie le nombre d'acides aminés Asp, Glu et Lys présents dans les différentes isoformes pouvant être biotinylés.

	AC II h	AC IX h	AC XII h
<b>Nombre de résidus Lysines</b>	24	6	17
<b>Nombre de résidus Asp et Glu</b>	68	32	31

**Tableau 63** : Nombre d'acides aminés acides et de Lysines présents dans les isoformes II, IX et XII de l'AC.

L'AC II possèdent quatre fois plus de Lysine que l'AC IX, et inversement l'AC IX possèdent deux fois plus d'acides aminés acides que l'AC II. Cette différence laisse présager qu'une biotinylation de l'AC II et de l'AC IX serait facilitée respectivement par la Sulfo-NHS-biotine par la pentylamine-biotine.

### 6.4. Optimisation de la biotinylation des AC

Dans le cadre de travaux menés par Papalia *et al*, une étude de l'étape de biotinylation de l'AC II b a été menée (Papalia *et al*, 2010). Il a en effet été démontré que la « sur-biotinylation » de la protéine réduit son taux d'immobilisation sur la surface de la lame et peut éventuellement conduire à un changement de sa conformation. L'idéal recherché serait une mono-biotinylation de la protéine

mais le couplage de la biotine étant aléatoire, il est difficile de contrôler le taux de biotinylation. L'approche proposée repose sur l'utilisation d'une concentration de l'agent de biotinylation inférieure à celle de la protéine afin de défavoriser les biotinylations multiples.

Dans un premier temps, une biotinylation de l'AC II b a été réalisée dans les conditions décrite par Papalia *et al* (2010), à l'aide de l'agent de biotinylation, sulfo-NHS-biotine et un ratio protéine/sulfo-NHS-biotine de 1/1. Dans un second temps, l'optimisation a porté également sur la méthode de purification de la protéine biotinylée, la nature de l'agent de biotinylation et la fraction molaire agent de biotinylation/protéine.

#### 6.4.1. Optimisation de la procédure de purification

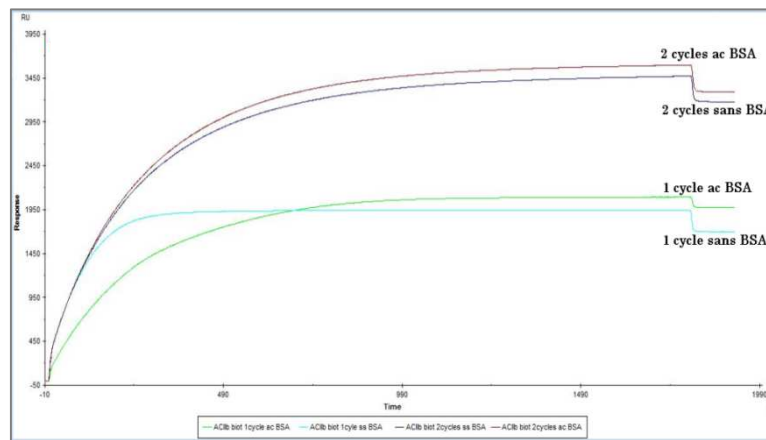
La solution contenant protéine biotinylée doit être purifiée afin d'éliminer l'agent de biotinylation n'ayant pas réagi. Nous avons choisi de réaliser la purification de la protéine biotinylée à l'aide d'un système Amicon Ultra<sup>®</sup> ; utilisé précédemment pour purifier l'AC IX h.

Une optimisation de la purification avait pour but de déterminer (1) le nombre de cycles de purification nécessaire à l'obtention d'une protéine biotinylée pure avec un rendement d'extraction optimal et (2) limiter l'adsorption de l'AC sur le système d'ultracentrifugation par addition de sérum albumine bovine (BSA : 66 kDalton) afin d'augmenter les rendements. Dans ce but quatre protocoles de purification ont été évalués :

- (1) **Un** cycle de purification
- (2) **Deux** cycles de purification
- (3) Ajout de BSA ( $[BSA]_{finale} = 1,5 \mu M$ ) à l'échantillon avec **un** cycle de purification
- (4) Ajout de BSA ( $[BSA]_{finale} = 1,5 \mu M$ ) à l'échantillon avec **deux** cycles de purification

Après ce cycle de purification, un volume d'environ 20  $\mu L$  d'échantillon concentré est récupéré. Il subit soit un second cycle de purification, soit une dilution afin d'obtenir une solution finale à 600 nM en protéine biotinylée qui est injectée sur la surface réactive pour immobilisation. La mesure du taux d'immobilisation permet d'évaluer la qualité des purifications. Un taux maximal étant le reflet d'une procédure optimale de purification.

Les quatre sensorgrammes obtenus avec les quatre modes de purification sont regroupés figure 75.



**Figure 75.** Sensorgrammes obtenus lors de l'immobilisation de l'AC II b biotinylée purifiée selon quatre procédures différentes.

Les taux d'immobilisation les plus importants (réponses en RU maximales) sont obtenus après la réalisation de deux cycles de purification. Un unique cycle de purification a pour conséquence une réduction des  $R_{max}$ . Cette différence de réponse ( $R_{max}$ ) peut s'expliquer par l'élimination insuffisante de l'agent de biotinylation. Celui-ci entre en compétition avec la protéine biotinylée pour les sites de streptavidine disponibles. Contrairement à Papalia *et al* (2010), l'ajout de BSA dans les échantillons n'améliore pas significativement le taux d'immobilisation de l'AC, ce qui semble montrer que la BSA ne permet pas d'obtenir un meilleur rendement d'extraction de la protéine biotinylée. La procédure retenue pour notre étude sera donc basée sur deux cycles de purification successifs sans addition de BSA dans l'échantillon.

#### **6.4.2. Répétabilité de la biotinylation et de l'immobilisation de la protéine biotinylée sur la lame de type streptavidine**

Avant d'optimiser les ratios molaires biotine/protéine pour les différentes isoformes, nous avons tout d'abord évalué la répétabilité de la biotinylation. Dans ce but, l'AC II b a été biotinylée quatre fois de manière indépendante selon le même protocole opératoire. Les quatre solutions purifiées d'AC II b biotinylée ont été injectées sur la lame de type streptavidine. Un taux d'immobilisation moyen de 2003 RU a été obtenu pour les quatre échantillons, et un coefficient de variation de 0,98%. La biotinylation est donc répétable.

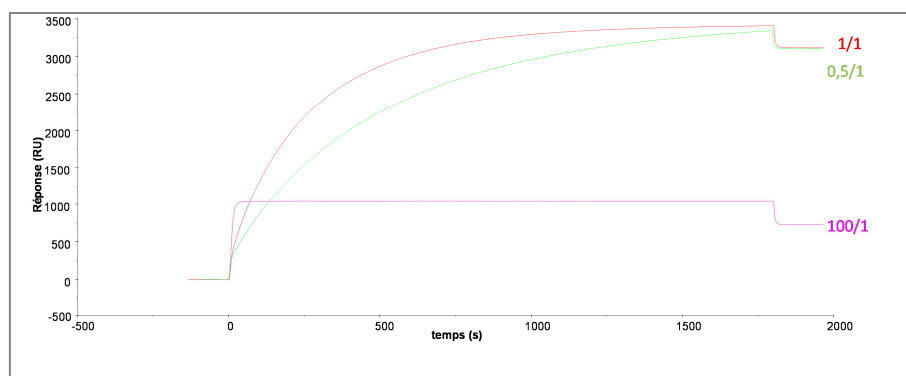
Nous avons également évalué la répétabilité des taux d'immobilisation obtenus avec une même solution d'AC II b biotinylée. Dans ce but, l'AC II b a été biotinylée selon la procédure décrite par Papalia *et al*, (ratio Sulfo-NHS-biotine/protéine 1/1). Après purification, une solution d'AC II b biotinylée à 600 nM a été injectée quatre fois sur la lame de type streptavidine activée. Après chaque injection, la surface est régénérée puis activée par injection du réactif de biocapture. Un taux d'immobilisation moyen de 1934 RU et un coefficient de variation de 0,92% a été obtenu qui atteste de la répétabilité de l'immobilisation.

### 6.4.3. Optimisation de la fraction molaire agent de biotinylation/AC

#### 6.4.3.1. Sulfo-NHS-biotine

- **AC II b**

Les sensorgrammes obtenus pour l'immobilisation de l'AC II b biotinylée à trois fractions molaires Sulfo-NHS-biotine/AC II b différentes (0,5/1, 1/1, 100/1) sont regroupés figure 76.

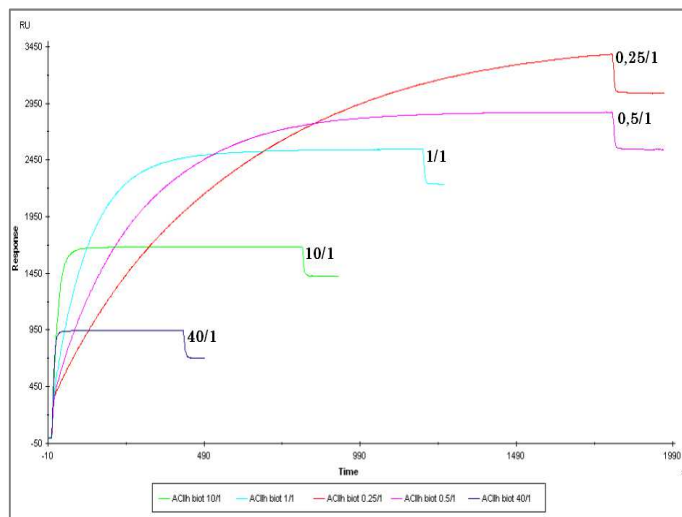


**Figure 76 :** Sensorgrammes obtenus pour l'immobilisation de l'AC II b biotinylée à différentes fractions molaires Sulfo-NHS-biotine/AC II b

Le taux d'immobilisation de l'AC II b est nettement plus faible (environ 700 RU) pour la fraction molaire 100/1 que pour les fractions molaires 0,5/1 et 1/1 (environ 3000 RU). La fraction molaire 1/1 pour l'AC II b a été retenue car la courbe correspondante atteint plus rapidement le plateau d'équilibre que pour la fraction 0,5/1.

- **AC II h**

Cinq fractions molaires ont été testées pour l'AC II h (0,25/1 ; 0,5/1 ; 1/1 ; 1/1). Les sensorgrammes obtenus sont présentés sur la figure 77.

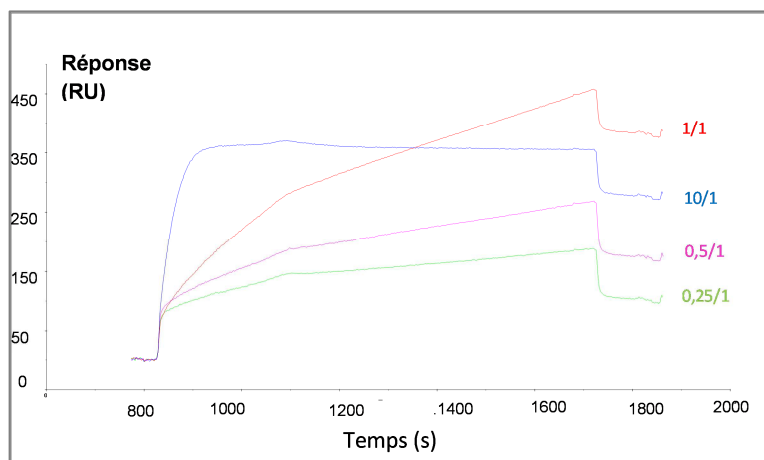


**Figure 77 :** Sensorgrammes obtenus pour l'immobilisation de l'AC II h biotinylée à différentes fractions molaires Sulfo-NHS-biotine/AC II h

La fraction molaire (agent de biotinylation/AC II h) optimale pour l'AC II h est égale à 0,25/1. Elle permet d'obtenir un taux d'immobilisation d'environ 3000 RU.

- **AC IX h**

Quatre fractions molaires (0,25/1 ; 0,5/1 ; 1/1 ; 10/1) ont été évaluées pour l'AC IX h. Les sensorgrammes obtenus pour l'AC IX sont présentés figure 78.



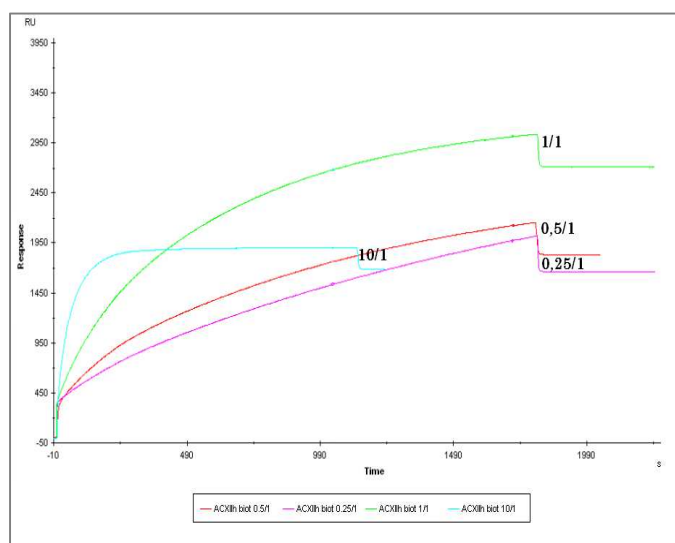
**Figure 78 :** Sensorgrammes obtenus pour l'immobilisation de l'AC IX h biotinylée à différentes fractions molaires Sulfo-NHS-biotine/AC IX



Quelle que soit la fraction molaire utilisée, des taux d'immobilisation très faibles ont été obtenus pour l'AC IX (inférieurs à 372 RU). Ce résultat est en accord avec le faible nombre de lysine (6) de l'AC IX h susceptibles de réagir avec la Sulfo-NHS-Biotine.

- **AC XII h**

Quatre fractions molaires (0,25/1 ; 0,5/1 ; 1/1 ; 10/1) ont été étudiées pour l'AC XII h. Les sensorgrammes obtenus pour l'AC XII sont présentés sur la figure 79.



**Figure 79 :** Sensorgrammes obtenus pour l'immobilisation de l'AC XII h biotylée à différentes fractions molaires Sulfo-NHS-biotine/AC XII

La fraction molaire (agent de biotinylation/AC XII) optimale pour l'AC XII est égale à 1/1, en effet la variation de l'indice de réfraction obtenue pour un ratio 1/1 est beaucoup plus importante que pour les autres ratios étudiés. Elle permet d'obtenir un taux d'immobilisation d'environ 2700 RU.

#### 6.4.3.2. Pentylamine-biotine

La réaction de biotinylation qui se fait sur les groupements carboxyles, implique l'activation de ces groupements par l'EDC, avant de réaliser le couplage à la pentylamine biotine.

Un excès molaire d'EDC soit à un ratio molaire 10000/1 (EDC/protéine) et un excès de pentylaminebiotine de 100/1 (pentylaminebiotine/protéine) ont été utilisés pour l'AC II b. Ces conditions expérimentales de biotinylation ont été choisies d'après les travaux de Papalia *et al* (2010).

Après purification, les protéines biotinylées sont injectées, sur la lame à l'aide du réactif de biocapture.

Les taux d'immobilisation obtenus pour les quatre isoformes sont inférieurs à 300 RU. Afin d'expliquer ces taux très faibles obtenus, trois hypothèses ont été avancées :

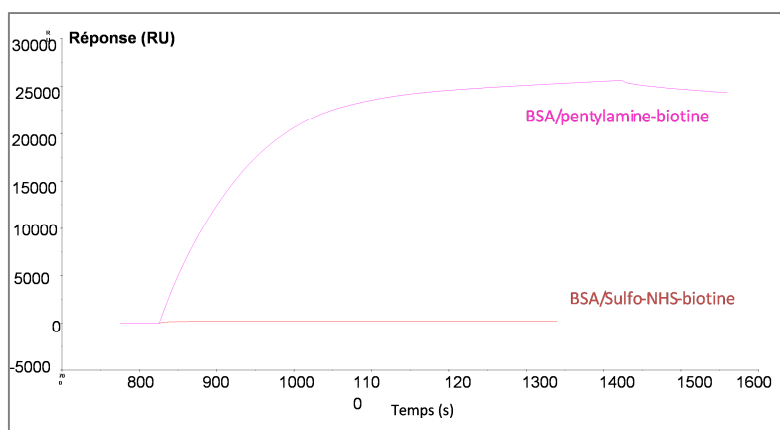
- dans ces conditions, la protéine a été surbiotinylée, chaque molécule de protéine est capable de se lier à plusieurs streptavidine. Le recouvrement de la surface se fait ainsi avec un nombre réduit de protéines. Il faut alors diminuer la concentration en pentylaminebiotine ;
- ou la protéine n'a pas été assez biotinylée. En raison de l'excès d'EDC lors de la réaction de couplage, les groupements carboxyles activés sur la protéine ont interagit avec d'autres fonctions amines, formant des liaisons inter et/ou intramoléculaires (formation d'oligomères), réduisant ainsi l'interaction entre la biotine présente sur la protéine et la streptavidine sur la surface réactive. Il faut alors augmenter la concentration en pentylaminebiotine ;
- dans nos conditions, l'hydrolyse de l'ester activé va conduire à l'acide de départ.

Afin d'optimiser le taux d'immobilisation des différentes isoformes, le ratio molaire EDC/protéine a été fixé à un excès molaire de 10000/1 et deux fractions molaires ont été étudiées :

- un ratio molaire pentylaminebiotine/protéine de 1/1, dans le cas d'une surbiotinylation potentielle de la protéine
- un ratio molaire pentylaminebiotine/protéine de 1000/1, dans le but d'éviter l'oligomérisation.

Lors de ces deux études, aucune amélioration du taux d'immobilisation n'a pu être obtenue. En résumé, quels que soit les ratios pentylamine/biotine (1/1 ; 100/1 ; 1000/1), les taux d'immobilisation sont faibles.

Afin de vérifier que le problème n'était pas lié à une dégradation éventuelle de l'agent de biotinylation, la BSA a été biotinylée à l'aide de la pentylaminebiotine. Les concentrations des différents réactifs ont été fixées de sorte que la fraction molaire EDC/BSA soit de 10000/1 et la fraction molaire pentylaminebiotine/BSA de 100/1. Le sensorgramme obtenu est présenté sur la figure 80.



**Figure 80** : Sensorgramme obtenu lors de l'immobilisation de la BSA.

Un taux d'immobilisation de 25224 RU est obtenu avec la BSA biotylée par la pentylamine biotine. Ce résultat démontre que les faibles taux d'immobilisation obtenus pour les isoformes de l'AC biotylées à l'aide de la pentylamine-biotine ne peuvent être incriminés à la qualité de l'agent de biotinylation.

Un contrôle de la biotinylation a été réalisé par une étude de western blot.

#### 6.4.4. Contrôle de la biotinylation de l'AC

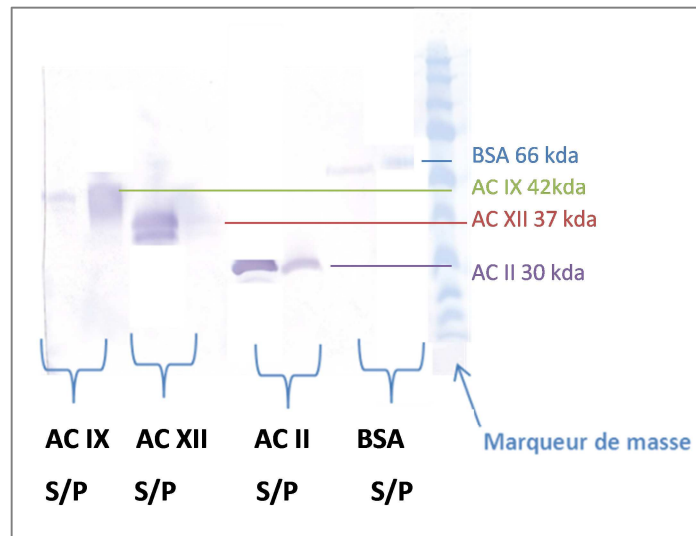
La technique se déroule en plusieurs étapes. Dans un premier temps les protéines sont dénaturées, puis séparées en fonction de leur masse molaire par électrophorèse sur un gel polyacrylamide. Après séparation, les protéines sont transférées à partir du gel de polyacrylamide sur une membrane de PVDF. La fixation des protéines se fait grâce à des interactions hydrophobes et ioniques entre la membrane et les protéines. La membrane est mise en contact avec une solution de protéines concentrées (protéines du lait par exemple) afin de limiter les interactions non spécifiques. La dernière étape, dite de révélation, consiste à appliquer sur la membrane une solution d'anticorps spécifiques des protéines d'intérêt permettant la détection de celles-ci.

L'AC II h, d'AC IX h et d'AC XII h biotylées précédemment ont été étudiées par western blot.

Des solutions de concentrations en AC II h et XII h de  $111 \mu\text{g.mL}^{-1}$  et en AC IX h de  $93 \mu\text{g.mL}^{-1}$  préparées dans le tampon Laemmli sont centrifugées et chauffées pendant 5 minutes à  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  afin de dénaturer la protéine avant la migration. Les solutions de protéines biotylées et non biotylées sont ensuite déposées sur le gel de polyacrylamide.

Les protéines biotylées fixées sur la membrane sont incubées par de l'avidine couplée à la phosphatase alcaline. La révélation colorimétrique a été obtenue à l'aide du kit AP conjugate

Substrate de BIORAD (coloration violette). Une partie du western blot obtenu est donné figure 81, les protéines non biotinylées n'étant pas révélées, elles ne sont pas représentées sur le western blot.



**Figure 81** : Western blot de l'AC II h, IX h et XII h biotinylées par deux agents de biotinylation. Avec S pour protéine biotinylée par l'agent de biotinylation sulfo-NHS-biotine et P pour la protéine biotinylée par l'agent de biotinylation pentylaminebiotine.

Comme attendu, les protéines non biotinylées ne sont pas visibles sur la membrane. La bande à 30000 et 37000 kDa obtenu pour l'AC II et l'AC XII biotinylée par le Sulfo-NHS-biotine étant d'intensité plus importante, il semblerait que le rendement de biotinylation soit supérieur pour le Sulfo-NHS-biotine. A l'inverse, l'AC IX semble être biotinylée préférentiellement avec la pentylaminebiotine. Ce résultat est en accord avec les séquences protéiques des différentes isoformes, à savoir une prédominance d'acides aminés Asp et Glu pour l'AC IX et une prédominance de Lysine pour l'AC II et XII.

Les faibles taux d'immobilisation obtenus pour les trois isoformes biotinylées avec la pentylaminebiotine sur la lame de type streptavidine ne peuvent donc être expliqués par un échec des réactions de biotinylation. En revanche, il est impossible de déduire où ont lieu les biotinylations et si les biotines sont accessibles pour l'interaction avec la streptavidine.

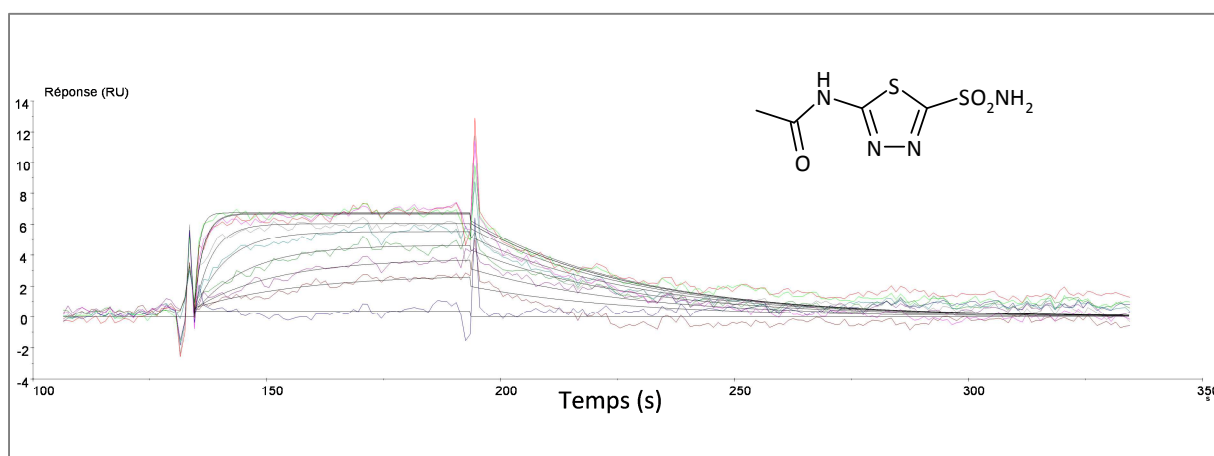
Par la suite, les études de biotinylation ont été réalisées à l'aide du sulfo-NHS-biotine.

## 6.5. Interaction Analyte/AC

Après l'immobilisation de l'AC II b, l'AC II h et l'AC XII h biotinylées sur une même lame de type streptavidine (taux d'immobilisation respectivement de 3000, 3000 et 2700 RU), des études d'interaction entre ces isoformes et trois composés d'intérêt ont été réalisées. Ces composés sont : l'acétazolamide (composé de référence), l'Alipk 177 (composé lead lors de l'étude avec la lame CM7) et l'Alica 13 (composé affin pour l'AC II). Par manque de temps cette étude n'a pu être étendue aux autres composés d'intérêt.

A partir des solutions mères d'analyte préparées dans le DMSO (10 mM), une série de sept solutions de concentration allant de 0,015625 à 10  $\mu\text{M}$ , ont été préparées. Les solutions d'analyte ont été injectées de manière randomisée et en triple sur l'ensemble des cellules. Toutes les dix analyses, trois injections de tampon de course ont été réalisées afin de servir de blanc pour le traitement des résultats.

Les solutions d'analyte ont ensuite été injectées sur toutes les cellules à un débit de 100  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  pendant une minute comme pour les études sur les lames CM5 et CM7. Les sensorgrammes obtenus lors de l'interaction de l'AZA avec l'AC II b sont donnés sur la figure 82.



**Figure 82** : Sensorgrammes obtenus pour l'interaction AZA/AC II b sur la lame de type streptavidine

On peut noter que la réponse maximale obtenue à saturation reste faible dans le cas de l'AZA et de l'AC II b (6 RU), bien que le taux d'immobilisation de l'AC II b soit relativement élevé (3000 RU). Des artéfacts observés au niveau des signaux correspondant à l'association et à la dissociation, sont néfastes au traitement mathématique. Notons que pour la même interaction évaluée sur la lame CM5, pour un taux d'immobilisation de 4700 RU, la réponse maximale obtenue était de 26 RU. Un constat équivalent a été observé pour les autres composés et les autres isoformes. On peut supposer que le mode d'immobilisation est à l'origine de cette différence. Sur la lame de type streptavidine, le

site actif de la protéine est peut-être moins accessible. La biotinylation a peut-être modifié le site de reconnaissance actif de la protéine.

En dépit des faibles réponses obtenues, les valeurs des constantes cinétiques d'association ( $k_a$ ) et de dissociation ( $k_d$ ) ainsi que les constantes thermodynamiques de dissociation ( $K_D$ ) ont pu être calculées. Elles sont données dans le tableau 64.

	<b>AC II b</b>	<b>AC II h</b>	<b>AC XII h</b>
<b>AZA</b>	$k_a = 1,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_a = 4,0 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_a = 2,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	$k_d = 2,3 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$k_d = 5,1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$k_d = 8,1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
	<b><math>K_D = 22 \text{ nM}</math></b>	<b><math>K_D = 13 \text{ nM}</math></b>	<b><math>K_D = 39 \text{ nM}</math></b>
<b>Alica 13</b>	$k_a = 3,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_a = 1,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_a = 3,2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	$k_d = 1,5 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$k_d = 1,8 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$k_d = 21,0 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
	<b><math>K_D = 40 \text{ nM}</math></b>	<b><math>K_D = 13 \text{ nM}</math></b>	<b><math>K_D = 1300 \text{ nM}</math></b>
<b>Alipk 177</b>	$k_a = 2,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_a = 4,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_a = 9,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	$k_d = 14,4 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$k_d = 20,1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	$k_d = 7,9 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$
	<b><math>K_D = 582 \text{ nM}</math></b>	<b><math>K_D = 470 \text{ nM}</math></b>	<b><math>K_D = 868 \text{ nM}</math></b>

**Tableau 64** : Constantes cinétiques et thermodynamiques caractérisant l'interaction Analyte/AC sur la lame sur lame de type streptavidine, CV < 25 %.

Les composés étudiés présentent des constantes thermodynamiques de dissociation ( $K_D$ ) allant de 22 à 582 nM pour l'AC II b, de 13 à 470 nM pour l'AC II h et de 39 à 1300 nM pour l'AC XII h. Les valeurs des constantes  $K_D$  obtenues pour ces trois composés avec les deux types de lames sont répertoriées dans le tableau 65.

<b>Composé</b>	<b><math>K_D</math> (nM)</b>					
	<b>AC II b</b>		<b>AC II h</b>		<b>AC XII h</b>	
<b>Lame</b>	<b>CM5</b>	<b>CAP</b>	<b>CM5</b>	<b>CAP</b>	<b>CM5</b>	<b>CAP</b>
<b>AZA</b>	29 ± 7	22 ± 21	20 ± 13	13 ± 20	66 ± 8	39 ± 34
<b>Alica 13</b>	9 ± 3	40 ± 35	6 ± 4	13 ± 12	786 ± 300	1300 ± 420
<b>Alipk 177</b>	125 ± 25	582 ± 304	299 ± 25	470 ± 289	340 ± 144	868 ± 323

**Tableau 65** : Comparaison des constantes obtenues pour l'interaction Analyte/AC sur lame CM5 et lame de type streptavidine pour l'AC II b et h et l'AC XII h.

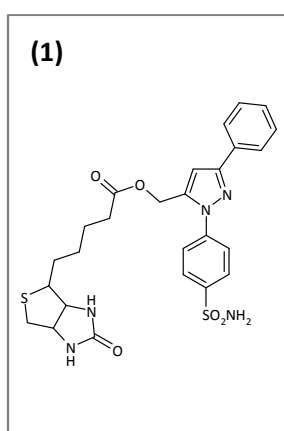
Notons que les constantes évaluées sur la lame de type streptavidine sont entachées d'une incertitude plus élevée.

Les valeurs de  $K_D$  obtenues sur la lame de type streptavidine pour l'Alica 13 et l'Alipk 177 sont plus élevées que sur la lame de type CM5. Dans le cas de l'AZA, les différences sont moins marquées. Pour les dérivés sulfonamidodiazolopyrazole, bien que les constantes obtenues soient différentes sur la lame de type streptavidine, l'échelle d'affinité reste la même. Ceci peut être expliqué par un accès différent de l'analyte au niveau du site actif de la protéine ou par une conformation différente de la protéine.

### 6.6. Immobilisation des molécules de bas poids moléculaire

Comme décrit précédemment, l'utilisation de lame de type streptavidine permet d'envisager une autre approche, qui consiste en l'immobilisation de l'analyte sur la surface réactive.

Dans un premier temps, un l'analogue de l'Alica 13 biotinylé a été synthétisé et caractérisé (RMN, LC-MS) à l'Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol (Dr. L. Goossens) a été étudié (figure 83). Ce composé a été choisi en raison de sa forte affinité pour l'AC II.



**Figure 83 :** Molécules biotinyllées afin de permettre leur immobilisation sur la lame de type streptavidine, (1) : l'Alica 13 biotinyllé.

Ce composé a été immobilisé sur la lame de type streptavidine selon le protocole décrit précédemment, par injection du composé biotinyllé à 600 nM. Le taux d'immobilisation obtenu est de 40 RU.

Une solution d'AC II b à 10  $\mu$ M a été injectée. Aucune interaction significative n'a été observée, alors que ce composé est affiné pour l'AC II b. En effet, la valeur de  $K_D$  déterminée après

immobilisation de l'AC II b biotinylée sur la lame de type streptavidine est de 8 nM pour l'Alica 13-biotinylé.

Un second essai d'immobilisation des dérivés biotinylés sur la lame de type streptavidine a été mené selon le protocole préconisé par Rouhana *et al* (Rouhana *et al*, 2013) : après immobilisation du dérivé biotinylé d'intérêt, les sites de streptavidine n'ayant pas réagi sont saturés par injection de Sulfo-NHS-biotine à 60  $\mu\text{M}$  pendant cinq minutes à un débit de 2  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Une série de solutions d'AC II b de concentration allant de 1 à 10  $\mu\text{M}$  a ensuite été injectée sur la lame de type streptavidine à différents débits (20, 50 et 100  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Comme précédemment, aucune interaction n'a été mise en évidence. Plusieurs hypothèses ont été avancées afin d'expliquer l'absence d'interaction :

- ✓ La petite molécule est mal orientée lors de l'immobilisation, ce qui empêche l'interaction entre les deux partenaires,
- ✓ La protéine n'est pas correctement « foldée » dans le tampon utilisé
- ✓ Le site actif de la protéine n'est pas accessible à la petite molécule. En effet, on peut citer les travaux de Svedhem *et al* (2001) qui ont étudié l'affinité de deux dérivés benzenesulfonamide qui se différencient par la présence d'un bras espaceur avec l'anhydrase carbonique II humaine. Les auteurs ont démontré que la présence du bras espaceur facilite l'accès dans la cavité de la protéine et donc l'interaction



## CONCLUSION GENERALE

---

Les anhydrases carbonique sont des métalloenzymes impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, tel que le cancer. Les inhibiteurs d'anhydrases carboniques peuvent être qualifiés de molécules anticancéreuses. Alors que l'isoforme II de l'AC est principalement responsable des rôles physiologiques « normaux », d'autres isoformes sont impliquées dans des phénomènes pathologiques tels que le cancer (AC IX et XII). L'AC IX est une protéine extramembranaire, associée à un mauvais pronostic en réponse au traitement de chimiothérapie conventionnel en raison de son implication dans la régulation du pH extracellulaire des cellules tumorales. Alors que l'AC II est ubiquitaire, l'AC IX est largement exprimée dans de nombreuses tumeurs et elle est quasiment absente dans la plupart des tissus sains, elle constitue de ce fait une cible thérapeutique dont la sélectivité cellulaire est une caractéristique de premier plan.

Le but principal de ce travail a consisté à déterminer l'affinité et la sélectivité d'une série de composés originaux conçus et synthétisés pour cibler l'anhydrase carbonique IX. Comme l'AC II est ubiquitaire, des composés ayant une affinité sélective AC IX *versus* AC II sont donc recherchés afin de réduire les effets secondaires. De plus, du fait de la surexpression de l'AC IX et de l'AC XII dans les cellules cancéreuses, il était intéressant d'obtenir des composés affins pour ces 2 isoformes évitant ainsi une suractivation d'une des deux isoformes dans le cas où un composé inhiberait uniquement l'une ou l'autre. Afin de répondre à l'objectif premier de ce travail, une étude comparative des performances de trois méthodes biophysiques ne nécessitant pas de marquage, la résonance plasmonique de surface, la calorimétrie de titration isotherme et la thermal shift assay, a été réalisée.

En raison de la structure de ces composés incluant un squelette sulfonamidodiarylpyrazole substitué par une fonction alcool primaire ou secondaire, deux problématiques ont émergées.

La première problématique porte sur la solubilité aqueuse relativement faible de ces dérivés. Ainsi, des études de complexation avec six cyclodextrines (cinq neutres et une cationique) ont été réalisées par RMN et par électrophorèse capillaire. Les constantes d'association de huit complexes ont été déterminées. D'après ces travaux, la cyclodextrine native  $\beta$ -CD est celle qui interagit le plus avec nos dérivés ( $178 \text{ M}^{-1} < K < 764 \text{ M}^{-1}$ ), notamment avec le composé Alica 87 dont la constante d'association est la plus élevée. Une étude structurale du complexe  $\beta$ -CD/Alica 87 a été réalisée par

RMN 2D ; elle a permis de montrer l'inclusion de la partie aliphatique de nos composés dans la cavité de la cyclodextrine.

La deuxième problématique est basée sur le fait que les molécules issues de la synthèse sont pour certaines sous la forme de mélanges racémiques. En effet, les composés substitués par une fonction alcool secondaire présentent un centre d'asymétrie. En raison des différences d'activité biologique pouvant résider entre deux isomères optiques, la séparation énantiomérique de ces composés s'est avérée nécessaire. Pour cela, des études comparatives à l'échelle analytique ont été réalisées par chromatographie en phase liquide (CLHP) et par chromatographie en phase supercritique (CPS) utilisant une PSC de type amylose, AD-H, afin de déterminer la méthode de choix pour l'obtention des énantiomères purs. En raison des avantages de la chromatographie en phase supercritique (rapidité, automatisation, consommation réduite de solvant, chimie verte), la séparation énantiomérique de six composés a été réalisée par CPS à l'échelle semi-préparative. La pureté énantiomérique des isomères isolés a été déterminée par CLHP et par électrophorèse capillaire utilisant les cyclodextrines comme sélecteurs chiraux. Elle a permis d'obtenir douze énantiomères purs dont les puretés énantiomériques sont comprises entre 97,1 à 99,3% selon les composés.

Afin de sélectionner la méthode adaptée pour l'évaluation de l'affinité de nos composés pour les isoformes de l'AC, une étude comparative des performances des trois méthodes présélectionnées (RPS, ITC et TSA) a été menée. Pour cela, l'AC II b et quatre composés ont été retenus. L'optimisation d'une méthode pour chaque technique a été menée à l'aide de l'acétazolamide, molécule de référence pour laquelle des données bibliographiques sont disponibles. La concordance des résultats obtenus et des données bibliographiques ont permis de valider les méthodes développées. Dans un second temps, l'interaction de l'AC II b avec les trois dérivés sulfonamidodiarylpyrazole sélectionnés ont également été évaluée à l'aide des trois techniques. Les résultats obtenus selon les trois méthodes utilisées sont cohérents (Alica 13 :  $K_D$  RPS :  $9 \pm 3$  ;  $K_D$  ITC :  $8 \pm 5$  ;  $K_D$  TSA :  $1 \pm 1$  nM). Etant donné que la RPS est la technique la moins consommatrice en protéine capable de donner des informations sur les constantes cinétiques d'association et de dissociation, elle a été choisie pour l'étude de l'affinité de nos dérivés sulfonamidodiarylpyrazole pour les trois isoformes d'intérêts.

L'approche retenue lors des études d'interaction moléculaire en RPS est fondée sur l'immobilisation des trois isoformes de l'AC sur la surface réactive. Les premières études ont été réalisées sur des lames de type carboxyméthyle dextran, classiquement utilisées par les utilisateurs de la technique. Les conditions d'immobilisation des trois isoformes sur la lame CM5 ont d'abord été optimisées. Après immobilisation des trois isoformes (AC II h, IX h et XII h) sur une même lame CM5,

les différents composés ont été injectés afin d'évaluer leurs affinités pour les différentes isoformes. Pour l'AC IX et l'AC XII, les valeurs sont entachées d'une incertitude élevée en raison probablement des faibles taux d'immobilisation obtenus (< 2100 RU). C'est pourquoi, les travaux se sont orientés vers l'utilisation d'une lame CM7, qui présente les mêmes caractéristiques de la lame CM5 avec un degré de carboxylation plus important, permettant une densité d'immobilisation plus élevée (8448 et 6734 RU, pour AC IX et AC XII). Après l'optimisation des conditions opératoires, l'affinité de quinze composés pour l'AC II h, l'AC IX h et l'AC XII h a été déterminée. Les composés d'intérêt étudiés présentent des affinités allant de 33,9 à 339 nM pour l'AC IX, de 214 à 786 nM pour l'AC XII et de 5,63 à 743 nM pour l'AC II.

Parmi les composés présentant un carbone asymétrique, il apparaît que pour certaines isoformes, des affinités différentes sont obtenues pour les énantiomères d'un même couple. Par exemple, les deux énantiomères de l'Alica 23 présentent une affinité proche pour l'AC IX ( $K_D$  de 108 et 147 nM pour E1 et E2) alors qu'ils présentent une énantiosélectivité élevée (facteur 7) pour l'AC II ( $K_D$  de 98 nM pour l'E1 et 743 nM pour l'E2). Pour l'AC IX, les composés Alica 87, Alica 76 et Alica 15 présentent une énantiosélectivité d'environ de 2. Les composés étant peu affins pour l'AC XII, l'énantiosélectivité est moins marquée pour cette isoforme. Cette étude montre donc l'intérêt de déterminer les affinités des différents énantiomères lors d'une étude pharmacologique.

Afin de sélectionner des composés « lead » parmi la série de composés étudiée, deux critères ont été fixés ; premièrement une constante thermodynamique de dissociation pour l'AC IX inférieure à 100 nM et deuxièmement une sélectivité AC IX *versus* AC II voisine de 2. Ainsi, cinq composés présentant une affinité élevée pour l'AC IX (l'Alipk 177, l'Alica 13, l'Alica 94 E1 et E2 et l'Alica 15 E2) ont été sélectionnés. Quatre de ces composés, l'Alica 15 E2, l'Alica 94 E1 et E2, et l'Alipk 177 présentent une sélectivité AC IX *versus* AC II supérieure à 2,2. Parmi ces composés, l'énantiomère E2 de l'Alica 15 présente la meilleure sélectivité AC IX *versus* AC II (8,8) avec une affinité de 83 nM pour l'AC IX. A l'inverse, l'Alipk 177 présente la meilleure affinité pour l'AC IX ( $K_D$  = 33,9 nM) et une sélectivité AC IX *versus* AC II intéressante de 5,8. De plus, l'Alipk 177 présente une affinité supérieure pour l'AC XII à celle de l'énantiomère E2 de l'Alica 15, maximisant ses chances d'efficacité. Par ailleurs, si on examine la valeur des constantes cinétiques d'association et de dissociation de ces composés pour l'AC IX, l'Alipk 177 présente une vitesse d'association plus grande et une vitesse de dissociation équivalente à celle de l'énantiomère E2 de l'Alica 15. Il interagira donc plus rapidement et restera plus longtemps associé à l'AC IX. Sur ce dernier critère, l'Alipk 177 a donc été retenu comme « lead » de notre série de composés.

Les constantes thermodynamiques de dissociation montrent une sélectivité AC IX *versus* AC II des composés ayant un faible encombrement stérique au niveau de la fonction alcool. Les études de relation structure affinité ont permis de mettre en évidence un pharmacophore affin et sélectif pour le site actif de l'AC IX *versus* AC II, qui possède:

- un noyau tenseur pyrazolique permettant de rigidifier la structure et ainsi orienter les substituants,
- une fonction sulfonamide portée par le N- aryle qui interagira sous sa forme anionique avec le zinc du site actif de la métalloenzyme,
- une fonction alcool et un encombrement limité en position 3,
- un groupement aryle en position 5 substitué ou non.

En parallèle des études d'affinités réalisées sur les lames de dextran carboxyméthylé, l'interaction de ces mêmes composés avec les différentes isoformes de l'AC a été étudiée à l'aide d'une lame comportant un oligonucléotide simple brin d'ADN, permettant l'immobilisation réversible de la streptavidine et de l'interaction spécifique d'une protéine biotinyllée. Cette étude avait pour objectif de comparer les constantes d'interaction obtenues, suivant le type de greffage utilisé, par liaison covalente ou par capture. Dans le cas de l'interaction streptavidine/biotine, deux agents de biotinylation ont été utilisés afin d'optimiser l'immobilisation de la protéine. Malgré nos efforts, l'AC IX n'a pas pu être immobilisée sur la lame de type streptavidine. L'interaction moléculaire de trois composés (dont un composé de référence, l'acétazolamide) avec les isoformes II et XII a été étudiée afin d'être comparée avec celle réalisée sur la lame CM5. Même si les valeurs d'affinité des composés sont plus élevées pour les études réalisées sur la lame de type streptavidine, l'échelle d'affinité pour l'AC II b, l'AC II h et l'AC XII reste identique. Cette différence peut être liée à une accessibilité différente de la molécule pour le site actif dépendante le mode d'immobilisation.

## PERSPECTIVES

---

Dans la continuité de ce travail, après avoir mis en évidence la complexation de nos dérivés avec la  $\beta$ -CD, des études permettant de déterminer et de comparer la solubilité aqueuse des composés en présence et en absence de CD seront réalisées afin de déterminer si la complexation est suffisante pour améliorer la solubilité.

De plus, vue les résultats obtenus, il serait intéressant d'étudier d'autres types de structures complexantes se rapprochant de la cyclodextrine  $\beta$ -CD, tels que des polymères de  $\beta$ -CD. En effet, la structure macromoléculaire réticulée des polymères permet d'une part une action coopérative entre les cavités des CDs voisines et d'autre part la possibilité de la formation de complexes de « non-inclusion » entre les dérivés et la chaîne principale du polymère. Cette perspective est inspirée d'études antérieures réalisées au laboratoire par le Dr. Cécile Danel, portant sur la complexation d'un principe actif, la rispéridone et divers polymères de CD. Une constante de complexation de ce composé avec le polymère de  $\beta$ -CD cinq fois supérieure à celle obtenue avec la  $\beta$ -CD native a été calculée. Grâce à des collaborations avec le Pr. Fourmentin (ULCO) et le Pr Martel (Lille 1), plusieurs types de polymères sont disponibles au laboratoire, notamment des polymères de la  $\beta$ -CD.

Dans la continuité des études d'interactions moléculaires en RPS, l'immobilisation d'un des partenaires sur une lame streptavidine classique (lame SA) serait également intéressante pour gagner en sensibilité. En effet, bien que l'interaction mise en jeu lors de l'immobilisation soit la même que sur la lame décrite dans le travail, la lame SA permet de greffer directement la streptavidine sur le dextran carboxyméthylé. Sur la lame SA, l'interaction entre la petite molécule et la protéine se fera ainsi dans une zone plus proche de la surface d'or permettant d'obtenir des réponses plus élevées.

A l'issue de cette étude, l'Alipk 177 semble être le meilleur composé pour le développement d'un candidat médicament. Dans cette optique, il serait judicieux d'étudier la stabilité chimique de ce composé. Ces études pourront être réalisées à l'aide des différentes techniques séparatives étudiées dans ce manuscrit, c'est-à-dire la chromatographie en phase liquide et/ou en phase supercritique, ou encore l'électrophorèse capillaire.

Par ailleurs, des études de métabolisme à l'aide d'enzymes isolées (cytochromes P450) ou de microsomes hépatiques permettront d'identifier des métabolites ainsi que la cinétique de dégradation (demi-vie) du composé lead. Ces études s'appuieront sur les méthodes séparatives mises au point dans ce travail.

Le couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse (CE-MS) apparaît depuis quelques années comme une perspective attractive permettant de combiner des séparations électrophorétiques hautement efficaces et faiblement consommatrices en échantillon avec une détection extrêmement sensible. Nous envisageons ainsi de développer une méthode de dosage du lead et de ces métabolites par CE-MS. Par ailleurs, les métabolites pourront être synthétisés afin d'évaluer leur affinité pour les trois isoformes par résonance plasmonique de surface.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abdel-Rahman, S.M., Jacobs, R.F., Massarella, J., Kauffman, R.E, Bradley, J.S., Kimko, H.C., Kearns, G.L., Shalayda, K., Curtin, C. Maldonado, S.D., Blume, J.L., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2007**, 51, 2668-2673.
- Allabashi, R., Arkas, M., Hormann, G., Tsiourvas, D., *Water research* **2007**, 41, 476-486.
- Amato, M.E., Lipkowitz, K.B., Lombardo, G.M., Pappalardo, G.C., *Magnetic Resonance in Chemistry* **1998**, 36, 693-705.
- Andersson, M.E., Aslan, D., Clarke, A., Roeraade, J., Hagman, G., *Journal of Chromatography A* **2003**, 1005, 83-101.
- Andersson, S., Allenmark, S.G., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2002**, 54, 11-23.
- Asensi-Bernaid, L., Escuder-Gilabert, L.E., Martin-Biosca, Y., Sagrado, S., Medicina-Hernandez, M.J., *Biomedical Chromatography* **2013**, 1, 120-126.
- Ashcroft, A.E., *Natural product Reports* **2005**, 22, 452-464.
- Baranauskiene, L., Matuliene, J., Matulis, D., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2008**, 70, 1043-4047.
- Baranauskiene, L., Petrikaite, V., Matuliene, J., Matulis, D., *International Journal of Molecular Sciences* **2009**, 10, 2752-5762.
- Belder, D., Schomburg, G., *Journal of chromatography A* **1994**, 666, 351-365.
- Benes, M., Zuskova, I., Svobodova, J., Gas, B., *Electrophoresis* **2012**, 33, 1032-1039.
- Benesi, H.A., Hildebrand, J.H., *Journal of American Chemistry Society* **1949**, 71, 2703-2707.
- Berger, T.A., Deye, J.F., *Journal of Chromatography A* **1992**, 594, 291-295.
- Berglund, J., *International Journal of pharmaceuticals* **1997**, 156, 195-200.
- Betof, A.S., Rabbani, Z.N., Hardee, M.E., Kim, S.J., Broadwater, G., Bentley, R.C., Snyder, S.A., Vujaskovic, Z., Oosterwijk, E., Harris, L.N., Horton, J.K., Dewhirst, M.W., Blackwell, K.L., *British Journal of Cancer* **2012**, 106, 916-1020.
- Bratu, I., Gavira-Vallejo, J.M., Hernanz, A., *Biopolymers* **2005**, 77, 361-367.
- Brewster, M.E., Loftsson, T., *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, 59, 645-666.
- Campoy, A.V., Freire, E., *Biophysical Chemistry* **2005**, 115, 115-124.
- Cannon, M.J., Papalia, G.A., Navratilova, I., Fisher, R.J., Roberts, L.R., Worthy, K.M., Stephen, A.G., Marchesini, G.R., Collins, E.J., Casper, D., Qiu, H., Satpaev, D., Liparoto, S.F., Rice, D.A., Gorshkova, I.I.,

Darling, R.J., Bennett, D.B., Sekar, M., Hommema, E., Liang, A.M., Day, E.S., Inman, J., Karlicek, S.M., Ullrich, S.J., Hodges, D., Chu, T., Sullivan, E., Simpson, J., Rafique, A., Luginbühl, B., Westin, S.N., Bynum, M., Cachia, P., Li, Y.J., Kao, D., Neurauter, A., Wong, M., Swanson, M., Myszka, D.G., *Analytical Biochemistry* **2004**, 330, 98-113.

Capkauskaitė, E., Baranauskiene, L., Golovenko, D., Manakova, E., Grazulis, S., Tumkevicius, S., Matulis, D., *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2010**, 18, 7357-57364.

Capkauskaite, E., Zubriene, A., Baranauskiene, L., Tamulaitiene, G., Manakova, E., Kairys, V., Grazulis, S., Tumkevicius, S., Matulis, D., *European Journal of Medicinal Chemistry* 2012, 51, 259-270.

Capkauskaite, E., Zubriene, A., Smirnov, A., Torresan, J., Kisonaite, M., Kazokaite, J., Gylyte, J., Michailoviene, V., Jogaite, V., Manakova, E., Grazulis, S., Tumkevicius, S., Matulis, D., *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2013, 21, 6937-6947.

Cappello, B., Rosa, G.D, Giannini, L, La Rotonda, M.I., Mensitieri, G., Miro, A., Quaglia, F., Russo, R., *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, 319, 62-70.

Carey, J.S., Laffan, D., Thomson, C., Williams, M.T., *Organic and Biomolecular Chemistry* **2006**, 4, 2337-2347.

Castelnovo, M., Joanny, J.F., *Langmuir* **2000**, 16, 7524-7532.

Cha, S., *Biochemistry Pharmacologie* **1975**, 24, 2177-2185.

Chankvetadze, B., Blaschke, G., *Electrophoresis* **1999**, 20, 2592-2604.

Chankvetadze, B., Endresz, G., Schulte, D., Bergenthal, D., Blaschke, G., *Journal of Chromatography A* **1996**, 732, 143-150.

Chankvetadze, B., Fillet, M., Burjanadze, N., Bergenthal, D., Bergander, C., Luftmann, H., Cromme, J., Blaschke, G., *Enantiomer* **2000** (a), 5, 313-322.

Chankvetadze, B., Pintore, G., Burjanadze, N., Bergenthal, D., Bergander, K., Breikreuz, C., Muhlenbrock, C., Blaschke, G., *Journal of Chromatography A* **2000**(b), 875, 455-469.

Chen, Z.X., Wu, W., Zhang, W.B., Deng, S.P., *Food Chemistry* **2011**, 128, 134-144.

Chipem, F.A., Behera, S.K., Krishnamoorthy, G., *The Journal of Physical Chemistry A* **2013**, 117, 4084-4095.

Chu, Y.H., Avila, L.Z., Biebuyck, H.A., Whitesides, G.M., *Journal of Medicinal Chemistry* 1992, 35, 2915-2917.

Cimpmperman, P., Baranauskiene, L., Jachimovic, S., Jachno, J., Torresan, J., Michailoviene, V., Matuliene, J., Sereikaite, J., Bumelis, V., Matulis, D., *Biophysical Journal* **2008**, 95, 3222-3231.

Cimpmperman, P., Matulis, D., *Royal Society of Chemistry* **2011**, 22, 247-274.

Colton, I.J., Carbeck, J.D., Rao, J., Whitesides, G.M., *Electrophoresis* 1998, 19, 367-382.

Culf, A.S., Gerig, J.T., Williams, P.G., *Journal of Biomolecular NMR* 1997, 10, 293-299.



- Danel, C., Chaminade, P., Odou, P., Bartélémy, C., Azarzar, D., Bonte, J.P., Vaccher, C., *Electrophoresis* **2007**, 28, 2683-2692.
- Danel, C., Duval, C., Azaroual, N., Vaccher, C., Bonte, J.P, Bailly, C., Landy, D., Goossens, J.F., *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 8708-8714.
- Daniel, M., Friess, S.D., Rajagopalan, S., Wendt, S., Zenobi, R., *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, 216, 1–27.
- Darwish, I.A., *International Journal of Biomedical Science* **2006**, 2, 217-235.
- Davis, M.E., Brewister, M.E., *Nature Review Drug Discovery* **2004**, 3, 1023-1035.
- Day, Y.S.N., Baird, C.L., Rich, R.L., Myszka, D.G, *Protein Science* **2002**, 11, 1017-1025.
- De Klerck, K., Parewyck, G., Mangelings, D., Vander Heyden, Y., *Journal of Chromatography A* **2012**, 1269, 336-345.
- Decher, G., Schmitt, J., *Progress Colloid Polymer Sciences* **1992**, 89, 160-164.
- Del Valle, E.M.M., *Process Biochemistry* **2004**, 39, 1033-1046.
- Demarco, A.L., Demarco, P.V., *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1971**, 60, 652-653.
- Deye, J.F., Berger, T.A., Anderson, A.G., *Analytical Chemistry* **1990**, 62, 615-622
- Dolnik, V., *Electrophoresis* **2008**, 29, 143-156.
- Dubas, S., Schlenoff, J., *Macromolecules* **1999**, 32, 8153-8160.
- Dudutiene, V., Baranauskiene, L., Matulis, D., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2007**, 17, 3335-3338.
- Dudutiene, V., Zubriene, A., Smirnov, J., Timm, D., Manakova, E., Grazulis, S., Matulis, D., *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2013**, 21, 2093-2106.
- Dugad, L.B., Cooley, C.R., Gerig, J.T. *Biochemistry* 1989, 28, 3955-3960.
- Dugad, L.B., Gerig, J.T., *Biochemistry* 1988, 27, 4310-4316.
- Durdagi, S., Vullo, D., Pan, P., Kähkönen, N., Määttä, J., Hytönen, V., Scozzafava, A., Parkkila, S., Supuran, C.T., *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55, 5529-5535.
- Ericsson, U.B., Hallberg, B.M., DeTitta, G.T., Dekker, N., Nordlund, P., *Analytical Biochemistry* **2006**, 289-298.
- Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N., Wikström, C., Wold, S., *Design of Experiments-Principles and Applications*, 3<sup>rd</sup>Edn, Umetrics, Sweden **2008**.
- Fernandes, C.M., Carvalho, R.A., Pereira da Costa, S., Veiga, F.J.B, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2003**, 18, 285-296.
- Figueiras, A., Sarraguça, J.M., Carvalho, R.A., Pais, A.A., Veiga, F.J., *Pharmaceutical Research* **2007**, 24, 377-389.

Francotte, *Journal of Chromatography A* **2001**, 906, 379-397.

French, D., Rundle, R.E., *Journal of American Chemical Society* **1942**, 64, 1651-1653.

Freyer, M.W., Lewis, E.A., *Methods in Cell Biology* **2008**, 84, 79-113.

Froehlich, 2010, <http://www.americanlaboratory.com/913-Technical-Articles/469-Advantages-of-In-House/>, American Laboratory.

García-Fernández, M.J., Tabary, N., Martel, B., Cazaux, F., Oliva, A., Taboada, P., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., *Carbohydrate Polymers* **2013**, 98, 1343-1352.

Garcia-Ruiz, C., Crego, A.C., Marina, M.L., *Electrophoresis* **2003**, 24, 2657-2664.

Ghosal, S., *Electrophoresis* **2004**, 25, 214-228.

Gosnat, M., Thèse de doctorat de l'Université de Paris XII-Val de Marne, **2000**.

Hedges, A.R., *Chemical Reviews* **1998**, 98, 2035-2044.

Heerklotz, H., Seelig, J., *Biochimica and Biophysica Acta* **2000**, 1508, 69-85.

Holdgate, G.A., Anderson, M., Edfeldt, F., Geschwindner, S., *Journal of Structural Biology* **2010**, 172, 142–157.

Holvoet, C., Vander Heyden, Y., Plaizier-Vercammen, J., *Pharmazie* **2007**, 62, 510-514.

Horcajada, P., Serre, C., Ferey, G., Couvreur, P., and Gref, R., *International Journal of Medicinal Sciences* 2010, 26, 761-767.

Illaparkurthy, A.C., Wyandt, C.M., Stodghill, S.P., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2005**, 59, 325-332.

Innocenti, A., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C.T., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2008, 18, 1583-1587.

Iqbal, S., Rahman, N.U., Iqbal, J., *Analytical Biochemistry* **2014**, 444, 16-21.

Jain, S.K., Gupta, Y., Jain, A., Amin, S., *Current Drug Delivery* **2008**, 3, 207-214.

Jekclin, M.C., Schauer, S., Dumelin, C.E., Zenobi, R., *Journal of Molecular Recognition* **2009**, 22, 319-329.

Job, P., *Annales de Chimie* **1928**, 9, 113-203.

Jogaité, V., Zubriene, A., Michailoviene, V., Morkunaite, V., Matulis, D., *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2013**, 21, 1431-1436.

Johnsson, B., Löfas, S., Lindquist, G., *Analytical Biochemistry* **1991**, 198, 268-277.

Jong, S., Epelbaum, N., Liyanage, R., Krylov, S.N., *Electrophoresis* **2012**, 33, 2584-2590.

Juvancz, Z., Kendrovics, R.B., Ivany, R., Szente, L., *Electrophoresis* **2008**, 29, 1701-1712.

Kahlifa R.G., *Journal of Biology Chemistry* **1971**, 246, 2561-2573.

Kanamori, K., Roberts, J.D., *Biochemistry* **1983**, 22, 2658.

Kemp, M.M, Weïner, M., Koehler, A.N., *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2012**, 20, 1979-1989.

Klesper, E., Corwin, A.H., Turner, D.A., *The Journal of Organic Chemistry* **1962**, 27, 700-706.

Kobetic, R., Jursic, B.S., Bonnette, S., Tsai, J.S.C, Salvatore, S.J., *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, 6077-6082.

Kodoyianni, V., *BioTechniques* **2011**, 50, 32-40.

Kretschmann, E., Raether, H., *Naturforsch* **1968**, 4, 299-304.

Krishnamurthy, V.M., Kaufman, G.K., Urbach, A.R., Glitlin, I., Gudiksen, K.L., Weibel, D.B., Whitesides, G.M., *Chemical Reviews* **2008**, 108, 946-1051.

Lambert, A., Ballon, J., Nicolas, A., *Pharmaceutical Research* **2001**, 18, 886-893.

Landy, D., Fourmentin, S., Salome, M., Surpateanu, G., *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2000**, 38, 187-198.

Laverde, A., Da Conceiçao, G., Queiroz, S., Fujuwara, F., Marqioli, A., *Magnetic Resonance in chemistry* **2002**, 40, 433-442.

Lecoeur, M., Goossens, J.F., Vaccher, C., Bonte, J.P., Foulon, C., *Electrophoresis* **2011**, 32, 2857-2866.

Lelievre, F., Gareil, P., Bahaddi, Y., Galons, H., *Analytical Chemistry* **1997** (a), 69, 393-401.

Lelievre, F., Gareil, P., Jardy, A., *Analytical Chemistry* **1997** (b), 69, 385-392.

Lequin, R.M., *Clinical Chemistry* 2005, 51, 2415-2418.

Liedberg, B, Lundstrom, I, *Sensors and Actuators B* **1993**, 11, 63-72.

Liu, C., Kang, J., *Journal of Chromatography A* **2012**, 1238, 146-151.

Liu, P.Y., Lin, Y.H., Feng, C.H., Chen, Y.L., *Electrophoresis* **2012**, 33, 3079-3086.

Lo, M.C., Aulabaugh, A., Jin, G., Cowling, R., Bard, J., Malamas, M., Ellestad, G., *Analytical Biochemistry* 2004, 332, 153-159.

Loftsson, T., Duchene, D., *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 329, 1-11.

Loftsson, T., Jarho, P., Masson, M., Jarviden, T., *Expert Opinion on Drug Discovery* **2005**, 2, 17-28.

Lou, Y., McDonald, P.C., Oloumi, A., Chia, S., Ostlund, C., Ahmadi, A., Kyle, A., Auf dem Keller, U., Leung, S., Huntsman, D., Clarke, B., Sutherland, B.W., Waterhouse, D., Bally, M., Roskelley, C., Overall, C.M., Minchinton, A., Pacchiano, F., Carta, F., Scozzafava, A., Touisni ,N., Winum, J.Y., Supuran, C.T., Dedhar, S., *Cancer Research* **2011**, 71, 3364-3376.

Lucy, C.A., MacDonald, A.M., Gulcev, M.D., *Journal of Chromatography A* **2008**, 1184, 81-105.

Maresca, A., Temperini, C., Vu, H., Pham, N.B., Poulsen, S.A., Scozzafava, A., Quinn, R.J., Supuran, C.T., *Journal of the American Chemical Society* **2009**, 131, 3057-3062.

Maryanoff, B.E., McComsey, D.F., Costanzo, M.J., Hochman, C., Smith-Swintosky, V., Shank, R.P., *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48, 1941-1947.

Matulis, D., Kranz, J., Salemme, F.R., Todd, M.J., *Biochemistry*, **2005**; 44, 5258-5266.

McDonald, P., Winum, J.Y., Supuran, C.T., Dedhar, S., *Oncotarget* **2012**, 1, 84-97.

Miller, L., Sebastian, I., *Journal of Chromatography A* **2012**, 1250, 256-263.

Moeker, J., Teruya, K., Rossit, S., Wilkinson, B.L., Lopez, M., Bornaghi, L.F., Innocenti, A., Supuran, C.T., Poulsen, S.A., *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2012**, 20, 2395-2404.

Morris, J.C., Chiche, J., Grelloer, C., Lopez, M., Bornaghi, L.F., Maresca, A., Supuran, C.T., Pouysségur, J., Poulsen, S.A., *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, 54, 6905-6918.

Murri-Plesko, M.T., Hulikova, A., Oosterwijk, E., Scott, A.M., Zorteza, A., Harris, A.L., Ritter, G., Old, L., Bauer, S., Swietach, P., Renner, C., *European Journal of Pharmacology* 2011, 657, 173-183.

Myszka, D.G., Rich, R.L., SPR formation, 2011 Advanced Biosensor Workshop, Méditerranée.

Myszka, D.G., Abdiche, Y.N., Arisaka, F., Byron, O., Eisenstein, E., Hensley, P., Thomson, J.A., Lombardo, C.R., Schwarz, F., Stafford, W., Doyle, M.L., *Journal of Biomolecular Techniques* **2003**, 14, 247-269.

Myszka, D.G., *Current Opinion in Biotechnology* **1997**, 8, 50-57.

Myszka, D.G., *Journal of Molecular Recognition* **1999**, 12, 390-408.

Nardi, A., Eliseev, A., *Journal of Chromatography A* **1993**, 638, 247-253.

Navratilova, I., Hopkins, A.L., *Medicinal Chemistry Letters* **2010**, 1, 44-48.

Navratilova, I., Papalia, G.A., Rich, R.L., Bedinger, D., Brophy, S., Condon, B., Deng, T., Emerick, A.W., Guan, H.W., Hayden, T., Heutmekers, T., Hoorelbeke, B., McCroskey, M.C., Murphy, M.M., Nakagawa, T., Parmeggiani, F., Qin, X., Rebe, S., Tomasevic, N., Tsang, T., Waddell, M.B., Zhang, F.F., Leavitt, S., Myszka, D.G., *Analytical Biochemistry* **2007**, 364, 67-77.

Nehmé, R., Perrin, C., Cottet, H., Blanchin, M. D., Fabre, H., *Electrophoresis* **2008**, 29, 3013-3023.

Nehmé, R., Perrin, C., Cottet, H., Blanchin, M. D., Fabre, H., *Electrophoresis* **2009**, 30, 1888-1898.

Pantoliano, M.W., Petrella, E.C., Kwasnoski, J.D., Lobanov, V.S., Myslik, J., Graf, E., *Journal of Biomolecular Screening* **2001**, 6, 429-440.

Papalia, G., Leavitt S., Bynum M., Katsamba, W.R., Qiu H., Steukers M., Wang S., Bindu L., Phogat S., Giannetti A., Ryan T., Pudlak V., Matusiewicz K., Michelson K., Nowakowski A., Pham-Baginski, B.J., Tieman B., Bruce B., Vaughn M., Baksh M., Hee Cho Y., De Wit M., Smets A., Vandersmissen J., Michiels L., Myszka D., *Analytical Biochemistry* **2006**, 359, 94-105.

- Papalia, G., Myszka, D., *Analytical Biochemistry* **2010**, 403, 30-35.
- Papalia, G.A., Leavitt, S., Bynum, M.A., Katsamba, P.S., Wilton, R., Qiu, H., Steukers, M., Wang, S., Bindu, L., Phogat, S., Giannetti, A.M., Ryan, T.E., Pudlak, V.A., Matusiewicz, K., Michelson, K.M., Nowakowski, A., Pham-Baginski, A., Brooks, J., Tieman, B.C., Bruce, B.D., Vaughn, M., Baksh, M., Cho, Y.H., De Wit, M., Smets, A., Vandermissen, J., Michiels, L., Myszka, D.G., *Analytical Biochemistry* **2006**, 359, 94-105.
- Parent, A., Pietschner, M., Rak, A., *NanoTemper Technology* **2011**.
- Pastorekova, S., Pastorek, J., *CRP Press : London* **2004**, 255-281.
- Pastorekova, S., Zavadova, Z., Kostal, M., Babusikova, O., Zavada, J., *Virology* **1992**, 187, 620-626.
- Pinho, E., Grootveld, M., Soares, G., Henriques, M., *Carbohydrate Polymers* **2014**, 101, 121-135.
- Platzer, M., Schwarz, M.A., Neubert, H.H., *Journal of Microcolumn Separation* **1999**, 11, 215-222.
- Qiu, N., Cheng, X., Wang, G., Wang, W., Wen, J., Zhang, Y., Song, H., Ma, L., Wei, Y., Peng, A., Chen, L., *Carbohydrate Polymers* **2014**, 101, 623-630.
- Rami, M., Montero, J.L., Dubois, L., Lambin, P., Scozzafava, A., Winum, J.Y., Supuran, C.T., *New Journal Chemistry* **2010**, 34, 2139-2144.
- Ribeiro, A., Sosnik, A., Chiappetta, D.A., Veiga, F., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., *Journal of the Royal Society Interface*, **2012**, 9, 2059-2069.
- Ribeiro, J.P., André, S., Canada, F.J., Gabius, H.J., Butera, A.P., Alves, R.J., Jiménez-Barbero, J., *ChemMedChem* **2010**, 5, 415-419.
- Rich, R.L., Myszka, D.G., *Journal of Molecular Recognition* **2010**, 23, 1-64.
- Rouhana, J., Padilla, A., Estaran, S., Bakari, S., Delbecq, S., Boudik, Y., Chopineau, J., Pugnère, M., Chavinieu, A., *The Journal of Biological Chemistry* **2013**, 288, 4659-4672.
- Rundlett, K.K., Armstrong, D.W., *Electrophoresis* 2001, 22, 1419-1427.
- Rusconi, S. Innocenti A., Vullo, D., Mastrolorenzo A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2004**, 14, 5763-5767.
- Sannes-Lowery, K.A., Griffey, R.H., Hofstadler, S.A., *Analytical Biochemistry* 2000, 280, 264–271.
- Santos, A., Marques, S., Vullo, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2007**, 17, 1538-1543.
- Schardinger, F., *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd* **1905**, 14, 772
- Schardinger, F., *Wien. Klin. Wochschr* **1904**, 17, 207
- Schneider, H.J., Hacket, F., Rüdiger, V., Ikeda, H., *Chemical Review* **1998**, 98, 1755-1786.
- Schwarz, F.P., Reinisch, T., Hinz, H.J., Surolia, A., *IUPAC* **2008**, Vol 80, N° 9, 2025-2040.

Scott, R.L., *Recueil des Travaux Chimique des Pays-Bas* **1956**, 75, 787-789.

Scozzafava, A., Supuran, C.T., *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2003**, 11, 2241-2246.

Servais, A.C., Fillet, A.C., *Methods in Molecular Biology* **2013**, 970, 289-295.

Shapira, A., Livney, Y.D., Broxterman, H.J., and Assaraf, Y.G., *Drug Resistance Updates* 2011, 14, 150-163.

Shuker, S.B., Hajduk, P.J., Meadows, R.P., Fesik, S.W., *Science* **1996**, 274, 1531-1534.

Smith, K.J., Wilcox, J.D., Mirick, G.E, Wacker, L.S., Ryan, N.S., Vensel, D.A., Reading, R., Domush, H.L., Amonoo, E.P., Shariff, S.S., Wenzel, T.J., *Chirality* **2003**, 15, 150-158.

Smith, R.M., Anten, K., Berger, C. (Eds.), *Supercritical Fluid Chromatography with Packed Columns*, Marcel Decker, **1997**, p 223.

Smith, R.M., *Journal of Chromatography A* **1999**, 856, 83-115.

Subramanian, G., *A practical Approach to Chiral Separation by Liquid Chromatography*, VCH. Weinheim; **1994**.

Sudzius, J., Baranauskiene, L., Golovenko, D., Matuliene, J., Michailoviene, V., Torresan, J., Jachno, J., Sukackaite, R., Manakova, E., Grazulis, S., Tumkevicius, S., Matulis, D., *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2010**, 18, 7413-7421.

Suenaga, E., Mizuno, H., Penmetcha, K.K.R, *Biosensors and Bioelectronics* **2012**, 32, 195-201.

Suenaga, E., Mizuno, H., Penmetcha, K.K.R, *Virulence* **2012**, 3, 464-470.

Supuran C.T., *Nature Publishing Group* **2008**, 7, 168-180.

Supuran, C.T., Briganti, F., Tilli, S., Chegwidde, W.R., Scozzafava, A., *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2001**, 9, 703-714.

Supuran, C.T., Scozzafava, A., *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2007**, 15, 4336-4350.

Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., *Medicinal Research Reviews* **2003**, 23, 146-189.

Svedhem, S., Enander, K., Karlsson, M., Sjöbom, H., Liedberg, B., Löfas, S., Martensson, L.G., Sjöstrand, S.E., Svensson, S., Carlsson, U., Lundström, I., *Analytical Biochemistry* 2001, 296, 188-196.

Swiech, O., Mieczkowska, A., Chmurski, K., Bilewicz, R., *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, 116, 1765-1771.

Swietach, P., Patiar, S., Supuran, C.T., Harris, A., Vaughan-Jones, R.D., *The Journal of Biological Chemistry* **2009**, 284, 20299-20305.

Swietach, P., Vaughan-Jones, R.D., Harris, A.L., *Cancer Metastasis Review* **2007**, 26, 299-310.

Szejtli, J., *Chemical Review* **1998**, 98, 1743-1753.

Szejtli, J., *Comprehensive Supramolecular Chemistry* **1996**, 3, 5-40.

Szejtli, J., *Cyclodextrins and their Inclusion Complexes* **1982**, Akademiai Klado, Budapest.

Tachibana, K., Ohnishi, A., *Journal of Chromatography A* **2001**, 996, 127-154.

- Tanaka, Y., Terabe, S., *Journal of Chromatography A* **2002**, 781, 151-160.
- Temperini, C., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2006**, 16, 4316-4320.
- Temperini, C., Winum, J.Y., Montero, J.L., Scozzafava, A., Supuran, C.T., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2007**, 17, 2795-2801.
- Terabe, S., *Trends in Analytical Chemistry* **1989**, 8, 129-134.
- Thiry A., Ledecq M., Cecchi A., Dogné J.M., Wouters J., Supuran C., Masereel B., *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49, 2743-2749.
- Thiry, A., Supuran, C.T., Masereel, B., Dogné, J.M., *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, 51, 3051-3056.
- Tiwari, G., Tiwari, R., Rai, A.K., *Journal of Pharmacy and Bioallied Science* **2010**, 2, 72-79.
- Verpoorte, J.A., Mehta, S., Edsall, J.T., *Journal of Biological Chemistry* **1967**, 242, 4221-4229.
- Villiers, A., Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Compte rendu de l'académie des sciences* **1891**, 112, 536-538.
- Wan, J., Yuan, S., Mak, K., Chen, J., Li, T., Lin, L., Lu, X., *Chemosphere* **2009**, 75, 759-764.
- Wang, C., Zhang, Y., *Journal of Chromatography A* **2013**, 1281, 127-134.
- Wang, T., Barber, M.N., Hardt, I., Kassel, D.B., *Journal of Mass Spectrometry* **2001**, 15, 2067-2075.
- Wang, Z., Separation of chiral compounds by SFC, in S Aduhja (Ed.), *Chiral Separation Methods for Pharmaceuticals and Biotechnological Products*, Johns Wiley & Sons, Calabash, NC, USA, **2011**, 299-329.
- Ward, W.H., Holdgate, G.A., *Progress in Medicinal Chemistry* **2001**, 38, 309-376.
- Whittington, D.A., Waheed, A., Ulmasov, B., Shah, G.N., Grubb, J.H., Sly, W.S., Christianson, D.W., *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* **2001**, 98, 9545-9550.
- Wintgens, V., Amiel, C., *European Polymer Journal* **2010**, 46, 1915-1922.
- Winum, J.Y., Innocenti, A., Vullo, D., Montero, J.L., Supuran, C.T., *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2009**, 19, 5082-5085.
- Wren, S., *Chromatographia* **2001**, 906, 105-125.
- Wren, S., *Journal of Chromatography* **1993**, 635, 113-118.
- Wren, S., Rowe, R.C., *Journal of Chromatography* **1992**, 603, 235-241.
- Yuexian, F., Yu, Y., Shaomin, S., Chuan, D., *Spectrochimica Acta A Part A* **2004**, 61, 953-959.
- Zampronio, G.C., Giannakopoulos, A.E., Zeller, M., Bitziou, E., Macpherson, J.V., Derrick, P.J. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, 5172-5179.

Zhang, G., Keita, B., Craescu, C.T., Miron, S., Oliveira, P., Nadjó, L., *Journal of Physical Chemistry B* **2007**, 111, 11253-11259.

Zhang, Y., Ren, K., He, Z., Li, H., Chen, T., Lei, Y., Xia, S., He, G., Xie, Y., Zheng, Y., Song, X., *Carbohydrate Polymers* **2013**, 98, 638-643.

Zhang, Y.L., Zhang, Z.Y., *Analytical Biochemistry* **1998**, 261, 139-148.

Zubriene, A., Matuliene, J., Baranauskiene, L., Jachno, J., Torresan, J., Michailoviene, V., Cimpmperman, P., Matulis, D., *International Journal of Molecular Sciences* **2009**, 10, 2662-2680.



## **ANNEXE 1 : Etude de la complexation par spectroscopie UV-Visible**

---

Des études de complexation entre nos dérivés et deux cyclodextrines ( $\beta$ -CD et la  $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD) ont été réalisées par spectroscopie UV-Visible. En raison de la faible solubilité aqueuse des dérivés sulfonamidodiarylpyrazoles, aucune constante de complexation de ces dérivés avec les cyclodextrines n'a pu être déterminée. Toutefois, les études d'optimisation sur deux types de spectrophotomètre ont été réalisées sur un composé de référence.

### **I. La spectroscopie UV-Visible**

L'évaluation des constantes d'interaction d'un complexe par spectroscopie UV-Visible par méthode directe repose sur les différences d'absorbance de l'analyte sous sa forme libre et complexée (Leyva *et al*, 2001). La détermination des constantes d'interaction nécessite ici encore la réalisation d'une titration afin d'observer les variations spectrales obtenues pour la molécule d'intérêt en présence de différentes concentrations en agent de complexation (cyclodextrine). La méthode de titration directe ne peut s'appliquer qu'aux molécules qui présentent un spectre d'absorption dans l'UV-Visible et dont la variation est significativement différente en présence de cyclodextrine. Compte tenu du fait que nos composés n'ont pas de chromophore satisfaisant, nous avons utilisé une méthode par compétition. Celle-ci nécessite la titration au préalable d'une molécule tierce (le compétiteur).

### **II. Principe de la méthode de titration**

La titration appliquée au couple cyclodextrine / analyte ou « hôte/invité » consiste à observer les changements spectraux d'une espèce donnée sous l'addition d'une concentration graduelle de l'autre composé. Puisque la cyclodextrine ne dispose pas de chromophore, il s'avère nécessaire d'observer les spectres d'absorption moléculaire de la molécule invitée.

L'absorptivité molaire de l'invité et celle du complexe permettent d'accéder à la constante de formation du complexe. Comme décrit précédemment, lorsqu'une molécule de cyclodextrine (C) s'associe à un composé (R) (complexe 1 : 1), la stabilité du complexe est définie par la constante d'interaction K



$$K = \frac{[RC]}{[R][C]} \quad (2)$$

La constante d'interaction du complexe formé est déterminée grâce à la différence d'absorbance du composé seul et du composé en présence de cyclodextrine. Une absorbance  $A_0$ , correspond au spectre du composé seul et une absorbance  $A$  correspond au spectre du composé associé à la cyclodextrine. La différence spectrale permet de déterminer les constantes d'interaction du composé.

### III. Principe de la méthode de compétition

L'étude consiste à observer les variations spectrales d'une molécule compétiteur en présence de cyclodextrine et de concentrations variables de molécule invitée. Le compétiteur utilisé est le Méthylorange (MO) appelé aussi hélianthine (figure 1). Dans un premier temps nous déterminons les concentrations optimales de cyclodextrine et de MO (compétiteur) permettant d'observer des variations significatives d'absorbance et dans un deuxième temps nous réalisons une titration de notre analyte d'intérêt (dont l'absorptivité molaire est nulle à la longueur d'onde analytique) afin de déterminer la constante d'interaction  $K$  (Matsui and Mochida, 1978 ; Yuexian *et al*, 2005 ; Sawunyama *et al*, 2001 and Khomutov *et al*, 2002).

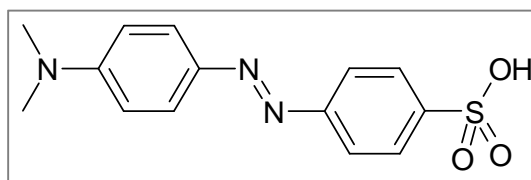
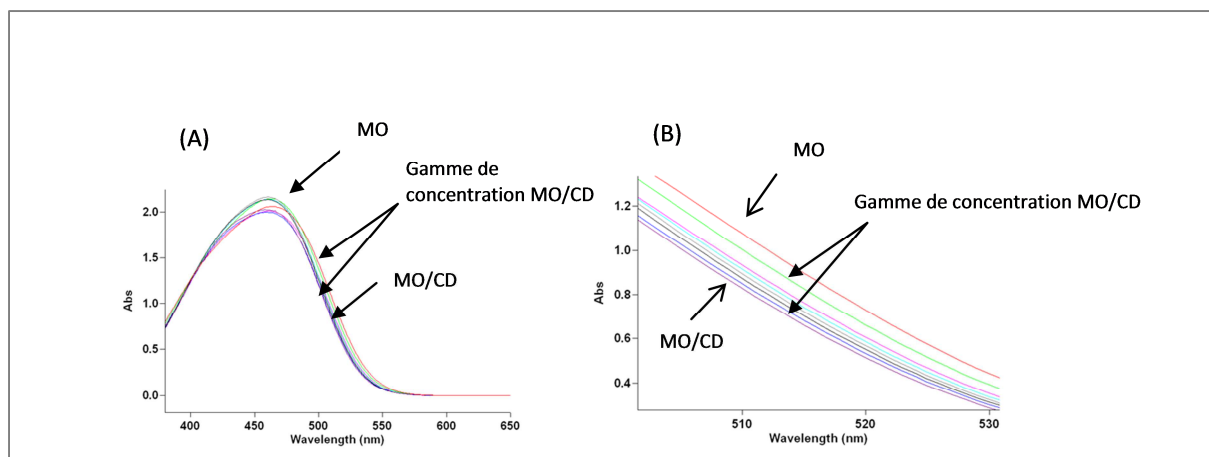


Figure 1 : Structure du Méthyle Orange

Le Méthylorange a une absorptivité molaire différente sous sa forme libre et sous sa forme complexée dans le domaine du visible.

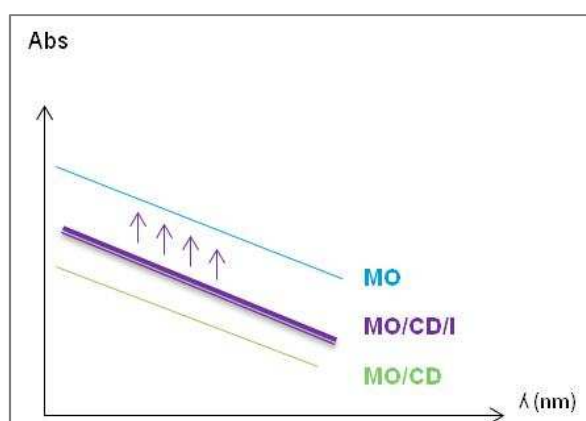
Lors de l'ajout de CD à la solution de MO, il y a formation du complexe d'inclusion MéthylOrange/cyclodextrine (MO/CD), se traduisant par une diminution de l'absorbance (figure 2).



**Figure 2** : Spectre de l'absorbance du Méthylorange sous sa forme libre et sous sa forme complexé, (A) : Spectre de 380 à 650 nm et (B) : Spectre de 500 à 530 nm.

A la longueur d'onde maximale,  $\lambda_{\text{max}}$  du MO (460 nm), les variations spectrales entre les différentes solutions ne sont pas significatives. Afin d'obtenir une variation significative entre chaque courbe, une gamme spectrale de 520 à 530 nm a été étudiée, correspondant à une bonne répétabilité des spectres et à une amplitude satisfaisante entre le signal minimum et maximum, contrairement au  $\lambda_{\text{max}}$  (figure X). De plus, dans le but de minimiser l'erreur, le calcul de la dérivée sera réalisé pour chaque courbe.

Lors des ajouts dosés d'une solution contenant l'analyte d'intérêt (I), la courbe MO/CD se déplace vers la courbe MO (figure 3).



**Figure 3** : Spectres représentant la méthode de titration par compétition, (MO : méthylorange seul, MO/CD : méthylorange en présence de CD, MO/CD/I : méthylorange en présence de CD et de la molécule invitée)

La stabilité du complexe d'inclusion CD/i peut s'évaluer grâce aux différences spectrales entre les mesures. Celles-ci dépendent des concentrations totales de chaque molécule et des affinités relatives aux complexes. L'absorbance de la solution de MO+CD+I est calculée à partir de la relation :

$$A = l.(\epsilon_{MO}.[MO]+\epsilon_{MOCD}.[MOCD]) \quad (3)$$

Avec A l'absorbance, l le trajet optique (cm),  $\epsilon_{MO}$  et  $\epsilon_{MOCD}$  les coefficients d'absorptivités molaires ( $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ ) du méthylorange seule et du méthylorange en présence de CD à la longueur d'onde  $\lambda$  d'étude, enfin [MO] et [MOCD] ( $mol.L^{-1}$ ), les concentrations du méthylorange seul et du méthylorange en présence de CD.

Le traitement des données obtenues par la méthode de compétition nécessite l'utilisation d'outils mathématiques développés au laboratoire de chimies environnementales et interaction sur le vivant (CEIV) de l'université du littoral Côte d'Opale (ULCO) par le Pr. D. Landy. La combinaison de deux algorithmes est nécessaire afin de déterminer les constantes de complexation :

- Le premier calcule les concentrations de chacune des espèces à l'équilibre à partir d'une valeur postulée de constante de formation pour le complexe CD/I
- Le deuxième calcule l'absorbance théorique à partir des concentrations précédemment estimées. L'algorithme fait varier la valeur de K jusqu' à ce que l'absorbance théorique corresponde à l'absorbance expérimentale.

#### IV. Optimisation de la méthode de compétition

Dans un premier temps, dans le but d'optimiser la méthode par compétition, nous avons étudié l'interaction entre la  $\beta$ -CD, le Méthylorange et le phénol, décrit dans la littérature (Landy *et al*, 2000).

Cette étude a été réalisée sur deux types de spectrophotomètres, un spectrophotomètre classique, utilisant des cuves de 1cm (Cary100 scan) et un spectrophotomètre lecteur de microplaque (Varioskan). L'objectif de cette comparaison était de miniaturiser la méthode, permettant une diminution de la consommation en composé et permettant une automatisation.

##### Remarque :

Les traitements (calcul de la dérivée et de l'aire sous la courbe) seront réalisés à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 4.

Les résultats obtenus avec le spectrophotomètre UV-Visible seront d'abord présentés.

### Conditions opératoires :

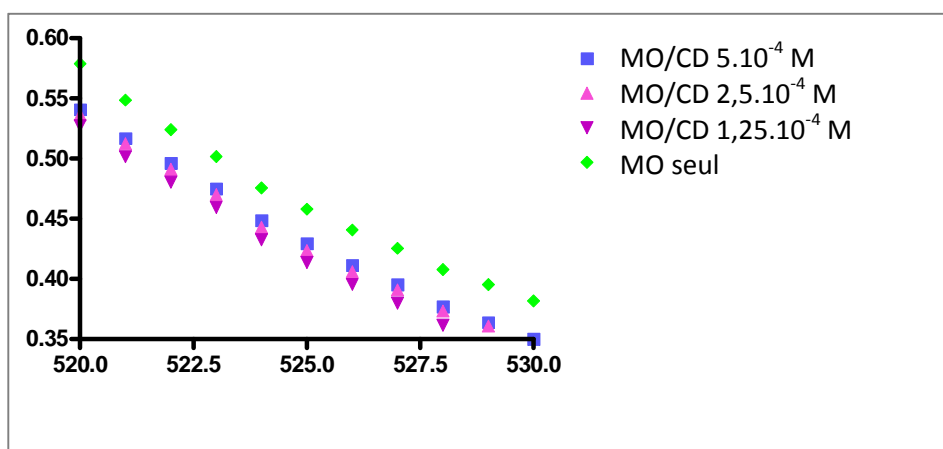
Cuves en quartz (3 mL),  $l = 1$  cm  
Tampon phosphate 50 mM pH 6,5  
Longueur d'onde : 520-530 nm  
Température : 25°C

### Préparation des solutions :

- (1) Solution de Méthylorange (MO) à  $1.10^{-4}$  M dans le tampon phosphate
- (2) Solution de  $\beta$ -CD à  $5.10^{-4}$  M et de  $1.10^{-4}$  M en MO : dissolution de la  $\beta$ -CD directement dans la solution (1) préparée
- Gamme de concentration en  $\beta$ -CD de  $1.10^{-4}$  à  $5.10^{-4}$  M : dilution de la solution (2) dans la solution (1)
- Phénol (molécule invitée) : gamme de 0 à  $10^{-2}$  M à partir de la solution (2) ( $[MO] = 1.10^{-4}$  M et  $[CD] = 5.10^{-4}$  M)

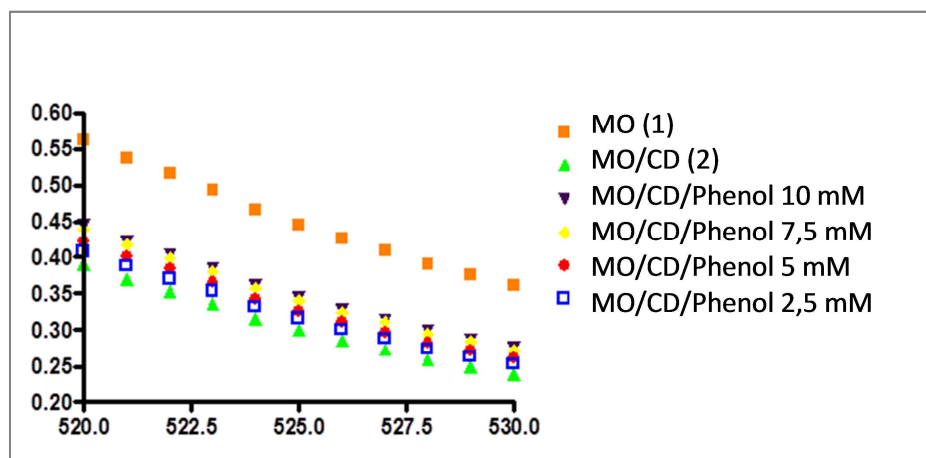
L'enregistrement des spectres a été réalisé entre 520 et 530 nm (par incrément de 0,1 nm), gamme spectrale où la variation entre les différents spectres (concentrations différentes en CD) est significative. L'aire sous la courbe de la dérivée première des spectres dépend de la concentration en MO sous forme complexée et sous forme libre (figure 4). Les algorithmes décrits précédemment permettent de déterminer la constante d'interaction du complexe CD MO et CD/analyte d'intérêt. Pour accéder à la constante de complexation du complexe  $\beta$ -CD/Phénol, il faut d'abord déterminer, par méthode directe, la constante d'affinité du MO avec la  $\beta$ -CD.

La constante de complexation du Méthylorange avec la  $\beta$ -CD est de  $2001 \text{ M}^{-1}$ .



**Figure 4 :** Spectres dérivés de la titration du Méthyl Orange en présence de concentration croissante en CD

Lors de l'addition du phénol dans la solution (2) de MO/ $\beta$ -CD ( $[MO] = 1.10^{-4}$  M et  $[CD] = 5.10^{-4}$  M), on observe une augmentation de l'absorbance de la solution contenant les trois partenaires CD/MO/Phénol par rapport à la solution MO/CD ce qui indique que le phénol déplace le MO de la cavité de la CD (figure 5).



**Figure 5 :** Courbes dérivées des spectres d'absorbance de différentes solutions : MO, MO+CD  $5.10^{-4}$  M et une gamme de concentration en phénol de 2,5 mM à 10 mM.

Le calcul de la constante de complexation du phénol avec la  $\beta$ -CD est en accord avec celle énoncée dans la littérature ( $K = 105 \text{ M}^{-1}$ ), ce qui nous a permis de valider la méthode (Landy *et al*, 2000).

## V. Comparaison des spectrophotomètres

Dans un second temps, nous avons optimisé la méthodologie en utilisant un lecteur de microplaques pour l'étude du complexe entre le phénol et la  $\beta$ -CD. Nous avons utilisé les mêmes solutions que celles utilisées avec le spectrophotomètre utilisant des cuves.

### Conditions opératoires :

Microplaque 96 puits (200 $\mu$ L) à fond rond et à fond plat

Tampon phosphate 50 mM pH 6,5

Longueur d'onde : 520-530 nm (incrément de 1 nm)

Température : 20-40°C

### Préparation des solutions :

- Solution de Méthyl orange (MO) à  $1.10^{-4}$  M dans le tampon phosphate
- Solution de  $\beta$ -CD à  $5.10^{-4}$  M et de  $1.10^{-4}$  M en MO
- Gamme de concentration en  $\beta$ -CD de  $1.10^{-4}$  à  $5.10^{-4}$  M
- Phénol (molécule invitée) dans la solution de MO +  $\beta$ -CD (gamme de 0 à  $10^{-2}$  M)

Comme pour l'étude précédente, l'enregistrement des spectres a été réalisé entre 520 et 530 nm. Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de la microplaque utilisée (fond rond ou plat). Afin de connaître l'incertitude des mesures en fonction des microplaques utilisées, nous avons comparé les valeurs d'absorbance obtenues pour 20 solutions de MO seul. L'écart type à partir des mesures d'absorbance avec la microplaque à fond rond ( $9.10^{-4}$ ) est plus faible qu'avec la microplaque à fond plat ( $1.4.10^{-3}$ ). Les microplaques à fond rond sont donc utilisées dans les travaux suivants.

La constante de complexation du complexe MO/ $\beta$ -CD a d'abord été déterminée, par la méthode directe ( $2165 \text{ M}^{-1}$ ). Puis, la constante de formation du complexe Phénol/ $\beta$ -CD a été déterminée,  $K = 98 \text{ M}^{-1}$ .

Comme les constantes obtenues avec le spectrophotomètre lecteur de microplaques et le spectrophotomètre classique sont très proches, nous avons sélectionné le lecteur de microplaques afin de réaliser un plus grand nombre d'expériences en consommant un minimum d'échantillon. De plus, cet appareil permet de réaliser des études en température (appareil thermostaté contrairement au spectrophotomètre classique) et d'automatiser les manipulations fastidieuses.

### **1. Etude du complexe $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD/ Phénol**

Une étude de complexation entre le phénol et la  $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment.

Les valeurs des constantes de complexation sont décrites dans le tableau 1.

Composé	$\beta$ -CD	$\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD
MO	2165	1330
Phénol	89	202

**Tableau 1 :** Constantes de complexation ( $\text{M}^{-1}$ ) obtenues pour le Méthyl Orange et pour le phénol avec la  $\beta$ -CD et la  $\text{NH}_2$ - $\beta$ -CD.

Le calcul de la constante de complexation du phénol avec la  $\beta$ -CD sur un spectrophotomètre lecteur de microplaques est en accord avec celle énoncée dans la littérature ( $K= 105 \text{ M}^{-1}$ ), ce qui nous a permis de valider la méthode.

## **2. Application de la méthode à nos analytes**

Par la suite, nous avons appliqué cette méthodologie à nos composés. En raison d'une faible solubilité aqueuse, la mise en solution préalable à une concentration de 20 mM est réalisée dans le méthanol. Lors des études de complexation, notamment en spectroscopie UV-Visible, l'utilisation de solvant organique est peu recommandée. En effet, le méthanol peut avoir un impact sur la complexation (phénomène de compétition) et/ou sur l'absorptivité molaire du chromophore. Nous avons choisi de limiter le pourcentage de MeOH à 0,05%.

Pour déterminer les constantes de complexation, une gamme en analyte de 0.1 à 1 mM est envisagée. Pour ce faire, une solution mère d'Alica 87 à 20 mM dans le méthanol est nécessaire. Les résultats obtenus ne sont pas exploitables en raison de la faible solubilité de nos composés. Des études sur l'influence de la proportion en solvant organique seront menées au laboratoire pour l'étude de nos composés d'intérêt.



## ANNEXE 2 : Détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (DEDL)

---

Le détecteur évaporatif à diffusion de la lumière est un détecteur universel, qui, a été mis au point pour résoudre la détection de molécules sans chromophores. La détection des composants d'un échantillon par l'intermédiaire d'un DEDL comprend trois étapes distinctes (Figure 6) :

(a) la nébulisation : l'éluant de la colonne est mélangé à un gaz inerte ( $N_2$ ) et passe par l'orifice étroit d'un nébuliseur pour produire une brume homogène composée de gouttelettes de phase mobile contenant le composé d'intérêt. L'excédent de solvant s'évacue par le drain à la base du nébuliseur. La nébulisation est efficace lorsqu'un éventail stable de gouttelettes est obtenu (gouttelettes uniformes).

(b) l'évaporation de la phase mobile : l'éluant nébulisé est entraîné par le flux de gaz inerte dans un tube de chauffage pour évaporer le reste de la phase mobile. Des molécules isolées des analytes dissous sont obtenues à partir de cette brume à la sortie de ce tube d'évaporation. La température du tube est fixée en fonction de l'analyte et contrôlée par l'utilisateur.

(c) la détection : le jet de particules solides entre dans une cellule qui inclut une source lumineuse (laser ou LED) et un photomultiplicateur. Les particules éclairées dévient la lumière en fonction de leur taille. L'intensité de la lumière dispersée par les particules est directement liée à la masse du composé élué. La lumière déviée est détectée par le photomultiplicateur fixé à un angle défini de la lumière incidente (souvent  $45^\circ$ ), (Froehlich, 2010).

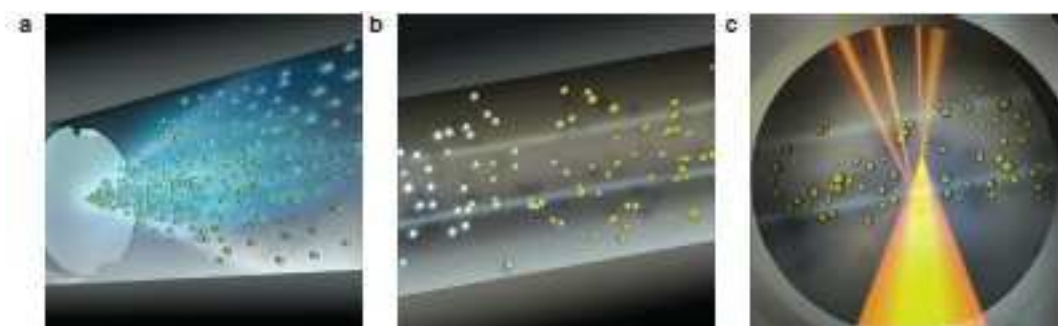


Figure 6 : Schéma du principe du DEDL.

La taille des gouttelettes (ou particules) est de la plus haute importance dans le processus de diffusion de la lumière. Elle est liée à de nombreuses propriétés de la phase mobile, à savoir la viscosité, le débit, la vitesse du gaz de nébulisation ainsi que le diamètre du capillaire de nébulisation, c'est à dire à la pression d'atomisation (Charlesworth, 1978). Par exemple, l'augmentation de la

pression de pulvérisation conduit à une diminution de la taille des gouttelettes, ce qui réduit la réponse du détecteur (Mourey *et al*, 1984). D'autres paramètres peuvent modifier la réponse du détecteur telle que la température dans le tube de dérive, et la concentration du composé. Pour ce dernier paramètre, il a été montré qu'il existe une valeur optimale de la concentration, ce qui induit une taille de particules optimale pour l'efficacité de dispersion (Mourey *et al*, 1984 ; Van der Meeren *et al*, 1992).

Le DEDL est souvent considéré comme un détecteur de masse. Sa réponse suit une loi non linéaire de la masse de l'analyte ( $m$ ) (Lesellier *et al*, 2012) telle que:

$$A = a \cdot m^b$$

Ou  $a$  et  $b$  sont des constantes.

La linéarité de l'étalonnage est obtenue avec l'utilisation du double logarithme :

$$\log A = b \log m + \log a$$

## ANNEXE 3 : Résonance plasmonique de surface

---

### I. Maintenance du Biacore

La maintenance de l'appareil Biacore est nécessaire à l'obtention d'une analyse de qualité.

Des protocoles de lavage appelés « Desorbe » ou « Sanitize » doivent être réalisés régulièrement sur une lame de maintenance.

Le « Désorbe » est un protocole de lavage qui permet d'éliminer les protéines adsorbées dans les tubulures de la pompe et de la carte microfluidique. Il consiste en l'injection successive de deux solutions appelés « Biadesorb 1 » (dodecylsulphate de sodium) et « Biadesorb 2 » (50 mM de glycine, ajustée à pH 9,5 avec de la soude 5 N se trouvant dans le BIAmaintenance Kit).

Le « Sanitize » est un protocole de lavage qui nettoie et désinfecte l'ensemble du circuit à l'eau de javel diluée (7,5% dans l'eau).

Lorsque des artefacts reflétant des phénomènes de cristallisation dans les tubulures du système microfluidique sont observés sur les sensorgrammes, des lavages à l'acide acétique et à l'eau chaude peuvent être réalisés.

Une fois ces lavages effectués, plusieurs « primes » sont réalisés à l'eau avant que la lame de maintenance puisse être retirée. Il s'agit de rinçages à débit élevé ( $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ) permettant également d'éliminer d'éventuelles bulles d'air présentes dans le système.

### II. Conditionnement des lames

- Lame CM 5 et CM 7

Trois « primes » sont réalisés sur les quatre cellules par infusion du tampon PBS 1X, puis par deux injections successives à un débit de  $100 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  pendant 10 s de HCl 10 mM, de NaOH 50 mM, de SDS 0,1 % et d'eau ultra pure.

- Lame CAP

Avant la première utilisation, la lame CAP nécessite un pré-conditionnement qui se fait en plusieurs étapes. Le tampon de course (HBS-P) à 20  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  est infusé pendant une nuit jusqu'à stabilisation (étape 1). Par la suite, trois injections successives d'une solution de régénération (mélange extemporané de trois volumes d'une solution de chlorhydrate de guanidine à 8 M et d'un volume de NaOH 1M) sont réalisées à un débit de 2  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  pendant 1 minute (étape 2). Le réactif de biocapture (streptavidine conjuguée avec l'oligonucléotide simple brin complémentaire de l'ADN pré-immobilisé sur la lame) est ensuite injecté sur les quatre cellules pendant cinq minutes à un débit de 2  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  (étape 3). La protéine biotinyllée est ensuite injectée 30 minutes à 2  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  (étape 4). Enfin, la solution de régénération est injectée pendant 2 minutes à 20  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  (étape 5). Les étapes 2, 3, 4 et 5 sont répétées trois fois avant de pouvoir utiliser la lame pour étudier l'affinité des composés.

### III. Protéines étudiées

Protéines	Abréviation	Masse Molaire (Dalton)	Fournisseur	Composition
<b>Anhydrase carbonique II bovine</b>	AC II b	30000	Sigma Aldrich	Lyophilisée
<b>Anhydrase carbonique II humaine</b>	AC II h	30000	Sigma Aldrich	Lyophilisée
<b>Anhydrase carbonique IX humaine</b>	AC IX h	42000	R&D System	En solution (Tris 25 mM et 150 mM NaCl, pH 7,5)
<b>Anhydrase carbonique XII humaine</b>	AC XII h	37000	Sino Biological	Lyophilisée

Tableau 2 : Protéines étudiées humaines et bovines de l'AC.

#### IV. Protocole de régénération d'une lame de type streptavidine

Après immobilisation de la protéine et mesure d'interactions, une solution de régénération préparée extemporanément par mélange de trois volumes de chlorhydrate de guanidine à 8 M et de un volume de NaOH 1 M, est injectée à  $20 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  pendant 2 minutes.

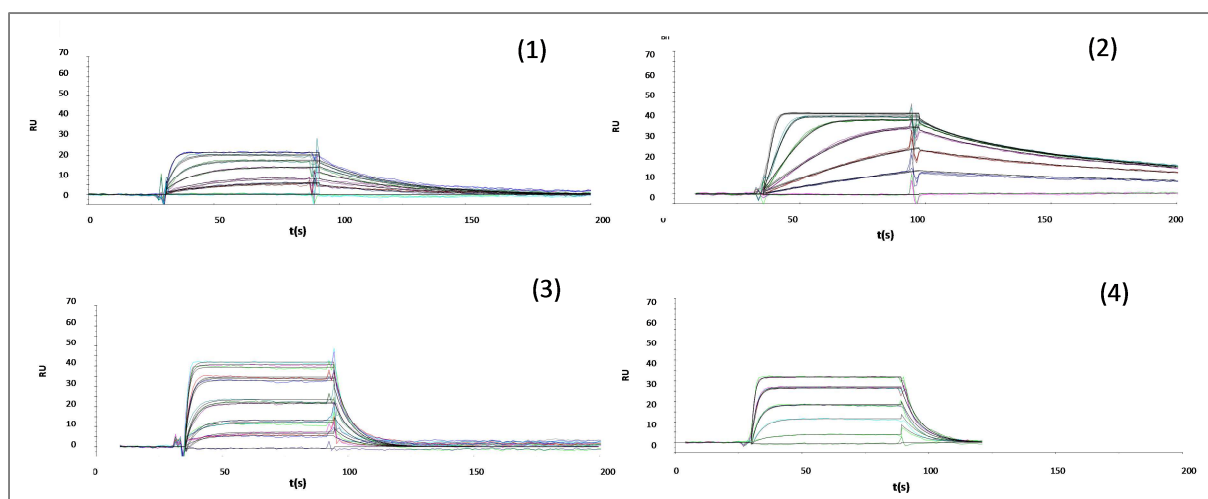
#### V. Etudes expérimentales

Les gammes de concentrations en analyte étudiées lors de la détermination de l'affinité d'un analyte pour l'AC sont données tableau 3.

	CM 5	CM 7
<b>AZA</b>	0,00136-1 $\mu\text{M}$	0,015-2 $\mu\text{M}$
<b>Alica 13</b>	0-0,33 $\mu\text{M}$	0,015-2 $\mu\text{M}$
<b>Alipk 41</b>	0-1,5 $\mu\text{M}$	0,015-4 $\mu\text{M}$
<b>Alipk 177</b>	0-1 $\mu\text{M}$	0,015-4 $\mu\text{M}$
<b>Alica 87</b>	-	0,015-4 $\mu\text{M}$
<b>Alica 76</b>	-	0,015-4 $\mu\text{M}$
<b>Alica 94</b>	-	0,015-4 $\mu\text{M}$
<b>Alica 23</b>	-	0,015-4 $\mu\text{M}$
<b>Alica 15</b>	-	0,015-4 $\mu\text{M}$

**Tableau 3** : Gamme de concentrations des analytes étudiée sur les lames CM 5 et CM 7.

La figure 7 présente, les sensorgrammes obtenues pour l'interaction de l'AZA, l'Alica 13, l'Alipk 41 et l'Alipk 177 avec l'AC II h et les fits obtenus par le logiciel Biaeval.



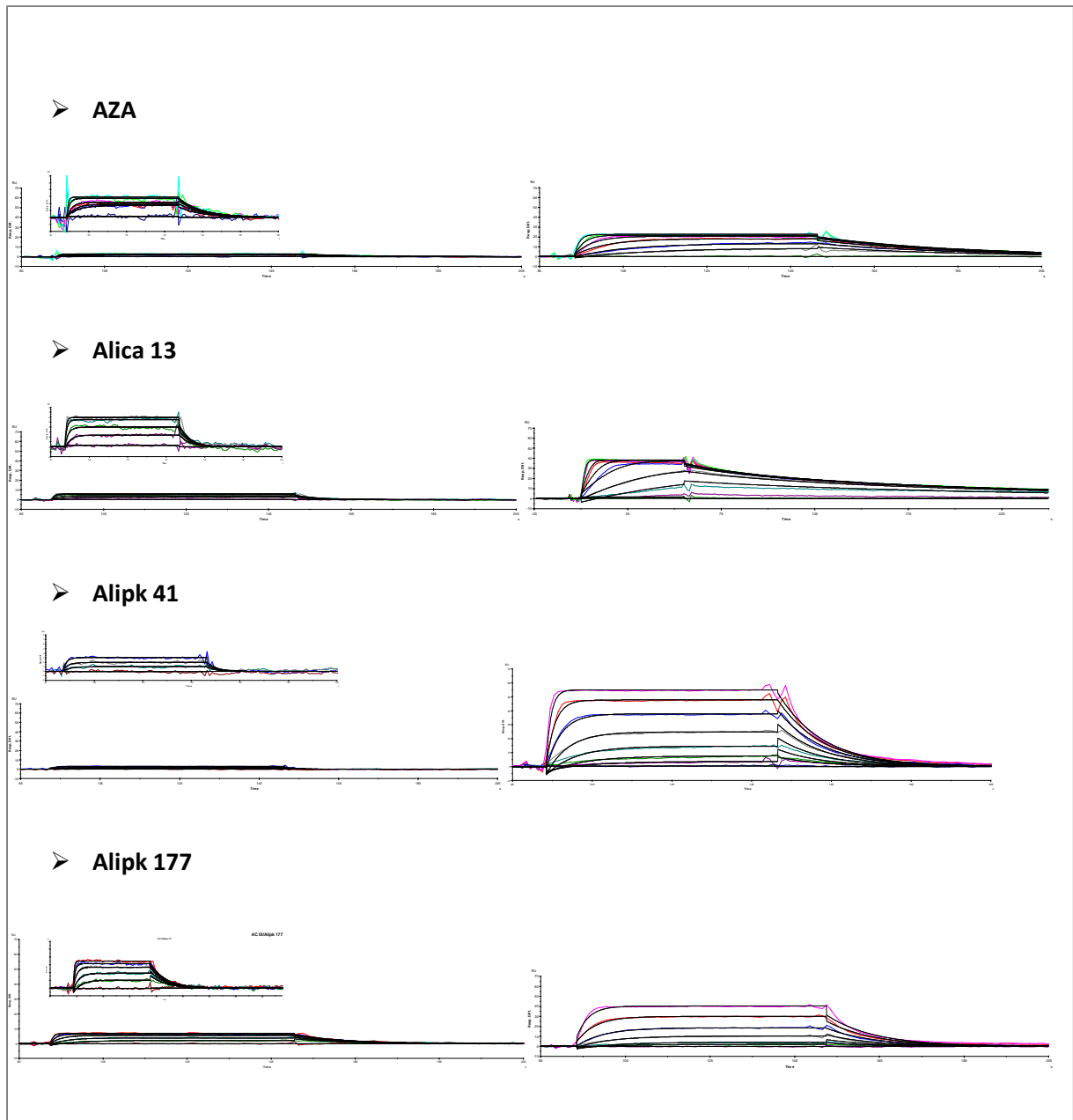
**Figure 7** : Sensorgrammes obtenus pour les différents analytes étudiés avec l'AC II h, (1) : AZA, (2) : Alica 13, (3) : Alipk 41 et (4) : Alipk 177. ; tampon PBS 1X, 1% DMSO. En couleur : sensorgrammes ; en noir :fits.

Le tableau X détaille les constantes cinétiques et thermodynamiques obtenues lors de l'interaction des quatre composés pour l'AC II h.

Composé	$k_a$ ( $10^6 \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$k_d$ ( $10^{-2} \cdot s^{-1}$ )	$K_D = k_d/k_a$ (nM)	$K_D$ équilibre (nM)
<b>AZA</b>	$1,7 \pm 0,7$	$3,4 \pm 2,0$	$20 \pm 15$	$32 \pm 9$
<b>Alica 13</b>	$5,0 \pm 0,9$	$2,9 \pm 0,7$	$6 \pm 4$	$19 \pm 10$
<b>Alipk 41</b>	$0,8 \pm 0,2$	$14,5 \pm 1,0$	$177 \pm 44$	$202 \pm 52$
<b>Alipk 177</b>	$0,4 \pm 0,1$	$10,9 \pm 0,6$	$299 \pm 25$	$245 \pm 35$

**Tableau 4** : Constantes cinétiques et thermodynamique caractéristiques de l'interaction Analyte/AC II h.

Pour comparer les profils d'interaction des quatre analytes étudiés pour l'AC II h et l'AC IX h sur la lame CM 5. Les sensorgrammes obtenus lors des manipulations préliminaires sont donnés figure 8.



**Figure 8** : Comparaison des sensorgrammes obtenus pour l'étude des quatre dérivés (AZA, Alica 13, Alipk 41, Alipk 177) avec l'AC II h et l'AC IX h.