

50376
1992
333

64457

50376
1992
333

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

Année 1992

N° d'ordre : 1027

Thèse de Doctorat d'Université
(nouveau régime)

présentée à l'Université de LILLE I
pour l'obtention du grade de

Docteur en Chimie

par



William BOURGUET



**SYNTHESE DE NOUVEAUX LIGANDS UTILISABLES
POUR LA PURIFICATION DES RECEPTEURS DE
L'ACIDE RETINOIQUE ET L'ETUDE DU MODE D'ACTION
DES RETINOIDES**

Présentée le 18 décembre 1992 devant la commission d'examen

JURY

Président	:	Dr. Jean Pierre HENICHART
Rapporteurs	:	Dr. Hinrich GRONEMEYER Pr. Pierre FORMSTECHE
Examineurs	:	Pr. Jean Luc BERNIER Dr. Bernard SABLONNIERE

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué au sein de l'équipe de recherche dirigée par Monsieur Jean-Pierre HENICHART, Directeur de Recherche à l'INSERM (U16 Lille). Je tiens à vous adresser le témoignage de ma reconnaissance pour cette étude que vous m'avez confiée et pour l'accueil que vous m'avez réservé au sein de votre équipe. Malgré vos nombreuses responsabilités, vous avez accepté de présider ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements.

Monsieur Pierre FORMSTECHE, Professeur à l'Université de Lille II et Monsieur Hinrich GRONEMEYER, Directeur de Recherche à l'INSERM (U184 Strasbourg) ont bien voulu juger ce travail et en être les rapporteurs. Je vous en remercie très sincèrement.

Monsieur Jean-Luc BERNIER, Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille et Monsieur Bernard SABLONNIERE, Maître de Conférence à l'Université de Lille II ont également accepté de siéger à ce jury. Je tiens à vous exprimer mes remerciements pour votre disponibilité permanente et les conseils que vous m'avez prodigués.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur le Professeur Daniel LESIEUR, Directeur de l'Institut de Chimie Pharmaceutique de Lille, de m'avoir accueilli dans son Laboratoire.

Je voudrais remercier tous ceux qui, à divers titres, ont contribué à l'élaboration de ce travail. En particulier Karine MONDO et Fatiha LARABI pour votre collaboration efficace en synthèse organique, Dominique MANECHEZ pour toutes les études biologiques et pour les nombreux moments passés ensemble où avec enthousiasme tu m'as initié à la recherche en biologie et également Isabelle GRILLIER, Philippe LEFEBVRE, Nathalie DALLERY et Ali TAHAYATO qui, avec beaucoup de patience, m'ont aidé à effectuer mes premiers pas en biochimie. Je tiens enfin à remercier Bernard SABLONNIERE pour la culture cellulaire et pour la préparation des extraits utilisés lors de la purification des récepteurs nucléaires.

ABREVIATIONS

ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc :	ADN complémentaire
Am80 :	acides rétinobenzoïques de la série Amide
AMPc :	Adenosine MonoPhosphate cyclique
AR :	Acide Rétinoïque
Ar :	Aromatique
ARN :	Acide RiboNucléique
ARNm :	ARN messenger
CAT :	Chloramphénicol Acétyl Transférase
CD367 :	(CompoundD 367) : TTAB (TetrahydroTetramethylAnthracenylBenzoic acid)
CE50 :	Concentration Efficace 50 %
Ch55 :	acide rétinobenzoïque de la serie Chalcone
CL50 :	Concentration Léthale 50 %
CL100 :	Concentration Léthale 100 %
CM :	ChyloMicrons
CME :	Concentration Minimale Efficace
CMR :	ChyloMicrons Remnants
COS :	Cellules de rein de singe
CRABP :	Cellular Retinoic Acid Binding Protein
CRBP :	Cellular Retinol Binding Protein
DAG :	DiAcylGlycerol
DCCI :	DiCyclohexylCarbodiImide
DE50 :	Dose Efficace 50 %
DIEA :	N,N-DiIsopropylEthylAmine
DMBA :	7,12-DiMéthylBenzAnthracène
DMF :	DiMéthylFormamide
DTT :	DiThioThreitol

E :	température d'ébullition
EGF :	Epidermal Growth Factor
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor
ER :	Estrogen Receptor
F :	température de fusion
GR :	Glucocorticoid Receptor
HL-60 :	Human Leukemia
HRE :	Hormone Response Element
Kd :	constante de dissociation à l'équilibre
Ki :	constante d'inhibition
NOE :	Nuclear Overhauser Effect
NBT :	NitroBleu de Tétrazolium
PKA :	Protéine Kinase A
PKC :	Protéine Kinase C
pm :	poids moléculaire
RAR :	Retinoic Acid Receptor
RARE :	Retinoic Acid Response Element
RBP :	Retinol Binding Protein
RE :	Retinyl Esters
ROH :	Rétinol
RSA :	Relations Structure-Activité
RSBP :	Retinoid Specific Binding Protein
RXRs :	récepteurs de l'acide rétinoïque différents des RARs
RXRE :	élément de réponse des RXRs
tBu :	tertioButyle
TG :	TransGlutaminase
THF :	TétraHydroFurane
TPA :	12-O-TetradecanoylPhorbol-13-Acetate
TR :	Thyroid Receptor

TRE : Thyroid Response Element
Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TTNN : TetrahydroTetramethylNaphtalenylNaphtalenic acid
TTNPB : TetrahydroTetraNaphtalenylPropenylBenzoic acid
TTR : TransThyRétine
VHB : Virus de l'Hépatite B

Ce travail effectué dans le laboratoire de Biochimie des Protéines (I.N.S.E.R.M. Unité 16) sous la direction de Monsieur Jean Pierre Hénichart en collaboration avec le laboratoire de Biochimie Structurale de la Faculté de Médecine de Lille a fait l'objet des communications suivantes :

PUBLICATIONS

Bourguet, W. ; Sablonnière, B. ; Formstecher, P. ; Chen, J.Y. ; Bernier, J.L. and Hénichart, J.P.

Synthesis of a biospecific adsorbent for the purification of the three human retinoic acid receptors (hRARs) by affinity chromatography.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, **187**, 711-716

Manechez, D. ; Bourguet, W. ; Tbarka, N. ; Bernier, J.L. ; Formstecher, P. and Dautrevaux, M.

Differential involvement of the protein kinase C pathway during the induction of tissue transglutaminase expression in HL-60 cells by retinoic acid and synthetic retinoids.

Exp. Cell Res., 1992 (soumise)

COMMUNICATIONS PAR AFFICHES

Manechez, D.; Bourguet, W.; Bernier, J.L.; Formstecher, P. and Dautrevaux, M.

Retinobenzoic acids. Effects on expression of tissue transglutaminase and differentiation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60) and neuroblastoma cells (SK-N-SH).

Second International Conference on Transglutaminases and Protein Crosslinking Reactions, Cannes, 1990.

Bourguet, W. ; Manechez, D. ; Bernier, J.L. ; Formstecher, P. et Hénichart, J.P.

Rétinoïdes. Synthèse d'une chalcone destinée à préparer un gel d'affinité pour la purification des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque.

3èmes journées franco-belges de pharmacochimie, Liège, Belgique, 1990.

Bourguet, W. ; Manechez, D. ; Bernier, J.L. ; Formstecher, P. et Hénichart, J.P.

Induction différentielle de la transglutaminase de tissu, marqueur de l'apoptose, par l'acide rétinoïque et les acides rétinoïques.

4èmes journées franco-belges de pharmacochimie, Lille, France, 1991.

Bourguet, W. ; Sablonnière, B. ; Bernier, J.L. ; Chen, J.Y. and Formstecher, P.
Design of a new suitable adsorbent for the purification of the three human retinoic acid receptors by affinity-chromatography.

F.A.S.E.B. "Summer research conference" sur les rétinoïdes, Saxtons River, U.S.A., 1992.

Grillier, I. ; Bourguet, W. ; Sablonnière, B. ; Manechez, D. ; Chen, J.Y. ; Formstecher, P. and Dautrevaux, M.

Structure activity relationships of novel substituted chalcone and triphenylethylenic derivatives.

The 10th symposium on advances in skin pharmacology, Sophia Antipolis, France, 1992.

INTRODUCTION

L'acide rétinoïque (AR), un des métabolites du rétinol (vitamine A), est bien connu pour exercer ses effets sur la croissance et la différenciation cellulaire. C'est également un composé essentiel pour le bon développement embryonnaire. Du fait de son activité différenciatrice et antiproliférative notamment au niveau des tissus épithéliaux, l'acide rétinoïque ou ses dérivés (les rétinoïdes) sont utilisés en dermatologie depuis fort longtemps. Par exemple, le Trétinoïne, l'Isotrétinoïne et l'Etrétinate sont utilisés dans le traitement de l'acné ou du psoriasis. Malheureusement les effets secondaires importants de ces molécules (desquamation, prurit, troubles osseux, irritation conjonctivale...) limitent leurs possibilités d'emploi. De plus, l'effet tératogène, bien connu pour la vitamine A, existe aussi pour tous les rétinoïdes. L'acide rétinoïque provoque la majorité de ses effets biologiques en se liant à deux familles de récepteurs nucléaires ($RAR\alpha$, β , γ et $RXR\alpha$, β , γ) appartenant à la superfamille des régulateurs de la transcription dépendant d'un ligand.

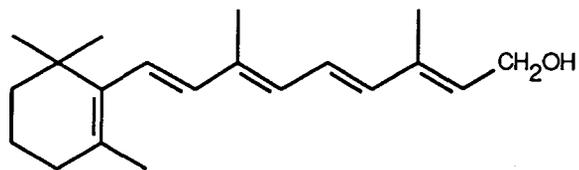
Aujourd'hui, la médecine a à sa disposition, plusieurs types de thérapies qui permettent de combattre le cancer. Parmi celles-ci, seule la chimiothérapie se présente comme un remède efficace dans le cas de tumeurs déjà métastasées ou lors de leucémies. Les composés utilisés en chimiothérapie anticancéreuse ont en commun leur manque de spécificité ; ils agissent aussi bien sur les cellules saines que sur les cellules malignes. L'un des objectifs majeurs de la recherche est alors de concevoir de nouvelles substances antitumorales plus spécifiques, plus efficaces et moins toxiques. La recherche de médicaments agissant sur la croissance et la différenciation cellulaire pourrait donc représenter une nouvelle voie d'exploration dans la chimiothérapie du cancer. Dans ce contexte, la famille des rétinoïdes laisse entrevoir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Tout récemment, une avancée majeure a été réalisée dans la compréhension du mécanisme du déclenchement de la leucémie aiguë promyélocytaire. Un remaniement du gène codant pour le récepteur $RAR\alpha$ aboutissant à un récepteur hybride maintiendrait les cellules dans un état non différencié. Des travaux récents ont en outre montré que cet état peut être inversé par l'apport d'une dose pharmacologique d'acide rétinoïque.

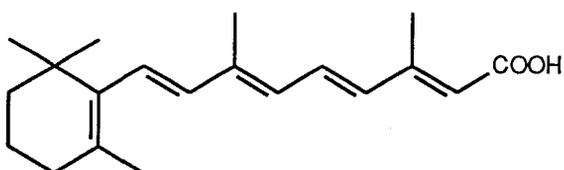
La grande diversité des effets de l'acide rétinoïque et son utilisation actuelle ou potentielle dans le traitement de certaines affections cutanées, dans le domaine de la chimiothérapie et éventuellement de la chimioprévention du cancer ont conduit à des efforts considérables de développement de nouvelles molécules à activité rétinoïde. La principale limitation à une utilisation plus répandue de ces molécules en thérapeutique étant le faible écart entre la dose efficace et la dose toxique, il semble intéressant de concevoir de nouveaux médicaments qui éviteraient cet écueil. Pour cela, il est clair que les progrès dans la compréhension du mécanisme d'action de l'acide rétinoïque seront d'un apport essentiel.

Dans la perspective d'élucider le rôle des rétinoïdes dans les mécanismes de croissance et de différenciation cellulaire, il serait tout à fait utile de disposer des protéines liant les rétinoïdes purifiées afin d'étudier leurs interactions avec l'acide rétinoïque ou ses analogues de synthèse. Dans ce cadre, nous avons développé un gel d'affinité que nous avons ensuite utilisé pour mettre au point un protocole de purification des récepteurs de l'acide rétinoïque. Il semble également raisonnable de penser que les multiples effets biologiques de l'acide rétinoïque pourraient être dissociés grâce à l'utilisation de rétinoïdes et / ou d'antagonistes spécifiques de chaque récepteur. Nous avons donc synthétisé de nouveaux ligands dans l'espoir d'obtenir des antirétinoïdes, ou éventuellement des agonistes sélectifs, sachant qu'une légère modification chimique est suffisante pour déplacer la spécificité d'un ligand. Enfin, les molécules obtenues au laboratoire ont été étudiées sur deux réponses biologiques : la différenciation cellulaire et l'induction de la transglutaminase de tissu.

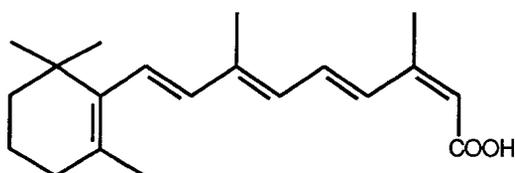
L'importance des RARs dans le contrôle de la différenciation cellulaire et dans l'apparition de certains cancers justifie pleinement l'intérêt qui leur est porté. Une meilleure connaissance de leurs structures et de leurs fonctionnements constituera sans nul doute une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes de la cancérisation.



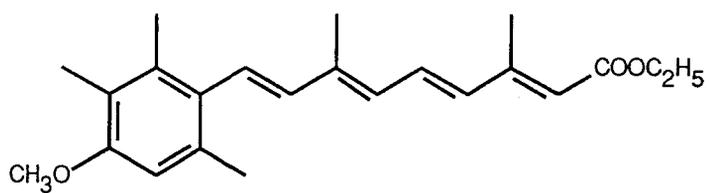
rétinol



acide rétinoïque 13 trans (Trétinoïne)



acide rétinoïque 13 cis (Isotrétinoïne)



Etrétinate

CHAPITRE I

GENERALITES SUR L'ACIDE RETINOIQUE ET LES RETINOIDES

I - VITAMINE A ET RETINOIDES

Les médecins de l'ancienne Egypte savaient déjà que certaines carences alimentaires provoquaient chez l'homme des modifications épithéliales. Mais il fallut attendre le début du XXème siècle pour que les causes de ces symptômes soient élucidées. En effet, après que la vitamine A fut isolée, on découvrit qu'elle était le précurseur de deux molécules très importantes : le rétinol, le chromophore du pigment des bâtonnets de la rétine, et l'acide rétinolique, un métabolite indispensable pour une différenciation correcte des épithélium. La vitamine A (ou rétinol) est un composé actif principalement dans les fonctions de reproduction. Le rétinol, métabolite d'oxydation du rétinol est actif dans le processus de la vision. Un troisième composé, existant aussi bien sous forme trans que cis, est l'acide correspondant au rétinol : l'acide rétinolique. Le terme rétinoïde quant à lui désigne un ensemble de molécules naturelles (ex : acide rétinolique) ou obtenues par synthèse chimique, qui agissent sur des réponses spécifiques en se liant à l'un ou l'autre des récepteurs de l'acide rétinolique.

C'est en 1913 que Mac Collum identifie dans l'huile de foie de morue et dans le beurre un composé qu'il dénomme : facteur A. En 1928, Euler met en évidence l'activité biologique provitamine A du β -carotène, Karrer élucide en 1929 les structures de la vitamine A et du β -carotène et Moore découvre en 1930 le clivage du β -carotène en vitamine A. Les premières synthèses chimiques du rétinol (Isler, 1947), et du β -carotène (Karrer, 1950), marquent les débuts de la production industrielle.



béta-carotène

La première synthèse de l'acide rétinolique par Van Dorp est réalisée en 1946 (Van Dorp, 1946). A partir de 1968, de nouvelles molécules ont été développées dans l'espoir d'obtenir des dérivés plus actifs et moins toxiques. Plus de 1500 rétinolides ont été préparés par le groupe d'Hoffman La Roche entre 1968 et 1983 (Bollag et Hartman,

1983) et plusieurs centaines d'autres depuis dans divers laboratoires de recherche universitaires et de l'industrie pharmaceutique.

II - ABSORPTION, TRANSPORT ET MECANISMES D'ACTION DE L'ACIDE RETINOÏQUE

Les principales sources de vitamine A dans l'alimentation sont les caroténoïdes (ou provitamines A) d'origine végétale ainsi que le rétinol estérifié (rétinyl-ester) provenant des tissus d'origine animale. Toutefois, l'acide rétinoïque peut également être généré directement à partir du β -carotène, sans formation de rétinol ou de rétinol intermédiaire (Posch *et al.*, 1989). Après ingestion, la majorité des esters de rétinol (RE) est enzymatiquement hydrolysée en rétinol (ROH) dans la lumière intestinale, celui-ci étant ensuite absorbé par les entérocytes (cellules intestinales). Les caroténoïdes quant à eux sont partiellement convertis en rétinol puis en rétinol dans les entérocytes (Figure 1). Ce dernier, après estérification par des acides gras est incorporé dans les chylomicrons (CM) qui gagnent alors la circulation générale *via* la circulation lymphatique et des chylomicrons modifiés (CMR) sont formés dans les capillaires sanguins. Les CMR contenant le rétinol sont ensuite captés par les cellules parenchymateuses hépatiques ou directement par les cellules cibles d'autres organes. Dans le foie les RE sont rapidement hydrolysés en rétinol qui se lie à la Retinol Binding Protein (RBP). Le complexe rétinol-RBP est excrété et capté par les cellules stellaires hépatiques puis directement excrété dans le plasma. La majorité du complexe rétinol-RBP est alors lié réversiblement à la transthyréline (TTR). Le complexe rétinol-RBP non lié à la TTR pénétrerait alors dans les cellules cibles peut-être par l'intermédiaire d'un récepteur de surface spécifique de la RBP (Blomhoff *et al.*, 1986). Trois grandes fonctions sont actuellement clairement reconnues à cette protéine : (i) sa liaison au rétinol permet une solubilisation dans le sang ; (ii) elle protège la vitamine A du catabolisme ; (iii) elle met l'organisme à l'abri des effets toxiques déstabilisants membranaires du rétinol . Dans le cytoplasme, le rétinol peut se lier à une protéine de transport cytoplasmique, la Cytoplasmic Retinol Binding Protein

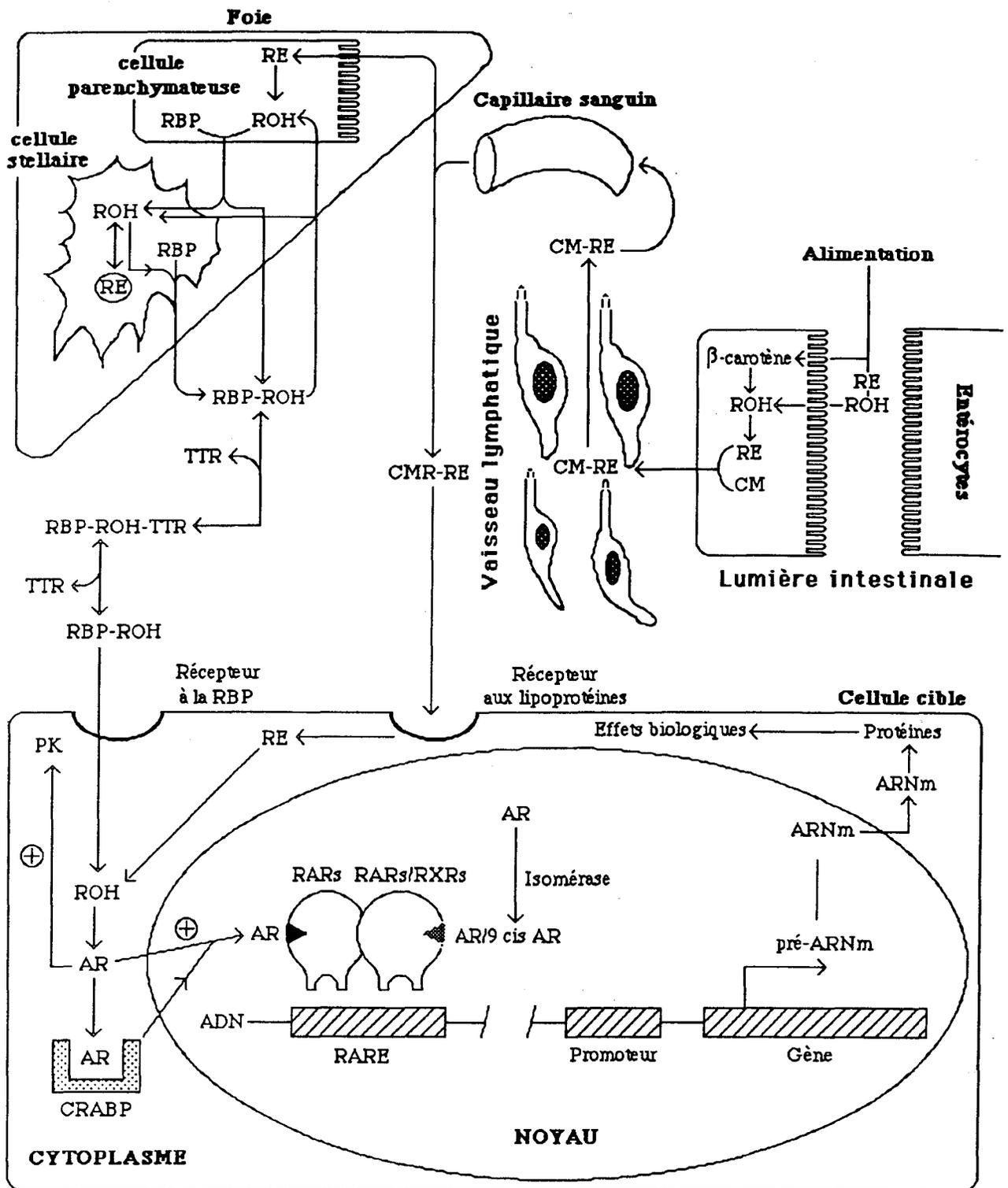


Figure 1 : Absorption, transport et mécanisme d'action de l'acide rétinoïque (adapté d'après Blomhoff *et al.*, 1990). PK : protéine-kinases, RE : retinyl esters, ROH : rétinol, CM : chylomicrons, CMR : chylomicrons remnants, RBP : retinol binding protein, RAR : retinoic acid receptor, CRABP : cytoplasmic retinoic acid binding protein, TTR : transthyréline, RARE : retinoic response element.

(CRBP), ou être oxydée en acide rétinoïque. Celui-ci peut alors se lier à la Cellular Retinoic Acid Binding Protein (CRABP) ou non et diffuser vers le noyau.

Dans le noyau, l'acide rétinoïque libre se lie à l'un de ses récepteurs nucléaires (Retinoic Acid Receptors, RARs) qui sont tous des facteurs de transcription ligand-dépendants. Cette liaison provoquerait un changement de conformation du récepteur et il en résulterait une augmentation de l'affinité de cette protéine pour l'ADN. Le site de fixation sur l'ADN est spécifique : il s'agit de séquences d'une quinzaine de paires de bases appelées Retinoic Acid Response Element (RARE). Il s'ensuit une activation ou une inhibition de la machinerie transcriptionnelle aboutissant à la modification de l'expression de gènes spécifiques jouant un rôle dans certains effets biologiques de l'acide rétinoïque.

Cette machinerie transcriptionnelle est complexe et encore mal connue, mais on sait toutefois qu'elle fait intervenir la fixation sur un promoteur (séquence nucléotidique située en amont du gène), de l'ARN polymérase, l'enzyme qui catalyse la transcription du gène en ARN messager. Cette enzyme une fois fixée sur le promoteur serait activée directement ou indirectement par le facteur de transcription lié à son élément de réponse.

Cependant, l'acide rétinoïque semble également pouvoir exercer des effets biologiques *via* des mécanismes ne faisant pas intervenir ses récepteurs nucléaires. On évoque généralement les effets membranaires de l'acide rétinoïque. Dans ce mécanisme, l'activation de récepteurs membranaires provoquerait une libération de seconds messagers (AMPC, DAG...) qui à leur tour activeraient des enzymes de phosphorylation (protéine kinases : PKA, PKC...). Ces kinases pourraient alors aller activer des protéines importantes pour le contrôle de la transcription de certains gènes. Il n'est pas exclu que l'acide rétinoïque puisse également activer certaines protéines par un processus de rétinoylation (Takahashi et Breitman, 1990).

III - EFFETS BIOLOGIQUES DE L'ACIDE RETINOIQUE

Il est considéré comme un métabolite actif de la vitamine A et joue un rôle dans la croissance et la différenciation cellulaire (Jetten *et al.*, 1987 ; Sporn *et al.*, 1984 ; Sherman, 1986 ; Lotan, 1980 ; Breitman *et al.*, 1983). Il intervient durant l'embryogenèse

comme morphogène (Eichele, 1989) et il contrôle la synthèse et la distribution de protéines de structure (collagène, kératine) (Lebel *et al.*, 1987 ; Agarwal *et al.*, 1990). L'acide rétinoïque est d'autre part impliqué dans la régulation de plusieurs systèmes enzymatiques. Par exemple, il induit une augmentation très rapide de la concentration en transglutaminase de tissu (ou TG de type II). Cette enzyme intervient dans la liaison des protéines de structure (Davies *et al.*, 1985 ; Melino *et al.*, 1988). D'autre part, l'acide rétinoïque est un immunomodulateur (Floersheim et Bollag, 1972), il inhibe l'ornithine décarboxylase (Jetten *et al.*, 1985), il modifie les glycoprotéines de surface qui jouent un rôle dans les phénomènes de croissance cellulaire, il modifie l'incorporation des sucres et augmente la sialylation des glycoprotéines de surface (Clement *et al.*, 1989). L'acide rétinoïque module l'action de certains facteurs de croissance et de leurs récepteurs membranaires. En particulier, il augmente le nombre de récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor ; Chytil, 1984 ; Earp *et al.*, 1986). Enfin, il supprime l'expression des oncogènes c-myc et c-fos (Griep et Deluca, 1986 ; Campisi *et al.*, 1984).

IV - ACTION ANTI-CANCEREUSE DE L'ACIDE RETINOIQUE

Le cancer est une maladie génétique qui survient lorsque des mutations spécifiques (ou un gène viral) s'accumulent dans une cellule et lui font perdre le contrôle de sa croissance. La transformation maligne se caractérise par une perte de la différenciation cellulaire associée à une hyperprolifération. L'induction de la différenciation des cellules tumorales par l'acide rétinoïque peut donc avoir des implications dans le traitement du cancer. Les ou les mécanismes responsables de l'action de certains rétinoïdes dans la prévention ou la thérapie de certains cancers restent mal connus, mais globalement les effets des rétinoïdes sur la différenciation et la prolifération cellulaire peuvent être partiellement expliqués en terme d'effets de ces composés sur l'expression des oncogènes c-myc et c-fos ou la régulation de l'expression du gène du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) ou d'autres gènes importants.

C'est en 1922 que Mori (Mori, 1922) démontra pour la première fois le rôle essentiel joué par les rétinoïdes dans la différenciation des tissus épithéliaux. Il prouva que la maladie

des yeux connue chez l'homme depuis l'antiquité et provoquée chez le rat par une carence en vitamine A est secondaire à la kératinisation des conjonctives et la cornée. En 1925, Wolbach et Howe (Wolbach et Howe, 1925) étendirent ces observations en démontrant que chez des animaux carencés en vitamine A, non seulement les épithéliums externes de l'oeil, mais aussi de nombreux épithéliums internes se transforment en des tissus stratifiés kératinisés ressemblant à l'épiderme.

En 1953, Fell et Mellanby rapportèrent que, au contraire, lorsque la peau d'un embryon de poulet est traitée par un excès de vitamine A, elle n'est plus capable de kératiniser (Fell et Mellanby, 1953). A partir de ces observations, il était logique de conclure qu'une concentration correcte de vitamine A est requise *in vivo* pour que la différenciation des épithéliums soit normale. En raison de ces premiers travaux, l'épiderme devint un modèle de choix pour étudier le rôle de la vitamine A et des rétinoïdes dans la différenciation des épithéliums.

D'autre part, les médecins commençaient à s'intéresser aux rétinoïdes en raison de leur efficacité dans le traitement d'affections de la peau comme l'acné, le psoriasis, le vieillissement cutané et dans la prévention des cancers épithéliaux. A ce sujet, on a soupçonné très tôt que les rétinoïdes pouvaient jouer un rôle dans la répression du phénotype tumoral des tissus épithéliaux. En effet dès 1926, Fujimaki faisait état d'une incidence plus élevée de cancers gastriques spontanés chez des rats carencés en vitamine A (Fujimaki, 1926). Plus récemment on a pu démontrer que chez des animaux carencés en vitamine A des cancers induits expérimentalement se développent en plus grand nombre que chez les animaux témoins. Inversement, chez des animaux traités par des rétinoïdes, l'incidence des tumeurs de la peau causées par l'application topique de diméthylbenzanthracène (DMBA) et de promoteurs tumoraux (TPA) est moindre (Boutwel, 1983).

In vitro, l'acide rétinoïque est capable d'inhiber le développement de lignées cellulaires malignes et d'induire une différenciation des cellules promyélocyaires (HL-60) en granulocytes matures (Breitman *et al.*, 1980 ; Breitman *et al.*, 1983).

Récemment l'acide rétinoïque a été utilisé avec succès dans le traitement de la leucémie promyélocytaire (Chomienne *et al.*, 1989). Cependant, des rechutes ont été observées en moyenne 8 mois après le début du traitement. Les études dans d'autres formes de cancer ne permettent pas de conclusions définitives, mais il semble exister une certaine spécificité de chaque famille de rétinoïdes pour certains tissus tumoraux. Dans l'état actuel, ce traitement du cancer reste surtout potentiel, et c'est surtout dans le domaine de la prévention des cancers que les résultats sont les plus prometteurs.

V - LES PROTEINES LIANT LES RETINOIDES ET LES RECEPTEURS DE L'ACIDE RETINOIQUE

V-1 - LES PROTEINES LIANT LES RETINOIDES

Le prototype de ce genre de molécule est la Retinol Binding Protein (RBP, 21 kDa), transporteur du rétinol (ROH) dans le sang (Goodman, 1984). Cette protéine est synthétisée dans le foie et excrétée dans le courant sanguin où on la retrouve en association avec la trans-thyrétine (TTR, 55 kDa). Cette association permet de diminuer la perte de RBP lors de la filtration glomérulaire. Le véritable mécanisme de la distribution du rétinol à partir du complexe RBP-ROH vers les tissus cibles reste à ce jour inexpliqué, malgré l'existence de publications en faveur de la présence ou inversement de l'absence d'un récepteur de surface pour la RBP (Creek *et al.*, 1989 ; Erikson *et al.*, 1986). Une hypothèse actuellement à l'étude est la pénétration directe du rétinol libre *via* des interactions hydrophobes avec la membrane cellulaire ou par endocytose. Outre la RBP, plusieurs autres protéines liant les rétinoïdes existent. Si l'acide rétinoïque ne subit pas de stockage et circule au niveau sanguin lié à la sérum-albumine, au niveau intracellulaire l'acide rétinoïque peut se lier aux CRABPI et CRABPII (Chytil et Ong, 1984 ; Aström *et al.*, 1991). La CRABP est une protéine cytoplasmique spécifique de liaison de l'acide rétinoïque. D'une masse moléculaire de 15-16 kDa, elle possède un seul site de liaison pour l'acide rétinoïque et une constante d'affinité de 2.10^{-9} M pour cette molécule

Protéines	Masse kDa	Principal ligand	Fonctions suggérées
RBP	21	Rétinol	Protéine de transport plasmatique
IRBP	140	Rétinol, Rétinal	Protéine de transport intercellulaire dans le cycle visuel
Quatre protéines secrétées dans l'utérus de truie	22	Rétinol	Protéine de transport vers le fœtus
Deux protéines de l'épididyme de rat	20	AR	Protéine de transport intercellulaire
CRBP (I)	16	Rétinol	Donneur pour estérification, Protéine de transport intercellulaire
CRBP (II)	16	Rétinol	Donneur pour estérification
CRBP (III) yeux de poissons	15	Rétinol	
CRABP (I)	16	AR	Régulateur de l'AR libre, métabolisme
CRABP (II) rat nouveau né	15	AR	Protéine de transport intracellulaire
CRABP (II) embryon de poulet	16	AR	Protéine de transport intracellulaire
CRALBP	36	Rétinal	Réactions enzymatiques dans le cycle visuel
RAR α (7 isoformes)	50	AR	Facteur de transcription ligand dépendant
RAR β (3 isoformes)	50	AR	Facteur de transcription ligand dépendant
RAR γ (7 isoformes)	50	AR	Facteur de transcription ligand dépendant
RXR α , β , γ	48	9. cis AR	Facteur de transcription ligand dépendant

Tableau 1 : Protéines liant les rétinoïdes et leurs fonctions présumées (d'après Blomhoff *et al.*, 1990).

(Darmon *et al.*, 1988). De localisation à la fois cytoplasmique et nucléaire, la CRABPII pourrait intervenir dans la translocation nucléaire des rétinoïdes, alors que la CRABPI servirait de réserve en acide rétinoïque et permettrait de réguler la concentration en rétinoïdes intracellulaires libres et donc actifs (Boylan et Gudas, 1991). Les deux protéines cellulaires liant spécifiquement le rétinol (CRBP : Cellular Retinol Binding Protein) et l'acide rétinoïque (CRABPII) correspondent vraisemblablement à des navettes chargées de transporter vers le noyau leur ligand qui serait alors pris en charge par le véritable récepteur responsable de l'effet transcriptionnel. Toutefois, la présence de ces vecteurs cytoplasmiques ne semblent pas être déterminante pour l'activité rétinoïde car un certain nombre de lignées cellulaires dépourvues de CRABP comme les cellules HL-60 répondent au traitement par l'acide rétinoïque (Jetten *et al.*, 1987). Le Tableau 1 mentionne les protéines de liaison des rétinoïdes et leurs fonctions présumées.

V-2 - LES RECEPTEURS DE L'ACIDE RETINOIQUE

Comme nous l'avons signalé précédemment, les rétinoïdes exercent essentiellement leurs effets biologiques *via* leur liaison à des récepteurs nucléaires récemment clonés appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires des hormones stéroïdes et thyroïdes (Glass *et al.*, 1991). Malgré les efforts de nombreux auteurs, la mise en évidence d'un récepteur de l'acide rétinoïque dans les cellules n'a pu être obtenue que tout récemment. En effet, la caractérisation de l'activité de liaison de l'acide rétinoïque à ses récepteurs est difficile pour trois raisons essentielles : (i) la faible abondance des récepteurs endogènes dans la plupart des tissus, (ii) la qualité peu satisfaisante du ligand naturel (instabilité, forte liaison non spécifique) et surtout (iii) la présence de la CRABP à une concentration élevée dans de nombreux types cellulaires qui masque ainsi la liaison spécifique ligand-récepteur. Le champ des recherches dans le domaine des rétinoïdes a brutalement décuplé quand deux équipes indépendantes ont rapporté le clonage du premier récepteur de l'acide rétinoïque (Retinoic Acid Receptor α , RAR α) et montré qu'il appartenait à la famille des récepteurs des hormones stéroïdes-thyroïdes (Petkovich *et al.*, 1987 ; Giguere *et al.*, 1987). Ce résultat a été obtenu grâce à l'utilisation de sondes

oligonucléotidiques complémentaires de la région codant pour le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs stéroïdiens. Parmi les séquences sélectionnées par criblage de banques d'ADN complémentaire humain, une séquence codant pour une protéine ayant la particularité de lier l'acide rétinoïque avec une forte affinité fut identifiée. Plus qu'une protéine de transport, les auteurs pensaient avoir identifié un véritable récepteur de l'acide rétinoïque car ils démontrèrent l'organisation en domaines de cette protéine, rappelant ainsi la structure des récepteurs stéroïdiens. Cependant, il fallait encore démontrer le comportement fonctionnel de cette protéine. Ceci a alors été réalisé en utilisant des récepteurs chimériques. En 1987, aucune séquence oligonucléotidique régulant l'expression des gènes contrôlés par l'acide rétinoïque n'avait encore été identifiée. Les groupes de P. Chambon et R. M. Evans préparèrent donc des récepteurs chimères où le domaine de liaison à l'ADN était remplacé par le domaine correspondant des récepteurs des glucocorticoïdes ou des estrogènes. Le récepteur ainsi obtenu a été cotransfecté avec un gène reporter chloramphénicol acétyltransférase (CAT) comportant en amont de son promoteur, l'élément de réponse aux glucocorticoïdes ou aux estrogènes. Dans ces cellules, l'induction de l'expression du gène CAT par l'acide rétinoïque fut obtenue, démontrant ainsi que cette nouvelle protéine possédait les caractéristiques requises pour un récepteur. Avant même la découverte de ce premier récepteur, Dejean et collaborateurs (Dejean *et al.*, 1986) avaient montré l'insertion de l'ADN du virus de l'hépatite B (VHB) dans un gène cellulaire d'un hépatocarcinome humain (cancer du foie). En 1987, le même groupe clona l'ADN complémentaire du site d'intégration du virus de l'hépatite B et l'analyse de la séquence nucléotidique révéla que la structure du gène cellulaire appelé *hap* était similaire à celui du domaine de liaison à l'ADN des hormones (de Thé *et al.*, 1987). Ces auteurs obtinrent la synthèse d'une protéine de 51 kDa à partir de l'ARN du gène *hap* mais ne purent mettre en évidence une liaison spécifique avec l'acide rétinoïque ou la testostérone. Des travaux conduits conjointement entre l'équipe de P. Chambon et P. Tiollais démontrèrent que le site d'intégration du virus de l'hépatite B (gène *hap*) était un deuxième RAR, le RAR β (Brand *et al.*, 1988). Ceci fut une nouvelle fois réalisé en démontrant la fonction de transactivation d'un récepteur chimérique. Des résultats

similaires ont été obtenus indépendamment par Benbrook et collaborateurs (Benbrook *et al.*, 1988). Ainsi, il est concevable que la mutagénèse du récepteur de l'acide rétinoïque par insertion de l'VHB puisse jouer un rôle dans la carcinogénèse hépatique induite par l'hépatite B. Des recherches visant à cloner ces gènes chez la souris (mRAR α et mRAR β) ont conduit à l'identification d'un troisième récepteur, le mRAR γ (Zelent *et al.*, 1989). Ce dernier récepteur a également été décrit par le groupe de P. Chambon chez l'homme (Krust *et al.*, 1989). Enfin, un récepteur apparenté au récepteur γ a été cloné chez le triton, le RAR δ (Ragsdale *et al.*, 1989).

V-3 - STRUCTURE DES RARs

Structuralement, les ADNc des récepteurs α , β et γ codent pour des protéines de tailles très voisines (462,448 et 454 acides aminés) et présentant une organisation en six domaines, comparable à celle des autres récepteurs nucléaires (estrogènes, glucocorticoïdes, progestérone, hormone thyroïdienne) (Giguere *et al.*, 1987 ; Zelent *et al.*, 1989 ; De thé *et al.*, 1987).

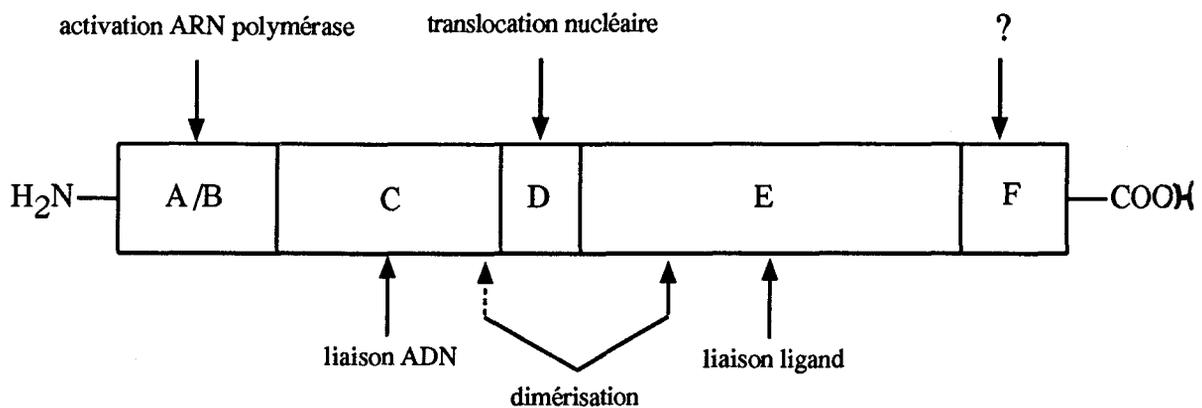


Figure 2 : Organisation structurale et fonctionnelle des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque.

Ils appartiennent tous à la famille des récepteurs nucléaires qui se comportent comme des facteurs de stimulation transcriptionnelle (Green et Chambon, 1986). La région C renfermant le domaine responsable de la liaison à l'ADN est le support de l'activation transcriptionnelle spécifique des gènes (Figure 2). C'est une région à forte homologie dans les récepteurs α , β et γ (94 à 97 % ; Figure 3). La région C est constituée de 66 acides aminés dont 8 cystéines qui complexées tétraédriquement à deux atomes de zinc forment deux doigts de zinc (Zn^{2+}). Ces doigts interagissent de manière spécifique avec une séquence d'ADN RARE ce qui entraîne une régulation de la transcription de gènes spécifiques. En fait une de ces deux régions en doigt de zinc (CI) jouerait un rôle dans la spécificité de liaison comme dans le cas des récepteurs hormonaux dont la séquence peptidique située au niveau du pied du premier doigt à zinc est responsable de la spécificité de cible des éléments de réponse hormonaux (Schule *et al.*, 1990 ; Umesono et Evans, 1990), alors que l'autre région (CII) pourrait permettre la formation de dimères (Leid *et al.*, 1992). La région E est responsable de la liaison au ligand effecteur et de la dimérisation. En effet, Forman et Samuels ont évoqué la présence dans cette région d'un domaine de dimérisation constitué de neuf heptades hydrophobes répétées créant une hélice alpha (Forman et Samuels, 1990). Elle présente également une homologie de séquence élevée (84 à 90 %). Le domaine A, situé à l'extrémité N terminale des récepteurs est une région hypervariable avec seulement 18 à 25 % d'homologie entre les différents RARs. La région B montre également une forte homologie entre les 3 RARs (75 à 86 %) ainsi que la région D (61 à 74 %). Ce dernier domaine contient un peptide basique conservé de séquence Arg-Asn-Lys-Lys-Lys-Lys qui pourrait constituer un signal de transfert nucléaire. Les régions A/B des RARs pourraient jouer un rôle dans la modulation transcriptionnelle de certains gènes spécifiques à l'image des récepteurs des hormones stéroïdes. L'hypervariabilité de la région A pourrait donc être à l'origine d'effets transcriptionnels différents entre chaque récepteur, voire chaque isoforme. Enfin le domaine F dont la fonction spécifique est encore mal connue est également très variable avec seulement 16 à 23 % d'homologie (Green et Chambon, 1988). Cette région est spécifique des récepteurs à l'acide rétinoïque et son hétérogénéité d'un récepteur à l'autre

permet l'obtention d'anticorps spécifiques (Gaub *et al.*, 1989). L'homologie avec les autres récepteurs nucléaires concerne surtout la région de fixation à l'ADN (62 à 42 %). La région E, quant à elle, présente des homologies plus restreintes d'un type de récepteur à l'autre (15 à 38 %).

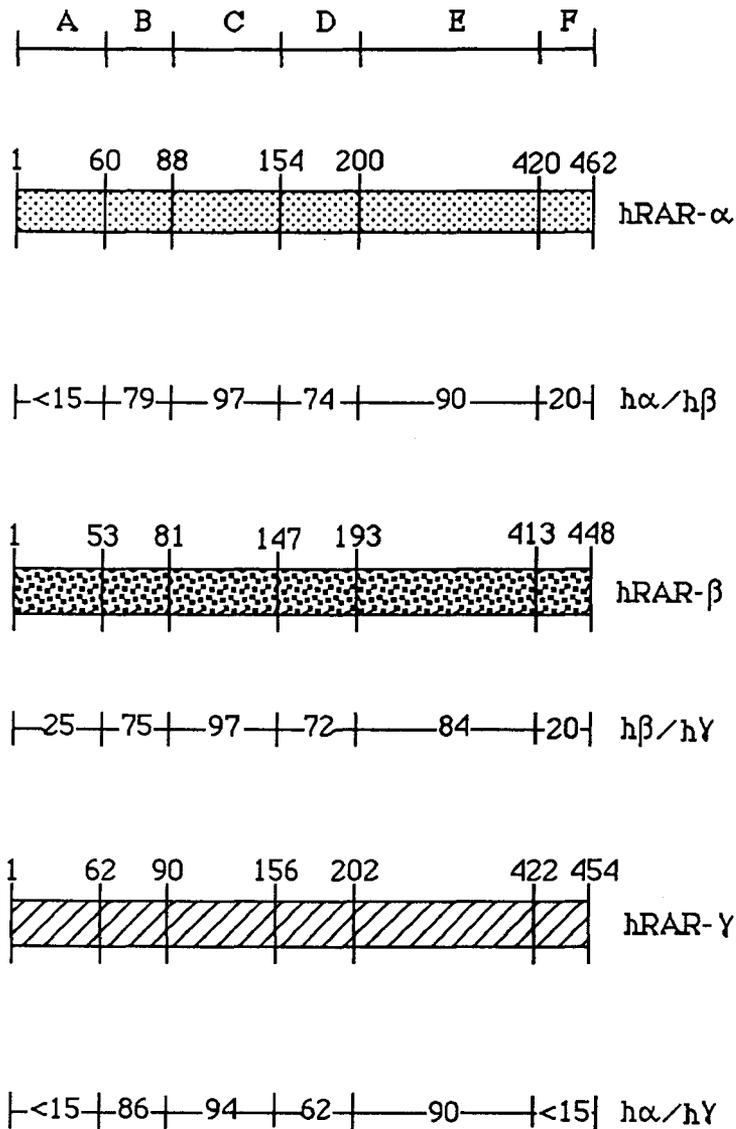


Figure 3 : Homologie de structure entre les différents récepteurs de l'acide rétinoïque.

V-4 - DISTRIBUTION

La distribution de RAR α et RAR β est ubiquitaire avec un rapport RAR α / RAR β fonction du type cellulaire (Rees *et al.*, 1989). RAR α est notamment présent dans les cellules de leucémie à promyélocytes (HL-60) (Largman *et al.*, 1989 ; Hashimoto *et al.*, 1989) et les cellules d'érythroleucémie (HEL) (Largman *et al.*, 1989). RAR β est également présent dans les cellules HL-60 (Largman *et al.*, 1989), ainsi que dans le cerveau (Rees *et al.* 1989) et dans les cellules en voie de mort cellulaire programmée (Dollé *et al.*, 1989). Le transcrit RAR γ quant à lui possède une distribution quasi exclusive aux tissus cutané et cartilagineux (Zelent *et al.*, 1989 ; Krust *et al.*, 1989 ; Ragsdale *et al.*, 1989).

V-5 - ISOFORMES

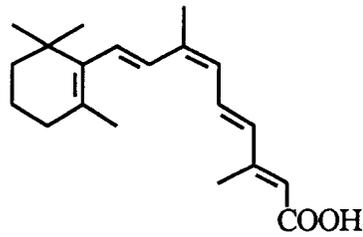
Tous ces récepteurs présentent des isoformes multiples formées à partir d'un seul gène par un épissage alternatif des sept (RAR γ) ou huit (RAR α , β) premiers exons du domaine A (Leroy *et al.*, 1991) ou par une transcription impliquant des promoteurs différents (Giguère *et al.*, 1990). Des études d'expression des gènes ont montré que les isoformes mRAR β 1 et mRAR β 3 sont principalement détectées dans le cerveau au stade foetal ou adulte, suggérant ainsi leur rôle dans le développement du système nerveux central (Zelent *et al.*, 1991), alors que mRAR β 2 est retrouvé dans les cellules embryonnaires, suggérant son implication dans les premiers stades du développement. Des études récentes ont permis de caractériser 7 isoformes pour RAR α (Leroy *et al.*, 1991) , 3 isoformes pour RAR β (Zelent *et al.*, 1991) et 7 isoformes pour RAR γ (Kastner *et al.*, 1990 ; Kastner *et al.*, 1991).

Il est intéressant de remarquer que la conservation des isoformes entre l'homme et la souris suggère que chacun de ces isoformes possède une fonction spécifique et distincte (Kastner *et al.*, 1991). Enfin, la grande diversité des types de récepteurs serait une explication à la grande diversité des activités biologiques de l'acide rétinoïque.

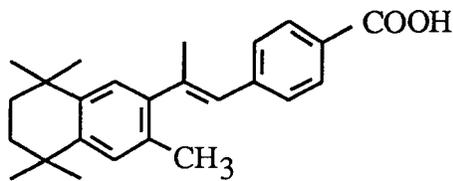
V-6 - UNE NOUVELLE CLASSE DE RECEPTEURS : LES RXRs

Le travail de Mangelsdorf et collaborateurs a récemment permis de mettre en évidence une nouvelle classe de récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque, les RXRs, en découvrant un premier membre de cette famille $RXR\alpha$ (Mangelsdorf *et al.*, 1990). Les récepteurs RXRs qui, tout en étant reliés sur le plan de leur structure (formés de six domaines) aux RARs, semblent avoir des particularités quant à leur liaison à leur cible d'ADN et à la fixation du ligand. Des résultats récents suggèrent qu'il existe, physiologiquement, des ligands appartenant à la famille des rétinoïdes, mais différents de l'acide rétinoïque tout trans, et contrôlant des gènes particuliers, par exemple celui codant pour la protéine de liaison du rétinol de type II (CRBP II). L'équipe de Rosenfeld a isolé un ADNc codant pour un second membre de cette sous famille, $RXR\beta$ et lui a assigné un rôle nouveau, celui de co-activateur coopérant avec les RARs (Figure 1), les hormones thyroïdiennes et la vitamine D pour augmenter leur liaison à leur cible spécifique (Yu *et al.*, 1991). $RXR\alpha$ et β sont identiques à 95 % au niveau de leur domaine de liaison à l'ADN et à 90 % au niveau du domaine de liaison du ligand. Les protéines $RXR\alpha$ et β sont donc capables de former des hétérodimères avec les récepteurs de l'acide rétinoïque ainsi qu'avec les récepteurs de la vitamine D et des hormones thyroïdiennes (Yu *et al.*, 1991 ; Kliewer *et al.*, 1992 ; Zhang *et al.*, 1992) et la liaison de ces hétérodimères aux éléments de réponse spécifiques est nettement supérieure (40 à 50 fois) à celle des homodimères (Leid *et al.*, 1992). La masse moléculaire des RXRs est de l'ordre de 48 à 56 kDa (Leid *et al.*, 1992). Les RXRs présentent peu d'homologie avec les RARs au niveau des régions C (61%) et surtout E (27%) (Mangelsdorf *et al.*, 1990). De nombreuses isoformes des RXRs ont également été détectées. Les RXRs sont présents de façon prédominante dans le foie et les reins (Mangelsdorf *et al.*, 1990). Enfin deux équipes viennent de caractériser le ligand physiologique des RXRs (Levin *et al.*, 1992 ; Heyman *et al.*, 1992). Il s'agit de l'acide 9-cis rétinoïque, un stéréoisomère de l'acide rétinoïque tout trans. Cet acide 9-cis rétinoïque, produit d'isomérisation *in vivo* de l'acide rétinoïque est un aussi bon activateur des récepteurs RARs que l'acide tout trans

rétinoïque et est 40 fois plus actif que ce dernier sur les récepteurs RXRs. De plus, deux ligands synthétiques des RXRs sont actuellement connus (Figure 4).



Acide rétinoïque 9 cis



3 méthyl TTNPB

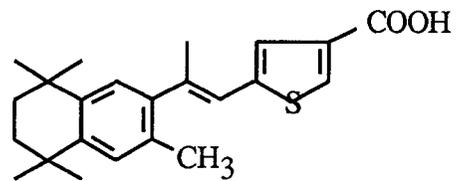


Figure 4 : Ligands des RXRs.

VI - INTERACTION RARs/ADN ET ELEMENTS DE REPONSE

La réponse transcriptionnelle aux hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, à la vitamine D et à l'acide rétinoïque se fait *via* la fixation de complexes ligands-récepteurs au niveau de séquences régulatrices des gènes. Il s'agit en fait ici du mécanisme d'action très général des protéines régulatrices de la transcription. A ce jour, trois motifs structuraux ont été proposés pour le domaine de liaison à l'ADN de la majorité de ces protéines : le motif "hélice-tour-hélice", le "leucine zipper" et les motifs en "doigts de zinc". Dans le cas qui nous intéresse, l'interaction spécifique RARs-RARE est contrôlée par le domaine C des RARs formé de deux motifs en doigts de zinc (Figure 5). Comme nous l'avons évoqué précédemment, deux séquences en acides aminés du domaine C

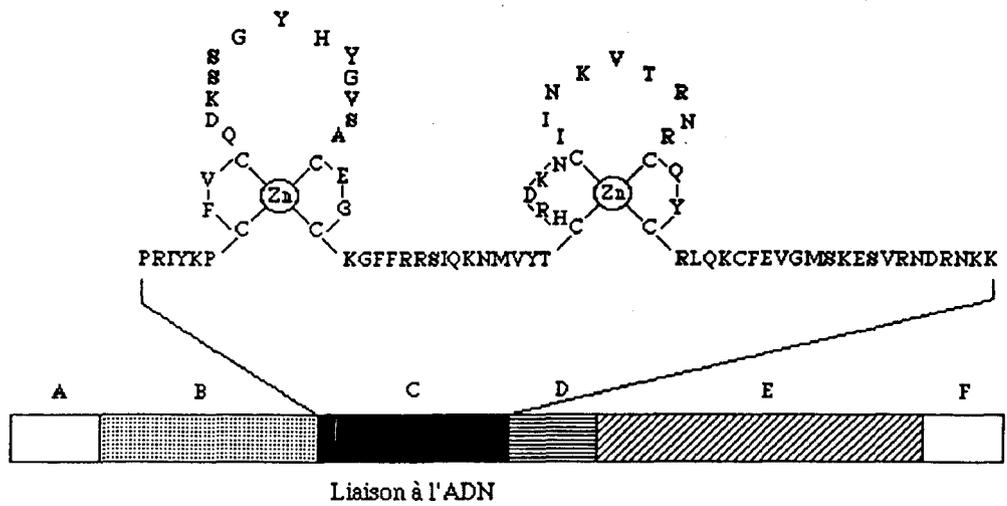


Figure 5 : Schéma de l'organisation en doigt de zinc du domaine de liaison à l'ADN de hRAR α .

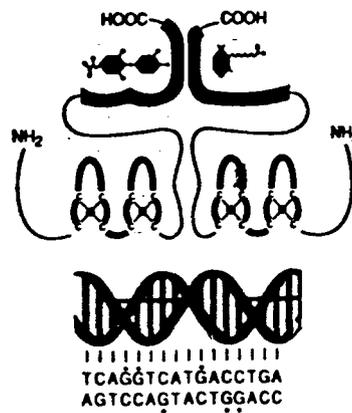


Figure 6 : Modèle d'interaction entre TR - RAR et TRE-pal.

séquestrent un ion Zn^{2+} via une coordination tétraédrique de l'ion par des résidus cystéine. Ensuite, les deux boucles ainsi formées pourraient se fixer par une interaction directe dans le grand sillon de l'ADN (Fairall *et al.*, 1986 ; Rhodes et Klug, 1986). D'autre part, de nombreuses protéines régulatrices forment des dimères pour commander l'expression des gènes. Il s'agit d'ailleurs généralement d'hétérodimères, c'est-à-dire que des facteurs de transcription différents peuvent s'associer et ainsi collaborer dans le contrôle de la régulation de l'expression génétique. Ceci est également vrai pour les RARs (Glass *et al.* , 1989, 1990 ; Forman *et al.* , 1989) qui possèdent une affinité décuplée pour l'ADN lorsqu'ils sont associés aux RXRs ou au récepteur des hormones thyroïdiennes (TRs). L'intérêt principal de tels dimères pourrait être d'augmenter le nombre des combinaisons possibles entre les différentes protéines régulatrices, dont le nombre est relativement limité (Figure 6). Tous les éléments de réponses aux hormones (Hormone Response Element, HRE ; Beato *et al.*, 1989 ; Evans *et al.*, 1988) spécifiques des différentes hormones ont des séquences voisines palindromiques, en répétitions directes ou inverses. Le premier élément de réponse à l'acide rétinoïque a été localisé en 1990 (de Thé *et al.*, 1990) en amont du promoteur du gène codant pour le récepteur RAR β (Tableau 2). Ainsi cet élément RARE rend compte de la stimulation de l'expression du gène codant pour RAR β . Il est caractérisé par l'existence de deux répétitions directes d'un hexanucléotide qui est du type de ceux constituant les hémipalindromes des autres HREs de cette famille (Tableau 2). De telles séquences RAREs ont ensuite été localisées en amont de nombreux gènes régulés par l'acide rétinoïque. Enfin, un RXRE constitué de 5 répétitions directes a été identifié dans la région promotrice de la CRBP II . La reconnaissance des éléments de réponses par un récepteur donné, dépend de la séquence, de l'orientation et de l'espacement entre les motifs répétés. Des études ont montré que les RARs ont une préférence pour les motifs espacés de 5 paires de bases (Umesono *et al.*, 1991), alors que les TRs et les RXRs reconnaissent préférentiellement les motifs séparés par 4 paires de bases (Umesono *et al.*, 1991) et 1 paire de bases (Mangelsdorf *et al.*, 1991) respectivement. Les hétérodimères RXR - RAR quant à eux se lient préférentiellement aux éléments de réponse formés de

motifs en répétition directe espacés d'une paire de bases (Leid *et al.*, 1992). Les différentes combinaisons possibles de chaque isoforme des RAR α , β et γ avec les isoformes des RXRs peuvent générer un grand nombre d'hétérodimères qui peuvent potentiellement exercer des fonctions spécifiques dans le processus d'activation transcriptionnelle. D'autre part, la contribution des hétérodimères RAR - RXR à l'activation de la transcription peut également dépendre des concentrations respectives en RAR, RXR, acide rétinoïque et 9-cis acide rétinoïque, cette dernière dépendant à son tour de l'activité de l'isomérase requise pour sa biosynthèse. De faibles variations de

<u>GGTTCA</u> CCGAA <u>AGTTCA</u>	mRAR β	RARE (Sucov <i>et al.</i> , 1990)
<u>GGTTCA</u> CCGAA <u>AGTTCA</u>	hRAR β	RARE (de Thé <i>et al.</i> , 1990)
<u>AGGTCA</u> CTGAC <u>AGG CA</u>	mCP-H	RARE (Munos-Carores <i>et al.</i> , 1990)
<u>GGGTCA</u> TTCAG <u>AGTTCA</u>	hADH-3	RARE (Duester <i>et al.</i> , 1991)
CCAGACAGGTTGACCCTT- TTTCTAAGGGCTTAACCTA- <u>GCTCACCTC</u>	mLamB1	RARE (Vasios <i>et al.</i> , 1989)
<u>TGACCTTTGGCGTGGGA</u>	rPEPCK	RARE (Lucas <i>et al.</i> , 1991)
GCTGTCA C <u>AGGTCA</u> C <u>AGGTCA</u> C <u>AGGTCA</u> C <u>AG-</u> <u>GTCA</u>	rCRBP II	RXRE (Mangelsdorf <i>et al.</i> , 1991)
<u>ATGAGTCAGTTTGCGGG-</u> <u>TGACTCT</u>	STR1	RARE (Nicholson <i>et al.</i> , 1990)

Tableau 2 : Quelques éléments de réponse à l'acide rétinoïque. mRAR β : promoteur du gène du récepteur RAR β de souris. hRAR β : promoteur du gène du récepteur RAR β humain. mCP-H : promoteur du gène du facteur du complément H de souris. hADH-3 : promoteur du gène de l'alcool déshydrogénase humaine. mLamB1 : promoteur du gène de la laminine B1. rPEPCK : promoteur du gène de la phosphoénolpyruvate carboxypeptidase. rCRBP II : promoteur du gène de la CRBP II de rat. STR1 : promoteur du gène de la stromélysine.

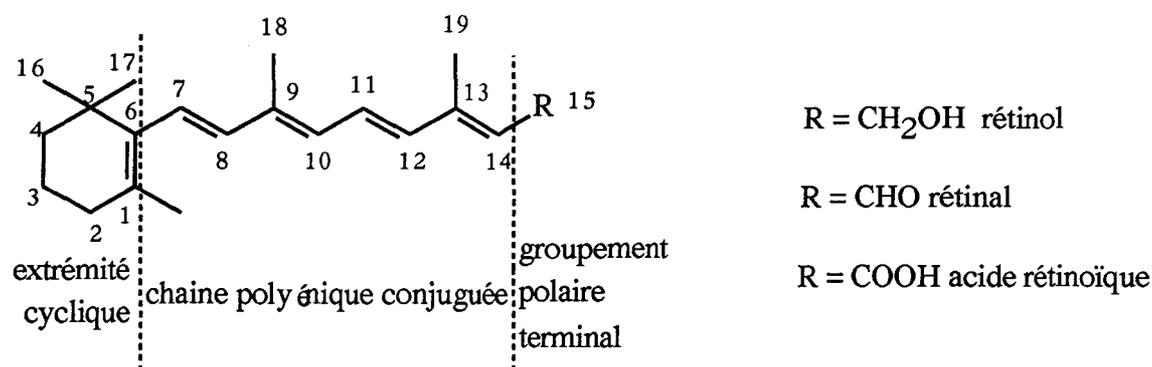
concentration de chacun de ces éléments pourrait résulter des différences importantes dans l'activité transcriptionnelle. Ainsi, comme le proposent Weintraub et collaborateurs (Lassar *et al.*, 1991), cette variété d'hétérodimère et la compétition au niveau d'un "partenaire" commun pour la liaison à l'ADN peut favoriser certaines voies de modulation

transcriptionnelle par rapport à d'autres. Par exemple, la compétition entre les RARs et les TRs par rapport aux RXRs peut diminuer le fonctionnement du récepteur le moins abondant et moduler ainsi les réponses cellulaires induites par les ligands. Un haut niveau d'expression du TR pourrait ainsi réduire l'activité des RARs (Graupner *et al.*, 1989 ; Hudson *et al.*, 1990) en raison de la compétition créée au niveau des RXRs. De plus, Leid et collaborateurs ont observé que les RXRs peuvent également renforcer la liaison de l'oncogène v-erb A au TRE palindromique. Ce résultat suggère qu'en séquestrant les RXRs, v-erb A peut exercer un effet inhibiteur de l'action des RARs (Sharif et Privalsky, 1991 ; Desbois *et al.*, 1991).

VII - LES RETINOIDES DE SYNTHESE

VII-1 - ELEMENTS DE RELATIONS STRUCTURE-ACTIVITE

L'acide rétinoïque est un produit très actif mais aussi très toxique. De nouvelles molécules ont été développées dans l'espoir d'obtenir des dérivés plus actifs et moins toxiques. On définit actuellement les rétinoïdes comme les substances qui provoquent une réponse spécifique *via* leur liaison au récepteur de l'acide rétinoïque (Sporn et Roberts, 1985). Les rétinoïdes naturels sont le rétinol, le rétinal et l'acide rétinoïque. La structure chimique de la molécule d'acide rétinoïque peut se décomposer en trois fragments :



La modification successive de ces trois parties permet la classification des rétinoïdes en trois classes.

□ Les rétinoïdes de première génération

Ce sont des dérivés résultant essentiellement de la modification de l'extrémité polaire de la chaîne latérale polyénique de l'acide rétinoïque. De nombreux dérivés ont été préparés : esters, amides, amines ou éthers. Ces analogues sont cependant moins actifs *in vitro* que les dérivés carboxyliques correspondant et même éventuellement inactifs si leur métabolisme ne permet pas de régénérer la fonction carboxylique libre (Frolik *et al.*, 1981). La chaîne latérale a été modifiée dans sa longueur, la position et le nombre des doubles liaisons et des substituants méthyle. L'Isotrétinoïne (acide rétinoïque 13-cis) est utilisé dans le traitement de l'acné alors que l'acide rétinoïque trans a donné de bons résultats dans le traitement des leucémies promyélocytaires.

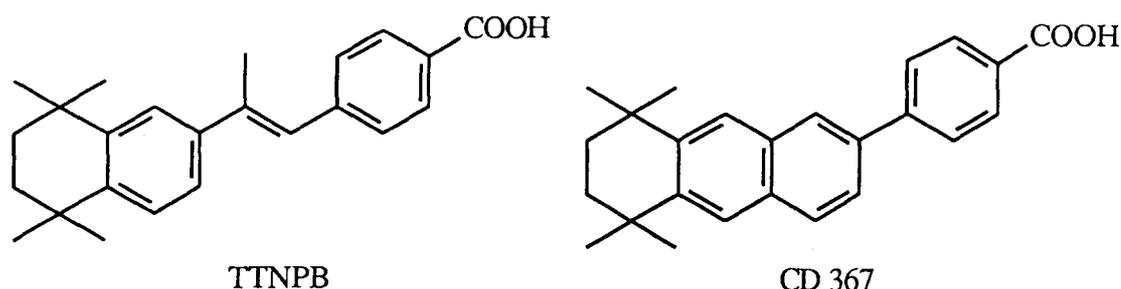
□ Les rétinoïdes de deuxième génération

Ils ont été obtenus essentiellement en échangeant l'extrémité cyclique de la molécule de vitamine A par une série de cycles divers, substitués ou non, voire d'hétérocycles. Les produits les plus intéressants de la série sont les dérivés portant un cycle aromatique substitué avec des méthyles, des méthoxy ou des halogènes. L'Etrétinate est très actif sur le modèle du papillome cutané et utilisé dans le traitement du psoriasis et des dermatoses kératinisantes.

□ Les rétinoïdes de troisième génération

Ils continuent à être développés et regroupent les dérivés présentant différentes formes de cyclisation englobant tout ou partie de la chaîne latérale polyénique. Une série particulièrement active est celle des arotinoïdes (Loeliger *et al.*, 1980), dont le chef de file, le TTNPB (Ro 13.6298) serait 8 000 fois plus actif que l'acide rétinoïque (Bollag et Hartman, 1983). En fait, l'efficacité de ces produits est variable selon les réponses testées. Dans cette série, la nature et la géométrie du connecteur reliant le cycle naphthalénique au cycle benzoïque sont importantes pour l'activité. Le meilleur connecteur est une chaîne propényle. Mais la chaîne polyénique peut être intégrée dans un cycle

aromatique comme dans le cas du CD367. Le CD367 a été développé comme ligand tritié des RARs (Cavey *et al.*, 1990).



Enfin, le groupe de K. Shudo a encore étendu la famille des rétinoïdes aromatiques en décrivant l'ensemble des acides rétinobenzoïques dont la formule générale est représentée sur la Figure 7 (Kagechika *et al.*, 1988 ; Kagechika *et al.*, 1989 a ; Kagechika *et al.*, 1989 b ; Kagechika *et al.*, 1989 c). L'activité biologique dans cette série est conditionnée par : (i) la présence de substituants hydrophobes en 3 et 5 ou en 3 et 4 (des substituants de type $C(CH_3)_3$, $Si(CH_3)_3$ ou $Ge(CH_3)_3$ peuvent être utilisés), (ii) une assez grande liberté dans le choix du connecteur X (les connecteurs propényle, cétone α , β insaturée et amide sont les meilleurs) et (iii) la nécessité de placer le carboxyle en para sur le cycle benzénique. L'activité est diminuée par l'estérification ou l'amidification du carboxyle, son remplacement par un groupe polaire bioisostère (sulfonique, aminosulfonique, tétrazolyle...).

VII-2 - SPECIFICITE

La recherche de nouveaux rétinoïdes de synthèse a pour but, de mettre au point des molécules moins toxiques que l'acide rétinoïque. Les causes de la très forte toxicité de rétinoïdes sont assez mal connues. Cependant, il semble clair que des molécules spécifiques d'un seul récepteur de l'acide rétinoïque possèderaient un meilleur indice thérapeutique. Or, l'acide rétinoïque possède une affinité et une capacité de transactivation équivalente pour chacun de ses récepteurs nucléaires. Des ligands $RAR\alpha$ spécifiques par

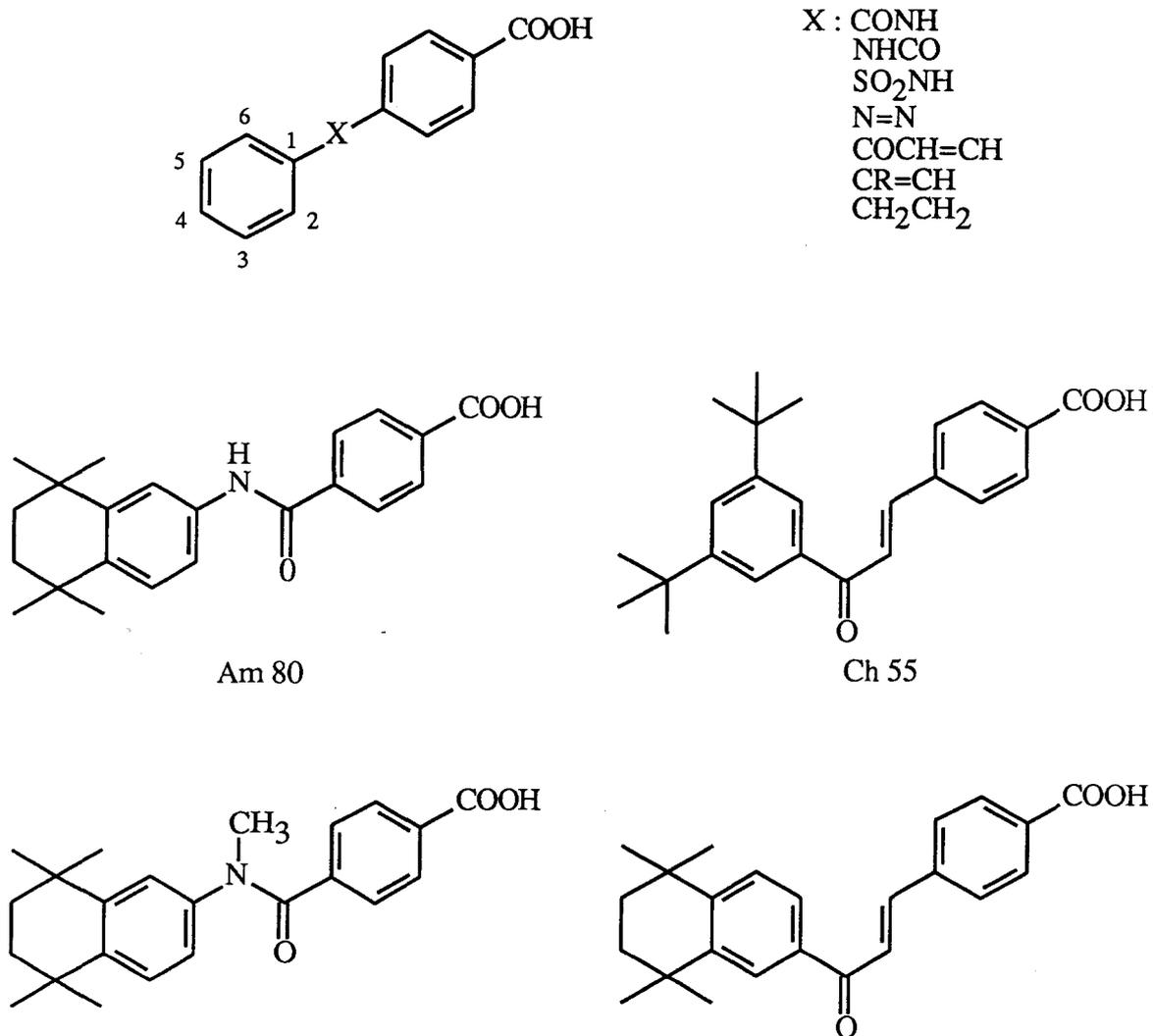


Figure 7 : Acides rétinobenzoïques.

exemple et donc utilisables comme agent anticancéreux (on pense que l'effet différenciateur développé par l'acide rétinoïque et les rétinoïdes implique l'activation de $RAR\alpha$) (Apfel *et al.*, 1992), devraient posséder une toxicité moindre grâce à l'élimination des effets indésirables dus à l'activation des deux autres récepteurs $RAR\beta$ et $RAR\gamma$. Avant le clonage des RARs, de nombreux travaux ont été effectués sur l'étude des Relations Structure-Activité (RSA) des rétinoïdes car seules ces études donnaient des informations sur le mécanisme d'action de l'acide rétinoïque et la structure du site actif des RARs. Un nombre impressionnant de nouvelles molécules ont donc été synthétisées durant ces quinze dernières années. De nombreuses modifications ont été apportées à la structure de base que représente la molécule d'acide rétinoïque et actuellement, les composés les plus actifs sont très éloignés du point de vue de leur structure, des rétinoïdes naturels. Jusqu'alors, les seules données utilisables pour mettre en oeuvre des études de RSA dans cette série, étaient des mesures d'activités biologiques, obtenues sur des cultures cellulaires. Ces résultats très intéressants par ailleurs sont difficilement exploitables en termes moléculaires car il s'agit généralement de phénomènes biologiques complexes difficilement interprétables (possibilités de métabolisation du produit, méconnaissance des cibles des rétinoïdes : récepteurs, PKA ...). Ensuite, le clonage et le séquençage des récepteurs ont ouvert une nouvelle ère dans ce domaine de recherche et très récemment la biologie moléculaire a permis l'obtention de récepteurs recombinants utilisables pour la détermination des activités de liaisons et de transactivation de ces nouvelles molécules.

Afin de permettre une bonne évaluation de la spécificité d'un rétinoïde, il est nécessaire d'en déterminer l'activité de liaison pour chacun des récepteurs, mais également d'analyser l'aspect fonctionnel qui découle de cette interaction ligand-protéine. La détermination des valeurs de K_d pour chacun des récepteurs est tout d'abord effectuée généralement sur des récepteurs recombinants entiers exprimés de façon transitoire dans des modèles artificiels comme les cellules de rein de singe COS ou les bactéries *E. Coli*. Ces modèles d'étude présentent de nombreux avantages. Ils offrent par exemple la possibilité de travailler sur un seul type de récepteur à la fois et permettent en outre de

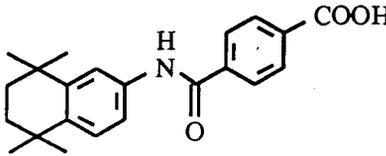
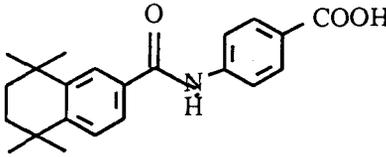
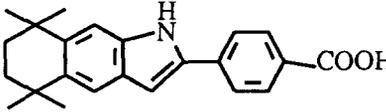
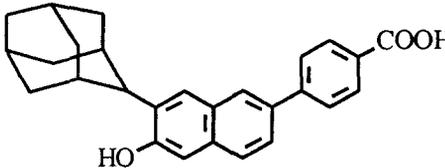
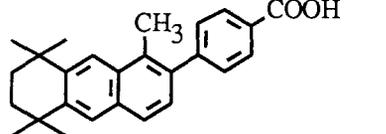
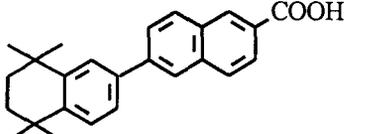
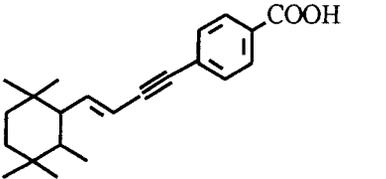
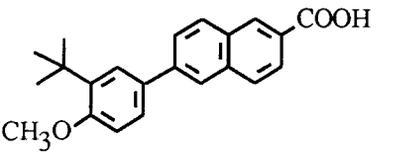
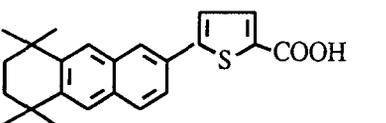
		Kis (nM)		
		hRAR alpha	hRAR bêta	hRAR gamma
	Am80	22	280	1720
	Am580	6	130	827
	3	11	90	62
	CD1530	2750	1500	150
	5	2800	350	540
	TTNN	460	26	190
	AGN 190121	1000	2,5	5
	CD417	6500	36	426
	9	1600	35	21

Tableau 3 : Quelques rétinoïdes spécifiques et leurs affinités pour les différents RARs.

manipuler des quantités appréciables de récepteurs en comparaison de ce qui est possible avec les tissus naturels où ces protéines sont présentes en quantité trop faible. La seconde étape est ensuite de procéder à un test fonctionnel permettant d'évaluer la capacité d'un rétinoïde à transactiver un gène reporter de type RARE-tk-CAT. La construction de cet outil consiste à insérer, dans un plasmide, l'élément de réponse de l'acide rétinoïque (RARE), un promoteur (ici le promoteur à la thymidine Kinase, tk) et enfin le gène de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT). Le plasmide obtenu est ensuite transfecté dans des cellules COS. La mesure de l'activité transactivatrice des rétinoïdes est alors effectuée en dosant l'activité CAT après traitement avec ces molécules.

On le voit, ces deux mesures apportent des informations complémentaires car si la mesure du K_d renseigne sur l'affinité d'un composé pour le domaine de liaison du ligand de $RAR\alpha$, $RAR\beta$ ou $RAR\gamma$, seul le test d'induction du gène CAT permet de distinguer un agoniste d'un antagoniste. Dans le cas des rétinoïdes de type agoniste, il existe généralement une très forte corrélation entre la spécificité de liaison d'un ligand et sa capacité de transactivation de l'un ou l'autre des récepteurs. Cependant, un composé tel que le TTNPB qui possède une affinité de 30 à 50% plus faible que celle de l'acide rétinoïque est environ 800 fois plus toxique. Ceci est probablement dû à une plus grande stabilité de ce composé *in vivo*. Il est également possible que cet arétinoïde soit capable d'induire une transactivation plus importante du récepteur. D'autre part, certains composés comme le rétinol ou le rétinol ne se lient pas de façon significative aux RARs et provoquent pourtant des effets biologiques. Ces rétinoïdes sont en fait métabolisés *in vivo* en acide rétinoïque capable de se lier aux récepteurs. De manière plus troublante, des composés tels que l'acide 4-hydroxy rétinoïque (un métabolite de l'AR) ou un analogue de l'AR avec une chaîne polyénique allongée (10 carbones) qui ne se lient pas aux RARs, ont des effets biologiques tels que l'hypervitaminose A. Plusieurs explications peuvent être avancées. Ces composés pourraient éventuellement exercer leurs effets *via* leur liaison à des récepteurs encore non identifiés, ou bien par d'autres mécanismes ne faisant pas intervenir les RARs. D'autre part, il n'est pas exclu que

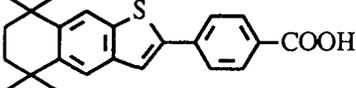
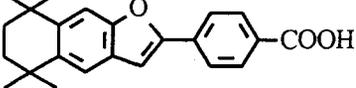
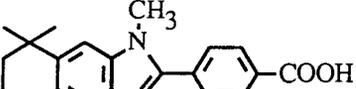
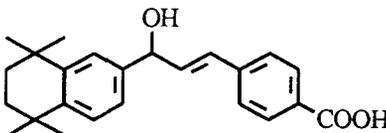
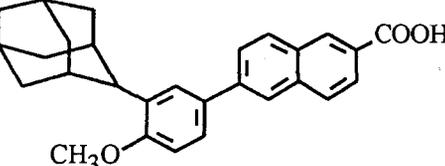
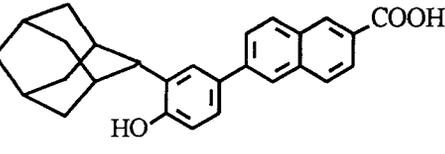
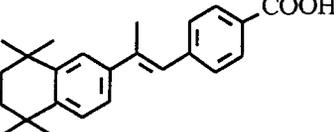
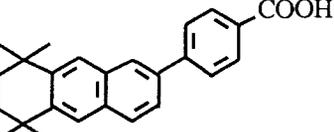
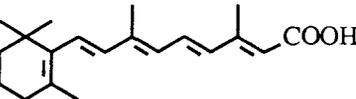
		Kis (nM)		
		hRAR alpha	hRAR béta	hRARgamma
	10	665	62	14
	CD495	32	6,5	4,5
	12	27000	260	108
	CD666	2240	2300	68
	CD271	1100	34	130
	CD437	6500	2480	77
	TTNPB	20	2	1
	CD367	5	2,5	3
	AR	13	5,5	3,5

Tableau 3 : Quelques rétinoides spécifiques et leurs affinités pour les différents RARs.

l'activité globale de certains rétinoïdes puisse être modifiée dans certains types cellulaires contenant d'autres protéines de liaison (par exemple la CRABP) ou enzymes.

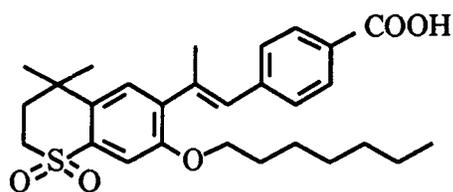
Des études récentes de RSA (Delescluse *et al.*, 1991 ; Lehmann *et al.*, 1991 ; Graupner *et al.*, 1991 ; Hashimoto *et al.*, 1990 ; Crettaz *et al.*, 1990 ; Bernard *et al.*, 1992) commencent à apporter les premiers éléments de Relations Structure-Spécificité des rétinoïdes (Tableau 3). Il est par exemple intéressant de remarquer que lorsqu'un rétinoïde possède dans sa partie centrale un groupement capable de former des liaisons hydrogène, celui-ci est plutôt spécifique de RAR α (par ex. Am80, Am580, dérivé 3), alors que les ligands spécifiques de RAR β ou RAR γ sont globalement plus hydrophobes (par ex. TTNN, CD417). On remarque également en analysant les données de la littérature qu'une sélectivité β/γ est très fréquente alors que les sélectivités α/β ou α/γ n'ont jamais été mises en évidence. En fait la sélectivité β/γ des rétinoïdes peut être corrélée avec le plus haut degré de similitude entre les domaines de liaison au ligand de RAR β et RAR γ comparé à celui de RAR α (Graupner *et al.*, 1991), notamment au niveau de l'hydrophobie des acides aminés de cette région (Reichert *et al.*, 1992). En effet, les domaines de liaison au ligand des trois RARs sont très similaires mais pas identiques et on constate que les séquences en acides aminés des domaines E des RARs sont plus conservées d'une espèce à l'autre que de l'un à l'autre (99 à 100% de l'homme à la souris) (Kastner *et al.*, 1990). Ceci permet de conclure à un rôle très spécifique de chaque récepteur. Le CD437 dérive du CD271 (Adapalène) par le fait que le groupement méthoxyle de l'Adapalène est remplacé par un groupement hydroxyle. Cette simple modification est apparemment suffisante pour déplacer la spécificité de RAR β vers RAR γ . Ce résultat est confirmé avec les composés CD1530 et CD666 qui comportent également un groupement hydroxyle sur la partie gauche hydrophobe de la molécule et qui ont une spécificité pour RAR γ . De plus, ces sélectivités observées sur des mesures d'activité de liaison sont conservées sur des mesures d'activité fonctionnelle de type CAT essais (Bernard *et al.*, 1992). Enfin, un motif encombrant placé au centre de la molécule fait chuter l'affinité pour RAR α . Ceci est observé notamment lorsque l'on passe du CD367 au composé 5. Le TTNPB et le ligand 12 qui portent un groupement méthyle

central ont également une sélectivité marquée β/γ . Il faut souligner que ces premiers éléments de Relations Structure-Spécificité des rétinoïdes ont été obtenus grâce à la synthèse de nouvelles molécules de conformation plus rigide. De telles molécules possèdent moins de degrés de liberté et permettent d'obtenir des informations plus précises sur la géométrie du site de liaison au ligand que les molécules plus flexibles comme l'acide rétinoïque. Cependant seules des études menées sur une grande quantité de rétinoïdes seraient en mesure d'apporter des informations déterminantes sur les bases moléculaires de la spécificité protéine-ligand dans cette série. Dans un avenir encore indéterminé, de nouveaux dérivés pourront être élaborés et utilisés pour activer sélectivement certaines fonctions biologiques en vertu de leur spécificité pour chaque sous-type de RAR.

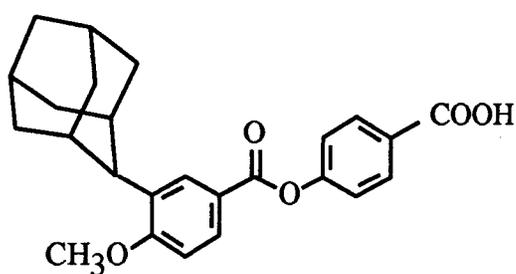
VIII - ANTAGONISTES

Des travaux très récents ont permis d'aboutir à la mise au point des premiers antirétinoïdes (Figure 8). Au vu des formules développées de ces molécules, il semble qu'elles aient été conçues sur le modèle des antihormones stéroïdes, c'est-à-dire en cherchant à occuper une poche hydrophobe vacante du récepteur par un groupement volumineux judicieusement placé sur le ligand. Ce thème sera développé dans un prochain chapitre consacré aux antagonistes de l'acide rétinoïque.

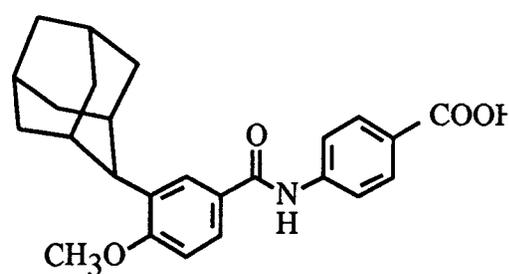
Pour l'heure, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le Ro 41-5253. Il s'agit d'un antagoniste pur, $RAR\alpha$ spécifique qui inhibe la différenciation des cellules HL-60 induite par l'acide rétinoïque (Apfel *et al.*, 1992). D'autres composés tels que le TD650 ou le TD550 sont des antagonistes partiels et ils possèdent une sélectivité marquée pour $RAR\alpha$ et $RAR\beta$. Enfin, deux antirétinoïdes faibles mais spécifiques de $RAR\beta$ ont également été synthétisés.



Ro 41-5253



TD 650



TD 550

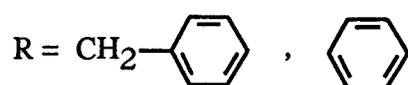
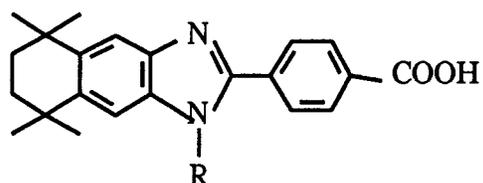


Figure 8 : Quatre antirétinoïdes de synthèse actuellement connus.

CHAPITRE II

LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Application à la purification des récepteurs
nucléaires de l'acide rétinoïque

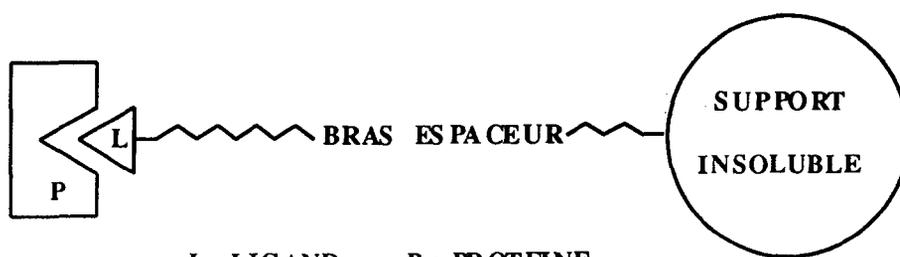
La conception rationnelle de nouveaux médicaments, potentiellement antitumoraux plus spécifiques et donc moins toxiques dans la série des rétinoïdes, ne sera envisageable que lorsqu'on aura des connaissances précises sur la structure tridimensionnelle des récepteurs de l'acide rétinoïque. Il est donc essentiel d'isoler et de caractériser ces protéines. Ce chapitre ne prétend pas traiter de la purification complète des trois récepteurs de l'acide rétinoïque mais plus simplement de la mise au point d'un outil, la chromatographie d'affinité, qui associé à d'autres techniques de purification permettra d'obtenir rapidement des quantités appréciables de RARs avec un haut degré de pureté.

I - GENERALITES SUR LA CHROMATOGRAPHIE BIOSPECIFIQUE

Bien qu'envisagée depuis fort longtemps dans son principe, la chromatographie d'affinité n'a connu son plein développement qu'après l'introduction des premiers supports de gel filtration des protéines à partir des années 1960 (Porath et Flodin, 1959). Cette technique a par la suite été utilisée avec succès pour la purification de protéines telles que des enzymes, des récepteurs ou encore des anticorps. Certains composés de haut poids moléculaire et présentant un intérêt biologique comme les acides nucléiques furent également purifiés en utilisant cette méthode.

L'intérêt de la chromatographie d'affinité réside dans la possibilité qu'elle offre de pouvoir séparer de façon sélective une protéine particulière d'un mélange complexe de plusieurs centaines de biomolécules avec un taux de purification bien supérieur à celui des autres techniques chromatographiques. Cette technique, développée par Cuatrecasas (Cuatrecasas et Anfinsen, 1971) est basée sur la spécificité fonctionnelle des protéines. La plupart des macromolécules biologiques possèdent une région hautement spécialisée destinée à une fonction unique : le site actif (enzymes) ou le site de liaison (récepteurs). La fixation covalente sur un support insoluble de la molécule complémentaire de ce site, ou ligand, permettra de retenir la protéine à purifier par adsorption spécifique sur le gel d'affinité (Figure 9A).

A



L : LIGAND P : PROTEINE

B

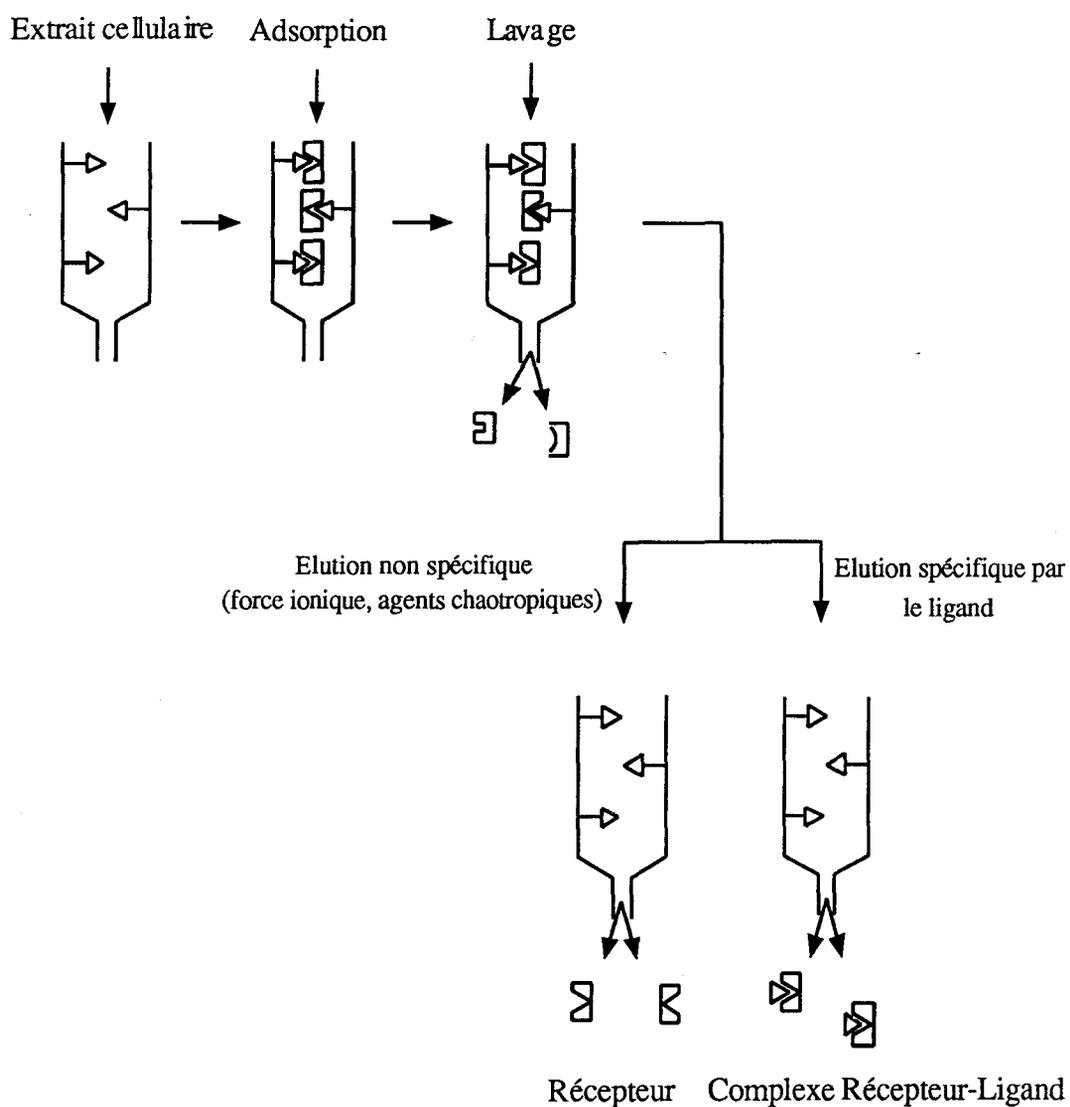


Figure 9 : Constitution d'un gel biospécifique (A) et principe de la chromatographie d'affinité (B).

Le processus de séparation se décompose en trois étapes (Figure 9B) :

- Adsorption spécifique de la protéine à purifier,
- Lavage de la colonne et élimination des protéines non spécifiques,
- Elution de la protéine.

L'échantillon contenant la protéine à purifier est donc mis en contact avec le gel d'affinité. Le ligand immobilisé sur le gel se lie spécifiquement à la protéine à purifier. Après un lavage intensif, qui élimine les protéines ne présentant pas d'affinité pour le ligand, l'élution est accomplie généralement par compétition en présence d'une concentration élevée du ligand ou d'un analogue soluble. Dans ce cas, l'élution est dite spécifique. Elle peut également être réalisée par un changement de pH ou par lavage avec une solution saline de concentration élevée. Il s'agit alors d'une élution non spécifique. Dans ce type d'élution, la composition du tampon est changée de telle façon que l'affinité du complexe macromolécule - ligand diminue suffisamment pour désorber la macromolécule. Un tel procédé d'élution présente deux inconvénients majeurs : la dénaturation irréversible fréquente et donc la perte de la fonction biologique de la macromolécule d'une part, la non-spécificité de l'élution d'autre part. L'élution spécifique quant à elle semble avoir tous les avantages quand elle est possible. Le ligand peut être le même que celui qui est immobilisé (il doit alors être utilisé en concentration plus élevée) ; il peut aussi, de préférence, être un autre ligand compétitif, d'affinité plus forte.

L'inconvénient majeur de la chromatographie d'affinité par rapport aux autres méthodes de fractionnement classique, consiste en l'utilisation de techniques très spécifiques et particulières à la macromolécule à isoler. Il est indispensable de faire précéder tout essai d'isolement par une étude approfondie de la macromolécule et de son ou ses ligands possibles. Un adsorbant spécifique et sélectif doit être préparé pour chaque macromolécule. L'autre inconvénient vient du caractère non totalement spécifique de l'adsorbant utilisé. Le support peut porter, outre le ligand, des groupements ioniques ou

hydrophobes, susceptibles d'adsorber les macromolécules. Les avantages de la chromatographie d'affinité sont cependant nombreux :

- ❑ Efficacité : basé sur la fonction biologique de la macromolécule, son isolement est beaucoup plus sélectif que les méthodes classiques.
- ❑ Rapidité / Facilité : lorsque la technique est au point, elle permet des purifications assez rapides nécessitant peu de manipulations.
- ❑ Protection contre la dénaturalisation : la liaison du site actif de la macromolécule à un ligand stabilise la structure tertiaire.

II - APPLICATION A LA PURIFICATION DES RECEPTEURS DE L'ACIDE RETINOÏQUE

Outre les quelques essais de purifications partielles des RARs par des méthodes conventionnelles (ultrafiltration, chromatographie d'exclusion de taille...) (Sani *et al.*, 1990 ; Hashimoto *et al.*, 1989 ; Nervi *et al.*, 1989), l'application de la chromatographie d'affinité à l'isolement des macromolécules liant l'acide rétinolique remonte à 1988, année où K. Shudo et collaborateurs ont décrit l'isolement partiel d'une protéine réceptrice de l'acide rétinolique (Retinoid Specific Binding Protein, RSBP) dans les cellules HL-60 (cellules de leucémie à promyélocytes) en utilisant comme ligands spécifiques (Figure 10) l'acide 4-[(5,6,7,8-tétrahydro-5,5,8,8-tétraméthyl-2-naphtalényl) carbamoyl] benzoïque (Am80) et l'acide (E)-4-[3-oxo-3-(5,6,7,8-tétrahydro-5,5,8,8-tétraméthyl-2-naphtalényl)-1-propényl]benzoïque (Ch80) (Kagechika *et al.*, 1988).

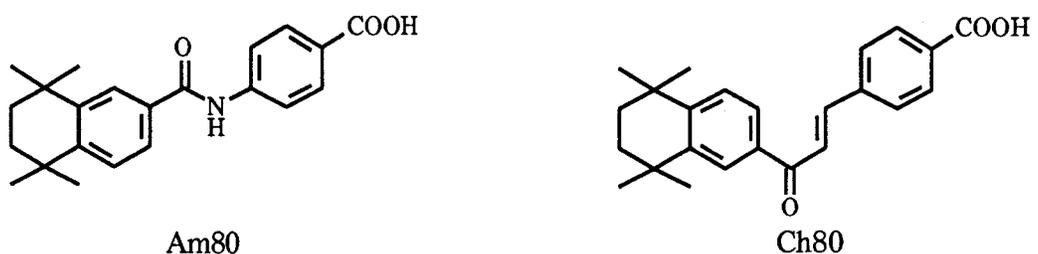


Figure 10 : Structure de deux ligands utilisés en chromatographie d'affinité.

Par la suite deux équipes ont également utilisé cette méthode d'isolement pour la purification de la CRABP (Singh *et al.*, 1989 ; Chapman et Curley, 1990). Les ligands utilisés étaient alors l'acide 14-carboxy-rétinoïque ou l'acide 4-(hydroxyéthoxy)-rétinoïque couplés au sépharose activé 4B ou 6B (Figure 11).

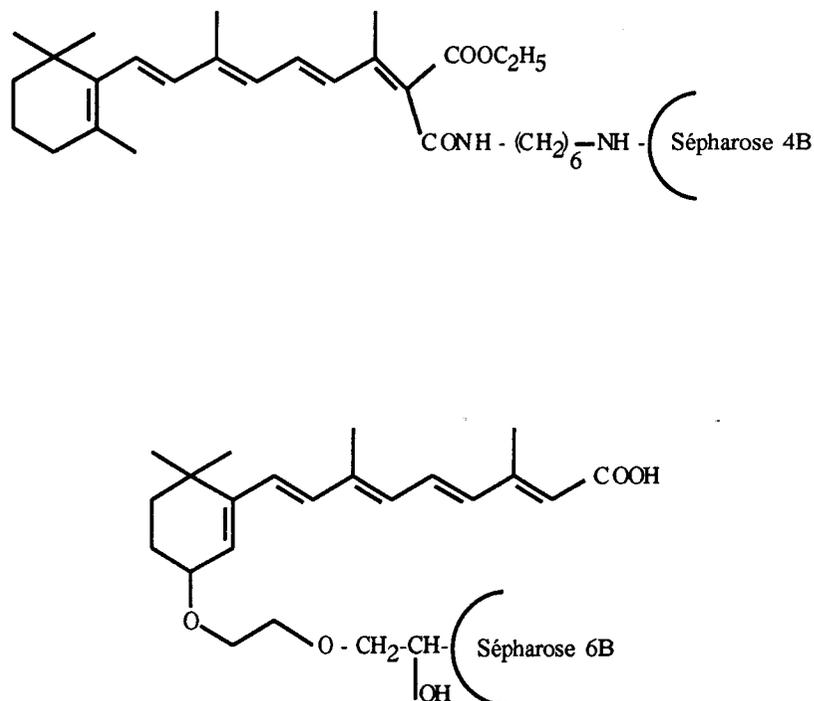


Figure 11 : Acide 14-carboxy-rétinoïque (A) et acide 4-(hydroxyéthoxy) rétinoïque (B) couplés au sépharose activé 4B ou 6B.

Les bons résultats obtenus pour la CRABP nous ont encouragés à développer une technique similaire pour les RARs. Cependant plusieurs obstacles rendaient l'opération difficile. En premier lieu, la CRABP présente en concentration très élevée dans les cellules naturelles pouvait entrer en compétition avec les récepteurs et ainsi diminuer leur adsorption spécifique. Ensuite la très faible abondance des RARs (de 500 à 1500 molécules / cellule) dans les cellules naturelles rendaient une telle purification presque impossible.

Nous avons donc entrepris d'une part de préparer un nouveau gel biospécifique, en utilisant un ligand à haute affinité pour les récepteurs à purifier, et d'autre part de travailler sur des récepteurs recombinants obtenus par l'utilisation de vecteurs d'expression viraux (baculovirus) ou bactériens (*Escherichia Coli*) pour la production en quantités plus significatives de ces protéines.

II-1 - SYSTEMES D'EXPRESSION DES RARS RECOMBINANTS

II-1-1 - Système de surexpression par infection cellulaire à l'aide de virus recombinants (Baculovirus Expression Vector System ; B.E.V.S.)

La production de protéines recombinantes dans les cellules eucaryotes d'insectes (cellules SF9), sous le contrôle d'un virus spécifique constitue un nouveau système de production abondante de protéines recombinantes possédant des propriétés antigéniques, immunologiques et fonctionnelles identiques à celles des protéines naturelles. Nous avons bénéficié pour le développement de ces méthodes de l'aide du groupe de P. Chambon (I.N.S.E.R.M. U184 / Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryotes, C.N.R.S.Strasbourg), qui nous a fourni les trois virus recombinants exprimant hRAR α , hRAR β et hRAR γ . Le principe de cette méthode de surproduction est simple. Au cours de l'infection de cellules SF9 par le virus naturel (non recombinant) deux formes de virus sont produits par les cellules cibles : des particules virales extracellulaires (PVE) et des occlusions virales (OV). Ces dernières sont constituées de la particule virale entourée d'une coque protéique formée en majorité de polyhédrine. Dans les cultures de cellules d'insecte infectées, la polyhédrine (29 kDa) s'accumule jusqu'à des concentrations de l'ordre de 1 mg/ml pour 10⁶ cellules infectées, ce qui représente alors plus de 50 % des protéines totales de la cellule. Le gène de la polyhédrine n'est pas essentiel pour la réplication ou la production de particules virales extracellulaires.

Il est dès lors possible de le modifier par l'insertion de gènes étrangers. Ces virus recombinants sont obtenus en trois étapes (Figure 12) : (i) insertion du gène à exprimer dans un vecteur de transfert bactérien, (ii) l'ADN du baculovirus et le

vecteur de transfert sont cotransfectés dans les cellules d'insectes SF9 (cellules ovariennes de chenilles). Au cours de cette étape, une recombinaison homologe permet la production d'un ADN viral recombinant porteur du gène à exprimer, enfin (iii) cette recombinaison est un évènement rare et il est nécessaire de purifier le virus recombinant.

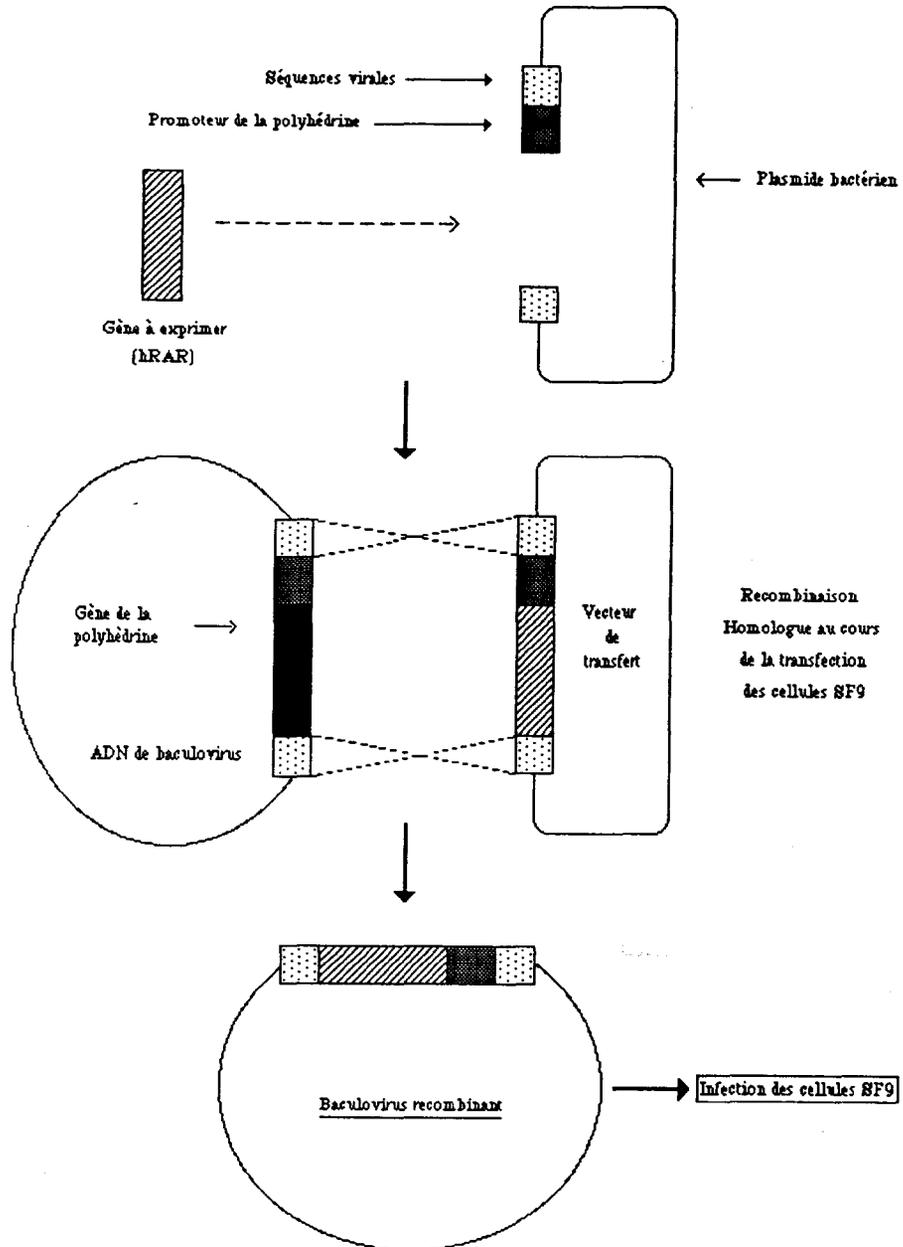


Figure 12 : Système de surexpression par infection cellulaire à l'aide de virus recombinants.

II-1-2 - Escherichia Coli

Les vecteurs utilisés dans cette étude ont été fournis par le groupe de P. Chambon. Dans notre cas, les plasmides utilisés (série pET3) sont porteurs (i) du gène de la protéine à exprimer, (ii) d'un promoteur inductible par l'IPTG (isopropylthiogalactoside : analogue du lactose) et (iii) d'un gène de résistance à un antibiotique (ex : ampicilline). Les plasmides ainsi obtenus sont alors insérés dans *E. Coli* et la sélection des bactéries transformées est alors effectuée en présence de l'antibiotique, agent de sélection. Les clones résistants sont ensuite isolés et repiqués. L'induction de la traduction des RARs recombinants est alors initiée par un traitement des bactéries avec l'IPTG.

II-2 - MISE AU POINT DU GEL D'AFFINITE

L'élaboration d'un gel d'affinité comporte plusieurs étapes :

- choix du support chromatographique
- choix du ligand
- choix du bras espaceur

II-2-1 - Choix du support

Les supports pouvant être utilisés sont assez nombreux et variés dans leur constitution. Le polystyrène, par exemple peut être employé mais trop hydrophobe et provoquant une adsorption non spécifique importante, il est relativement peu utilisé en chromatographie d'affinité. De même pour la cellulose de caractère fibreux et non uniforme qui empêche une bonne pénétration des macromolécules ainsi que les dextrans de porosité trop faible. Par contre l'agarose, grâce à sa structure spatiale, comporte des régions hélicoïdales alternant avec des chaînes en conformation désordonnée. Cette diversité de structure lui confère une grande perméabilité. Aucun support ne présente réellement toutes les qualités requises pour la chromatographie d'affinité. L'agarose est actuellement le plus utilisé bien qu'il possède une faible résistance mécanique et chimique.

Sa grande porosité est un avantage essentiel sur tous les autres supports, car elle permet une bonne accessibilité des ligands couplés, ce qui est indispensable à l'adsorption d'une macromolécule. D'un point de vue chimique, il s'agit d'un polysaccharide linéaire constitué d'un enchaînement alternatif de D - galactose et de 3,6-anhydro - L - galactose (Figure 13).

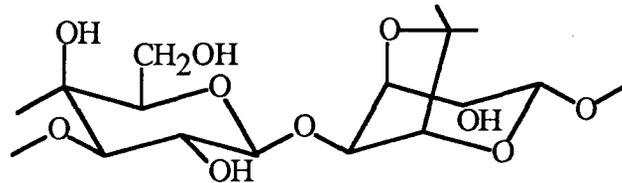


Figure 13 : Structure chimique de l'agarose.

Un point intéressant est sa nature hydrophile et l'absence de groupement ionisé à sa surface : l'agarose présente de ce fait une adsorption non spécifique assez faible. Les groupes hydroxyle situés sur les résidus sucrés peuvent être aisément utilisés pour fixer de manière covalente le bras espaceur. En fait, les gels que nous utilisons au laboratoire sont constitués d'agarose ou d'agarose réticulé (Sépharose CL4B, Pharmacia) qui présente de bonnes propriétés mécaniques ainsi qu'une bonne stabilité dans les milieux organiques.

II-2-2 - Choix du ligand

Une fois le support choisi, il reste à déterminer le ligand et son mode de fixation sur le support. Ce choix, d'une importance capitale, détermine la spécificité de l'interaction du gel d'affinité avec le récepteur à purifier. Le ligand doit logiquement être pourvu d'une grande sélectivité et d'une forte affinité vis à vis du récepteur. Il doit en outre, posséder un groupement chimique capable de former une liaison covalente avec le support, et ceci sans qu'il y ait perte ou altération sérieuse de ses interactions avec la macromolécule. L'utilisation de l'acide rétinoïque comme ligand a d'emblée été écartée.

En effet, il s'agit d'une molécule peu stable qui s'oxyde facilement, dont l'affinité pour les récepteurs de l'acide rétinoïque est forte mais sans doute insuffisante en raison de la faible abondance des récepteurs endogènes, et qui surtout manque de spécificité. En effet, il se fixe non seulement à ses récepteurs, mais aussi à la CRABP, et donne lieu du fait de sa forte hydrophobie à une importante liaison non spécifique (lipides, autres protéines).

Depuis quelques années, de nombreux rétinoïdes ont été synthétisés et parmi ceux-ci, certains sont plus actifs et plus stables que l'acide rétinoïque. L'équipe de K. Shudo a notamment développé de nombreux rétinoïdes de troisième génération (Kagechika *et al.*, 1988 ; Kagechika *et al.*, 1989 a ; Kagechika *et al.*, 1989 b ; Kagechika *et al.*, 1989 c). Leur activité sur la différenciation cellulaire a été mesurée sur différentes lignées cellulaires ainsi que leurs affinités pour la CRABP (Jetten *et al.*, 1987) et la RSBP (Retinoid Specific Binding Protein = RARs ; Hashimoto *et al.*, 1988).

Analogue	EC 50 (nM) Cellules F9	EC 50 (nM) HL-60	CRABP Ki (μM)	RSBP Ka (M^{-1})
AR	0,37	1,00	0,21	$2,4 \cdot 10^{10}$
Am80	6,30	0,40	3,60	$4,4 \cdot 10^{10}$
Am90	>100	>100	>100	NT
Am580	3,80	NT	4,00	NT
Ch55	0,26	0,04	540	NT
Ch30	0,80	0,80	>100	NT
Ch80	0,60	0,70	>100	NT

EC 50 : Concentration Efficace 50%, Ki, Ka : constante d'inhibition ou d'association.

Tableau 4 : Comparaison de l'activité biologique, de l'affinité pour la CRABP et la RSBP de l'acide rétinoïque et de certains analogues rétinoïdes.

Le Tableau 4 indique clairement que Ch55 (Figure 14) est le composé testé le plus actif sur la différenciation des cellules HL-60 et F9 (cellules de tératocarcinome de souris). Ch55 est d'autre part capable de supprimer l'expression de l'oncogène c-myc dans les cellules HL-60 (Hashimoto *et al.*, 1987) et d'augmenter l'activité de liaison de l'EGF à l'EGFR (Sporn *et al.*, 1986).

De plus, on remarque une corrélation entre la valeur de la constante d'association RSBP - Rétinoïde et l'activité biologique des produits, dans la lignée HL-60. En outre, une caractéristique intéressante de Ch55 est qu'il possède une très faible affinité pour la CRABP. Plus récemment, une étude de l'activité de liaison de Ch55 sur les RAR α et β exprimés dans les cellules HL-60 a montré que cette molécule possède une meilleure affinité pour ces deux récepteurs que l'acide rétinoïque lui-même (Hashimoto *et al.*, 1990).

Toutes ces caractéristiques nous ont conduit à choisir cette molécule comme ligand pour l'élaboration du gel d'affinité car elle semblait posséder une bonne affinité et la plus grande sélectivité vis à vis des RARs. En ce qui concerne le point d'attache du bras espaceur sur cette molécule, deux possibilités existaient : ou bien utiliser la fonction carboxylique présente sur Ch55 ou bien préparer un nouveau dérivé porteur d'une fonction réactive placée sur une autre position de la molécule. La première approche avait l'avantage de la simplicité, mais la présence d'une fonction carboxylique libre est indispensable pour conserver une bonne activité de liaison (Shudo *et al.*, 1985 ; Cavey *et al.*, 1990).

Nous avons donc entrepris la synthèse d'une nouvelle molécule, dérivée de Ch55 et possédant un groupement amino-3-propanoxyde en ortho de la fonction carboxylique (Figure 14). La molécule obtenue a ensuite pu être greffée, par l'intermédiaire de sa fonction amine, à l'extrémité du bras espaceur porté par l'agarose.

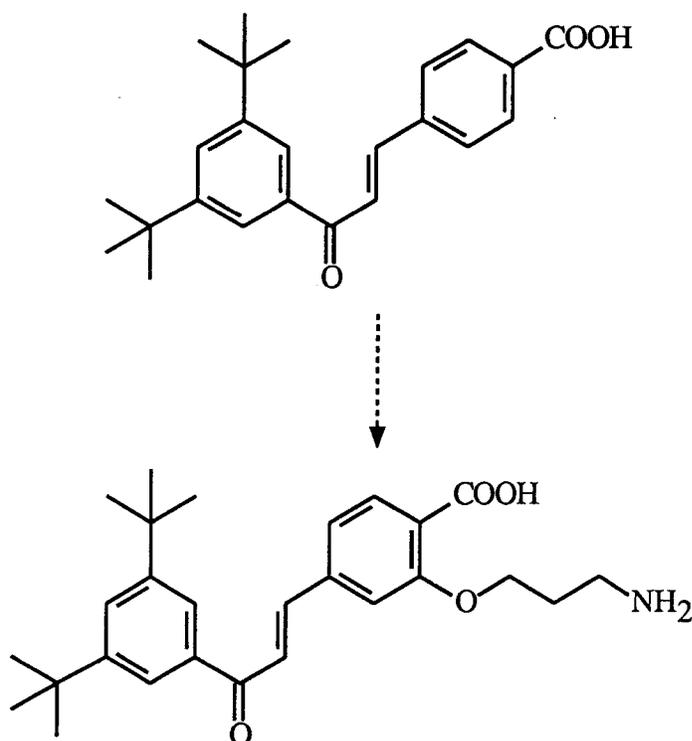
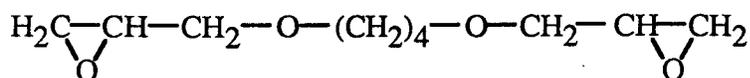


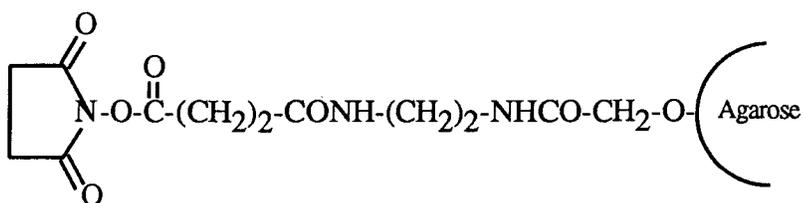
Figure 14 : Structures de Ch55 et de son dérivé substitué en 3'.

II-2-3 - Choix du bras espaceur et de la nature de la liaison ligand-bras espaceur

Le rétinoïde, du fait de sa petite taille doit être écarté du support au moyen d'un élément bifonctionnel : le bras espaceur. Ce bras espaceur diminue les encombrements stériques en augmentant l'accessibilité du ligand pour le récepteur et en diminuant les interférences dues au support solide. La nature de la liaison chimique ligand-bras espaceur est un point de toute première importance dans l'élaboration d'un gel d'affinité. Il est en effet très important de s'assurer de la stabilité chimique de cette liaison. De ce point de vue, une liaison ester ne peut-être utilisée car ce type de liaison est rapidement hydrolysé par les estérases présentes dans les extraits biologiques. Les gels ainsi préparés ne sont pas stables et relarguent des sites ligands par hydrolyse. Pour prévenir l'action des estérases cytosoliques, certains auteurs introduisent une étape de prépurification avant la chromatographie d'affinité. Ainsi, la précipitation par le sulfate d'ammonium permet d'éliminer les estérases et d'éviter le relargage du ligand au cours de



□ Enfin, nous avons utilisé un gel commercialisé par les laboratoires Bio-Rad et appelé Affi-Gel 10. Ce gel est constitué d'une matrice de type agarose sur laquelle est greffé un long bras espaceur (10 atomes). Ce dernier est porteur d'une fonction ester activé à son extrémité permettant de fixer notre ligand. Ce gel porte 10 μmoles de bras espaceur/ml de gel.



II-3 - METHODES ET SYNTHESSES

II-3-1 Synthèse du ligand : trifluoroacétate de l'acide (E)-2'-(3-amino propanoxy)-4-(3-(3, 5-ditertiobutylphényl)-3-oxo-1-propényl)benzoïque 12

II-3-1-1 - *Synthèse de la 3, 5-ditertiobutyl acétophénone 4*

Le toluène (Schéma 1) est converti en 3,5-ditertiobutyl toluène **1** par une réaction de type Friedel-Crafts en présence de chlorure de tertiobutyle et de chlorure d'aluminium (Geuse *et al.*, 1956). Le substituant méthyle étant donneur par effet inductif, la première substitution se fait en para plutôt qu'en ortho du fait de l'encombrement stérique du groupement tertiobutyle. La deuxième substitution implique un réarrangement afin de minimiser les interactions stériques. Nous obtenons un toluène disubstitué en méta. Il est à noter que la substitution par le chlorure de tertiobutyle menée sur le para tertiobutyl-toluène fournit aussi un produit disubstitué en méta. Il s'agit donc d'un cas particulier où l'effet d'encombrement stérique rend inutilisable les règles de Holleman. Il

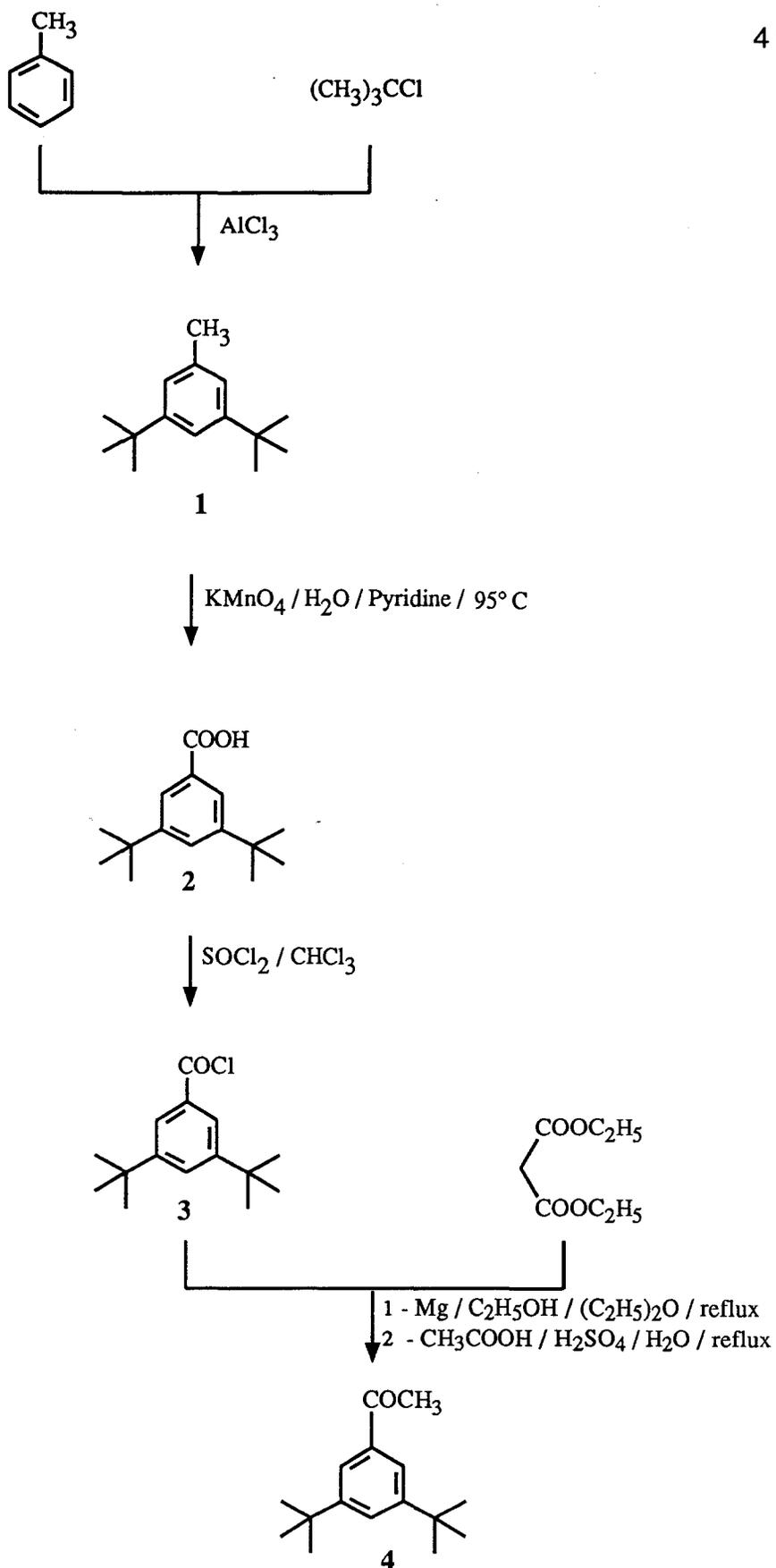


Schéma 1 : Synthèse de la 3, 5-di-tertobutylacétophénone (4)

est en fait très probable que l'on soit ici en présence d'une substitution électrophile dite *ipso*. Ces substitutions particulières sont généralement observées dans la protodesalkylation des alkylbenzènes, une réaction qui est l'inverse de l'alkylation de Friedel-Crafts. Les groupes alkyles tertiaires sont d'ailleurs les plus facilement scindés.

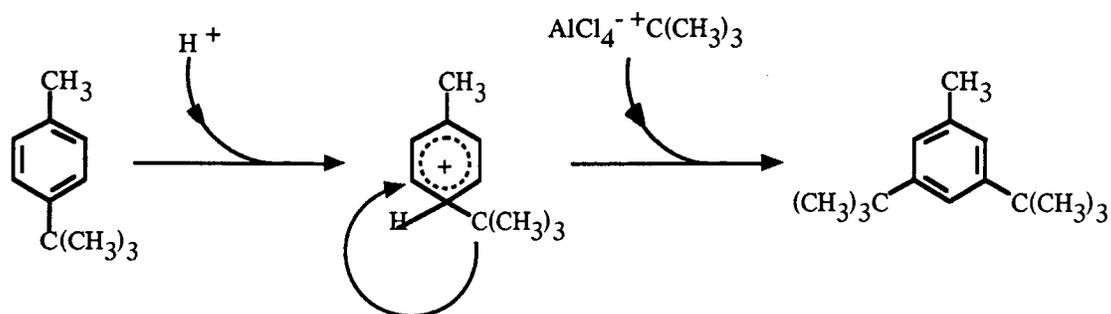


Figure 15 : Mécanisme de réarrangement des alkylbenzènes.

Le mécanisme de cette réaction commence probablement par la protonation grâce à des traces d'HCl, suivie de l'expulsion du cation tertibutyle et de la décomposition de ce dernier, régénérant le proton et fournissant du 2-méthyl-propène. L'attaque *ipso* est également responsable de l'isomérisation des alkylbenzènes par réarrangement. Ici, un groupe tertibutyle migre d'un atome de carbone du cycle vers un autre (Figure 15).

Le groupement méthyle directement lié au cycle aromatique est alors oxydé en présence de permanganate de potassium et de pyridine pour obtenir l'acide 3, 5-ditertibutylbenzoïque 2. Ce dernier donne le chlorure d'acide 3 correspondant par traitement avec le chlorure de thionyle dans le chloroforme anhydre. Enfin, une synthèse malonique conduit à la cétone désirée 4 (Walker et Hauser, 1946). Une synthèse plus directe de ce dernier composé a été tentée en partant directement de l'acétophénone que nous avons soumise à l'alkylation de Friedel-Crafts. Cependant, l'effet désactivant du carbonyle n'a pas permis d'obtenir la 3, 5-ditertibutyl-acétophénone désirée.

II-3-1-2 - *Synthèse du 2-(3-tertiobutyl-oxycarbonylamino propanoxy)-4-formyl benzoate d'éthyle 10*

L'acide 4-méthyl-salicylique est estérifié puis acétylé pour donner le 4-méthyl-2-acétoxy-benzoate d'éthyle **6** (Schéma 2). Cet ester est ensuite oxydé en milieu anhydride acétique en présence d'oxyde de chrome (VI) et le composé diacétoxy **7** obtenu (Dyke *et al.*, 1973) est hydrolysé en présence d'acide sulfurique dans le méthanol pour obtenir le 4-formyl-salicylate d'éthyle **8**.

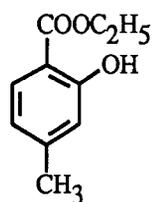
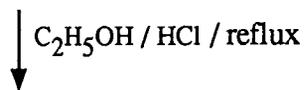
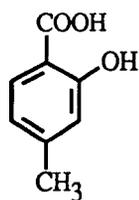
Cet aldéhyde **8** est alors traité par l'hydrure de sodium dans le diméthylformamide (DMF) anhydre, puis on ajoute le 1-bromo-3-tertiobutyl-oxycarbonyl-amino-propane **9** obtenu classiquement par action du carbonate de ditertiobutyle sur la 3-bromo propylamine (Schéma 3).

Le faible rendement obtenu lorsque cette réaction de greffage est effectuée à température ambiante, est grandement amélioré par un chauffage du milieu réactionnel à 60-65°C pendant 6-7 heures. Ce rendement décroît de nouveau lorsque la température dépasse 70-80°C en raison de la génération de nombreux produits secondaires.

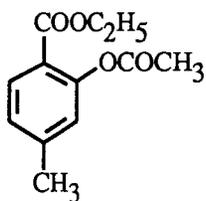
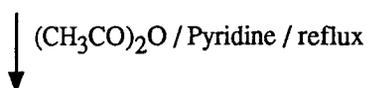
II-3-1-3 - *Synthèse du trifluoroacétate de l'acide - (E)-2'-(3-amino propanoxy)-4-(3-(3, 5-ditertiobutylphényl)-3-oxo-1-propényl) benzoïque 12*

Après purification par chromatographie sur colonne de silice, la condensation aldolique de l'aldéhyde **10** avec l'acétophénone **4** est effectuée dans l'éthanol en milieu basique (Schéma 3). La chalcone **11** obtenue est alors déprotégée par traitement avec l'acide trifluoroacétique (TFA) dans le dichlorométhane.

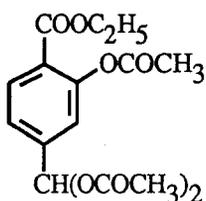
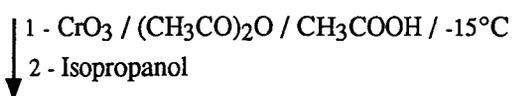
Au cours du clivage, il y a formation de cations tertibutyle susceptibles de réagir avec les noyaux aromatiques, d'où la nécessité de les piéger par la présence d'un "scavenger" dans le milieu réactionnel, le plus souvent du phénol ou de l'anisol (5%).



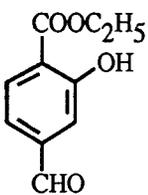
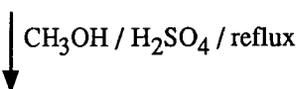
5



6



7



8

Schéma 2 : Synthèse du 4-formyl salicylate d'éthyle (8)

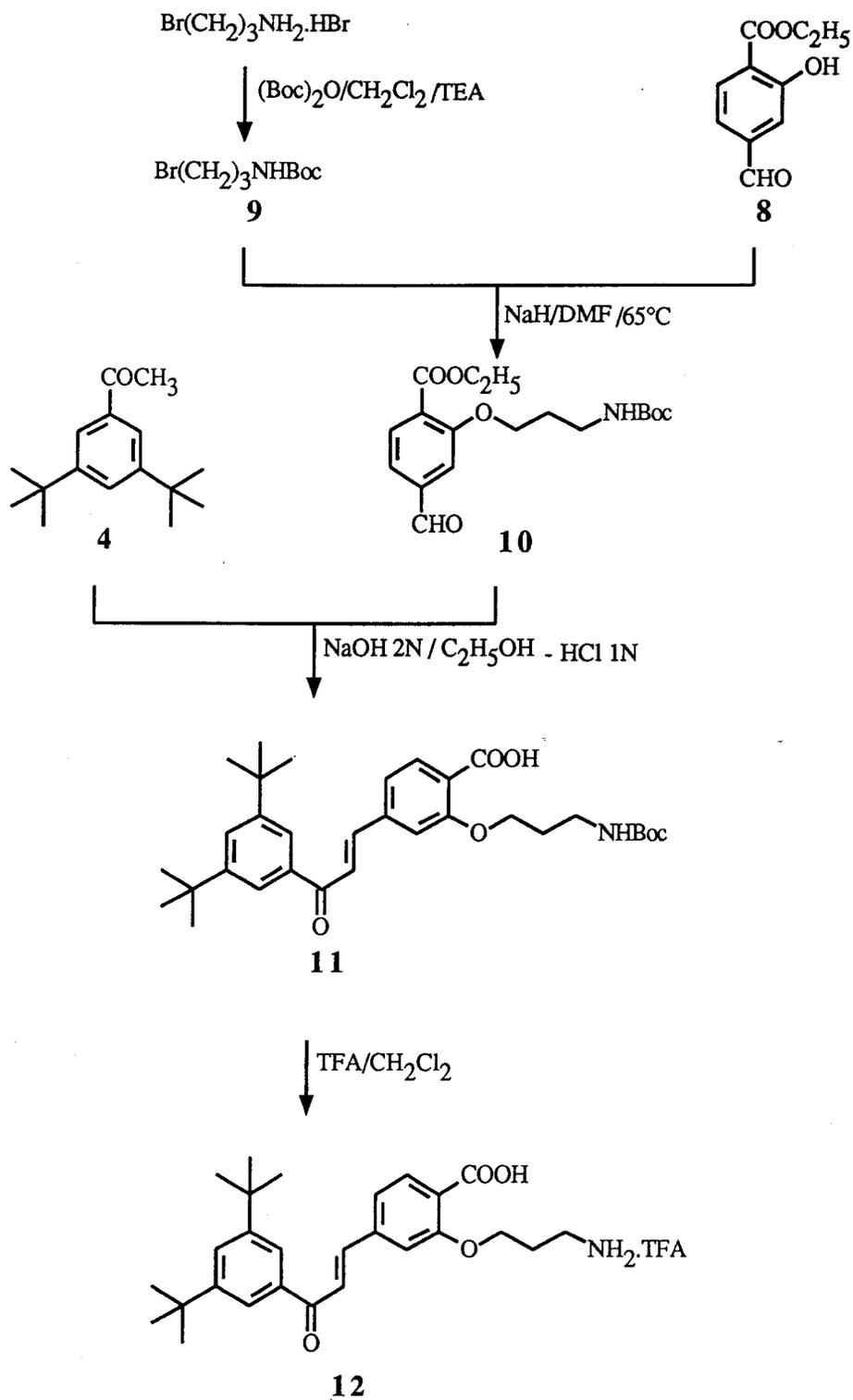


Schéma 3 : Synthèse du trifluoroacétate de l'acide (E)-2'-(3-aminopropanoxy)-4-(3-(3, 5-ditertiobutylphényl)-3-oxo-1-propényl) benzoïque (12)

II-3-2 - Activation du support et greffage du bras espaceur

II-3-2-1 - *Cas de l'acide -7- aminoheptanoïque*

Parmi les nombreuses techniques décrites de fonctionnalisation de l'agarose, la méthode la plus courante est celle consistant à utiliser du bromure de cyanogène (Schéma 4). Le bromure de cyanogène réagit en milieu alcalin sur les groupes hydroxyle vicinaux du Sépharose pour former des esters cyaniques (1). Ces esters cyaniques sont pour la plupart rapidement hydrolysés en carbamates (3) non réactifs ou en imidocarbonates (2) peu réactifs. Les groupements réactifs (esters cyaniques et imidocarbonates) réagissent avec les fonctions amine primaire en établissant des liaisons isourée (4). De nombreux protocoles utilisant le bromure de cyanogène ont été décrits. La procédure que nous avons retenue est celle proposée par P. March (March *et al.*, 1974) et modifiée par P. Lustenberger (Lustenberger, 1986). Le bromure de cyanogène est ajouté sous forme d'une solution dans l'acétonitrile et la réaction se déroule dans un tampon phosphate 5M (pH 11). Du fait de la grande instabilité des esters cyaniques, le gel est rapidement lavé et le couplage du bras espaceur immédiatement effectué. Ce type de gel sera dénommé : gel BrCN.

II-3-2-2 - *Cas du 1,8-dioxiranyl-2,7-dioxaoctane*

Le couplage du bras espaceur est réalisé directement sur l'agarose en milieu basique, selon la méthode décrite par Porath et Sundberg (Sundberg et Porath, 1974) pendant 5 heures à température ambiante (Schéma 5). Ce type de gel sera dénommé : gel Oxirane.

II-3-3 - Couplage du ligand

II-3-3-1 - *Gels BrCN*

La fixation du ligand sur l'extrémité carboxylique du bras espaceur est obtenue par formation d'une liaison amide (Schéma 4). Cette réaction nécessite

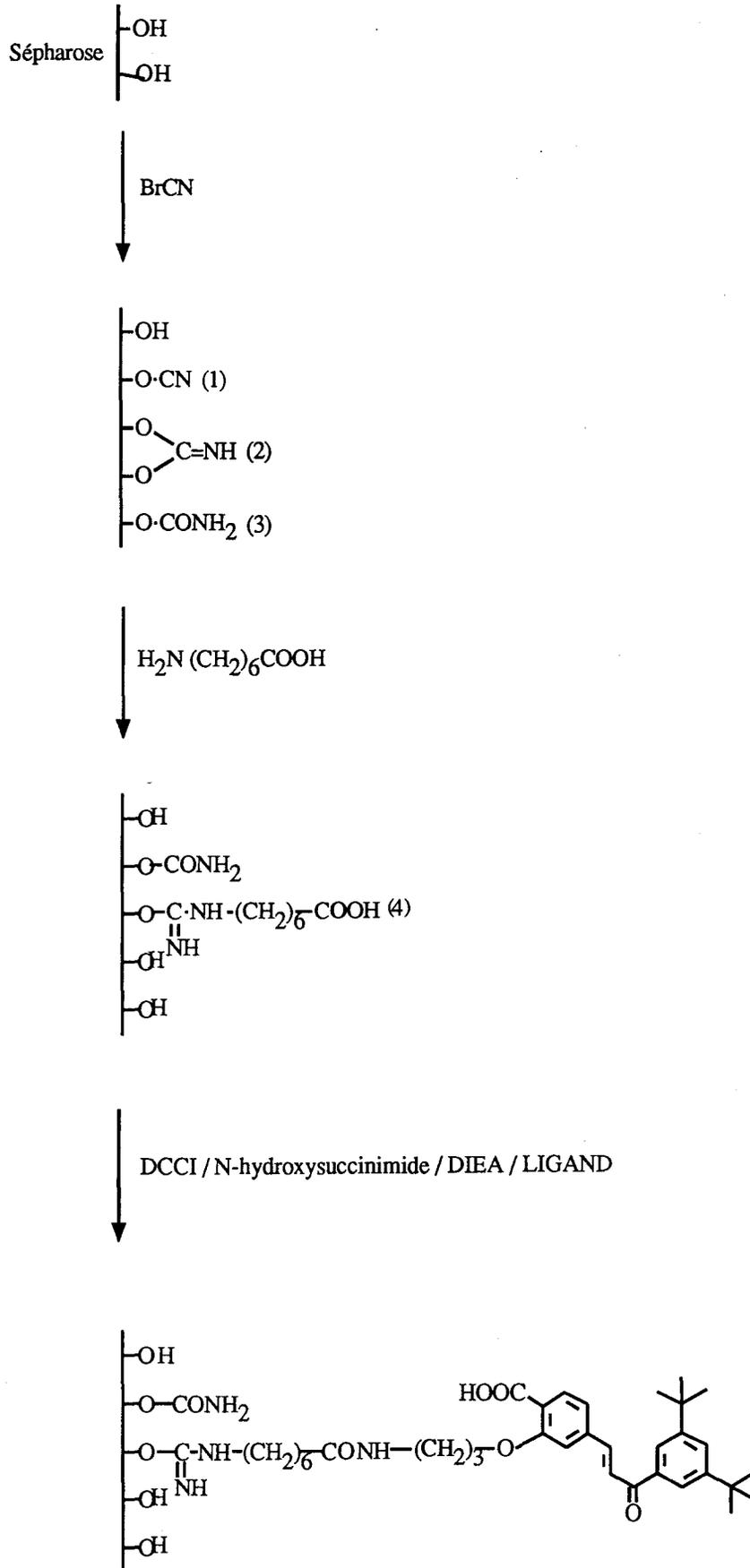


Schéma 4 : Synthèse des gels d'affinité de type BrCN

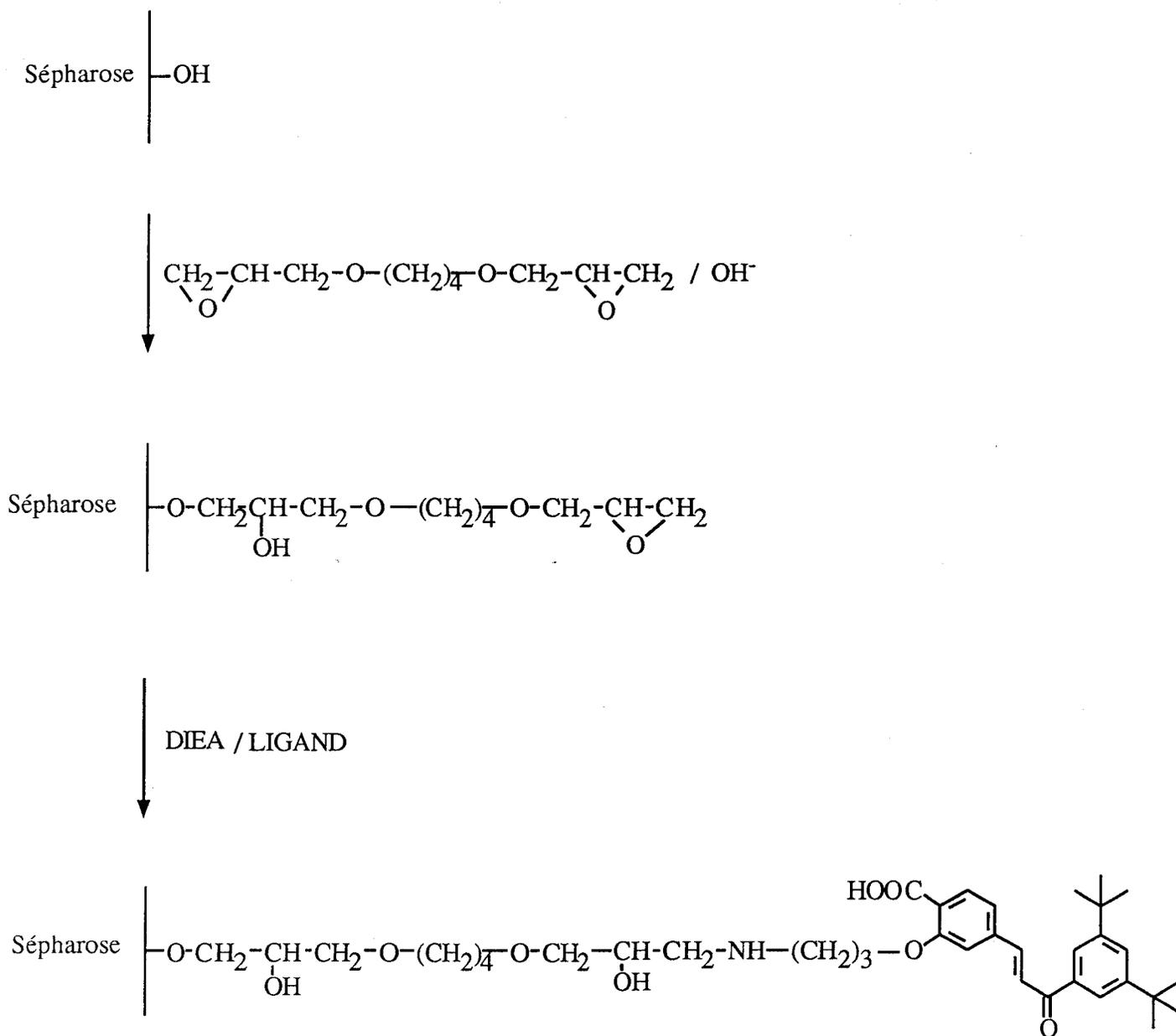


Schéma 5 : Synthèse des gels de type Oxirane.

l'activation de la fonction carboxyle. Nous avons testé plusieurs agents d'activation et les meilleurs résultats ont été obtenus avec le couple DCCI / N-hydroxysuccinimide en présence d'un large excès de N, N-diisopropyléthylamine.

II-3-3-2 - *Gels Oxirane*

Le couplage du ligand est effectué dans le diméthylformamide (DMF) en présence d'un excès de DIEA pendant 12 heures à température ambiante (Schéma 5).

II-3-3-3 - *Affi-Gel 10*

Le dérivé 2'-3-aminopropanoxyde de Ch55 est couplé en agitant 12 heures à 0-4°C dans le DMF en présence d'un excès de DIEA (pH 9-10). Ce pH élevé s'est révélé indispensable pour l'obtention d'un bon rendement de couplage (80%). Ce type de gel sera dénommé : Affi-Gel (Schéma 6).

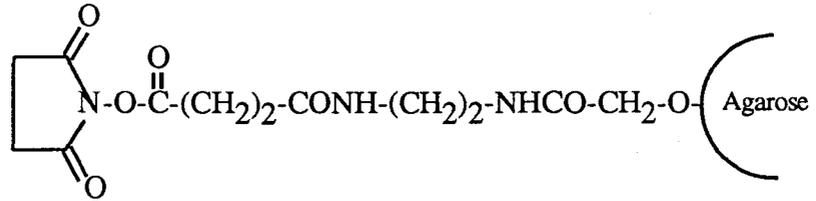
II-3-3-4 - *Désactivation*

Après couplage du ligand, des groupements réactifs peuvent être encore présents et il faut veiller à ce que le support soit désactivé avant utilisation en chromatographie d'affinité. Cette désactivation est réalisée en traitant les gels avec une solution d'éthanolamine à 0,1 M. Les gels après lavages à l'eau sont conservés à 0-4°C dans de l'eau azidée (0,02% NaN_3) ou dans un mélange eau / éthanol (80/20).

II-3-4 - Degré de substitution

Le schéma de synthèse du gel d'affinité comporte trois étapes : (i) activation du support, (ii) couplage du bras espaceur et (iii) immobilisation du ligand. Le contrôle quantitatif de cette synthèse comporte la mesure du degré de substitution après chaque étape qui permet d'apprécier le rendement des diverses réactions. Ce paramètre est primordial pour la mise au point d'un gel à efficacité optimale, surtout dans le cas où les récepteurs sont présents à très faible concentration. Dans ce domaine, l'expérimentateur est placé entre deux exigences contradictoires :

□ disposer d'un gel d'affinité de capacité élevée pour adsorber le maximum de récepteur. Ceci suppose un taux de greffage élevé en ligand.



Affi-Gel 10

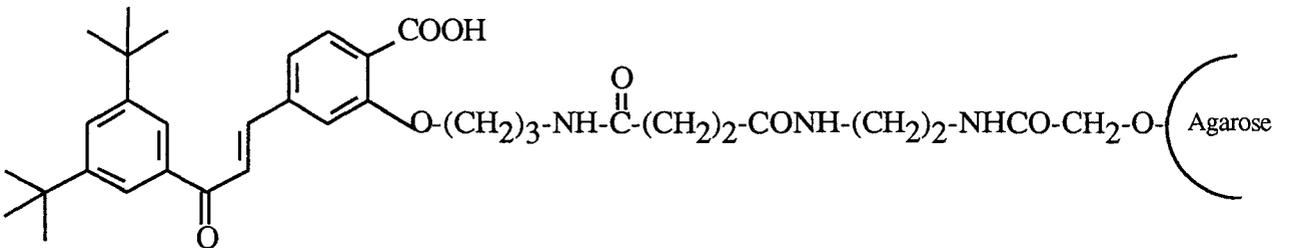
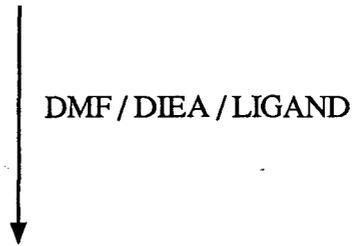


Schéma 6 : Synthèse des gels d'affinité de type Affi-Gel.

□ pouvoir éluer efficacement le récepteur, or une concentration trop élevée peut rendre l'élution impossible (phénomènes de réadsorption).

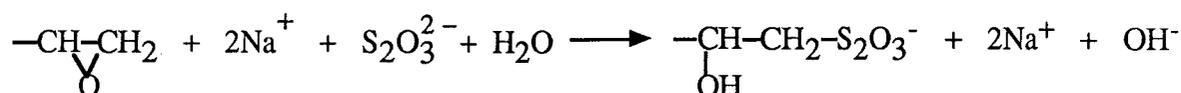
En se basant sur des résultats ultérieurs obtenus au laboratoire (Formstecher et Lustenberger, 1987), nous avons considéré qu'une gamme de concentrations comprises entre 0,1 et 5 $\mu\text{mol} / \text{ml}$ de gel humide permet d'obtenir des gels d'efficacité optimum.

II-3-4-1 - Dosage des fonctions activées présentes sur le gel

Le dosage des esters cyaniques est basé sur la réaction colorimétrique entre ceux-ci et la pyridine en utilisant l'acide barbiturique pour former la coloration (Kohn et Wilchek, 1978). Après filtration et dilution, on effectue le dosage à 588 nm. Les imidocarbonates sont déterminés par hydrolyse à pH 1, conduisant à la formation d'ammoniac, qui est dosé par une méthode colorimétrique utilisant la ninhydrine et l'hydrindantine (Kohn et Wilchek, 1981).

II-3-4-2 - Dosage du bras porté par le gel

En ce qui concerne les gels BrCN, aucune méthode de dosage simple et précise n'a été trouvée afin d'évaluer la quantité de fonction carboxylique greffée. Nous nous sommes donc limité à un dosage différentiel des esters cyaniques avant et après greffage du bras espaceur. Cependant cette méthode est imprécise du fait de la grande instabilité des cyanates. Dans le cas des gels Oxirane, nous avons utilisé une méthode faisant intervenir une réaction entre les cycles oxiranes et le thiosulfate de sodium (Sundberg et Porath, 1974).



La libération des ions OH^- est suivie par titration avec une solution d'acide chlorhydrique 10^{-3}N .

2-3-4-3 - *Dosage du ligand immobilisé*

Il n'existe pas de méthode générale, chaque ligand représente un cas particulier. Dans notre cas, le ligand à greffer présente un pic d'absorption maximum dans l'UV à 305 nm. La mesure de l'absorbance à cette longueur d'onde peut être pratiquée de trois manières :

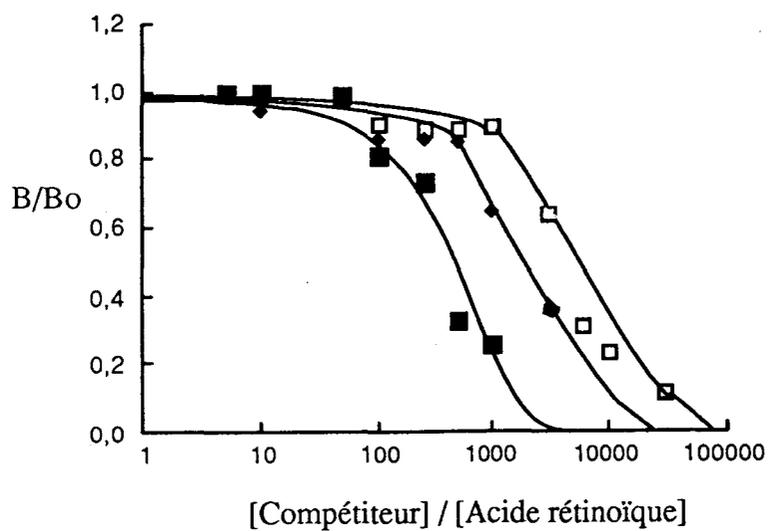
- soit directement sur le gel maintenu en suspension dans du polyéthylène glycol ou du glycérol,
- soit après hydrolyse du gel à chaud et en milieu acide,
- soit en effectuant un dosage différentiel du ligand avant et après couplage dans le surnageant.

Les deux premiers protocoles n'ont pas permis d'obtenir des résultats fiables en raison des interférences apportées par l'agarose lui-même dans le premier cas et par les produits de dégradation de ce dernier dans le deuxième cas, au cours du dosage spectrométrique. La troisième solution a donc été envisagée et a permis d'obtenir de meilleurs résultats. Cependant la proportion de ligand immobilisé est souvent très faible par rapport à l'excès important de ligand mis en oeuvre. L'écart des concentrations mesuré est donc très faible et dans ce contexte, cette technique de dosage ne semble donner qu'une estimation de la proportion de chalcone greffée.

II-3-5 - Mesure de l'affinité du ligand vis à vis des récepteurs RAR α , β et γ

II-3-5-1 - *Principe*

Afin de vérifier que la molécule munie de la chaîne propylamine n'avait pas perdu toute affinité pour le récepteur à purifier, nous avons entrepris de mesurer la constante d'inhibition (K_i) du ligand **12** en utilisant le principe des compétitions. Ce travail, réalisé au sein du laboratoire de P. Formstecher par I. Griller, a été effectué en choisissant comme matériel biologique, les récepteurs recombinants obtenus par l'utilisation du vecteur d'expression baculovirus.



	RAR α	RAR β	RAR γ
Kis μ M	4,5	3,6	1,2

Figure 16 : Etude de la liaison des récepteurs RAR α (\square), β (\blacktriangledown) et γ (\blacksquare) au ligand 12.

Deux procédés sont théoriquement envisageables pour la mesure de K_i . Dans le cas présent, nous avons employé la méthode qui consiste à ajouter des quantités croissantes de rétinol à tester à des aliquotes de nucléosol, en présence d'une concentration constante du ligand de référence radioactif [^3H] CD367. L'incubation est poursuivie jusqu'à l'équilibre.

La mesure de la liaison spécifique du ligand radioactif en l'absence (B_0) et en présence (B) de compétiteur permet d'évaluer le degré de compétition. La représentation graphique B / B_0 en fonction du logarithme de la concentration en compétiteur qui est une sigmoïde, permet de déterminer la valeur I_{50} , concentration en compétiteur entraînant 50% d'inhibition de liaison. Une relation mathématique conduit à K_i , constante d'inhibition (Figure 16).

II-3-5-2 - Résultats

Les constantes K_i du ligand **12** sont théoriquement suffisamment élevées vis à vis des trois récepteurs pour qu'il en résulte une bonne liaison des RARs sur le gel d'affinité (un K_d inférieur à 100 μM est suffisant pour obtenir une rétention correcte; Lowe et Dean, 1974). Cependant cette affinité n'est pas trop élevée et reste bien inférieure (environ 1000 fois) à celle du ligand de référence radioactif utilisé lors de l'élution (K_d CD367 = 5,3 (α), 3,0 (β), 1,3 (γ) nM) (Delescluse *et al.*, 1991). Dans ce cas, l'élution spécifique pourra être obtenue en utilisant des concentrations raisonnables (1 à 10 μM) en ligand soluble.

Comme nous l'avons signalé précédemment, les gels généralement utilisés sont greffés à des taux de 0,1 à 5 μmoles de ligand / ml de gel humide, soit des concentrations de 10^{-4} à $5 \cdot 10^{-3}$ M. Or le ligand immobilisé intervient lors de l'étape d'élution en compétition avec le ligand libre, faisant ainsi chuter le rendement de cette étape.

II-4 - CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE - ISOLEMENT DES RARs

II-4-1 - Mise en oeuvre du gel d'affinité / essais d'adsorption de hRAR α

II-4-1-1 *Principe*

Les différents gels synthétisés ont dans un premier temps été testés en ce qui concerne leur capacité à adsorber spécifiquement hRAR α . En pratique, il s'agit de mettre en contact dans une colonne, une petite quantité de gel d'affinité (200 μ l) et l'extrait contenant le récepteur recombinant. La suspension est agitée à 4°C pendant environ 12 h sur agitateur rotatif. Un aliquote de surnageant est prélevé au temps $t = 0$ et à la fin de l'étape d'adsorption pour mesurer la capacité de liaison du [3 H] CD367 (méthode au charbon-dextran). Ces deux mesures permettent alors d'apprécier par différence la proportion de récepteur adsorbé, et ceci par rapport à la même quantité d'un gel témoin non greffé afin d'éliminer l'adsorption non spécifique. Les extraits ont été incubés avec les trois différents gels d'affinité, en fonction des variables suivantes :

- Variation de la force ionique du tampon d'adsorption
- Variation du volume de l'extrait par rapport au volume de gel
- Variation de la source de récepteur

II-4-1-2 - *Résultats*

Les premiers résultats obtenus avec les 2 premiers types de gels (Tableau 5) se sont révélés assez décevants car : dans presque tous les cas, l'adsorption était très forte (60-80%) même pour le témoin constitué d'un gel CL 4B non greffé et une telle adsorption non spécifique compromettrait fortement nos chances d'obtenir de bons taux de purification, la différence d'adsorption était assez faible (10-20%) par rapport au gel témoin et il n'existait pas de différence notable quelle que soit le système de surexpression du récepteur recombinant utilisé. La chromatographie d'affinité est une méthode de purification très performante mais également très délicate à mettre en oeuvre.

SOURCE DE RECEPTEUR	TYPE DE GEL	[LIGAND] μmol / ml gel	TAUX D'ADSORPTION SPECIFIQUE (%)	FORCE IONIQUE [KCl]	VOL. EXTRAIT / VOL. GEL
<i>E.Coli</i>	BrCN	0,3	19	0,1	5
<i>E.Coli</i>	BrCN	0,3	10	0,1	20
<i>E.Coli</i>	BrCN	0,3	12	0,1	20
<i>E.Coli</i>	Oxirane	1,0	0	0,3	4
baculovirus	BrCN	0,3	0	0,3	5
baculovirus	BrCN	0,3	0	0,3	5
baculovirus	Affi-Gel	5,0	45	0,6	10
baculovirus	Affi-Gel	2,0	30	0,6	10

Tableau 5 : Essais d'adsorption de hRAR α . Il s'agit de mettre en contact dans une colonne, une petite quantité de gel d'affinité (200 μl) et l'extrait contenant le récepteur recombinant. La suspension est agitée à 4°C pendant environ 12 h sur agitateur rotatif. Un aliquote de surnageant est prélevé au temps t = 0 et à la fin de l'étape d'adsorption pour mesurer la capacité de liaison du [³H] CD367 (méthode au charbon-dextran). Ces deux mesures permettent alors d'apprécier par différence la proportion de récepteur adsorbé, et ceci par rapport à la même quantité d'un gel témoin non greffé afin d'éliminer l'adsorption non spécifique. Les extraits ont été incubés avec les trois différents gels d'affinité, en fonction des variables suivantes : variation de la force ionique du tampon d'adsorption, variation du volume de l'extrait par rapport au volume de gel et variation de la source de récepteur.

En effet, nombreux sont les paramètres qui interviennent tant au niveau de l'élaboration du gel d'affinité (choix du support, du bras espaceur, du ligand, quantité de ligand immobilisé...) que de son utilisation (choix du matériel biologique, préparation des extraits cellulaires, détermination des conditions physicochimiques de la purification : pH, force ionique...). La défaillance d'un seul de ces facteurs peut entraîner l'échec complet de cette technique.

Les rendements d'adsorption que nous avons obtenus avec nos gels BrCN les plus "performants" (10-20 %) ne nous permettaient pas d'envisager la purification des récepteurs par cette technique. Les gels Oxirane, quant à eux, n'ont donné aucun résultat positif, peut-être en raison d'une hydrophilie trop élevée. Cependant, ces résultats préliminaires nous ont incité à penser que la mise au point d'un gel d'affinité utilisable pour la purification des récepteurs de l'acide rétinoïque peut être raisonnablement entreprise à condition d'améliorer notablement l'adsorption de la protéine sur le gel (30 à 40 % d'adsorption nous permettait d'entreprendre cette purification). Ceci était logiquement possible en augmentant la quantité de ligand immobilisé. Cependant, nous n'avons pu améliorer nos rendements de couplage en utilisant le Sépharose CL4B. Cette incapacité à augmenter le taux de greffage de nos gels est peut être due, malgré les nombreux essais effectués, au protocole d'activation des gels que nous avons employé. L'utilisation du gel commercial Affi-Gel 10, porteur d'une fonction ester activé à l'extrémité du bras espaceur, nous a donc permis d'augmenter très fortement le taux de fonctionnalisation de nos gels, améliorant ainsi très significativement l'adsorption spécifique du récepteur (Tableau 5). Les essais de purification des RARs qui vont suivre ont été réalisés avec ce dernier support. Ne sachant pas par avance le taux de greffage idéal, nous avons synthétisé un gel peu fonctionnalisé à 2 μmol de ligand / ml de gel et un autre à 5 μmol / ml.

II-4-2 - Purification des récepteurs

Une telle purification peut être réalisée en colonne ou en "batch". Dans la technique en "batch", le gel est mis en suspension dans la totalité de l'extrait cellulaire et

le tout est ensuite agité pendant plusieurs heures. Quelques paramètres peuvent être considérés afin de choisir rationnellement la technique à employer. Généralement l'adsorption dite en "batch" est utilisée lorsque la macromolécule à purifier est (i) présente à faible concentration, (ii) peu stable et (iii) pourvue d'une assez bonne affinité pour le ligand immobilisé (Lowe et Dean, 1974). C'est donc cette seconde méthode que nous avons employée pour purifier les RARs. Enfin, il faut préciser que la grande instabilité des récepteurs nucléaires nous a imposé de réaliser toutes les étapes de purification à une température comprise entre 0 et 4°C.

II-4-2-1 - Adsorption

Un des premiers paramètres à fixer avant de débiter toute manipulation, est la proportion volume d'extrait biologique/volume de gel. Comme l'ont montré nos essais d'adsorption sur des petites quantités de gel, le rendement de cette première étape augmente logiquement lorsque le rapport volume extrait / volume de gel diminue. Ainsi quand ce rapport passe de 5 à 20, l'adsorption spécifique diminue d'une valeur de 20% à une valeur de 10 %. Ce résultat est en faveur d'un rapport volume extrait / volume de gel faible, cependant deux autres critères sont à prendre en considération. D'une part une quantité trop élevée de gel conduira à une élévation des interactions non spécifiques avec l'agarose, ce qui diminuera d'autant les liaisons spécifiques ligand-récepteur entraînant ainsi une diminution du taux de purification. D'autre part un excès de ligand lié à la matrice entraînera vraisemblablement une chute du rendement de l'étape d'élution, car celle-ci dépend de l'efficacité de l'échange entre le ligand lié et le ligand compétiteur en solution. Enfin un troisième élément en faveur d'une quantité plus restreinte de gel vient du fait qu'il devient possible dans ces conditions d'effectuer l'élution avec une faible quantité de tampon et donc de récupérer le récepteur en solution plus concentrée. Ceci est important pour la suite des manipulations comme par exemple l'ultime étape de purification par HPLC ou encore la mise en évidence du récepteur purifié par la technique de Western blot. Nous avons donc fixé notre rapport volume d'extrait / volume de gel à 10 avec un volume de gel d'affinité utilisé compris entre 1 et 2ml. La durée de

l'adsorption doit également être prise en considération. Celle-ci est généralement comprise entre 10 et 15 heures, et nos premières purifications ont été effectuées en respectant cette durée. Cependant, la forte protéolyse observée en fin de purification nous a incité à ramener le temps d'adsorption à 6 heures. Aucune baisse du taux d'adsorption n'a été observée suite à cette modification mais malheureusement la dégradation du récepteur n'a pas non plus varié de manière significative.

L'adsorption a donc été réalisée dans une colonne IBF 11. Un volume de gel préalablement lavé avec 20 volumes d'eau et 20 volumes de tampon 0,6M KCl, pH 8 est mis en contact avec 10 volumes d'extrait cellulaire, et le tout est ensuite placé sur un agitateur rotatif pendant 6 heures à 0-4°C. L'adsorbat (effluent) est alors séparé du gel par filtration et ce dernier est lavé à l'aide de plusieurs solutions tampons. Le taux d'adsorption est calculé en mesurant la différence d'activité de liaison du [³H] CD367 dans l'extrait nucléaire de départ et dans l'effluent (méthode au charbon-dextran).

II-4-2-2 - *Lavage*

Le lavage du gel entre l'adsorption et l'élution est indispensable pour obtenir le produit final avec une bonne pureté. En effet, même lorsqu'une bonne adsorption spécifique est obtenue, la concentration en récepteur reste très faible par rapport à la totalité des autres macromolécules et quelques microgrammes de protéines contaminantes peuvent représenter la principale composante de l'éluat. Comme nous l'avons évoqué précédemment, le gel d'affinité donne lieu à des interactions non-spécifiques non négligeables et les lavages successifs en faible ou forte force ionique ont pour but de décrocher les protéines retenues non spécifiquement. Dans le cas des récepteurs de l'acide rétinoïque, nous avons utilisé la séquence suivante : 1 lavage avec le tampon d'adsorption (0,6 M KCl, 30 volumes), 1 lavage avec un tampon de faible force ionique (sans KCl, 30 volumes), 1 lavage en haute force ionique (1 M KCl, 30 volumes), et enfin 1 lavage avec le tampon d'élution (0,3 M KCl, 30 volumes) qui permet également de revenir à la force ionique utilisée pour l'élution. Les différentes fractions de lavage sont alors conservées à 0 - 4°C pour le dosage du récepteur.

II-4-2-3 - Elution

L'élution biospécifique, utilisant un rétinol tritié possédant une forte affinité pour les récepteurs, a été employée dans toutes nos purifications. L'acide rétinol tritié ou le CD367 tritié ont été utilisés, cependant la grande stabilité et la forte affinité du CD367 pour les 3 RARs font de cette molécule un des meilleurs ligands à utiliser pour l'élution des récepteurs. Le coût élevé de ces molécules radioactives nous a d'autre part incité à effectuer des dilutions isotopiques. Ainsi le ligand d'élution a généralement été utilisé à une concentration de 20 μ M dans 2 à 3 volumes de tampon d'élution, avec une dilution isotopique au 20^{ème} à l'aide de CD367 froid.

II-4-2-4 - Résultats

Les résultats de purification des trois récepteurs sont résumés dans le Tableau 6. Le nouveau gel biospécifique que nous avons synthétisé nous a permis de purifier partiellement les trois récepteurs de l'acide rétinol avec des rendements (2-49%) et des taux de purification (65-94 fois) variables pour chacun des RARs.

	Activité de liaison totale pmoles	Activité de liaison pmoles/ml	Activité de liaison spécifique pmoles/mg	Taux de purifi- cation	Rendement (%)
Extrait cellulaire brut	260 (1)	26	6.5	1	100
	320 (2)	40	16		
	1905 (3)	119	6.6		
Effluent	45 (1)	4.8	1.4	---	17
	12 (2)	1.8	0.8		4
	691 (3)	43.2	3.3		36
Eluat	54 (1)	18	429	65	20
	157 (2)	45	1500	94	49
	44.2 (3)	19.2	480	73	2.3

Tableau 6 : Résultats de purification des RARs par chromatographie d'affinité.

(1) : RAR α ; (2) : RAR β ; (3) : RAR γ .

Les purifications ont été effectuées à pH8 et à une concentration en KCl égale à 0,6 M (pour l'adsorption). Le pH et la force ionique sont deux paramètres importants. En effet, Shudo et collaborateurs ont rapporté une diminution significative de l'adsorption spécifique quand le pH était ajusté à 7,2 et une récupération quantitative des RARs dans l'effluent à pH 6,8 (Shudo *et al.*, 1988). D'autre part, lors d'un essai de purification de hRAR α exprimé dans *E.Coli*, nous avons constaté une très forte baisse du taux d'adsorption. Or le tampon d'extraction des récepteurs dans le cas où ces derniers sont produits dans *E.Coli*, possède une force ionique de 0,1 M KCl. Un nouvel essai de purification de ce récepteur a donc été tenté en ajustant la concentration saline de l'extrait bactérien à 0,6 M KCl, et le résultat obtenu a été la restauration d'un taux d'adsorption "normal" d'environ 70 %. La grande sensibilité du rendement d'adsorption à toute variation de ces deux paramètres (pH et force ionique) suggère qu'il existe des interactions ioniques (groupement COOH des rétinoïdes) et hydrophobes (groupements tertio-butyle) entre le rétinoïde et les RARs. La perte de récepteur lors des lavages a été très faible (5 à 10 %), même avec un lavage en forte force ionique (1 M KCl). Celui-ci s'est d'ailleurs révélé tout à fait indispensable pour obtenir un lavage efficace. Le rendement d'élution est un paramètre crucial lors d'une purification par chromatographie d'affinité. Si l'efficacité d'adsorption des trois récepteurs est à peu près équivalente, il n'en va pas de même en ce qui concerne l'élution. Les différences que nous avons obtenues suivant le type de récepteur peuvent être en partie expliquées par leur différence d'affinité vis à vis du ligand. En effet, le rendement d'élution dépend de l'efficacité de l'échange entre le ligand lié et le ligand libre, et cette efficacité varie d'un récepteur à l'autre. Lors des essais de purification de RAR α et RAR β , nous avons utilisé un gel greffé à 5 μ moles de ligand / ml de gel. Mais, pour RAR γ qui possède la plus grande affinité pour la chalcone, l'emploi de ce gel ne nous a pas permis de récupérer le récepteur purifié, en raison d'une élution très faible. Nous avons ensuite utilisé un gel à 2 μ moles / ml, afin d'améliorer le rendement d'élution tout en conservant un taux d'adsorption acceptable. Cependant, malgré une adsorption satisfaisante, nous avons observé un taux d'élution encore très faible pour ce troisième récepteur.

Le choix de la concentration en ligand fixé sur le support est donc essentiel pour l'obtention d'un bon rendement global de purification. L'association de ce nouveau gel d'affinité et du système de surexpression baculovirus a permis l'obtention de ces trois récepteurs avec une pureté 8 à 25 fois supérieure à celle décrite précédemment par l'équipe de Shudo (Kagechika *et al.*, 1988). Cependant, même dans le meilleur des cas, la chromatographie d'affinité est incapable de fournir une protéine complètement purifiée et une étape supplémentaire de purification est nécessaire pour atteindre une homogénéité complète. La pureté théorique de nos éluats estimée à partir des intensités des bandes obtenues en électrophorèse était comprise entre 40 et 60 % (Figures 17,18 et 19). La Figure 20 présente l'électrophorèse en PAGE-SDS de hRAR α produit dans *E.Coli* à différents stades de sa purification.

II-4-3 - Ultime étape de purification et caractérisation des RARs purifiés

Malgré l'instabilité bien connue des complexes ligand - protéine purifiés et la difficulté de manipuler des solutions très diluées, une étape supplémentaire de purification était nécessaire. Deux techniques conventionnelles, la chromatographie d'échange d'ions et la chromatographie d'exclusion de taille à haute performance ont été utilisées pour compléter la purification des récepteurs. Ces méthodes permettent généralement d'obtenir des taux de purification de 5 à 50 fois avec des rendements de 90 %. Les éluats obtenus après chromatographie d'affinité ont été injectés (environ 0,7ml) et des fractions de 1ml ont été collectées et soumises à une mesure de radioactivité. Dans tous les cas, un pic unique de radioactivité [^3H] CD367 - RAR a été observé (Figures 21 et 22). Cependant, les rendements obtenus ont été très faibles (5 - 10 %). Afin d'établir le degré de pureté après HPLC, les fractions contenant de la radioactivité ont été rassemblées, concentrées par ultrafiltration (30kDa) et des échantillons (100-150 μl) ont été analysés en électrophorèse puis caractérisés par la technique de Western-blot (détection d'une protéine particulière à l'aide d'un anticorps). Dans la majorité des cas, nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence du récepteur dans les extraits purifiés.

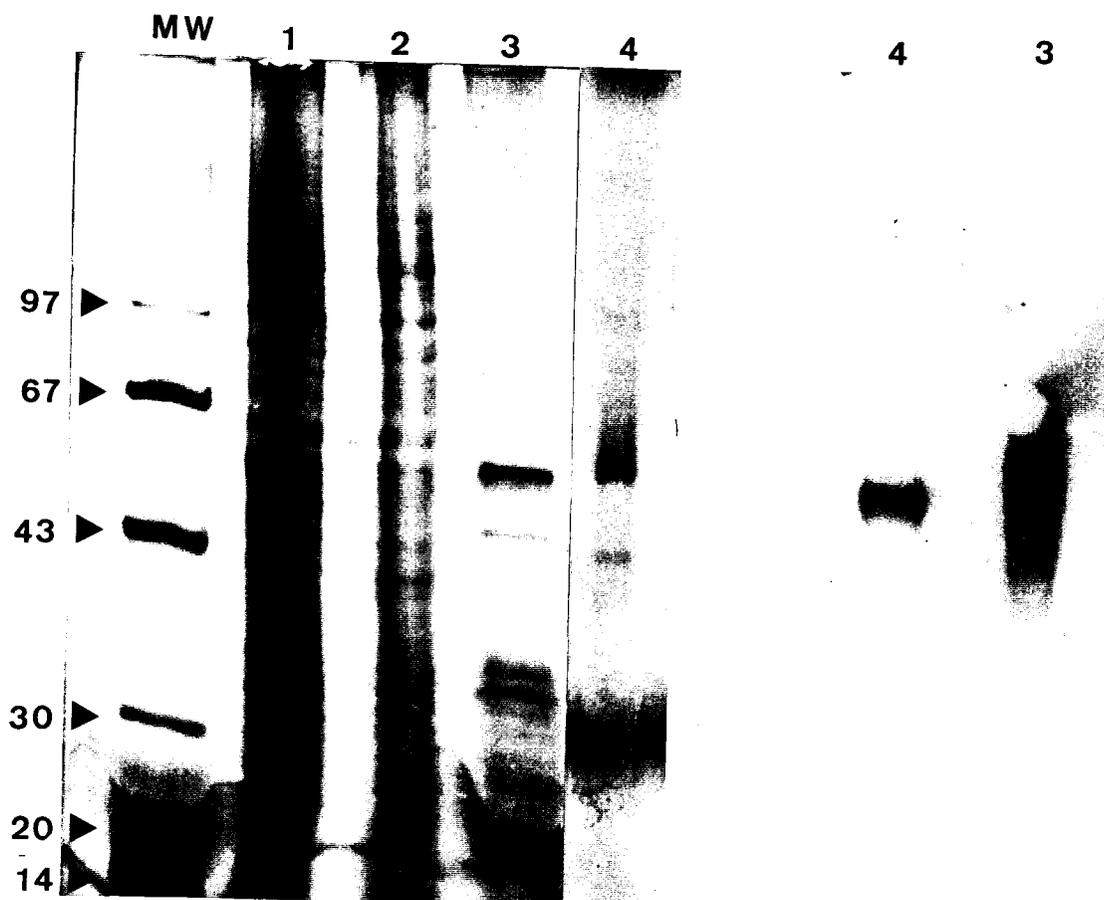


Figure 17 : a) Analyse par électrophorèse en PAGE-SDS des extraits nucléaires hRAR α produits dans le système d'expression baculovirus à différents stades de leur purification (Coloration à l'argent). Ligne (1) : Extrait nucléaire brut (1 μ l). Ligne (2) : Effluent (2 μ l). Ligne (3) : Eluat (50 μ l). Ligne (4) : Eluat après HPLC d'échange d'ions (100 μ l). MW : Témoins de masse moléculaire. b) Analyse des éluats par la technique de western-blot (Révélation par chimioluminescence). Ligne (3) : Eluat (50 μ l). Ligne (4) : Eluat après HPLC d'échange d'ions (100 μ l).

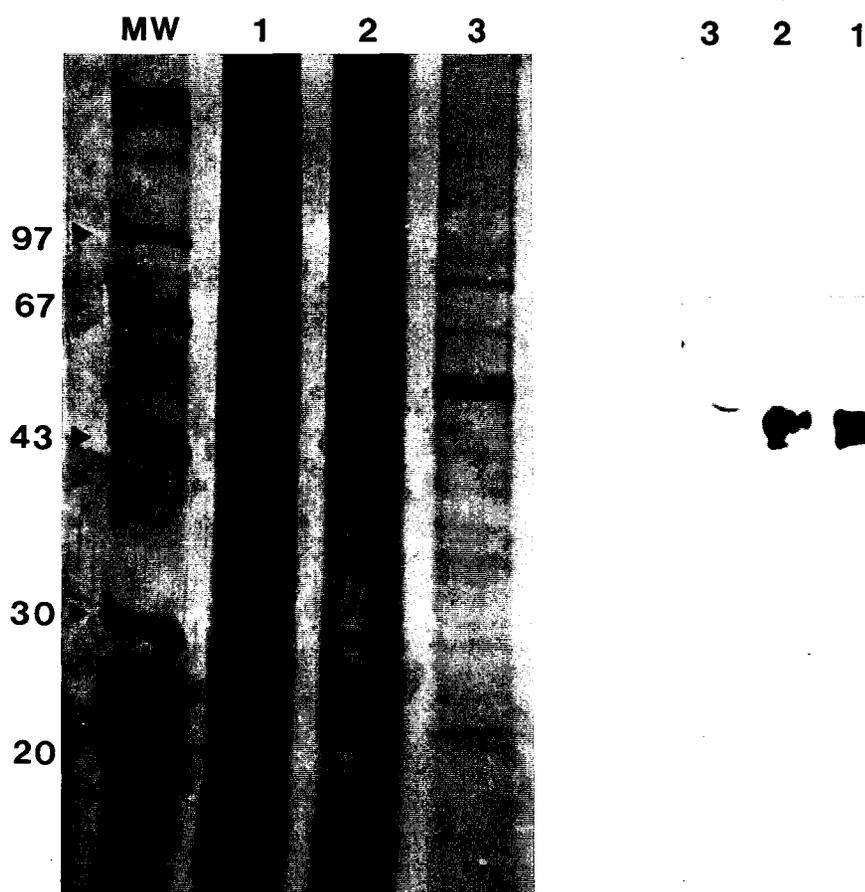


Figure 18 : a) Analyse par électrophorèse en PAGE-SDS des extraits nucléaires hRAR β produits dans le système d'expression baculovirus à différents stades de leur purification (Coloration à l'argent). Ligne (1) : Extrait nucléaire brut (1 μ l). Ligne (2) : Effluent (2 μ l). Ligne (3) : Eluat (50 μ l). MW : Témoins de masse moléculaire. b) Analyse par la technique de western-blot (Révélation par chimioluminescence). Ligne (1) : Extrait nucléaire brut (2 μ l). Ligne (2) : Effluent (4 μ l). Ligne (3) : Eluat (50 μ l).

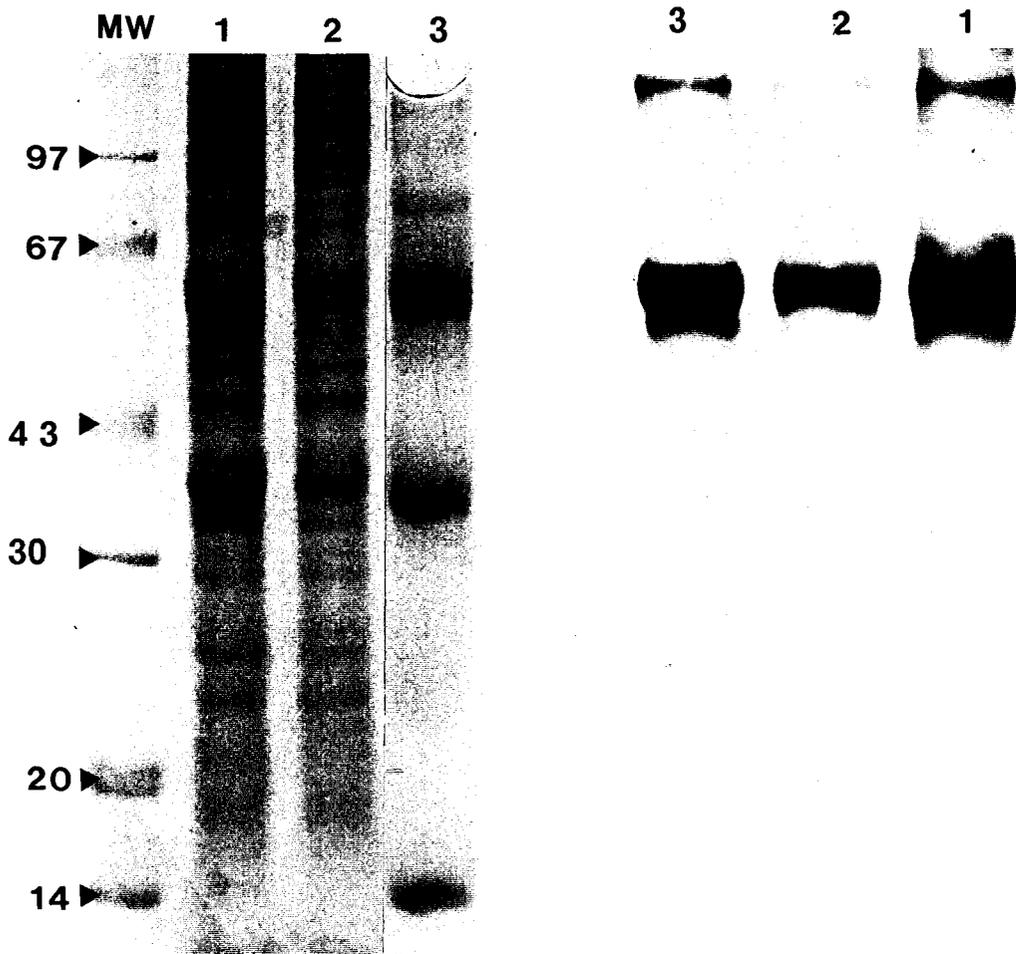


Figure 19 : a) Analyse par électrophorèse en PAGE-SDS des extraits nucléaires hRAR γ produits dans le système d'expression baculovirus à différents stades de leur purification (Coloration au bleu Coomassie). Avant d'être déposés, les éluats sont concentrés 10 fois par ultrafiltration (30kDa). Ligne (1) : Extrait nucléaire brut (1 μ l). Ligne (2) : Effluent (2 μ l). Ligne (3) : Eluat (50 μ l). MW : Témoins de masse moléculaire. b) Analyse par la technique de western-blot (Coloration classique). Avant d'être déposés, les éluats sont concentrés 10 fois par ultrafiltration (30 kDa). Ligne (1) : Extrait nucléaire brut (2 μ l). Ligne (2) : Effluent (4 μ l). Ligne (3) : Eluat (50 μ l).

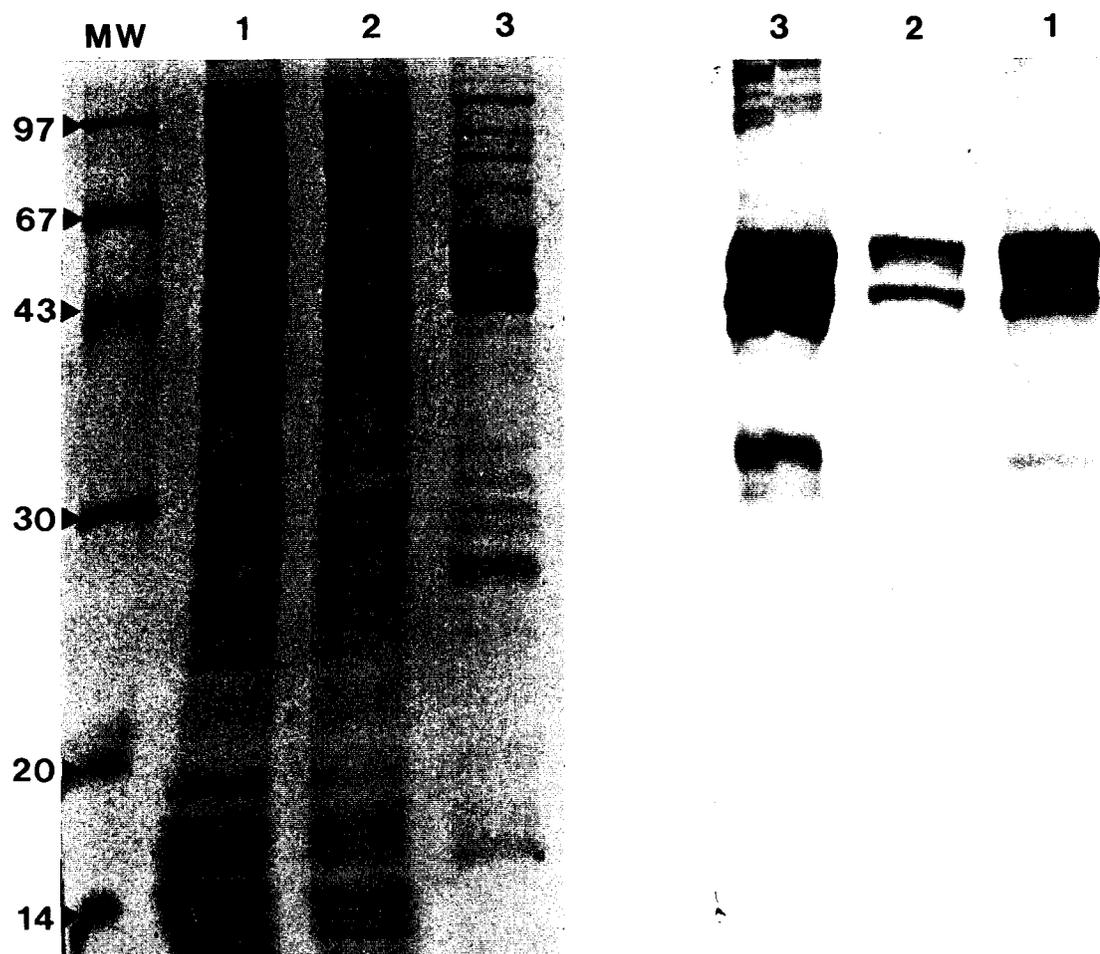


Figure 20 : a) Analyse par électrophorèse en PAGE-SDS des extraits nucléaires hRAR α produits dans *E. Coli* à différents stades de leur purification (Coloration au bleu coomassie). Avant d'être déposés, les éluats sont concentrés 10 fois par ultrafiltration (30 kDa). Ligne (1) : Extrait nucléaire brut (1 μ l). Ligne (2) : Effluent (2 μ l). Ligne (3) : Eluat (50 μ l). MW : Témoins de masse moléculaire. b) Analyse par la technique de western-blot (coloration classique). Avant d'être déposés, les éluats sont concentrés 10 fois par ultrafiltration (30 kDa). Ligne (1) : Extrait nucléaire brut (2 μ l). Ligne (2) : Effluent (4 μ l). Ligne (3) : Eluat (50 μ l).

Ceci est en partie explicable par les très faibles quantités de RARs récupérées à la sortie des HPLC. En outre, ces protéines sont obtenues en solution très diluée (environ 1 pmole / ml), ce qui impose de concentrer les extraits avant de les analyser en électrophorèse. Malheureusement, l'utilisation de l'ultrafiltration pour des solutions très diluées est peu recommandée car il en résulte généralement une forte perte de matériel biologique par adsorption sur la membrane. Le seul résultat positif a été obtenu en employant la chromatographie d'échange d'ion haute performance en dernière étape de purification de hRAR α (Figure 17). De plus, les méthodes de coloration des gels de polyacrylamide (coloration à l'argent ou au bleu coomassie) ont une sensibilité qui ne permet pas de repérer d'aussi faibles quantités de récepteur (dépôt maximum de 100-150 μ l soit 0,1 pmole). Les faibles rendements des HPLC nous ont cependant surpris. Connaissant l'instabilité des protéines purifiées en solution très diluée, nous avons émis l'hypothèse que ces problèmes ne venaient pas des techniques employées, mais plutôt de la fragilité des récepteurs qui pouvaient relâcher très rapidement leur ligand radioactif au cours de l'HPLC. Cette hypothèse a été validée, en effectuant une expérience permettant d'évaluer la vitesse de dissociation du complexe [3 H] CD367 - RAR purifié. Des échantillons d'éluats obtenus après chromatographie d'affinité (élution avec [3 H] CD367 au 1/20e) sont dilués au 1/5 ou au 1/10 et sont incubés avec du charbon à 3 % afin d'éliminer le CD367 en excès. Après centrifugation, les surnageants contenant le complexe ligand - RAR sont incubés avec un large excès (100 fois) de CD367 froid. Puis, en fonction du temps, on prélève un échantillon afin de mesurer la radioactivité associée [3 H] CD367 - RAR. La Figure 23 montre clairement que la liaison spécifique [3 H] CD367 - RAR décroît très rapidement lorsque l'on rompt l'équilibre en mettant le complexe en présence d'un large excès de ligand froid qui entre alors en compétition avec le [3 H] CD367. Au bout de quelques minutes, la radioactivité se stabilise lorsque l'on atteint la liaison non spécifique du [3 H] CD367. Cette expérience permet de ne mesurer que la vitesse de dissociation du complexe, sans tenir compte de sa réassociation. Il devient alors possible d'évaluer la durée de demie-vie du complexe CD367 - RAR à quelques minutes (environ 5 min.).

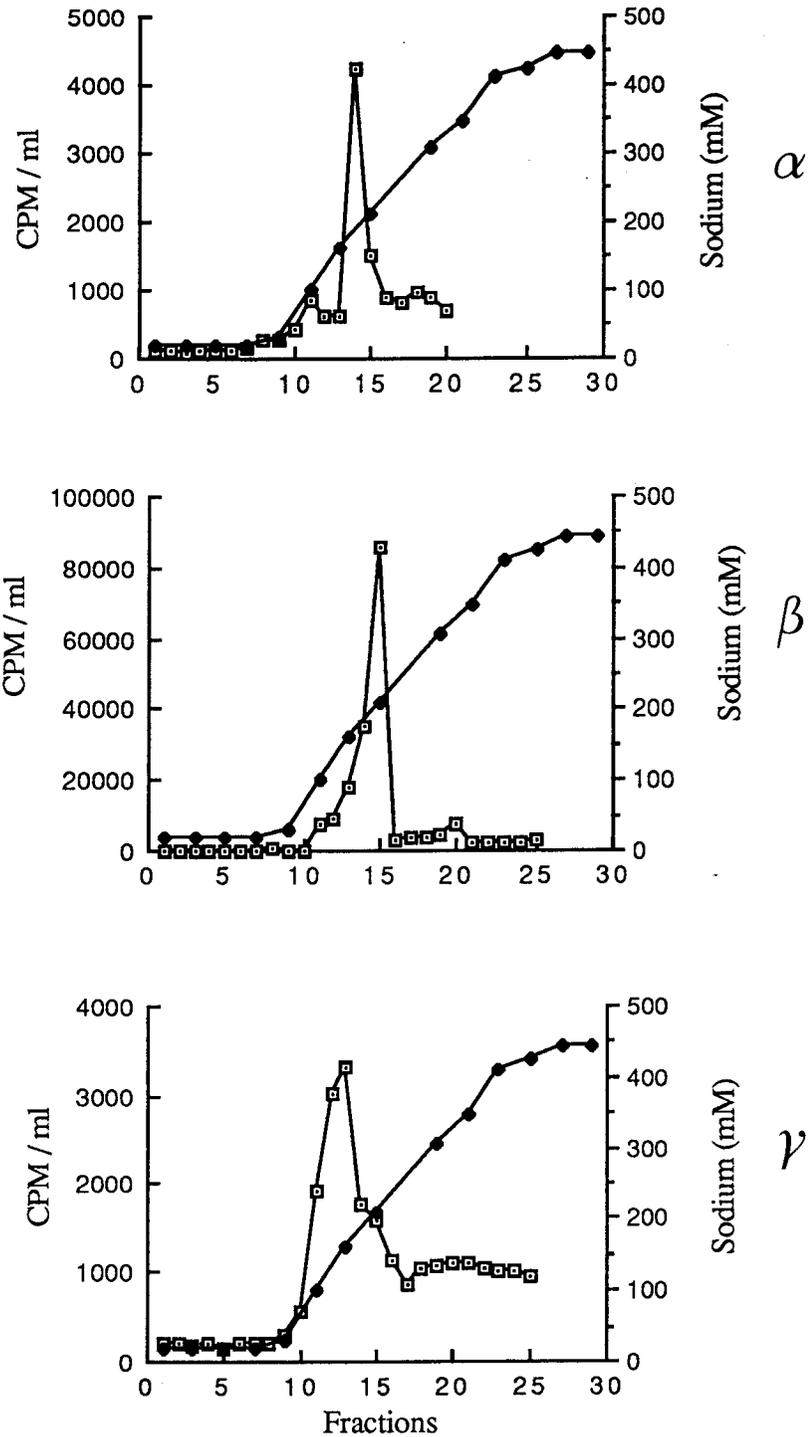


Figure 21 : Chromatographie d'échange d'ions en HPLC des complexes hRAR α - CD367, hRAR β - CD367 et hRAR γ - CD367 sur colonne Pharmacia Mono Q HR 5/5. Les diagrammes représentent les profils d'élution (\square) obtenus après injection de 0,7ml d'éluat ramené à une force ionique de 30mM KCl. Les éluations sont réalisées à un débit de 0,5ml.min⁻¹ et à 0 - 4°C, avec un gradient en KCl (\blacklozenge) de 45 min. Des fractions de 1 minute sont collectées et mesurées en radioactivité.

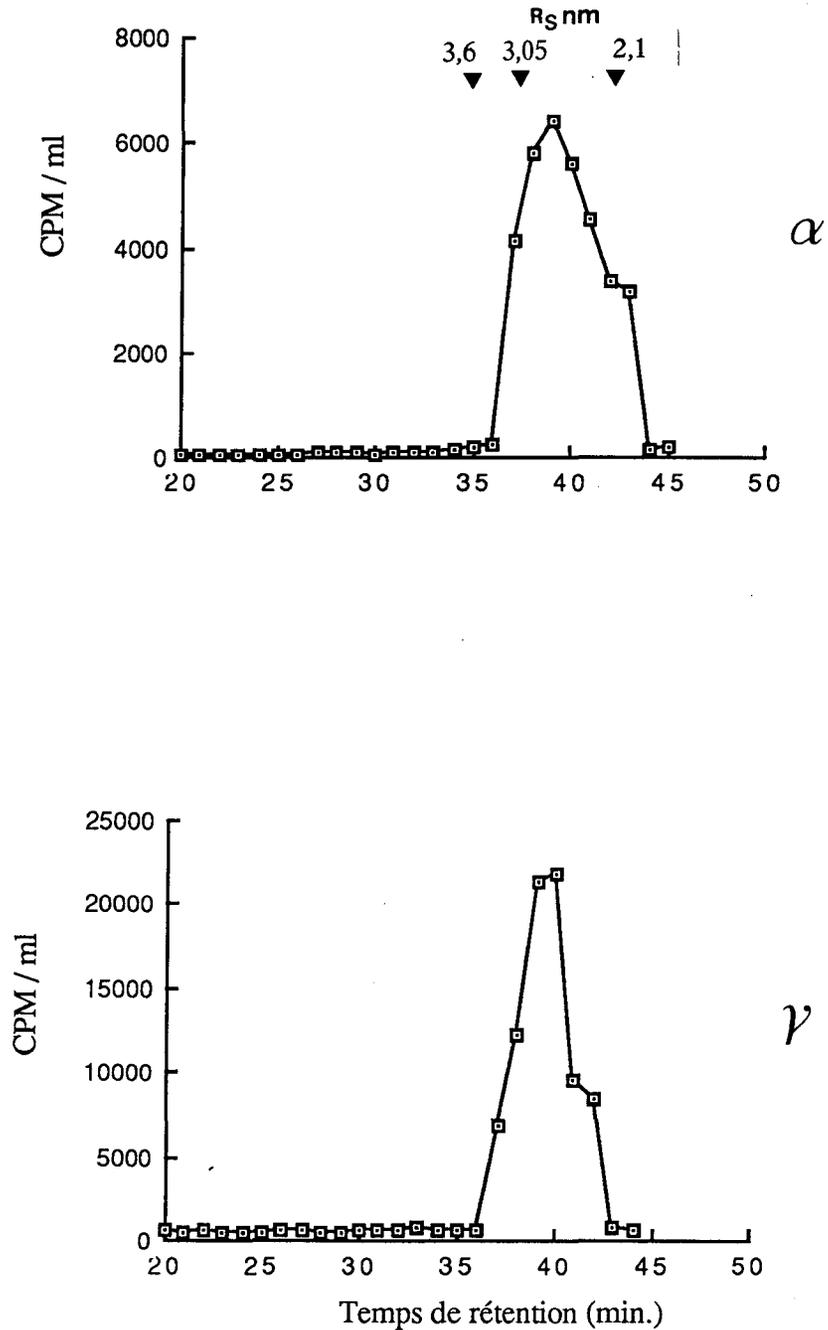


Figure 22 : Chromatographie d'exclusion de taille en HPLC des complexes hRAR α - CD367, hRAR β - CD367 et hRAR γ - CD367 sur colonne TSK 3000SW. Des échantillons de 3ml d'éluats obtenus après chromatographie d'affinité, sont injectés dans la colonne. Les éluations sont réalisées en tampon 0,3 M KCl à un débit de 0,5ml.min⁻¹ et à 0 - 4°C. Des fractions de 1ml sont collectées et soumises à une mesure de radioactivité avec un compteur à scintillation LKB1214. Les flèches (\blacktriangledown) indiquent l'éluution des protéines standards avec leur rayon de stockes en nanomètres.

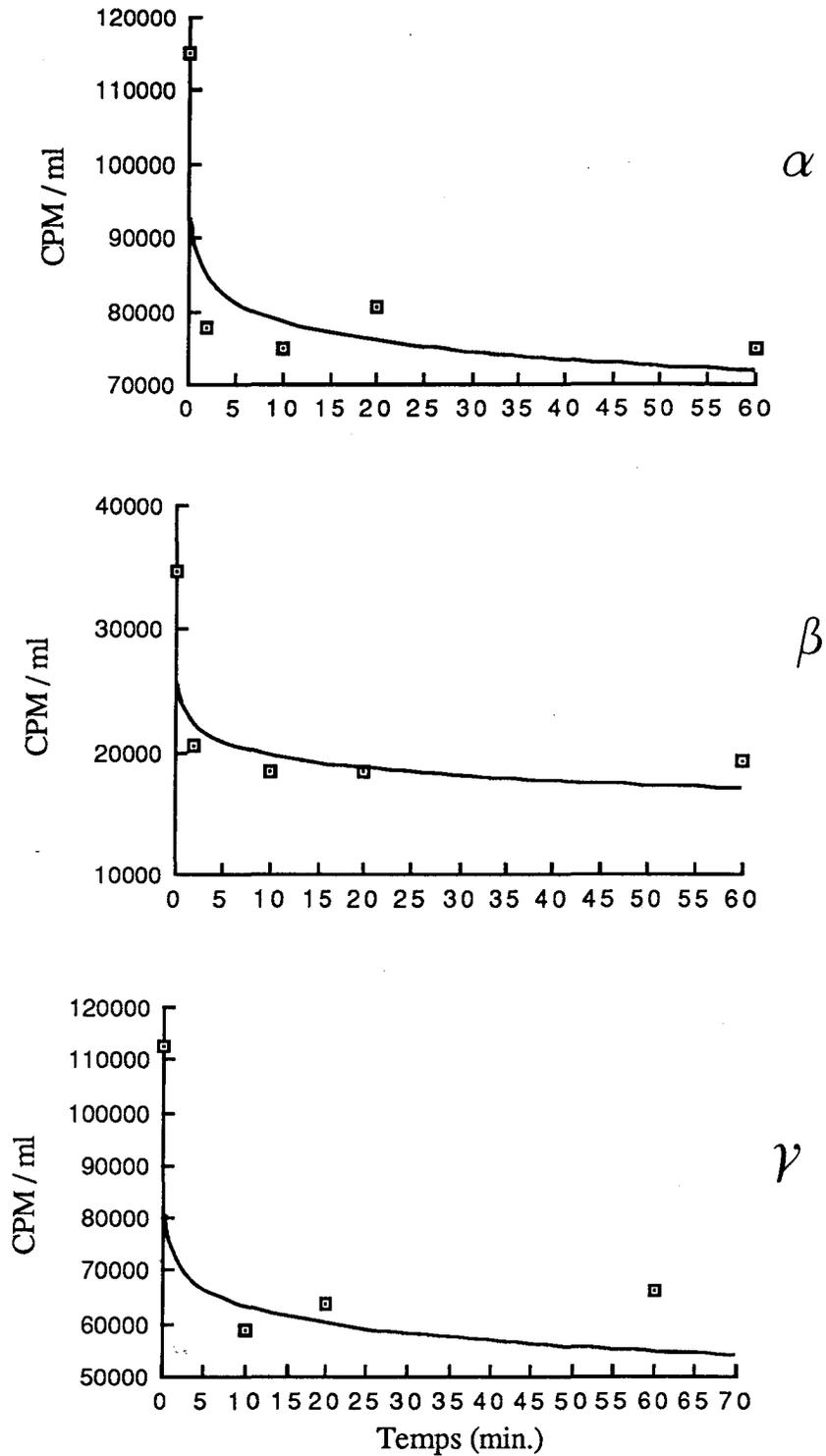


Figure 23 : Etude du temps de demie-vie des complexes hRAR α - CD367, hRAR β - CD367 et hRAR γ - CD367 purifiés. Des échantillons d'éluats obtenus après chromatographie d'affinité (élution avec [3 H] CD367 au 1/20e) sont dilués au 1/5 ou au 1/10 et sont incubés avec du charbon à 3 % afin d'éliminer le CD367 en excès. Après centrifugation, les surnageants contenant le complexe ligand - RAR sont incubés avec un large excès (100 fois) de CD367 froid. Puis, en fonction du temps, on prélève un échantillon afin de mesurer la radioactivité associée [3 H] CD367.

Ainsi la vitesse de dissociation du récepteur purifié est très rapide et nos difficultés à caractériser ce dernier pourraient venir de la perte très rapide du ligand radioactif.

Ce phénomène à une nouvelle fois été mis en évidence lors de la détermination de la masse moléculaire des RARs purifiés par ultracentrifugation en gradient de saccharose et chromatographie d'exclusion de taille haute performance. L'association de ces deux techniques permet une mesure indirecte de la masse moléculaire des protéines. En effet, celle-ci est directement proportionnelle au rayon de stockes de la protéine (R_s) que l'on détermine par chromatographie d'exclusion de taille et a sa constante de sédimentation dans un gradient de saccharose (S) que l'on mesure par ultracentrifugation.

$$M = f (R_s, S)$$

La mesure du coefficient de sédimentation est pratiqué comme suit. Les protéines standard et les protéines étudiées (après incubation avec leur ligand radioactif, ici du [^3H] CD367), sont disposées à la surface d'un gradient continu de 5 à 20 % de saccharose dans un tube de plastique et centrifugées 15 heures à 55000 tr / min.. Une petite ouverture est alors pratiquée dans le bas du tube et on recueille des fractions de 0,18 ml que l'on soumet ensuite à une mesure de radioactivité. L'utilisation du ligand radioactif à haute affinité pour les RARs permet de repérer les complexes RAR-Ligand radiomarqués. On détermine ainsi la position relative des protéines dans le gradient.

Une nouvelle fois, nous avons malheureusement constaté l'instabilité remarquable des complexes RAR - CD367 purifiés (Figure 24). En effet, au lieu d'obtenir un pic de radioactivité correspondant au complexe ligand-récepteur, nous avons obtenu pour les trois récepteurs purifiés une élévation continue de la radioactivité. Ceci est le reflet de la perte du ligand au cours de la centrifugation. Ainsi, la vitesse de dissociation étant très rapide et la réassociation difficile voire

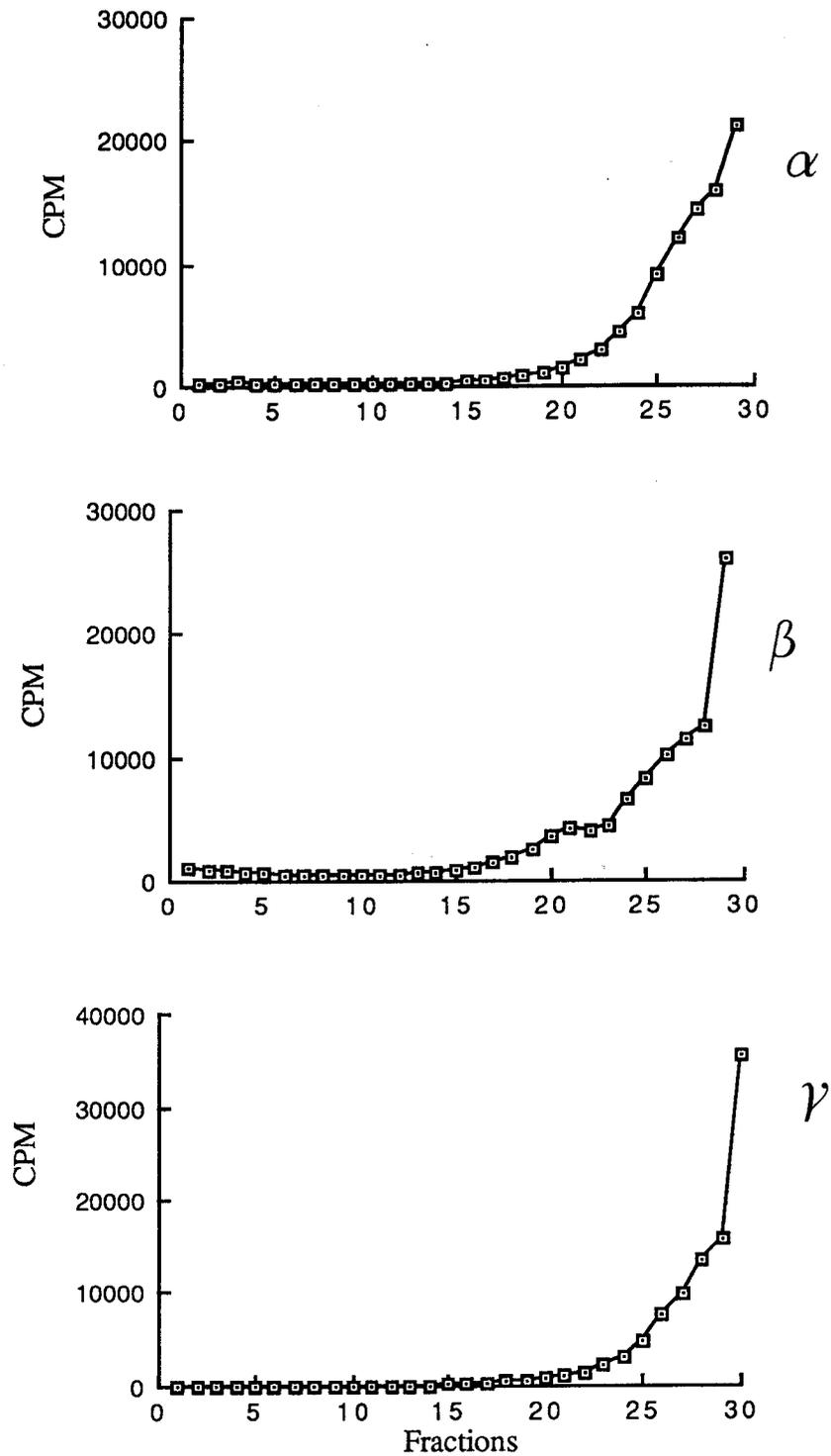


Figure 24 : Analyse par ultracentrifugation en gradient de sucrose des complexes hRAR α - CD367, hRAR β - CD367 et hRAR γ - CD367. La mesure du coefficient de sédimentation des complexes est effectuée en les soumettant à une ultracentrifugation en gradient de saccharose (5 - 20 %). Un échantillon de l'éluat (0,2ml) est disposé sur le gradient et après centrifugation de 16 heures à 55000tr/min, des fractions de 0,18ml sont collectées et soumises à une mesure de radioactivité.

impossible lors des techniques utilisées (HPLC, ultracentrifugation), il en résulte une diminution importante de la radioactivité associée à la fin des expériences.

II-4-4 - Retard sur gel

La chromatographie d'affinité permet théoriquement d'isoler des macromolécules tout en leur conservant leur aspect fonctionnel. Pour un régulateur de la transcription dépendant d'un ligand tel que le RAR, les fonctions les plus importantes sont bien sûr la capacité de liaison du rétinol, mais également la liaison à l'ADN. Cette dernière caractéristique peut être étudiée par la technique du retard sur gel.

II-4-4-1 - *Principe*

Le retard sur gel est une technique utilisée pour mettre en évidence l'interaction de macromolécules avec un fragment d'ADN. Le principe en est le suivant : un fragment d'ADN contenant l'élément de réponse de l'acide rétinol est marqué radioactivement par l'isotope ^{32}P du phosphore. La migration électrophorétique de cet oligonucléotide dans un gel de polyacrylamide s'opère de la cathode vers l'anode ; en effet l'ADN a une charge globale négative grâce à la fonction acide libre des liaisons phosphodiester. Lorsque l'oligonucléotide est complexé avec une macromolécule, le rapport charge/masse du complexe est différent de celui de l'oligonucléotide seul et retarde la migration au travers du réseau de polyacrylamide. Après migration, l'autoradiographie du gel fera apparaître une tache de radioactivité retardée qui indique que la macromolécule est affine pour l'oligonucléotide.

II-4-4-2 - *Résultats*

L'autoradiogramme du gel présenté sur la Figure 25 montre clairement que hRAR α partiellement purifié par chromatographie d'affinité (50 % d'homogénéité), est incapable de se lier à l'ADN (ligne 4). Cependant, l'activité de liaison à l'ADN est restaurée lorsque la même préparation de hRAR α est incubée avec un extrait de cellules SF9 non infectées (extrait Mock) avant la mise en contact avec l'ADN (lignes 5, 6, 7 et

8). Ce résultat suggère donc que l'activité de liaison RAR - RARE nécessite la présence d'une ou de plusieurs protéines, absentes dans les extraits purifiés. Cette observation est en accord avec une publication récente (Leid *et al.*, 1992) qui identifie RXR β comme un cofacteur indispensable pour qu'il y ait une forte affinité des RARs vis à vis de leurs éléments de réponse. De plus, cette même publication relate la présence dans les cellules SF9 non infectées, d'un homologue des RXRs. Cependant, la nature exacte de ce cofacteur dans les cellules d'insectes reste à établir. On peut donc conclure que le récepteur purifié par chromatographie d'affinité reste fonctionnel tant du point de vue de sa capacité de liaison à l'ADN qu'au ligand. Cependant les RARs purifiés sont grandement fragilisés et leur caractérisation devient beaucoup plus difficile que celle des RARs natifs.

MOCK	0	0	20	0	19	17.5	15	10	5	0
PURIF.	0	0	0	20	1	2.5	5	10	15	0
CRUDE	0	2	0	0	0	0	0	0	0	10

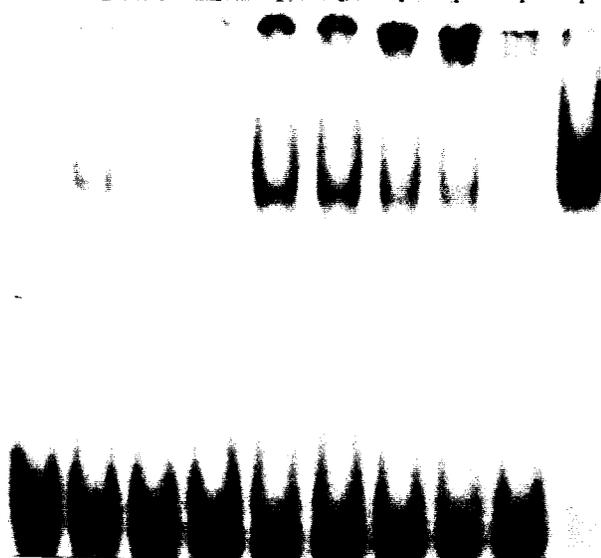


Figure 25 : Etude de l'activité de liaison de hRAR α purifié à l'ADN par gel retard. Les extraits nucléaires des cellules SF9 non infectées (3,4mg de protéines / ml) (extraits mock) sont mélangés avec les extraits hRAR α partiellement purifiés (40 μ g/ml) et incubés à 30°C pendant 20 min. Les extraits nucléaires reconstitués sont alors mis en présence d'un oligonucléotide marqué au 32 p contenant l'élément de réponse RARE β . Après incubation pendant 45 min. Dans la glace, les complexes protéines-ADN sont séparés sur gel de polyacrylamide 5 % non dénaturant. Ensuite, les gels sont séchés et autoradiographiés à -70°C.

III - CONCLUSION

La chromatographie d'affinité est une technique qui complète efficacement les méthodes de fractionnement classiques. En une seule étape de purification, cette technique nous a permis d'obtenir les récepteurs de l'acide rétinoïque avec un degré de pureté allant de 40 à 60% suivant le RAR étudié. L'association de la chromatographie biospécifique avec la chromatographie liquide haute performance nous a en outre permis de purifier hRAR α à proximité de l'homogénéité (environ 90% de pureté). Cependant, la grande instabilité des complexes RAR-rétinoïde purifiés semble être un facteur limitant rendant la caractérisation de ces derniers assez difficile.

Pourtant, la purification complète, ainsi que la caractérisation des RARs purifiés semble possible à condition de travailler avec des quantités plus importantes de matériel biologique. Cela implique de disposer du matériel adapté notamment pour la culture bactérienne ou cellulaire, mais également du ligand radioactif utilisé pour l'élution en quantité suffisante.

CHAPITRE III

RECHERCHE DE NOUVEAUX ANTIRETINOIDES

I - PRESENTATION

Les rétinoïdes de synthèse, bien qu'assez éloignés d'un point de vue structural de l'acide rétinoïque, présentent les éléments indispensables pour interagir avec le site de liaison des RARs : un pôle hydrophobe, un tenseur et une fonction carboxylique libre. De telles molécules peuvent reproduire les effets de l'acide rétinoïque qu'elles remplacent : il s'agit alors de molécules agonistes. De nombreuses molécules de ce type ont été décrites. Au contraire, d'autres substances peuvent induire une conformation inactive du récepteur et ne pas entraîner d'effet. Le site de fixation du récepteur étant occupé, l'acide rétinoïque lui-même ne peut pas agir et son action est donc inhibée. Ces substances sont dites antagonistes ou antirétinoïdes. Généralement ces molécules ont des effets incomplets et on parle alors d'agonistes ou d'antagonistes partiels. Le cas des antigluco-corticoïdes est assez bien documenté et le mécanisme d'action possible de ces molécules est basé sur une vitesse de dissociation assez lente par rapport aux agonistes.

D'un point de vue fondamental, de tels antagonistes présentent un intérêt évident comme sonde pharmacologique, utilisable dans l'étude des récepteurs de l'acide rétinoïque et de leurs fonctions. En effet, la complexité des systèmes de transcription dépendant des rétinoïdes peut être disséquée par l'utilisation soit d'agonistes soit d'antagonistes sélectifs agissant exclusivement ou préférentiellement sur un récepteur donné. Quelques molécules possédant un bon degré de spécificité ont très récemment été décrites (voir chapitre I). Des antagonistes spécifiques tels que le Ro 41-5253 (Figure 8) devraient également avoir un intérêt thérapeutique non négligeable en permettant de contrôler la forte toxicité des rétinoïdes utilisés en dermatologie et en cancérologie en diminuant ou en éliminant certains effets indésirables de ces molécules.

De notre côté, nous avons tenté d'élaborer de nouveaux antirétinoïdes en nous basant sur deux hypothèses fondées sur la présence éventuelle d'une poche hydrophobe située au sein du domaine E des récepteurs de l'acide rétinoïque.

II - PREMIERE HYPOTHESE DE TRAVAIL

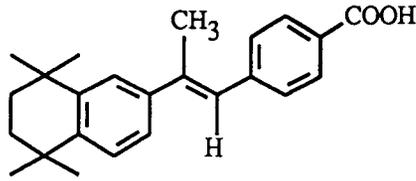
II-1 - PRINCIPE

Dans un précédent chapitre, traitant des différents récepteurs de l'acide rétinoïque, nous avons évoqué un rapprochement structural de ces derniers avec les autres familles de récepteurs nucléaires. Dans le cadre de notre recherche d'antirétinoïdes, nous avons développé cette analogie au niveau des ligands de synthèse. Pour cela, nous nous sommes inspirés de l'exemple des antihormones stéroïdes et en particulier, des antiestrogènes. Les analogies entre la famille des estrogènes et celle des rétinoïdes sont les suivantes : (i) mode d'action (liaison à un récepteur nucléaire), (ii) structure des récepteurs et (iii) structure de certains ligands de synthèse.

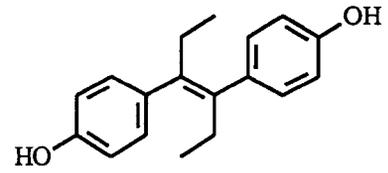
En effet, un des rétinoïdes de synthèse les plus puissants, le TTNPB (Loeliger *et al.*, 1980), présente une structure générale assez similaire à celle du diéthylstilbestrol (DES : estrogène de synthèse) dont certains analogues triphénylés sont des antiestrogènes très puissants (Figure 26). De nombreux antiestrogènes non stéroïdiens de type triaryléthylène ont été testés pour leur capacité à inhiber les tumeurs mammaires et un de ces composés, le Tamoxifène (Harper et Walpole, 1966) est maintenant utilisé en routine dans le traitement du cancer du sein hormono-dépendant. L'activité antitumorale de ces substances est aujourd'hui expliquée par une inhibition de l'interaction des estrogènes avec leur récepteur (Rochefort *et al.*, 1983). Le mécanisme de liaison hypothétique des antiestrogènes non stéroïdiens (Figure 27) est basé sur la présence d'une poche hydrophobe située à proximité du site actif du récepteur. Dans le premier cas (a), l'estradiol induit une transconformation du récepteur. Ce dernier est de cette façon activé et peut ainsi transmettre l'effet biologique. Par contre, le monohydroxytamoxifène (b), antiestrogène puissant, se lie au récepteur en plaçant sa chaîne alkylaminoéthoxyle dans une poche hydrophobe voisine. L'occupation de ce "site antiestrogène" empêche la transconformation de la protéine, indispensable à l'induction de l'activité hormonale.

 ACIDE RETINOIQUE

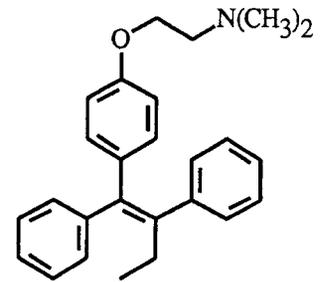
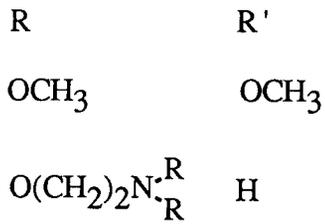
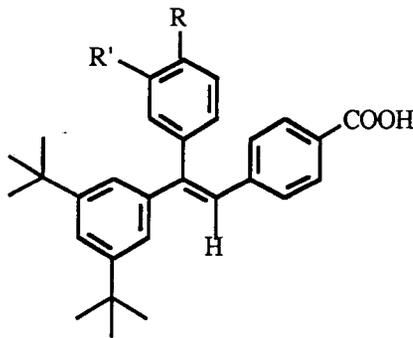
 ESTRADIOL

 A
G
O
N
I
S
T
E
S


TTNPB



Diéthylstilbestrol (DES)

 A
N
T
A
G
O
N
I
S
T
E
S


TAMOXIFEN

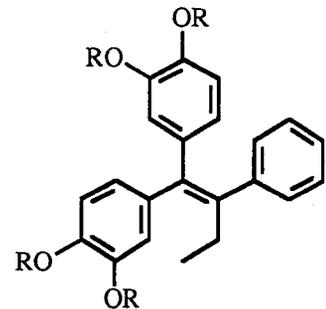


Figure 26 : Première hypothèse de travail basée sur la similitude rétinoides / estrogènes non stéroïdiens.

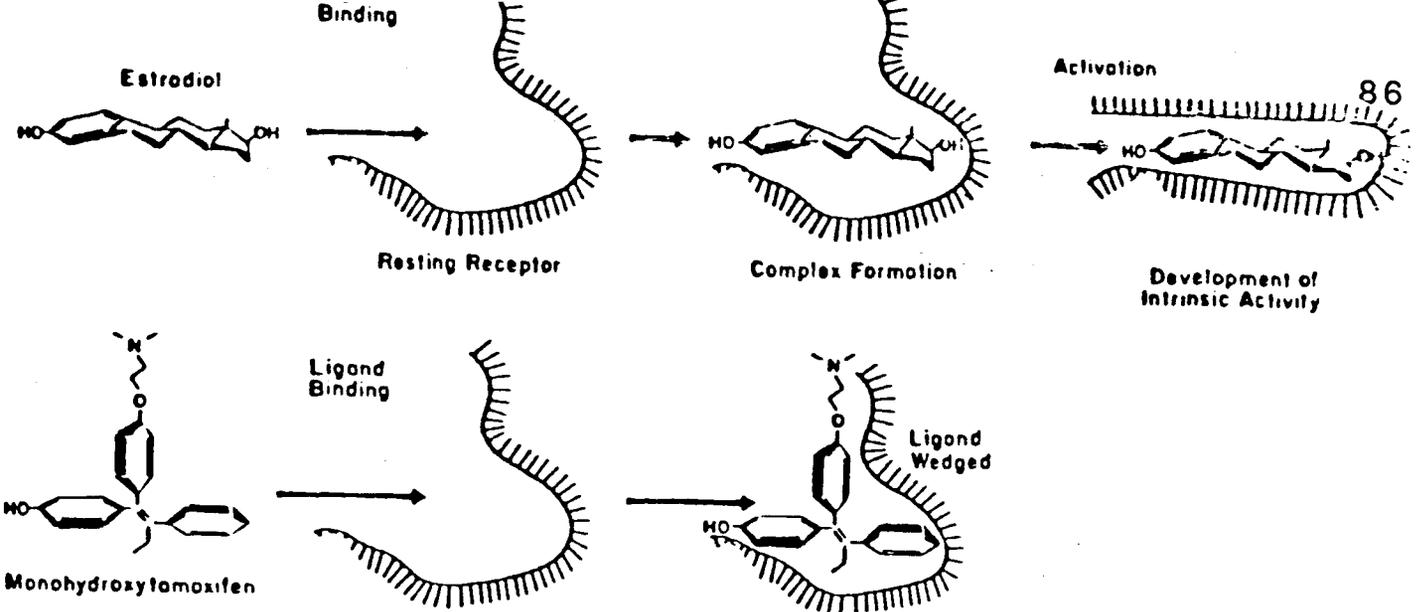


Figure 27 : Mécanisme d'action supposé des estrogènes et des antiestrogènes.

Dans le cas des récepteurs de l'acide rétinoïque, l'idée a été de partir à la recherche d'une éventuelle poche hydrophobe dans le site actif, poche qui pourrait être utilisable pour le verrouillage du récepteur dans l'état inactif comme cela se passe dans le cas des récepteurs stéroïdiens. En s'inspirant du modèle d'activation conformationnelle du récepteur aux estrogènes, le site de liaison des RARs natifs pourrait être représenté comme une poche ouverte capable de se refermer après liaison avec un agoniste du type TTNPB (Figure 28). Le changement de conformation accompagnant cette fermeture serait responsable de l'activation du RAR. Les interactions initiales avec tous les rétinoïdes se feraient *via* des sous-sites A et B, points d'ancrage des ligands. Dans le cas d'un agoniste, les changements de conformation des sous-sites A et B entraîneraient la fermeture du site de liaison (Figure 28 I). Dans le cas d'un antirétinoïde, le changement de conformation du sous-site C serait impossible en raison de la présence du groupement phényle substitué. Le complexe ainsi formé serait alors inactif car sa conformation serait très proche de celle de la protéine native (Figure 28 II). Deux antagonistes semblant agir selon ce principe ont d'ailleurs été décrits (Figure 8, page 32). En effet, le Ro 41-5253 et surtout les deux dérivés du benzimidazole sont des molécules qui présentent un axe de symétrie horizontal. Lorsque l'on fait pivoter ces molécules par rapport à cet axe en s'arrangeant pour placer les groupements phényle, benzyle ou la chaîne aliphatique vers le haut, on remarque que ces groupements hydrophobes encombrant peuvent venir se placer dans la cavité précédemment décrite.

En nous inspirant des modifications de structure permettant de passer d'un agoniste à un antagoniste dans la famille des estrogènes, nous avons élaboré de nouvelles molécules susceptibles de posséder des propriétés antirétinoïdes. Les substances dont la synthèse a été envisagée dérivent toutes d'un analogue du TTNPB où le groupement méthyle central a été substitué par un noyau aromatique substitué (Figure 26).

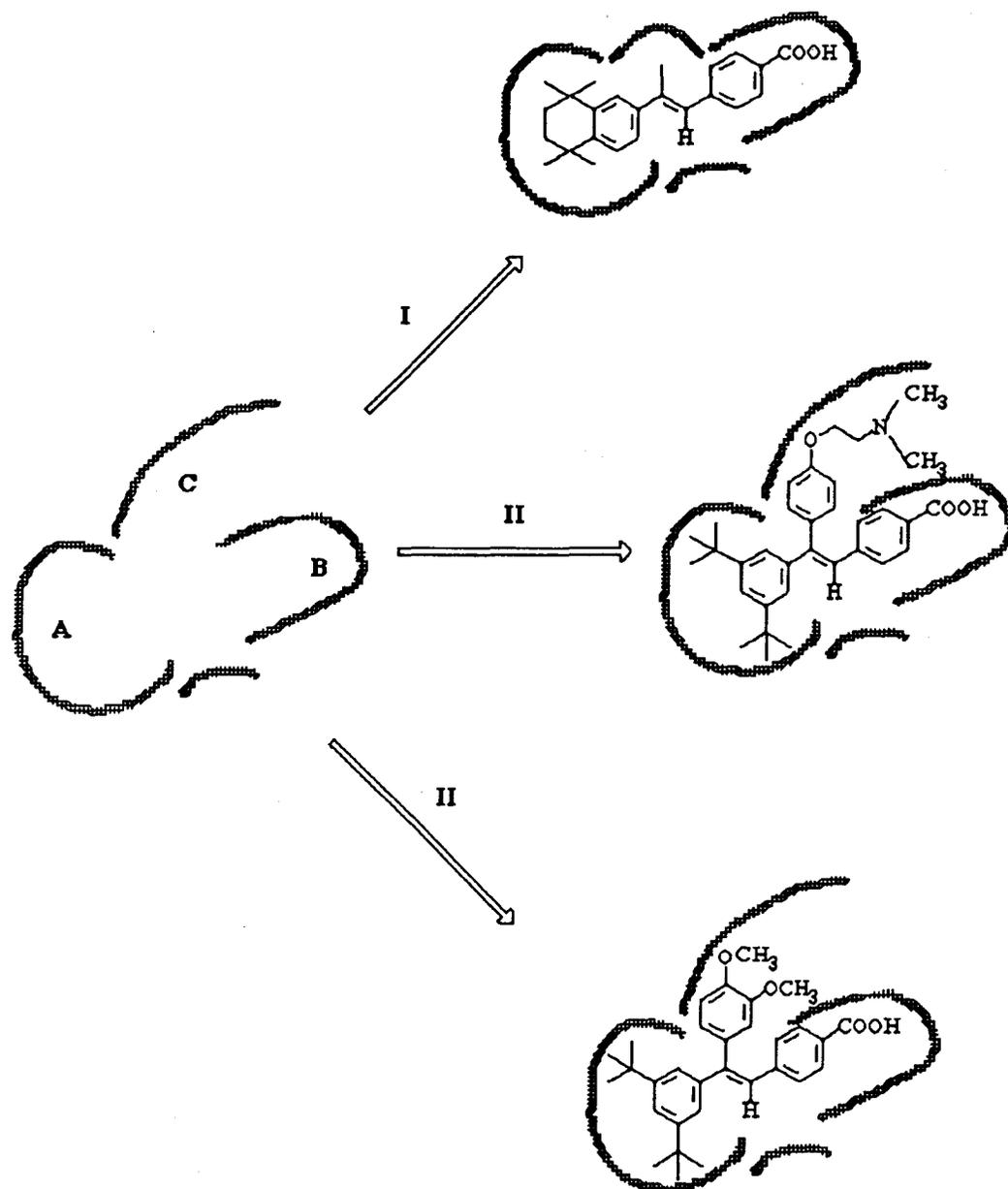


Figure 28 : Représentation hypothétique du mode d'action des rétinoïdes et des antirétinoïdes. (I) Modification conformationnelle du récepteur après interaction avec un agoniste. (II) Modification conformationnelle du récepteur après interaction avec un antagoniste.

II-2 - METHODES ET SYNTHESSES

II-2-1 - Synthèse du 1, 1-[(3", 4"-diméthoxyphényl)-3', 5'-ditertiobutyl phényl]-2-(4-benzoate de méthyle) éthylène 18

Ce composé est obtenu par une réaction de Mc Murry entre la 3', 5'-ditertiobutyl phenyl-3,4-dimethoxy benzophenone **17** et le 4-formyl benzoate de méthyle **16** (Schéma 7). La formation d'une double liaison C=C peut être obtenue selon plusieurs schémas de synthèse. La réaction de Wittig ou ses nombreuses modifications sont souvent utilisées. Cependant, ce schéma réactionnel comporte un inconvénient majeur, à savoir le nombre élevé d'étapes, qui rend la synthèse malaisée et laborieuse. Nous avons préféré utiliser la réaction de Mc Murry plus directe que la précédente. Cette réaction de couplage de carbonyles catalysée par un sel de titane de faible degré d'oxydation a été décrite par Mukaiyama (Mukaiyama *et al.*, 1973) et développée par Mc Murry (Mc Murry et Fleming, 1974 ; Mc Murry et Fleming, 1975 ; Mc Murry *et al.*, 1978).

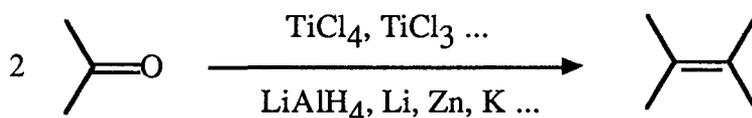


Figure 29 : Principe de la réaction de couplage de carbonyles.

De nombreux couples de réactifs associant un réducteur et un sel de titane (LiAlH₄-TiCl₃, Mc Murry et Fleming, 1974 ; Zn-TiCl₄, Mukaiyama *et al.*, 1973 ; Mg-TiCl₃, Tyrlik et Wolochowicz, 1973) sont capables de catalyser un couplage réducteur de carbonyles conduisant à l'obtention d'oléfines. Mc Murry a particulièrement étudié la réaction (Mc Murry *et al.*, 1978). Il a proposé un mécanisme hétérogène où le titane actif formé *in situ* catalyserait la réaction de couplage avec formation de pinacol intermédiaire (Figure 30). Il est à noter que lors de la synthèse, nous avons obtenu de nombreux sous produits dont un

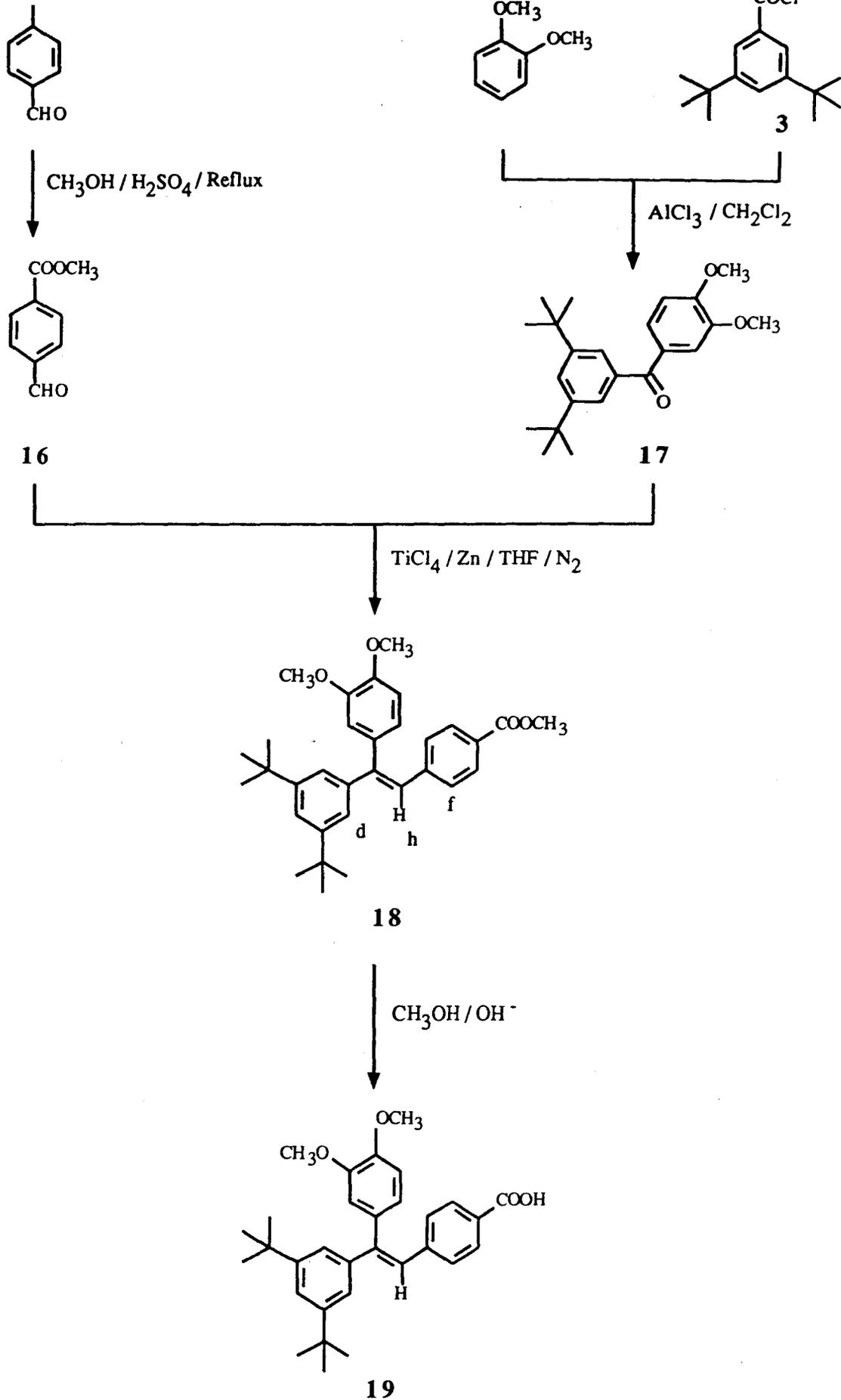


Schéma 7 : Synthèse de l'acide 2-(1, 1-[(3', 4'-diméthoxy phényl)-3', 5'-ditertiobutylphényl] éthylène) benzoïque **19**.

mélange des isomères cis et trans du composé **18**. L'isomère cis a été séparé par recristallisation et caractérisé en RMN 400 MHz.

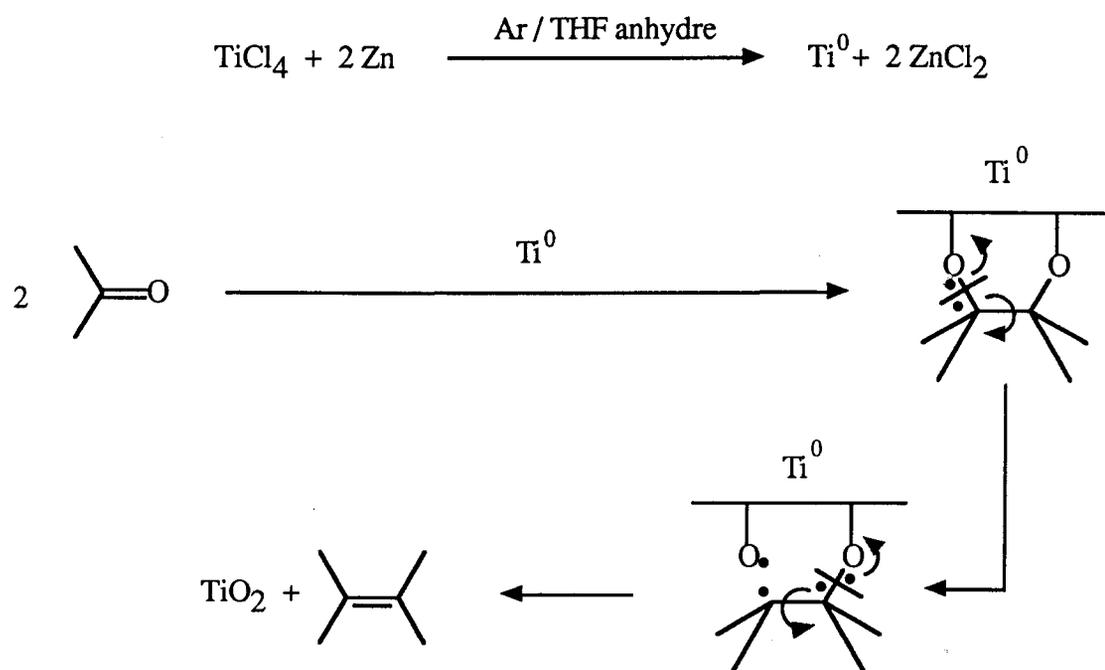


Figure 30 : Mécanisme hypothétique de la réaction de couplage de carbonyles.

L'analyse conformationnelle du dérivé **18** a été effectuée par la technique de l'Effet Overhauser Nucléaire (NOE). L'effet NOE correspond à un transfert d'énergie magnétique à travers l'espace entre deux noyaux proches, et est caractérisé par l'augmentation d'absorption RMN d'un spin nucléaire lorsque l'absorption d'un proton voisin est saturé. Le grand intérêt de cette technique dans l'étude des structures moléculaires réside dans l'existence d'une corrélation directe entre l'effet NOE et les distances interatomiques au sein d'une molécule. La mesure de l'effet NOE permet de déterminer des distances internucléaires relatives. La mise en évidence de ce phénomène consiste à saturer l'absorption RMN d'un proton donné. Cette irradiation est maintenue durant l'enregistrement du spectre RMN de la molécule. Le spectre obtenu est alors caractérisé par (Figure 31) :

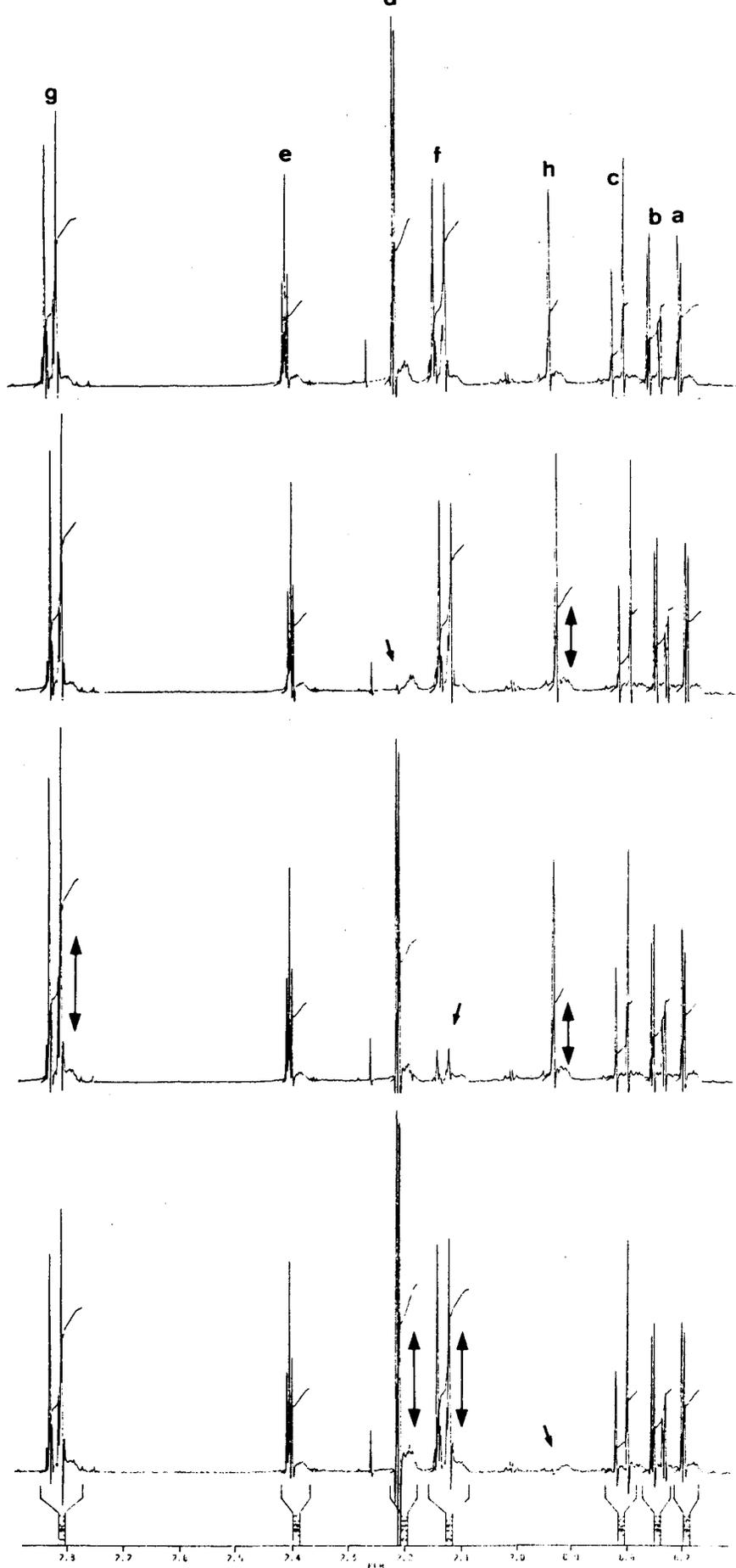


Figure 31 : Spectres RMN des protons aromatiques et éthyléniques de **18** lors de son analyse conformationnelle par la technique de l'effet NOE. Les flèches simples indiquent quels sont les protons irradiés et les flèches doubles les protons dont l'intensité du signal augmente significativement.

- la disparition des raies du proton dont on a saturé la résonance,
- l'augmentation de l'intensité des signaux des protons proches dans l'espace du noyau irradié.

Donc l'irradiation d'un proton donné, perturbe l'absorption RMN de ceux qui l'entourent et la détection de cette variation d'absorption permet d'identifier les protons voisins. Nous avons appliqué cette méthode à l'analyse conformationnelle des dérivés du triphényléthylène obtenu. Les résultats obtenus démontrent clairement la proximité spatiale des protons d et h, et h et f (Schéma 7). En effet, une augmentation significative des signaux des protons d et f est observée quand la résonance de h est saturée (Figure 30, Tableau 7). La benzophénone 17 et le benzaldéhyde 16 ont également été synthétisés au laboratoire. La 3',5'-ditertiobutyl-3,4-diméthoxy benzophénone 17 a été obtenue par une acylation de Friedel-Crafts en utilisant le vératrole et le chlorure d'acide 3 dont la synthèse a été décrite précédemment. Le 4-formyl benzoate de méthyle 16 quant à lui a été obtenu par estérification de l'acide-4-formyl benzoïque en milieu sulfurique.

	Aspect	δ ppm	$^3J(\text{ortho})$	$^4J(\text{méta})$	Effet NOE
a	d	6,70	-	1,95	
b	dxd	6,74	8,35	1,95	
c	d	6,81	8,35	-	
d	d	7,21	-	1,85	h = 26 %
e	t	7,40	-	1,85	
f	d	7,13	8,45	-	g = 28 % b = 6 % h = 18 %
g	d	7,82	8,45	-	f = 19 %
h	s	6,93	-	-	f = 10 % d = 12 %

Tableau 7 : Résultats quantitatifs de l'analyse conformationnelle de 18 par la technique de l'effet NOE.

II-2-2 - Synthèse de l'acide 2-(1, 1-[(3'', 4''-diméthoxy phényl)-3', 5'-ditertiobutyl phényl] éthylène) benzoïque 19

Ce composé est obtenu par une saponification de **18** effectuée dans le méthanol en présence d'une solution de soude 2N. Cette étape est nécessaire afin de libérer la fonction carboxylique indispensable à l'activité rétinolique.

II-2-3 - Synthèse de l'acide 2-(1, 1-[(4''(2-diméthylamino) éthoxyphényl)-3', 5'-ditertiobutylphényl] éthylène) benzoïque 24

Cette molécule est préparée en 9 étapes, à partir des produits commerciaux suivants : toluène, anisole, 1-chloro-2-diméthylaminoéthyle et acide 4-formyl benzoïque (Schéma 8). La 3', 5'-ditertiobutylphényl-4-méthoxy benzophénone **20** est obtenue par une acylation de Friedel-Crafts en utilisant l'anisole et le chlorure d'acide **3**. Le composé obtenu est ensuite déméthylé avec BBr₃ et fournit la 3', 5'-ditertiobutylphényl-4-hydroxy benzophénone **21**. Le traitement de ce dernier produit avec le 1-chloro-2-diméthylaminoéthyle en présence de carbonate de potassium dans l'acétone anhydre fournit la 3', 5'-ditertiobutylphényl-4-(2-diméthylamino)éthoxy benzophénone **22**. Le 1, 1-[(4''(2-diméthylamino) éthoxyphényl)-3', 5'-ditertiobutylphényl]-2-(4-benzoate de méthyle) éthylène **23** est alors synthétisé par une réaction de Mc Murry en présence de 4-formyl benzoate de méthyle **16**.

Une saponification dans le méthanol à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium 2N conduit à l'acide correspondant **24**.

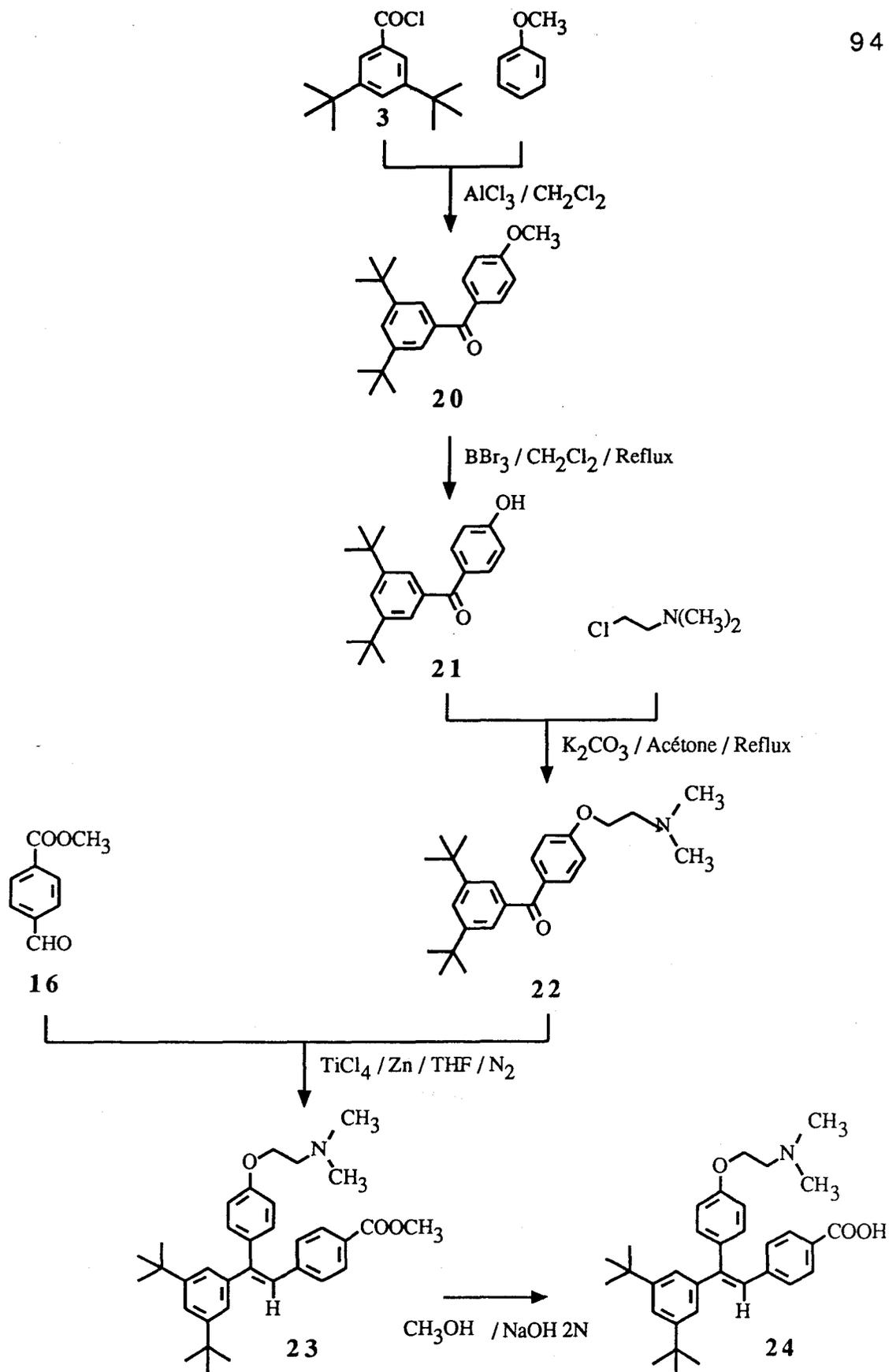


Schéma 8 : Synthèse de l'acide 2-(1, 1-[(4''(2-diméthylamino) éthoxyphényl)-3', 5'-ditertiobutylphényl] éthylène) benzoïque 24.

III - SECONDE HYPOTHESE DE TRAVAIL

III-1 - PRINCIPE

Notre première hypothèse a été de développer une analogie structurale entre antihormones et antirétinoïdes. Une seconde hypothèse consiste à rechercher une poche hydrophobe à proximité du site de liaison du groupement carboxyle de l'acide rétinoïque. En se basant sur des comparaisons de séquences primaires, des prévisions de structures secondaires et sur l'homologie avec la bactériorhodopsine (Henderson *et al.*, 1990), des modèles tridimensionnels de récepteurs couplés à la protéine G (Dopamine : D₂ ; Sérotonine : 5HT₂ ; Noradrénaline : α_2 ; Acétylcholine : M₂) ont été construits (Hibert *et al.*, 1991). Le site de liaison du ligand a été localisé dans chacun de ces récepteurs membranaires et les acides aminés responsables de l'affinité et de la sélectivité ont été identifiés. La nature des interactions physicochimiques entre les chaînes latérales des résidus et les ligands a également été étudiée par ces mêmes auteurs. Or, une caractéristique générale à tous ces sites de liaison semble résider dans la stabilisation des liaisons salines formées entre les fonctions amines protonées des ligands (Dopamine...) et un acide aminé du site actif (Asp,...), par la présence autour de ces paires d'ions de groupements aromatiques formant une cage (Figure 32). Ces noyaux aromatiques correspondent aux chaînes latérales des 3 acides aminés suivants :

□ Phénylalamine, Tyrosine, Tryptophane.

Cette cage hydrophobe serait également responsable de la transduction du signal résultant de la liaison de l'effecteur, par un mouvement des 3 cycles aromatiques lors de la création de la liaison ionique aspartate-ammonium. La présence de cette poche hydrophobe semble être assez répandue puisqu'on la retrouve dans de nombreux récepteurs membranaires couplés à la protéine G comme par exemple la bactériorhodopsine (la liaison de cette protéine au rétinol intervient dans le mécanisme de la vision) , mais également dans d'autres protéines telle que la glutathion peroxydase.

Nous avons postulé que ce système de stabilisation / propagation pouvait être un phénomène que l'on pouvait retrouver lorsque le complexe Récepteur-Ligand est

caractérisé par une liaison ionique. Bien que nous ne soyons pas ici en présence de récepteurs membranaires, il nous a paru intéressant de transposer ce principe au cas des récepteurs de l'acide rétinoïque. Les modes d'interactions rétinoïdes-protéines semblent être complexes et variés. En effet, si le domaine de liaison au ligand de la CRABP est constitué en majorité de feuillets β , il ne semble pas que se soit le cas du domaine E des RARs surtout constitué d'hélices α (prévisions de structures réalisées au laboratoire de P. Formstecher). D'autre part l'AR pénètre profondément dans la CRABP en dirigeant son groupement carboxylique vers l'intérieur de la protéine (Jones *et al.*, 1988), alors que ROH semble s'introduire dans la CRBP par sa partie cyclohexène (Newcomer *et al.*, 1992).

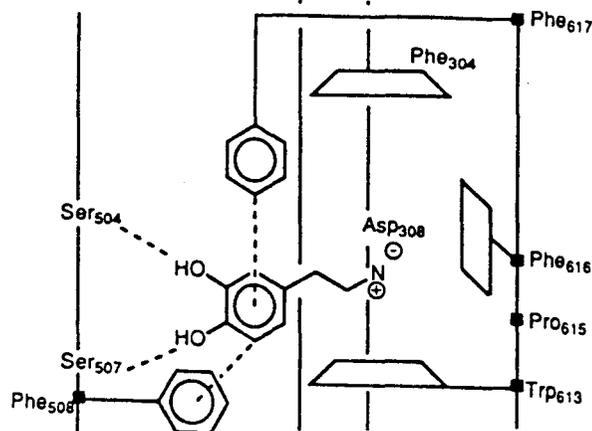


Figure 32 : Représentation schématique de l'interaction entre le site de liaison du récepteur D2 de la dopamine et son ligand.

Ici, l'idée serait alors que, l'anion carboxylate formé (Kagechika *et al.*, 1988) se lierait avec un résidu basique (Arg, Lys...) dans le site de liaison du récepteur. La paire d'ion ainsi formée pourrait être également stabilisée par un système de noyaux aromatiques, dont le mouvement permettrait la transmission du signal induit par l'acide rétinoïque conduisant en final au changement de conformation du récepteur. Des travaux visant à localiser une arginine essentielle dans le domaine E des RARs sont actuellement en cours dans le laboratoire de P. Formstecher. La synthèse de molécules possédant un noyau aromatique à proximité de la fonction carboxylique a donc été envisagée. Un tel noyau pourrait alors se placer de manière favorable pour former une liaison par empilement avec

les chaînes latérales des résidus aromatiques présents dans le domaine E des RARs (Tyr 208, Trp 225, Phe 228, Phe 242, Phe 249, Tyr 277, Phe 286, Phe 302, Phe 310, Phe 312, Tyr 362, Phe 374) et ainsi perturber l'étape d'activation. Le schéma 9 présente quelques molécules, analogues de Ch55 et comportant en 3' un groupement phénylalkyloxy de longueur variable dont la synthèse a été développée en application de ce principe.

III-2 - SYNTHÈSE DES DÉRIVÉS DE TYPE (E)-3'-PHENYLALKYLOXY-4'-CARBOXY-3, 5-DITERTIIBUTYL CHALCONE **28**, **29**, **30**

Les 2-phénylalkyloxy-4-formyl benzoate de méthyle **25**, **26**, **27** sont synthétisés par action du dérivé halogéné correspondant (chlorure de benzyle, 2-bromoéthyl benzène et 1-bromo-3-phénylpropane) sur le 4-formyl salicylate de méthyle **8** dont la synthèse a été décrite précédemment (Schéma 9). Cette réaction est effectuée dans le DMF anhydre en présence d'hydrure de sodium. Les aldéhydes ainsi obtenues sont soumises en présence de l'acétophénone **4**, à une aldolisation en milieu basique suivie d'une crotonisation.

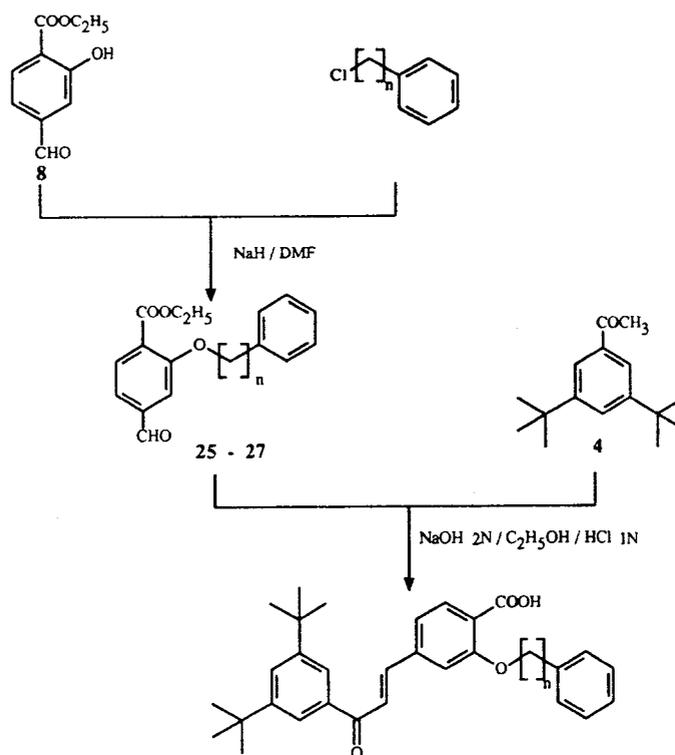


Schéma 9 : Synthèse des dérivés de type (E)-3'-phénylalkyloxy-4-carboxy-3, 5-ditertiobutyl chalcone (n=1 **28**, n=2 **29**, n=30).

IV - RESULTATS

IV-1 - ETUDE DE L'ACTIVITE DE LIAISON

Dans un premier temps, l'affinité des cinq nouveaux rétinoïdes pour les trois RARs a été mesurée sur les récepteurs recombinants produits dans les cellules SF9 infectées. Les valeurs de K_i mentionnées dans le Tableau 8 ont été mesurées par des expériences de compétition avec de l'acide rétinoïque tritié.

COMPOSES	Kis (μ M)		
	RAR α	RAR β	RAR γ
CD367	0,0048	0,0048	0,0032
Ch55	0,32	0,32	0,32
19	0,36	0,8	4,8
24*	7,2	9,6	>3000
28	14	14	14
29	42	>2000	>2000
30	32	32	32

Tableau 8 : Affinités des différents rétinoïdes pour les trois récepteurs de l'acide rétinoïque. Les K_i s présentés sont des valeurs moyennes (3 expériences) et ont été mesurés par des expériences de compétition avec de l'acide rétinoïque tritié. (*) : valeur obtenue lors d'une seule expérience.

Dans nos études de binding, l'activité de liaison du CD367 a été mesurée afin de contrôler la validité de nos résultats. Les valeurs de K_i s obtenues pour cette molécule sont en accord avec les constantes de dissociation K_d parues dans la littérature (Tableau 3). Cependant, l'affinité de Ch55 pour les trois RARs recombinants apparait très faible par rapport à sa forte activité biologique. Ce manque de corrélation avait déjà été mis en évidence très récemment (Keidel *et al.*, 1992) et ceci est en contradiction avec les résultats

de K. Shudo et collaborateurs pour qui Ch55 est un meilleur ligand de RAR α et RAR β que l'AR. Les dérivés de Ch55 28-30 possèdent une faible activité de liaison indiquant ainsi que les groupements phényle ne semblent pas pouvoir se placer dans une cavité vacante dans cette région du site de liaison du récepteur. Le composé 29 possède cependant un intérêt non négligeable, à savoir une spécificité quasiment exclusive pour RAR α . Le dérivé triphénylé 19 quant à lui présente une affinité comparable à celle de Ch55 pour RAR α . Cette activité de liaison décroît légèrement avec RAR β et devient dix fois plus faible pour RAR γ . Cette sélectivité marquée pour RAR α / RAR β est intéressante et doit être confirmée par des essais de transactivation.

IV-2 - ESSAIS DE TRANSACTIVATION

Les expériences de transactivation des RARs ont été réalisées à l'aide de cellules COS co-transfectées avec des vecteurs contenant la séquence codante des RARs recombinants et le gène reporter (RARE)₃-tk-CAT. Ce type d'expérience est important car il permet de préciser si la molécule testée est un agoniste ou un antagoniste de l'AR.

Les premières mesures ont été effectuées avec l'AR et Ch55. Ces deux molécules bien connues pour leur forte activité biologique notamment sur la différenciation des cellules HL-60 ou F9, ont été choisies comme références. Les activités de transactivation présentées sur la Figure 33 sont des valeurs relatives calculées en prenant l'activité de l'AR comme égale à 100%. Les résultats obtenus sur ces deux premières molécules mettent une nouvelle fois en évidence la faible corrélation qui existe entre l'affinité de Ch55 vis à vis des différents RARs recombinants et sa capacité de transactivation. En effet, cette molécule induit des activités CAT très similaires à celles induites par l'AR pour RAR β et RAR α , avec en outre, une transactivation d'environ 110% pour RAR α . En ce qui concerne la molécule 19 qui était le nouveau rétinoïde le plus intéressant du point de vue de son activité de liaison, sa sélectivité RAR α / RAR β est conservée dans les essais de transactivation. En effet, ce composé possède une activité environ dix fois plus faible sur RAR γ que sur les deux autres récepteurs.

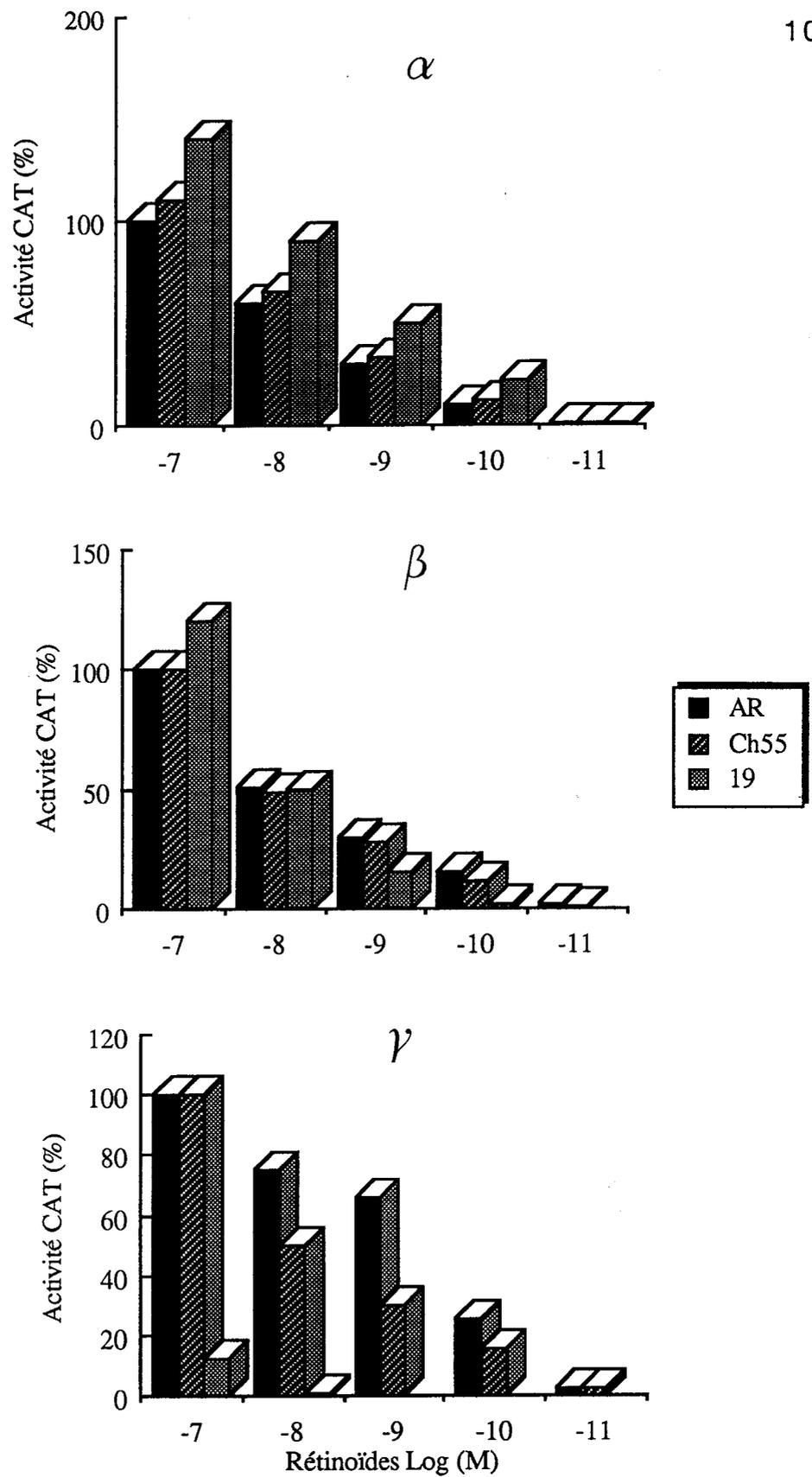


Figure 33 : Etude de l'activité fonctionnelle de l'AR, Ch55 et du dérivé 19.

Ce rapport était de 13 pour les affinités relatives $RAR\alpha / RAR\gamma$ et de 6 pour $RAR\beta / RAR\gamma$. Enfin le dérivé **19** présente une transactivation de 150 % par rapport à l'AR sur $RAR\alpha$ et de 120 % sur $RAR\beta$. Ce composé ne serait donc pas un antagoniste mais plutôt un agoniste sélectif $RAR\alpha / RAR\beta$ de l'AR. Il serait en outre un meilleur agoniste que le ligand naturel pour ces deux récepteurs.

V - CONCLUSION

Des travaux sont actuellement en cours dans l'équipe de P. Formstecher pour mesurer l'activité transactivatrice des autres dérivés présentés dans ce chapitre. Il est prévu, notamment pour la famille des dérivés phénylalkyloxy **28-30**, de tester l'activité de ces composés seuls ou en compétition avec Ch55 par exemple pour déceler un éventuel antagoniste. En ce qui concerne l'agoniste sélectif **19**, il sera très intéressant de mesurer son activité biologique sur la différenciation des cellules HL-60 car il apparaît que $RAR\alpha$ est impliqué dans ce processus de transformation (Apfel *et al.*, 1992). En outre, la grande capacité de transactivation de ce produit, surtout au niveau de $RAR\alpha$, pourrait avoir des applications intéressantes dans la chimiothérapie de certains cancers qui, comme par exemple la leucémie aigüe promyélocytaire, répondent au traitement par l'AR *via* le récepteur $RAR\alpha$. Enfin un avantage supplémentaire d'une telle molécule devrait être la suppression de tous les effets secondaires cutanés importants provoqués par l'AR.

CHAPITRE IV

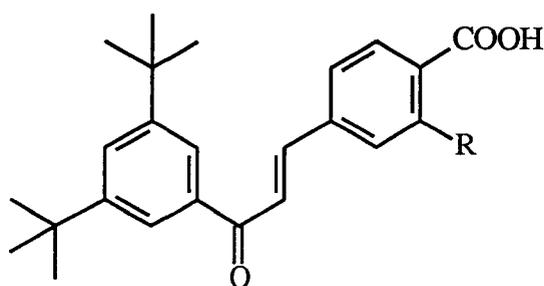
ACTIVITE BIOLOGIQUE DES RETINOIDES

Rétinoïdes et différenciation
Rétinoïdes et transglutaminase

I - RETINOIDES ET DIFFERENCIATION

Parallèlement à l'étude des relations structure-activité de liaison, l'équipe animée par P. Formstecher développe une étude de l'action de l'AR et des rétinoïdes sur des modèles cellulaires. Ces modèles sont constitués de cellules humaines (HL-60 et SK-N-SH) se différenciant sous l'effet des rétinoïdes. Ces travaux permettent de mesurer l'activité biologique des molécules synthétisées, de la comparer à celle d'autres dérivés déjà décrits (relations structure-activité biologique) et d'aborder le mécanisme de la différenciation contrôlée des cellules tumorales, une perspective très intéressante en chimiothérapie du cancer.

L'activité biologique des chalcones Ch55 **31**, 3'-OH-Ch55 **32**, **11** et **12** (Figure 34) a été testée *in vitro* sur deux lignées cellulaires : des neuroblastes (SK-N-SH) et des cellules leucémiques à promyélocyte humain (HL-60). Ces chalcones induisent la redifférenciation des cellules malignes. Ces travaux ont été réalisés par D. Manechez.



	R
Ch55	H
3'OH-Ch55	OH
11	O(CH ₂) ₃ NHBoc
12	O(CH ₂) ₃ NH ₂ .TFA

Figure 34 : Nouveaux dérivés synthétisés au laboratoire et utilisés dans l'étude de l'induction de la différenciation cellulaire par les acides rétinoïques.

I-1 - SYNTHÈSES DE L'ACIDE (E)-4'-(3-(3, 5-DITERTIOBUTYL PHENYL)-3-OXO-1-PROPENYL) BENZOÏQUE (Ch55) **31** ET DE L'ACIDE-(E)-4'-(3-(3, 5-DITERTIOBUTYL PHENYL)-3-OXO-1-PROPENYL) SALICYLIQUE **32**

Ch55 (**31**) et son dérivé 3'-hydroxylé **32** ont été synthétisés en effectuant une condensation aldolique en milieu basique entre la 3, 5-ditertiobutylacétophénone **4** et l'acide 4-formyl benzoïque dans le cas de Ch55 ou le 4-formyl salicylate d'éthyle **8** dans le cas du dérivé hydroxylé (Schéma 10).

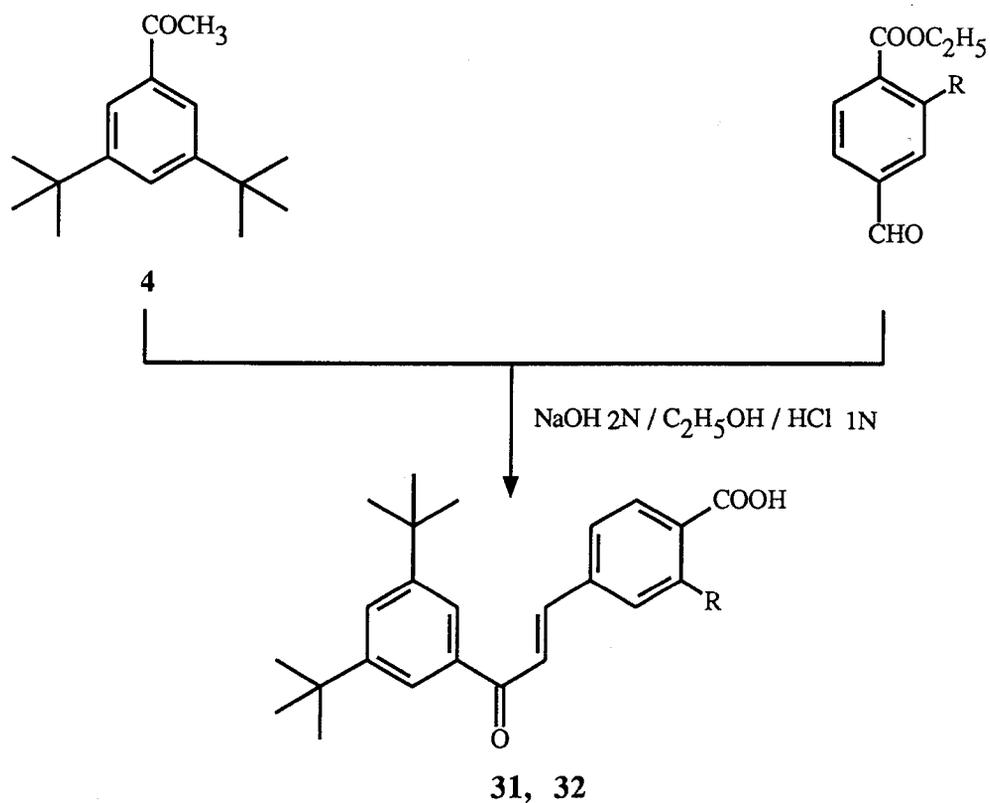


Schéma 10 : Synthèse des chalcones Ch55 (**31**, R=H) et **32** (R=OH).

I-2 - PRINCIPE (PRESENTATION DES MODELES PHARMACOLOGIQUES)

I-2-1 - Cellules leucémiques à promyélocyte : HL-60

Photo 1 - Témoin (cellules non traitées ; x 1000)

Le noyau des cellules est ovale. Les granulations non spécifiques sont nombreuses dans le cytoplasme.

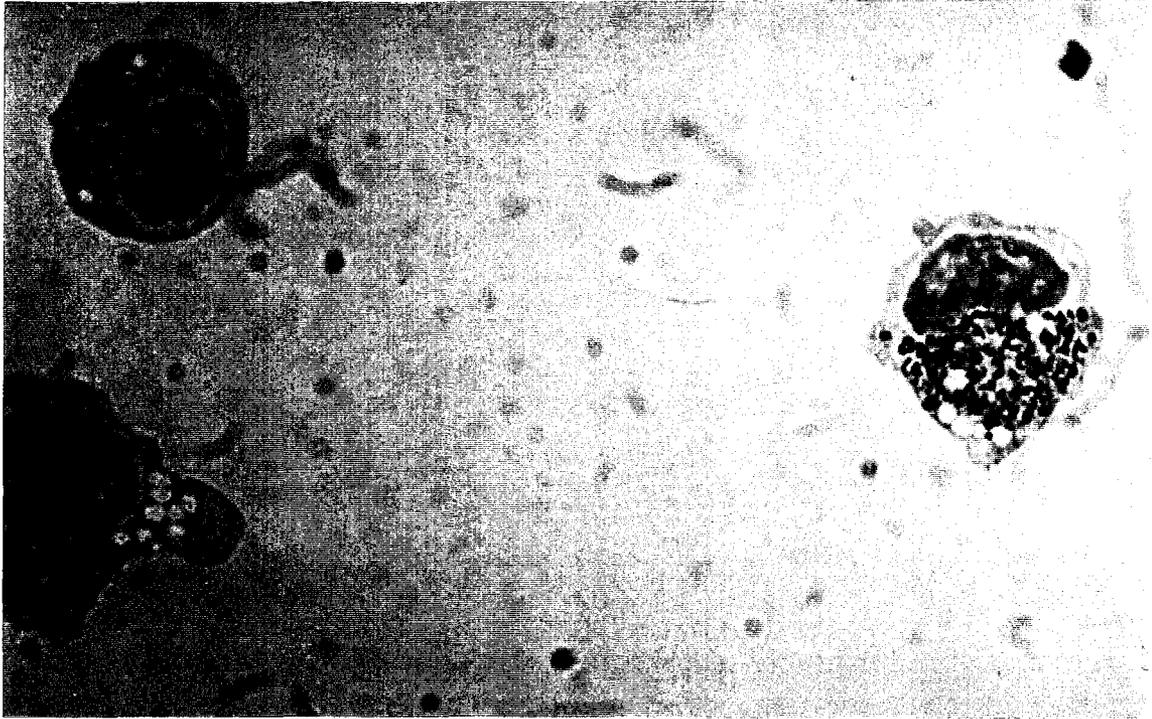


Photo 2 - Cellules traitées par $1\mu\text{M}$ de rétinoïde (pendant 5 jours ; x 1000)

La cellule est différenciée : son noyau est polylobé et les granulations non spécifiques ont disparu. C'est une différenciation que l'on repère par son aspect morphologique.

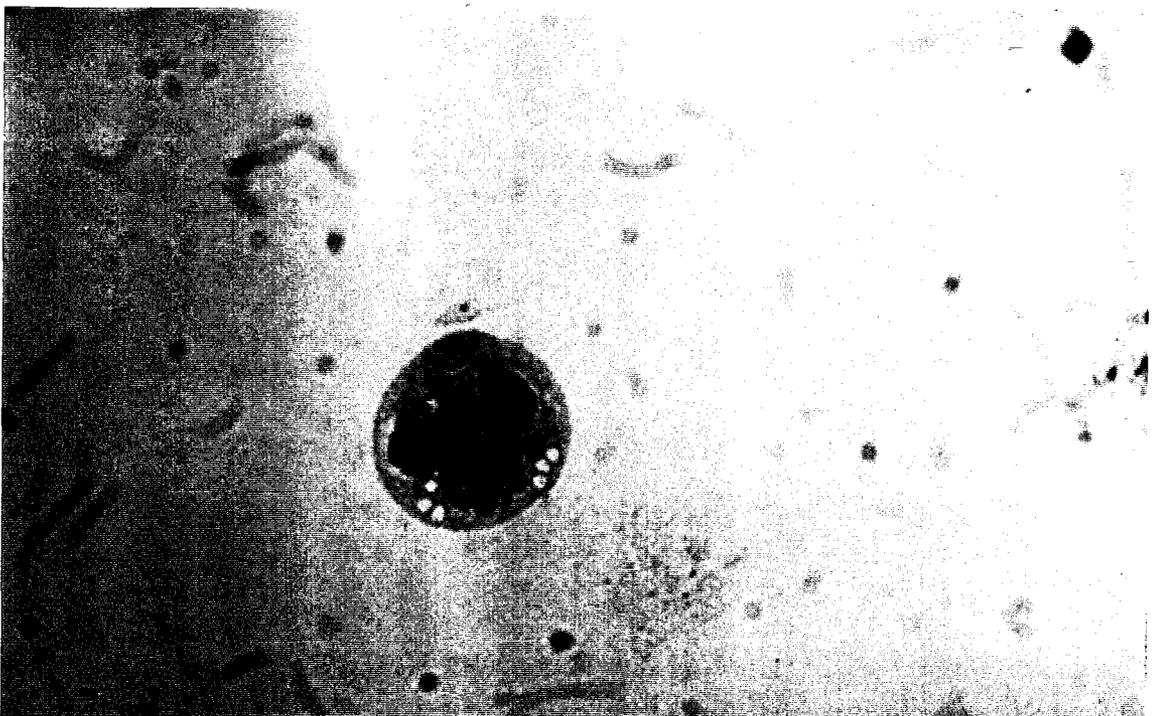
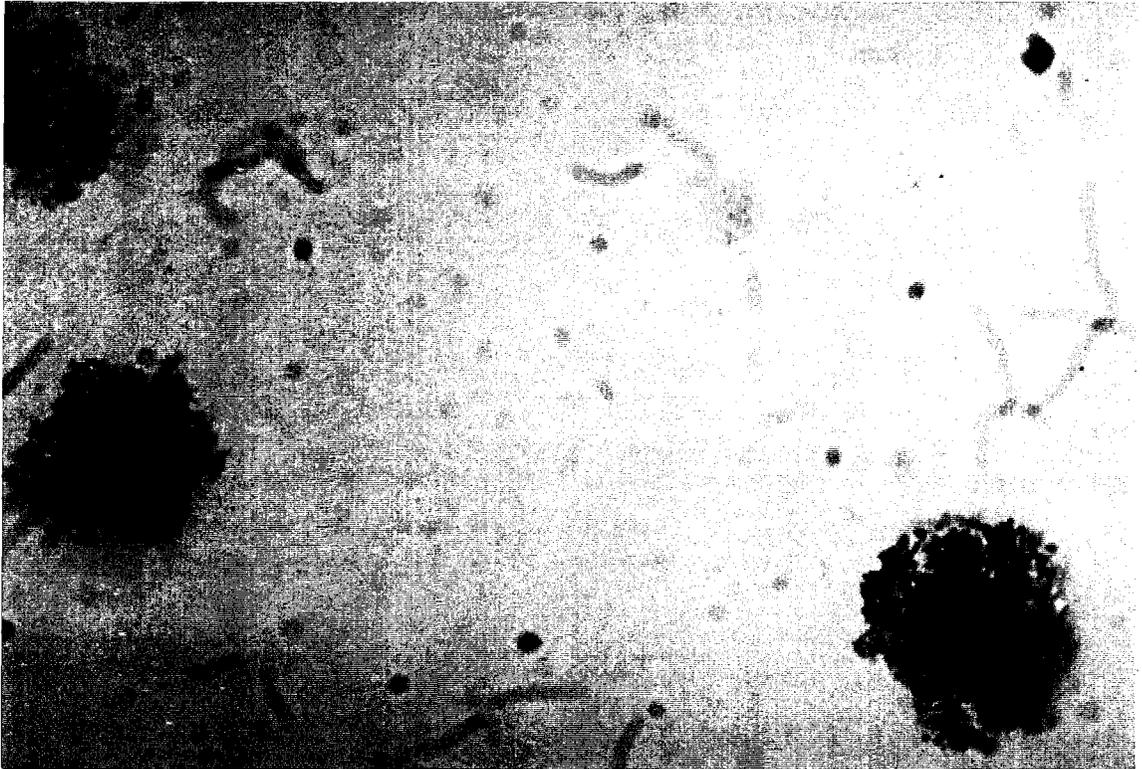


Photo 3 - Cellules traitées par $1\mu\text{M}$ de rétinol (pendant 5 jours ; x 400)

Test au nitrobleu tétrazolium (NBT). Dans les cellules différenciées, le NBT est réduit et devient insoluble dans le cytoplasme. On observe alors dans celui-ci la présence de granulations noires (NBT réduit). Les cellules leucémiques non différenciées sont incapables de réduire le NBT qui reste soluble dans le cytoplasme. Ce test met en évidence une différenciation fonctionnelle. Elle permet de visualiser et de quantifier la redifférenciation des cellules HL-60 en granulocytes fonctionnalisés.



I-2-2 - Neuroblastome humain : SK-N-SH

Photo 4 - Témoin (cellules non traitées ; x 1000)

La morphologie du neuroblaste est fusiforme.

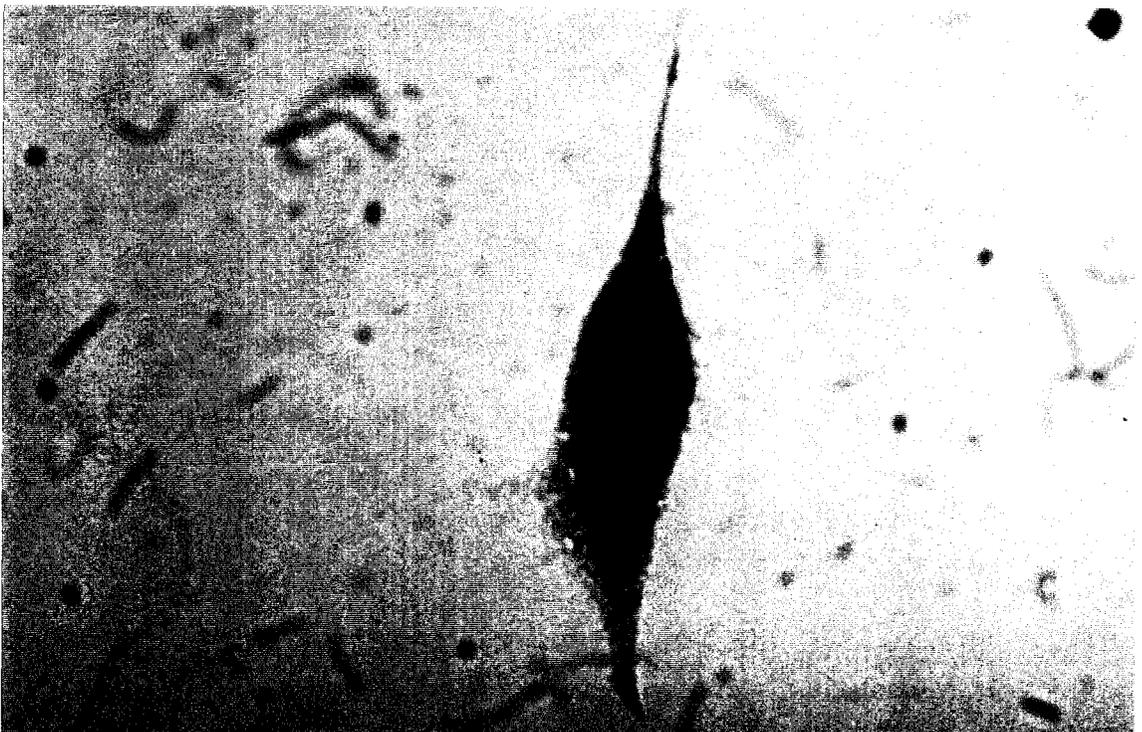
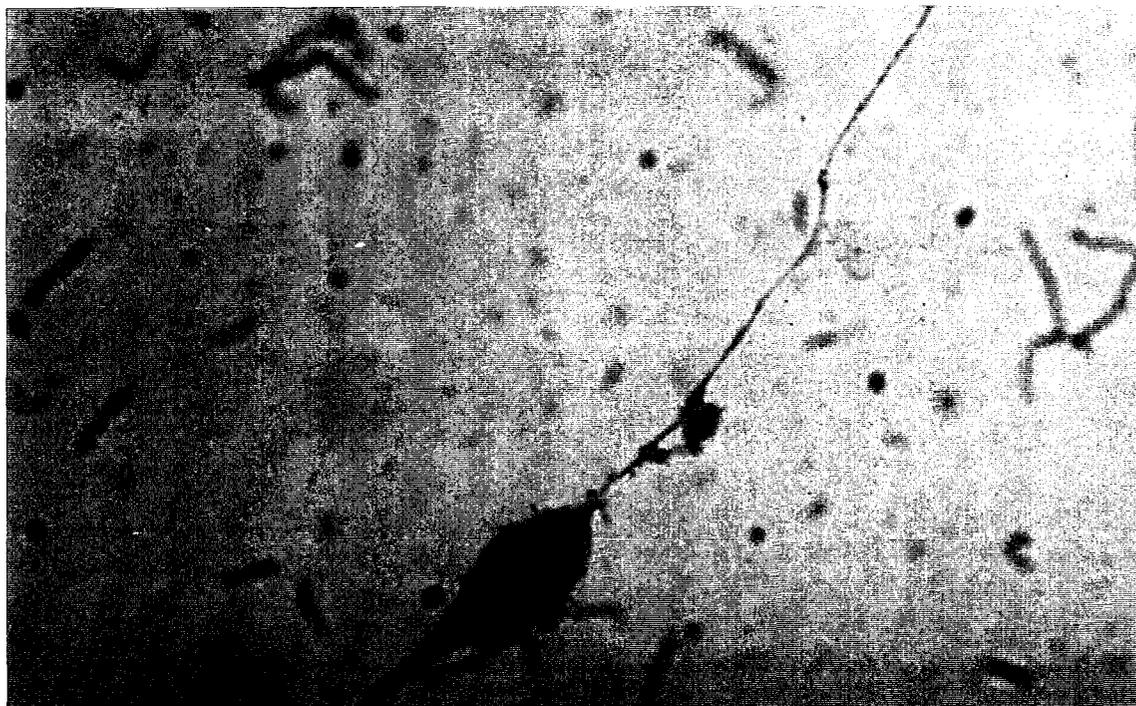


Photo 5 - Cellules traitées par 10 μ M de rétinoïde (pendant 4 jours ; x 1000)
Après différenciation, l'axone de la cellule s'allonge et finalement on obtient des cellules dont la morphologie est celle de cellules nerveuses normales.



I-3 - RESULTATS

Les résultats quantitatifs mentionnés dans le Tableau 9 et sur la Figure 35 confirment la forte activité différenciatrice du produit Ch55 **31** par rapport à l'acide rétinoïque. De plus, le nouveau composé hydroxylé **32** possède une activité comparable à Ch55 sur la différenciation des deux lignées cellulaires. Ce résultat indique que la présence d'un groupement hydroxyle à proximité de la fonction carboxyle ne fait pas décroître l'activité biologique de manière significative. D'autre part ces résultats sont bien corrélés avec une toxicité bien supérieure des deux chalcones à celle de l'acide rétinoïque. Par contre, la faible activité développée par le composé **11** semble être le reflet de l'encombrement stérique apporté par le bras espaceur. Ce dernier est en effet pourvu d'un groupement tertio-butyle volumineux pouvant créer une gêne au niveau du groupement carboxyle fortement impliqué dans la liaison récepteur-ligand. Le ligand **12** quant à lui, est totalement inactif. Cette inactivité sur des cellules en culture peut être expliquée par le caractère ionique de la molécule rendant difficile la diffusion de celle-ci à travers les membranes.

COMPOSE	REDUCTION NBT HL-60 (CE50.nM)	CROISSANCE AXONALE SK-N-SH (CME.nM)	EXCLUSION BLEU TRYPAN HL-60 (CL50.µM)	PERTE D'ADHERENCE SK-N-SH (CL100.µM)
AR	49,00	10,00	>10,00	50,00
Ch55	1,20	0,10	0,54	6,00
31	1,60	0,10	0,81	8,00
11	>100	NT	>10,00	NT
12	I	I	-	-

CE50: Concentration efficace 50% ; CME: Concentration minimum effective ; CL50: Dose létale 50% ; CL100: Dose létale 100% ; NT: Non testé ; I: Inactif.

Tableau 9 : Mesure de l'activité des rétinoïdes sur la différenciation cellulaire et la toxicité aiguë dans les lignées HL-60 et SK-N-SH.

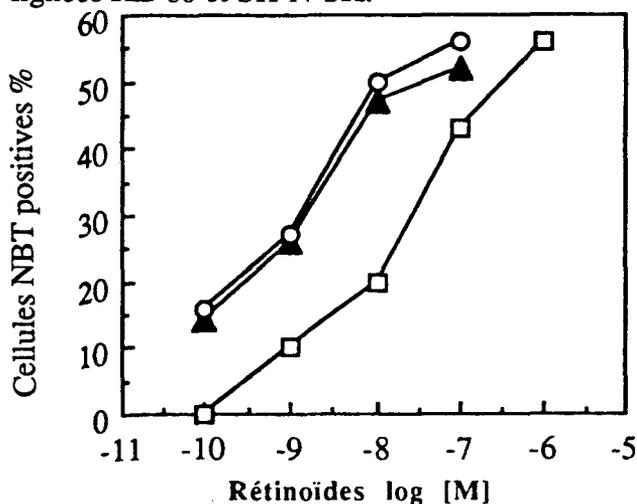


Figure 35 : Courbe dose-réponse de l'acide rétinoïque (□) et des acides rétinoïques Ch55 (○) et 32 (▲) sur la différenciation des cellules de leucémie à promyélocyte HL-60 traitées pendant 5 jours.

II - RETINOIDES ET TRANSGLUTAMINASE

II-1 - INTRODUCTION

La différenciation cellulaire est un bon modèle pharmacologique permettant de mesurer l'activité biologique des rétinoïdes, mais il est trop complexe pour étudier le mode d'action de ces molécules. Très peu d'exemples d'effets directs des rétinoïdes sur l'expression des gènes ont été décrits. L'induction de l'expression de la transglutaminase de tissu ou TG de type II par l'acide rétinoïque est un exemple de réponse primaire et a été choisie à ce titre comme second modèle pour l'étude de l'activité cellulaire des rétinoïdes par l'équipe de P. Formstecher.

L'acide rétinoïque et les rétinoïdes en général, induisent une différenciation cellulaire souvent accompagnée de l'induction de la transglutaminase de tissu, une enzyme calcium dépendante (Lorand et Conrad, 1984). Ce phénomène a été observé dans de nombreuses lignées cellulaires (Davies *et al.*, 1985 ; Melino *et al.*, 1988) et en particulier dans les lignées HL-60 (leucémie aigüe promyélocytaire humaine) et SK-N-SH (neuroblastome humain). En fait cette enzyme est fréquemment induite dans les cellules en différenciation terminale et évoluant vers l'apoptose (mort cellulaire programmée). La transglutaminase de tissu est impliquée dans le mécanisme d'altération de protéines en catalysant la formation d'une liaison covalente ϵ (γ -glutamyl)-lysyle entre deux protéines ou bien en incorporant certaines amines de faible poids moléculaire comme la putrescine ou la cadavérine, au niveau des sites γ -glutamyle de ces mêmes protéines (Lorand et Conrad, 1984 ; Figure 36). La transglutaminase de tissu serait impliquée dans des phénomènes biologiques comme l'activation des macrophages (Fesus *et al.*, 1981 ; Schroff *et al.*, 1981), les modifications post-traductionnelles de protéines durant le développement (Cariello *et al.*, 1990), le maintien de l'état non prolifératif des cellules (Birkbichler *et al.*, 1977) et la différenciation cellulaire spontanée ou induite (Moore *et al.*, 1984). Des études visant à mesurer la cinétique de l'induction de l'ARNm de la transglutaminase de tissu après exposition de macrophages à l'acide rétinoïque ont

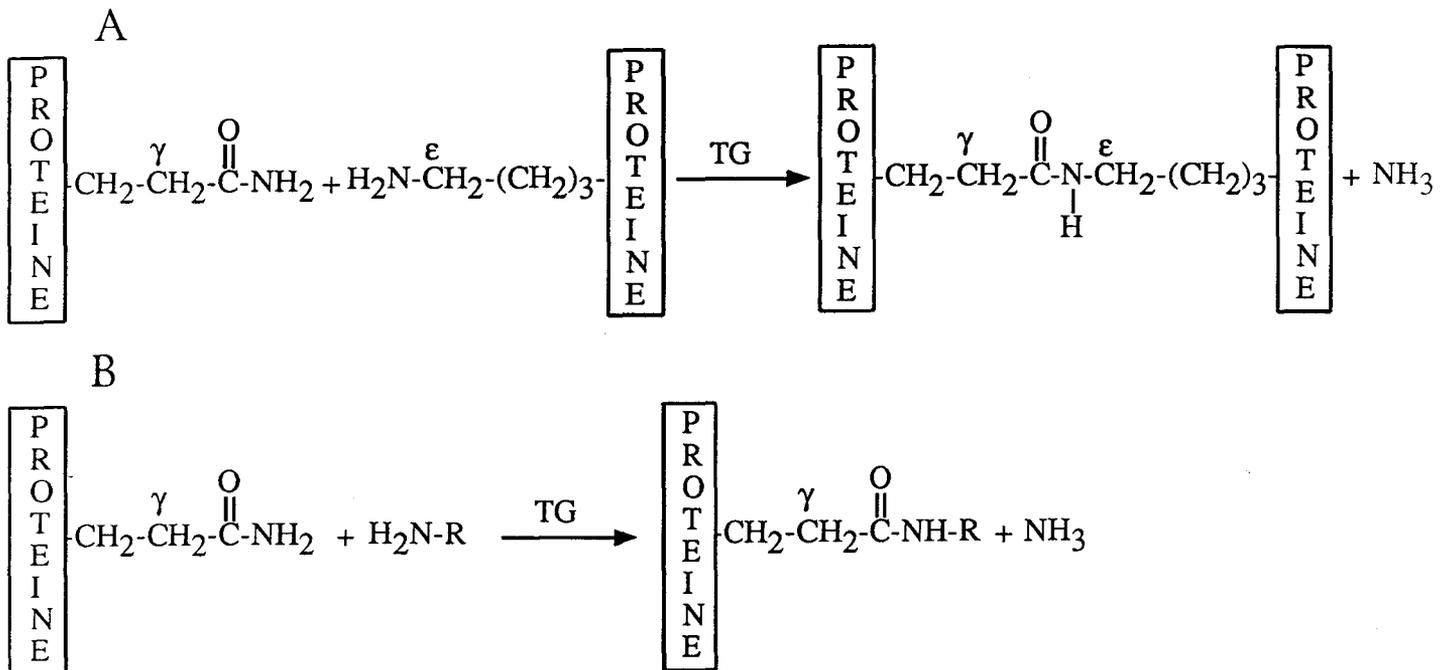


Figure 36 : Réactions catalysées par la transglutaminase de tissu.
 A : Polymérisation de protéines ; B : incorporation d'amines de faible poids moléculaire.

démontré une augmentation des taux d'ARNm de la TG II 15 minutes seulement après le début du traitement. En outre, cet effet ne semble pas impliquer de protéine intermédiaire puisqu'il persiste en présence de cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique. L'induction de cette enzyme par l'acide rétinoïque semble donc être une réponse primaire qui s'effectue au niveau transcriptionnel (Chiocca *et al.*,1988 ; Chiocca *et al.*,1989). Récemment, une forte corrélation a d'ailleurs été établie entre le niveau d'induction de cette protéine et le taux de récepteur de l'acide rétinoïque présent dans le noyau (Denning et Yerma, 1991). Ainsi, il apparaît que les récepteurs de l'acide rétinoïque pourraient être les facteurs de transcription régulant l'expression du gène de la transglutaminase de tissu.

II-2 - INDUCTION DIFFERENTIELLE DE LA TRANSGLUTAMINASE PAR L'ACIDE RETINOIQUE ET LES ACIDES RETINO BENZOIQUES

Les effets de l'AR, de Ch55 31 et du dérivé 3'OH-Ch55 32 sur l'expression de la transglutaminase de tissu ont été étudiés dans les lignées cellulaires HL-60 et SK-N-SH.

II-2-1 - Principe (presentation du modèle pharmacologique)

En pratique, il s'agit d'incuber les cellules pendant 48 heures avec différentes concentrations en rétinoïdes. Une lyse cellulaire est ensuite effectuée et après sédimentation, le surnageant contenant l'enzyme est récupéré et incubé avec une solution de N, N'-diméthylcaséine et de putrescine tritiée. L'activité de la transglutaminase est mesurée 30 min. plus tard en dosant la proportion de [³H] putrescine incorporée à la N,N'-diméthylcaséine, après précipitation du complexe putrescine-caséine. Il s'agit du dosage de l'activité de la transglutaminase et donc de la capacité des différents rétinoïdes à induire plus ou moins la biosynthèse de cette protéine.

II-2-2 - Résultats

Comme le montrent les Figures 37a et 37b, l'induction de la transglutaminase par l'acide rétinoïque est dose-dépendante dans les deux lignées cellulaires et l'induction maximum est de 10 fois dans les cellules HL-60 et d'environ 8 fois dans les cellules SK-

N-SH, par rapport au taux de base dans les cellules non traitées. D'autre part, comme dans le cas des essais sur la différenciation cellulaire, les composés Ch55 et 3'OH-Ch55 possèdent des courbes dose-réponse très similaires dans les deux lignées. Cependant, de façon surprenante et contrairement à ce que nous avons observé pour la différenciation, ces mêmes composés présentent une induction maximale 2 à 5 fois plus faible que celle de l'acide rétinoïque. La dissociation des réponses apparaît à partir de 10^{-8} M dans les cellules HL-60 et 10^{-6} M dans la lignée SK-N-SH. Cela est d'autant plus surprenant que bien que ces composés aient un taux maximum d'induction bien inférieur à celui de l'acide rétinoïque, leur activité est détectable à des concentrations mille fois plus faible. Cette différence de plateau a également été mise en évidence par la technique de Western blot dans les cellules HL-60. Afin d'apporter une explication à ces observations apparemment contradictoires, nous avons formulé deux hypothèses :

□ Premièrement, l'acide rétinoïque et ses analogues se lieraient au même récepteur mais la faible activité intrinsèque des dérivés ne permettrait pas d'aboutir à la conformation la plus active du récepteur. Dans ce cas, Ch55 ou son dérivé 32 seraient des agonistes partiels de l'AR dans cette réponse biologique.

□ Dans la seconde hypothèse, les dérivés Ch55 et 3'OH-Ch55 se lieraient à des récepteurs distincts de ceux activés par l'AR faiblement impliqués dans l'expression de l'enzyme, ou bien induiraient la transglutaminase de tissu en agissant sur des systèmes indépendants des RARs (PKA, PKC...).

Dans le but d'étayer l'une ou l'autre des hypothèses, une expérience associant l'acide rétinoïque avec Ch55 ou le 3'OH-Ch55 a été effectuée dans les cellules HL-60. Comme le montre la Figure 38, Ch55 n'antagonise pas l'effet induit par l'acide rétinoïque. Ce résultat suggère donc que l'AR et les acides rétinoïques étudiés induisent la transcription de la transglutaminase de tissu en se liant à des récepteurs distincts, ou par des mécanismes différents. La différence de plateau observée pourrait

également provenir de l'intervention aux concentrations plus élevées (10^{-8} - 10^{-6} M), d'un deuxième mécanisme d'action, spécifique de l'acide rétinolique et ne faisant pas intervenir les récepteurs nucléaires.

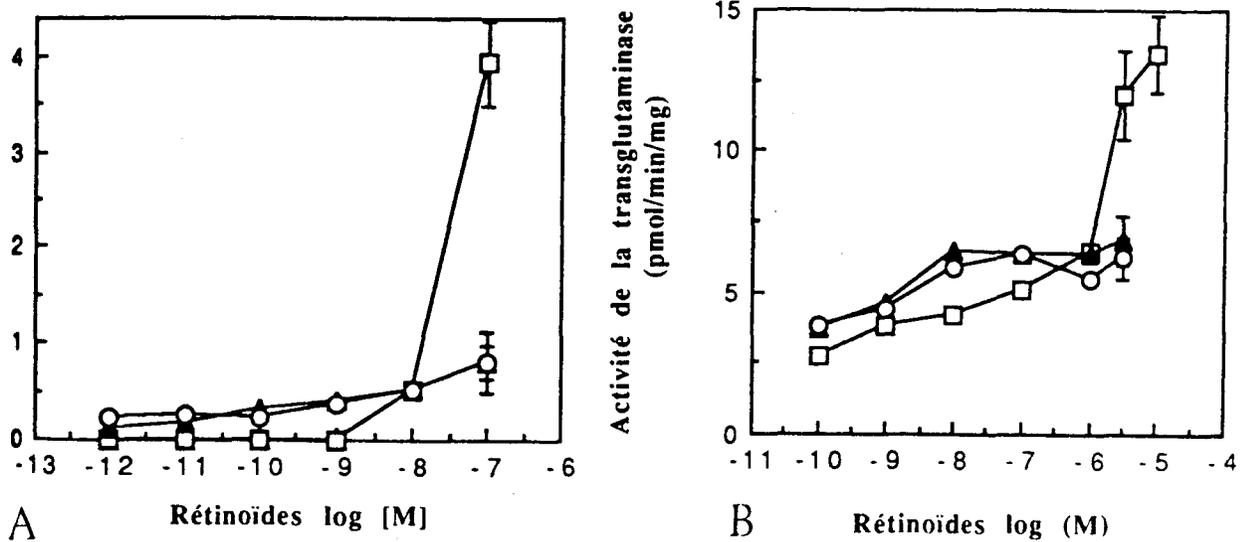


Figure 37 : Courbes dose-réponse de l'AR (\square), et des acides rétinobenzoïques Ch55 (\blacktriangle) et 32 (\circ) sur l'activité de la transglutaminase de tissu après 48 heures dans les cellules HL-60 (A) et SK-N-SH (B).

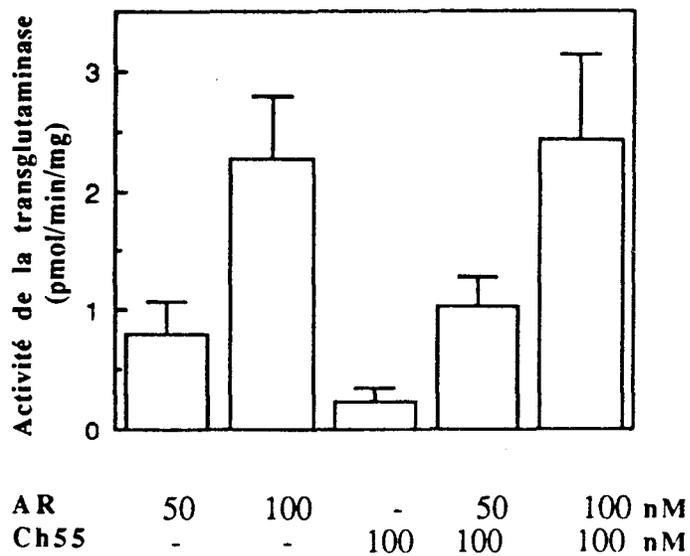


Figure 38 : Compétition entre l'AR et Ch55 sur l'activité de la transglutaminase de tissu dans les cellules HL-60 après 48 heures de traitement.

Comme nous l'avons signalé dans un précédent chapitre, les mécanismes d'action nucléaires de l'acide rétinoïque ne sont qu'une des composantes de l'action cellulaire de cette molécule.

Les mécanismes intimes régulant les processus de différenciation et de transformation maligne font intervenir les teneurs intracellulaires en calcium et AMPc ; tous deux sont des seconds messagers intracellulaires qui agissent sur les protéine-kinases (PKA et PKC). Lors de la différenciation des cellules HL-60 induite par l'AR, une augmentation de la PKA ainsi que de la PKC a été observée démontrant ainsi l'implication de ces systèmes de transduction (Olsson *et al.*, 1982 ; Makowske *et al.*, 1988). De plus, certains rétinoïdes, dont l'acide rétinoïque, stimulent l'activité des protéine-kinases AMPc et calcium dépendantes de différents systèmes cellulaires induisant une différenciation (Plet *et al.*, 1982). Enfin, la potentialisation par l'AMPc de l'effet de l'acide rétinoïque sur la transglutaminase de tissu a déjà été démontrée (Murtaugh *et al.*, 1986).

Dans le but d'explorer l'implication éventuelle des protéine-kinases dans le mécanisme d'induction de la transglutaminase par les rétinoïdes, des expériences ont été menées par D. Manechez. Dans celles-ci, les incubations des cellules HL-60 avec de l'AR ont été réalisées en présence d'inhibiteurs de la protéine-kinase A (H-8) ou de la protéine-kinase C (H-7). Les résultats font apparaître que H-7 modifie de manière importante la réponse induite par l'AR (Figure 39). En effet, la courbe obtenue en présence de H-7 présente un maximum d'induction légèrement supérieur au plateau obtenu avec Ch55 seul (Figure 40). Par contre, il est à noter que les mêmes expériences menées avec Ch55 ne font pas apparaître de variation significative (Figure 41). H-8 quant à lui n'a que très peu d'effet sur l'induction de la transglutaminase de tissu par l'AR (Figure 39). La Figure 42 montre le contrôle de l'activité de H-8.

Enfin, le rôle probable de la PKC dans le contrôle de l'expression de la TG II induite par l'AR a été confirmé par l'utilisation de l'ester de phorbol (TPA), un activateur connu de la PKC. En effet, quand le TPA était ajouté 24 heures après le début de l'incubation des cellules HL-60 avec les rétinoïdes, une augmentation significative de l'induction était observée (Figure 43).

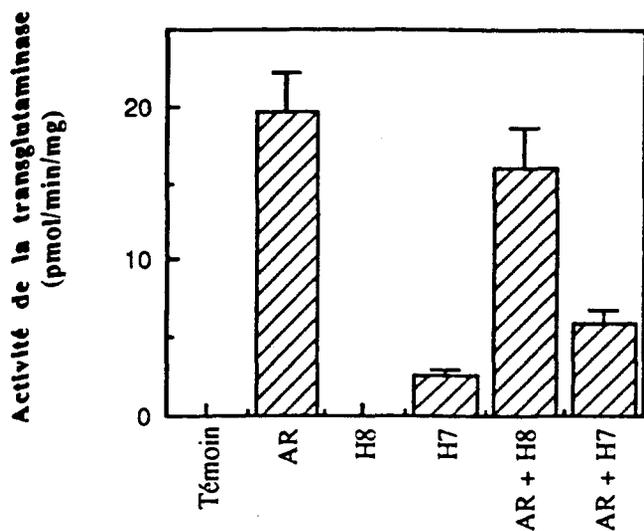


Figure 39 : Effet de l'AR $1\mu\text{M}$, de H-8 $20\mu\text{M}$ et H-7 $20\mu\text{M}$ sur l'induction de la transglutaminase de tissu dans les cellules HL-60 pendant 48 heures.

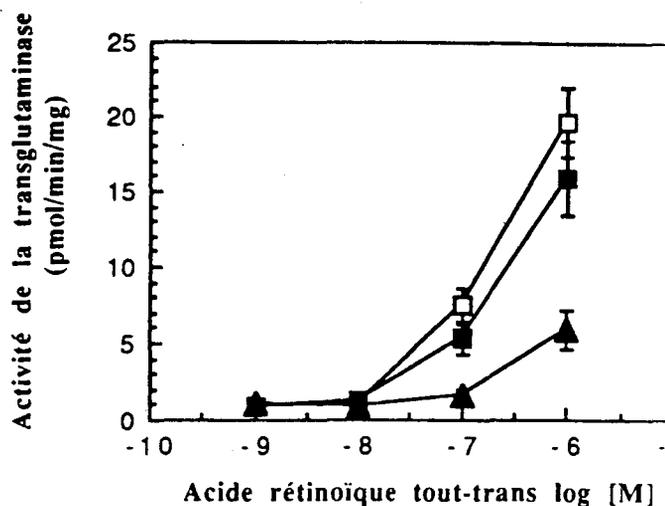


Figure 40 : Courbes dose-réponse de l'AR seul (□), en présence de H-8 (■) ou en présence de H-7 (▲) sur l'induction de la transglutaminase de tissu dans les cellules HL-60 pendant 48 heures.

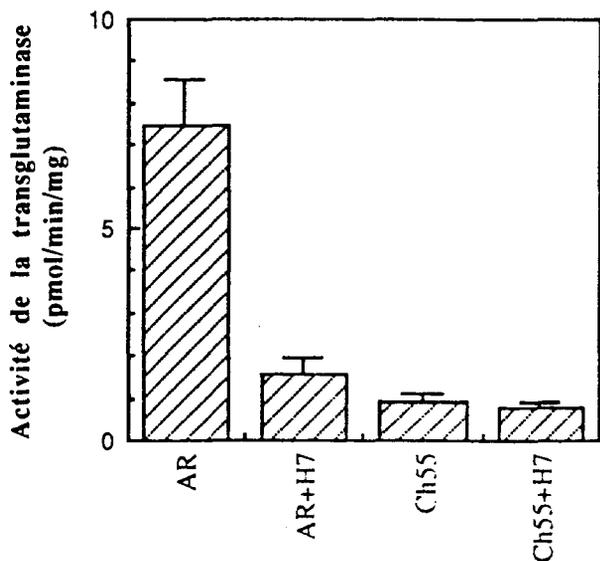


Figure 41 : Effets de l'AR à $0,1\mu\text{M}$ et de Ch55 à $0,1\mu\text{M}$, seuls ou en présence de H-7 à $20\mu\text{M}$, sur l'induction de la transglutaminase de tissu dans les cellules HL-60.

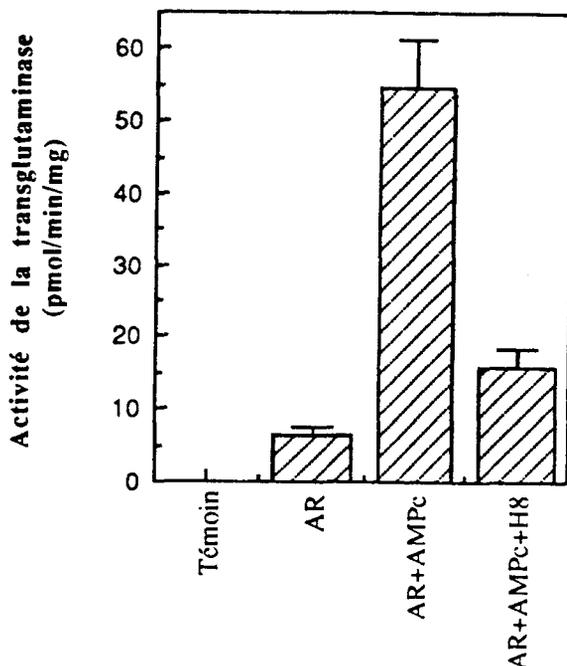


Figure 42 : Effets de l'AR à $1\mu\text{M}$ seul ou en présence de dibutylAMPc à 1mM , en absence ou en présence de H-8 à $20\mu\text{M}$ sur l'induction de la transglutaminase dans les cellules HL-60.

Ainsi en présence de TPA, l'induction de la TG II par Ch55 à 0,1 μ M atteint 68 % de l'induction induite par l'AR à la même concentration contre seulement 11 % en absence de TPA.

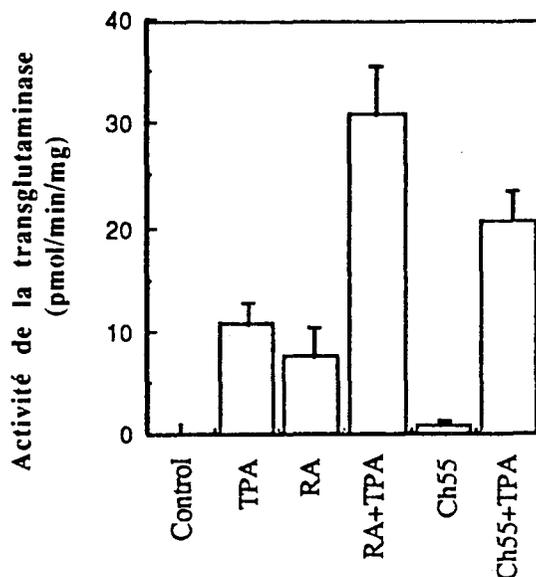


Figure 43 : Effets du TPA (10nM) sur l'induction de la transglutaminase par l'AR (0,1 μ M) et Ch55 (0,1 μ M) dans les cellules HL-60.

Une part importante du mécanisme conduisant à l'induction de l'enzyme par l'AR pourrait ainsi résulter d'une action directe (par une réaction de rétinoylation par exemple) ou indirecte de ce dernier sur la protéine kinase C. En fait, l'activité de l'AR dans cette réponse biologique pourrait être biphasique, avec l'implication des RARs dans la première partie de la courbe (10^{-10} à 10^{-8} M) ce qui expliquerait la petite activité présentée par Ch55. Puis à partir de 10^{-8} M, l'intervention de la protéine kinase C activée par l'AR (et non par Ch55) permettrait de phosphoryler certains facteurs de transcription qui à leur tour induiraient la transcription du gène de la transglutaminase de tissu.

Des travaux récents du groupe de Davies (Davies *et al.*, 1992) ont d'autre part démontré l'implication des récepteurs RXRs dans l'induction de la transcription de la transglutaminase par les rétinoïdes. Le TTNPB est un rétinoïde de troisième génération qui

lie les RARs mais pas RXR α et qui en outre possède un profil d'induction de la transglutaminase très similaire à celui de Ch55 (Figure 44). Dans cette étude américaine, les auteurs ont étudié l'activité d'un dérivé du TTNPB, le 3-méthyl TTNPB sur la réponse transglutaminase dans un sous clone de cellules HL-60 dépourvu de RARs mais dans lequel RXR α a été détecté. Dans ces cellules, l'AR ou le 3-méthyl TTNPB n'induisent pas de différenciation mais une induction de la transcription de la transglutaminase est observée de manière équivalente pour ces deux molécules.

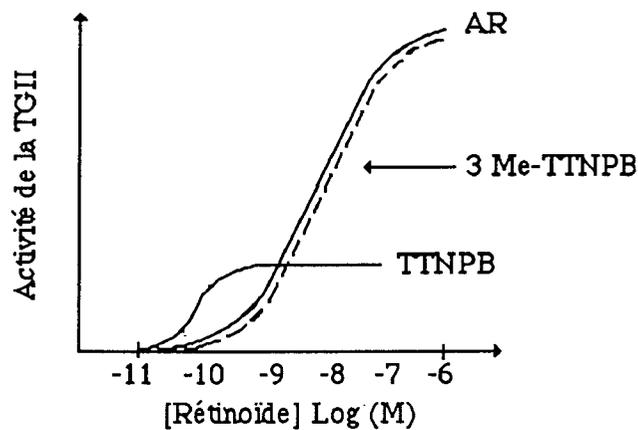


Figure 44 : Induction de la transglutaminase par l'AR, le TTNPB et le 3 méthyl-TTNPB.

Ainsi le TTNPB est incapable de lier RXR α et n'induit pas la transglutaminase alors que le 3-méthyl TTNPB est actif dans les deux cas. Cette sélectivité RAR / RXR pourrait également être à l'origine de l'induction différentielle de la transglutaminase par les acides rétinoïques tels que Ch55 ou le TTNPB et l'AR qui dans les cellules est isomérisé en 9-cis AR, ligand physiologique des RXRs.

III - CONCLUSION

Les résultats obtenus par l'équipe de Davies, en association avec nos propres travaux, suggèrent fortement que les deux réponses "différenciation" et "transglutaminase de tissu" sont induites par des mécanismes différents. La différenciation cellulaire provoquée par l'acide rétinoïque ou les rétinoïdes semble être induite *via* l'activation des

RARs, alors que l'expression de la TGII pourrait être régulée à la fois par les RARs et par les RXRs. Elle semble dépendre également de l'activation de la protéine-kinase C. Des travaux sont actuellement en cours dans l'équipe de P. Formstecher afin de préciser les relations qui existent entre ces différentes voies d'induction de la TGII par l'acide rétinoïque.

CONCLUSION

La chromatographie d'affinité en association avec la chromatographie d'échange d'ions haute performance nous a permis d'obtenir, en deux étapes seulement le récepteur RAR α avec un taux de pureté d'environ 90%. Les taux de purification des deux autres récepteurs après l'étape de chromatographie d'affinité étaient très proches de ceux obtenus pour RAR α (40-60%). Ainsi, le gel biospécifique que nous avons synthétisé au laboratoire semble être utilisable en première étape de purification des trois RARs. Les points faibles de cet outil restent cependant l'adsorption non spécifique assez élevée que l'on ne parvient pas à éliminer lors des lavages et également les rendements de purification assez faibles notamment pour RAR γ . Cependant, le problème majeur de cette purification ne provient pas de la technique utilisée, mais plutôt de la protéine étudiée. En effet, les récepteurs deviennent très instables lorsqu'ils sont purifiés, et ils perdent très rapidement leur fonctionnalité, notamment en ce qui concerne l'activité de liaison au ligand. Ce phénomène rend la caractérisation de ces protéines très difficile. Des études visant à améliorer la caractérisation des RARs purifiés sont actuellement en cours dans le laboratoire de P. Formstecher. D'autre part, la chromatographie d'affinité a également été appliquée à la purification des RARs produits dans *E. Coli*. Une nouvelle fois, nous avons observé une bonne efficacité de la technique, mais également une dégradation importante des récepteurs, encore supérieure à celle obtenue lors de la purification des RARs produits dans les cellules SF9.

Les recherches entreprises n'ont pour l'instant pas permis de mettre au point un nouvel antirétinoïde. L'étude des nouveaux ligands synthétisés au laboratoire est actuellement poursuivie dans l'équipe de P. Formstecher. Nous avons cependant obtenu un composé sélectif ($\alpha > \beta \gg \gamma$) dans les essais d'activité de liaison mais également de transactivation. Cette sélectivité a également été observée (Chapitre I, page 31) avec les premiers antirétinoïdes décrits qui possèdent eux aussi un groupement hydrophobe volumineux en partie centrale. Outre l'intérêt évident de ces molécules sélectives en thérapeutique, de tels composés devraient être des outils puissants pour l'étude des

récepteurs de l'acide rétinoïque et de leurs fonctions, utilisables notamment pour établir les relations récepteur - fonction dans la famille des RARs.

Les expériences sur la différenciation cellulaire et l'induction de la transglutaminase par l'acide rétinoïque et les rétinoïdes ont permis de mettre en évidence un nouveau mode d'action de l'acide rétinoïque. Ce résultat suggérant une action directe ou indirecte de l'acide rétinoïque sur la PKC dans le mécanisme d'induction de la transglutaminase II, démontre clairement l'intérêt des ligands de synthèse dans l'étude des mécanismes d'action de l'acide rétinoïque et des rétinoïdes.

L'étude du mécanisme d'action de l'acide rétinoïque et la recherche de nouvelles molécules (agonistes ou antagonistes) plus spécifiques de chaque récepteur constituent le thème central du travail présenté. Les approches utilisées (la chromatographie d'affinité, l'étude d'une réponse biologique : induction différentielle de la transglutaminase par les rétinoïdes, la recherche d'antagonistes), bien qu'assez différentes par leurs techniques, permettent, grâce à des démarches classiques du drug design, d'accéder à une meilleure connaissance du récepteur et de l'interaction ligand (acide rétinoïque) - récepteur. A plus long terme, ces recherches devraient permettre la mise au point de nouveaux médicaments plus efficaces et surtout moins toxiques.

PARTIE EXPERIMENTALE

Spectroscopie infra-rouge (IR)

Les spectres sont réalisés sur un spectrographe Perkin-Elmer 1310, sous forme de film pour les liquides ou en dispersion dans KBr pour les solides ; les fréquences d'absorption sont exprimées en nombre d'onde (cm^{-1}).

Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN ^1H sont enregistrés sur un appareil Brücker 80 MHz, avec le TMS pour référence interne ; chaque signal est repéré par son déplacement chimique δ (exprimé en ppm), sa morphologie (s = singulet ; d = doublet ; t = triplet ; q = quadruplet ; m = multiplet), son éventuelle constante de couplage (J en Hz) et son intensité.

Spectrométrie de masse (SM)

Les spectres de masse sont réalisés sur un spectromètre quadrupolaire Ribermag R 10-10 (couplé à un système informatique Riber 400) fonctionnant à 70 eV par impact électronique (IE) ou sur un spectromètre Kratos MS 50 RF (FAB : Fast Atom Bombardment) en utilisant le glycérol ou le thioglycérol comme matrice.

Chromatographie sur couche mince (CCM)

La pureté des produits est vérifiée systématiquement par chromatographie sur couche mince dans les conditions suivantes :

- support : gel de silice 60F 254 d'épaisseur 0,20 mm, référence 5735 Merck
- Systèmes solvants utilisés (s.s.) :

<u>s.s.1</u> :	hexane
<u>s.s.2</u> :	chloroforme 9 / éthanol 1
<u>s.s.3</u> :	acétone 4 / toluène 3 / hexane 3
<u>s.s.4</u> :	hexane 4 / dichlorométhane 6
<u>s.s.5</u> :	dichlorométhane
<u>s.s.6</u> :	éthanol 2 / hexane 2 / toluène 2 / acétone 4
<u>s.s.7</u> :	acétate d'éthyle 1 / dichlorométhane 9
<u>s.s.8</u> :	dichlorométhane 9 / méthanol 1
<u>s.s.9</u> :	dichlorométhane 8 / hexane 2
<u>s.s.10</u> :	hexane 8 / acétate d'éthyle 2

Point de fusion (F)

Les points de fusion sont déterminés à l'aide d'un appareil de Tottoli (Büchi 510), ils ne sont pas corrigés et sont exprimés en $^{\circ}\text{C}$.

3.5-DITERTIOBUTYL TOLUENE 1

Réactifs

Toluène : 50g (0,54 mole) ; Chlorure de tertiobutyle : 101g (1,09 mole) ; Chlorure d'aluminium : 2,8g (0,02 mole).

Mode opératoire

Le travail est effectué en milieu anhydre. Le toluène et le chlorure de tertiobutyle sont introduit dans un erlen rodé de 250ml surmonté d'un piège à humidité. Durant 4 heures environ, et sous agitation magnétique, le chlorure d'aluminium est ajouté par petites portions. La réaction se développe durant 18 heures en maintenant l'agitation. La solution obtenue est alors versée dans un mélange de glace pilée et de 150ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1 N. On laisse le tout sous agitation magnétique jusqu'à décoloration complète de la phase huileuse et on extrait celle-ci avec de l'éther (3 x 30ml). Ensuite, la phase étherée est lavée à l'eau puis avec une solution aqueuse de bicarbonate de sodium 1N (2 x 30ml), séchée sur sulfate de sodium et filtrée. Après évaporation de l'éther, puis distillation sous pression réduite on obtient une huile incolore.

Résultats

Rendement : 49 % (54g) ; E : 112-125°C (25 mm Hg) ; C.C.M. (s.s.1) : Rf = 0,7 ; I.R. : 890-850-710 cm^{-1} (Ar trisubstitué en 1,3,5) ; R.M.N. (CDCl_3) : 1,3 ppm (s, 18H, tBu), 2,3 ppm (s, 3H, CH_3), 7,2 ppm (m, 3H, Ar).

ACIDE-3, 5-DITERTIOBUTYL BENZOIQUE 2

Réactifs

Produit 1 : 30g (0,14 mole) ; Pyridine : 103g ; Eau déminéralisée : 52g ; Hydroxyde de potassium : 12,8g ; Permanganate de potassium : 58g.

Mode opératoire

Le produit 1, la pyridine, l'eau et l'hydroxyde de potassium sont introduit dans un erlen rodé de 500ml surmonté d'une ampoule de coulée et d'un réfrigérant. Après avoir chauffé ce mélange à 95°C sous agitation magnétique, on ajoute par petites portions, durant 3 heures environ, le permanganate de potassium. Une fois l'addition terminée, on maintient l'agitation et le chauffage pendant 90 minutes. Le mélange est filtré afin d'éliminer le dioxyde de manganèse formé. Ce dernier est lavé avec 200ml d'une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium 2N. Le produit 1 qui n'a pas réagi est extrait avec de l'éther (3 x 30ml). La phase aqueuse est concentrée et acidifiée avec une solution aqueuse d'acide sulfurique 4N. Le produit attendu précipite. Après avoir filtré puis lavé le produit brut à l'eau froide, il est recristallisé dans un mélange d'eau et d'acide acétique. On obtient une poudre blanche.

Résultats

Rendement : 70 % (24,1g) ; F : 165 °C ; C.C.M. (s.s.2) : Rf = 0,7 ; I.R. : 3200-2500 cm^{-1} (O-H, acide), 1680 cm^{-1} (COOH) ; R.M.N. (CDCl_3) : 1,4 ppm (s, 18H, tBu), 7,8 ppm (m, 3H, Ar), 10,1 ppm (s, 1H, COOH).

CHLORURE DE-3, 5-DITERTIOBUTYL BENZOYLE 3**Réactifs**

Solution 1 : Produit 2 : 40g (0,15 mole), Chloroforme anhydre : 75ml, Pyridine : 0,5ml ;

Solution 2 : Chlorure de thionyle : 31g (0,26 mole), Chloroforme anhydre : 75ml.

Mode opératoire

Dans un ballon de 500ml surmonté d'une ampoule de coulée et d'un réfrigérant lui-même surmonté d'un piège à humidité, la solution 1 est introduite et chauffée à reflux. La solution 2 est ajoutée en veillant à maintenir le reflux. On laisse ainsi pendant 90 minutes. Ensuite le chlorure de thionyle en excès est évaporé par trois entraînements chloroformiques puis on distille sous pression réduite.

Résultats

Rendement : 88 % (35,2g) ; E : 188 -192 °C (16 mm Hg) ; C.C.M. (s.s.2) : Rf = 0,9 ; I.R. : 1770 cm^{-1} (C=O, chlorure d'acide) ; R.M.N. (CDCl_3) : 1,4 ppm (s, 18H, tBu), 7,8 ppm (m, 3H, Ar).

3, 5-DITERTIOBUTYL ACETOPHENONE 4**Réactifs**

Solution 1 : Magnésium : 4,4g (0,18 mole), Ethanol absolu : 7,2ml, Tétrachlorure de carbone : 0,72ml, Ether absolu : 73ml ; Solution 2 : Malonate d'éthyle : 29,2g (0,18 mole), Ethanol absolu : 18,2ml, Ether absolu : 21,7ml ; Solution 3 : Produit 3 : 41,4g (0,16 mole), Ether absolu : 50ml ; Solution 4 : Eau déminéralisée : 36,2ml, Acide acétique glacial : 72,3ml, Acide sulfurique concentré : 9,14ml.

Mode opératoire

Le travail est effectué en milieu anhydre. Dans un ballon de 500ml surmonté d'une ampoule de coulée et d'un réfrigérant lui-même surmonté d'un piège à humidité, la solution 1 et l'éther absolu sont introduit avec précautions, puis le mélange réactionnel est placé au bain marie afin d'obtenir un reflux. La solution 2 est additionnée au mélange à une vitesse qui maintient un reflux rapide, si possible sans chauffage et, le reflux est maintenu jusqu'à dissolution complète du magnésium. Ensuite, lentement, la solution 3 est ajoutée et le mélange réactionnel devient vert. Le reflux est laissé ainsi encore 1 heure, puis l'éthanol et l'éther sont évaporés. Après avoir laissé le résidu refroidir, il est acidifié avec une solution aqueuse d'acide sulfurique 2N. La solution devient rose. Le produit est extrait avec de l'éther (3 x 30ml). La phase étherée est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de

sodium et filtrée. Après évaporation de l'éther le produit est mis dans un ballon de 250 ml où l'on ajoute la solution 4. Pendant 12 heures, le mélange est chauffé à reflux, puis refroidi dans un bain de glace. Après alcalinisation avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 20 % jusqu'à pH = 9-10, le produit est extrait avec de l'éther (3 x 30ml). La phase étherée est lavée à l'eau et séchée sur sulfate de sodium. Après évaporation de l'éther, puis distillation sous pression réduite (E : 185°C sous 20 mm Hg) on recristallise le produit dans l'éthanol pour obtenir des cristaux blancs.

Résultats

Rendement : 72 % (27,4g) ; F : 39°C ; C.C.M. (s.s.1) : Rf = 0,6 ; I.R. : 1710 cm⁻¹ (C=O, cétone); R.M.N. (CDCl₃) : 1,35 ppm (s, 18H, tBu), 2,6 ppm (s, 3H, CH₃), 7,7 ppm (m, 3H, Ar).

2-HYDROXY-4-METHYL BENZOATE D'ETHYLE 5

Réactifs

Acide-4-méthyl salicylique : 30g (0,197 mole), Ethanol 95° : 200ml, HCl gazeux.

Mode opératoire

Dans un erlen rodé de 500ml, l'acide-4-méthyl salicylique et l'éthanol sont introduit et mis sous agitation magnétique. On fait buller dans ce mélange de l'acide chlorhydrique gazeux jusqu'à saturation. Pendant 12 heures le produit est chauffé à reflux puis l'excès d'éthanol est évaporé. L'acide en excès précipite. Le produit est filtré et l'huile obtenue est distillée sous pression réduite.

Résultats

Rendement : 68 % (24,2g) ; E : 140-145°C (10 mmHg) ; C.C.M. (s.s.4) : Rf = 0,8 ; I.R. : 3150 cm⁻¹ (O-H), 1670 cm⁻¹ (C=O) ; R.M.N. (CDCl₃) : 1,4 ppm (t, 3H, CH₃CH₂), 2,3 ppm (s, 3H, CH₃ Ar), 4,4 ppm (q, 2H, CH₂), 7,4 ppm (m, 3H, Ar), 10,9 ppm (s, 1H, OH).

2-ACETOXY-4-METHYL BENZOATE D'ETHYLE 6

Réactifs

Produit 5 : 24,2g (0,13 mole), Anhydride acétique : 60ml, Pyridine : quelques gouttes.

Mode opératoire

Dans un ballon de 250ml, tous les réactifs sont introduit pour être chauffés à reflux pendant 5 heures. L'excès d'anhydride acétique est évaporé puis le résidu est repris dans de l'eau. Le produit est extrait avec de l'éther (3 x 30ml) et la phase étherée est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium et filtrée. L'éther est évaporé pour obtenir une huile jaune.

Résultats

Rendement : 91 % (27,1g) ; C.C.M. (s.s.5) : Rf = 0,8 ; I.R. : 1770 cm⁻¹ (C=O, acétate de phényle), 1740 cm⁻¹ (C=O, ester arylique) ; R.M.N. (CDCl₃) : 1,4 ppm (t, 3H, CH₃CH₂), 2,3 ppm (s, 3H, CH₃Ar), 2,4 ppm (s, 3H, CH₃COOAr), 4,4 ppm (q, 2H, CH₂), 7,5 ppm (m, 3H, Ar).

2-ACETOXY-4-DIACETOXYMETHYL BENZOATE D'ETHYLE 7

Réactifs

Solution 1 : Produit 6 : 7,5g (0,034 mole), Anhydride acétique : 75ml ; Solution 2 : Oxyde de chrome (VI) : 13,5g, Anhydride acétique : 113ml, Acide acétique glacial : 75ml; Acide sulfurique concentré : 7,5ml ; Isopropanol : 90ml.

Mode opératoire

Dans un erlen de 500ml, la solution 1 est introduite et refroidie à -15°C sous agitation magnétique. La solution 2 est mise dans un erlen de 500ml et refroidie à 0°C sous agitation magnétique. Lorsque cette température est atteinte, l'acide sulfurique concentré est ajouté lentement, puis le mélange est retiré du bain de glace. Le tout est laissé sous agitation jusqu'à dissolution complète de l'oxyde de chrome. La solution 2 est ajoutée à la solution 1 goutte à goutte en veillant à ce que la température du mélange réactionnel soit comprise entre -15°C et -10°C. Après avoir maintenu le mélange réactionnel à -10°C pendant 90 minutes, puis à 0°C pendant 90 minutes, toujours sous agitation magnétique, l'isopropanol est ajouté à une vitesse qui maintient la température du mélange inférieure à 15°C. Ensuite l'isopropanol est évaporé et 50g de glace pilée sont ajoutés et laissés pendant 1 heure. Le produit est extrait avec du chloroforme (3 x 30 ml). Après avoir lavé la phase chloroformique à l'eau, puis avec une solution aqueuse de bicarbonate de sodium 1N (3 x 30ml), elle est séchée sur sulfate de sodium et filtrée. Le chloroforme est évaporé et on obtient une huile qui cristallise. Elle est recristallisée dans le méthanol pour obtenir des cristaux blancs.

Résultats

Rendement : 52 % (6g) ; C.C.M. (s.s.5) : Rf = 0,8 ; I.R. : 1740 cm⁻¹ (C=O, ester) ; R.M.N. (CDCl₃) : 1,4 ppm (t, 3H, CH₃CH₂), 2,2 ppm (s, 6H, CH₃COOCH), 2,4 ppm (s, 3H, CH₃COOAr), 3,5 ppm (s, 1H, CH), 4,4 ppm (q, 2H, CH₃CH₂), 7,6 ppm (m, 3H, Ar).

4-FORMYL SALICYLATE D'ETHYLE 8

Réactifs

Produit 7 : 5g (0,015 mole) ; Méthanol : 35ml ; Acide sulfurique concentré : 1,5ml.

Mode opératoire

Dans un ballon de 100 ml, tous les réactifs sont introduit et chauffés à reflux pendant 5 heures. Après évaporation de l'excès de méthanol, 25g de glace sont ajoutés au résidu et laissés ainsi 30 minutes. Le produit est extrait avec du chloroforme (3 x 20ml). La phase chloroformique est lavée à l'eau, puis avec une solution aqueuse de bicarbonate 1N (3 x 30ml). Le chloroforme est séché sur sulfate de sodium, filtré et évaporé pour obtenir une huile jaune qui cristallise. Après recristallisation dans l'éther de pétrole on obtient une poudre jaunâtre.

Résultats

Rendement : 58 % (1,7g) ; F : 45°C ; C.C.M. (s.s.4) : Rf = 0,5 ; I.R. : 2720 cm⁻¹ (CHO), 1700 cm⁻¹ (C=O) ; R.M.N. (CDCl₃) : 1,4 ppm (t, 3H, CH₃), 4,4 ppm (q, 2H, CH₂), 7,6 ppm (m, 3H, Ar), 10 ppm (s, 1H, CHO), 11 ppm (s, 1H, OH).

1-BROMO-3-TERTIOBUTYL OXYCARBONYLAMINO PROPANE 9**Réactifs**

Triéthylamine : 5,6ml ; Dichlorométhane : 50ml ; Carbonate de ditertiobutyle : 4,5g (0,026 mole) ; Chlorhydrate de 3-bromo propylamine : 4,5g (0,021 mole).

Mode opératoire

Dans un erlen rodé de 100ml, la triéthylamine, le dichlorométhane et le carbonate de diterbutyle sont introduit et laissés quelques minutes sous agitation magnétique. Puis le chlorhydrate de 3-bromo propylamine est ajouté lentement. Un sel blanc se forme. La réaction se développe pendant 12 heures puis le mélange réactionnel est filtré. Le filtrat est lavé à l'eau (3 x 20ml), puis avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N (3 x 20ml). Après séchage sur sulfate de sodium puis filtration, le dichlorométhane est évaporé. On obtient une huile jaune qui cristallise au bout de quelques heures.

Résultats

Rendement : 80 % (4g) ; F : 38°C ; I.R. : 3320 cm⁻¹ (N-H), 1690 cm⁻¹ (C=O) ; R.M.N. (CDCl₃) : 1,4 ppm (s, 9H, CH₃), 2,1 ppm (m, 2H, CH₂), 3,3 ppm (m, 4H, CH₂), 4,9 ppm (s, 1H, NH) ; S.M. : M⁺ = 238.

2-(3-TERTIOBUTYL OXYCARBONYLAMINO PROPANOXY)-4-FORMYL BENZOATE D'ETHYLE 10**Réactifs**

Hydruure de sodium à 97 % : 0,2000g (8,1 mmoles) ; Diméthylformamide anhydre : 15ml ; Produit 8 : 1,3292g (6,8 mmoles) ; Produit 9 : 1,7890g (7,5 mmoles).

Mode opératoire

Dans un ballon de 50ml surmonté d'un piège à humidité, l'hydruure de sodium et le diméthylformamide sont introduit. Le produit 8 est ajouté sous agitation magnétique et

lorsque le dégagement d'hydrogène est terminé, le produit 9 est ajouté toujours sous agitation magnétique. Après avoir chauffé à 60-65°C durant 6 heures, l'excès d'hydrure de sodium est détruit avec de l'eau. On évapore à sec et le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 10ml). La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium et filtrée. Après évaporation de l'acétate d'éthyle le produit est purifié par chromatographie sur colonne (silice/AcOEt 1/CH₂Cl₂ 9) pour obtenir une huile jaune pâle recristallisée dans l'hexane.

Résultats

Rendement : 42 % (1,02g) ; F : 75-76°C ; C.C.M. (s.s.7) : Rf = 0,35 ; I.R. : 3360 cm⁻¹ (NH), 2720 cm⁻¹ (CHO), 1740-1670 cm⁻¹ (C=O) ; R.M.N. (CDCl₃) : 1,4 ppm (t, 3H, CH₃CH₂), 1,5 ppm (s, 9H, CH₃ tBu), 2,2 ppm (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3,4 ppm (q, 2H, CH₃CH₂), 4,2 ppm (t, 2H, CH₂NH), 4,4 ppm (q, 2H, OCH₂), 5,6 ppm (s, 1H, NH), 7,4-8 ppm (m, 3H, Ar) ; 10 ppm (s, 1H, CH) ; S.M. : [M⁺ + Na] = 374.

ACIDE-(E)-2'-(3-TERTIOBUTYL OXYCARBONYLAMINO PROPANOXY)-4-(3-(3,5-DITERTIOBUTYL PHENYL)-3-OXO-1-PROPENYL) BENZOIQUE 11

Réactifs

Produit 4 : 0,2118g (9,12.10⁻⁴ mole) ; Produit 10 : 0,2091g (5,95.10⁻⁴mole) ; Ethanol 95° : 7ml ; Solution aqueuse de soude 2N : 3ml.

Mode opératoire

Dans un ballon de 100ml, le produit 4, l'éthanol et la solution aqueuse de soude sont introduit. Le produit 1 est ajouté lentement sous agitation magnétique et la réaction se développe ainsi pendant 60 heures à température ambiante. Après avoir acidifié avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N (pH > 4) l'éthanol est évaporé. Le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 20ml), et la phase organique est lavée à l'eau. Après séchage sur sulfate de sodium, l'acétate d'éthyle est évaporé et on purifie partiellement le produit par chromatographie sur colonne (silice/MeOH 1/CH₂Cl₂ 9).

Résultats

Rendement : 45% ; C.C.M. (s.s.8) : Rf = 0,6 ; I.R. : 3320 cm⁻¹ (NH), 1700 cm⁻¹ (C=O, acide) ; R.M.N. (CDCl₃) : 1,3 ppm (s, 9H, tBu), 1,4 ppm (s, 18H, tBu), 2,1 ppm (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3,4 ppm (q, 2H, CH₂NH), 4,3 ppm (t, 2H, OCH₂), 5,2 ppm (m, 1H, NH), 7,2-7,8 ppm (m, 8H, Ar et éthyléniques) ; S.M. : M⁺ = 537.

TRIFLUOROACETATE DE L'ACIDE-(E)-2'-(3-AMINOPROPANOXY)-4-(3-(3,5-DITERTIOBUTYL PHENYL)-3-OXO-1-PROPENYL) BENZOIQUE 12

Réactifs

Produit 11 : 0,3130g (5,8.10⁻⁴ mole) ; Acide trifluoroacétique : 10ml ; Dichlorométhane : 10ml ; Anisole : quelques gouttes.

Mode opératoire

Dans un ballon de 50ml, on introduit le produit 11, le mélange acide trifluoroacétique / dichlorométhane et on ajoute de l'anisole. Le produit est laissé ainsi sous agitation magnétique pendant une heure. Après évaporation à sec, le résidu est repris dans l'éthanol et évaporé. Ceci 4 fois de suite pour obtenir une huile marron que l'on purifie par chromatographie sur colonne (silice/MeOH 8/CH₂Cl₂ 2).

Résultats

Rendement : 89% (0,314g) ; C.C.M. (s.s.8) : Rf = 0,15 ; I.R. : 1700 cm⁻¹ (C=O) ; R.M.N. (CDCl₃) : 1,35 ppm (s, 18H, tBu), 2,2 (m, 2H, CH₂CH₂CH₂), 3,3 ppm (m, 2H, CH₂NH) 4,3 ppm (t, 2H, OCH₂), 7,1-7,8 ppm (m, 8H, Ar et éthyléniques) ; S.M. : M⁺ = 438 (partie positive de la molécule).

PREPARATION DES GELS D'AFFINITE BrCN 13

1. Activation au bromure de cyanogène, greffage du bras espaceur et couplage du ligand

A) Activation et fixation du bras

Réactifs

Solution de bromure de cyanogène dans l'acétonitrile : 50ml d'acétonitrile distillé sont ajoutés à un flacon de 100g de BrCN. Après dissolution complète, on obtient 97,1ml de solution à 1,03g de BrCN/ml ; Tampon phosphate de potassium 5M, pH 11,9 : K₃PO₄ (3,33 M) : 70,7g, K₂HPO₄ (1,67 M) : 29,1g, Eau distillée : qsp 100ml ; Tampon bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 9,5 : NaHCO₃ 8,4g, Eau distillée : qsp 1000ml ; Tampon bicarbonate de sodium 0,2 M, pH 9,5 : NaHCO₃ : 16,8g, Eau distillée : qsp 1000ml ; Tampon acétate de sodium 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 4,0 : Acétate de sodium : 8,2g, NaCl : 29,3g, Eau distillée : qsp 1000ml ; Urée 2 M, NaCl 0,5 M : Urée : 120g, NaCl : 29,3g, Eau distillée : qsp 1000ml ; Tampon bicarbonate de sodium 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 10,0 : NaHCO₃ : 8,4g, NaCl : 29,3g, Eau distillée : qsp 1000ml ; Solution de l'acide aminé à coupler : Acide-7-aminoheptanoïque: 150mg dans 25ml de tampon bicarbonate de sodium 0,2 M pH 9,5.

Mode opératoire

Le Sépharose CL 4B (Pharmacia) est lavé à l'eau (10 volumes d'eau pour un volume de gel) et 1 volume de gel (25ml) est mis en suspension dans un volume de tampon phosphate 5 M pH 11,9. Le mélange est agité lentement avec un agitateur magnétique et accéléré juste avant d'ajouter en une seule fois 0,5ml de la solution de BrCN. Après deux minutes de contact, le gel est transféré sur un fritté et lavé à 4°C avec 10 volumes de tampon bicarbonate 0,1 M, 10 volumes d'eau et enfin 10 volumes de bicarbonate 0,2 M. Ces lavages ne doivent pas excéder deux minutes. 2ml de gel sont prélevés pour les

dosages des cyanates et des imidocarbonates. Le gel est alors transféré dans un tube à vis contenant un volume de la solution d'acide-7-aminoheptanoïque à coupler, refroidie à 4°C. Le couplage est poursuivi pendant 20 heures à 4°C sous agitation rotative. Le gel est ensuite lavé avec 20 volumes de tampon acétate 0,1 M pH 4, 20 volumes d'une solution d'urée 2 M, 20 volumes de tampon bicarbonate 0,1 M pH 10 (ces trois solutions renferment également 0,5 M de NaCl), puis 20 volumes d'eau distillée. Le gel est conservé dans un volume d'eau en présence de 0,02 % de NaN₃ à 4°C.

B) Couplage du ligand

Réactifs

Gel tassé : 5ml ; Ligand : 8mg (environ 15 μmol) ; DCCI : 100mg ; N-hydroxysuccinimide : 50mg ; DIEA : 400 μl.

Mode opératoire

Le gel est lavé avec successivement 10 volumes d'eau, 10 volumes d'un mélange eau/éthanol (1/1), 10 volumes d'éthanol absolu, 10 volumes d'un mélange éthanol / DMF (1/1), et enfin 10 volumes de DMF anhydre, celui-ci est placé dans une fiole à vide avec 5ml de DMF anhydre, la DCCI et la N-hydroxysuccinimide. Il est tiré sous vide quelques minutes. Le tout est transféré dans un tube vissé et agité 4 heures à 4°C. Le gel est lavé avec 10 volumes de DMF refroidi à 4°C. Dans un tube à essai, 8mg de ligand, 1ml de DMF anhydre et 400 μl de DIEA sont préparés. Un échantillon de cette solution est préparé pour la mesure à t = 0 de la densité optique à 305 nm. Le solution est introduite dans un tube vissé contenant le gel en suspension dans 5ml de DMF et laissé 12 heures à 4°C sur agitateur rotatif. Le gel est lavé 5 fois avec 2 volumes de DMF puis 1 fois avec 2 volumes d'un mélange éthanol / DMF (1/1), 2 volumes d'éthanol absolu, 2 volumes d'un mélange éthanol / eau (1/1) et enfin, 2 volumes d'eau. Le gel est conservé dans 5ml d'eau en présence de 0,02 % de NaN₃ ou dans l'éthanol à 20% à 4°C. Les différents éluats récupérés lors des lavages sont conservés pour la mesure des densités optiques.

2. Dosages

A) Dosage des fonctions cyanates portées par les gels activés au BrCN

Réactifs

Solution : Acide barbiturique : 300mg, Eau : 3ml, Pyridine distillée : 27ml.

Ce réactif est à préparer extemporanément car il jaunit même si on le conserve à - 20°C.

Dosage

A 0,5ml de gel humide fraîchement activé et lavé, on ajoute 5ml de réactif et l'on met au bain-marie à 40°C dans un tube à bouchon à vis pendant 25 minutes. Après centrifugation et dilution du surnageant, on effectue le dosage à 588 nm contre un témoin contenant du

gel non activé et placé dans les mêmes conditions. Le coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 137000$ est utilisé pour le calcul.

$$DO \times 5 \times 2 / 137 = \mu\text{moles} / \text{ml gel}$$

N.B. : Ce dosage est à faire dans l'heure qui suit la réaction d'activation car les fonctions cyanates sont peu stables.

B) Dosage des groupes imidocarbonates portés par les gels activés au BrCN

A 0,5ml de gel activé humide placé dans un tube à bouchon à vis, on ajoute 5ml de HCl 0,1 N. L'hydrolyse est effectuée au bain-marie sous agitation à 40°C pendant 30 minutes. Après centrifugation, on prélève 1ml du surnageant que l'on complète à 5ml avec de l'acétate de sodium 0,2 M, pH 5,5 (échantillon). Le dosage de l'ammoniac est effectué par gamme étalon avec un témoin contenant du gel non activé.

Réactifs

Solution : Hydrindantine : 176mg, Ninhydrine : 800mg, Ethylglycol monoéthyl éther : qsp 20ml.

Mode opératoire

A 1ml de l'échantillon, 4ml d'acétate de sodium 0,2M, pH 5,5 et 1,5ml de réactif sont ajoutés et laissés au bain-marie à 100°C pendant 20 minutes. On complète à 10ml avec une solution à 37% de formaldéhyde dans un mélange isopropanol / eau (1:1). On mesure alors la DO à 570 nm.

C) Dosage du ligand immobilisé

La densité optique des éluats dilués ou non est mesurée à 305 nm. Pour chaque éluat :

$$VOL.\text{éluat} \times DO \times Dilution = X \text{ Unités de DO}$$

La somme des DO des différents éluats est alors comparée à celle obtenue au temps $t = 0$.

La différence obtenue permet d'évaluer la quantité de ligand greffé.

PREPARATION DES GELS D'AFFINITE OXIRANES 14

1. Greffage du 1,8-dioxiranyl-2,7-dioxaoctane et couplage du ligand

A) Greffage du bras espaceur

Réactifs

1,8-dioxiranyl-2,7-dioxaoctane : 2ml ; Solution de NaOH 2N : 2ml.

Mode opératoire

10ml de gel Sépharose sont lavés avec 10 volumes d'eau. Le gel est introduit dans un flacon à vis, et mis en suspension dans 7ml d'eau. On ajoute 2ml de 1,8-dioxiranyl-2,7-dioxaoctane ainsi que 2ml de soude 2N. La réaction se développe pendant 5 heures à 20 °C. Puis le gel est lavé sur fritté avec 50 volumes d'eau. Un aliquote de gel est prélevé pour le dosage des fonctions époxyde.

B) Couplage du ligand**Réactifs**

Ligand : 6mg ; DIEA : 300 μ l ; Gel tassé : 5ml.

Mode opératoire

5ml de gel Oxirane sont lavés avec 10 volumes d'eau, 10 volumes d'un mélange eau/éthanol (1/1), 10 volumes d'éthanol absolu, 10 volumes d'un mélange éthanol/DMF et enfin 10 volumes de DMF. Dans un tube à essai, 6mg de ligand sont dissout dans 2ml de DMF et 300 μ l de DIEA sont ajoutés. Un échantillon de cette solution est prélevé pour la mesure de la densité optique à $t = 0$. Le produit est mis en suspension dans une fiole à vide et les 5ml de gel lavé dans 8ml de DMF. La solution de ligand est ajoutée et tirée sous vide quelques minutes. Le tout est placé dans un tube vissé et la réaction se développe pendant 12 heures à 20°C sous agitation rotative. Le gel est lavé sur fritté 5 fois avec 2 volumes de DMF, une fois avec 2 volumes d'un mélange eau/DMF et enfin une fois avec 2 volumes d'eau. Les éluats sont conservés pour les mesures de densité optique. Le gel est conservé dans un volume de tampon phosphate de sodium 0,5 M, pH7 à 4°C.

2. Dosages**A) Dosage du bras porté par le gel****Réactifs**

Solution de thiosulfate de sodium 3M, pH 7 : 0,5ml ; Solution d'HCl 10^{-3} M ; Gel tassé : 0,5ml.

Mode opératoire

A 0,5ml de gel tassé, on ajoute 0,5ml de la solution de thiosulfate de sodium (pH7). Le pH de la solution est ramené à 7 par addition d'HCl jusqu'à ce que la réaction soit totale. La quantité de fonction époxyde présente sur le gel est calculée à partir du volume d'HCl versé afin de maintenir la neutralité.

B) Dosage du ligand immobilisé

Le mode opératoire de ce dosage est identique à celui décrit précédemment.

SYNTHESE AFFI-GEL 15**Réactifs**

Affi-Gel 10 : 22ml ; Ligand : 77mg ; Ethanol : 300ml ; Eau : 650ml ; DMF : 360ml ; DIEA: 500 μ l ; Ethanolamine 0,1M : 20ml.

Mode opératoire

22 ml d'Affi-Gel 10 dans l'isopropanol sont lavés avec 200 ml d'éthanol, 200 ml d'éthanol / eau (v/v), 200 ml d'eau, 200 ml d'eau / DMF (v/v), 200 ml de DMF et enfin mis en suspension dans 25 ml de DMF. Le ligand 12 (77 mg, 0,14 mmoles) est dissous dans 1 ml de DMF, en présence de 500 μ l de N,N diisopropyléthylamine (DIEA). Cette solution est alors mise en présence du gel et la réaction de couplage est poursuivie pendant 12 h à 4°C sous agitateur rotative. Le gel est ensuite filtré et lavé avec 20 ml de DMF, 20 ml de DMF / eau (v/v) puis 20 ml d'eau. Le gel est alors traité avec une solution à 0,1 M d'éthanolamine pendant 12 heures afin de désactiver les fonctions ester activées n'ayant pas réagit. Le gel est ensuite abondamment lavé à l'eau (200 ml) puis stocké à 4°C dans une solution à 20 % d'éthanol ou dans l'eau azidée à 0,02%.

4-FORMYL BENZOATE DE METHYL 16**Réactifs**

Acide-4-formyl benzoïque : 10g (0,066 mole) ; Méthanol : 100ml ; Acide sulfurique concentré : 2,5ml.

Mode opératoire

Dans un ballon de 100ml, tous les réactifs sont introduit et chauffés à reflux pendant 12 heures. Le méthanol est évaporé puis le résidu est mis dans de la glace pilée. Le produit est extrait avec du chloroforme (3 x 20ml) et la phase chloroformique est lavée à l'eau, puis avec une solution aqueuse de bicarbonate de sodium 1N (2 x 20ml). Après séchage de la phase chloroformique sur sulfate de sodium, le chloroforme est filtré et évaporé. Le résidu est constitué d'une huile (l'ester) et d'un précipité blanc (l'acide). On ajoute de l'hexane puis on filtre pour éliminer l'acide. On distille le filtrat sous pression réduite (E = 175°C sous 20mm Hg) et on obtient une poudre blanche par recristallisation dans le cyclohexane.

Résultats

Rendement : 68 % ; C.C.M. (s.s.2) : Rf = 0,85 ; I.R. : 1720 cm^{-1} (C=O, ester), 1680 cm^{-1} (CHO) ; S.M. : M⁺ = 164.

3', 5'-DITERTIOBUTYL PHENYL-3, 4-DIMETHOXY BENZOPHENONE 17**Réactifs**

Produit 3 : 5g (0,02 mole) ; Vétratole : 2,8g (0,02 mole) ; Chlorure d'aluminium : 2,5g (0,02 mole) ; Dichlorométhane anhydre : 15ml.

Mode opératoire

Dans un erlen rodé de 100ml surmonté d'un piège à humidité, sont introduit le vétratole, le produit 3 et le dichlorométhane puis, par petites portions (durant 2 heures environ) et sous agitation, on ajoute le chlorure d'aluminium. La solution est laissée ainsi à température ambiante pendant 15 heures. Elle est hydrolysée en versant le mélange réactionnel dans un mélange de glace pilée et d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N. Après avoir extrait le produit avec du dichlorométhane (3 x 20 ml) la phase organique est lavée à l'eau, puis avec une solution aqueuse de bicarbonate de sodium 1N (2 x 20ml). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium puis filtrée. Après avoir évaporé le dichlorométhane on obtient un solide orange clair qui est recristallisé dans l'éther de pétrole pour obtenir une poudre blanche.

Résultats

Rendement : 51 % (3,62g) ; F : 106°C ; I.R. : 2950 cm^{-1} (tBu), 1635 cm^{-1} (C=O, cétone Ar) ; C.C.M. (s.s.8) : Rf = 0,55 ; R.M.N. (CDCl_3) : 1,3 ppm (s, 18H, tBu), 3,9 ppm (s, 3H, CH_3), 4 ppm (s, 3H, CH_3), 6,9 ppm (d, 1H, CHAr), 7,4 ppm (d, 1H, CHAr), 7,5 ppm (s, 2H, CHAr), 7,7 ppm (s, 2H, CHAr) ; S.M. : $\text{M}^+ = 354$.

1, 1-[(3'', 4''-DIMETHOXY PHENYL)-3', 5'-DITERTIOBUTYL PHENYL]-2-(4-BENZOATE DE METHYLE) ETHYLENE 18

Réactifs

Solution 1 : Produit 17 : 1,0984g (3,1 mmoles), Produit 16 : 0,5088g (3,1 mmoles), Tétrahydrofuranne : 60ml ; Tétrachlorure de titane : 3,5g (0,018moles) ; Zinc en poudre : 2,3g (0,035 moles).

Mode opératoire

Dans un ballon de 250ml surmonté d'un réfrigérant lui-même surmonté d'un piège à humidité, sont introduit le zinc et le tétrahydrofuranne et cette suspension est mise à -10°C sous agitation et sous atmosphère d'argon. Goutte à goutte le tétrachlorure de titane est ajouté puis le mélange est porté à température ambiante. La solution est portée à reflux pendant 2 heures et refroidie à température ambiante puis ajoutée goutte à goutte à la solution 1. On porte de nouveau à reflux pendant 2 heures et on refroidi. Dans 300ml d'une solution aqueuse de carbonate de potassium à 10 % sous agitation, on verse le mélange réactionnel. Le produit est extrait avec de l'éther (3 x 50ml), la phase étherée est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium et filtrée. Après évaporation de l'éther, une huile jaune est obtenue. On ajoute du cyclohexane et on filtre. Le filtrat est évaporé, puis le résidu est repris par de l'isopropanol. Le précipité obtenu est filtré puis on évapore. Le résidu est repris par du méthanol et filtré à nouveau pour obtenir une poudre jaune.

Résultats

C.C.M. (s.s.9) : Rf = 0,43 ; I.R. : 2950 cm⁻¹ (tBu), 1710 cm⁻¹ (C=O, ester) ; R.M.N. (CDCl₃) : 1,35 ppm (s, 18H, tBu) ; 3,7 ppm (s, 3H, CH₃), 3,8 ppm (s, 3H, CH₃), 3,9 ppm (s, 3H, CH₃), 6,70 ppm (d, 1H, CHAr a), 6,74 ppm (d.d, 1H, CHAr b), 6,81 ppm (d, 1H, CHAr c), 6,93 ppm (s, 1H, CHAr h), 7,13 ppm (d, 2H, CHAr f), 7,21 ppm (d, 2H, CHAr d), 7,40 ppm (t, 1H, CHAr e), 7,82 ppm (d, 2H, CHAr g) ; S.M. : M⁺ = 486.

ACIDE 2-(1, 1-[(3'', 4''-DIMETHOXY PHENYL)-3', 5'-DITERTIOBUTYL PHENYL] ETHYLENE) BENZOIQUE 19

Réactifs

Produit 18 : 0,300g (0,62 mmoles) ; Méthanol : 5ml ; Solution aqueuse d'hydroxyde de potassium 2N : 2ml.

Mode opératoire

Dans un ballon de 50ml, tous les réactifs sont introduit et agités à température ambiante pendant 36 heures. On neutralise avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N et on évapore. Le résidu est repris par de l'eau et le produit est extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 20ml). La phase organique est lavée à l'eau (3 x 10ml) puis séchée sur sulfate de sodium. L'acétate d'éthyle est évaporé et le résidu repris par de l'hexane. Un précipité jaune se forme. Après filtration et lavage avec de l'hexane, on obtient une poudre jaune.

Résultats

C.C.M. (s.s.7) : Rf = 0,3 ; I.R. : 3200-2500 (OH, acide), 1680 cm⁻¹ (C=O, acide) ; R.M.N. (CDCl₃) : 1,35 ppm (s, 18H, tBu), 3,7 ppm (s, 3H, CH₃), 3,9 ppm (s, 3H, CH₃), 6,70 ppm (d, 1H, CHAr a), 6,74 ppm (d.d, 1H, CHAr b), 6,81 ppm (d, 1H, CHAr c), 6,93 ppm (s, 1H, CHAr h), 7,13 ppm (d, 2H, CHAr f), 7,21 ppm (d, 2H, CHAr d), 7,40 ppm (t, 1H, CHAr e) ; 7,82 ppm (d, 2H, CHAr g) ; S.M. : M⁺ = 472.

3', 5' - DITERTIOBUTYL PHENYL-4-METHOXY BENZOPHENONE 20

Réactifs

Produit 3 : 8,1g ; Anisole : 3,8g ; Dichlorométhane : 30ml ; Chlorure d'aluminium : 4,1g.

Mode opératoire

Dans un erlen de 100ml surmonté d'un piège à humidité, le produit 3, l'anisole et le dichlorométhane anhydre sont introduit. Par petites portions, le chlorure d'aluminium est ajouté pendant deux heures. On laisse à température ambiante pendant 22 heures sous agitation magnétique. Ensuite le milieu réactionnel est hydrolysé avec un mélange de 100ml d'acide chlorhydrique 1N et 50g de glace. Le produit est extrait avec du dichlorométhane. La phase organique est lavée avec 20ml d'eau, 20ml d'une solution d'hydrogénocarbonate de sodium 1N et avec 20ml d'eau, puis séchée sur sulfate de

soduim, filtrée et le solvant évaporé. Une huile est obtenue et purifiée par chromatographie sur colonne (SiO_2 ; cyclohexane 9 / dichlorométhane 1) pour obtenir une poudre blanche recristallisée dans l'éther de pétrole.

Résultats

Rendement : 21 % (2,100g) ; F : 85°C ; C. C. M. (s. s. 7) : $R_f = 0,4$; I. R. : 2950 cm^{-1} tBu, 1640 cm^{-1} C=O ; R.M.N. (CDCl_3) : 1,3 ppm (s, 18H, tBu), 3,9 ppm (s, 3H, CH_3), 6,9 ppm (s, 1H, Ar), 7 ppm (s, 1H, Ar), 7,25 ppm (s, 1H, Ar), 7,6 ppm (s, 1H, Ar), 7,8 ppm (s, 1H, Ar), 7,9 ppm (s, 1H, Ar).; S. M. : $M^+ = 324$.

3', 5'-DITERIOBUTYL PHENYL-4-HYDROXY BENZOPHENONE 21

Réactifs

Produit 20 : 0,78g ; Dichlorométhane : 30ml ; Tribromure de bore : 2ml ; Méthanol : 10ml.

Mode opératoire

Dans un tricol de 100ml, surmonté d'un piège à humidité, d'un réfrigérant et une ampoule à brome, le produit 20, le dichlorométhane sont introduit puis laissés sous agitation magnétique et sous atmosphère d'azote en refroidissant à l'aide d'un bain de glace. Le BBr_3 est ajouté goutte à goutte. Après 15 minutes, le bain est retiré et on laisse agiter à température ambiante pendant une heure puis on porte à reflux pendant une heure. Avec un bain de glace, le produit est refoidi et le méthanol est ajouté goutte à goutte de manière à détruire l'excès de tribromure de bore. Le milieu réactionnel est transvasé dans un ballon de 100ml puis le solvant est évaporé. On reprend par de l'acétate d'éthyle (environ 50ml) et la phase organique est lavée avec 20ml d'eau, séchée sur sulfate de sodium et évaporée. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne (SiO_2 ; hexane 8 / acétate d'éthyle 2) et recristallisé dans l'éther de pétrole pour obtenir une poudre jaune.

Résultats

Rendement : 52 % (0,3970g) ; F : 167-169°C ; C.C.M. (s. s. 8) : $R_f = 0,3$; I.R. : 3500-3000 cm^{-1} (OH), 2950 cm^{-1} (tBu), 1550 cm^{-1} (C=O) ; R.M.N. (CDCl_3) : 1,3 ppm (s, 18H, tBu), 6,7 ppm (s, 1H, Ar), 6,8 ppm (s, 1H, Ar), 7,25 ppm (s, 1H, Ar), 7,55 ppm (s, 1H, Ar), 7,6 ppm (s, 1H, Ar), 7,7 ppm (s, 1H, Ar) ; S.M. : $M^+ = 310$.

3', 5'-DITERTIOBUTYL PHENYL-4 (-2 DIMETHYLAMINO) ETHOXY BENZOPHENONE 22

Réactifs

Produit 21 : 0,4g ; 1-chloro 2-Diméthylaminoéthyle : 0,33g ; Acétone (anhydre) : 140ml ; Carbonate de potassium (anhydre) : 0,33g.

Mode opératoire

Dans un ballon de 250ml, surmonté d'un réfrigérant et d'un piège à humidité, l'acétone, le carbonate de potassium, l'amine et le produit **21** sont introduits. Puis on met à reflux pendant 48 heures. Le produit est refroidi, filtré pour enlever le carbonate de potassium, rotavapé puis repris avec du dichlorométhane et lavé avec 20ml d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée et le solvant évaporé. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne (SiO_2 ; dichlorométhane 8 / méthanol 2).

Résultats

Rendement : 72,5 % (0,3538g) ; C.C.M. (s. s. 9) : $R_f = 0,6$; I. R. : 2950 cm^{-1} (tBu), 1650 cm^{-1} (C=O) ; R.M.N. (CDCl_3) : 1,3 ppm (s, 18H, tBu), 2,4 ppm (s, 6H, CH_3), 2,8 ppm (t, 2H, CH_2), 4,2 ppm (t, 2H, CH_2), 6,9 ppm (s, 1H, Ar), 7 ppm (s, 1H, Ar), 7,6 ppm (s, 1H, Ar), 7,8 ppm (s, 1H, Ar), 7,9 ppm (s, 1H, Ar) ; S.M. : $M^+ = 381$.

1, 1-[4" (N, N DIMETHYLAMINO)ETHOXYPHENYL)-3', 5'-
DITERTIOBUTYLPHENYLE]-2-(4 BENZOATE DE METHYLE) ETHYLENE 23

Réactifs

Produit **22** : 0,7g ; produit **16** : 0,27g ; Chlorure de Titane (IV) : 1,1ml ; Zinc (poudre) : 1,2g ; Tétrahydrofurane (anhydre) : 33ml.

Mode opératoire

Le mode opératoire est identique à celui utilisé pour la synthèse du produit **18**. La purification de ce composé est effectuée par chromatographie sur colonne (SiO_2 ; MeOH 3 / CHCl_3 7).

Résultats

Rendement : 29 % ; I. R. : 2950 cm^{-1} (tBu), 1730 cm^{-1} (C=O) ; R.M.N. (CDCl_3) : 1,3 ppm (s, 18H, tBu), 2,4 ppm (s, 6H, CH_3), 2,8 ppm (t, 2H, CH_2), 4,1 ppm (t, 2H, CH_2), 6,7-7,9 ppm (m, 12H, Ar et éthylénique) ; S.M. : $M+1 = 514$.

ACIDE 2- (1, 1-[4" (2-DIMETHYLAMINO) ETHOXY PHENYL)-3',5'-
DITERTIOBUTYL PHENYL] ETHYLENE) BENZOIQUE 24

Réactifs

Produit **23** : 0,21g ; Méthanol : 5ml ; Solution aqueuse d'hydroxyde de potassium 2N : 2ml.

Mode opératoire

Le mode opératoire est indentique à celui utilisé pour le produit **19**. L'huile obtenue est purifiée par chromatographie sur colonne (SiO_2 ; CH_2Cl_2 7/MeOH 3).

Résultats

Rendement : 85% ; I. R. : 2950 cm^{-1} (tBu), 1685 cm^{-1} (C=O) ; R.M.N. (CDCl_3) : 1,2 ppm (s, 18H, tBu), 2,4 ppm (s, 6H, CH_3), 2,7 ppm (t, 2H, CH_2), 4,1 ppm (t, 2H, OCH_2), 6,6-7,4 ppm (m, 12H, Ar et éthylénique) ; S.M. : $M+1 = 500$.

2-BENZYLOXY-4-FORMYL BENZOATE DE METHYLE 25**Réactifs**

Produit 8 : 0,3248g ; Chlorure de benzyle : 0,25ml ; Hydrure de sodium : 0,0448g ; DMF (anhydre) : 5ml.

Mode opératoire

Dans un ballon de 50ml, surmonté d'un piège à humidité, l'hydrure de sodium, le DMF et le produit 8 sont introduit et mis sous agitation. Après avoir agité pendant 15 minutes et lorsque le dégagement d'hydrogène est terminé, le chlorure de benzyle est ajouté. Dans un bain d'huile, on chauffe pendant 6 heures entre 60-65 °C, puis le DMF est évaporé. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle, lavé à l'eau (2 x 25ml), séché sur sulfate de sodium, filtré et le solvant est évaporé. Une huile jaune est obtenue puis purifiée par chromatographie sur colonne (SiO_2 ; Acétate d'éthyle 1/dichlorométhane 9).

Résultats

Rendement : 74,7% (0,3552g) ; C. C. M. (s. s. 3) : $R_f = 0,4$; I. R. : 1690 cm^{-1} (C=O), 1740 cm^{-1} (C=O) ; R.M.N. (CDCl_3) : 3,9 ppm (s, 3H, CH_3), 5,2 ppm (s, 2H, CH_2), 7,4 - 8 ppm (m, 8H, Ar), 10 ppm (s, 1H, CHO), S. M. : $M^+ = 270$.

2-PHENETHOXY-4-FORMYL BENZOATE DE METHYLE 26**Réactifs**

Produit 8 : 0,3248g ; 2-Bromoéthyl benzene : 0,30ml ; Hydrure de sodium : 0,0448g ; DMF : 5ml.

Mode opératoire

Le mode opératoire est dentique à celui utilisé pour la synthèse du produit 25.

Résultats

Rendement : 15% (0,0731g) ; C. C. M. (s. s. 7) : $R_f = 0,4$; I. R. : 1690 cm^{-1} (C=O), 1740 cm^{-1} (C=O) ; R. M. N. (CDCl_3) : 3,2 ppm (t, 2H, CH_2 Ar), 3,9 ppm (s, 3H, CH_3), 4,3 ppm (t, 2H, CH_2O), 7,4 - 8 ppm (m, 8H, Ar), 10 ppm (s, H, CHO) ; S. M. : $M^+ = 284$.

2-PHENYLPROPANOXY-4-FORMYL BENZOATE DE METHYE 27**Réactifs**

Produit 8 : 0,3248g ; 1-Bromo-3-phénylpropane : 0,33ml ; Hydrure de sodium : 0,0448g ; DMF : 5ml.

Mode opératoire

Le mode opératoire est dentique à celui utilisé pour la synthèse du produit 25.

Résultats

Rendement : 45,6% (0,2453g) ; C. C. M. (s. s. 7) : Rf = 0,2 ; I. R. : 1690 cm^{-1} (C=O), 1740 cm^{-1} (C=O) ; R. M. N. (CDCl_3) : 3,3 ppm (s, 3H, CH_3), 2,3 ppm (t, 2H, CH_2Ar), 4,1 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 4,4 ppm (t, 2H, CH_2O), 7,4 - 8 ppm (m, 8H, Ar), 10 ppm (s, 1H, CHO) ; S. M. : M^+ = 298.

(E)-3'-BENZYLOXY-4'-CARBOXY-3, 5-DITERTIOBUTYL CHALCONE 28**Réactifs**

Produit 25 : 0,3552g ; produit 4 : 0,5883g ; NaOH 2N : 5ml ; Ethanol 95% : 10ml.

Mode opératoire

Dans un ballon de 50ml, le produit 25, l'éthanol, la solution de soude, et le produit 4 sont introduit. Après avoir agité pendant 2 jours, on acidifie le milieu avec une solution d'HCl 1N (pH = 3). L'éthanol est évaporé et la phase aqueuse est extraite avec de l'acétate d'éthyle, séchée sur sulfate de sodium, filtrée et évaporée sous vide. On fait précipiter le produit avec un mélange d'acétate d'éthyle et d'hexane. Le précipité est alors filtré et lavé avec de l'hexane.

Résultats

Rendement : 30 % (0,1854g) ; F : 156°C ; C. C. M. (s. s. 10) : Rf = 0,6 ; I. R. : 2950 cm^{-1} (tBu), 1655 cm^{-1} (C=O), 1590 cm^{-1} (C=O) ; R.M.N. (CDCl_3) : 1,3 ppm (s, 18H, tBu), 5,4 ppm (s, 2H, CH_2), 7,4 - 8ppm (m, 13H, 11H Ar + 2 éthyléniques), 10 ppm (s, 1H, CHO) ; S. M. : M^+ = 470 ; U.V. : λ max = 307 nm.

(E)-3'-PHENETHOXY-4'-CARBOXY-3, 5-DITERTIOBUTYL CHALCONE 29**Réactifs**

Produit 26 : 0,1073g produit 4 : 0,1753g ; NaOH 2N : 5ml ; Ethanol 95° : 10ml.

Mode opératoire

Le mode opératoire est dentique à celui utilisé pour la synthèse du produit 28.

Résultats

Rendement : 24% (0,0433g) ; F : 132°C ; C. C. M. (s. s. 10) : Rf = 0,8 ; I. R. : 1590 cm^{-1} (C=O), 1670 cm^{-1} (C=O), 2950 cm^{-1} (tBu) ; R. M. N. (CDCl_3) : 1,3 ppm (s, 18H, tBu), 3,5 ppm (t, 2H, CH_2Ar), 4,5 ppm (t, 2H, CH_2O), 7,3 - 8 ppm (m, 13H, Ar et éthyléniques), 10 ppm (s, 1H, CHO) ; S. M. : MH = 485 ; U. V. : λ max = 304 nm.

(E)-3'-PHENYLPROPANOXY-4'-CARBOXY-3, 5-DITERTIOBUTYL CHALCONE

30

Réactifs

Produit 27 : 0,2500g ; produit 4 : 0,3700g ; NaOH 2N : 5ml ; Ethanol 95% : 10ml.

Mode opératoire

Le mode opératoire est dentique à celui utilisé pour la synthèse du produit 28.

Résultats

Rendement : 10 % (0,0040g) ; F : 147°C ; C. C. M. (s. s. 10) : Rf =0,8 ; I. R. : 1600 cm^{-1} (C=O), 1660 cm^{-1} (C=O) ; R.M.N. (CDCl_3) : 1,3 ppm (s, 18H, tBu), 2,3 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,7 ppm (t, 2H, CH_2Ar), 4,3 ppm (t, 2H, CH_2O), 7,4 - 8 ppm (m, 13H, Ar et éthyléniques), 10ppm (s, 1H, CHO) ; S.M.: $\text{M}^+ = 499$; U. V.: $\lambda_{\text{max}} = 305 \text{ nm}$.

ACIDE-(E)-4'-(3-(3, 5-DITERTIOBUTYL PHENYL)-3-OXO-1-PROPENYL)BENZOIQUE (CH55) 31**Réactifs**

Produit 4 : 0,5g (2,2 mmoles), Ethanol : 20ml, Solution aqueuse de soude 2N : 5ml, Acide-4-formyl benzoïque : 0,33g (2,2 mmoles).

Mode opératoire

Dans un ballon de 50ml, l'éthanol, la soude et le produit 4 sont introduit et maintenu sous agitation. L'acide-4-formyl benzoïque est ajouté et la réaction est laissée pour se développer pendant 20 heures. Le mélange est versé dans 250ml d'eau puis acidifié par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique N/2. Le précipité formé est filtré et lavé à l'eau puis recristallisé dans l'éthanol. On obtient une poudre jaune.

Résultats

Rendement : 52 % (0,42g) ; C.C.M. (s.s.3) : Rf = 0,5 ; I.R. : 3200-2540 cm^{-1} (OH, acide), 1660 cm^{-1} (C=O, cétone Ar α, β éthylénique) ; R.M.N. (CDCl_3) : 1,4 ppm (s, 18H, CH_3), 7,4 ppm (m, 2H, CH), 7,9 ppm (m, 7H, Ar), 13,1 ppm (s, 1H, COOH).

ACIDE-(E)-4'-(3-(3, 5-DITERTIOBUTYL PHENYL)-3-OXO-1-PROPENYL)SALICYLIQUE 32**Réactifs**

Produit 4 : 3,6g (16 mmoles) ; Produit 8 : 1,5g (7,7 mmoles) ; Solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 2N : 40ml ; Ethanol 95° : 80ml.

Mode opératoire

Dans un ballon de 250ml, le produit 4, la soude et l'éthanol sont introduit. Le produit 8 est ajouté sous agitation magnétique. Après avoir laissée la réaction se développer pendant 60 heures le mélange est acidifié avec une solution aqueuse d'acide

chlorhydrique 1N. L'éthanol est ensuite évaporé et le produit extrait avec de l'acétate d'éthyle (3 x 20ml). La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium et filtrée. Après évaporation de l'acétate d'éthyle on obtient une huile jaune. Le produit est précipité avec le système de solvants acétate d'éthyle - hexane. Le précipité jaune pâle qui se forme est alors filtré et lavé avec de l'hexane.

Résultats

Rendement : 53 % (1,56g) ; C.C.M. (s.s.6) : Rf = 0,6 ; I.R. : 1655 cm⁻¹ (C=O, cétone α , β éthylénique) ; R.M.N. (acétone d₆) : 1,4 ppm (s, 18H, tBu), 7,4 ppm (m, 2H, CH éthyléniques), 7,9 ppm (m, 6H, Ar).

PREPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES CONTENANT LE RECEPTEUR RECOMBINANT

Les cellules SF9 sont mises en culture en milieu SF900 additionné de 5% de sérum de veau, de 50 μ g/ml de gentamycine et de 2,5 μ g/ml d'amphotéricine B. Pour la préparation des extraits, la culture en suspension liquide est utilisée. Lorsque la préculture atteint une saturation de 10⁶ cellules/ml, les cellules sont placées dans un flacon de verre de 10 litres contenant 1 litre de milieu additionné de 0,1% de pluronic 68 et agitées par un barreau magnétique à 150 rpm. Lorsque la concentration cellulaire atteint 2.10⁶ cellules/ml, les cellules sont centrifugées, ramenées à une concentration de 10⁷ cellules/ml et incubées pendant une heure avec un aliquot de suspension du virus recombinant à une concentration virale de 10⁶-10⁷ virus/ml. La concentration cellulaire est alors ajustée à 2.10⁶ cellules/ml et l'infection maintenue pendant 48 à 72 heures. Les cellules sont centrifugées, lavées 3 fois en PBS, puis incubées 30min. à 0°C en tampon Tris 10mM pH 8, KCl 10mM, DTT 1mM, glycérol 10% en présence d'un cocktail d'antiprotéases. Elles subissent alors une homogénéisation douce au Potter, puis sont centrifugées à 3500 rpm pendant 20min.. Le culot contenant les noyaux est repris par 20ml de tampon Tris 10mM pH 8, KCl 0,6M, DTT 1mM, glycérol 10%, incubé 30min. à 0°C puis homogénéisé au Dounce par 20 aller-retours. L'homogénat est alors ultracentrifugé 30 min. à 45000 rpm. Le surnageant récupéré est alors utilisé et dénomé "extrait nucléaire brut".

CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Réactifs

Tampon B : 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 600 mM KCl, 10% glycérol, pH 8 ;
Tampon faible force ionique : 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycérol, pH 8 ;
Tampon 1 M KCl : 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 M KCl, 10% glycérol, pH 8 ;
Tampon d'éluion : 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 300 mM NaCl, 10% glycérol, pH 8 ;
 CD367 tritié et froid.

Mode opératoire

Dans une colonne IBF 11, l'extrait cellulaire (10 ml) est ajouté à 1 ml de gel d'affinité préalablement lavé avec 20ml d'eau et équilibré dans le tampon B (20ml). L'adsorption en batch est maintenue pendant 6 à 15 heures à 4°C sous agitation rotative. L'effluent est alors récupéré par filtration et le gel est ensuite lavé (à 4°C) avec 30 ml de TpB, 30 ml de Tp de faible force ionique, 30 ml de Tp 1M KCl puis 30 ml de Tp d'éluion. L'éluion biospécifique est alors obtenue en utilisant une solution de [³H] CD367 à 20 µM dans 2,5 ml de Tp d'éluion. Elle est maintenue sous agitation rotative à 4°C pendant 15 heures, puis l'éluat est récupéré, concentré environ 5 à 10 fois par ultrafiltration et analysé en électrophorèse et Western blot. Une fraction non concentrée de l'éluat est utilisée pour la quantification du récepteur élué et pour le dosage des protéines. L'éluat concentré restant est conservé à -80°C.

ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU DENATURANT

Matériel

Cuve à électrophorèse verticale : Protean Slab Electrophoreses Cell Bio Rad (réf : 71651420).

Réactifs

Solution A à 10 % d'acrylamide : Acrylamide : 100,00g, Bis acrylamide : 2,66g, Tris : 45,3g, SDS : 1,00g, TEMED : 0,30ml, HCl 5,6 N : qsp pH 6,8, H₂O : qsp 1000ml ;
Solution C de concentration : Acrylamide : 30,00g, Bis acrylamide : 0,80g, Tris : 15,10g, SDS : 1,00g, TEMED : 0,5ml, HCl 5,6 N : qsp pH 6,8, H₂O : qsp 1000ml ;
 Solution aqueuse de persulfate d'ammonium à 10 % (v/v) (à préparer extemporanément) ;
Tampon d'électrophorèse (4 fois concentré) : Tris : 12,00 g, Glycine : 57,20 g, SDS : 4,00 g, HCl 5,6 N : qsp pH 8,3, H₂O : qsp 1000ml. (à diluer au 1/4 avant utilisation) ;
"Sample buffer" (tampon de dénaturation pour échantillons protéiques) : Tris-HCl : 0,08 M pH 6,8, SDS : 3 % (p/v), β-mercaptoéthanol : 5 %, Glycérol (v/v) : 20 % (v/v), Bleu de bromophénol : 0,001 % (p/v) ; Marqueurs de masse moléculaire : (Kit Bio Rad, Haut et bas poids moléculaire)

<u>6T (LMW) Composition</u>	<u>kDa</u>
Phosphorylase b du muscle de lapin	97,400
Sérumalbumine bovine	66,200
ovalbumine du blanc d'oeuf de poule	42,699
Anhydrase carbonique bovine	31,000
Inhibiteur tryptique du soja	21,500
Lysozyme du blanc d'oeuf de poule	14,400

<u>□ 5T (HMW) Composition</u>	<u>kDa</u>
Myosine	200,000
β -galactosidase d' <i>E.coli</i>	116,250
Phosphorylase du muscle de lapin	97,400
Sérumalbumine bovine	66,200
Ovalbumine du blanc d'oeuf de poule	42,699

Solution de coloration des gels : Bleu brillant R250 de Coomassie (Merck 12553) : 1,0g, Acide trichloracétique 50 % (p/v) : 250ml, Méthanol : 250ml, Eau ultra pure : qsq 1000ml; Solution de décoloration : Méthanol : 500ml, Acide acétique : 160ml, Eau ultra pure : 1300ml.

Mode opératoire

Un bouchon d'acrylamide (solution à 30 %) (5 ml + 50 μ l de persulfate d'ammonium) est coulé pour maintenir l'étanchéité du système (2plaques de verre 160 x 180 mm ; 1,5 mm d'épaisseur). 30 ml de solution à 10 % d'acrylamide sont ensuite coulés (30 ml de solution A + 100 μ l de persulfate) et polymérisent en 15 min. à 50°C. Puis le gel de concentration est coulé (7,5 ml de solution C + 150 μ l de persulfate d'ammonium) et le peigne rajouté immédiatement. Après une pré-électrophorèse, les échantillons protéiques sont disposés dans les puits en présence de bleu de bromophénol 0,001 % et de glycérol, après avoir été traités 3 min. au bain-marie bouillant en présence de 3 % de SDS. L'électrophorèse est réalisée à 35 mA (par gel) pendant 4h. Les gels sont démoulés puis fixés et colorés dans la solution de coloration pendant 2h. L'excès de colorant est éliminé par lavage du gel dans la solution de décoloration.

Coloration à l'argent :

On utilise un kit commercialisé par Bio-Rad Laboratories. La solution oxydante est préparée en diluant 20 ml d'oxydant (HNO_3 / $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) dans 180 ml d'eau. Le gel est incubé avec la solution oxydante durant 15 à 20 minutes, puis l'on effectue deux rinçages de 10 minutes chacun avec de l'eau. Le gel est ensuite incubé pendant 30 minutes avec la solution d'argent (AgNO_3 20 ml + 180 ml d'eau) puis rincé à l'eau pendant une minute. Le gel est alors incubé avec le révélateur (Na_2CO_3 / formaldéhyde à 32g par litre). Lorsque la solution devient trouble (30 secondes), on renouvelle le révélateur et on laisse incubé environ 5 minutes. La solution de révélateur est alors renouvelée et on laisse incubé jusqu'à l'apparition de bandes. La coloration est stoppée en remplaçant le révélateur par une solution d'acide acétique à 5 %. Le gel est alors conservé à 4°C dans un sachet étanche de célophane.

ACTIVITE BIOLOGIQUE

- Culture cellulaire : Les cellules leucémiques HL-60 humaine sont maintenues en croissance dans le milieu RPMI-1640 contenant 15% de sérum foetal de veau, 4 mM de L-glutamine, 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules sont cultivées sous une atmosphère saturée en H₂O et contenant 5% de CO₂ à 37°C. Pour les expériences, les cellules sont cultivées dans le milieu RPMI-1640 sans sérum foetal de veau, contenant 5 µg/ml d'insuline, 5 µg/ml de transferrine et 5 ng/ml de sélénium. Les neuroblastes SK-N-SH humains sont maintenus en croissance dans un milieu minimum essentiel (MEM) contenant 10% de sérum foetal de veau, 4 mM de L-glutamine, 100 UI/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les cellules sont cultivées sous une atmosphère saturée en H₂O et contenant 5% de CO₂ à 37°C. Pour les expériences, les cellules sont cultivées dans un milieu MEM avec 5% de sérum foetal de veau.

- Etudes de la différenciation cellulaire et de la toxicité : La différenciation morphologique des cellules HL-60 est observée à partir d'une préparation cytopspin (May-Grunwald-Giemsa). La différenciation fonctionnelle est évaluée par le test de réduction du Nitrobleu tétrazolium (NBT). Les cellules HL-60 sont traitées avec différentes concentrations en rétinoïdes pendant 5 jours. Pour le test au NBT 10⁶ cellules sont incubées à 37°C pendant 20 minutes avec un volume égal de tampon phosphate contenant 200 ng de PMA et 0,1% de NBT. Après le dépôt sur les lames par cytopspin, le pourcentage de cellules contenant des dépôts de formazan (NBT réduit) est déterminé par inspection microscopique d'au moins 200 cellules. Les cellules SK-N-SH sont traitées avec différentes concentrations en rétinoïdes pendant 4 jours. La différenciation morphologique des cellules est observée à partir d'une préparation au Crystal violet. Dans les cellules HL-60 et SK-N-SH, la toxicité aiguë est déterminée respectivement par un test d'exclusion du Bleu tripan 5 jours après le début de l'incubation (HL-60) et par la perte complète d'adhérence (SK-N-SH) associée au test d'exclusion du Bleu tripan 4 jours après l'addition des rétinoïdes.

- Transglutaminase : Les cellules HL-60 et SK-N-SH sont traitées pendant 48 h avec différentes concentrations en rétinoïdes respectivement dans un milieu RPMI-1640 et dans un milieu MEM contenant 5% de sérum foetal de veau. Après lavages (Solution : 20 nM Tris-HCl, pH 7,5, 150 nM NaCl), les cellules sont collectées, puis une lyse est effectuée avec 150 µl d'une solution contenant : 20 nM Tris-HCl, pH 7,5, 1nM EDTA et 0,5% Triton X-100. Après sédimentation, le surnageant est récupéré et 0,2 à 0,4 mg de protéines sont incubés à 30°C pendant 20 minutes avec une solution contenant : 20 nM Tris-HCl, pH 7,5, 5 nM CaCl₂, 15 nM β-mercaptoéthanol, 2mg N,N'-diméthylcaséine/ml, 2µCi [³H] putrescine et 0,1 mM putrescine. La réaction est stoppée

dans la glace et 80 μ l de solution sont déposés sur un filtre Whatmann 3M traité avec 100 mM d'EGTA (éthylène glycol-bis (β -aminoéthyl éther) N, N, N', N'-tétraacétique acide). Le complexe [3 H] putrescine-N,N'-diméthylcaséine précipite et le papier filtre est immédiatement placé dans une solution à 10% d'acide trichloroacétique pendant 20 minutes. La putrescine tritiée libre est éliminée par des lavages du filtre avec : une solution à 10% d'acide trichloroacétique, un mélange 1/1 éthanol/acétone et de l'acétone pure. Le papier filtre est séché et révélé avec 5 ml de liquide de scintillation (AQUALYTE TM). La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation.

WESTERN BLOT

Matériel

Appareil LKB 2005 Transphor Electroblothing Unit (BROMA, Sweden), Nitrocellulose Schleicher & Schull BA 85 (0,45 μ m).

Réactifs

Tampon de transfert : Tris-HCl 25 mM pH 8,3, Glycine 150 mM, Méthanol 20 %.

Mode opératoire

Le gel de polyacrylamide est placé en contact avec la feuille de nitrocellulose préalablement équilibrée dans du tampon. Le transfert s'effectue pendant 5 h à 60 V (0,3A) ou 16h à 20V, en évitant l'échauffement de la cuve à l'aide d'une circulation d'eau courante. Après électrotransfert, les protéines sont colorées 5 min. par une solution aqueuse de Rouge Ponceau à 0,2 % contenant 3 % d'acide trichloroacétique. L'excès de colorant est éliminé par plusieurs lavages de la feuille de nitrocellulose à l'eau distillée. La feuille est utilisée immédiatement pour la révélation.

Réactifs

TBS : Tri-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 ; TNT (à préparer extemporanément) : TBS 1000 ml, Tween 20 (0,1 %, p/v) 1 gramme ; Révéléateur (à préparer extemporanément) : 4-chloro-1-naphtol (SIGMA C8890) 50 mg à dissoudre dans 17 ml de méthanol, TBS : qsq 100 ml, ajouter H₂O₂ à 30 % : 60 μ l.

Mode opératoire

La feuille de nitrocellulose est saturée dans la solution de TBS contenant 5 % (p/v) de lait écrémé en poudre 1h à 37° C. Après lavage 2 fois 15 minutes dans TBS à température ambiante et 1 fois 15 minutes dans le TNT, la solution est incubée avec le premier anticorps en solution au 1/2000 dans le TNT, le lait écrémé en poudre 1 % (p/v), 1h à 2h à température ambiante. Le tout est lavé 3 fois 15 minutes dans le TNT. Le produit est incubé avec l'anticorps marqué à la peroxydase (système souris) en solution au 1/20000 dans le TNT, le lait écrémé 1 % (p/v), et laissé 1 heure sous agitation à température ambiante. Il est lavé 2 fois 15 minutes dans le TNT et 1 fois dans le TBS. La révélation est effectuée par la solution de 4-chloronaphtol et de H₂O₂, et les immuncomplexes

apparaissent sous forme de bandes colorées en violet. La coloration est ensuite stoppée par rinçage de la membrane avec une solution de glycérol à 10 %. La membrane est alors séchée entre deux feuilles de papier 3 MM puis stockée à 4°C à l'abri de la lumière.

DOSAGE DES PROTEINES

Réactifs

Réactif de Coomassie : G250 Bleu de Coomassie 15mg, Alcool absolu 4,7ml, H₃PO₄ 85 % 10ml, H₂O : qsq 100ml, filtrer sur papier whatman 3 MM ; Prise de l'échantillon dilué au 1/20 : 135 µl ; Volume du réactif colorant : 2565 µl.

Mode opératoire

Après avoir mélangé les deux réactifs, on laisse 5 minutes à température ambiante puis on lit la densité optique contre un blanc à 595 nm (Gamme IgG de 50 à 800 µg/ml ou sérumalbumine bovine de 5 à 200 µg/ml).

CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS HAUTE PERFORMANCE (MONO Q)

Matériel

Colonne utilisée : Pharmacia MonoQ HR 5/5.

Appareil : HPLC : Pompes 6000A, programmeur de gradient M600 Waters.

Réactifs

Tampon A : Tris 10 mM, DTT 1 mM, NaCl 30 mM, pH 8 ; Tampon B : Tris 10 mM, DTT 1 mM, NaCl 500 mM, pH 8, Tampon C : Tris 10 mM, DTT 1 mM, NaCl 1 mM, pH 8.

Mode opératoire

Les différents tampons (Tp) sont préparés, filtrés et stockés à 4°C. La colonne est lavée avec de l'eau pendant 30 minutes à un débit de 1ml / min. La pompe A est alors alimentée en eau alors que la pompe B est alimentée en TpC. On effectue un gradient de 10 min. (1 ml / min.) de la pompe A (100 - 0 %) vers la pompe B (0 % - 100 %). La colonne est alors rincée avec le TpC pendant 30 min. (1 ml / min.). La pompe A est alors alimentée en TpA et un gradient de 10 min. (1 ml / min.) de la pompe B vers la pompe A est alors effectué. La colonne est ensuite équilibrée dans le TpA durant 30 min. La force ionique du TpA étant de 30 mM, il est nécessaire de diluer l'éluat (300 mM) dix fois à l'aide du Tp de faible force ionique utilisé pour la chromatographie d'affinité. On introduit environ 7 ml (0,7 ml éluat + 6,3 ml Tp - KCl) à l'aide de 5 injections (attendre 2 min. entre chaque injection, débit : 1 ml / min.). Après la dernière injection, on laisse 10 min. en TpA (1ml / min.) afin d'éliminer la totalité de la radioactivité libre non retenue sur la colonne. La pompe B est alors alimentée en TpB et le débit est ajusté à 0,5 ml / min. Enfin un gradient de 45 min. entre la pompe A et la pompe B est lancé et on récupère des fractions de 2 minutes. La radioactivité associée, contenue dans chaque fraction est

comptée (400 μ l) à l'aide d'un compteur à scintillation. Les fractions contenant le complexe Ligand-Récepteur sont alors rassemblées et concentrées à l'aide d'un Diaflo (30kDa). L'éluat Mono Q ainsi obtenu est dénaturé.

CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION DE TAILLE HAUTE PERFORMANCE

Matériel

Colonne : TSK 3000SW.

Réactif

Tampon : Tris 10 mM, DTT 1 mM, KCl 300 mM, pH 7,2.

Mode opératoire

Des échantillons de 3ml d'éluats obtenus après chromatographie d'affinité, sont injectés dans la colonne. Les éluations sont réalisées en tampon 0,3M KCl à un débit de 0,5 ml. min⁻¹ et à 0 - 4°C. Des fractions de 1ml sont collectées et soumises à une mesure de radioactivité avec un compteur à scintillation LKB1214.

DOSAGE DU RECEPTEUR DANS LES EXTRAITS CELLULAIRES

Réactifs

DCC : 1,5g de charbon dans le tampon : Tris 10mM, KCl 10mM, EDTA 1mM, DTT 1mM, pH 8, 150mg de dextran ; [³H]CD367.

Mode opératoire

L'extrait cellulaire (extrait de départ ou effluent) est dilué au 1/30ième (33 μ l d'extrait + 967 μ l TpB). Dans un tube à hémolyse, on évapore dans l'EtOH 15 μ l de [³H]CD367 (solution à 1pm / μ l) puis on ajoute 500 μ l de l'extrait cellulaire dilué (tube T). Dans un second tube, on évapore 15 μ l de [³H]CD367 et on ajoute 5 μ l de CD367 non radioactif (solution à 2.10⁻³ M dans le DMSO). Enfin, on introduit 500 μ l de l'extrait cellulaire dilué (tube B). On laisse l'incubation se poursuivre dans les 2 tubes à 0 - 4°C pendant au moins 5 heures. L'excès de ligand libre radioactif est alors éliminé par la technique au charbon dextran. Dans deux tubes coniques 100 μ l de DCC sont ajoutés à 200 μ l de chaque extrait cellulaire (T et B). Après agitation, l'adsorption du CD367 libre sur le charbon est poursuivie pendant 15 min. dans la glace, puis on centrifuge les 2 tubes à 4000 tours / min. durant 10 min. 150 μ l de surnageant sont alors prélevés dans chaque tube et introduits dans 2 tubes à scintillation. Après avoir ajouté 5 ml de liquide à scintillation, la "radioactivité associée" est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation.

$$\text{Concentration (pmol/ml)} = \frac{\text{cpm (T)} - \text{cpm (B)} \times \text{dilution de départ} \times \text{dilution DCC} \times 1000}{\text{Act.Spé.} \times \text{Volume compté}}$$

Cpm : Coups par minute, Act.Spé. CD367 : 58.000 cpm/pmole

BIBLIOGRAPHIE

AGARWAL C., ECKERT R.L.
Cancer Res., 1990, 50, 5947-5953.

APFEL C., BAUER F., CRETTEZ M., FORNI L., KAMBER M., KAUFMANN F.,
LeMOTTE P., PIRSON W., KLAUS M.
Proc. Natl. Acad. Sci., 1992, 89, 7129 - 7133.

ASTROM A., TAVAKKOL A., PETTERSSON U., CROMIE M., ELDER J.T.,
VOORHEES J.J.
J. Biol. Chem., 1991, 266, 17662-17666.

BEATO M.
Cell, 1989, 56, 335-344.

BENBROOK D., LERNHARDT E., PFAHL M.A.
Nature, 1988, 333, 669-672.

BERNARD B.A., BERNARDON J.M., DELESCLUSE C., MARTIN B., LENOIR M.
C., MAIGNAN J., CHARPENTIER B., PILGRIM W.R., REICHERT U., SHROOT B.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, 186, 977-983.

BIRKBICHLER P.J., ORR G.R., CONWAY E., PATTERSON M.K. JR
Cancer Res., 1977, 37, 1340-1344.

BLOMHOFF R., GREEN M.H., BERG T., NORUM K.R.
Science, 1990, 250, 399 - 404.

BOLLAG W., HARTMAN H.R.
Cancer Surveys, 1983, 2, 293-314.

BOUTWEL R.K.
Academic Press, New York, 1983, 279-297.

BOYLAN J.F., GUDAS L.J.
J. Cell Biol., 1991, 112, 965-979.

BRAND N.J., PETKOVITCH M., FAUST A., CHAMBON P., de THE H., MARCHIO
A., TIOLLAIS P., DEJEAN A..
Nature, 1988, 332, 850 - 853.

BREITMAN T.R., SELONICK S.E., COLLINS S.J.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1980, 77, 2936-2940.

BREITMAN T.R., KEENE B.R., HEMMI H.
Cancer Surveys, 1983, 2, 263-291.

CAMPISI J., GRAY H.E., PARDEE A.B., DEAN M., SONENSHEIN G.E.
Cell, 1984, 36, 241.

CARIELLO L., VELASCO P.T., WILSON J., PARAMESWARAN K.N., KARUSH F.,
LORAN L.
Biochem., 1990, 29, 5103-5104.

CAVEY M.T., MARTIN B., CARLAVAN I., SCHROOT B.
Anal. Biochem., 1990, 186, 19-23.

CHAPMAN J.M., CURLEYR.W.

Protein expression and purification, 1990, **1**, 63-69.

CHIOCCA E.A., DAVIES P.J.A., STEIN J.P.

J. Biol. Chem., 1988, **263**, 11584-11589.

CHIOCCA E.A., DAVIES P.J.A., STEIN J.P.

J. Cell. Biochem., 1989, **39**, 293-304.

CHOMIENNE C., BALLERINI P., BALITRAND P., AMAR M., BERNARD J.F.,

BOIVIN P., DANIEL M.T., BERGER R., CASTAIGNE S., DEGOS L.

Lancet, 1989, 746-747.

CHYTIL F.

Pharmacol. Rev., 1984, **36**, 935-1005.

CHYTIL F., ONG D.E.

In "The retinoids", ed SPORN M.B., ROBERTS A.B., GOODMAN D.S.

1984, Vol. 2, 89-123, Orlando.

CLEMENT B., SEGUI-REAL B., HASSELL, J.R., MARTIN G.R., YAMADA Y.

J. Biol. Chem., 1989, **264**, 12467-12471.

COLLINS S.J., ROBERTSON K.A., MUELLER L.

Mol. Cell. Biol., 1990, **10**, 2154-2163.

CREEK K.E., SILVERMAN-JONES C.S., DE LUCA L.M.

J. Invest. Dermatol., 1989, **92**, 283-289.

CRETTAZ M., BARON A., SIEGENTHALER G., HUNZIKER W.

Biochem. J., 1990, **272**, 391-397.

CUATRECASAS P., ANFINSEN C.B.

Ann. Rev. Biochem., 1971, **40**, 259-278.

DARMON M., ROCHER M., CAVEY M.T., MARTIN B., RABILLOUD T.,

DELESCLUSE C., SHROOT B.

Skin Pharmacol., 1988, **1**, 161-175.

DAVIES J.P.A., MURTAUGH M.P., MOORE W.T., JOHNSON G.S., LUCAS D.

J. Biol. Chem., 1985, **260**, 5166-5174.

DAVIES J.P.A.

FASEB "Summer research conference" sur les rétinoïdes.

14 - 19 juin 1992, Saxtons River, U.S.A.

DEJEAN A., BOUGUELERET L., GRZESCHIK K.H., TIOL

Nature, 1986, **322**, 70-72.

DELESCLUSE C., CAVEY M.T., MARTIN B., BERNARD B.A., REICHERT

U., MAIGNAN J., DARMON M., SHROOT B.

Mol. Pharmacol., 1991, **40**, 556-562.

DENNING M.F., YERMA A.K.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1991, **175**, 344-350.

- DESBOIS C., PAIN B., GUILHOT C., BENCHAIBI M., FRENCH M., GHYSDAEL J., MADJAR J. J., SAMARUT J.
Oncogene, 1991, **6**, 2129-2135.
- De THE H., MARCHIO A., TIOLLAIS P., DEJEAN A..
Nature, 1987, **330**, 667 - 670.
- De THE H., VIVANCO-RUIZ M.D.M., TIOLLAIS P., STUNNENBAG H., DEJEAN A.
Nature, 1990, **343**, 177-180.
- DOLLE P., IZPISVA-BELMONTE J.C., FALKENSTEIN H., RENUCCI A., DUBOULE D.
Nature, 1989, **342**, 767-772.
- DYKE S.F., WHITE A.W.C., HARTLEY D.
Tetrahedron Lett., 1973, **29**, 860.
- EARP H.S., LEE L.W., RAYMOND V., BLAISDELL J., AUSTIN K., GRISHAM J.W.
J. Cell. Biochem., 1986, **10**, 129.
- EICHELE G.
Trends Gen., 1989, **5**, 246-251.
- ERIKSON V., HANSSON E., NILSSON H., JONSSON K.H., SUNDELIN J., PETERSON P.A.
Cancer Res., 1986, **46**, 717-722.
- EVANS R.M.
Science., 1988, **240**, 889-895.
- FAIRALL L., RHODES D., KLUG A.
J. Mol. Biol., 1986, **192**, 577-591.
- FELL H.B., MELLANBY E.
J. Physiol., 1953, **119**, 470-488.
- FESUS L., SANDOR M., HORVATH L.I., BAGYINKA C., ERDEI A., GERGELY J
Mol. Immunol., 1981, **18**, 633-638.
- FESUS L., THOMAZY V., FALUS A.
FEBS Lett., 1987, **224**, 104-108.
- FORMAN B.M., YANG C., CASANOVA J., GHYSDAEL J., SAMUELS H.H.
Mol. Endocrinol., 1989, **3**, 1610-1626.
- FORMAN B. M., SAMUELS H. H.
Mol. Endocrinol., 1990, **4**, 1293-1301.
- FORMSTECHEP P., LUSTENBERGER P.
in "Recent advances in steroid hormone action", 1987, Ed. Moudgil V.K., Walter de Gruyter and Co., 499 - 535.
- FROLIK C.A., SWANSON B.N., DART L.L., SPORN M.B.
Arch. Biochem. Biophys., 1981, **208**, 344-352.

- FUJIMAKI Y.
J. Cancer Res., 1926, 10, 469-477.
- GAUB M.P., LUTZ Y., RUBERTE E., PETKOVITCH M., BRAND N., CHAMBON P.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1989, 86, 3089-3093.
- GEUSE J., RUINARD C., SOETERBROEK J., VERKADE P., WEPSTER B.
Rec. Trav. Chim., 1956, 75, 305.
- GIGUERE V., ONG E.S., SEGUI P., EVANS R.M.
Nature, 1987, 330, 624 - 629.
- GLASS C.K., LIPKIN S.M., DEVARY O.V., ROSENFELD M.G.
Cell, 1989, 59, 697-708.
- GLASS C.K., DEVARY O.V., ROSENFELD M.G.
Cell, 1990, 63, 2500-2504.
- GLASS C.K., DIRENZO J., KUROKAWA R., HAN Z.
DNA Cell Biol., 1991, 10, 623-638.
- GOODMAN D.S.
In "The retinoids" (Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S.)
1984, pp 41-88, Academic press, Orlando.
- GRAUPNER G., WILLS K.N., TZUKERMAN M., ZHANG X.K., PFAHL M.
Nature, 1989, 340, 653-656.
- GRAUPNER G., MALLE G., MAIGNAN J., LANG G., PRUNIERAS M., PFAHL M.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1991, 179, 1554-1561.
- GREEN C., CHAMBON P.
Nature, 1986, 324, 615-617.
- GREEN S., CHAMBON P.
Trends Genet., 1988, 4, 309-314.
- GREEN S., KUMAR V., THEULAZ I., WAHLI W., CHAMBON P.
EMBO J., 1988, 7, 3037-3044.
- GRIEP A.E., DELUCA H.F.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1986, 83, 5539.
- HARPER M.J.K., WALPOLE A.L.
Nature, 1966, 212, 87.
- HASHIMOTO Y., KAGECHIKA H., KAWACHI E., SHUDO K.
Chem. Pharm. Bull., 1987, 35, 3190-3194.
- HASHIMOTO Y., KAGECHIKA H., KAWACHI E., SHUDO K.
Jpn. J. Cancer Res., 1988, 79, 473-483.
- HASHIMOTO Y., PETKOVITCH M., GAUB M.P., KAGECHIKA H., SHUDO K.,
CHAMBON P.
Mol. Endocrinol., 1989, 3, 1046-1052.

- HASHIMOTO Y., KAGECHIKA H., SHUDO K.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1990, **166**, 1300-1307.
- HENDERSON R., BALDWIN J., CESKA T.H., ZEMLIN F., BECKMAN E.,
DOWNING K.J.
J. Mol. Biol., 1990, **213**, 890-929.
- HEYMAN R.A., MANGELSDORF D.J., DYCK J.A.
Cell, 1992, **68**, 397-406.
- HIBERT M., TRUMPP-KALLMEYER S., BRUINVELS A., HOFLACK J.
Mol. Pharmacol., 1991, **40**, 8-15.
- HUDSON L.G., SANTON J.B., GLASS C.K., GILL G.N.
Cell, 1990, **62**, 1165-1175.
- ISLER O.
Helv. Chim. Acta., 1947, **30**, 1911.
- JETTEN A.M., SHIRLEY J.
Exp. Cell. Res., 1985, **156**, 221-230.
- JETTEN A.M., ANDERSON K., DEAS M.A., KAGECHIKA H., LOTAN R.,
REARICK J.I., SHUDO K.
Cancer Res., 1987, **47**, 3523-3527.
- JONES T.A., BERGTORS T., SEDZIK J., UNGE T.
EMBO J., 1988, **7**, 1597-1604.
- JORDAN V.C.
in "Antihormones" ; 1979, Ed. Agarwal M.K., Elsevier/North Holland : Amsterdam,
235-252.
- KAGECHIKA H., HASHIMOTO Y., KAWACHI E., SHUDO K..
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1988, **155**, 503 - 508.
- KAGECHIKA H., KAWACHI E., HASHIMOTO Y., HIMI T., SHUDO K.
J. Med. Chem., 1988, **31**, 2182-2192.
- KAGECHIKA H., KAWACHI E., HASHEMOTO Y., SHUDO K.
J. Med. Chem., 1989, **32**, 834-840.
- KAGECHIKA H., HIMI T., NAMIKAWA K., KAWACHI E., HACHIMOTO Y.,
SHUDO K..
J. Med. Chem., 1989, **32**, 1098 - 1108.
- KAGECHIKA H., HIMI T., KAWACHI E., HASHIMOTO Y., SHUDO K.
J. Med. Chem., 1989, **32**, 2292-2296.
- KARRER P.
Helv. Chim. Acta., 1950, **33**, 1172.
- KASTNER P., KRUST A., MENDELSON C., GARNIER J.M., ZELENT A., LEROY
P., STRAUB A., CHAMBON P.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1990, **87**, 2700-2704.

KASTNER P., BRAND N., KRUST A., LEROY P., MENDELSON C., PETKOVICH M., ZELENT A., CHAMBON P.
in "Developmental patterning of the vertebrate limb", 1991, Eds Hinchliffe et al., Plenum Press, New York, 75-88.

KEIDEL S., RUPP E., SZARDENINGS M.
Eur. J. Biochem., 1992, **204**, 1141-1148.

KLIEWER S.A., UMESONO K., MANGELSDORF D.J., EVANS R.M.
Nature, 1992, **355**, 446-449.

KOHN J., WILCHEK M.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978, **84**, 7-14.

KOHN J., WILCHEK M.
Anal. Biochem., 1981, **115**, 375-382.

KRUST A., KASTNER P., PETKOVITCH M., ZELENT A., CHAMBON P.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1989, **86**, 5310 - 5314.

LARGMAN C., DETMER K., CORRAL J.C., HACK F.M., LAWRENCE H.J.
Blood, 1989, **74**, 99-102.

LASSAR A.B., DAVIS R.L., WRIGHT W.E., HADESCH T., MURRE C.,
VORONOVA A., BALTIMORE D., WEINTRAUB H.
Cell, 1991, **66**, 305-315.

LEBEL S., LAMPRON C., ROYAL A., RAYMOND Y.
J. Cell Biol., 1987, **105**, 1099-1104.

LEHMANN J.M., DAWSON M.I., HOBBS P.D., HUSMANN M., PFAHL M.
Cancer Res., 1991, **51**, 4804-4809.

LEHMANN J.M., HUSMANN M., PFAHL M.
Nucl. Acids Res., 1991, **19**, 573-578.

LEID M., KASTNER P., LYONS R., NAKSHATRI H., SAUNDER M.,
ZACHAREWSKI T., CHAN J.Y., STAUB A., GARNIER J.M., MADER S.,
CHAMBON P.
Cell, 1992, **68**, 377-395.

LEROY P., KRUST A., ZELENT A., MENDELSON C., GARNIER J.M., KASTNER P.,
DIERICH A., CHAMBON P.
EMBO J., 1991, **10**, 59-69.

LEVIN A.A., STURZENBECKOR L.J., KAZMOR S., *et al.*
Nature, 1992, **355**, 359-361.

LOELIGER P., BOLLAG W., MAYER H.
Eur. J. Med. Chem., 1980, **15**, 9-15.

LORAND L., CONRAD S.M.
Mol. Cell Biochem., 1984, **58**, 9-35.

LOTAN R.
Biochim. Biophys. Acta, 1980, **605**, 33-91.

- LOWE C.R., DEAN P.D.G.
in "Affinity Chromatography", 1974, Eds Lowe C.R., Dean P.D.G.; Wiley J. and Sons,
London, 12-86.
- LUDWIG K.W., LOWEY B., NILES R.M.
J. Biol. Chem., 1980, **255**, 5999-6002.
- LUSTENBERGER P., FORMSTECHEP P., DAUTREVAUX M.
J. Steroid Biochem., 1981, **14**, 697-703.
- LUSTENBERGER P.
Thèse Doctorat 3ème cycle, Lille, 1986.
- MAKOWSKE M., BALLESTER R., CAYRE Y., ROSEN O.M.
J. Biol. Chem., 1988, **263**, 3402-3410.
- MANGELSDORF D.J., ONG E.S., DYCK J., EVANS R.M.
Nature, 1990, **345**, 224-229.
- MANGELSDORF D.J., UMESONO K., KLIEWER S.A., BORGMAYER U., ONG
E.S., EVANS R.M.
Cell, 1991, **66**, 555-561.
- MARCH S.C., PARIKH I., CUATRECASAS P.
Anal. Biochem., 1974, **60**, 149-152.
- Mc MURRY J.E., FLEMING M.P.
J. Am. Chem Soc., 1974, **96**, 4708-4709
- Mc MURRY J.E., FLEMING M.P.
J. Org. Chem., 1975, **41**, 896-897.
- Mc MURRY J.E., FLEMING M.P., KENNETH L.K., KREPSKI L.R.
J. Org. Chem., 1978, **43**, 3255-3266.
- MELINO G., FARRACE M.G., CERU M.P., PIACENTINI M.
Exp. Cell. Res., 1988, **179**, 429-445.
- MOON R.C., Mc CORNICK D.L., MEHTA R.G.
Cancer Res., 1983, **43**, 24696-24755.
- MOORE W.T., MURTAUGH M.P., DAVIES P.J.A.
J. Biol. Chem., 1984, **259**, 12794-12802.
- MORI S.
Bull. Johns Hopkins Hosp., 1922, **33**, 357-359.
- MUKAIYAMA T., SATO T., HANNA J.
Chem. Lett., 1973, 1041.
- MURTAUGH M., MOORE W., DAVIES P.
J. Biol. Chem., 1986, **261**, 614-621.
- NERVI C., GRIPPO J.F., SHERMANN M.J., DE GEORGE M.D., JETTEN A.M.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1989, **86**, 5854-5858.

NEWCOMER M.E.

FASEB "Summer research conference" sur les rétinoides.
14 - 19 juin 1992, Saxtons River, U.S.A.

OLSSON I.L., BREITMAN T.R., GALLO R.C.
Cancer Res., 1982, **42**, 3928-3933.

PETKOVITCH M., BRAND N.J., KRUST A., CHAMBON P.
Nature, 1987, **330**, 444 - 450.

PLET A., EVAIN D., ANDERSON W.B.
J. Biol. Chem., 1982, **257**, 889-893.

PLET A., RAYNAUD F., EVAIN - BRION D.
Médecine / Sciences, 1988, **4**, 618 - 623.

PORATH J., FLODIN P.
Nature, 1959, **214**, 1491-1492.

POSCH K.C., ENRIGHT W.J., NAPOLI J.L.
Arch. Biochem. Biophys., 1989, **274**, 171-178.

RAGSDALE C., PETKOVITCH M., GATES P., CHAMBON P., BROCKES J.
Nature, 1989, **341**, 654 - 657.

RAYMOND V.W., GRISHAM J.W., EARP H.S.
Cell Growth Differ., 1990, **1**, 393-399.

REES J.L., DALY A.K., REDFERN C.P.F.
Biochem. J., 1989, **259**, 917-919.

RENOIR J.M., YANG C.R., FORMSTECHEP P., LUSTENBERGER P., WOLFSON
A., REDEUILH G., MESTER J., RICHARD-FOY H., BAULIEU E.E.
Eur. J. Biochem., 1982, **127**, 71-79.

RHODES D., KLUG A.
Cell, 1986, **46**, 123-132.

ROCHEFORT H., BORGNA J.L., EVANS E.J.
Steroid Biochem., 1983, **19**, 69.

SANI B.P., WILLE J.J. Jr, DAWSON M.I., HOBBS P.D., BUPP J., RHEE S., CHAO
W., DORSKY A.
Chem. Biol. Interact., 1990, **75**, 293-304.

SANI B.P., SINGH R.K., LAKSHMI G.R., GAUB M.P.
Arch. Biochem. Biophys., 1990, **283**, 107-113.

SCHNEIDER M.R., BALL H., SHILLER C.D.
J. Med. Chem., 1986, **29**, 1355-1362.

SCHROFF G., NEUMANN C., SORG C.
Eur. J. Immunol., 1981, **11**, 637-642.

SHARIF M., PRIVALSKY M.L.
Cell, 1991, **66**, 885-893.

SHERMAN M.I.

in "Retinoids and cell differentiation" ; Ed. Sherman M.I. CRC Press, 1986, 161-186, New-York.

SHUDO K.

in "Differentiation of cancer cells and cancer chemotherapy" ; Ed. Hozumi M. and Takaku F., 1985, 189-196, Tokyo.

SHUDO K., KAGECHIKA H., KAWACHI E., HASHIMOTO Y.

Chem. Pharm. Bull., 1985, 33, 404-407.

SHUDO K., KAGECHIKA H.

In " Chemistry and biology of synthetic retinoids", ed M.I. Dawson and W.H. Okamura, 1988, CRC Press, Florida, in press.

SINGH K.R., SANI B.P., DAWSON M.I., SHEALY Y.F.

Biochem. J., 1989, 262, 917-922.

SLUYTERMAN L.A.

Biochim. Biophys. Acta., 1967, 135, 139.

SPORN M.B., ROBERTS A.B.

Cancer Res., 1983, 43, 3034-3040.

SPORN M.B., ROBERTS A.B., GOODMAN D.S.

in "The retinoids" ; Academic Press, 1984, Vols. 1 and 2, New-York.

SPORN M.B., ROBERTS A.B.

in "Retinoids, differentiation and disease". Ciba foundation Pitman Eds, London, 1985, Symposium 113, 1-5.

SPORN M.B., ROBERTS A.B.

J. Amer. Acad. Dermatol., 1986, 15, 756-764.

SUNDBERG L., PORATH J.

J. Chromatogr., 1974, 90, 87-98.

TYRLIK S., WOLOCHOWICZ I.

Bull. Soc. Chim. Fr., 1973, 2147.

UMESONO K., MURAKAMI K.K., THOMPSON C.C., EVANS R.M.

Cell, 1991, 65, 1255-1266.

Van DORP D.A., ARENS J.F.

Nature, 1946, 158, 60.

VASIOS G.W., GOLD J.D., PETKOVITCH M., CHAMBON P., GUDAS L.J.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1989, 86, 9099-9103.

WALKER H.G., HAUSER C.R.

J. Am. Chem. Soc., 1946, 68, 1386-1388.

WOLBACH S.B., HOWE P.R.

J. Exp. Med., 1925, 42, 753-777.

YAMAKAWA T., KAGECHIKA H., KAWACHI E., HASHIMOTO Y., SHUDO K.

J. Med. Chem., 1990, 33, 1430-1437.

YU V.C., DELSERT C., ANDERSEN B., HOLLOWAY J.M., DEVARY O.V., NAAR A.M., KIM S.Y., BOUTIN J.M., GLASS C.K., ROSENFELD M.G.
Cell, 1991, **67**, 1251-1266.

ZELENT A., KRUST A., PETKOVITCH M., KASTNER P., CHAMBON P.
Nature, 1989, **339**, 714 - 717.

ZELENT A., MENDELSON C., KASTNER P., GARNIER J.M., RUFFENACH F., LEROY P., CHAMBON P.
EMBO J., 1991, **10**, 71-81.

ZHANG X.K., HOFFMANN B., TRAN P.B.V., GRAUPNER G., PFAHL M.
Nature, 1992, **355**, 441-446.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	page 1
CHAPITRE I : GENERALITES SUR L'ACIDE RETINOIQUE ET LES RETINOIDES	
I - VITAMINE A ET RETINOIDES	page 4
II - ABSORPTION, TRANSPORT ET MECANISMES D'ACTION DE L'AR	page 5
III - EFFETS BIOLOGIQUES DE L'ACIDE RETINOIQUE	page 7
IV - ACTION ANTI-CANCEREUSE DE L'ACIDE RETINOIQUE	page 8
V - LES PROTEINES LIANT LES RETINOIDES	page 10
V-1 - Les protéines liant les rétinoïdes	page 10
V-2 - Les récepteurs de l'acide rétinoïque	page 12
V-3 - Structure des RARs	page 14
V-4 - Distribution	page 17
V-5 - Isoformes	page 17
V-6 - Une nouvelle classe de récepteurs : les RXRs	page 18
VI - INTERACTION RARs/ADN ET ELEMENTS DE REPONSE	page 19
VII - LES RETINOIDES DE SYNTHESE	page 23
VII-1 - Eléments de relations structure - activité	page 23
VII-2 - Spécificité	page 25
VIII - ANTAGONISTES	page 32
CHAPITRE II : LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE	
I - GENERALITES SUR LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE	page 34
II - APPLICATION A LA PURIFICATION DES RECEPTEURS DE L'AR	page 37
II-1 - Systèmes d'expression des RARs recombinants	page 39
II-1-1 - Baculovirus Expression Vector System (BEVS)	

II-1-2 - <i>Escherichia Coli</i>	
II-2 - Mise au point du gel d'affinité	page 41
II-2-1 - Choix du support	
II-2-2 - Choix du ligand	
II-2-3 - Choix du bras espaceur et de la nature de la liaison ligand-bras espaceur	
II-3 - Méthodes et synthèses	page 47
II-3-1 - Synthèse du ligand : trifluoroacétate de l'acide - (E)-2'-(3-amino propanoxy)-4- (3-(3, 5-ditertiobutyl phényl)-3-oxo-1-propényl) benzoïque	page 47
II-3-1-1 - <i>Synthèse de la 3,5-ditertiobutyl acétophénone</i>	
II-3-1-2 - <i>Synthèse du 2-(3-tertiobutyl-oxycarbonylamino prapanoxy)-4-formyl benzoate d'éthyl</i>	
II-3-1-3 - <i>Synthèse du trifluoroacétate de l'acide - (E)-2'-(3-amino propanoxy)-4-(3-(3, 5-ditertiobutyl phényl)-3-oxo-1-propényl) benzoïque</i>	
II-3-2 - Activation du support et greffage du bras espaceur	page 53
II-3-2-1 - <i>Cas de l'acide -7-aminoheptanoïque</i>	
II-3-2-2 - <i>Cas du 1,8-dioxiranyl-2,7-dioxaoctane</i>	
II-3-3 - Couplage du ligand	page 53
II-3-3-1 - <i>Gels BrCN</i>	
II-3-3-2 - <i>Gels Oxirane</i>	
II-3-3-3 - <i>Affi-gel 10</i>	
II-3-3-4 - <i>Désactivation</i>	
II-3-4 - Degré de substitution	page 56
II-3-4-1 - <i>Dosage des fonctions activées présentes sur le gel</i>	
II-3-4-2 - <i>Dosage du bras porté par le gel</i>	
II-3-4-3 - <i>Dosage du ligand immobilisé</i>	
II-3-5 - Mesure de l'affinité du ligand vis à vis des récepteurs RAR α , β , et γ	page 59
II-3-5-1 - <i>Principe</i>	
II-3-5-2 - <i>Résultats</i>	
II-4 - Chromatographie d'affinité - Isolement des RARs	page 62
II-4-1 - Mise en oeuvre du gel d'affinité / essais d'adsorption de hRAR α	
II-4-1-1 - <i>Principe</i>	
II-4-1-2 - <i>Résultats</i>	

II-4-2 - purification des récepteurs	page 64
II-4-2-1 - <i>Adsorption</i>	
II-4-2-2 - <i>Lavage</i>	
II-4-2-3 - <i>Elution</i>	
II-4-2-4 - <i>Résultats</i>	
II-4-3 - Ultime étape de purification et caractérisation des RARs purifiés	
II-4-4 - Retard sur gel	page 80
II-4-4-1 - <i>Principe</i>	
II-4-4-2 - <i>Résultats</i>	
III CONCLUSION	page 82
 CHAPITRE III : RECHERCHE DE NOUVEAUX ANTIRETINOIDES	
I - PRESENTATION	page 83
II - PREMIERE HYPOTHESE DE TRAVAIL	page 84
II-1 - Principe	page 84
II-2 - Méthodes et synthèses	page 88
II-2-1 - Synthèse du 1,1-[(3",4"-diméthoxyphényl)-3',5'-ditertiobutyl phényl]-2-(4-benzoate de méthyle) éthylène	
II-2-2 - Synthèse de l'acide-2-(1,1-[(3",4"-diméthoxyphényl)-3',5'- ditertiobutyl phényl] éthylène) benzoïque	
II-2-3 - Synthèse de l'acide-2-(1,1-[(4"(2-diméthylamino)éthoxyphényl)- 3',5'-ditertiobutylphényl] éthylène) benzoïque	
III - SECONDE HYPOTHESE DE TRAVAIL	page 95
III-1 - Principe	page 95
III-2 - Synthèse des dérivés de type (E)-3'-alkyloxy-4'-carboxy-3, 5- ditertiobutyl chalone	page 97
IV - RESULTATS	page 98
IV-1 - Etude de l'activité de liaison	page 98
IV-2 - Essais de transactivation	page 99
V - CONCLUSION	page 101
 CHAPITRE IV : ACTIVITE BIOLOGIQUE DES RETINOIDES	
I - RETINOIDES ET DIFFERENCIATION	page 102

I-1 - Synthèses de l'acide -(E)-4'-(3-(3, 5-ditertiobutyl phényl)-3-oxo-1-propényl)benzoïque (Ch55) et de l'acide-(E)-4'-(3-(3,5-ditertiobutyl phényl)-3-oxo-1-propényl) salicylique	page 103
I-2 - Principe	page 104
I-2-1 - Cellules leucémiques à promyélocyte : HL-60	
I-2-2 - Neuroblastome humain : SK-N-SH	
I-3 - Résultats	page 106
II - RETINOIDES ET TRANSGLUTAMINASE	page 108
II-1 - Introduction	page 108
II-2 - Induction différentielle de la transglutaminase de tissu par l'AR et les acides retinobenzoïques	page 110
II-2-1 - Principe	
II-2-2 - Résultats	
III- CONCLUSION	page 116
CONCLUSION	page 118
PARTIE EXPERIMENTALE	page 120
BIBLIOGRAPHIE	page 146

