



UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNOLOGIES DE LILLE I



THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Présentée par

Mohammed KAJJOUT

Pour l'obtention du grade de



DOCTEUR EN SCIENCES DE CHIMIE ORGANIQUE ET MACROMOLECULAIRE

Titre de thèse :

Chimie Organique pour les microsystèmes analytiques et la protéomique

Soutenue publiquement le 04 Décembre 2006 à Lille devant le jury composé de :

Pr. DIDIER BARBRY	Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille	Président
Dr. Olivier LAPREVOTE	Directeur de recherche au CNRS	Rapporteur
Dr. Serge PALACIN	Directeur de recherche au CEA Saclay	Rapporteur
Dr. Christian ROLANDO	Directeur de recherche au CNRS	

A mes parents
A Lalla Rajae
A toute ma famille

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au laboratoire de Chimie Organique et Macromoléculaire à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, au sein de l'équipe physico-chimie pour l'analyse et la biologie.

En premier lieu, je tiens à adresser mes remerciements à Monsieur Christian ROLANDO, Directeur de recherche au CNRS, Directeur de cette thèse, de m'avoir accueillie, durant mon stage de DEA, au sein de son équipe, et d'avoir dirigé cette thèse. Je le remercie de m'avoir confié ce sujet qui se positionne à l'interface chimie et microfluidique d'une part, et chimie et protéomique d'autre part, où j'ai eu la chance d'employer de nombreuses techniques expérimentales et analytiques. Je le remercie ensuite pour son encadrement, ses nombreux conseils, discussions et critiques apportés tout au long de ce travail, ainsi que pour la confiance qu'il m'a toujours témoignée.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à Monsieur Olivier LAPREVOTE, Directeur de recherche au CNRS, Monsieur Serge PALACIN, Directeur de recherche au CEA, et Monsieur Didier BARBRY, Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je tiens à remercier également Madame Nicole MORIN, responsable du service spectrométrie de masse de l'Ecole Normale Supérieure de Paris, pour la réalisation des analyses de haute masse et d'avoir été toujours disponible, Monsieur Guy RICART, et Mlle Adeline PAGE, pour leur aide et leur formation sur les spectromètres de masse (ESI) et MALDI, ainsi que Monsieur Fabrice CANTAIS, pour les analyses sur le spectromètre FT-SM.

Je remercie Mlle Séverine LE GAC et Madame Cécile CREN pour leur participation à ce travail, pour les discussions que nous avons pu tenir et pour leur aide et leurs conseils.

Je remercie Souila OUDIR, Clément ROUX, Gaëlle NOT et Reda MHIDIA qui ont travaillé avec moi au cours de ma thèse.

Je tiens à remercier Caroline SOLAZO, Caroline TOKARSKI, et Olivia GUERRE, d'avoir assuré la correction d'au moins une partie de ce manuscrit.

Tous mes remerciements à mes collègues de laboratoire, qui ont toujours su maintenir la bonne ambiance de l'équipe : Saïd EDDARIR, Kamal TOBAL, Florence GUERARD, Anne Gaëlle FOURNIAL, Sigrid MIRABAUD, Khadija EL IDRISSE, Bouchra MAHER, Karima DEHAK, Bouchra SILAHI, Adil ESSAKHI, Zohra DEMBAHRI, Xiayan WANG, et Joël

LYSKAWA, ainsi qu'aux secrétaires de l'unité Jacqueline RICART, Florence FERRET, Annie KEKENBOSCH et Karine DELHAYE pour leur bonne humeur, et pour leur patience.

Enfin mes remerciements les plus sincères s'adresse à madame Rajae ZEMMOURI, mon épouse, pour son soutien tout le long de ce travail, à mes parents, pour leur efforts et leur encouragements, ainsi qu' à toute ma famille.

Sommaire

Remerciements	3
Sommaire	6
Introduction générale	12
CHAPITRE I : Synthèses des analogues glycosylés et glucuronidés de la quercétine	16
<i>Partie A. Généralités</i>	17
I. Introduction	17
II. Les polyphénols	17
III. Structure et localisation de la quercétine.	19
IV. Propriétés biologiques des flavonoïdes	20
IV.1. Activités cardio-protectrices	20
IV.2. Activités anticancéreuses	21
V. Métabolisme de la quercétine	21
<i>Partie B. Synthèse des analogues glycosylés et glucuronidés de la quercétine</i>	23
I. Introduction	23
II. Protection des fonctions phénoliques de la quercétine	23
II.1. Protection du groupement de type catéchol	24
II.1.1. Ether d'alkyle	24
II.1.2. Ether d'aryle	24
II.1.3. A partir de composés carbonylés	25
II.1.3.1. Protection par des silylènes	25
II.1.3.2. Protection par le dichlorodiphénylméthane	27
II.2. Protection sélective de la quercétine	28
II.2.1. Benzylation de la quercétine	28
II.2.2. Protection du cycle B de la quercétine	31
III. Synthèse des analogues glycosylés et glucuronidés de la quercétine	32
III.1. Introduction	32
III.2. Glycosylation de la quercétine	32
III.3. Choix du réactif de couplage	32
III.4. Protocoles de glycosylation.	33
III.5. Déprotection du groupement glycosyle	34
III.6. Oxydation sélective de l'alcool primaire du groupement glycoside	34
III.7. Déprotection des fonctions hydroxyles de la quercétine	35
IV. Synthèse du 3- <i>O</i> -glucuronide quercétine et de la 3- <i>O</i> -glycoside quercétine	35
V. Synthèse de 5- <i>O</i> -glucuronide quercétine et de la 5- <i>O</i> -glycoside quercétine	39
VI. Synthèse de la 4'- <i>O</i> -glycoside quercétine	41
VII. Synthèse de la 7- <i>O</i> -glucuronide quercétine et de la 7- <i>O</i> -glycoside quercétine	42
VIII. Synthèse de la 3'- <i>O</i> -glucuronide quercétine et de la 3'- <i>O</i> -glycoside quercétine	44
IX. Conclusion	45
X Partie expérimentale	46
XI. Références bibliographiques	81
CHAPITRE II : Réactivité chimique dans les réacteurs microfluidique	88
I. Introduction	89
II. Domaines d'applications de la microfluidique	89
II.1. Avantages de la miniaturization	90
II.2. Microréacteurs et analyse biochimique	90
II.3. Microréacteurs et réactions chimiques	90
II.3.1. Réaction d'alkylation	91

II.3.2. Réaction de formation d'un composé diazo	92
II.3.3. Réaction de polymérisation	93
III. Le mélange	93
III.1. Réactions compétitives	93
III.2. Mélangeurs à flux laminaire	94
IV. Méthylation de la quercétine	96
IV.1. Réaction de méthylation de la quercétine en verrerie classique	97
IV.1.1. Etudes des fragmentations des analogues monométhylés en ESI-SM/SM	97
IV.1.1.1. Etudes des fragmentations des deux isomères monométhylquercétines en position 3' et 4'	97
IV.1.1.2. Etudes des fragmentations des deux isomères monométhylquercétines en position 3 et 5	99
IV.1.1.3. Etudes des fragmentations de l'isomère monométhylquercétine en position 7	100
IV.1.2. Analyse des analogues méthylés de la quercétine par couplage LC/SM	101
IV.1.3. Résultats de la méthylation directe de la quercétine	102
IV.2. Synthèse d'un métabolite monométhylé : exemple de la 4'-O-méthylquercétine	104
IV.3. Utilisation d'un mélangeur microfluidique, le Nanomixer™	105
IV.3.1. Optimisation du débit	106
IV.3.2. Protocole opératoire	106
IV.3.3. Résultat	108
IV.3.4. Discussion	109
V. Conclusion	110
VI. Partie expérimentale	111
VII. Références bibliographiques	113
CHAPITRE III : Chimie de surface pour cible MALDI	116
I. Introduction	117
II. Généralités sur les microsystèmes	118
II.1. Caractéristiques de l'échelle du micron	118
II.2. Matériaux et microfabrication	118
II.2.1. Matériaux	119
II.2.1.1. Silicium	119
II.2.1.2. Verres	119
II.2.1.3. Polymères	120
II.2.2. Procédés de fabrication	120
II.2.2.1. Photolithographie	120
II.2.2.2. Gravure	120
II.2.2.3. La technologie en PDMS	121
III. Traitement de surface	122
III.1. Monocouches autoassemblées sur substrat métallique	123
III.1.1. SAMs sur supports en or	124
III.1.1.1 : Avantage de l'or	124
III.1.1.2 : Les monocouches auto-assemblées sur une surface d'or	125
III.1.2. Traitement de surface	125
III.1.2.1. Protocole d'adsorption	126
III.1.2.2. Mesure d'angle de contact	126
III.1.3. Caractère Hydrophile/hydrophobe	127

IV. Fonctionnalisation en volume	129
IV.1. Brosses de polymères	129
IV.2. Les différents types de polymères brosses	129
IV.3. Synthèse de brosses de polymères	131
IV.3.1. Préparation des brosses de polymères par physisorption	131
IV.3.2. Préparation des polymères brosses par chimisorption	132
IV.3.2.1. Approche « Grafting onto » pour la fabrication des brosses de polymères	132
IV.3.2.2. Approche « Grafting from » pour la fabrication des polymères brosses	132
IV.4 Polymérisation radicalaire contrôlée « polymérisation vivante »	133
IV.4.1. Polymérisation contrôlée par addition : Fragmentation (RAFT)	133
IV.4.2. Polymérisation contrôlée par les nitroxydes (NMP)	133
IV.4.3. Polymérisation par transfert d'atome (ATRP)	134
IV.5. Notre Choix	135
IV.6. Synthèse de l'ancre	135
IV.7. Protocole de polymérisation	138
IV.8. Réalisation de dispositifs de dessalage	139
IV.8.1. Principe du MALDI-TOF	140
IV.8.2. Résultats sur Cytochrome C	141
IV.8.3. Analyse du plasma brut	142
IV.9. Rétention spécifique des phosphopéptides	143
IV.9.1. Surfaces de type IMAC	143
IV.9.2. Préparation des surfaces de type IMAC	143
IV.9.3. Résultats	144
V. Conclusion	146
VI. Partie expérimentale	147
VII. Références bibliographiques	151
CHAPITRE IV : Développements de nouveaux colorants et réactifs pour l'analyse protéomique	156
I- Introduction	157
II. L'analyse protéomique et fluorescence	159
II.1. Les principales étapes de l'analyse protéomique	159
II.1.1. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide	159
II.1.2. La digestion	161
II.1.3. L'analyse bioinformatique	162
II.2. Détection des protéines sur gel d'électrophorèse	162
II.2.1. Coloration par le nitrate d'argent	162
II.2.2. Les colorants organiques	163
II.2.3. Les techniques basées sur la fluorescence	164
II.2.3.1. Introduction à la fluorescence	164
II.2.3.2. Colorants fluorescents en protéomique	166
II.2.3.2.1. Marquage covalent	167
II.2.3.2.2. Marquage non covalent	168
III. Développement de nouveaux colorants fluorescents pour l'analyse protéomique	169
III.1. Formulation d'un colorant fluorescent	170
III.1.1. Déformulation de la solution commerciale de Sypro® Ruby	170
III.1.1.1. Analyse RMN	170
III.1.1.2. Analyse Élémentaire	171
III.1.2. Stratégie de synthèse de Ru(BPS) ₃	172

III.1.3. Formulation de la solution colorante à base de Ru(BPS) ₃	174
III.1.3.1. Influence de la quantité de complexe	175
III.1.3.2. Influence du solvant	177
III.1.3.3. Influence de l'acide	178
III.1.3.4. Influence du DMSO	180
III.1.3.5. Effet de sel	181
III.1.4. Comparaison avec la solution commerciale Sypro® Ruby	183
III.1.5. Conclusion	183
III.2. Complexes hétéroleptiques	184
III.2.1 Stratégie de synthèse	184
III.2.2 Coloration par RuBP(BPS) ₂	187
III.2.2.1. Comparaison entre coloration au RuBP(BPS) ₂ et celle au Ru(BPS) ₃	187
III.2.2.2. Influence du pH	187
III.3. Colorants hydrophobes	188
III.3.1. Synthèse du vert de coomassie	189
III.3.2. Comparaison entre coloration au vert de coomassie et celle au bleu de coomassie	189
IV. Nouveaux réactifs pour l'étude sélective de sous-protéomes	191
IV.1. Introduction	191
IV.2. Les sondes	193
IV.2.1. La sonde spécifique aux protéines glycosylées	193
IV.2.2. La sonde spécifique aux protéines oxydées	193
IV.2.3. La sonde spécifique aux protéines phosphorylées	194
IV.3. Le bras espaceur	195
IV.4. Les poignées	195
IV.4.1. La sonde fluorescente	195
IV.4.2 Chromatographie d'affinité Biotine-Avidine	196
IV.5. Détection sélective des glycoprotéines	196
IV.5.1. Détection des glycoprotéines par des kits commerciaux	197
IV.5.2. ASC_GLY_FLUO, un nouveau colorant fluorescent pour la détection sélective des glycoprotéines	198
IV.5.2.1 Stratégie de synthèse	198
IV.5.2.1.1 Analyse rétrosynthétique	199
IV.5.2.1.2. Première approche	200
IV.5.2.1.3. Seconde approche	202
IV.5.2.1.4. Dernière approche	203
IV.5.2.2. Résultats sur gels d'électrophorèse	204
IV.5.3. ASC_GLY_BIOT, un nouveau réactif pour la détection sélective des glycoprotéines	207
IV.5.3.1 Stratégie de synthèse	208
IV.5.3.2. Tests réalisés en présence de ASC_GLY_BIOT	209
IV.5.3.2.1. Procédure générale de l'isolation spécifique des protéines ou peptides glycosylées	209
IV.5.3.2.2. Tests du réactif ASC-GLY_BIOT sur la rutine	210
IV.5.3.2.3. Tests sur un mélange de protéines glycosylées et non glycosylées	211
IV.6. Détection sélective des protéines oxydées	212
IV.6.1. ASC_OX_BIOT, un nouveau réactif pour la détection des protéines oxydées.	212

IV.6.1.1. Stratégie de synthèse	213
IV.6.1.2 Test du ASC_OX_BIOT sur du plasma	215
IV.6.2. Stratégie de synthèse de ASC_OX_FLUO, un nouveau colorant fluorescent pour la détection sélective des protéines oxydées.	218
IV.7. Conclusion	220
V. Partie expérimentale	222
VI. Références bibliographiques	242
Conclusion générale	249

Introduction générale

Au cours de cette dernière décennie, certains domaines analytiques tels que la microfluidique et la protéomique, ont connu un développement exponentiel, au point de représenter une part importante des publications dans *Analytical Chemistry*, revue de référence de la discipline.

Dans le premier cas, ce phénomène s'accroît avec l'apparition des premiers dispositifs commerciaux. Ces microsystèmes se caractérisent par : (i) des dimensions de l'ordre de la dizaine de microns, (ii) une fabrication reposant sur des techniques de microélectronique et (iii) l'intégration d'une série d'opérations. Ce dernier point leur confère de nombreux avantages tels que : (i) une sensibilité accrue pour l'analyse d'échantillons de taille réduite comme des extraits cellulaires, (ii) la suppression des étapes manuelles qui sont source de contamination, (iii) la standardisation des techniques conduisant à une reproductibilité accrue et au passage au haut débit.

Dans le cas de la protéomique, l'élément déclenchant a été la prise de conscience que la connaissance de la totalité de l'information génétique n'apporte pas toutes les réponses concernant les mécanismes cellulaires. Ce sont, les protéines, et elles seules, qui sont actives au sein d'une cellule puisqu'elles assurent les différentes fonctions cellulaires, donc leur étude est devenue primordiale. Les techniques actuelles permettent de visualiser 1000 à 2000 protéines sur un gel d'électrophorèse bidimensionnelle et seulement 100 à 200 de ces tâches sont identifiées en spectrométrie de masse. Or une cellule contient 10^4 protéines (10^5 à 10^6 en incluant les modifications post-traductionnelles) présentant une très grande dynamique d'expression: le rapport entre la protéine la plus faiblement exprimée et la plus fortement exprimée est de 10^6 copies ! Ainsi, de nombreux progrès méthodologiques doivent encore être réalisés et ne peuvent reposer que sur la synthèse de nouveaux réactifs pour le piégeage sélectif des protéines glycosylées, phosphorylées ou oxydées.

Ce travail de thèse se positionne à l'interface chimie et microfluidique d'une part, et chimie et protéomique d'autre part : tout d'abord « la chimie au service de la microfluidique » permet le développement d'une chimie de surface robuste, indispensable aux échelles microniques et inférieures. « La microfluidique au service de la chimie » rend possible la conduite de réactions chimiques à l'échelle du nanolitre. Enfin « la chimie au service de la protéomique » permet la synthèse des nouveaux réactifs originaux pour des applications protéomiques.

Ce travail, construit donc sur des thèmes différents, m'aura permis d'être confronté à plusieurs contraintes. Dans un premier temps nous avons commencé par développer une stratégie de synthèse basée sur différents jeux de protections et déprotections sélectives des

fonctions hydroxyles d'un polyphénol, la quercétine, pour accéder à ses métabolites et analogues glycosylés et glucuronidés. La quercétine est le flavonoïde le plus largement répandu dans le règne végétal, en particulier dans de nombreux fruits et légumes. Elle appartient à la grande famille des flavones, bien connue pour être active dans toutes les maladies liées au vieillissement (maladies cardio-vasculaires, maladies neuro-dégénératives, cancers...). Ces propriétés poussent à comprendre le rôle des polyphénols et tout spécialement de ceux consommés en alimentation humaine. Les polyphénols sont très rapidement métabolisés (méthylés, glucuronidés ou sulfatés). Le but du chapitre I de ce travail est de synthétiser les métabolites glucuronidés de la quercétine qui ne sont pas disponibles à partir des sources biologiques pour des études biologiques et des analogues pour les études physico-chimiques.

Dans un second temps nous avons essayé de mettre en évidence les différences entre des réactions menées dans de la verrerie classique, à l'échelle du laboratoire, et des réactions menées dans un microréacteur, à l'échelle du micron et illustrer ainsi l'apport de la microfluidique à la conduite de réactions de chimie organique classiques. Cette étude a été effectuée sur une réaction bien connue à notre laboratoire : la méthylation de la quercétine. À l'échelle du laboratoire, cette réaction donne accès à un mélange complexe de molécules alkylées sur les cinq positions phénoliques du composé, avec différents degrés d'alkylation.

Nous avons ainsi étudié la réaction de méthylation de la quercétine dans des conditions conventionnelles dans de la verrerie classique, et dans des conditions microfluidiques avec un nanomélangeur. Le microréacteur consiste en un capillaire standard de 15 cm de longueur, avec un diamètre interne de 75 μm . Ce capillaire est alimenté par deux flux de réactifs, à débit fixé par des pousses-seringues (typiquement 1,5 $\mu\text{L}/\text{min}$). La solution est collectée en sortie de microréacteur et analysée par spectrométrie de masse pour identifier les produits formés et en LC-SM/SM pour les quantifier et en déterminer la structure (position(s) d'alkylation). Le mélange des deux flux est effectué à l'aide d'un mélangeur chaotique, Nanomixer (Upchurch Scientific), placé en amont du canal de réaction.

Le troisième chapitre de cette thèse étudiera le développement de systèmes intégrés pour la préparation d'échantillons biologiques avant leur analyse par MALDI. Les étapes de préparation des échantillons sont réalisées sur la cible MALDI elle-même, ces étapes pouvant être le dessalage d'échantillons peptidiques ou le piégeage sélectif de protéines données. A cette fin, il est nécessaire de fonctionnaliser les plots de la cible MALDI avec une phase stationnaire appropriée. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés au développement d'une fonctionnalisation en volume de la surface à l'aide de brosses de polymère, réticulé ou non

réticulé. La composition du polymère est choisie en fonction de l'application visée. Ainsi, nous avons utilisé des monomères ayant une fonctionnalisation hydrophobe pour des applications de dessalage et des monomères comprenant un groupement réactif (cycle époxy), permettant l'ancrage ultérieur d'un anticorps, pour des applications de digestion ou de piégeage sélectif de protéines. Les brosses de polymère sont élaborées selon un protocole de polymérisation contrôlée (ATRP). La surface est d'abord garnie d'un bras-espaceur comportant une tête qui sert d'amorce à la polymérisation. Dans un second temps, la polymérisation est effectuée sur cette amorce pour donner une couche de polymère d'épaisseur homogène.

La dernière thématique abordée dans ce travail, est le développement de nouveaux marqueurs pour l'analyse protéomique. D'une part nous avons synthétisé des colorants fluorescents pour gels délectrophorèse et nous avons formulé notre solution colorante. D'autre part, nous avons développé la synthèse de réactifs permettant la caractérisation et l'isolation de deux grandes classes de modifications post-traductionnelles : la glycosylation, et l'oxydation. Ces réactifs originaux sont constitués d'une sonde permettant la reconnaissance de la fonction chimique recherchée, d'un bras espaceur, et d'une poignée permettant la manipulation de la protéine capturée.

Chapitre I : Synthèse des analogues glycosylés et glucuronidés de la quercétine

Partie A. Généralités

I. Introduction

La quercétine est une molécule naturelle présente dans de nombreux légumes, en particulier les oignons. C'est le flavonoïde dont la consommation journalière est la plus élevée (entre 10 et 100 mg par jour suivant les habitudes alimentaires). La quercétine appartient à la famille des flavones, bien connue pour être active dans toutes les maladies liées au vieillissement (maladies cardio-vasculaires, maladies neuro-dégénératives, cancer...). L'un des objectifs majeurs des recherches actuelles en nutrition est de comprendre le rôle des métabolites secondaires (terpènes, polyphénols, alcaloïdes) pour la santé humaine. Les flavonoïdes sont métabolisés sous forme de dérivés glucuronidés, sulfatés et/ou méthylés. Malheureusement, très peu de données structurales sont disponibles pour ces métabolites. La compréhension des effets biologiques de ces composés devient très délicate, d'autant plus que les quantités disponibles par les études biochimiques des rares métabolites identifiés sont infimes et ne permettent l'étude ni des propriétés biologiques, ni des caractéristiques physico-chimiques. Le but de ce travail est de synthétiser les métabolites glucuronidés et les analogues de la quercétine qui ne sont pas disponibles pour les études biologiques.

II. Les polyphénols

Les polyphénols sont des composés très répandus dans les végétaux des racines jusqu'aux fruits^[1-5]. Ils ont de nombreuses propriétés. Par exemple, ils jouent un rôle important dans l'aspect (couleur), la saveur (arôme) et la conservation (propriétés bactéricides) des aliments d'origine végétale.

Le terme de polyphénols englobe tous les composés phénoliques naturels et notamment un groupe de molécules ayant un squelette de base de 15 atomes de carbones (C₆-C₃-C₆) appelé flavonoïdes.^[1-5] Le nombre de flavonoïdes caractérisés à l'heure actuelle est assez impressionnant puisqu'il avoisine les 6500 molécules. Leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun, la 4,2,4',6'-tétrahydroxylchalcone. Par action enzymatique, cette chalcone se métabolise en différentes classes de flavonoïdes dont la structure varie selon le degré d'oxydation du squelette de base et la position des substituants sur le noyau central. Les classes de flavonoïdes les plus importantes sont les flavones et les flavonols (pigments jaunes), les anthocyanidines (pigments bleus et rouges des fleurs et fruits), les catéchines, les

flavanones, les flavanonols et les proanthocyanidines. Cinq classes de composés qui ne possèdent pas le squelette 2-phényl-chromone classique mais qui sont très proches chimiquement et biosynthétiquement des autres types de flavonoïdes sont également incluses dans ce groupe : les isoflavones, les dihydrochalcones, les chalcones, les néoflavones et les aurones (Figure I.1).

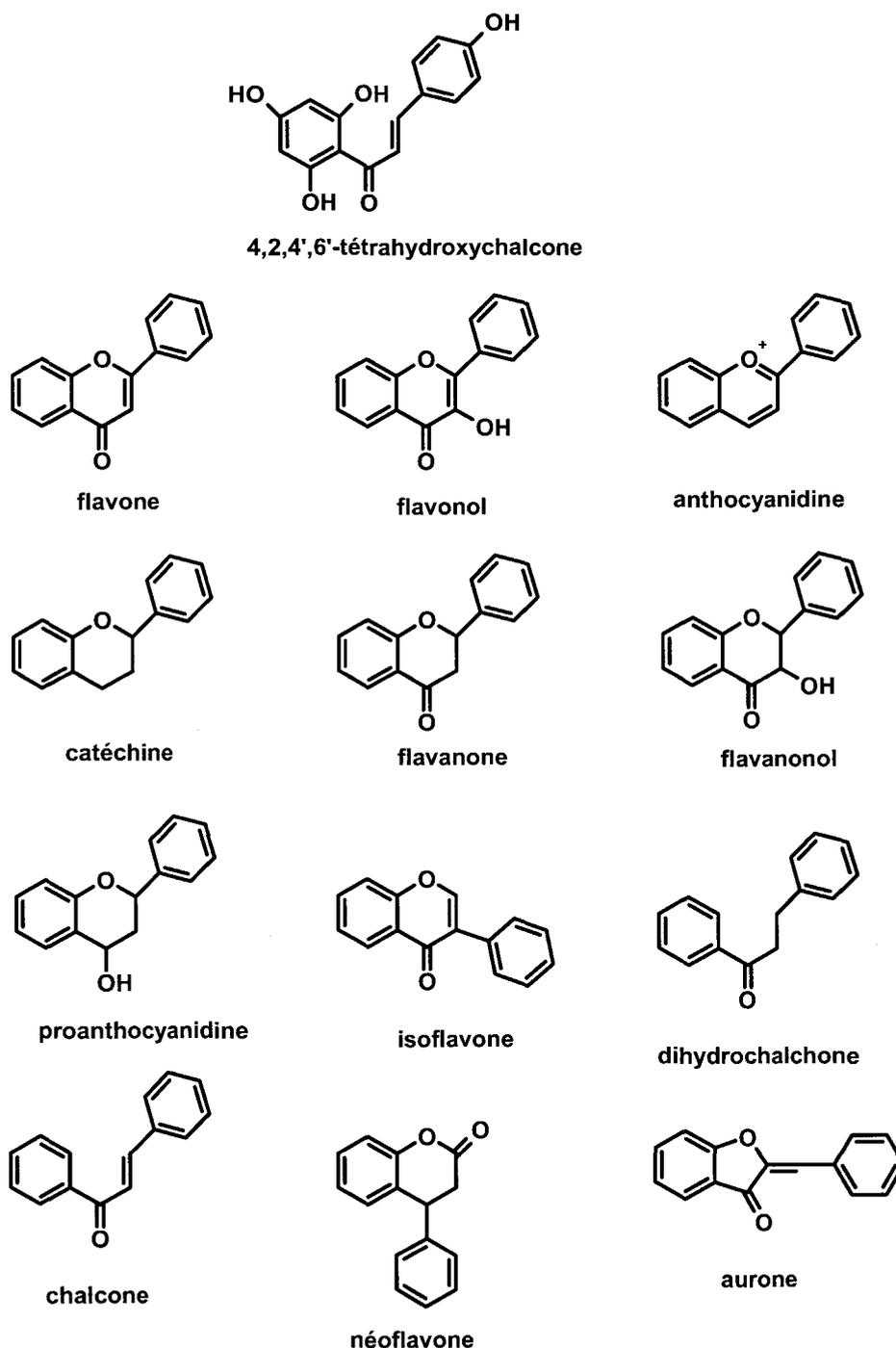


Figure I.1 : Les différentes classes de flavonoïdes.

III. Structure et localisation de la quercétine.

Les flavonols^[3] constituent l'une des classes majeures des flavonoïdes. La quercétine (Figure I.2) appartient à cette classe de composés. Les fruits^[6], les légumes^[6, 7] et les boissons^[8, 9] telles que le thé et les jus de fruits sont les principales sources de la quercétine en alimentation humaine. (Tableaux I.1 et I.2)

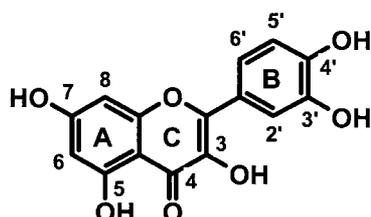


Figure I.2 : Structure de la quercétine.

Teneur en quercétine des fruits et légumes (mg / 100 g)	
Pomme	10-28
Abricot	2,5
Myrtille	10
Ciboulette	10,4
Baie de sureau	10,5-24
Oignon blanc	28-49
Chou frisé	11
Poireau	1,0-2,5
Fraise	0,8-1

Tableau I.1 : Teneur en quercétine des fruits et légumes^[6, 7]

Teneur en quercétine des boissons (mg / 100 mL)	
Jus de pomme	0,25
Jus de raisin	0,44
Jus de pamplemousse	0,49
Jus de citron	0,74
Jus d'orange	0,34-0,57

Jus de tomate	1,1-1,3
Thé vert	1,4-2,3
Vin rouge	0,4-1,6

Tableau I.2 : Teneur en quercétine de quelques boissons usuelles^[8, 9]

IV. Propriétés biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes et les flavonols en particulier présentent de très nombreuses propriétés biologiques entre autre bactéricides,^[10] antivirales,^[11, 12] anti-inflammatoires,^[13-15] et antioxydantes.^[16] Ils sont principalement connus pour leurs effets protecteurs faces aux maladies liées au vieillissement,^[16] telles que les maladies neurodégénératives,^[17] les cancers^[18-20] et les maladies cardiovasculaires.^[19, 21]

IV.1. Activités cardio-protectrices

Plusieurs études épidémiologiques^[22-24] ont montré que l'absorption d'un régime alimentaire composé de flavonoïdes est corrélée à la réduction de la mortalité par maladies cardiovasculaires. La quercétine peut participer à la prévention de ces maladies cardiovasculaires. Elle inhibe l'oxydation des lipoprotéines, qui sont des vésicules de transport du cholestérol dans le sang, et dont l'oxydation est un événement crucial dans les premières étapes du développement de l'athérosclérose, cause sous jacente des infarctus, thrombose et toutes autres maladies cardiovasculaires.

Les mécanismes exacts de protection des LDL par les polyphénols sont loin d'être bien compris. Différentes hypothèses sont avancées, nous en présentons quelques unes :

-(i) les polyphénols peuvent piéger les radicaux libres formés au niveau des sites inflammatoires,

-(ii) comme la peroxydation lipidique a lieu lorsque les antioxydants endogènes sont épuisés (α -tocophérol, β -carotène, lycopène...), les polyphénols pourraient retarder l'oxydation des antioxydants présents dans les LDL en étant oxydés avant eux,

-(iii) ou encore, ils pourraient les régénérer, par exemple, en transférant un atome d'hydrogène au radical de l' α -trophérol formé pendant l'oxydation.

-(iv) comme les polyphénols sont de bons chélateurs de métaux, ils pourraient aussi inhiber l'oxydation des LDL par capture des ions métalliques induisant leur oxydation.

-(v) ou encore en réduisant la formation des radicaux libres produits par les réactions de Fenton.

IV.2. Activités anticancéreuses

De nombreuses études épidémiologiques ont montré une corrélation inverse entre la consommation de fruits et légumes et l'incidence de différents cancers.^[25, 26] Les études réalisées *in vitro* ou *in vivo* sur l'animal de laboratoire suggèrent que les polyphénols peuvent agir à tous les stades de la cancérogenèse. Le quart de la population qui ne consomme que peu de fruits et légumes présente un risque deux fois plus élevé pour la plupart des cancers, que la fraction de la population qui suit un régime riche en fruits et légumes.

Les mécanismes impliqués dans ces effets sont encore peu connus malgré un grand nombre d'études consacrées à ce sujet.

V. Métabolisme de la quercétine

Si les études *in vitro* s'accordent à rapporter des effets biologiques intéressants pour les flavonoïdes, on manque encore actuellement de données sur leur devenir dans l'organisme une fois qu'ils ont été ingérés, c'est à dire sur leur biodisponibilité. Elle se définit comme étant la fraction de l'apport alimentaire d'un composé capable de remplir un rôle biologique dans l'organisme. Elle dépend de l'absorption, du transport dans le sang, du métabolisme par divers organes, du stockage et de l'élimination. Pour appréhender les effets sur la santé des flavonoïdes, il est essentiel de disposer de suffisamment de données sur leur devenir dans l'organisme, et notamment l'absorption et le métabolisme des flavonoïdes dans la sphère splanchnique qui est composée de l'intestin et du foie.

Les données de la littérature^[27-30] ont permis de dresser un schéma général de la biodisponibilité des flavonoïdes, ces étapes étant similaires chez le rat et chez l'homme. Le métabolisme des flavonoïdes implique quatre étapes distinctes et intrinsèquement liées : la dépolymérisation, s'il y a lieu, par le milieu acide de l'estomac, l'absorption intestinale, le métabolisme au niveau des tissus internes au cours duquel le squelette de la forme native est préservé, et enfin la dégradation par la microflore du gros intestin des flavonoïdes en acides phénoliques (Figure I.3).

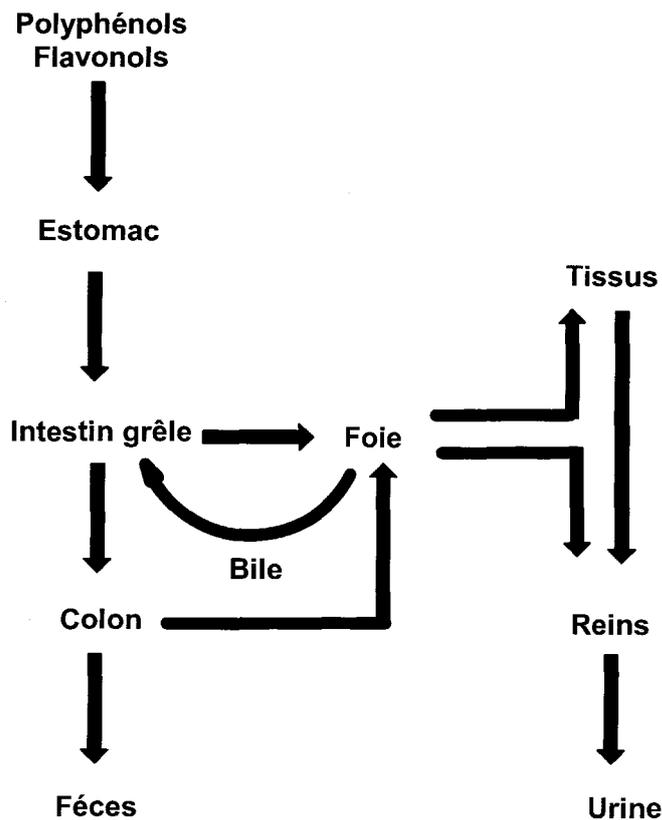


Figure I.3 : Les différentes voies possibles du métabolisme pour les polyphénols.

Les flavonoïdes sont présents dans notre alimentation sous plusieurs formes, et cette particularité va leur conférer des métabolismes différents. C'est ainsi que les formes libres peuvent être directement absorbées au niveau de l'intestin grêle, tandis que les formes glycosylées doivent être hydrolysées par la flore intestinale au niveau du côlon, avant de pouvoir être absorbées. Cependant, les formes libres issues de l'hydrolyse, peuvent aussi être dégradées par la microflore en acides phénoliques, eux mêmes absorbés ou éliminés via les féces. Dans le sang, les flavonoïdes ne sont pas présents sous leur forme native car ils ont été transformés au niveau du foie par des enzymes dites de conjugaison qui transforment les flavonoïdes en flavonoïdes conjugués. Ces métabolites ainsi formés vont atteindre leur tissu cible pour avoir un effet biologique ou bien être éliminés définitivement dans les urines. Toutefois, une fraction des flavonoïdes peut être déversée au niveau de l'intestin via la bile. Dans ce dernier cas, les métabolites peuvent être hydrolysés par les enzymes d'origine bactériennes, présentes dans l'intestin, libérant de nouveau l'aglycone qui éventuellement pourra être réabsorbé, et qui constitue un recyclage entéro-hépatique des flavonoïdes.

Il reste encore des questions à résoudre dans la biodisponibilité des flavonoïdes, et notamment la détermination des modalités d'absorption, le rôle respectif de l'intestin et du foie dans la conjugaison des flavonoïdes, ainsi que l'implication de la sécrétion biliaire. De même, il est nécessaire de statuer sur la nature des formes présentes dans le sang et le devenir des propriétés biologiques de ces formes circulantes.

Partie B. Synthèse des analogues glycosylés et glucuronidés de la quercétine

I. Introduction

Comme nous venons de le voir, un des freins majeurs à la compréhension des bienfaits des flavonols sur la santé humaine vient des quantités infimes de métabolites isolées par des techniques biochimiques. A cela s'ajoute un manque flagrant d'information sur la réactivité intrinsèque de chaque partie des molécules. Le but de ce travail est donc de proposer d'une part une voie de synthèse de métabolites connus de la quercétine et, d'autre part, celle de composés modèles de la quercétine présentant une réactivité identique à la molécule mère et permettant une étude sélective des différentes parties, voire même de chaque fonction phénolique de la molécule.

Une stratégie de synthèse doit donc être envisagée, reposant notamment sur le choix des groupements protecteurs. La synthèse des analogues de la quercétine nécessite la mise en œuvre de diverses protections de phénol et catéchol. Le choix des différents groupes protecteurs est principalement dicté par trois critères : (i) la nature du groupe à protéger et les caractéristiques de la molécule elle-même, (ii) la stabilité de la protection vis à vis des conditions expérimentales ultérieures, (iii) les conditions de l'étape de déprotection.

II. Protection des fonctions phénoliques de la quercétine

La synthèse de différents analogues glycosylés et glucuronidés de la quercétine nécessite, comme nous venons de le voir, l'utilisation de groupements protecteurs judicieusement choisis. La protection sélective de l'un des deux cycles offrant la possibilité de modifier librement le cycle resté libre et d'accéder ainsi à divers analogues de la quercétine. L'étape clé dans cette synthèse réside dans la protection sélective du cycle B. Aussi nous

allons examiner, tout d'abord, différentes protections possibles pour les groupements catéchols avant de discuter plus en détail des différentes synthèses réalisées lors de ce travail.

II.1. Protection du groupement de type catéchol

Les catéchols peuvent être protégés sous forme de diéthers ou de diesters par les méthodes classiquement rencontrées pour les phénols. Cependant, la formation d'acétals, de cétals ou d'esters cycliques se révèle plus spécifique puisqu'elle permet de protéger sélectivement deux fonctions phénols vicinales sans affecter les autres fonctions phénols de la molécule.

II.1.1. Ether d'alkyle

Les éthers de méthyles sont usuellement préparés selon une variante de la synthèse de Williamson, le groupe hydroxyle réagit avec l'iodure de méthyle, le sulfate de diméthyle ou les triflates de méthyle en présence d'une base appropriée.^[31]

Les éthers de méthyles sont usuellement clivés par un acide de Lewis tel que l'iodure de triméthyle silyle (TMSI)^[32] dans le chloroforme et le trichlorure de bore (BCl_3) dans le dichlorométhane^[33]. Dans certains cas, l'addition d'un thiosulfure (Me_2S)^[34] qui forme un complexe solide avec le BBr_3 , fournit un nucléophile doux qui facilite la scission nucléophilique de la liaison C-O.

II.1.2. Ether d'aryle

Les méthodes de préparation des éthers de benzyles sont analogues à celles utilisées dans la préparation des éthers de méthyles. La réaction se déroule en présence de bromure ou de chlorure de benzyle et d'une base faible telle que K_2CO_3 ou Na_2CO_3 qui sert à la déprotonation du phénol. Dans le cas des catéchols substitués, il est intéressant de noter que la réactivité des deux fonctions hydroxyles est légèrement différente.

L'hydrogénation catalytique est de loin la méthode la plus douce pour le clivage de la liaison éther benzylique. Le catalyseur de choix est le palladium sur charbon dans le THF.

II.1.3. A partir de composés carbonylés

La protection d'un groupement catéchol en acétal via l'utilisation d'un groupement méthylènedioxy^[35] ou en acétal via l'utilisation d'acétone^[36] ou de 2,2-diméthoxypropane^[37] présente des conditions de déprotection trop dures. En effet, la déprotection par l'utilisation de AlBr_3 à 0°C ^[38], dans le cas des acétals ou par hydrolyse acide en présence d'un mélange acide acétique/eau à 100°C pendant 18 heures dans le cas des cétales,^[36] n'est pas adaptée à des molécules fragiles. Laks et al^[39] ont ainsi proposé une stratégie de protection de la catéchine utilisant une cétone symétrique de type R_2CO . Ils ont ainsi préparé six analogues protégés de la catéchine, avec des rendements inférieurs à 10%, en faisant varier la longueur de la chaîne alkyle du groupement R de 5 à 15 carbones (Figure I.4). Nous nous sommes intéressés à des groupements protecteurs clivables dans des conditions plus douces afin de préserver la molécule. Ces groupements protecteurs peuvent être soit des silanes, soit le dichlorodiphénylméthane.

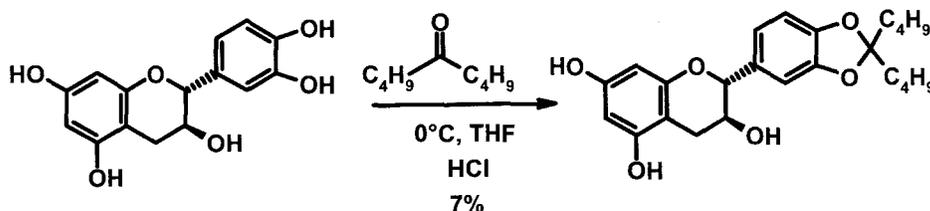


Figure I.4 : Synthèse de la dinonanylméthylènedioxycatéchine

II.1.3.1. Protection par des silylènes

Les éthers ou cétales silylés jouent, en effet, un rôle important dans la protection des groupements catéchols. La réaction du diol avec le dichloro-di-*tert*-butyl silane en présence de 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) a été la première méthode utilisée pour préparer les dérivés des di-*tert*-butyl silylène.^[40] L'action du di-*tert*-butyldichlorosilane, du ditriflate de di-*tert*-butylsilane ou du ditriflate de diisopropylsilane en présence de triéthylamine ou de 2,6-lutidine conduit à la protection désirée (Figure I.5). L'utilisation de triéthylamine dans l'acétonitrile a également conduit à des rendements satisfaisants dans le cas du noyau catéchol de la catéchine (Figure I.6).^[41]

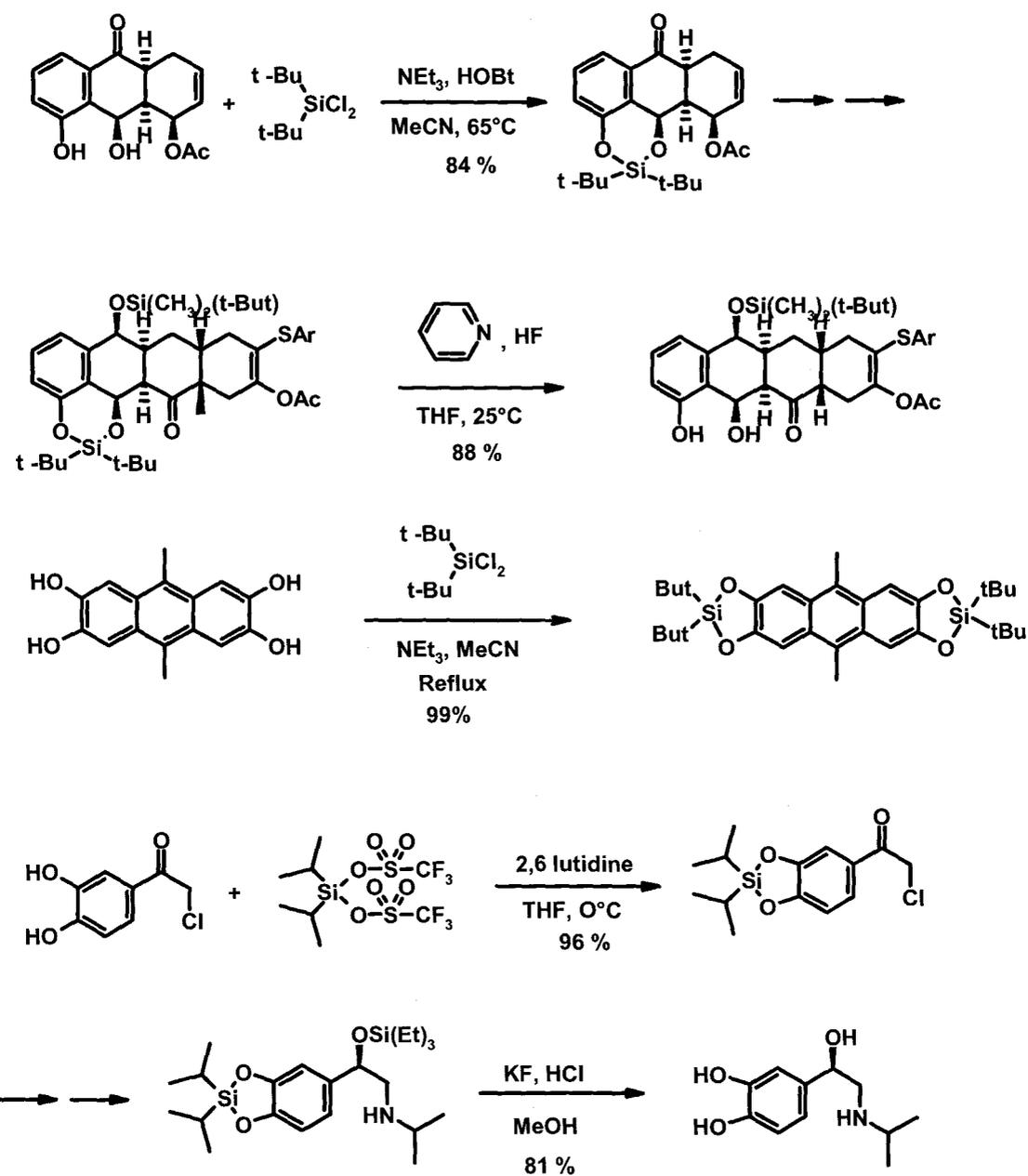


Figure I.5 : Protection et déprotection de diols et catéchols par des dérivés silylés.

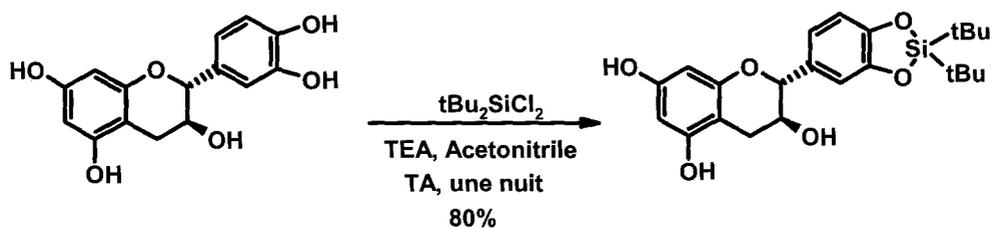


Figure I.6 : Protection du noyau catéchol de la catéchine avec les silylènes

Pour couper ces éthers silylés, l'ion fluorure en milieu aprotique est un excellent agent. La déprotection s'effectue en présence d'acide fluorhydrique dans l'acétonitrile^[42] ou le méthanol^[43] ou bien en présence de complexe acide fluorhydrique-pyridine dans le THF^[40]. La principale difficulté rencontrée avec ce type de groupements protecteurs est leur instabilité relative durant la purification par chromatographie sur colonne de silice, ce qui limite parfois leur utilisation (Figure I.7)

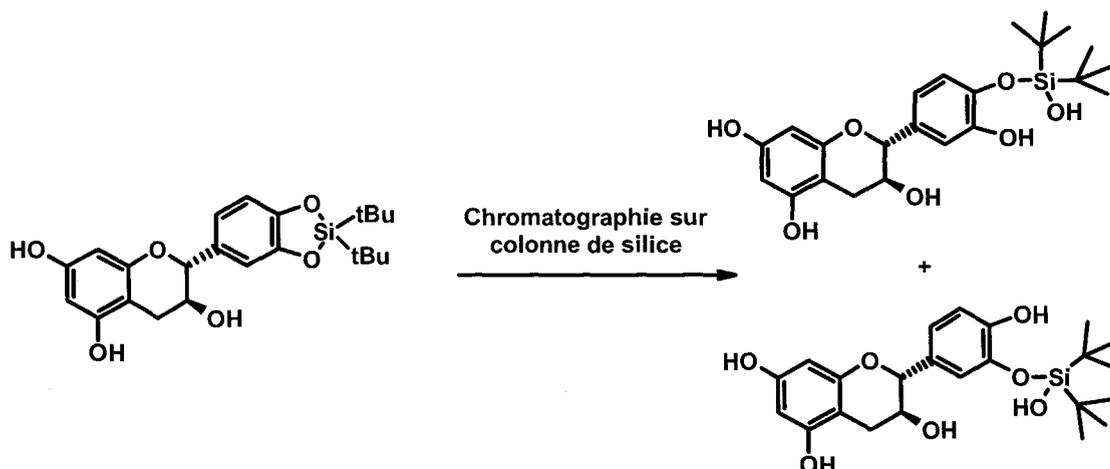


Figure I.7 : Hydrolyse de dérivés di-*tert*-butylsilène sur colonne de silice.

II.1.3.2. Protection par le dichlorodiphénylméthane

Le groupement dichlorodiphénylméthane constitue une autre protection possible des fonctions catéchols et s'avère utile lorsque des conditions de déprotection en milieu acide ne peuvent être utilisées ou lorsqu'une stratégie de déprotection sélective des différents groupements s'impose. Le groupement dichlorodiphénylméthane peut être introduit sur les catéchols de deux manières distinctes. La première consiste en l'action du dichlorodiphénylméthane en présence d'une base (carbonate de potassium) dans l'acétonitrile^[44] (Figure I.8) alors que la seconde met en oeuvre des conditions dures : chauffage à haute température (170°C,^{[45],[46]} ou 180°C^[47]) (Figure I.9).

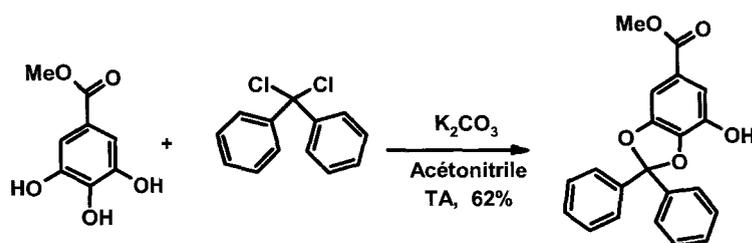


Figure I.8 : Protection du groupement catéchols dans un milieu basique

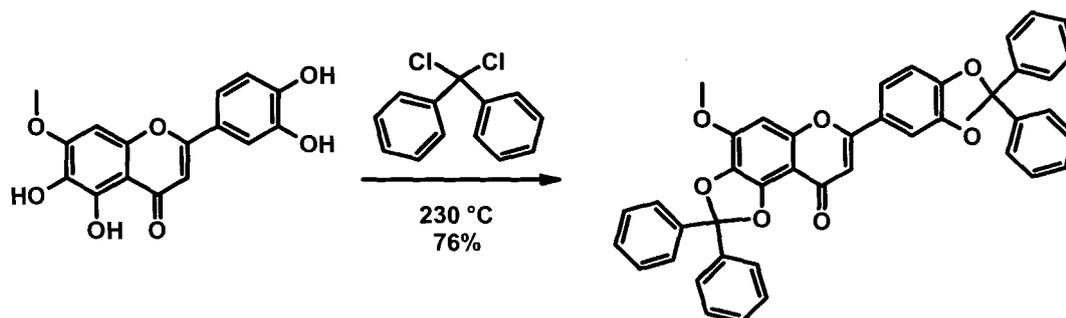


Figure I.9 : Protection de groupement catéchols dans les conditions de chauffage

Les cétyls de ce type, peuvent en général, être clivés par hydrogénation catalytique en présence de Pd/C dans le MeOH^[48] ou l'acétate d'éthyle.^[49] Cette réaction peut aussi être effectuée par hydrolyse acide contrôlée avec AcOH/eau^[44, 45] ou avec l'acide trifluoracétique.^[50]

II.2. Protection sélective de la quercétine

II.2.1. Benzylation de la quercétine

Le radical benzyle a l'avantage de pouvoir être éliminé, par simple hydrogénation catalytique sans dommage pour les produits.

Dans un premier temps il nous est apparu intéressant d'optimiser les conditions de la benzylation partielle en variant le nombre d'équivalent des réactifs (Tableau I.3). Ainsi l'action d'un équivalent de bromure de benzyle sur la quercétine en présence de carbonate de potassium (1,25 équivalent) dans le DMF conduit en plus de la quercétine résiduel à un mélange d'isomères de mono-, di- et tri-*O*-benzylquercétine dont le rapport est respectivement 32 (isomères mono)/ 49 (isomères di) / 19 (isomères tri). L'utilisation de deux et trois équivalents favorise la formation des composés tri- et tetra-*O*-benzyle quercétine par rapport aux composés mono- et di-*O*-benzyle quercétine. Dans les mêmes conditions avec 3.5 équivalents de bromure de benzyle, la réaction ne donne que deux produits majoritaires le tri-*O*-benzylquercétine 24% et tetra-*O*-benzylquercétine 72%. La quercétine pentabenzylée est aussi obtenue sous forme de trace (Figure I.10).

	0,5 equiv	1 equiv	2 equiv	3 equiv	3,5 equiv	6 equiv
Composés monobenzylé	70	32	0	0	0	0
Composés dibenzylé	25	49	48	0	0	0
Composés tribenzylé	5	19	44	52	24	0
Composés tetrabenzylé	0	0	8	36	72	0
Composé pentabenzylé	0	0	0	12	4	100

Tableau I.3 : Optimisation des conditions de la benzoylation de la quercétine

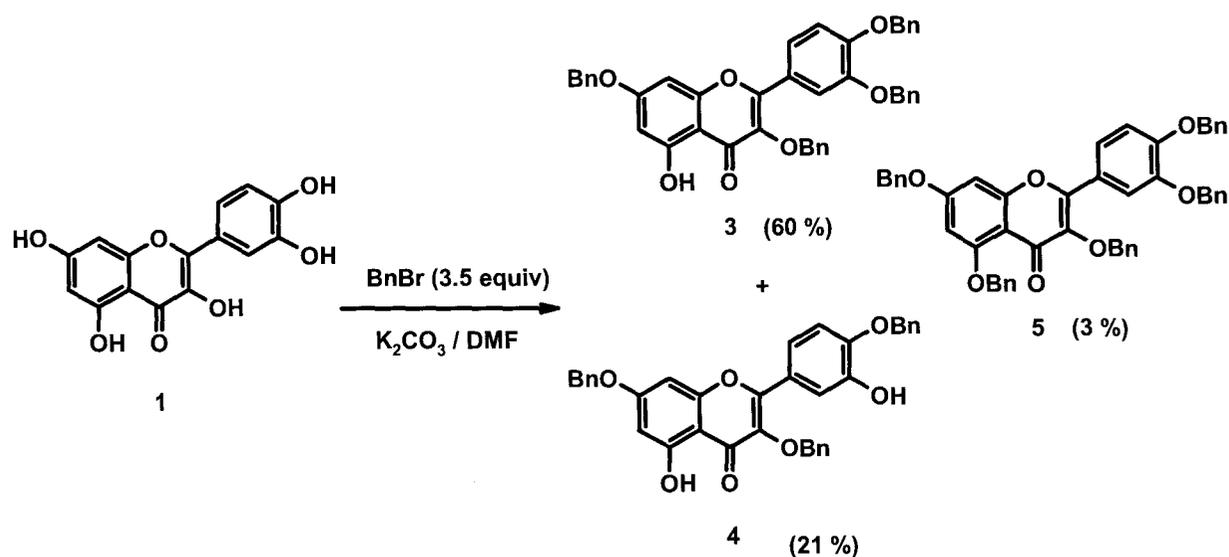


Figure I.10 : Benzoylation de la quercétine

Pour la tri-*O*-benzylquercétine, la benzoylation en position 5 doit être écartée car le groupement hydroxyle résiste à la benzoylation du fait qu'il forme une liaison hydrogène avec la fonction cétone en position 4. Quatre autres structures sont alors possibles suivant la position des radicaux benzyloxy : 3,3',4' ; 3,3',7 ; 3,4',7 et 3', 4',7. La structure de la tri-*O*-benzylquercétine est déterminée par spectroscopie NOE (effet Overhauser nucléaire) à une dimension, après méthylation des fonctions hydroxyles libres du composé 4 par l'action d'un excès d'iodure de méthyle dans le DMF en présence de K₂CO₃ (Figure I.11).

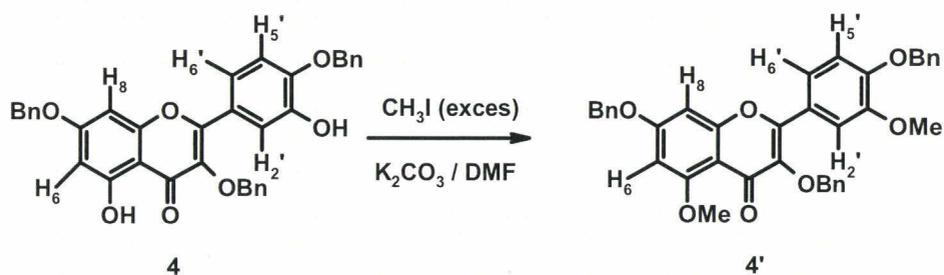
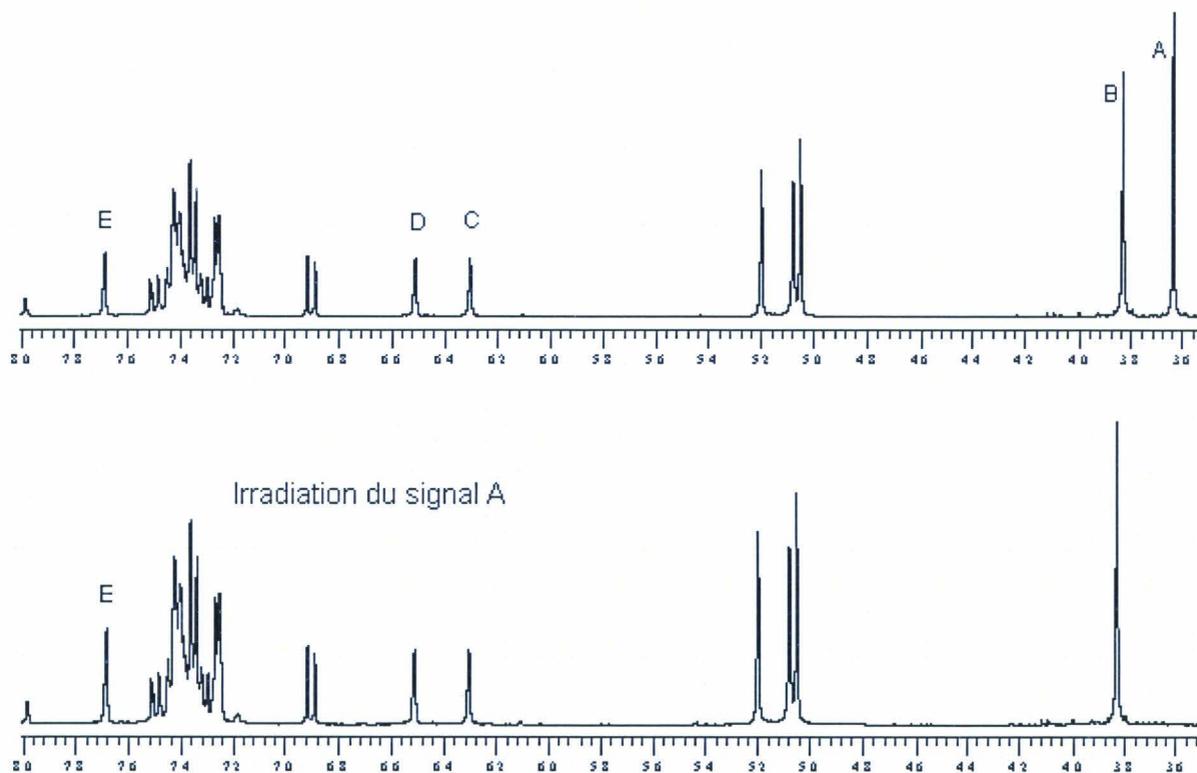


Figure I.11 : Méthylation du composé **4** pour l'étude par effet Overhauser nucléaire NOE.

L'irradiation des signaux **A** et **B** qui correspond aux fréquences de résonance des deux groupements méthyles provoque une augmentation de l'intensité des signaux **C** et **E** attribuables aux protons H_6 et $H_{2'}$, tandis que les signaux correspondants aux protons $H_{5'}$ et H_8 ne sont pas affectés (Figure **I-12**). La structure du composé tri-*O*-benzylé obtenu est donc la 3,4',7-tri-*O*-benzylquercétine.



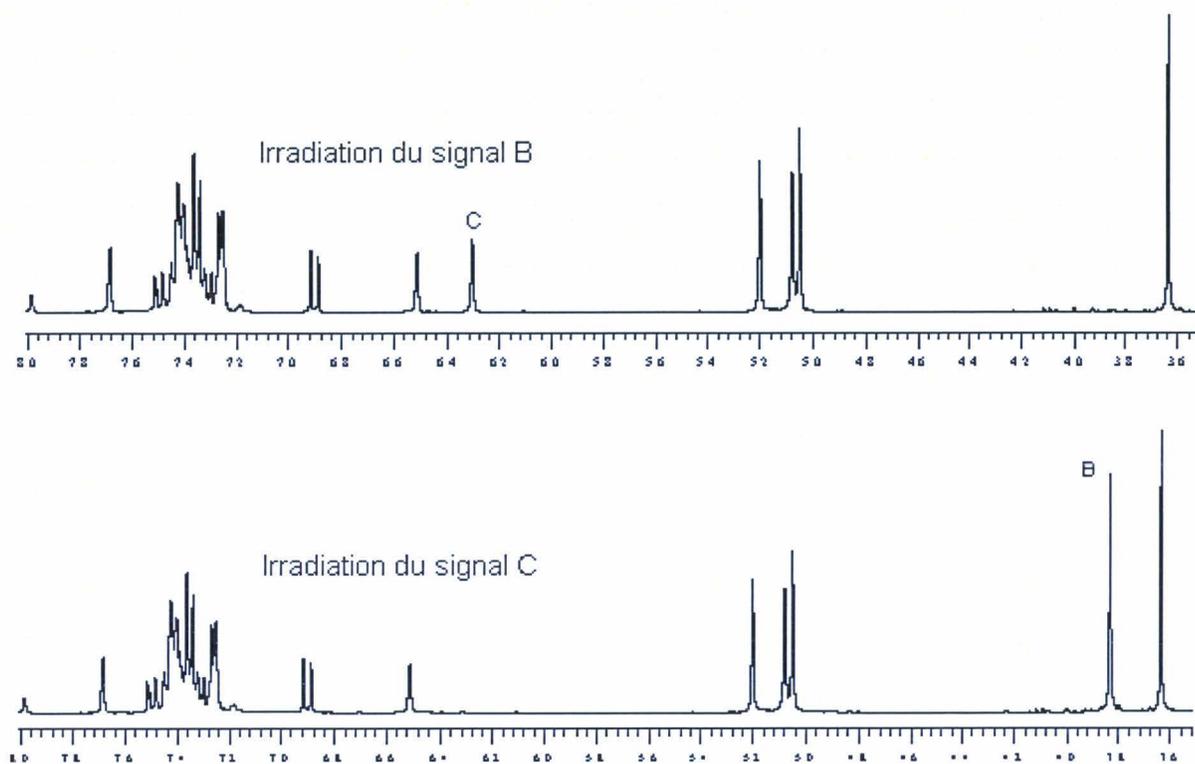


Figure I-12 : Effets NOE, observés sur les spectres RMN du composé **4'**.

II.2.2. Protection du cycle B de la quercétine

Comme nous venons de le voir, la protection sélective du cycle B est l'étape déterminante des synthèses conduisant aux analogues glycosylés et glucuronidés de la quercétine respectivement sur les cycles A ou B. Afin d'obtenir la protection sélective du cycle B de la quercétine, nous avons choisi l'utilisation du dichlorodiphénylméthane (Figure I-13). L'action du dichlorodiphénylméthane (2 équivalents) sur la quercétine à 180°C pendant 5 min dans le DMF, conduit au composé désiré **2** avec un rendement de 35 %.

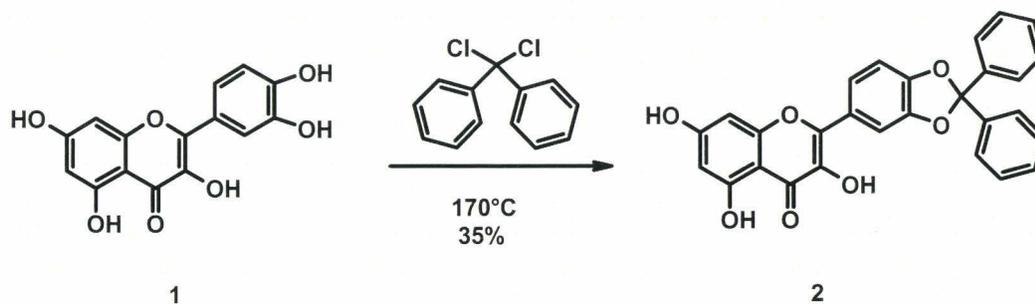


Figure I.13 : Protection du groupement catéchol de la quercétine par le dichlorodiphénylméthane.

III. Synthèse des analogues glycosylés et glucuronidés de la quercétine

III.1. Introduction

Les métabolites et analogues dont on souhaite réaliser la synthèse sont des dérivés glucuronidés. Il est envisageable, à priori, d'introduire directement le noyau glucuronidé. Cependant, il s'avère que la fonction acide de celui-ci désactive fortement la molécule et empêche un couplage efficace.^[51] Il a donc fallu modifier notre stratégie de synthèse et choisir un autre réactif pour le couplage. Nous avons donc envisagé de faire réagir la quercétine protégée sur un dérivé du glucose afin d'obtenir les intermédiaires glycosylés et de les oxyder en fin de synthèse. Notre approche a donc été la suivante :

- glycosylation sélective de la quercétine.
- déprotection du groupement glycosidé.
- oxydation sélective de l'alcool primaire du groupement glycoside.
- déprotection finale des groupements hydroxyyles de la quercétine.

III.2. Glycosylation de la quercétine

Plusieurs méthodes ont été développées pour réaliser des *O*-glycosylations.^[52-56] Parmi ces méthodes, nous en avons choisi une inspirée de travaux antérieurs :^[57] l' α -bromo-tétraacétylglucose est condensé sur la quercétine dont certaines fonctions hydroxyyles sont protégées. La synthèse impliquant la condensation d'un α -halogéno-acétylose avec un aglycone flavonique avait déjà été utilisée par différents auteurs, dans des conditions opératoires variées.^[58-61] La nécessité dans notre cas d'obtenir sélectivement les isomères β , nous a donc conduit à utiliser les conditions classiques de glycosylation de types Koenigs-Knorr,^[62] qui reposent sur une substitution d'un halogénure (chlorure ou bromure), par un groupement nucléophile.

III.3. Choix du réactif de couplage

Le dérivé en question doit être activé en position hémiacétalique par un chlore ou un brome et protégé sur les fonctions hydroxyyles. En série glucose nous pouvons envisager trois groupements protecteurs pour les fonctions hydroxyyles 2, 3,4 et 6, à savoir : benzyle, benzoate

et acétate. Le groupement benzyle a tout d'abord été éliminé car il est déjà utilisé pour la protection du groupement hydroxyle de la quercétine. En effet, l'étape d'oxydation ultérieure du noyau glycosidique en glucuronide, risquant de toucher les fonctions phénoliques de la quercétine, il est nécessaire que celles-ci restent protégées, et donc que la déprotection des fonctions hydroxyles sur le sucre soit sélective.

Nous nous sommes alors orientés vers une protection par un groupement acétate, plus pratique à employer que le benzoate sur de grandes quantités de produit.

Le réactif finalement choisi pour effectuer la réaction de glycosylation a donc été le 1-bromo-2,3,4,6-tétraacétyl- α ,D-glycopyranoside, communément appelé acétobromoglucose (Figure I.14). Ce produit peut être facilement préparé par action d'acide bromhydrique dans l'acide acétique glacial sur l' α -D-glucose pentaacétylé.^[63] Il se conserve cristallisé à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

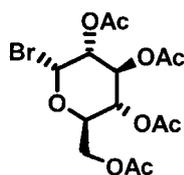


Figure I.14 : Structure de l'acétobromoglucose

III.4. Protocoles de glycosylation.

Couramment employée pour effectuer la glycosylation des phénols, et notamment celle de la quercétine, la substitution de l'halogène (chlorure ou bromure), par un groupement nucléophile suivant le protocole de Koenigs-Knorr est aidée par l'utilisation de sels ou d'oxyde d'argent, en présence de quinoléine.^[64] Les sous-produits de la réaction (halogénures d'argent), ainsi que le coût des sels eux-mêmes, nous ont amenés à envisager les variantes décrites pour de nombreux autres phénols.

Deux protocoles ont été testés.

- Utilisation du DMF comme solvant, en présence de carbonate de potassium, ces conditions sont classiquement utilisées pour effectuer une substitution sur un halogénure d'alkyle.^[65] Nous n'avons pas employé d'autre base que le carbonate de potassium, il s'agit lors de cette réaction de déprotoner un phénol et non d'activer un halogénure.

- Couplage glycosidique en conditions de transfert de phase; fréquemment décrit, ce protocole a longuement été considéré comme inadapté pour la synthèse de β -glycoside acétylés.^[66] Il a ensuite été développé avec l'acétobromoglucose^[67] et d'acétobromogalactose.^[68]

Le choix du protocole dépend de la position de la fonction hydroxyle sur laquelle se greffe le groupement glycosyle. Ainsi de bons rendements pour la glycosylation des hydroxyles en positions 5, 4' et 3 de la quercétine sont obtenus selon les conditions du protocole K_2CO_3 /DMF. La glycosylation de la fonction hydroxyle en position 3'et 7 s'effectue dans les conditions de transfert de phase avec de bon rendement.

III.5. Déprotection du groupement glycosyle

La déprotection est effectuée très simplement par transestérification des quatre acétates par le méthylate de sodium, dans le méthanol. La quantité de méthanol étant très largement supérieure à celle de glycoside, le déplacement de la réaction est total, et conduit à la formation d'acétate de méthyle et de glycoside libre. Le méthylate de sodium est utilisé en quantité catalytique, et neutralisé par la suite à l'aide d'une résine acide (amberlite), préalablement rincée à l'eau et au méthanol. Nous ne retrouvons donc plus dans le mélange réactionnel que le glycoside recherché, en solution dans le méthanol, et une petite quantité d'acétate de méthyle. Ces deux solvants sont évaporés sous vide. Le produit est obtenu de façon quantitative.

III.6. Oxydation sélective de l'alcool primaire du groupement glycoside.

L'oxydation de l'alcool primaire du noyau glycosidique est réalisée par l'hypochlorite de sodium NaOCl catalysé par le 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine 1-oxyde (TEMPO) en présence de KBr selon le mécanisme présenté dans la figure **I.15**.^[69-72] La faible solubilité de la quercétine protégée et glycosylée a été surmontée en opérant dans les conditions de transfert de phase en présence de bromure de tetrabutylammonium dans le dichlorométhane et dans une solution saturée de $NaHCO_3$.^[73-75]

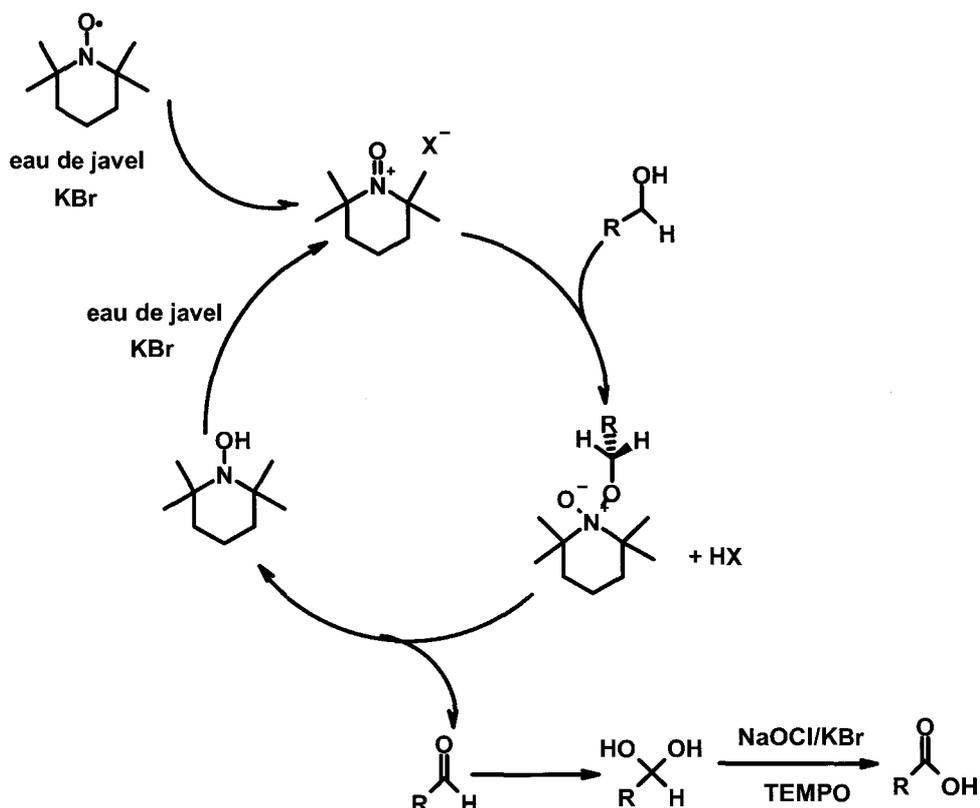


Figure I.15 : Mécanisme d'oxydation des alcools primaires par NaOCl en présence de TEMPO.

III.7. Déprotection des fonctions hydroxyles de la quercétine

La déprotection des groupements protecteurs existant sur la quercétine, les benzyles et le groupement dichlorophénylméthane, s'effectue par simple hydrogénolyse sur palladium à 10% dans du THF.

IV. Synthèse de la 3-*O*-glucuronide quercétine et de la 3-*O*-glycoside quercétine.

La stratégie de synthèse de la 3-*O*-glucuronide quercétine est constituée de cinq principales étapes à partir du composé **2** :

- (i) glycosylation sélective de la fonction hydroxyle en position 3
- (ii) protection des fonctions hydroxyles libres par un groupement benzyle
- (iii) déprotection du groupement glycosyle
- (iv) oxydation sélective de l'alcool primaire du groupement glycosyle
- (v) enfin la déprotection finale des fonctions hydroxyles de la quercétine.

Examinons, maintenant, plus en détail chaque étape de cette synthèse.

La première étape de cette synthèse est la glycosylation sélective du composé **2**. L'action de l'acétobromoglucose sur le composé **2** en présence de K_2CO_3 dans le DMF à température ambiante conduit, en effet, avec un rendement de 60% au composé **6**.

La benzylation des hydroxyles en position 5 et 7 constitue la seconde étape de cette synthèse. L'action d'un excès de bromure de benzyle en présence de carbonate de potassium dans le DMF à température ambiante sur le composé **6** conduit, avec un très bon rendement au composé **7** (Figure I.16).

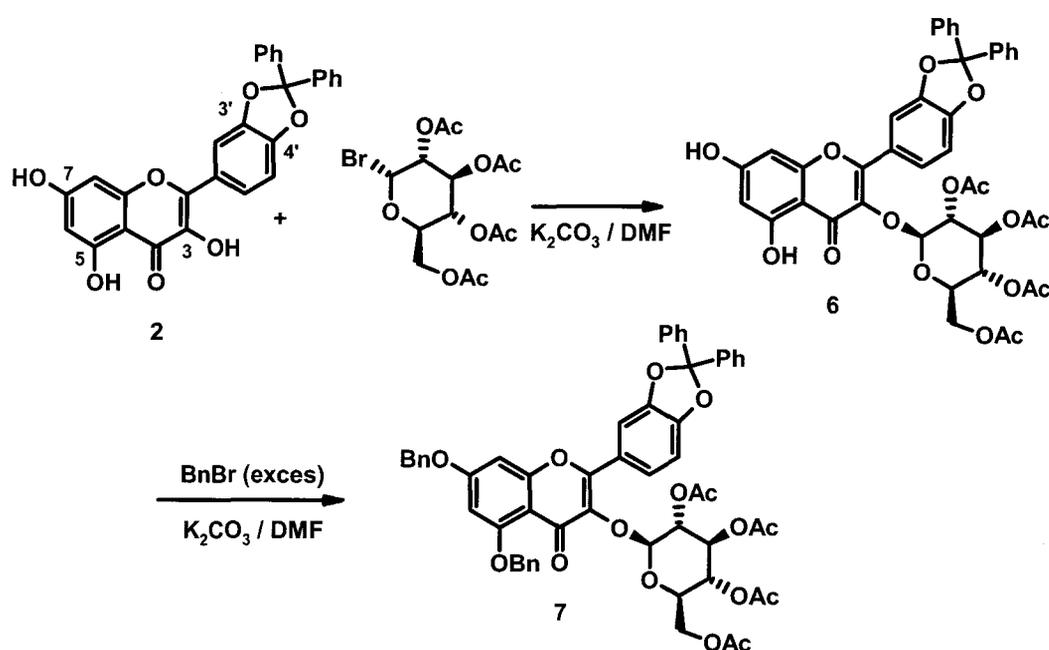


Figure 1.16 : Glycosylation sélective de la position 3 du composé **2** suivie d'une benzylation des fonctions hydroxyles libres en positions 5 et 7.

La sélectivité d'obtention de la configuration β glycoside^[76] peut être expliquée soit par une réaction de substitution nucléophile S_N2 , soit à travers le passage par le biais d'un ion oxonium acétyle cyclique dont la formation se produit par la participation de l'ester sur le carbone 2 de l' α -acétobromoglucose (Figure I.17).

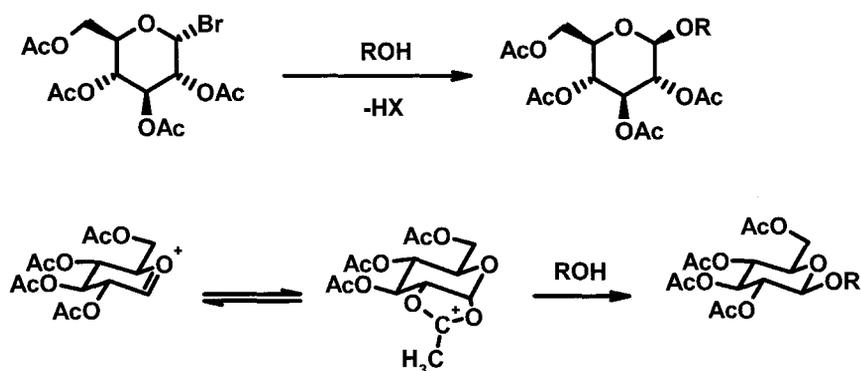


Figure I.17 : Mécanisme de formation de l'isomère de configuration β .

L'étape suivante de notre synthèse est la déprotection des alcools du groupement glycoside. La coupure des acétates du glycoside est réalisée par le méthylate de sodium dans le méthanol et conduit d'une façon quantitative au composé **8** (Figure I.18). La déprotection finale des fonctions hydroxyles de la quercétine donne accès au 3-*O*-glycoside quercétine avec un rendement de 70% (Figure I.19).

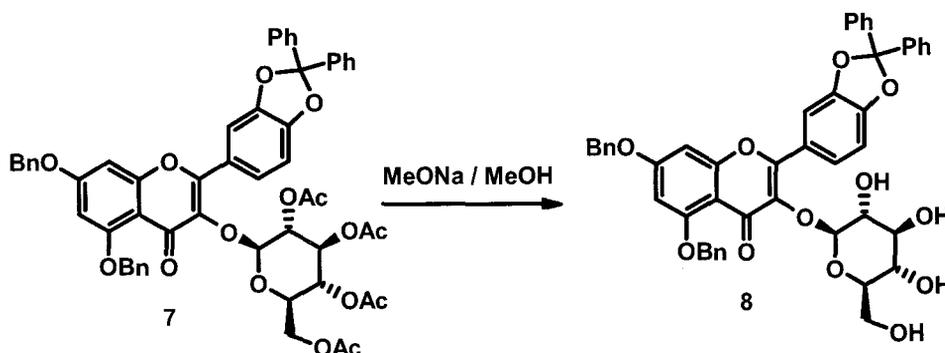


Figure I.18 : Désacétylation des quatre fonctions hydroxyles sur le noyau glycosidique

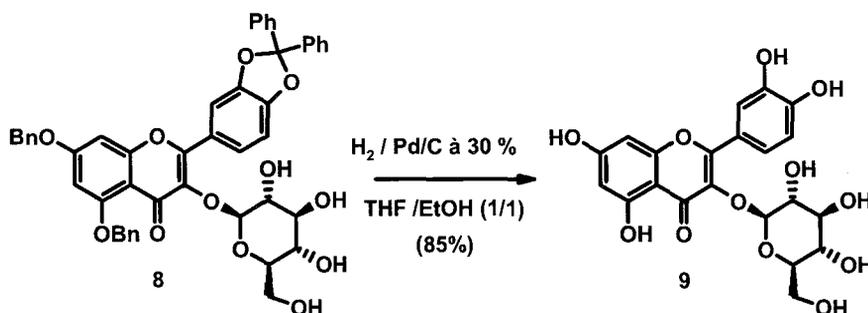


Figure I.19 : Déprotection des fonctions hydroxyles de la quercétine

Enfin, l'oxydation sélectif de l'alcool primaire par l'hypochlorite de sodium, catalysée par le 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine 1-oxyle (TEMPO), en présence de KBr, suivie d'une étape d'hydrogénolyse sur Pd/C à 30% dans le THF, conduit à la 3-*O*-glucuronide quercétine **10**, avec un rendement de 50% (Figure I.20).

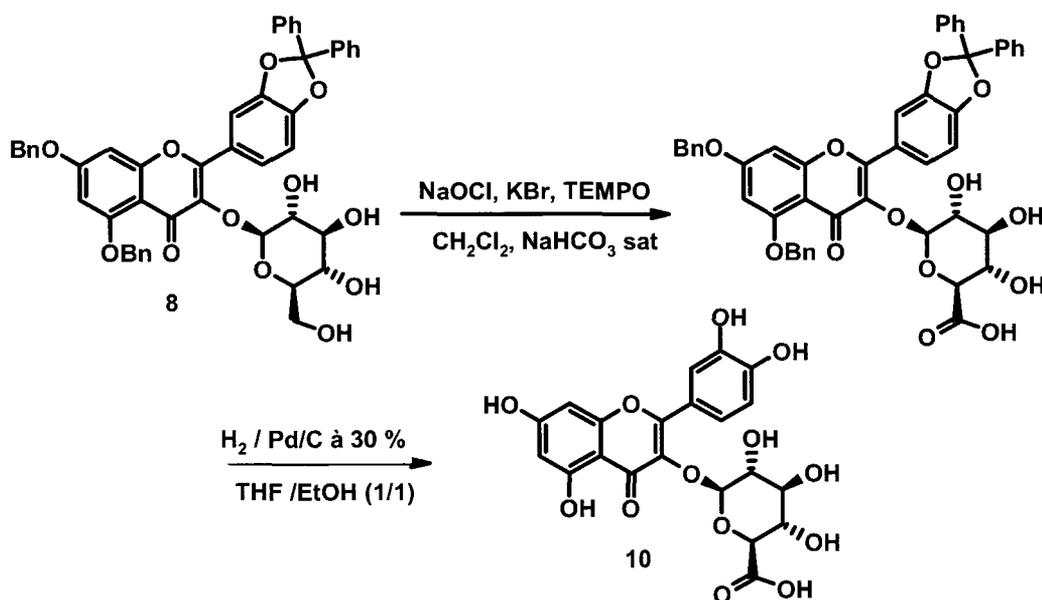


Figure I.20: Oxydation sélectif de l'alcool primaire suivie d'une déprotection des fonctions hydroxyles de la quercétine

Par la même stratégie de synthèse, nous avons obtenu la 3-*O*-glycoside et la 3-*O*-glucuronide quercétine à partir de la 3',4',5,7-*O*-tétrabenzylquercétine **11**, préparée par benzylation de la rutine suivie d'une hydrolyse acide. Dans cette méthode, la 3',4',5,7-*O*-tétrabenzylquercétine est obtenue en une seule étape. Cette synthèse est donc beaucoup plus simple à mettre en œuvre (Figure I.21).

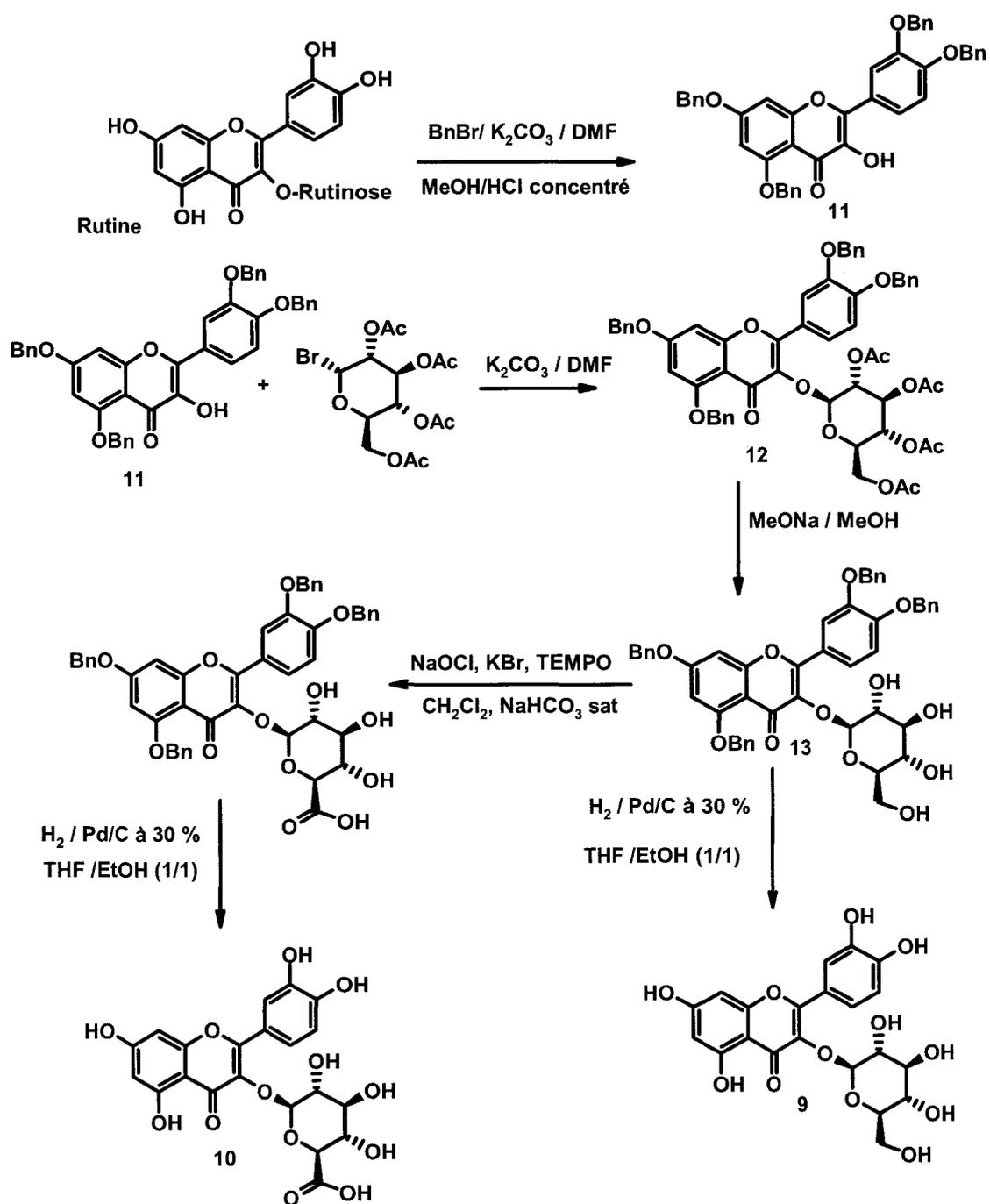


Figure I.21 : Schéma de synthèse de la 3-*O*-glycoside et de la 3-*O*-glucuronide quercétine à partir de la rutin

V. Synthèse de 5-*O*-glucuronide quercétine et de la 5-*O*-glycoside quercétine

La synthèse de la 5-*O*-glucuronidequercetine s'effectue en quatre étapes à partir du composé 4. La première étape consiste à glycosyler la fonction hydroxyle libre du composé 4.

Ainsi, l'action d'un excès d'acétobromoglucose en présence de carbonate de potassium dans le DMF sur le composé **4** conduit au composé **14** avec un rendement de 70%.

La seconde étape consiste à déprotéger le groupement glycoside par le méthylate de sodium dans le méthanol. Ensuite, l'hydrogénolyse des fonctions benzyle de la molécule donne accès à la 5-*O*-glycoside quercétine **16**, avec un rendement de 70%. D'autre part, l'oxydation de l'alcool primaire par l'hypochlorite de sodium, catalysée par le 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine 1-oxyde (TEMPO), en présence de KBr, suivie d'une étape d'hydrogénolyse sur Pd/C à 30% dans le THF, conduit à la 5-*O*-glucuronide quercétine **17**, avec un rendement de 40%.

La synthèse de la 5-*O*-glucuronide quercétine et de la 5-*O*-glycoside quercétine est résumée sur le schéma ci-dessous (Figure I.22)

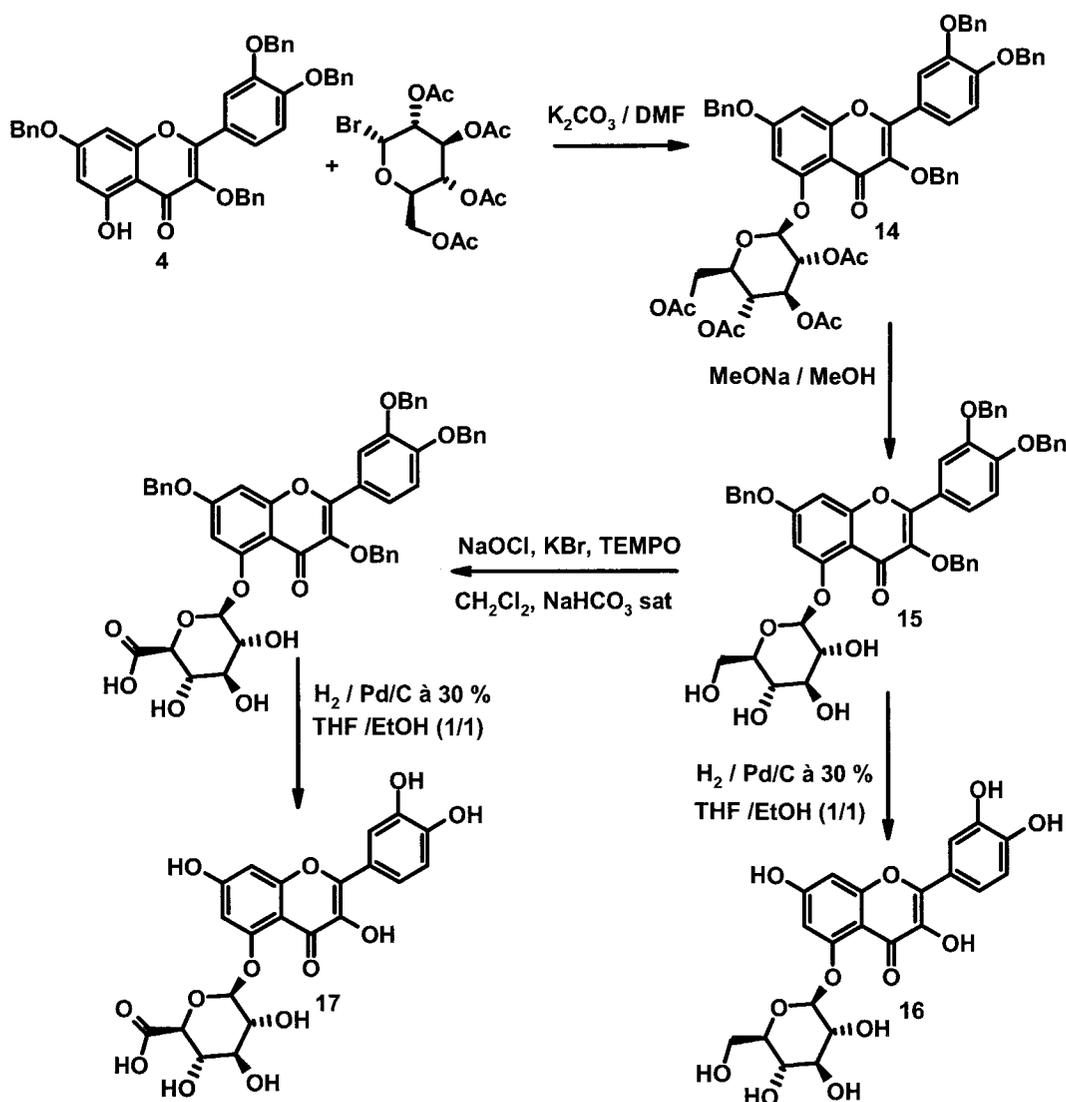


Figure I.22 : Schéma de synthèse de la 5-*O*-glycoside et de la 5-*O*-glucuronide quercétine.

VI. Synthèse de la 4'-*O*-glycoside quercétine

La synthèse de la 4'-*O*-glycoside quercétine (Figure I.23) se fait en quatre étapes à partir de la quercétine protégée par le dichlorophénylméthane (composé **2**).

La première étape consiste à protéger les trois fonctions hydroxyles libres du composé **2** par un groupement protecteur qui doit être stable dans les conditions de déprotection du groupement catéchol du noyau B (acide acétique / H₂O (80/20) à reflux). L'action du bromure de benzyle en présence de carbonate de potassium sur le composé **2** conduit ainsi quantitativement à la 3,5,7-*O*-tribenzyl-3',4'-diphénylméthylènedioxyquercétine **18**. Cette protection nous a donc permis de passer à la seconde étape de notre synthèse à savoir la déprotection sélective du cycle B. L'hydrolyse acide (acide acétique / eau (80/20)) à reflux pendant 3 heures du composé **18** permet d'obtenir la 3,7-*O*-dibenzylquercétine **19** avec un rendement de 65%. La déprotection du groupement benzyle en position 5 peut être expliquée par la participation de la fonction cétonique en position 4.

La glycosylation de la position 4' du composé **19** constitue donc la troisième étape de cette synthèse. L'action d'acétobromoglucose (1 équivalent) en présence de K₂CO₃ dans le DMF à température ambiante sur le composé **19** conduit, en effet, avec un rendement de 35% au composé **20**. La quatrième étape de cette synthèse est la benzylation des groupements OH en position 5 et 3'.

Enfin la déprotection des alcools du groupement glycoside, suivie d'une étape d'hydrogénolyse sur Pd/C à 10% dans le THF, conduit à la 4'-*O*-glycosidequercétine **23**.

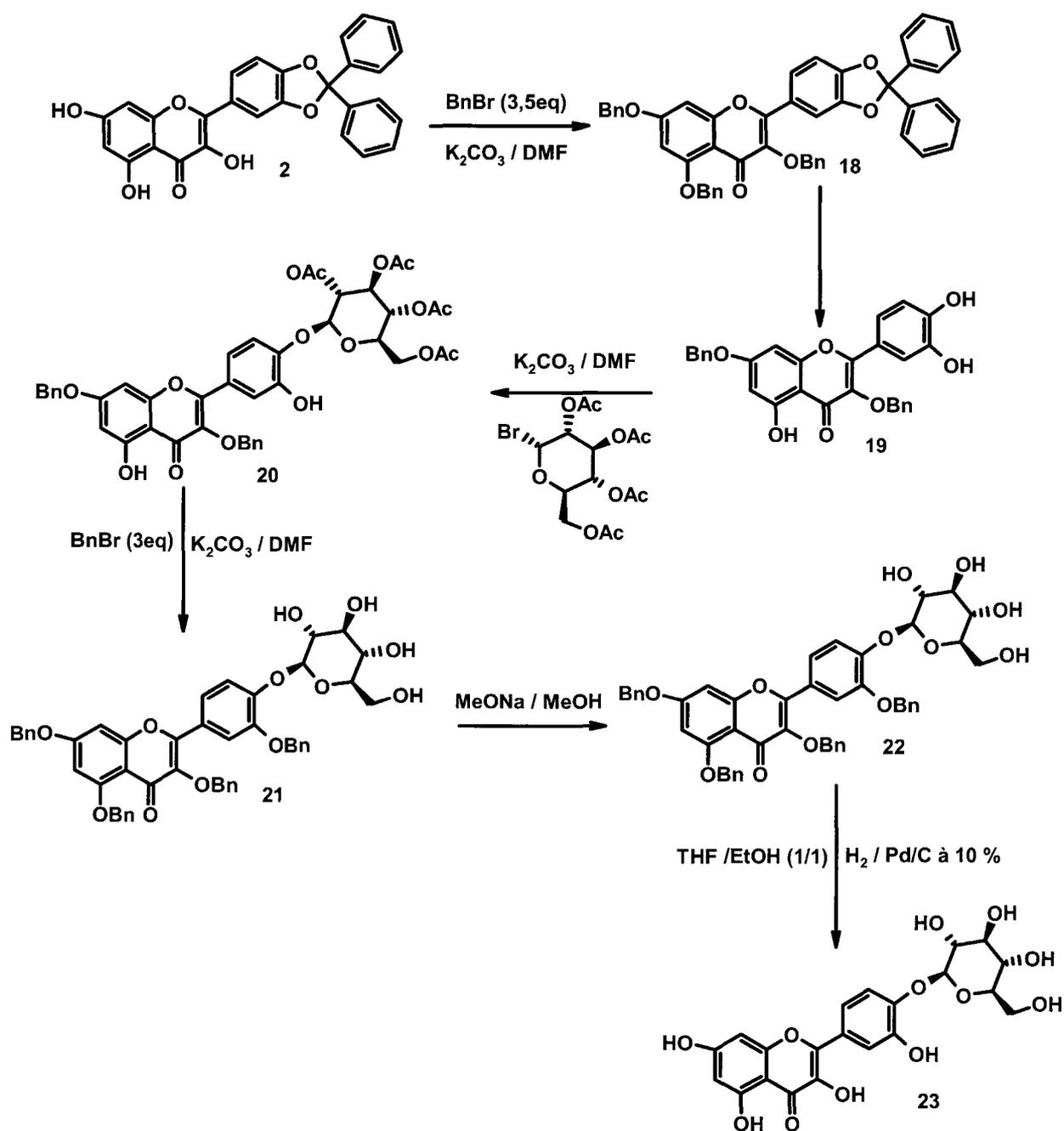


Figure I.23 : Synthèse 4'-O-glycoside quercétine

VII. Synthèse de la 7-O-glucuronide quercétine et de la 7-O-glycoside quercétine

La synthèse de la 7-O-glucuronide quercétine et la 7-O-glycoside (Figure I-24), relève de la même stratégie générale que celle employée lors de la synthèse de la 3-O-glucuronide

quercétine et de la 3-*O*-glycosidequercétine, ce qui change c'est juste le protocole de couplage glycosidique.

Ainsi la première étape de cette synthèse consiste à greffer le groupement glycoside sur la position 7 de la quercétine. Cette réaction est réalisée dans les conditions de transfert de phase par couplage de l'acétobromoglucose sur la 3-*O*-benzyl-3',4'-diphénylméthylènedioxyquercétine **24**, dans une solution saturée de carbonate de potassium en présence de TDA-1 comme agent de transfert de phase.

La benzylation de la position 5 libre, et la déprotection des acétyles du composé **25** sont identiques à celles effectuées précédemment. De même pour l'oxydation par le TEMPO et la déprotection des fonctions hydroxyles.

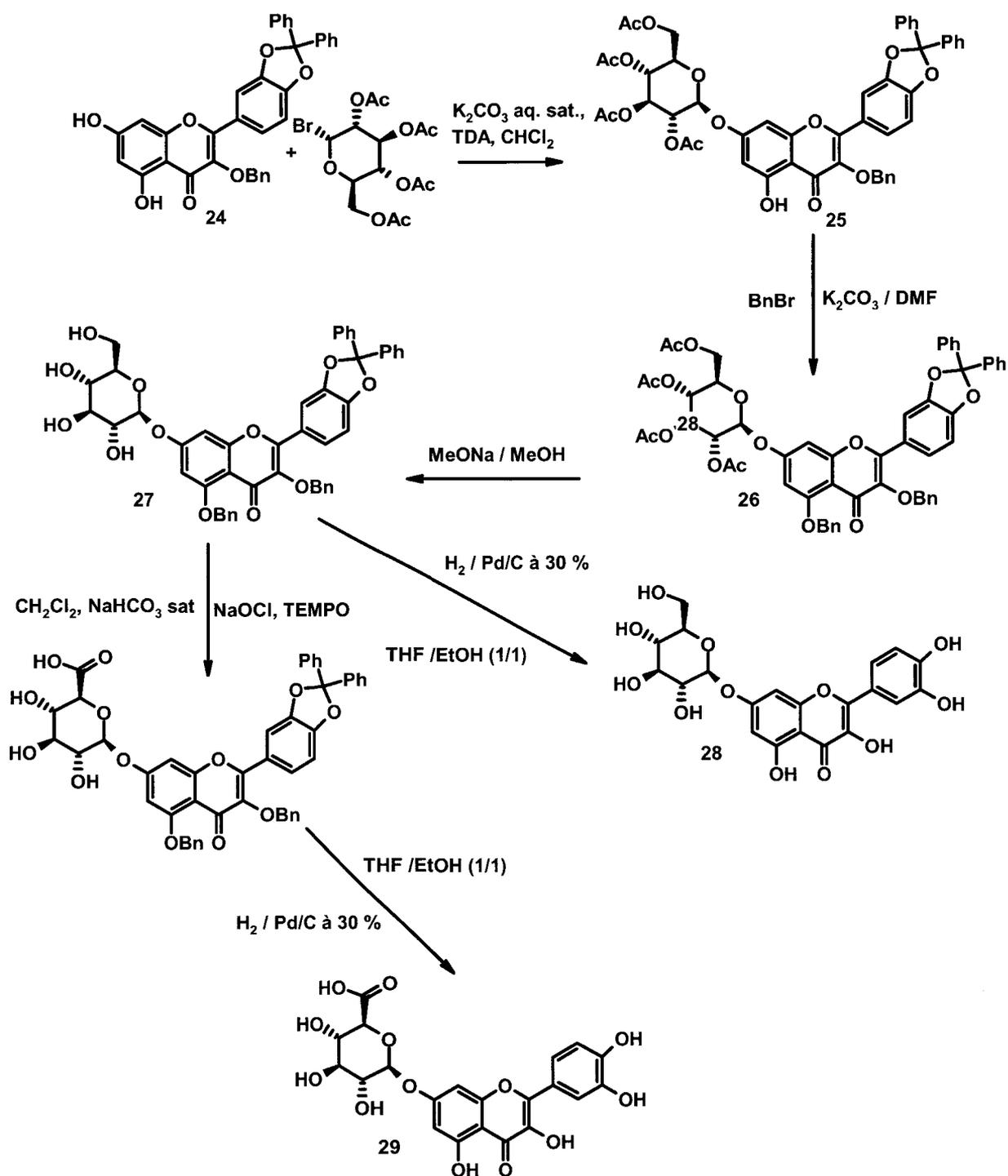


Figure I.24 : Schéma de synthèse de la 7-*O*-glycoside et de la 7-*O*-glucuronide quercétine

VIII. Synthèse de la 3'-*O*-glucuronide quercétine et de la 3'-*O*-glycoside quercétine

La synthèse de la 3'-*O*-glucuronide quercétine et de la 3'-*O*-glycoside quercétine est résumée sur le schéma ci-dessous (Figure I.25). Cette synthèse a été réalisée de la même façon que celle de la 7-*O*-glucuronide quercétine et de la 7-*O*-glycoside quercétine.

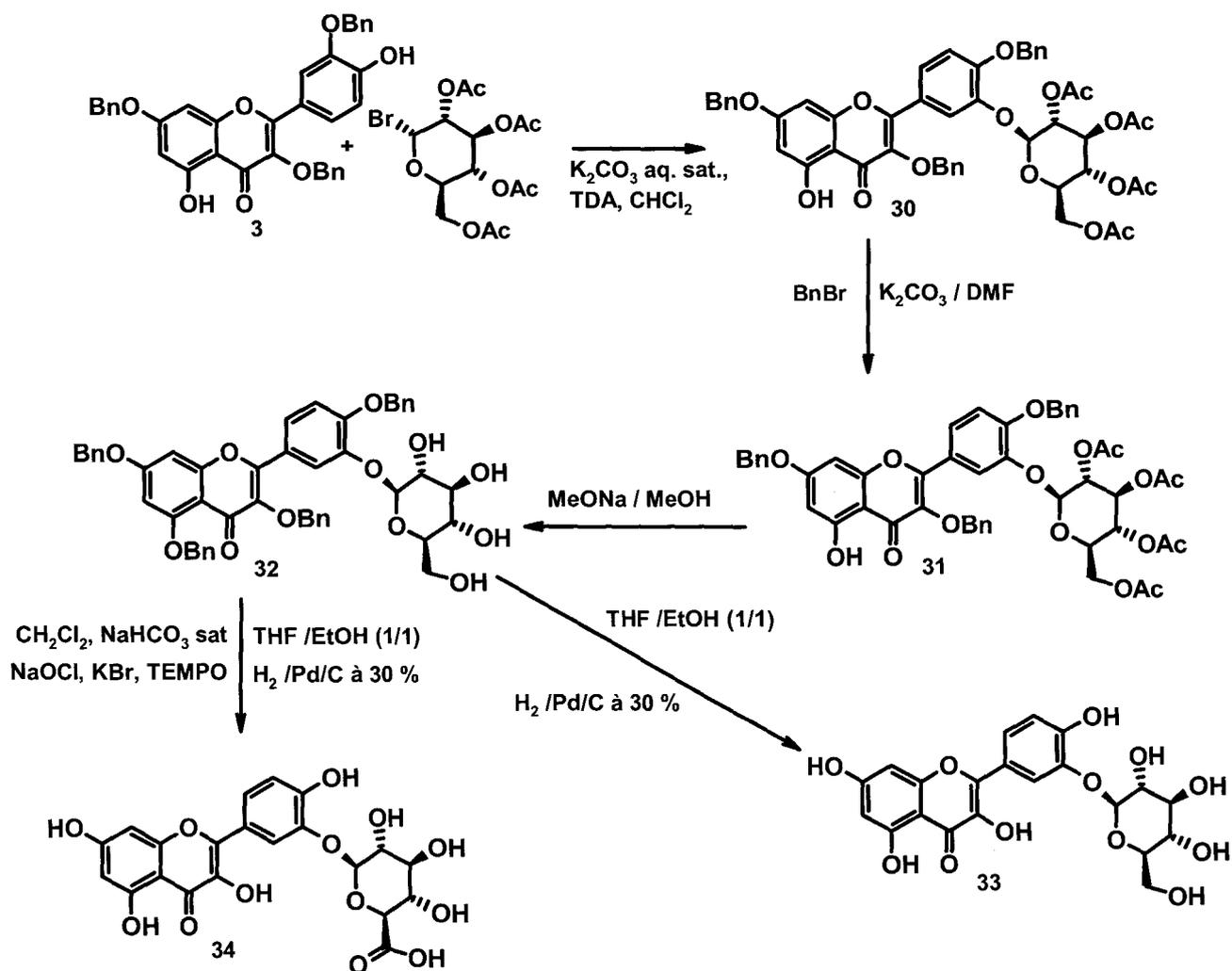


Figure I.25 : Schéma de synthèse de la 3'-O-glycoside et de la 3'-O-glucuronide quercétine.

IX. Conclusion

Nous avons développé une nouvelle stratégie de synthèse basée sur différents jeux de protections et déprotections sélectives des fonctions phénols et catéchols de la quercétine. Ainsi nous avons synthétisé les intermédiaires glycosylés dont l'oxydation sélective de l'alcool primaire par $NaOCl$ en présence de $TEMPO$ conduit aux glucuronides attendus.

Des tests biologiques et physico-chimiques mettant en œuvre ces produits synthétisés seront effectués ultérieurement.

X. Partie expérimentale

X.1. Purification des solvants

Les solvants pour les chromatographies ainsi que pour les extractions sont de qualité technique et sont distillés sur un agent dessicant avant emploi.

Solvant	Abréviation	Distillé sur
Chloroforme	CHCl ₃	CaCl ₂
Dichlorométhane	CH ₂ Cl ₂	CaCl ₂
Diéthyléther	Et ₂ O	CaCl ₂
Acétate d'éthyle	ACOEt	K ₂ CO ₃
Tétrahydrofurane	THF	Potassium (benzophénone)
Acétonitrile	CH ₃ CN	
Diméthylformamide	DMF	
Méthanol	MeOH	CaO
Ethanol	EtOH	CaO

X.2. Caractérisation des produits

X.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les CCM sont effectuées au moyen de couches minces (0,2 mm d'épaisseur) avec gel de silice 60 F₂₅₄ (indicateur fluorescence) sur aluminium (Merk; Darmstadt). Après élution dans le solvant donné, les plaques sont révélées par une lampe UV (254 nm).

X.2.2. Colonnes chromatographiques

Les colonnes chromatographiques sont effectuées avec du Geduran Si 60, grosseur de grains 0,063 – 0,200 mm (Merk). Les colonnes flash chromatographiques sont effectuées avec du gel de silice Si 60, grosseur de grains 40 – 70 µm (Merk) et sous pression (p = 0,5-0,9). L'éluant et les proportions du mélange utilisés sont décrits dans le mode opératoire de chaque produit.

X.2.3. Points de fusion

Les points de fusion ont été mesurés par appareil de référence Reichert-thermopan. Les valeurs données ne sont pas corrigées.

X.2.4. Spectrométrie de masse

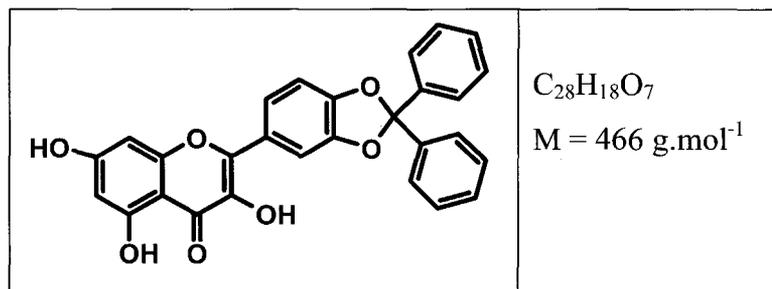
Les spectres de masse haute résolution ont été effectués à l'Ecole Normale Supérieure de Paris sur un spectromètre JEOL mass Station 700 (impact électronique 70 eV, ou FAB) et au sein de l'équipe sur un spectromètre APEX h-Q-q-FT-ICR (Bruker Daltonics) 9,4 Tesla. Les mesures par ionisation électrospray ont été effectuées sur un appareil Quattro II Micromass. Les analyse MALDI ont été réalisées sur un appareil MALDI-TOF Voyager DE-STR (perseptive Biosystems, Framingham, MA) équipé d'un laser de longueur d'onde de 337 nm.

X.2.5. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER AC 300 (à 300 MHz pour le proton et à 75 MHz pour le ^{13}C). Les solvants utilisés sont CDCl_3 , Acétone- d_6 , MeOH- d_4 , DMSO- d_6 , le standard interne est le TMS. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm (partie par million) dans l'ordre croissant et les constantes de couplage J sont données en Hz. La multiplicité des signaux est donnée avec les abréviations s (singulet), d (doublet), t (triplet) et m (multiplet).

X.3. Protection sélective de la quercétine

X.3.1. 2-(2,2-diphénylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one (2)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 50 mL, sous agitation magnétique on introduit (2,00 g, 5,92 mmoles) de quercétine et 2 mL de dichlorodiphénylméthane. Le mélange est chauffé à 180°C pendant 5 minutes. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant un mélange 70/30 d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle. Le produit isolé est recristallisé dans le chloroforme.

Rendement : 35%

Analyses :

Point de fusion : 222-224°C.

RMN ^1H ($[\text{D}_6]$ DMSO) : 6,20 (d, $J = 1,9$ Hz, 1 H); 6,47 (d, $J = 1,9$ Hz, 1 H, aromatique H); 7,17 (d, $J = 8,3$ Hz, 1 H, aromatique H); 7,44-7,58 (m, 10 H, aromatique H); 7,79 (dd, $J = 8,3$ et 1,6 Hz, 1 H, aromatique H); 7,81 (d, $J = 1,6$ Hz, 1 H, aromatique H).

RMN ^{13}C ($[\text{D}_6]$ DMSO) : 93,6; 98,3; 103,1; 107,8; 108,8; 117,0; 123,0; 125,2; 125,7; 128,6; 129,5; 136,4; 139,4; 145,5; 146,6; 147,6; 156,2,160,7; 164,1; 176,0 (C=O).

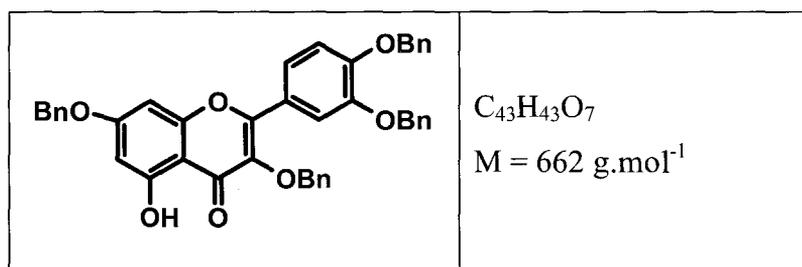
Microanalyse: Calculé pour $C_{28}H_{18}O_7$ (466,45) : C, 72,10; H, 3,86; O, 24,04; Mesuré : C, 71,83; H, 3,74; O, 23,89.

X.3.2. 3,7-bisbenzyloxy-2-(3,4-bisbenzyloxyphényl)-5-hydroxychromen-4-one (3); 3,7-bisbenzyloxy-2-(3-hydroxy-4-benzyloxyphényl)-5-hydroxychromen-4-one (4) et 3,5,7-tribenzyloxy-2-(3,4-bisbenzyloxyphényl)chromen-4-one (5)

Mode opératoire :

Dans un ballon de 250 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon; on introduit une solution de quercétine (5,00 g, 14,79 mmoles) dans 100 mL de DMF. On purge avec de l'argon durant 10 min. On ajoute 3,5 équivalents de bromure de benzyle (6,19 mL, 51,77 mmoles) et 3,5 équivalents de carbonate de potassium (37,14 g, 51,77 mmoles). La solution est agitée vigoureusement à température ambiante pendant 16 heures. Le milieu réactionnel est dilué avec 150 mL d'acétate d'éthyle puis lavé 2 fois avec 75 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. Le mélange purifié par chromatographie sur colonne de silice en utilisant le dichlorométhane comme éluant donne trois produits : la 3,3',4',7-tétabenzylbenzylquercétine (**3**) (6,50 g, 60%), la 3,4',7-tribenzylbenzylquercétine (**4**) (1,69 g, 20%), et la 3,3',4',5,7-pentabenzylbenzylquercétine (**5**) (0,33 g, 3%).

X.3.2.1. 3,7-bisbenzyloxy-2-(3,4-bisbenzyloxyphényl)-5-hydroxychromen-4-one (3).



Rendement : 60%

Analyses :

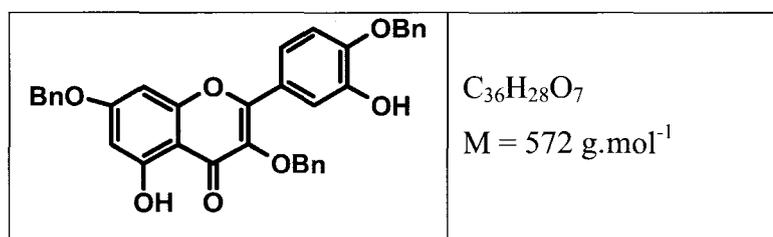
Point de fusion : 140-142°C (Lit140-142°C)^[77]

RMN ¹H (CDCl₃) : 4,96 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,01 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,12 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,25 (s, 2 H, OCH₂Ph); 6,44 (d, $J = 2,1$ Hz, 1 H, aromatique H); 6,46 (d, $J = 2,1$ Hz, 1 H, aromatique H); 6,96 (d, $J = 8,7$ Hz, 1 H, aromatique H); 7,21-7,45 (m, 20 H, aromatique H); 7,54 (dd, $J = 8,7$ et 2,1 Hz, 1 H, aromatique H); 7,72 (d, $J = 2,1$ Hz, 1 H, aromatique H).

RMN ^{13}C (CDCl_3): 70,4 (OCH_2Ph), 70,8 (OCH_2Ph), 71,0 (OCH_2Ph), 74,3 (OCH_2Ph), 93,0; 98,5; 106,1; 113,6; 115,2; 122,6; 123,4; 127,2; 127,4; 127,5; 127,9; 128,0; 128,3; 128,4; 128,5; 128,6; 128,8; 128,9; 135,8; 136,0; 136,7; 136,9; 137,5; 148,2; 151,1 ; 156,2; 156,7; 162,1; 164,4; 178,8 ($\text{C}=\text{O}$).

Microanalyse : Calculé pour $\text{C}_{43}\text{H}_{34}\text{O}_7$ (662,75) : C, 77,94; H, 5,14; O, 16,92; Mesuré : C, 77,90; H, 5,16; O, 16,50.

X.3.2.2. 3,7-bisbenzyloxy-2-(3-hydroxy-4-benzyloxyphényl)-5-hydroxychromen-4-one (4)



Rendement : 20%

Analyses :

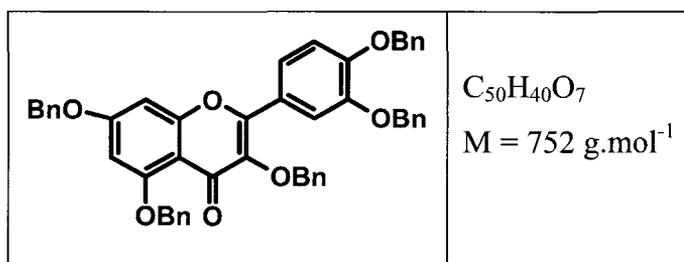
Point de fusion : 150-152°C (Lit144-145°C)^[78]

RMN ^1H (CDCl_3) : 5,03 (s, 2 H, OCH_2Ph); 5,12 (s, 2 H, OCH_2Ph); 5,18 (s, 2 H, OCH_2Ph), 6,41 (d, $J = 2,1$ Hz, 1 H, aromatique H), 6,50 (d, $J = 2,1$ Hz, 1 H, aromatique H), 6,94 (d, $J = 8,7$ Hz, 1 H, aromatique H), 7,21-7,47 (m, 15 H, aromatique H), 7,70 (dd, $J = 8,7$; et 2,1 Hz, 1 H, aromatique H), 7,72 (d, $J = 2,1$ Hz, 1 H, aromatique H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 70,4 (OCH_2Ph), 71,0 (OCH_2Ph), 74,2 (OCH_2Ph), 93,0; 98,7; 106,2; 111,6; 115,0; 121,9; 123,8; 127,5; 127,9; 128,2; 128,3; 128,6; 128,7; 128,8; 135,7; 135,8; 136,5; 137,6; 145,6; 148,0; 156,3; 156,7; 161,9; 164,4; 178,8 ($\text{C}=\text{O}$).

Microanalyse : Calculé pour $\text{C}_{36}\text{H}_{28}\text{O}_7$ (572,62) : C, 75,52; H, 4,90; O, 19,58; Mesuré : C, 75,31; H, 5,10; O, 19,43.

X.3.2.3. 3,5,7-tribenzyloxy-2-(3,4-bisbenzyloxyphényl)-chromen-4-one (5)



Rendement : 3%

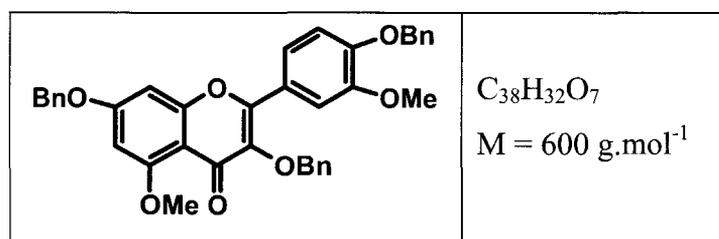
Analyses :

Point de fusion : 156-158°C (Lit. 156-159°C)^[79]

RMN ¹H (CDCl₃) : 4,95 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,07 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,09 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,22 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,27 (s, 2 H, OCH₂Ph); 6,45 (d, $J = 1,9$ Hz, 1 H, aromatique H); 6,52 (d, $J = 1,9$ Hz, 1 H, aromatique H); 6,94 (d, $J = 8,8$ Hz, 1 H, aromatique H); 7,15-7,47 (m, 23 H, aromatiques H); 7,51 (dd, $J = 8,8$ et 1,8 Hz, 1 H, aromatique H); 7,58-7,63 (m, 2 H, aromatiques H); 7,72 (d, $J = 1,8$ Hz, 1 H, aromatique H).

RMN ¹³C (CDCl₃) : 70,5 (OCH₂Ph), 70,7 (OCH₂Ph); 71,8 (OCH₂Ph); 71,0 (OCH₂Ph); 74,1 (OCH₂Ph); 93,9; 98,1; 110,0; 113,7; 114,0; 115,1; 122,1; 126,7; 127,2,127,5; 127,7; 127,9; 128,0; 128,1 128,2; 128,4; 128,5; 128,6; 128,7; 128,8; 128,9; 135,8; 136,5; 136,9; 137,1; 137,2; 139,9; 148,2; 150,5; 153,0 158,7; 159,7; 162,7; 173,9 (C=O).

X.3.3. 3,7-bisbenzyloxy-2-(3-méthoxy-4-benzyloxyphényl)-5-hydroxychromen-4-one (4')



Mode opératoire :

Dans un ballon de 100 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon; on introduit (1,00 g, 2,19 mmoles) du 3,7-bisbenzyloxy-2-(3-hydroxy-4-benzyloxyphényl)-5-hydroxychromen-4-one 4 dissout dans 30 mL de DMF. On purge avec l'argon durant 10 minutes. On ajoute (780 mg, 5,47 mmoles) d'iodure de méthyle et (1,00 g 7,24 mmoles) de

carbonate de potassium. La solution est agitée à température ambiante pendant 16 heures. Le milieu réactionnel est dilué avec 100 mL d'acétate d'éthyle et lavé 2 fois avec 70 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. Le produit obtenu est purifié par recristallisation dans l'acétate d'éthyle. Le composé **4'** est obtenu sous forme d'un solide blanc.

Rendement : 90%

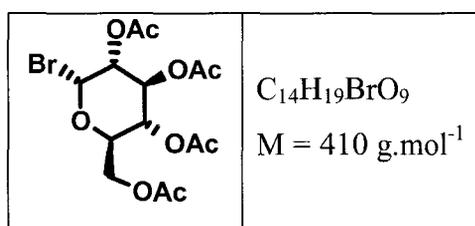
Analyses :

Point de fusion : 114-116°C (Lit. 116-118°C)^[77]

RMN ¹H (CDCl₃) : 3,54 (s, 3 H, OCH₃), 3,71 (s, 3 H, OCH₃); 4,98 (s, 2 H, OCH₂Ph); 4,99 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,11 (s, 2 H, OCH₂Ph); 6,17 (d, *J* = 2,1 Hz, 1 H, aromatique H); 6,43 (d, *J* = 2,1 Hz, 1 H, aromatique H); 6,83 (d, *J* = 8,7 Hz, 1 H, aromatique H); 7,17-7,40 (m, 15 H, aromatique H); 7,43 (dd, *J* = 8,7 et 2,0 Hz, 1 H, aromatique H); 7,63 (d, *J* = 2,0 Hz, 1 H, aromatique H).

RMN ¹³C (CDCl₃) : 55,7 (OCH₃), 56,2 (OCH₃), 70,4 (OCH₂Ph), 70,7 (OCH₂Ph), 74,0 (OCH₂Ph), 93,1; 99,2; 109,3; 112,2; 112,8; 121,2; 123,7; 127,2; 127,8; 128,0; 128,2; 128,3; 128,5; 128,6; 128,9; 135,8; 136,5; 137,1; 139,8; 149,0; 152,9; 158,5; 160,7; 162,4; 162,8; 173,8 (C=O).

X.3.4. 1-bromo-2,3,4,6-tétraacétyl- α ,D-glucofuranose (5')



Mode opératoire :

Dans un ballon de 500 mL, 20 g de 1,2,3,4,6-pentaacétyl- α -D-glucofuranose commercial sont introduits dans 100 mL d'acide bromhydrique dans de l'acide acétique 33%. Le mélange est agité pendant 8 heures. Le milieu réactionnel est dilué avec 250 mL de chlorure de méthylène à froid et lavé 3 fois avec 100 mL d'eau glacée. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé.

Rendement : 90%

Analyse :

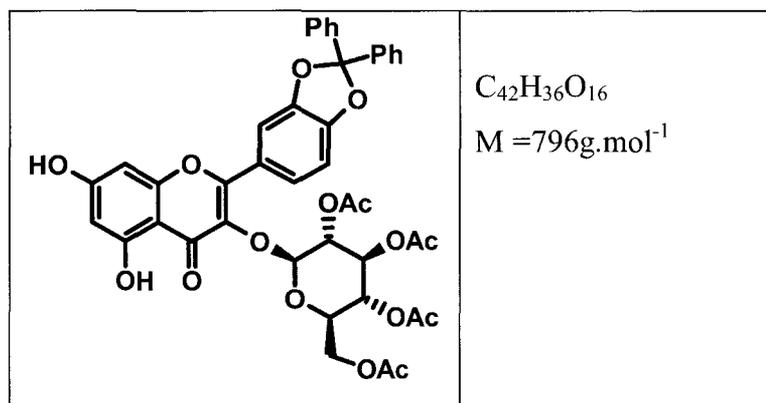
Point de fusion : 78-80°C (Lit. 79-81°C)^[80]

RMN ¹H (CDCl₃): 2,00 (3H, s, OAc); 2,01 (3H, s, OAc); 2,08 (6H, s, 2 x OAc); 4,10 (1H, m); 4,32 (2H, m, H₆); 4,85 (1H, d, *J* = 4Hz); 5,05 (1H, dd, *J* = 2,9 Hz, *J* = 4,0 Hz); 6,60 (1H, d, H₁).

RMN ¹³C (CDCl₃) : 20,6; 20,7; 20,8; 20,9; 60,7; 67,1; 69,4; 70,5; 71,1; 85,4; 162,4; 168,3; 170,5; 171,2.

X.4. Synthèse du 3-*O*-glycoside et 3-*O*-glucuronide quercétine

X.4.1. 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl)-β-D-glucopyranosyloxy -5,7-dihydroxy -chromen-4-one (6)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 100 mL, sous atmosphère inerte; (1,0 g, 2,14 mmoles) de 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3,5,7-trihydroxy-chromen-4-one (**2**); (1,76 g, 4,29 mmoles) d'acétobromoglucose et (593 mg, 4,29mmoles) de carbonate de potassium dans 20 mL de DMF; sont agités pendant 6 heures. Le milieu réactionnel est dilué avec 100 mL d'acétate d'éthyle et lavé 2 fois avec 75 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant un mélange 30/70 d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole.

Rendement : 60%

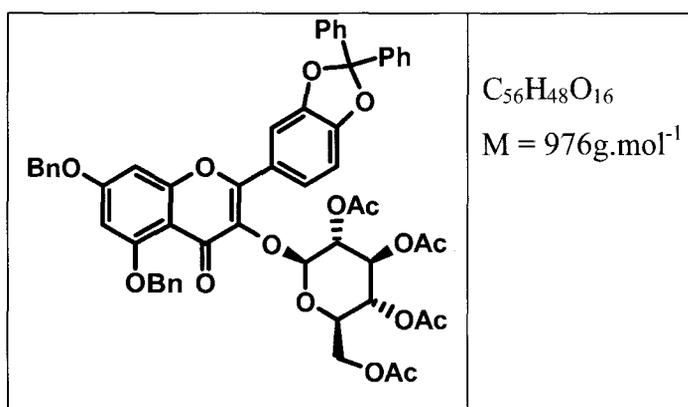
Analyse :

RMN¹H (CDCl₃) : 1,91 (CH₃, s, 3H); 2,01 (CH₃, s, 3H); 2,03 (CH₃, s, 3H); 2,09 (CH₃, s, 3H); 3,76 (H_{5''}, m, 1H); 4,15 (H_{6''}, m, 2H); 5,28 -5,00 (H_{2''}, H_{3''} et H_{4''}, m, 3H); 5.59 (H_{1''}, d, *J* = 7,5 Hz, 1H); 6,25 (H₆, d, *J* 2,0 Hz, 1H); 6,32 (H₈, d, *J* = 2,0 Hz, 1H); 6,94 (H_{5'}, d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 7,64 (H_{6'}, dd, *J* = 8,3 et 1,7 Hz, 1H); 7,57 (H_{2'}, d, *J* = 1,7 Hz, 1H); 7,63-7,32 (H Aromatiques, m, 10H).

RMN¹³C (CDCl₃) : 20,2; 20,6; 20,8; 61,9; 67,1; 68,5; 69,9; 71,1; 94,1; 99,1; 99,3; 105,3; 108,3; 109,1; 117,9; 123,1; 124,7; 126,2; 126,3; 128,4; 129,3; 133,7; 139,7; 139,7; 147,2; 149,4; 156,7; 157,0; 161,9; 162,9; 169,7; 170,2; 170,9; 177,4.

HR-FAB-SM (*m/z*) trouvé : 819,1920; Calculé pour C₄₂H₃₆NaO₁₆ : 819,1901 [M+Na]⁺.

X.4.2. 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)- 3-(2,3,4,6 tétra-*O*-acétyl) -β-D-glucopyranosyloxy -5,7-bisbenzyloxy chromen-4-one (7)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 100 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon, on introduit (700 mg, 0,88 mmoles) de 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)- 3-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl) -β-D-glucopyranosyloxy-5,7-dihydroxy -chromen-4-one (**6**) dissout dans 20 mL de DMF. On purge avec l'argon durant 10 min. On ajoute 2,5 équivalents de bromure de benzyloxy (0,26 mL, 2,20 mmoles) et 2,5 équivalents de carbonate de potassium (0,30 g, 2,20 mmoles). La solution est agitée vigoureusement à température ambiante pendant 16 heures. Le milieu

réactionnel est dilué avec 100 mL d'acétate d'éthyle et lavé 2 fois avec 75mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé.

Rendement : 90%

Analyse :

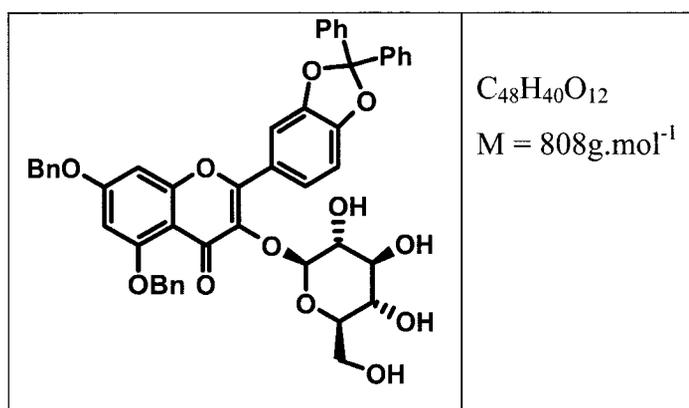
Point de fusion : 126-129°C

RMN¹H (CDCl₃) : 1,99 (CH₃, s, 3H); 2,03 (CH₃, s, 6H); 2,12 (CH₃, s, 3H); 3,62 (H_{5''}, m, 1H); 3,97 (H_{6''}, d, *J* = 3,0 Hz, 2H); 5,06 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,28 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,31 -5,06 (H_{2''}, H_{3''} et H_{4''}, m, 3H); 5,77 (H_{1''}, d, *J* = 7,5 Hz, 1H); 6,44 (H₆, d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 6,55 (H₈, d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 6,96 (H_{5'}, d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 7,67 (H_{6'}, dd, *J* = 8,3 et 1,7 Hz, 1H); 7,59 (H_{2'}, d, *J* = 1,7 Hz, 1H); 7,62-7,28 (H Aromatiques, m, 20H).

RMN¹³C (CDCl₃) : 20,3; 20,7; 20,9; 61,2; 68,3; 70,5; 70,8; 71,5; 71,7; 72,9; 93,8; 98,2; 98,8; 108,2; 109,0; 109,7; 117,6; 124,2; 124,3; 126,3; 126,3; 126,6; 127,6; 127,7; 128,3; 128,5; 128,6; 128,8; 129,3; 135,6; 135,9; 136,3; 139,8; 139,9; 147,1; 148,9; 154,2; 158,6; 159,7; 162,9; 169,5; 170,1; 170,5; 172,7.

HR-FAB-SM (*m/z*) trouvé : 999,2864; Calculé pour C₅₆H₄₈NaO₁₆ : 999,2840 [M+Na]⁺.

X.4.3. 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3-β-D-glucopyranosyloxy -5,7-bisbenzyloxy chromen-4-one (8)



Mode opératoire :

2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl)- β-D-glucopyranosyl-oxy-5,7-bis-benzyloxy-chromen-4-one (7) (0,50 g, 0,51 mmoles) est dissout à

l'abri de l'air dans 40 mL d'un mélange méthanol/THF (50/50). On ajoute ensuite une solution de méthylate de sodium, préparée par réaction de sodium métal (10 mg) dans 10 mL de méthanol. La réaction est suivie par C.C.M. avec comme éluant un mélange 9/1 d'acétate d'éthyle et de méthanol. Lorsque la déprotection est achevée; la résine échangeuse d'ions (2,00 g), préalablement rincée à l'eau (trois fois 50 mL) et au méthanol (quatre fois 50 mL), est introduite dans le mélange réactionnel. L'agitation est maintenue 30 minutes, puis la solution est filtrée; la résine est rincée par du méthanol (deux fois 50 mL). Le méthanol est éliminé par évaporation sous vide, sans chauffage.

Rendement : 90%

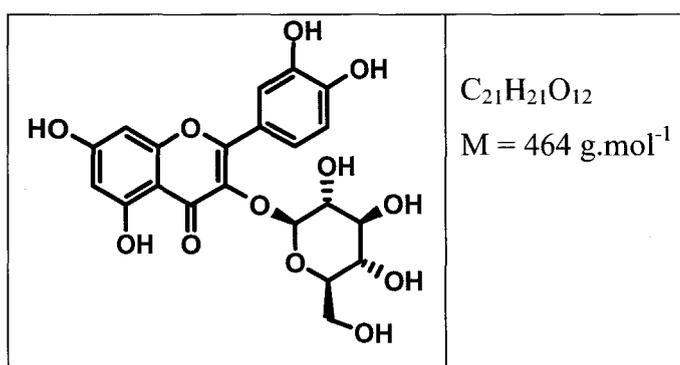
Analyse :

Point de fusion : 136-139°C

RMN¹H (CDCl₃) : 3,20 (H_{5''}, m, 1 H); 3,68–3,33 (H_{2''}, H_{3''} et H_{4''}, H_{6''}, m, 5 H); 4,81 (H_{1''}, d, *J* = 6,7 Hz, 1H); 5,01 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,17 (s, 2 H, OCH₂Ph); 6,33 (H₆, d, *J* = 2,2 Hz, 1 H); 6,49 (H₈, d, *J* = 2,2 Hz, 1 H); 6,93 (H_{5'}, d, *J* = 8,3 Hz, 1 H); 7,12-7,77 (H Aromatique, H_{2'} et H_{6'}, m, 22 H).

RMN¹³C (CDCl₃) : 62,4; 70,0; 70,5; 70,7; 74,0; 76,0; 93,8; 98,4; 105,4; 108,1; 109,1; 109,5; 117,9; 123,9; 124,2; 126,3; 126,3; 126,6; 127,6; 127,8; 128,4; 128,5; 128,6; 128,8; 129,4; 135,4; 136,0; 137,7; 139,6; 139,8; 147,0; 149,3; 155,1; 158,7; 159,7; 163,4; 174,1

X.4.4. 3-*O*-glycoside quercétine (9)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 100 mL, sous agitation magnétique on introduit 100 mg de du 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3-β-D-glucopyranosyloxy-5,7-bisbenzyloxychromen-4-one **46**; 30 mL de THF; 30 mL d'éthanol et 60 mg de palladium sur charbon 30%. Le milieu réactionnel est soumis à une légère surpression d'hydrogène à l'aide d'un ballon de baudruche. La solution est agitée à température ambiante durant 24 heures. La solution est filtrée sur Célite 545 et rincée avec l'éthanol. On évapore le solvant à l'évaporateur rotatif. Le produit obtenu est lavé avec du dichlorométhane. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur cartouche LC-SPE avec comme éluant un mélange 30/60 méthanol/eau.

Rendement : 70%

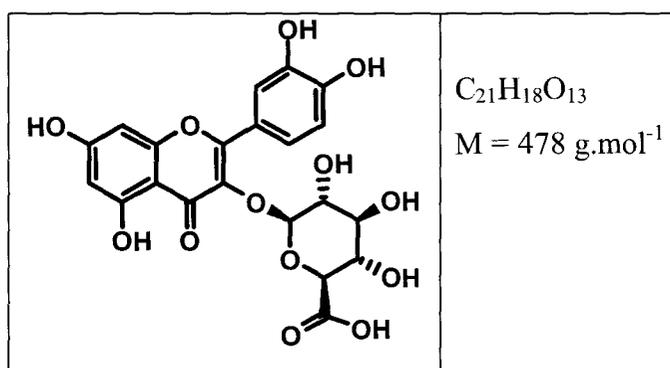
Analyse :

RMN¹H (CD₃OD): 3,18-3,78 (H_{2''}, H_{3''}, H_{4''}, H_{5''}, H_{6''} m, 6 H); 5,23 (H_{1''}, d, *J* = 7,7, 1 H); 6,15 (H₈, d, *J* = 2,0 Hz, 1 H); 6,33 (H₆, d, *J* = 2,0 Hz, 1 H); 6,75 (H₅, dd, *J* = 8,6, 2,0 Hz, 1 H); 7,57 (H_{6'}, d, *J* = 8,6 Hz, 1 H); 7,70 (H_{2'}, d, *J* = 2,0 Hz, 1 H)

RMN¹³C (CD₃OD) : 62,5; 71,2; 75,7; 78,1; 78,3; 94,7; 99,9; 104,3; 105,7; 116,0; 117,6; 123,0; 123,2; 135,6; 145,7; 149,8; 158,4; 159,0; 162,9; 165,9; 179,4.

HR-FAB-SM (*m/z*) trouvé : 487,0848; Calculé pour C₂₁H₂₀NaO₁₂ : 487,0852 [M+Na]⁺.

X.4.5 3-*O*-glucuronide quercétine (10)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 50 mL muni d'un agitateur magnétique on introduit 4 mL d'une solution de 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3-β-D-glucopyranosyloxy-5,7-bis-

benzyloxy -chromen-4-one **9** (50 mg, 0,06 mmoles) dans CH₂Cl₂, 1 mL d'une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium 1,5 mg de 2,2,6,6-tétraméthylpiperidin-1-oxyl (TEMPO), 1,5 mg de bromure de potassium et 2,0 mg de bromure de tétrabutylammonium. A cette solution on ajoute goûte à goûte 10 mL d'une solution de NaOCl 5,5%. Après deux heures d'agitation le mélange est dilué par 30 mL d'acétate d'éthyle et 30 mL d'eau le précipité ainsi formé est filtré. Le solide obtenu est solubilisé dans un mélange THF/ Ethanol (1/1) puis on ajoute la même masse de palladium sur charbon à 30%. On soumet alors le milieu réactionnel à une légère surpression d'hydrogène à l'aide d'un ballon de baudruche. La suspension est agitée à température ambiante durant 24 heures puis la solution est filtrée sur Célite 545 et rincée avec l'éthanol. Le filtrat est évaporé sous vide et le produit résultant est lavé avec du dichlorométhane pour éliminer le benzophénone. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur cartouche LC-SPE avec comme éluant un mélange 40 : 60 méthanol/eau.

Rendement : 40%

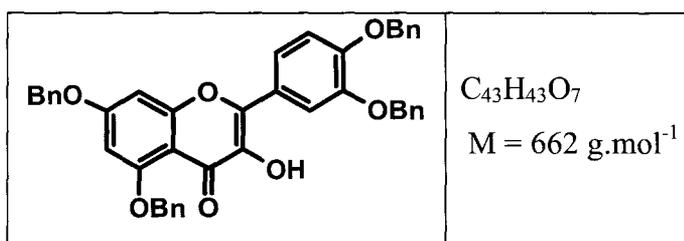
Analyse :

RMN¹H (CD₃OD) : 3,85-3,48 (H₂^o, H₃^o, H₄^o, H₅^o, m, 4 H); 5,38 (H₁^o, d, *J* = 7,2, 1 H); 6,22 (H₈, d, *J* = 2,0 Hz, 1 H); 6,42 (H₆, d, *J* = 2,0 Hz, 1 H); 6,76 (H₅^o, dd, *J* = 8,4 et 2,0 Hz, 1 H); 7,64 (H₆^o, d, *J* = 8,4 Hz, 1 H); 7,73 (H₂^o, d, *J* = 2,0 Hz, 1 H).

RMN¹³C (CD₃OD) : 73,4; 75,6; 77,7; 78,1; 94,7; 99,9; 104,3; 105,7; 116,2; 118,1; 122,7; 122,8; 135,7; 145,9; 149,8; 158,5; 158,5; 159,2; 163,0; 171,1; 176,3.

HR-FAB-SM (*m/z*) trouvé : 479,0779; Calculé pour C₂₁H₁₉O₁₃ : 479,0826 [M+H]⁺

X.4.6. 3-hydroxy -2-(3,4-bisbenzyloxyphényl)-5,7-bisbenzyloxy chromen-4-one (**11**)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 250 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon; on introduit une solution de rutine (5,00 g, 8,19 mmoles) dans 100 mL de DMF. On purge avec de l'argon durant 10 min. On ajoute 10 équivalents de bromure de benzyle (9,81 mL, 81,96 mmoles) et 10 équivalents de carbonate de potassium (11,31 g, 81,96 mmoles). La solution est agitée vigoureusement pendant 24 heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est dilué avec 200 mL d'acétate d'éthyle puis lavé 2 fois avec 150 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. Le produit obtenu est solubilisé dans un mélange MeOH/HCl concentré 98/2. La solution est chauffée à reflux jusqu'à ce que le produit commence à précipiter. Après refroidissement, le précipité est filtré puis lavé deux fois avec 50 mL de méthanol.

Rendement : 40%

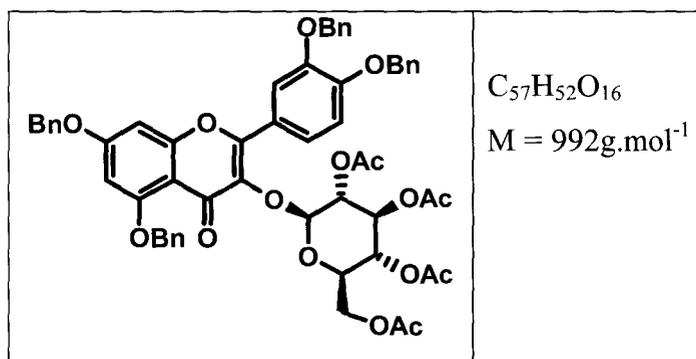
Analyses :

Point de fusion : 136-138°C

RMN ¹H (CDCl₃) : 5,09 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,19 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,22 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,24 (s, 2 H, OCH₂Ph); 6,45 (d, *J* = 1,9 Hz, 1 H, aromatique H); 6,55 (d, *J* = 1,9 Hz, 1 H, aromatique H); 7,01 (d, *J* = 8,5 Hz, 1 H, aromatique H); 7,22-7,55 (m, 20 H, aromatiques H); 7,59 (dd, *J* = 8,5; 1,6 Hz, 1 H, aromatique H); 7,75 (d, *J* = 2,1 Hz, 1 H, aromatique H).

RMN ¹³C (CDCl₃) : 70,5 (OCH₂Ph); 70,6 (OCH₂Ph); 70,9 (OCH₂Ph); 71,5 (OCH₂Ph); 93,6; 97,5; 106,7; 114,0; 114,1; 121,2; 124,3; 126,7; 127,2; 127,5; 127,7; 127,8; 127,9; 128,5; 128,6; 128,7; 128,9; 135,6; 136,2; 136,8; 137,1; 137,7; 141,9; 148,6; 150,1; 158,7; 159,3; 163,2; 171,7 (C=O).

X.4.7. 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl)- β -D-glucopyranosyloxy -5,7-bisbenzyloxychromen-4-one (12)



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl)- β -D-glucopyranosyloxy -5,7-dihydroxy chromen-4-one (7).

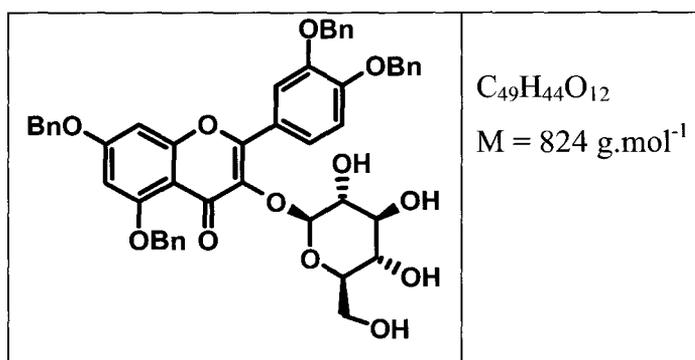
Rendement : 70%

Analyse :

RMN¹H (CDCl₃) : 1,99 (CH₃, s, 3H); 2,03 (CH₃, s, 6H); 2,12 (CH₃, s, 3H); 3,62 (H_{5''}, m, 1H); 3,97 (H_{6''}, d, $J = 3,0$ Hz, 2H); 5,09 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,19 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,22 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,24 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,31 -5,06 (H_{2''}, H_{3''} et H_{4''}, m, 3H); 5,77 (H_{1''}, d, $J = 7,5$ Hz, 1H); 6,45 (d, $J = 1,9$ Hz, 1 H, aromatique H); 6,55 (d, $J = 1,9$ Hz, 1 H, aromatique H), 7,01 (d, $J = 8,5$ Hz, 1 H, aromatique H); 7,22-7,55 (m, 20 H, aromatique H); 7,59 (dd, $J = 8,5$ et 1,6 Hz, 1 H, aromatique H); 7,75 (d, $J = 2,1$ Hz, 1 H, aromatique H).

RMN¹³C (CDCl₃) : 20,3; 20,6; 20,9; 61,2; 68,3; 70,5; 70,6; 70,7; 70,8; 70,9; 71,5; 71,6; 93,6; 97,5; 106,7; 109,4; 114,0; 114,1; 121,2; 124,3; 126,7; 127,2; 127,5; 127,7; 127,8; 127,9; 128,5; 128,6 128,7; 128,9; 135,6; 136,2; 136,8; 137,1; 137,7; 142,2; 149,1; 151,1; 158,5; 159,1; 162,9; 169,7; 170,3; 170,6; 172,2 (C=O).

X.4.8. 2-(3,4-bisbenzyloxyphényl)-3-β-D-glucopyranosyloxy-7-5-bisbenzyloxychromen-4-one (13).



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3-β-D-glucopyranosyloxy -5,7-bisbenzyloxy chromen-4-one (8).

Rendement : 90%

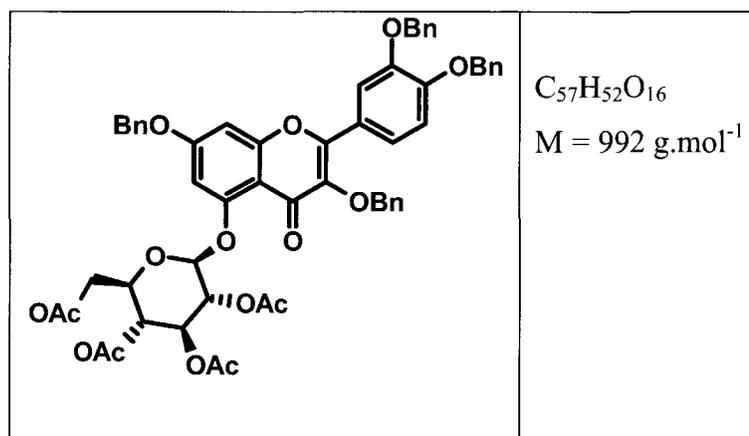
Analyse :

RMN¹H (CDCl₃) : 3,20 (H_{5''}, m, 1 H); 3,68–3,33 (H_{2''}, H_{3''} et H_{4''}, H_{6''}, m, 5 H); 4,81 (H_{1''}, d, $J = 6,7$ Hz, 1H); 5,08 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,17 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,20 (s, 2 H, OCH₂Ph), 5,25 (s, 2 H, OCH₂Ph); 6,41 (d, $J = 1,9$ Hz, 1 H, aromatique H); 6,53 (d, $J = 1,9$ Hz, 1 H, aromatique H); 7,06 (d, $J = 8,5$ Hz, 1 H, aromatique H); 7,22-7,55 (m, 20 H, aromatique H); 7,62 (dd, $J = 8,5, 1,6$ Hz, 1 H, aromatique H); 7,74 (d, $J = 2,1$ Hz, 1 H, aromatique H).

RMN¹³C (CDCl₃) : 62,2; 69,3; 70,2; 70,5; 70,7; 70,8; 70,9; 71,5; 71,6; 93,2; 97,8; 106,9; 109,1; 114,1; 114,9; 121,2; 124,3; 126,7; 127,2; 127,5; 127,7; 127,8; 127,9; 128,5; 128,6; 128,7; 128,9; 135,5; 136,2; 136,7; 137,2; 137,8; 142,1; 149,3; 151,2; 158,5; 159,2; 162,8; 173,2 (C=O).

X.5. Synthèse du 5-*O*-glycoside et 5-*O*-glucuronide quercétine.

X.5.1. 3,7-bisbenzyloxy-2-(3,4bisbenzyloxyphényl)-5-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl)- β -D-glucopyranosyloxychromen-4-one (14)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 100 mL, sous atmosphère inerte, (1,00 g, 1,51 mmoles) de 3,7-bisbenzyloxy-2-(3,4-bisbenzyloxyphényl)-5-hydroxychromen-4-one (**4**) 1,24 g (3,02 mmoles) d'acétoxyglucose et (0,42 g, 3,02 mmoles) de carbonate de potassium dans 20 mL de DMF, sont agités pendant 6 h. Le milieu réactionnel est dilué avec 150 mL d'acétate d'éthyle et lavé 2 fois avec 75 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice et élué avec un mélange 85/15 de chlorure de méthylène et d'acétate d'éthyle.

Rendement : 75%

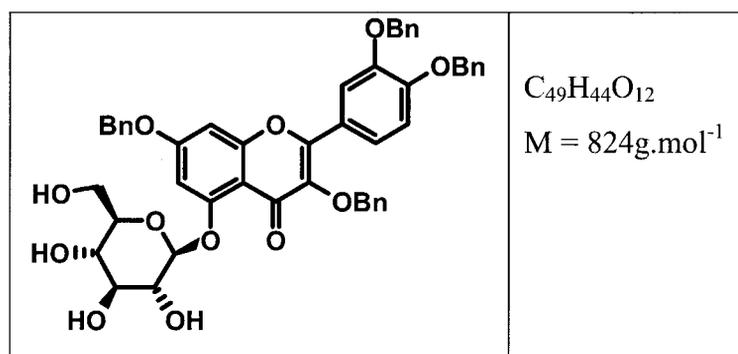
Analyse :

Point de fusion : 104-110°C

RMN ^1H (CDCl_3) : 1,96 (CH_3 , s, 3 H); 2,01 (CH_3 , s, 3 H); 2,07 (CH_3 , s, 3 H) 2,15 (CH_3 , s, 3 H); 3,76 ($\text{H}_{5''}$; m, 1 H); 4,15 ($\text{H}_{6''}$; m, 2 H); 4,91 (s, 2 H, OCH_2Ph); 5,09 (s, 4 H, OCH_2Ph); 5,23 (s, 2 H, OCH_2Ph); 5,51-5,05 ($\text{H}_{2''}$; $\text{H}_{3''}$ et $\text{H}_{4''}$; m, 3 H); 4,85 ($\text{H}_{1''}$; d, $J = 7,5$ Hz, 1 H); 6,65 (H_6 , d, $J = 2,0$ Hz, 1 H); 6,85 (H_8 , d, $J = 2,0$ Hz, 1 H); 6,94 ($\text{H}_{5'}$, d, $J = 8,3$ Hz, 1 H); 7,58 ($\text{H}_{6'}$; dd, $J = 8,3$ et 1,7 Hz, 1 H); 7,74 ($\text{H}_{2'}$; d, $J = 1,7$ Hz, 1 H); 7,52-7,18 (m, 20 H, Aromatique H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 20,5; 20,8; 22,6; 60,9; 66,3; 67,5; 70,4; 71,1; 74,1; 74,2; 93,0; 98,6; 106,8; 110,6; 114,9; 116,0; 121,8; 123,9; 125,9; 127,2; 127,4; 128,4; 127,9; 128,2; 128,3; 128,3; 128,7; 128,7; 128,8; 129,0; 135,7; 135,8; 136,4; 137,6; 139,3; 145,6; 147,9; 156,7; 162,0; 164,4; 169,5; 169,6; 170,2; 178,8.

X.5.2. 3,7-bisbenzyloxy-2-(3,4-bisbenzyloxyphényl)-5- β -D-glucopyranosyloxy chromen-4-one (15)



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3- β -D-glucopyranosyloxy -5,7-bisbenzyloxy chromen-4-one (8).

Rendement : 85%

Analyse :

Point de fusion : 136-140°C

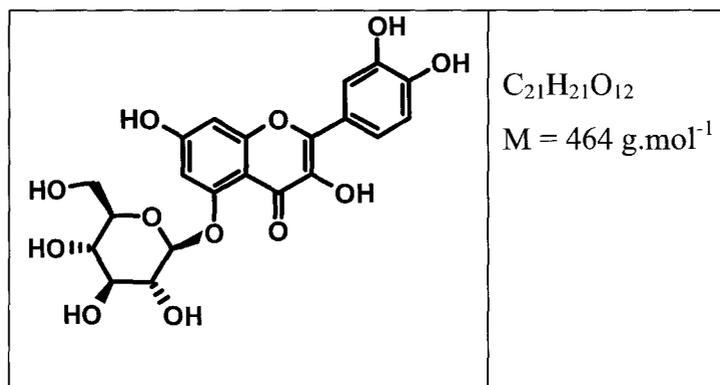
RMN ^1H (CDCl_3) : 3,20 (H_5 , m, 1 H); 3,70-3,93 (H_3 , H_4 et H_6 , m, 4 H); 4,95 (H_1 , d, $J = 6,85$ Hz, 1 H); 4,73 (s, 2 H, OCH_2Ph); 4,89 (s, 4 H, OCH_2Ph); 5,03 (s, 2 H, OCH_2Ph); 6,34; (H_6 ; d, $J = 1,50$ Hz, 1 H); 6,67 (H_8 ; d, $J = 1,50$ Hz, 1 H); 6,72 (H_5 ; d, $J = 8,76$ Hz, 1 H); 7,34 (H_6 ; dd, $J = 8,76$ et 1,40 Hz, 1 H); 7,60 (H_2 ; d, $J = 1,40$ Hz, 1 H); 7,34-7,08 (H Ar; m, 20 H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 61,2; 68,5; 70,1; 70,5; 70,7; 72,9; 74,0; 75,8; 96,4; 101,7; 103,4; 109,7; 113,1; 114,7; 121,9; 123,4; 127,1; 127,3; 127,6; 127,7; 127,9; 128,2; 128,3; 128,5; 128,6; 128,7; 135,7; 136,7; 136,8; 136,9; 139,5; 148,0; 150,5; 153,3; 157,4; 158,5; 162,8; 174,5.

HR-FAB-SM (m/z) trouvé : 847,2742; Calculé pour $C_{49}H_{44}NaO_{12}$: 847,2730

$[M+Na]^+$

X.5.3. 5-*O*-glycoside quercétine (16)



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du 3-*O*-glycoside quercétine (10).

Rendement : 70%

Analyse :

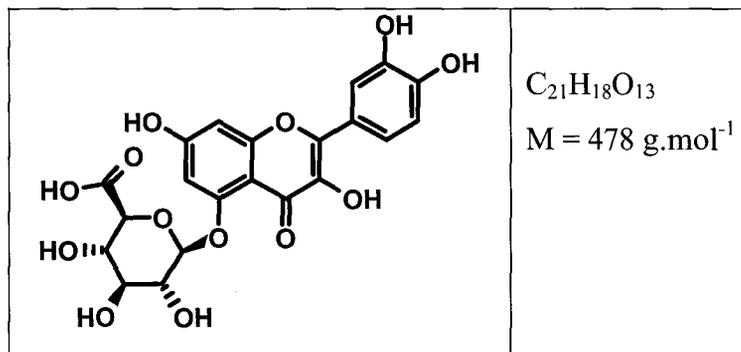
RMN¹H (CD_3OD) : 3,68-3,28 (H_2'' , H_3'' , H_4'' , H_5'' et H_6'' , m, 6 H); 4,78 (H_1'' ; d, $J = 6,7$; 1 H); 6,61 (H_6 ; d, $J = 2,17$ Hz, 1 H); 6,77 (H_8 ; d, $J = 2,17$ Hz, 1 H); 6,88 (H_5 ; d, $J = 8,51$ Hz, 1 H); 7,50 (H_6' , d, $J = 8,76$ Hz, 1 H); 7,63 (H_2 ; 1 H).

RMN¹³C (CD_3OD) : 60,82; 69,76; 73,73; 75,71; 77,52; 97,37; 103,14; 103,95; 106,36; 114,74; 115,67; 119,58; 122,05; 137,24; 143,52; 145,06; 147,33; 157,15; 158,45; 162,48; 171,75.

HR-FAB-SM (m/z) trouvé : 465,1036; Calculé pour $C_{21}H_{21}O_{12}$: 465,1033

$[M+H]^+$.

X.5.4. 5-O-glucuronide quercétine (17)



Mode opératoire :

Le mode opératoire est analogue à celui décrit pour la 3-O-glucuronide quercétine (11).

Rendement : 40%

Analyse :

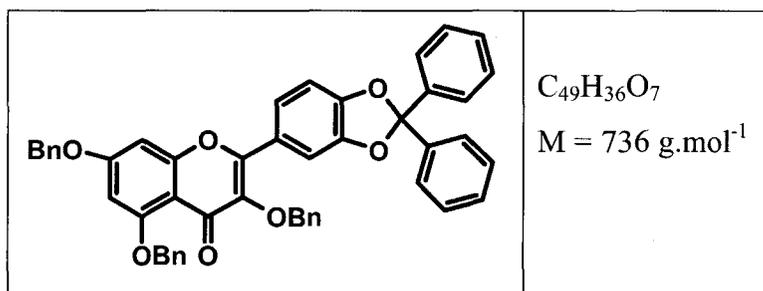
RMN ^1H ([D₆]DMSO): 3,70-3,55 (H_{2''}, H_{3''} et H_{4''} m, 3 H); 3,78 (H_{5''}, m, 1 H); 5,02 (H_{1''}; d, $J = 6,7$; 1 H); 6,64 (H₆; d, $J = 2,17$ Hz, 1 H); 6,90 (H₈; d, $J 2,17$ Hz, 1 H); 6,88 (H₅; d, $J = 8,51$ Hz, 1 H); 7,64 (H_{6'}; d, $J = 8,76$ Hz, 1 H); 7,73 (H_{2'}; 1 H).

RMN ^{13}C ([D₆]DMSO): 73,5; 74,7; 76,8; 77,2; 99,0; 105,0; 105,3; 107,6; 115,8; 116,3; 121,5; 124,0; 138,7; 145,7; 146,3; 148,7; 159,4; 159,7; 164,8; 173,8; 176,3.

HR-FAB-SM (m/z) trouvé : (m/z) Trouvé: 479,0779; Calculé pour $C_{21}H_{19}O_{13}$: 479,0826 [M+H]⁺.

X.6. Synthèse du 4'-*O*-glycoside

X.6.1. 2-(2,2-diphénylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)-3,5,7-tribenzyloxychromen-4-one (18)



Mode opératoire :

Le composé (18) est préparé par action du bromure de benzyle sur le 2-(2,2-diphénylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one (2) selon les conditions de benzylation classique (3,5 équivalents de BnBr et 3,5 équivalents de K_2CO_3 dans le DMF à température ambiante pendant 12 heures). Le produit obtenu est purifié par recristallisation dans l'acétate d'éthyle.

Rendement : 90%

Analyses :

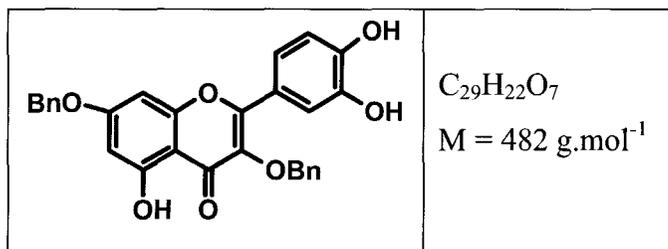
Point de fusion : 120-122°C

RMN 1H ($CDCl_3$) : 5,08 (s, 2 H, OCH_2Ph); 5,09 (s, 2 H, OCH_2Ph); 5,28 (s, 2 H, OCH_2Ph); 6,47 (d, $J = 1,9$ Hz, 1 H, aromatique H); 6,56 (d, $J = 1,9$ Hz, 1 H, aromatique H); 6,90 (d, $J = 8,2$ Hz, 1 H, aromatique H); 7,12-7,25 (m, 2 H, aromatiques H); 7,37-7,65 (m, 15 H, aromatiques H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : 70,5 (OCH_2Ph); 70,8 (OCH_2Ph); 74,2 (OCH_2Ph); 93,9; 98,1; 108,2; 108,9; 110,0; 123,6; 124,7; 126,3; 126,7; 127,7; 128,0; 128,1; 128,5; 128,7; 128,8; 129,1; 129,4; 135,7; 136,8; 139,5; 139,9; 147,2; 148,7; 153,7; 158,7; 159,8; 162,8; 173,9 (C=O).

Microanalyse : Calculé pour $C_{49}H_{36}O_7$ (736,82) : C, 79,88; H, 4,92; O, 15,20; Mesuré : C, 78,86; H, 5,07; O, 15,16.

X.6.2. 3,7-bisbenzyloxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxychromen-4-one (19)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 100 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon; on introduit (1,00 g, 1,36 mmoles) du 2-(2,2-diphénylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)-3,5,7-tribenzyloxychromen-4-one (**18**) et 50 mL dans un mélange d'acide acétique/eau (80/20). La suspension est portée à reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, on ajoute 50 mL d'eau, le mélange est extrait à l'acétate d'éthyle (2 fois 50 mL). La phase organique est lavée par une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium (40 mL) et par de l'eau (2 fois 50 mL) puis séchée sur $MgSO_4$ et concentrée sous vide. Le solide jaune obtenu est recristallisé dans le dichlorométhane. Le composé (**20**) (392 mg) est obtenu sous forme d'un solide jaune.

Rendement : 65%

Analyses :

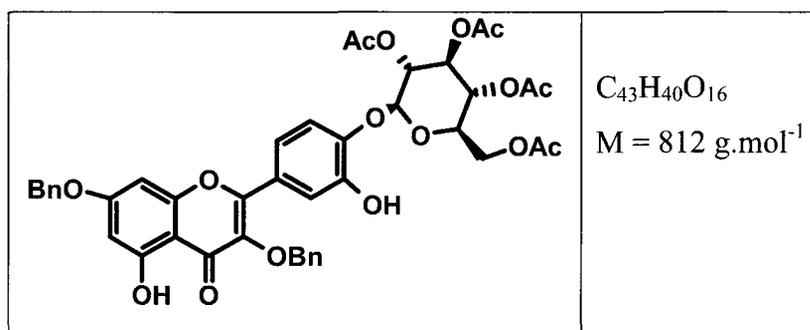
Point de fusion : 202-204°C

RMN 1H ($[D_6]DMSO$) : 5,01 (s, 2 H, OCH_2Ph); 5,21 (s, 2 H, OCH_2Ph); 6,43 (d, $J = 2,0$ Hz, 1 H, aromatique H); 6,75 (d, $J = 2,0$ Hz, 1 H, aromatique H); 6,87 (d, $J = 8,4$ Hz, 1 H, aromatique H); 7,28-7,46 (m, 11 H, aromatiques H); 7,55 (d, $J = 2,0$ Hz, 1 H, aromatique H); 9,36 (s, 1 H, OH); 9,83 (s, 1 H, OH); 12,7 (s, 1 H, OH).

RMN ^{13}C ($[D_6]DMSO$) : 70,0 (OCH_2Ph); 73,3 (OCH_2Ph); 93,0; 98,4; 105,3; 115,5; 115,7; 120,8; 121,0; 136,1; 136,5; 136,6; 145,2; 148,8; 156,2; 156,8; 161,0; 164,1; 178,0 (C=O).

Microanalyse : Calculé pour $C_{29}H_{22}O_7$ (482) : C, 72,19; H, 4,60; O, 23,21; Mesuré : C, 70,87; H, 4,57; O, 23,31.

X.6.3. 2-(4-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl)- β -D-glucopyranosyloxy-3,7-dibenzyloxy chromen-4-one (20)



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3- β -D-glucopyranosyloxy -5,7-bisbenzyloxy chromen-4-one (**8**).

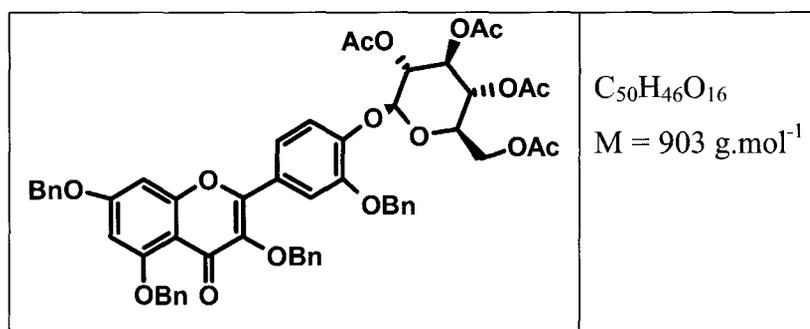
Rendement : 35%

Analyse :

RMN ^1H (CDCl_3) : 1,96 (CH_3 , s, 3 H); 2,01 (CH_3 , s, 3 H); 2,05 (CH_3 , s, 3 H); 2,07 (CH_3 , s, 3 H); 3,75 ($\text{H}_{5''}$, m, 1 H); 4,16 ($\text{H}_{6''}$, m, 2 H); 5,05 (s, 2 H, OCH_2Ph); 5,13 (s, 2 H, OCH_2Ph); 5,14-5,24 ($\text{H}_{2''}$, $\text{H}_{3''}$ et $\text{H}_{4''}$, m, 3 H); 5,06 ($\text{H}_{1''}$, d, $J = 7,5 \text{ Hz}$, 1 H); 6,20 (H_6 , d, $J = 2,0 \text{ Hz}$, 1 H); 6,57 (H_8 , d, $J = 2,0 \text{ Hz}$, 1 H); 7,35 ($\text{H}_{5'}$, d, $J = 8,3 \text{ Hz}$, 1 H); 7,71 ($\text{H}_{6'}$, dd, $J = 8,3, 1,7 \text{ Hz}$, 1 H); 7,73 ($\text{H}_{2'}$, d, $J = 1,7 \text{ Hz}$, 1 H); 7,36-7,53 (H Aromatic, m, 10 H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 20,4; 20,5; 20,7; 21,2; 61,9; 68,4; 70,3; 71,1; 71,8; 72,3; 74,7; 93,6; 99,2; 100,2; 107,7; 116,2; 116,5; 120,7; 123,3; 127,2; 127,4; 127,6; 127,9; 128,4; 128,5; 129,2; 130,18; 136,4; 136,7; 144,2; 147,3; 148,2; 156,7; 157,6; 162,7; 164,3; 170,0; 173,24.

X.6.4. 2-(4-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl)- β -D-glucopyranosyloxy-3-benzyloxyphényl)-3,5,7-tribenzyloxychromen-4-one (21)



Mode opératoire :

Le produit **21** est préparé par benzylation du composé **20** dans les conditions standards (1,3 équivalents de bromure de benzyle et 1,5 équivalents de carbonate de potassium dans DMF à température ambiante pendant 12 heures).

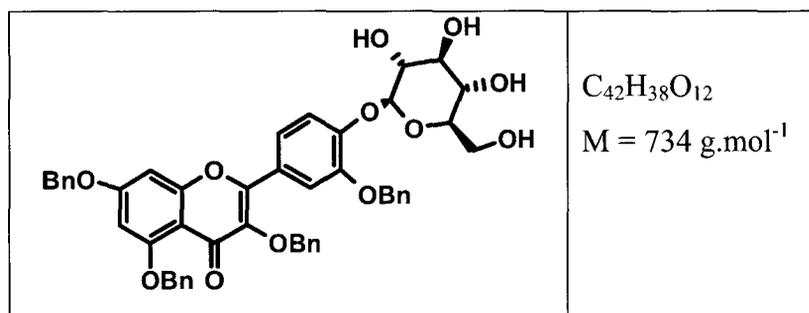
Rendement : 80%

Analyse :

RMN ^1H (CDCl_3) : 2,00 (CH_3 , s, 3 H); 2,02 (CH_3 , s, 3 H); 2,05 (CH_3 , s, 3 H); 2,09 (CH_3 , s, 3 H); 3,16 ($\text{H}_{5''}$, m, 1 H); 4,15 ($\text{H}_{6''}$, m, 2 H); 5,27 (s, 2 H, OCH_2Ph); 5,18 (s, 2 H, OCH_2Ph H); 5,13 (s, 2 H, OCH_2Ph); 5,06 (s, 2 H, OCH_2Ph); 5,35-5,06 ($\text{H}_{2''}$, $\text{H}_{3''}$ et $\text{H}_{4''}$, m, 3 H); 4,91 ($\text{H}_{1''}$, d, $J = 7,5 \text{ Hz}$, 1 H); 6,69 (H_6 , d, $J = 2,1 \text{ Hz}$, 1 H); 6,93 (H_8 , d, $J = 2,1 \text{ Hz}$, 1 H); 6,99 (H_5 , d, $J = 8,1 \text{ Hz}$, 1 H); 7,63 (H_6' , dd, $J = 8,1$ et $1,8 \text{ Hz}$, 1 H); 7,79 (H_2' , d, $J = 1,8 \text{ Hz}$, 1 H); 7,66-7,18 (H Aromatiques, m, 20 H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 20,6; 20,7; 20,8; 20,9; 61,5; 66,9; 68,8; 71,1; 71,5; 72,3; 73,1; 74,7; 74,9; 94,5; 98,8; 108,2; 114,2; 119,0; 124,6; 124,5; 127,9; 128,2; 128,4; 128,6; 128,9; 129,2; 129,3; 129,5; 129,7; 130,0; 136,2; 136,9; 137,9; 139,8; 140,7; 146,8; 151,1; 153,2; 159,5; 160,4; 163,6; 169,9; 170,3; 170,6; 173,5.

X.6.5. 2-(4-β-D-glucopyranosyloxy-3-benzyloxyphényl)-3,5,7-tribenzyloxychromen-4-one (22)



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3-β-D-glucopyranosyloxy -5,7-bisbenzyloxy chromen-4-one (**8**).

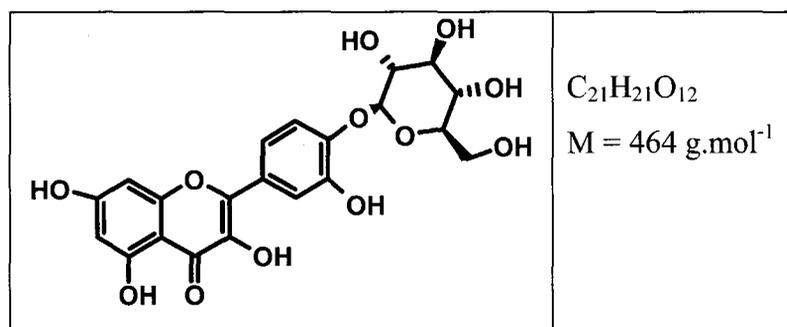
Rendement : 85%

Analyse :

RMN ¹H (CDCl₃) : 4,23-4,02 (H_{2''}, H_{3''}, H_{4''}, H_{5''} et H_{6''} m, 6 H); 4,12 (H_{6''}, m, 2 H); 5,27 (H_{1''}, d, J = 7,5 Hz, 1 H); 5,0 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,14 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,16 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,20 (s, 2 H, OCH₂Ph); 6,53 (H₆, d, J = 2,1 Hz, 1 H); 6,61 (H₈, d, J = 2,1 Hz, 1 H); 7,29 (H_{5'}, d, J = 8,1 Hz, 1 H); 7,60 (H_{6'}, dd, J = 8,1, 1,8 Hz, 1 H); 7,69 (H_{2'}, d, J = 1,8 Hz, 1 H); 7,53-7,29 (H Aromatic, m, 20 H).

RMN ¹³C (CDCl₃) : 61,3; 70,3; 70,5; 70,9; 71,2; 73,7; 74,7; 77,1; 77,3; 96,7; 98,9; 101,1; 112,9; 114,1; 115,4; 120,9; 123,3; 124,1; 127,1; 127,4; 127,9; 128,1; 128,3; 128,4; 128,6; 130,2; 136,3; 136,5; 136,9; 144,2; 148,9; 149,8; 153,2; 156,7; 159,1; 161,4, 173,1.

X.6.6. 4'-O-glycoside (23)



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du 3-*O*-glucoside quercétine (10).

Rendement : 85%

Analyse :

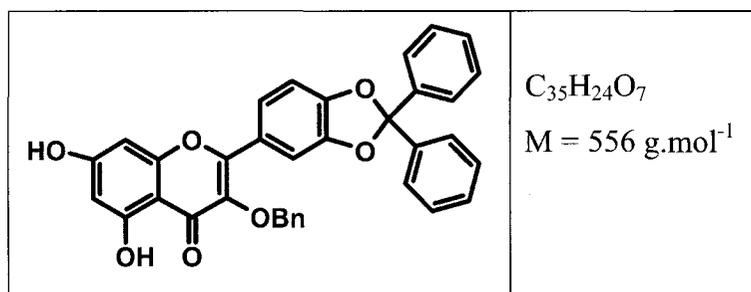
RMN ¹H ([D₆]DMSO) : 3,79–3,12 (H_{2''}, H_{3''}, H_{4''}, H_{5''} et H_{6''}, m, 6 H); 4,86 (H_{1''}, d, J 6.7 = Hz, 1H); 6,21 (H₆, d, J = 1,9 Hz, 1 H); 6,47 (H₈, d, J = 1,9 Hz, 1 H); 7,01 (H_{5'}, d, J = 8,6 Hz, 1 H); 7,31 (H_{6'}, d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,88 (H_{2'}, s, 1H).

RMN ¹³C ([D₆]DMSO) : 61,1; 70,45; 73,01; 76,7; 77,2; 93,9; 98,7; 102,1; 103,9; 115,8; 116,9; 123,4; 124,0; 136,6; 146,85; 149,7; 156,7; 157,8 ; 161,0; 164,7; 176,34.

HR-FAB-SM (*m/z*) trouvé : (*m/z*) Trouvé: 465,1034; Calculé pour C₂₁H₂₁O₁₂ : 465,1033 [M+H]⁺.

X.7. Synthèse du 7-*O*-glycoside et 7-*O*-glucuronide quercétine.

X.7.1. 2-(2,2-diphénylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)-3-benzyloxy-5,7-dihydroxychromen-4-one (24).



Mode opératoire :

Le produit **24** est préparé par benzylation du 2-(2,2-diphénylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one (**2**) dans les conditions standards (1,3 équivalents de bromure de benzyle et 1,5 équivalents de carbonate de potassium dans DMF à température ambiante pendant 12 heures.

Rendement : 65%

Analyses :

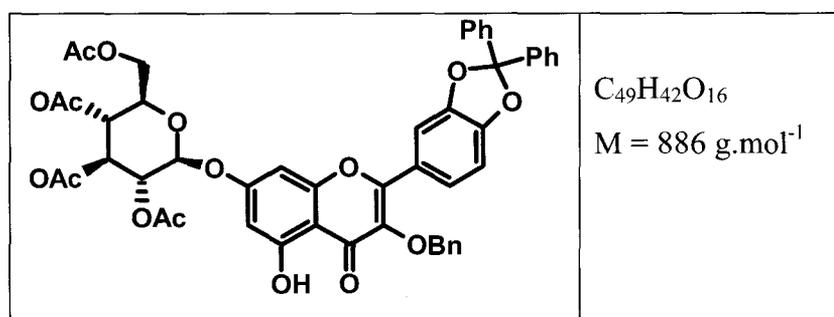
Point de fusion: 124-126°C.

RMN ¹H (CDCl₃) : 4,98 (s, 2 H, OCH₂Ph); 6,35 (d, *J* = 2,1 Hz, 1 H, aromatique H); 6,40 (d, *J* = 2,1 Hz, 1 H, aromatique H); 6,89 (d, *J* = 8,1 Hz, 1 H, aromatique H); 7,41-7,48 (m, 6 H, aromatiques H); 7,60-7,65 (m, 4 H, aromatiques H); 7,53 (dd, *J* = 8,1; et 1,8 Hz, 1 H, aromatique H); 7,58 (d, *J* = 1,8 Hz, 1 H, aromatique H).

RMN ¹³C (CDCl₃) : 74,7 (OCH₂Ph); 94,2; 99,4; 105,6; 108,3; 109,0; 117,8; 124,1; 124,2; 126,3; 128,1; 128,2; 128,4; 129,0; 129,4; 135,9; 137,8; 147,2; 149,3; 156,9; 157,0; 162,0; 163,2; 178,8 (C=O).

Microanalyse: Calculé pour C₃₅H₂₄O₇ (556,57) : C, 75,53; H, 4,35; O, 20,12; Mesuré : C, 73,70; H, 4,59; O, 19,63.

X.7.2. 2-(2,2-diphénylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)-3-benzyloxy-5-hydroxyl-7-(2,3,4,6 tétra-*O*-acétyl) -β-D-glucopyranosyloxychromen-4-one (25).



Mode opératoire :

Dans un ballon de 250 mL, sous atmosphère inerte, le TDA (0,5 g, 3,46 mmoles), le 2-(2,2-diphénylbenzo[1,3]dioxol-5-yl)-3-benzyloxy-5,7-dihydroxychromen-4-one (24) (1,0 g, 1,8 mmoles) et 40 mL de solution aqueuse saturée de carbonate de potassium sont agités vigoureusement; une suspension jaune-orange se forme, à laquelle on ajoute l'acétobromoglucose (1,10 g, 2,71 mmoles) en solution dans 40 mL de dichlorométhane. L'émulsion obtenue est agitée pendant 24 heures. Après l'addition de 40 mL d'eau; la phase aqueuse et la phase organique sont séparées. La phase aqueuse est extraite deux fois avec 60 mL de dichlorométhane. Les phases organiques sont réunies puis lavées successivement avec 50 mL d'une solution aqueuse de soude à 0,5%, 50 mL d'eau, 50 mL de solution d'acide chlorhydrique à 2% (pH neutre), puis deux fois avec 50 mL d'eau. Après séchage sur sulfate de magnésium, le dichlorométhane est évaporé. Le produit est ensuite purifié par

chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant un mélange 70/30 d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle.

Rendement : 69%

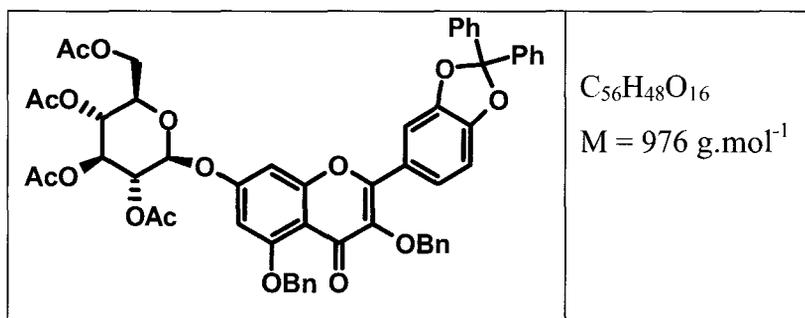
Analyse :

Point de fusion : 100-106°C

RMN¹H (CDCl₃) : 2,01 (CH₃, s, 3H); 2,03 (CH₃, s, 3H), 2,04 (CH₃, s, 3H); 2,06 (CH₃, s, 3H); 3,93 (H_{5''}, m, 1H); 4,23 (H_{6''}, m, 2H); 5,01 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,38 -5,12 (H_{2''}, H_{3''} et H_{4''}, m, 3H); 5,19 (H_{1''}, d, *J* = 7,0 Hz, 1H); 6,41 (H₆, d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 6,50 (H₈, d, *J* = 2,2Hz, 1H); 6,87 (H_{5'}, d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 7,54 (H_{6'}, dd, *J* = 8,3 et 1,7 Hz, 1H); 7,46 (H_{2'}, d, *J* = 1,7 Hz, 1H); 7,60-7,06 (H Aromatiques, m, 15H); 12,43 (OH, s, 1H).

RMN¹³C (CDCl₃) : 20,5; 20,6; 20,6; 21,0; 61,3; 68,2; 70,9; 72,4; 72,6; 74,4; 95,1; 98,1; 99,5; 107,3; 108,4; 108,9; 124,0; 124,2; 126,2; 127,4; 128,2; 128,3; 128,4; 128,9; 129,4; 133,8; 139,7; 147,2; 149,4; 156,6; 157,0; 161,9; 162,7; 169,5; 169,9; 170,3; 170,9; 174,4.

X.7.3. 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3,5-bisbenzyloxy 7-(2,3,4,6 tétra-*o*-acétyl) -β-D-glucopyranosyloxychromen-4-one (26).



Mode opératoire :

Le 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3,5-bisbenzyloxy 7-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl) -β-D-glucopyranosyloxychromen-4-one (**26**) est préparé par benzylation de l'hydroxyle en position 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3-benzyloxy-5-hydroxyl-7-(2,3,4,6 tétra-*O*-acétyl) -β-D-glucopyranosyloxychromen-4-one (**25**) dans les conditions standards (1,3 équivalents de bromure de benzyle et 1,5 équivalents de carbonate de potassium dans DMF à température ambiante pendant 12 heures.

Rendement : 85%

Analyse :

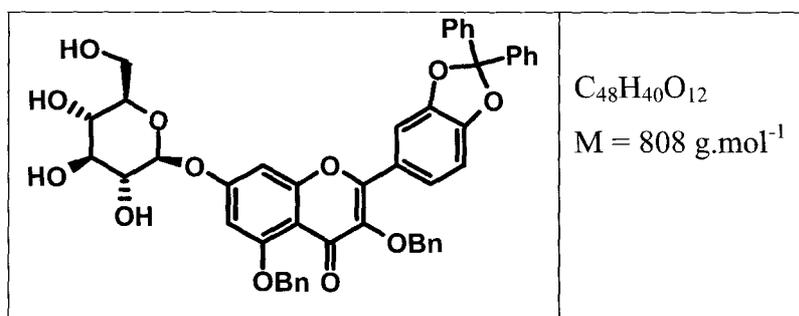
Point de fusion : 90-96°C

RMN¹H (CDCl₃) : 1,99 (CH₃, s, 3H); 2,02 (CH₃, s, 3H); 2,07 (CH₃, s, 3H); 2,09 (CH₃, s, 3H); 3,92 (H_{5''}, m, 1H); 4,18 (H_{6''}, m, 2H); 5,01 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,06 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,36-5,11 (H_{2''}, H_{3''} et H_{4''}, m, 3H); 5,17 (H_{1''}, d, *J* = 7,0 Hz, 1H); 6,37 (H₆, d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 6,47 (H₈, d, *J* = 2,2 Hz, 1H); 6,87 (H_{5'}, d, *J* = 8,3 Hz, 1H); 7,54 (H_{6'}, dd, *J* = 8,3 et 1,7 Hz, 1H); 7,46 (H_{2'}, d, *J* = 1,7 Hz, 1H); 7,60-7,06 (H Aromatiques, m, 20H).

RMN¹³C (CDCl₃) : 20,3; 20,4; 20,6; 20,9; 61,9; 68,2; 70,5; 72,1; 72,4; 72,7; 94,1; 98,2; 99,3; 108,3; 109,2; 117,9; 124,0; 124,2; 126,2; 127,4; 128,2; 128,3; 128,4; 128,9; 129,4; 133,7; 137,3; 139,7; 147,2; 149,4; 156,6; 157,0; 162,0; 162,9; 169,6; 170,2; 170,3; 170,9; 177,4.

HR-FAB-SM (*m/z*) trouvé : 999,2864; Calculé pour C₅₆H₄₈NaO₁₆ : 999,2840 [M+Na]⁺.

X.7.4. 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3,5-bisbenzyloxy-7-β-D-glucopyranosyloxy chromen-4-one (27)



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3-β-D-glucopyranosyloxy-5,7-bisbenzyloxy chromen-4-one (8).

Rendement : 80%

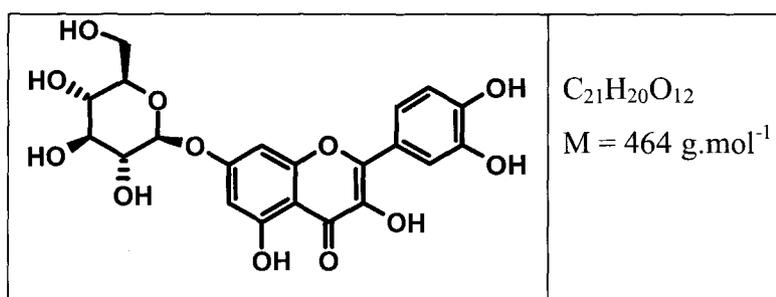
Analyse :

Point de fusion : 140-144°C

RMN¹H (CDCl₃) : 3,15 (H_{5''}, m, 1 H); 3,62–3,28 (H_{2''}, H_{3''} et H_{4''}, H_{6''}, m, 5 H); 4,76 (H_{1''}, d, *J* = 6,7 Hz, 1H); 5,05 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,12 (s, 2 H, OCH₂Ph); 6,33 (H₆, d, *J* = 2,2 Hz, 1 H); 6,43 (H₈, d, *J* = 2,2 Hz, 1 H); 6,93 (H_{5'}, d, *J* = 8,3 Hz, 1 H); 7,12-7,77 (H Aromatiques, H_{2'} et H_{6'}, m, 22 H).

RMN¹³C (CDCl₃) : 61,4; 68,9; 70,2; 71,7; 72,1; 73,4; 76,0; 94,8; 98,4; 107,4; 108,7; 109,1; 117,9; 123,9; 124,2; 126,3; 126,3; 126,6; 127,6; 127,8; 128,4; 128,5; 128,6; 128,8; 129,4; 136,0; 137,7; 139,6; 147,0; 149,3; 155,1; 158,7; 159,7; 162,7; 173,1.

X.7.5. 7-*O*-glycoside quercétine (28).



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du 3-*O*-glycoside quercétine (9).

Rendement : 78%

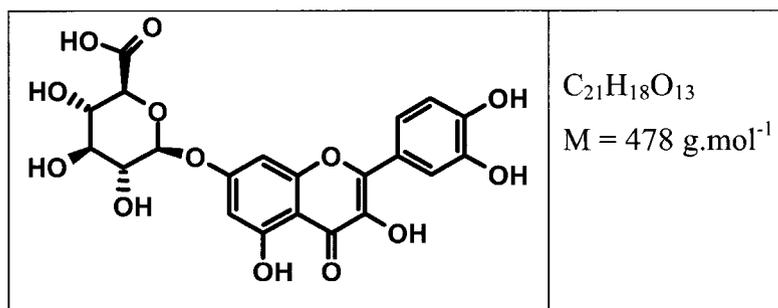
Analyse :

RMN¹H (CD₃OD) : 3,67–3,12 (H_{2''}, H_{3''}, H_{4''}, H_{5''} et H_{6''}, m, 6 H); 4,98 (H_{1''}, d, *J* = 6,7 Hz, 1H); 6,37 (H₆, d, *J* = 2,2 Hz, 1 H); 6,58 (H₈, d, *J* = 2,2 Hz, 1 H); 6,86 (H_{5'}, d, *J* = 8,3 Hz, 1 H); 7,49 (H_{6'}, dd, *J* = 8,5, 1,7 Hz, 1H); 7,64 (H_{2'}, d, *J* = 1,7 Hz, 1H).

RMN¹³C (CD₃OD) : 61,0; 69,3; 72,9; 75,9; 77,0; 94,6; 99,0; 100,1; 104,9; 115,1; 115,9; 120,1; 122,0; 136,0; 144,7; 147,4; 147,7; 157,4; 160,1; 162,1; 175,1.

HR-FAB-SM (*m/z*) trouvé : 465,1046; Calculé pour C₂₁H₂₁O₁₂ : 465,1033 [M+H]⁺.

X.7.6. 7-*O*-glucuronide quercétine (29)



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du 3-*O*-glucuronide quercétine (10).

Rendement : 65%

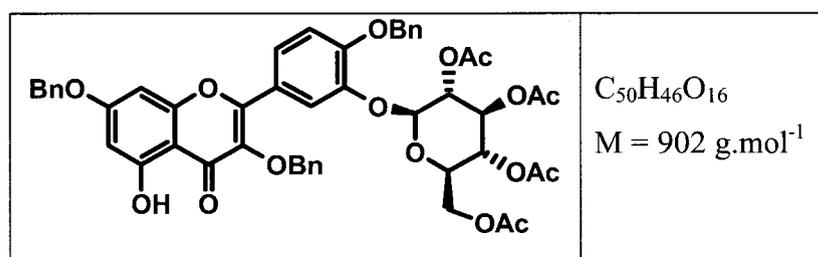
Analyse :

$RMN^{13}C$ (CD_3OD) : 3,73–3,25 (H_2'' et H_3'' , H_4'' , m, 3 H); 4,08 (H_5'' , d, $J = 9,2$ Hz, 1H); 5,12 (H_1'' , d, $J = 6,7$ Hz, 1H); 6,42 (H_6 , d, $J = 2,2$ Hz, 1 H); 6,62 (H_8 , d, $J = 2,2$ Hz, 1 H); 6,85 (H_5 , d, $J = 8,3$ Hz, 1 H); 7,61 (H_6' , dd, $J = 8,5$ et 1,8 Hz, 1H); 7,69 (H_2' , d, $J = 1,8$ Hz, 1H).

$RMN^{13}C$ (CD_3OD) : 73,2; 74,5; 76,5; 77,4; 95,7; 100,4; 105,1; 106,3; 116,1; 116,3; 122,0; 123,9; 137,7; 146,2; 148,7; 157,6; 162,0; 162,9; 164,3; 174,8; 177,4.

X.8. Synthèse du 3'-*O*-glycoside et 3'-*O*-glucuronide quercétine

X.8.1. 3,7-bisbenzyloxy-2-(3-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl)- β -D-glucopyranosyloxy)-4-benzyloxyphényl)-5-Hydroxylchromen-4-one (30)



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du 3-*O*-glucuronide quercétine (25).

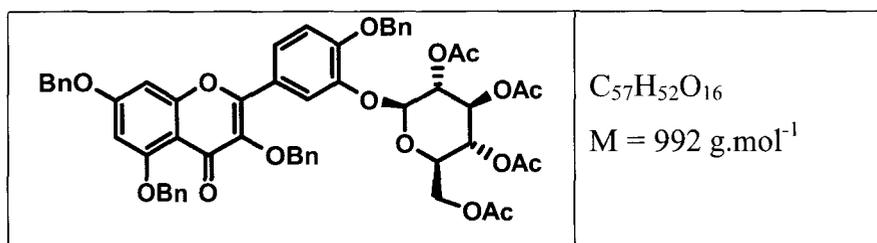
Rendement : 70%

Analyse :

RMN ¹H (CDCl₃) : 1,96 (CH₃, s, 3 H); 2,01 (CH₃, s, 3 H); 2,05 (CH₃, s, 3 H); 2,09(CH₃, s, 3 H); 3,12 (H_{5''}, m, 1 H); 4,07 (H_{6''}, m, 2 H); 5,05 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,12 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,17 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,35-5,05 (H_{2''}, H_{3''} et H_{4''}, m, 3 H); 4,81 (H_{1''}, d, J = 7,5 Hz, 1 H); 6,65 (H₆, d, J = 2,0 Hz, 1 H); 6,85 (H₈, d, J = 2,0 Hz, 1 H); 6,94 (H_{5'}, d, J = 8,3 Hz, 1 H); 7,58 (H_{6'}, dd, J = 8,3, 1,7 Hz, 1 H); 7,74 (H_{2'}, d, J = 1,7 Hz, 1 H); 7,52-7,18 (H Aromatiques, m, 15 H).

RMN ¹³C (CDCl₃) : 20,8; 20,9; 21,6; 61,9; 68,3; 70,8; 71,1; 71,4; 72,1; 72,9; 74,2; 94,0; 99,2; 100,2; 106,2; 114,9; 119,5; 122,8; 124,9; 127,2; 127,4; 128,4; 127,9; 128,2; 128,3; 128,3; 128,7; 128,7; 128,8; 129,0; 135,7; 135,8; 136,4; 137,6; 139,3; 145,6; 147,9; 156,7; 162,0; 164,4; 169,8; 169,9; 170,6; 171,2; 178,9.

X.8.2. 2-(3-(2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl)-β-*D*-glucopyranosyloxy-4-benzyloxyphényl)-3,5,7-tribenzyloxychromen-4-one (31)



Mode opératoire :

Le prouit (31) est préparé par benzylation du composé (30) dans les conditions standards (1,3 équivalents de bromure de benzyle et 1,5 équivalents de carbonate de potassium dans DMF à température ambiante pendant 12 heures).

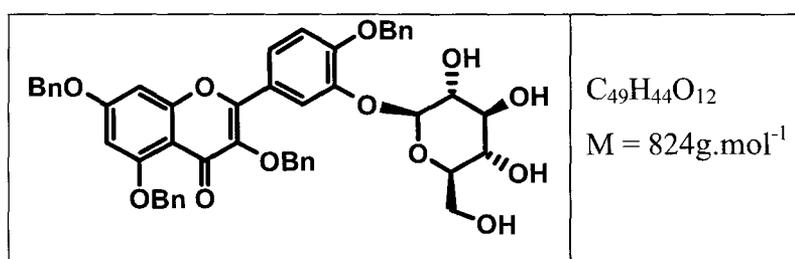
Rendement : 90%

Analyse :

RMN ¹H (CDCl₃) : 1,97 (CH₃, s, 3 H); 2,03 (CH₃, s, 3 H); 2,06 (CH₃, s, 3 H); 2,09(CH₃, s, 3 H); 3,13 (H_{5''}, m, 1 H); 4,11 (H_{6''}, m, 2 H); 5,23 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,15 (s, 2 H, OCH₂Ph H); 5,10 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,05 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,32-5,02 (H_{2''}, H_{3''} et H_{4''}, m, 3 H); 4,83 (H_{1''}, d, J = 7,5 Hz, 1 H); 6,65 (H₆, d, J = 2,1 Hz, 1 H); 6,85 (H₈, d, J = 2,1 Hz, 1 H); 6,92 (H_{5'}, d, J = 8,1 Hz, 1 H); 7,58 (H_{6'}, dd, J = 8,1 et 1,8 Hz, 1 H); 7,74 (H_{2'}, d, J = 1,8 Hz, 1 H); 7,52-7,18 (H Aromatiques, m, 20 H).

RMN ¹³C (CDCl₃) : 20,5; 20,6; 20,7; 20,8; 61,0; 66,4; 68,1; 70,5; 70,8; 71,7; 72,5; 74,2; 74,3; 93,9; 98,2; 107,8; 113,7; 118,5; 123,9; 124,0; 127,3; 127,7; 127,7; 128,1; 128,5; 128,6; 128,6; 128,7; 128,8; 129,3; 135,7; 136,4; 137,4; 139,3; 140,2; 146,2; 150,6; 152,6; 158,7; 159,8; 162,9; 169,3; 169,4; 170,3; 170,7; 173,8.

X.8.3. 2-(3-β-D-glucopyranosyloxy-4-benzyloxyphényl)-3,5,7-tribenzyloxychromen-4-one (32).



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du 2-(2,2-diphényl-benzo[1,3]dioxol-5-yl)-3-β-D-glucopyranosyloxy -5,7-bisbenzyloxy chromen-4-one (8).

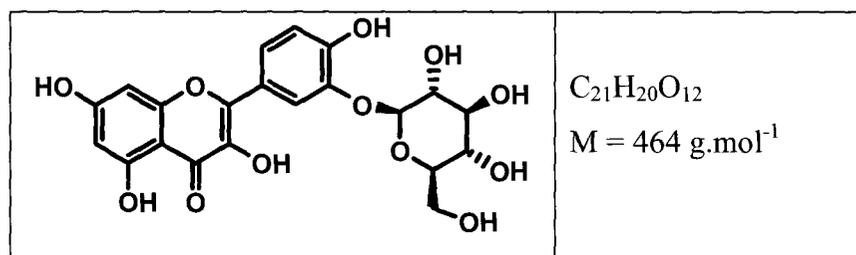
Rendement : 85%

Analyse :

RMN ¹H (CDCl₃) : 3,82-3,02 (H_{2''}, H_{3''}, H_{4''}, H_{5''} et H_{6''} m, 6 H); 4,11 (H_{6''}, m, 2 H); 4,83 (H_{1''}, d, J = 7,5 Hz, 1 H); 5,27 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,17 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,12 (s, 2 H, OCH₂Ph); 5,02 (s, 2 H, OCH₂Ph); 6,59 (H₆, d, J = 2,1 Hz, 1 H); 6,82 (H₈, d, J = 2,1 Hz, 1 H); 6,95 (H_{5'}, d, J = 8,1 Hz, 1 H); 7,61 (H_{6'}, dd, J = 8,1, 1,8 Hz, 1 H); 7,77 (H_{2'}, d, J = 1,8 Hz, 1 H); 7,52-7,18 (H Aromatiques, m, 20 H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 60,8; 70,5; 71,1; 71,2; 72,7; 73,2; 74,1; 76,7; 77,2; 94,2; 99,0; 100,9; 108,9; 114,1; 115,8; 122,9; 123,0; 126,9; 127,4; 127,7; 128,9; 128,0; 128,1; 128,3; 128,4; 128,5; 136,7; 136,8; 136,9; 138,9; 146,7; 149,7; 154,2; 158,1; 159,0; 162,5; 172,3.

X.8.4. 3'-*O*-glycoside (33)



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du 3-*O*-glycoside quercétine (9).

Rendement : 85%

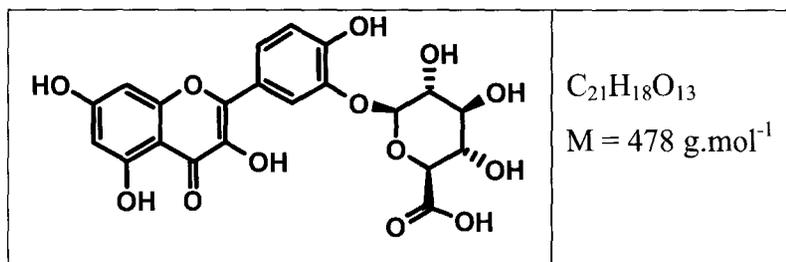
Analyse :

RMN ^1H ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$) : 3,77–3,15 (H_2'' , H_3'' , H_4'' , H_5'' et H_6'' , m, 6 H); 4,75 (H_1'' , d, $J = 6,7 \text{ Hz}$, 1H); 6,27 (H_6 , d, $J = 1,9 \text{ Hz}$, 1 H); 6,55 (H_8 , d, $J = 1,9 \text{ Hz}$, 1 H); 6,89 (H_5' , d, $J = 8,6 \text{ Hz}$, 1 H); 7,55 (H_6' , d, $J = 8,6 \text{ Hz}$, 1H); 7,85 (H_2' , s, 1H).

RMN ^{13}C ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$) : 61,3; 69,9; 73,9; 76,7; 77,9; 94,6; 99,7; 103,1; 105,9; 116,1; 116,9; 123,1; 124,0; 136,4; 146,7; 150,7; 156,7; 157,1; 161,1; 161,7; 178,2.

HR-FAB-SM (m/z) trouvé : 465,1042; Calculé pour $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{12}$: 465,1033 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

X.8.5. 3'-*O*-glucuronide (34)



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du 3-*O*-glucuronide quercétine (10).

Rendement : 45%

Analyse :

RMN ^1H CD_3OD : 3,83–3,35 ($\text{H}_{2''}$, $\text{H}_{3''}$, $\text{H}_{4''}$, m, 3 H); 4,28 ($\text{H}_{5''}$, d, $J = 9,2$ Hz, 1H) 5,15 ($\text{H}_{1''}$, d, $J = 6,7$ Hz, 1H); 6,22 (H_6 , d, $J = 2,2$ Hz, 1 H); 6,42 (H_8 , d $J = 2,2$ Hz, 1 H); 6,95 (H_5 , d, $J = 8,3$ Hz, 1 H); 7,11 ($\text{H}_{2'}$, s, 1H); 7,79 (H_6 , d, $J = 8,3$ Hz, 1H).

RMN ^{13}C (CD_3OD): 71,7; 73,5; 75,5; 76,4; 94,2; 98,7; 99,6; 104,1; 115,7; 116,6; 121,7; 122,0; 136,7; 147,2; 149,1; 151,6; 156,8; 161,9; 164,3; 170,8; 176,9.

XI. Références bibliographiques

- [1] Aherne, S.A.; O'Brien, N.M. **Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism.** *Nutrition (New York, NY, United States)* **2002**, *18*, 75-81.
- [2] Bohm, B.A. *Introduction to Flavonoids*, 1998.
- [3] Bravo, L. **Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance.** *Nutrition reviews* **1998**, *56*, 317-333.
- [4] Harborne, J.B.; Williams, C.A. **Advances in flavonoid research since 1992.** *Phytochemistry* **2000**, *55*, 481-504.
- [5] Peterson, J.; Dwyer, J. **Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity.** *Nutrition Research (New York)* **1998**, *18*, 1995-2018.
- [6] Hertog, M.G.L.; Hollman, P.C.H.; Katan, M.B. **Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1992**, *40*, 2379-2383.
- [7] Crozier, A.; Lean, M.E.J.; McDonald, M.S.; Black, C. **Quantitative Analysis of the Flavonoid Content of Commercial Tomatoes, Onions, Lettuce, and Celery.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 590-595.
- [8] Peterson, J.; Dwyer, J.; Bhagwat, S.; Haytowitz, D.; Holden, J.; Eldridge, A.L.; Beecher, G.; Aladesanmi, J. **Major flavonoids in dry tea.** *Journal of Food Composition and Analysis* **2005**, *18*, 487-501.
- [9] Hertog, M.G.L.; Hollman, P.C.H.; van de Putte, B. **Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines, and fruit juices.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1993**, *41*, 1242-1246.
- [10] Scalbert, A. **Antimicrobial properties of tannins.** *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3875-3883.
- [11] Shahat, A.A.; Cos, P.; De Bruyne, T.; Apers, S.; Hammouda, F.M.; Ismail, S.I.; Azzam, S.; Claeys, M.; Goovaerts, E.; Pieters, L.; Vanden Berghe, D.; Vlietinck, A.J. **Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and proanthocyanidins from crataegus sinaica.** *Planta Medica* **2002**, *68*, 539-541.
- [12] Lyu, S.-Y.; Rhim, J.-Y.; Park, W.-B. **Antiherpetic activities of flavonoids against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in vitro.** *Archives of Pharmacal Research* **2005**, *28*, 1293-1301.

- [13] Wei, B.L.; Lu, C.M.; Tsao, L.T.; Wang, J.P.; Lin, C.N. **In vitro anti-inflammatory effects of quercetin 3-O-methyl ether and other constituents from Rhamnus species.** *Planta medica* **2001**, *67*, 745-747.
- [14] Theoharides, T.C.; Alexandrakis, M.; Kempuraj, D.; Lytinas, M. **Anti-inflammatory actions of flavonoids and structural requirements for new design.** *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* **2001**, *14*, 119-127.
- [15] Guardia, T.; Rotelli, A.E.; Juarez, A.O.; Pelzer, L.E. **Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat.** *Farmaco* **2001**, *56*, 683-687.
- [16] Mitscher, L.A.; Jung, M.; Shankel, D.; Dou, J.-H.; Steele, L.; Pillai, S.P. **Chemoprotection: a review of the potential therapeutic antioxidant properties of green tea (*Camellia sinensis*) and certain of its constituents.** *Medicinal Research Reviews* **1997**, *17*, 327-365.
- [17] Schroeter, H.; Spencer, J.P.E.; Rice-Evans, C.; Williams, R.J. **Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3.** *Biochemical Journal* **2001**, *358*, 547-557.
- [18] Yang, C.S.; Landau, J.M.; Huang, M.T.; Newmark, H.L. **Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds.** *Annual review of nutrition* **2001**, *21*, 381-406.
- [19] Hertog, M.G.L.; Katan, M.B. **Quercetin in foods, cardiovascular disease, and cancer.** *Antioxidants in Health and Disease* **1998**, *7*, 447-467.
- [20] Hertog, M.G.L. **Do flavonoids in tea, red wine and onions protect against heart disease and cancer?** *Polyphenols Actualites* **1995**, *13*, 17-19.
- [21] Duarte, J.; Perez-Vizcaino, F.; Jimenez, J.; Tamargo, J.; Zarzuelo, A. **Flavonoids and cardiovascular diseases.** *Studies in Natural Products Chemistry* **2001**, *25*, 565-605.
- [22] de Whalley, C.V.; Rankin, S.M.; Hoult, J.R.; Jessup, W.; Leake, D.S. **Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages.** *Biochemical pharmacology* **1990**, *39*, 1743-1750.
- [23] Frankel, E.N.; Kanner, J.; German, J.B.; Parks, E.; Kinsella, J.E. **Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine.** *Lancet* **1993**, *341*, 454-457.
- [24] Rankin, S.M.; Leake, D.S. **The modification of low density lipoproteins by macrophages by oxidation or proteolysis.** *Agents and actions. Supplements* **1988**, *26*, 233-239.

- [25] Steinmetz, K.A.; Potter, J.D. **Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review.** *Journal of the American Dietetic Association* **1996**, *96*, 1027-1039.
- [26] Block, G.; Patterson, B.; Subar, A. **Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence.** *Nutrition and cancer* **1992**, *18*, 1-29.
- [27] Aura, A.M.; O'Leary, K.A.; Williamson, G.; Ojala, M.; Bailey, M.; Puupponen-Pimia, R.; Nuutila, A.M.; Oksman-Caldentey, K.M.; Poutanen, K. **Quercetin Derivatives Are Deconjugated and Converted to Hydroxyphenylacetic Acids but Not Methylated by Human Fecal Flora in Vitro.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 1725-1730.
- [28] Crespy, V.; Morand, C.; Besson, C.; Manach, C.; Demigne, C.; Remesy, C. **Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats.** *Journal of Nutrition* **2001**, *131*, 2109-2114.
- [29] Crespy, V.; Morand, C.; Manach, C.; Besson, C.; Demigne, C.; Remesy, C. **Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen.** *American Journal of Physiology* **1999**, *277*, G120-G126.
- [30] Murota, K.; Shimizu, S.; Chujo, H.; Moon, J.H.; Terao, J. **Efficiency of absorption and metabolic conversion of quercetin and its glucosides in human intestinal cell line Caco-2.** *Archives of biochemistry and biophysics* **2000**, *384*, 391-397.
- [31] MacKenzie, A.R.; Moody, C.J.; Rees, C.W. **Synthesis of the bacterial coenzyme methoxatin.** *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3259-3268.
- [32] Jung, M.E.; Lyster, M.A. **Quantitative dealkylation of alkyl ethers via treatment with trimethylsilyl iodide. A new method for ether hydrolysis.** *Journal of Organic Chemistry* **1977**, *42*, 3761-3764.
- [33] Nagaoka, H.; Schmid, G.; Iio, H.; Kishi, Y. **A synthesis of the aromatic segment of rifamycin S.** *Tetrahedron Letters* **1981**, *22*, 899-902.
- [34] Node, M.; Nishide, K.; Fuji, K.; Fujita, E. **Hard acid and soft nucleophile system. 2. Demethylation of methyl ethers of alcohol and phenol with an aluminum halide-thiol system.** *Journal of Organic Chemistry* **1980**, *45*, 4275-4277.
- [35] Cabiddu, M.G.; Cadoni, E.; De Montis, S.; Fattuoni, C.; Melis, S.; Usai, M. **A re-examination of the methylenation reaction.** *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4383-4387.
- [36] Corey, E.J.; Szekely, I.; Shiner, C.S. **Synthesis of 6,9a-oxido-11a,15a-dihydroxyprosta-(E)5,(E)13-dienoic acid, an isomer of PGI₂ (Vane's PGX).** *Tetrahedron Letters* **1977**, 3529-3532.

- [37] Tanabe, M.; Bigley, B. **17a,21-Isopropylidenedioxy steroids**. *Journal of the American Chemical Society* **1961**, *83*, 756-757.
- [38] Node, M.; Nishide, K.; Sai, M.; Ichikawa, K.; Fuji, K.; Fujita, E. **Aluminum halide-thiol system: a useful reagent for demethylation of aliphatic and aromatic methyl ethers and demethylation of methylenedioxy compounds**. *Chemistry Letters* **1979**, 97-98.
- [39] Laks, P.E.; Pruner, M.S. **Flavonoid biocides: structure/activity relations of flavonoid phytoalexin analogs**. *Phytochemistry* **1988**, *28*, 87-91.
- [40] Trost, B.M.; Caldwell, C.G. **The di-tert-butylsilylene protecting group for diols**. *Tetrahedron Letters* **1981**, *22*, 4999-5002.
- [41] Cren-Olive, C.; Lebrun, S.; Rolando, C. **An efficient synthesis of the four mono methylated isomers of (+)-catechin including the major metabolites and of some dimethylated and trimethylated analogues through selective protection of the catechol ring**. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2002**, 821-830.
- [42] Corey, E.J.; Hopkins, P.B. **Diisopropylsilyl ditriflate and di-tert-butylsilyl ditriflate: new reagents for the protection of diols**. *Tetrahedron Letters* **1982**, *23*, 4871-4874.
- [43] Corey, E.J.; Link, J.O. **The first enantioselective syntheses of pure R- and S-isoproterenol**. *Tetrahedron Letters* **1990**, *31*, 601-604.
- [44] Alam, A.; Takaguchi, Y.; Ito, H.; Yoshida, T.; Tsuboi, S. **Multi-functionalization of gallic acid towards improved synthesis of α - and β -DDB**. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 1909-1918.
- [45] Benard, C.; Zouhiri, F.; Normand-Bayle, M.; Danet, M.; Desmaele, D.; Leh, H.; Mouscadet, J.-F.; Mbemba, G.; Thomas, C.-M.; Bonnenfant, S.; Le Bret, M.; d'Angelo, J. **Linker-modified quinoline derivatives targeting HIV-1 integrase: synthesis and biological activity**. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2004**, *14*, 2473-2476.
- [46] Lee, Y.; Yeo, H.; Liu, S.-H.; Jiang, Z.; Savizky, R.M.; Austin, D.J.; Cheng, Y.-c. **Increased Anti-P-glycoprotein Activity of Baicalein by Alkylation on the A Ring**. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 5555-5566.
- [47] Horie, T.; Tsukayama, M.; Kourai, H.; Nakayama, Y.; Nakayama, M. **Studies of the selective O-alkylation and dealkylation of flavonoids. VIII. Synthesis of pedaliin**. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **1986**, *34*, 30-35.

- [48] Chen, Z.; Hu, Y.; Wu, H.; Jiang, H. **Synthesis and biological evaluation of flavonoids as vasorelaxant agents.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*, 3949-3952.
- [49] Haslam, E.; Haworth, R.D.; Mills, S.D.; Rogers, H.J.; Armitage, R.; Searle, T. **Gallotannins. II. Some esters and depsides of gallic acid.** *Journal of the Chemical Society* **1961**, 1836-1842.
- [50] Albrecht, M.; Schneider, M. **Preparation of a highly alkyl-substituted dicatechol ligand and its dinuclear titanium(IV) complex.** *Synthesis* **2001**, 2234-2238.
- [51] Stachulski, A.V.; Jenkins, G.N. **The synthesis of O-glucuronides.** *Natural product reports* **1998**, *15*, 173-186.
- [52] Schmidt, R.R.; Castro-Palomino, J.C.; Retz, O. **New aspects of glycoside bond formation.** *Pure and Applied Chemistry* **1999**, *71*, 729-744.
- [53] Schmidt, R.R. **New methods of glycoside and oligosaccharide syntheses - are there alternatives to the Koenigs-Knorr method?** *Angewandte Chemie* **1986**, *98*, 213-236.
- [54] Jensen, K.J. **O-Glycosylations under neutral or basic conditions.** *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **2002**, 2219-2233.
- [55] Jayakanthan, K.; Vankar, Y.D. **Glycosyl trichloroacetyl-carbamate: a new glycosyl donor for O-glycosylation.** *Carbohydrate Research* **2005**, *340*, 2688-2692.
- [56] Boons, G.-J. **Strategies in oligosaccharide synthesis.** *Tetrahedron* **1996**, *52*, 1095-1121.
- [57] Daubresse, N.; Chupeau, Y.; Francesch, C.; Lapierre, C.; Pollet, B.; Rolando, C. **Rational design, synthesis and biological evaluation of the first inhibitor of lignin polymerization.** *Chemical Communications (Cambridge)* **1997**, 1489-1490.
- [58] Oyama, K.; Kondo, T. **Total Synthesis of Flavocommelin, a Component of the Blue Supramolecular Pigment from *Commelina communis*, on the Basis of Direct 6-C-Glycosylation of Flavan.** *Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 5240-5246.
- [59] Lewis, P.; Kaltia, S.; Wahala, K. **The phase transfer catalyzed synthesis of isoflavone-O-glucosides.** *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry* **1998**, 2481-2484.
- [60] Du, Y.; Wei, G.; Linhardt, R.J. **Total Synthesis of Quercetin 3-Sophorotrioside.** *Journal of Organic Chemistry* **2004**, *69*, 2206-2209.
- [61] Boryski, J.; Gryniewicz, G. **A regioselective synthesis of genistein 4'-O-ribofuranosides.** *Synthesis* **2001**, 2170-2174.

- [62] Oyama, K.-i.; Kondo, T. **Total synthesis of apigenin 7,4'-di-O- β -glucopyranoside, a component of blue flower pigment of *Salvia patens*, and seven chiral analogs.** *Tetrahedron* **2004**, *60*, 2025-2034.
- [63] Mitchell, S.A.; Pratt, M.R.; Hruba, V.J.; Polt, R. **Solid-Phase Synthesis of O-Linked Glycopeptide Analogues of Enkephalin.** *Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 2327-2342.
- [64] Paulsen, H. **Progress in the selective chemical synthesis of complex oligosaccharides.** *Angewandte Chemie* **1982**, *94*, 184-201.
- [65] Bouktaib, M.; Lebrun, S.; Atmani, A.; Rolando, C. **Hemisynthesis of all the O-monomethylated analogues of quercetin including the major metabolites, through selective protection of phenolic functions.** *Tetrahedron* **2002**, *58*, 10001-10009.
- [66] Brewster, K.; Harrison, J.M.; Inch, T.D. **Synthesis of aryl β -D-glucopyranosides and aryl β -D-glucopyranosiduronic acids.** *Tetrahedron Letters* **1979**, 5051-5054.
- [67] kajjout. **glycoprotein Activity of Baicalein by Alkylation on the A Ring.** *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *47*, 5555-5566.
- [68] Dess, D.; Kleine, H.P.; Weinberg, D.V.; Kaufman, R.J.; Sidhu, R.S. **Phase-transfer catalyzed synthesis of acetylated aryl β -D-glucopyranosides and aryl β -D-galactopyranosides.** *Synthesis* **1981**, 883-885.
- [69] Tromp, R.A.; van Boom, S.S.G.E.; Timmers, C.M.; van Zutphen, S.; van der Marel, G.A.; Overkleeft, H.S.; van Boom, J.H.; Reedijk, J. **The β -glucuronyl-based prodrug strategy allows for its application on β -glucuronyl-platinum conjugates.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*, 4273-4276.
- [70] De Nooy, A.E.J.; Besemer, A.C.; Van Bekkum, H. **On the use of stable organic nitroxyl radicals for the oxidation of primary and secondary alcohols.** *Synthesis* **1996**, 1153-1174.
- [71] de Nooy, A.E.J.; Besemer, A.C.; van Bekkum, H. **Selective oxidation of primary alcohols mediated by nitroxyl radical in aqueous solution. Kinetics and mechanism.** *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8023-8032.
- [72] Bragd, P.L.; Besemer, A.C.; van Bekkum, H. **Bromide-free TEMPO-mediated oxidation of primary alcohol groups in starch and methyl α -D-glucopyranoside.** *Carbohydrate Research* **2000**, *328*, 355-363.

- [73] Kuszmann, J.; Medgyes, G.; Boros, S. **Synthesis of 2,5-anhydro-(β -D-glucopyranosyluronate)- and (α -L-idopyranosyluronate)-D-mannitol hexa-O-sulfonate hepta sodium salt.** *Carbohydrate Research* **2004**, *339*, 1569-1579.
- [74] Davis, N.J.; Flitsch, S.L. **Selective oxidation of monosaccharide derivatives to uronic acids.** *Tetrahedron Letters* **1993**, *34*, 1181-1184.
- [75] Bouktaib, M.; Atmani, A.; Rolando, C. **Regio- and stereoselective synthesis of the major metabolite of quercetin, quercetin-3-O- β -D-glucuronide.** *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 6263-6266.
- [76] Wulff, G.; Roehle, G. **Results and problems of O-glycoside syntheses.** *Angewandte Chemie* **1974**, *86*, 173-187.
- [77] Farkas, L.; Vermes, B.; Nogradi, M. **First synthesis of three natural quercetin glucosides (spiraeoside, quercetin 5- and 3'-O- β -D-glucopyranoside).** *Chemische Berichte* **1972**, *105*, 3505-3510.
- [78] Jurd, L. **Plant polyphenols. V. Selective alkylation of the 7 hydroxyl group in polyhydroxyflavones.** *Journal of the American Chemical Society* **1958**, *80*, 5531-5556.
- [79] Caldwell, S.T.; Crozier, A.; Hartley, R.C. **Isotopic labeling of quercetin 4'-O- β -D-glucoside.** *Tetrahedron* **2000**, *56*, 4101-4106.
- [80] Winum, J.-Y.; Leydet, A.; Seman, M.; Montero, J.-L. **Synthesis and biological activity of glycosyl conjugates of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide.** *Farmaco* **2001**, *56*, 319-324.

Chapitre II : Réactivité chimique dans les réacteurs microfluidiques

I. Introduction

La microfluidique est un domaine de recherche en pleine expansion depuis une dizaine d'années, et dont la vitalité est nourrie par la diversité de ses applications. Sa définition historique est l'étude des écoulements fluides dans des canaux capillaires ou dans des milieux poreux, dont la dimension la plus faible est de l'ordre de quelques microns. Cette définition n'est aujourd'hui plus suffisante pour couvrir l'ensemble des activités de recherches désignées par le terme "microfluidique", qui comprend entre autres l'étude de phénomènes physiques, la chimie analytique, la biologie moléculaire ou encore la chimie organique.

La microfluidique, en chimie, a permis la conduite et l'étude de réactions dans des microréacteurs tubulaires de quelques centaines de nL.^[1, 2] L'intérêt des chimistes pour la microfluidique est motivé par différents facteurs. Une réduction des échelles va de pair avec (i) l'augmentation de la surface d'échange, un million de fois supérieure comparée à l'échelle du laboratoire, (ii) une très grande rapidité des opérations, (iii) la mise en jeu de volumes réduits, (iv) la mise en parallèle possible d'un grand nombre de réacteurs, soit pour une montée en échelle de la production, soit pour mener simultanément des réactions différentes. De plus, à ces échelles, les performances ne sont pas les mêmes qu'en verrerie classique, suite à un meilleur transfert de chaleur qui aide au contrôle des réactions et du fait que celles-ci sont menées en flux continu sans interactions entre réactifs et produits formés.

Ce chapitre vise à mettre en évidence les différences entre des réactions menées dans la verrerie classique, à l'échelle du laboratoire, et des réactions menées dans un microréacteur, à l'échelle du micron, et illustrer l'apport de la microfluidique à la conduite de réactions de chimie organique classiques.

II. Domaines d'applications de la microfluidique

Parmi le grand nombre d'applications de la microfluidique, deux principales directions peuvent être distinguées. D'une part, l'utilisation de la microfluidique comme outil pour étudier des phénomènes avec une plus grande précision. Dans cette optique nous pouvons mentionner, entre autres, les phénomènes de glissements à l'interface liquide-solide,^[3, 4] la percolation, l'étirement de macromolécules dans des écoulements^[5] et le processus d'agrégation de particules soumises à un écoulement.

D'autre part, la microfluidique peut être utilisée pour créer des systèmes d'analyses chimiques ou biologiques.

II.1. Avantages de la miniaturisation

L'avantage de la miniaturisation permet d'avoir un rapport surface/volume très important^[6, 7] qui permet d'accélérer les phénomènes de transferts de masse et d'énergie. Cette observation scientifique a permis d'imaginer une amélioration de plusieurs opérations unitaires où les phénomènes de transferts jouent un rôle prioritaire, par exemple dans les réactions chimiques polyphasiques, hétérogènes où l'augmentation de la surface d'échange permet d'avoir un taux de conversion de la réaction plus important. On peut ainsi contrôler les paramètres de transfert pour optimiser les temps de séjour et augmenter le rendement. Les transferts d'énergie sont également augmentés, et des petites structures ont vu le jour permettant d'évacuer des grandes quantités de chaleur.

II.2. Microréacteurs et analyse biochimique

Dans le domaine biochimique, les premières applications apparaissent comme une continuation des puces à ADN. Des études visent à miniaturiser à l'échelle d'un microsystème des réactions d'amplification de brins d'ADN à l'aide de la technique PCR.^[8] Par ailleurs, Matis et al^[9] ont décrit le séquençage d'oligonucléotides par électrophorèse capillaire dans des microcanaux usinés sur un microsystème. Ces séparations électrophoretiques ont été utilisées pour d'autres molécules, comme des protéines.^[10] Un deuxième domaine d'application est la protéomique, avec l'intégration sur un microsystème fluide de différentes étapes de préparation des échantillons protéomiques avant leur analyse en ligne par spectrométrie de masse le plus souvent.^[11-14]

II.3. Microréacteurs et réactions chimiques

De nombreux auteurs ont développé des structures de microréacteurs adaptées à la synthèse chimique. Ils ont comparé l'influence de la miniaturisation sur plusieurs réactions homogènes.^[2, 15] Ils obtiennent un taux de conversion supérieur aux procédés classiques en évitant la formation de produits secondaires, provenant des réactions successives consécutives.

Les microréacteurs ont été jusqu'à présent plus souvent utilisés pour des synthèses en phase gazeuse que pour des réactions chimiques en phase liquide, certainement à cause des pertes de

charges créées par frottements des liquides sur les parois. De plus, la cinétique des réactions en phase liquide est souvent plus lente que la cinétique des réactions en phase gazeuse. Dans le cas des cinétiques lentes, l'utilisation des réacteurs classiques est plus favorable. Cependant, les divers avantages de la miniaturisation ont fait que plusieurs réactions mettant en jeu des produits organiques en phase liquide, ont vu le jour depuis peu de temps. Une partie de ces réactions est développée pour mettre en avant les propriétés intéressantes des microréacteurs.

II.3.1. Réaction d'alkylation

Masaharu et *al*^[16] ont étudiés une réaction d'alkylation de l'oxocyclopentanecarboxylate d'éthyle par le bromure de benzyle en présence de bromure de tetrabutylammonium (TBAB) (Figure II.1). Cette réaction a été conduite en microréacteur et en conditions macroscopiques. Ils ont observé que le rendement était meilleur en microréacteur qu'en verrerie classique, à l'échelle du laboratoire, même avec une agitation vigoureuse.

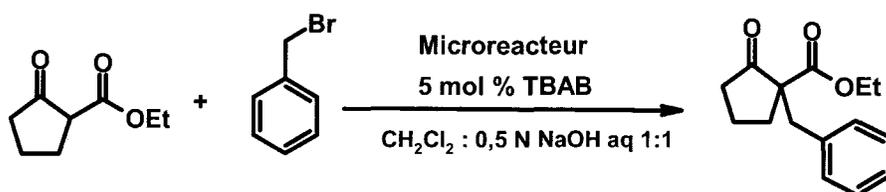


Figure II.1 : Réaction d'alkylation en microréacteur.

En effet, le produit d'alkylation a été obtenu avec un rendement de 57% dans le microréacteur après 60 secondes. Ce rendement grimpe jusqu'à plus de 90% après un temps de séjour de 300 secondes, contre 37% en ballon classique même avec une agitation importante de l'ordre de 1350 t/mn pendant 60 secondes (Figure II.2).

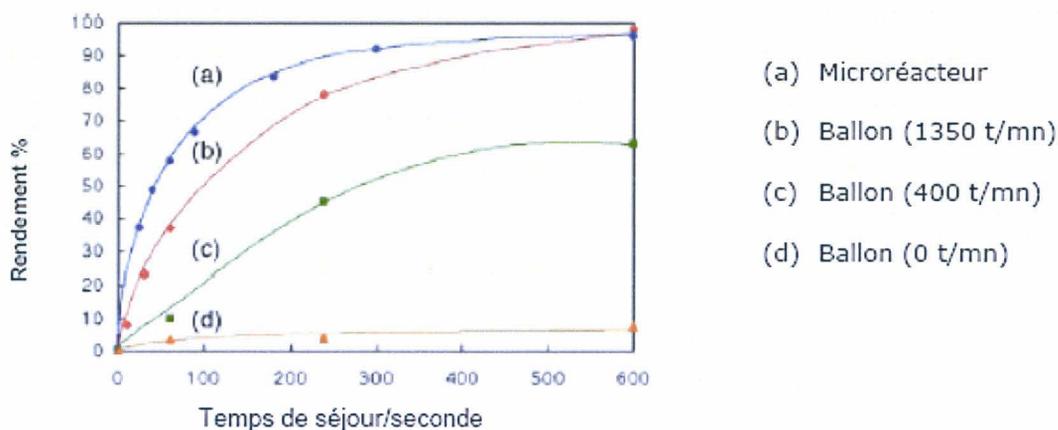


Figure II.2 : Profil d'alkylation en microréacteur et en verrerie classique.

II.3.2. Réaction de formation d'un composé diazo

Un deuxième exemple de réaction en conditions de transfert de phase est une réaction de couplage conduisant à l'obtention d'un composé diazo.^[17]

La réaction est testée ici sur le 5-méthyl résorcinol et le tétrafluoroborate de 4-nitrobenzène diazonium (Figure II.3), introduits respectivement en phase organique et en phase aqueuse à un débit de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Le résorcinol, mis en contact avec la phase aqueuse, diffuse dans cette dernière. Il peut donc réagir avec le sel de diazonium pour donner le composé diazo, soluble dans la phase organique.

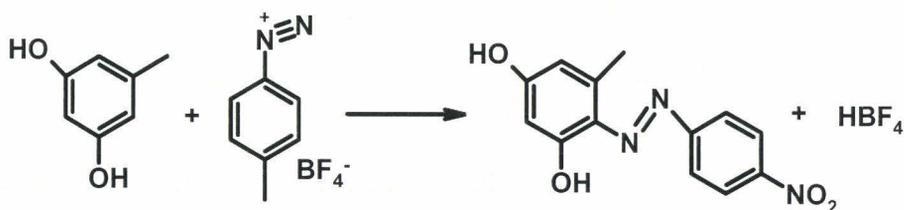


Figure II.3 : Réaction de formation d'un composé diazo.

Le taux de conversion à l'échelle microfluidique, avoisine les 100%, contre un rendement plus faible en conditions macroscopiques, dépendant de la vitesse d'agitation du milieu. Par ailleurs, un produit secondaire, de type bisazo, se forme conjointement. Néanmoins, comme sa diffusion vers la phase organique est beaucoup plus lente, les deux produits peuvent aisément être séparés à l'échelle microfluidique, le bisazo restant dans la phase aqueuse.

II.3.3. Réaction de polymérisation

La production industrielle de grands nombres de polymères se fait à partir d'un réacteur batch. Récemment, la synthèse du poly(méthyl-méthacrylate) (PMMA) et du poly(acide acrylique) à partir du motif de base (méthacrylate de méthyl) a été réalisée à partir d'un micro-procédé pour augmenter la sécurité du procédé de fabrication.^[18] Le procédé classique est constitué d'un mélangeur statique suivi d'un réacteur tubulaire. Le mélange uniforme entre l'initiateur de polymérisation et le motif de base se fait rapidement au sein du mélangeur statique, pour éviter la cristallisation de produits secondaires de grande masse molaire. Malheureusement la faible performance du mélangeur statique provoque la précipitation des produits et réduit ensuite fortement l'efficacité du réacteur. Le nouveau procédé muni d'une étape de pré-mélange supplémentaire, constitué d'une série de microréacteurs mis en parallèle, évite fortement la formation de produits secondaires en augmentant la performance du mélange entre le monomère et l'initiateur.

Ce procédé multi-échelle a permis d'augmenter la capacité de production et de réduire les pertes de charges de moitié car le débit d'écoulement est moins important. Dans cet exemple, nous remarquons que l'étape décisive de mélange, une fois optimisée, permet d'augmenter la quantité de produit tout en réduisant les coûts de production.

III. Le mélange

Généralement, l'agitation est le moyen d'initier, d'accélérer ou d'améliorer les phénomènes physico-chimiques mis en jeu. Le mélange est un procédé physique qui a pour but de tendre vers une distribution uniforme de la concentration dans un volume fini. Habituellement l'objectif est d'obtenir un temps de mélange le plus court possible.

III.1. Réactions compétitives

Plusieurs méthodes ont été développées pour déterminer les temps de mélange dans les réacteurs continus et discontinus. Pour déterminer et caractériser l'efficacité de micromélange, on utilise plus couramment les propriétés cinétiques des réactions compétitives. En effet, la présence de plusieurs réactions chimique dans un même système produit différentes espèces chimiques qui se forment à des vitesses différentes.

Donc, connaissant la cinétique des réactions en compétition, il est possible de remonter jusqu'au temps de mélange, en quantifiant la concentration des différentes espèces formées au cours de l'expérience. Nous allons nous intéresser plus particulièrement à une réaction entre les ions iodates et les ions iodures (Figure II.4). Cette technique a été adaptée aux microréacteurs et a eu une meilleure reproductibilité. On alimente une entrée du microréacteur avec une solution contenant des ions iodates IO_3^- , d'iodures I^- et de l'acétate de sodium. On additionne par l'autre entrée un acide fort, généralement de l'acide chlorhydrique. Si le mélange est rapide il y a formation de sel et d'acide acétique, par contre si le mélange est moins rapide il y a formation d'une solution d'iode.^[19] Une simple analyse par UV suffit à visualiser le résultat pour quantifier la qualité de mélange.

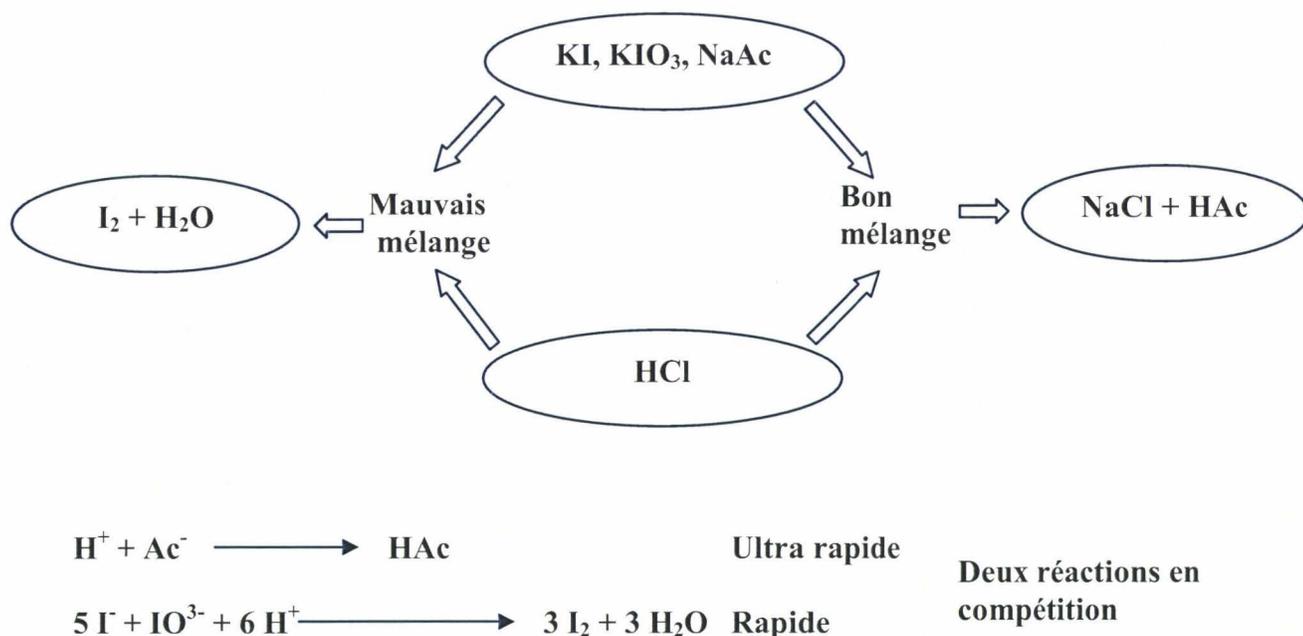


Figure II.4 : Un exemple de réaction dépendant des conditions de mélange.

III.2. Mélangeurs à flux laminaire

A l'échelle microfluidique, on distingue deux volets de réactions de chimie organique : les réactions conduites en milieu homogène et celles conduites en conditions de transfert de phase. En effet, comme l'écoulement des fluides est laminaire en microfluidique (Figure II.5) et qu'il n'y a pas de turbulences locales, le mélange des flux est difficile et peu efficace. Il

résulte uniquement de la diffusion des espèces et la réaction a lieu principalement à l'interface entre les flux. Ainsi, pour des réactions homogènes, l'absence de mélange est palliée par une microstructuration locale en amont de la zone de réaction, forçant les séparations et recombinaisons des flux. En revanche, pour des réactions conduites en conditions de transfert de phase, l'absence de mélange est mise à profit : en fin de réaction, l'étape d'extraction et de purification des produits est supprimée, les produits se situent exclusivement dans l'un des deux flux.

Dans le cas d'un microcanal, le mélange est peu efficace comme le montre l'équation **II.1**, (où L représente une longueur caractéristique transverse de l'écoulement et D le coefficient de diffusion des molécules étudiées qui dépend du milieu et de la taille de la molécule).

Pour diminuer ce temps de mélange, il suffit de diminuer L , longueur caractéristique transverse du système. Des études ont donc été réalisées pour optimiser ces paramètres de mélange^[20] en modifiant la géométrie du microcanal. Pour ce faire, on peut diviser le canal principal en série de plusieurs microcanaux. Une fois que le mélange a eu lieu, les microcanaux sont ensuite recombinaisonnés pour recomposer le canal de sortie principal. Ainsi, la longueur transverse caractéristique de l'écoulement devient-elle L' définie comme L/n et le temps de mélange est n^2 fois plus court avec n est le nombre de microcanaux (Equation **II.2**).

$$t_{\text{mélange}} = \frac{L^2}{D}$$

Equation II.1

$$t^{(n)}_{\text{mélange}} = \frac{L^2}{n^2 D}$$

Equation II.2

Ce type de microréacteur est utilisé pour un mélange binaire (A, B). Chaque canal d'alimentation est divisé en plusieurs plus petits microcanaux pour permettre ensuite la mise en contact d'une petite quantité de fluide à mélanger. Les microcanaux du liquide A rencontrent les microcanaux du liquide B et sont placés alternativement les uns à la suite des autres (Figure **II.6**).^[20] Les deux liquides rentrent en contact intime dans un seul microcanal.

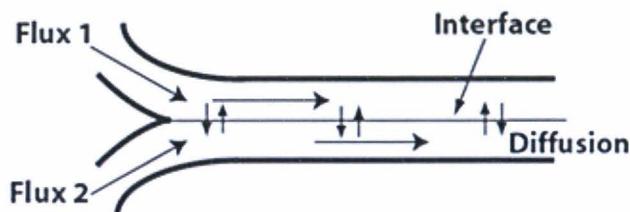


Figure II.5 : Ecoulement laminaire

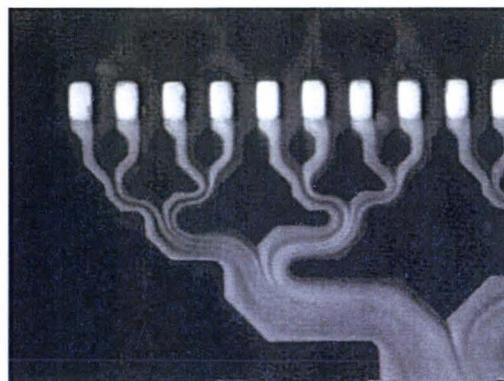


Figure II.6 Mélange de deux colorants par diffusion^[20]

IV. Méthylation de la quercétine

Les études microfluidiques ont été menées sur la réaction de méthylation de la quercétine. Nous avons choisi cette réaction pour deux raisons majeures ; tout d'abord, elle a été largement étudiée au laboratoire dans de la verrerie conventionnelle^[21] et ensuite, elle se prête à différents types de conditions : homogènes, hétérogènes ou transfert de phase.

Cette réaction a été conduite dans différentes conditions; (i) des conditions standards dites à l'échelle du laboratoire (verrerie classique), (ii) des conditions homogènes, à l'échelle microfluidique avec le mélange forcé des réactifs grâce à un NanomixerTM commercial (UpChurch Scientific). Les expériences ont été effectuées dans un capillaire, qui est un bon modèle de microcanal et qui permet de créer une structure en Y. Les capillaires utilisés ont un diamètre interne de 75 μm et sont alimentés en amont à l'aide de pousses-seringues, à un débit fixé et régulier. Le microréacteur a typiquement une longueur de 15 cm. Le NanomixerTM est placé en amont du capillaire qui constitue le microréacteur. Le mélange réactionnel est analysé en fin de réaction en couplage chromatographie liquide, spectrométrie de masse en utilisant l'ionisation par électronébulisation (LC-ESI-SM) afin de déterminer les proportions des différents produits obtenus. La structure des produits obtenus est confirmée par leurs spectres de fragmentation en incluant un balayage SM/SM durant le couplage.

IV.1. Réaction de méthylation de la quercétine en verrerie classique

Dans des conditions classiques (la verrerie conventionnelle), la réaction de méthylation de la quercétine est menée en phase homogène, dans le DMF, les réactifs étant K_2CO_3 (base) et l'iodure de méthyle (l'agent alkylant). Cette réaction a été étudiée à température ambiante dans le DMF, en faisant varier le nombre d'équivalents de réactifs (base et agent alkylant). Un équivalent est défini comme une quantité stoechiométrique d'agent alkylant et 1,25 fois plus de base. Les produits obtenus en fin de réaction sont alors identifiés par ESI-SM et quantifiés par LC-ESI-SM/SM.

IV.1.1. Etudes des fragmentations des analogues monométhylés en ESI-SM/SM.

Au laboratoire, une technique simple basée sur le couplage chromatographie liquide haute performance – spectrométrie de masse via une source d'électronébulisation permettant de caractériser et de différencier chaque site de méthylation possible sur la quercétine a été développée.

IV.1.1.1. Etudes des fragmentations des deux isomères monométhylquercétines en position 3' et 4'

Les spectres SM/SM des isomères 3'-*O*-méthylquercétine et 4'-*O*-méthylquercétine sont très semblables (Figure II.7). Dans les hautes masses les ions $[M+H-CH_3]^+$ à m/z 302 sont les fragments prédominants. Les ions aux masses m/z 284 et 228 sont formés respectivement à partir de l'ion à m/z 302 par la perte d'une molécule d'eau et d'une molécule d'eau suivie de deux molécules de monoxyde de carbone. Les fragments qui correspondent aux masses m/z 274, 246 et 218 peuvent être expliqués par la perte du radical méthyle et une, deux ou trois molécules de CO à partir de l'ion moléculaire. On observe aussi des ions fragments correspondant à la perte d'une molécule de méthanol suivie d'une perte successive d'une, de deux et de trois molécules de monoxyde de carbone à partir de l'ion moléculaire dont les masses respectives sont : m/z 257, 229 et 201.

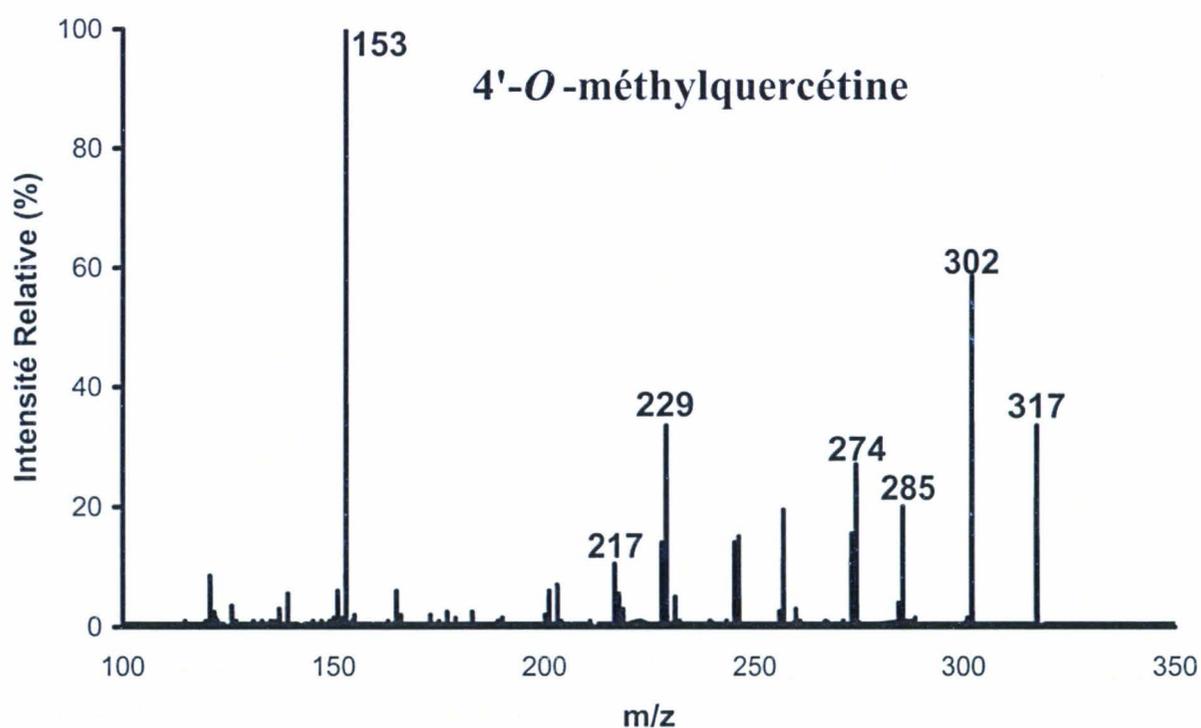
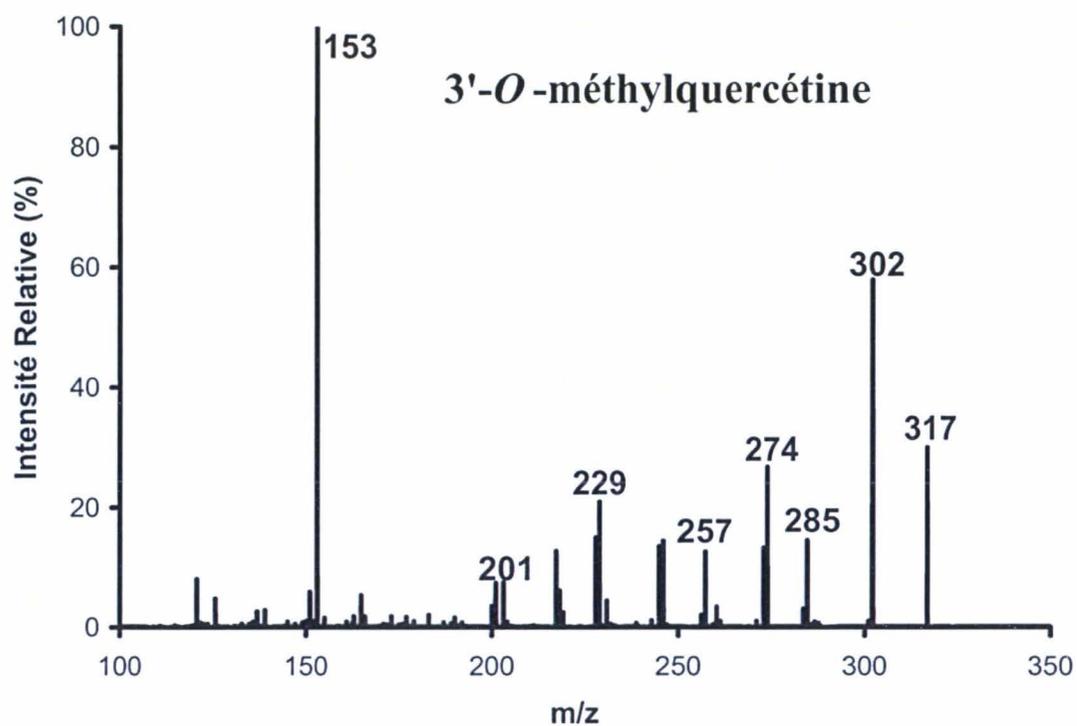
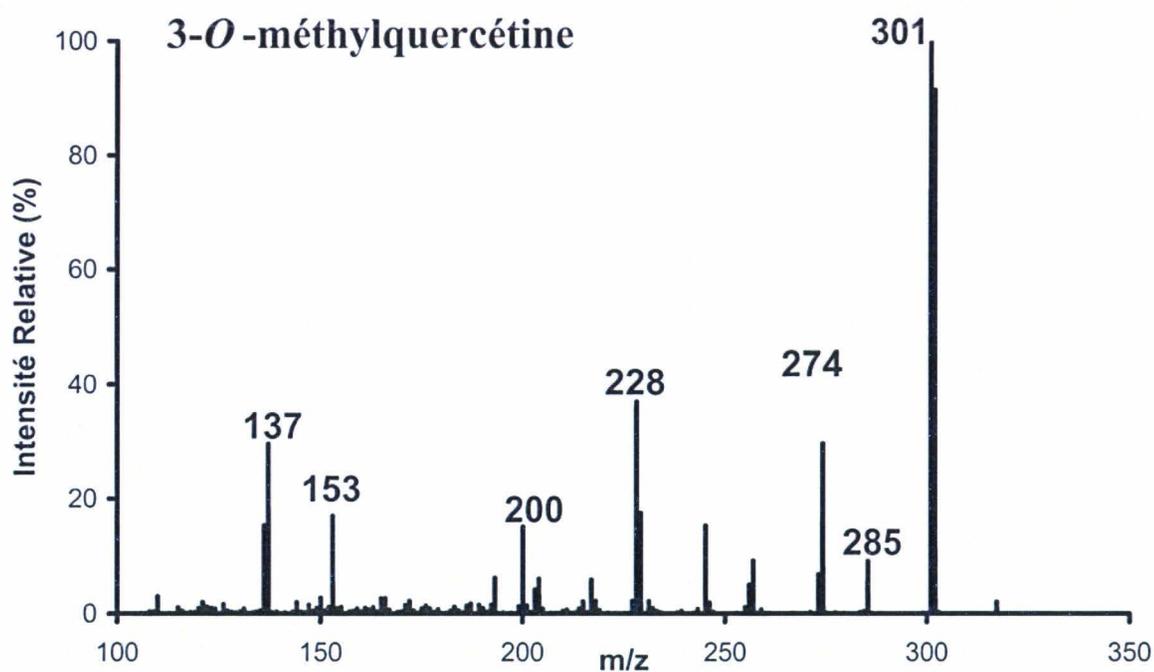


Figure II.7 : Spectres SM/SM obtenus pour le 3'-O-méthylquercétine et le 4'-O-méthylquercétine; énergie de collision : 38 eV.

IV.1.1.2. Etudes des fragmentations des deux isomères monométhylquercétines en position 3 et 5.

La majeure fragmentation observée dans les spectres des composés 3-*O*-méthylquercétine et 5-*O*-méthylquercétine, est la perte d'un radical méthyle à partir de l'ion moléculaire à $m/z = 302$. L'ion $m/z = 301$ peut être formé par la perte successive des radicaux méthyle et hydrogène (Figure II.8).



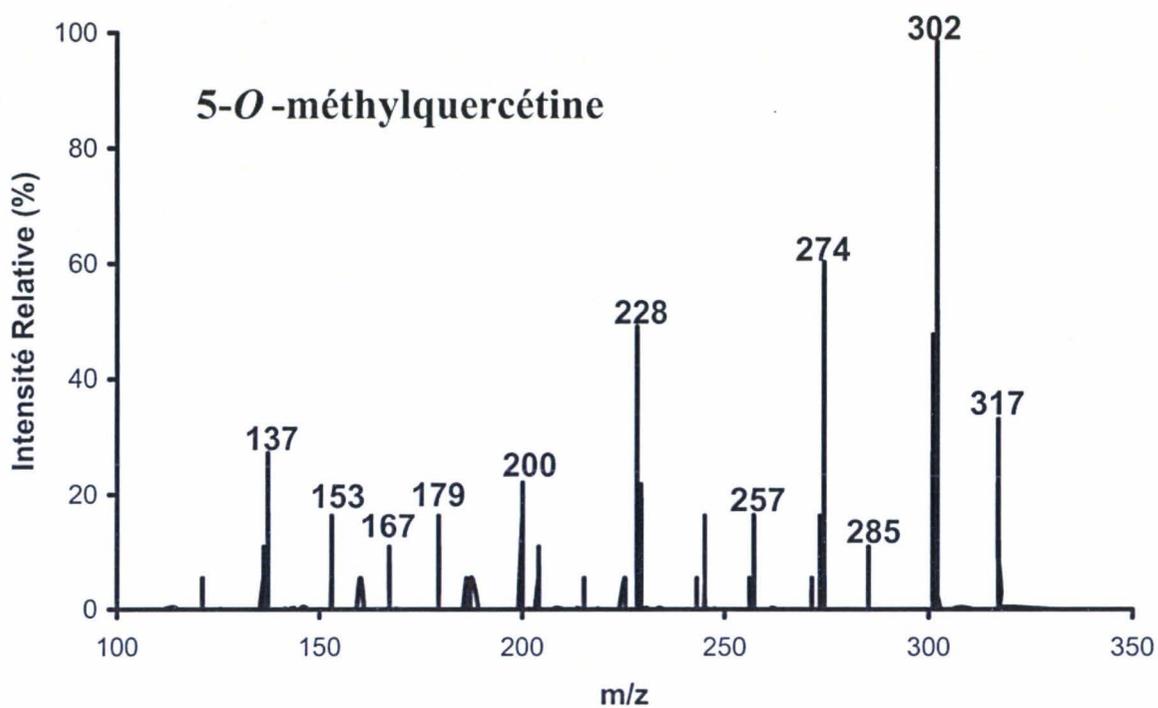


Figure II.8 : Spectres SM/SM obtenus pour le 3-*O*-méthylquercétine et le 5-*O*-méthylquercétine; énergie de collision : 38 eV.

IV.1.1.3. Etudes des fragmentations de l'isomère 7-*O*-méthylquercétine

Le spectre SM/SM de l'isomère 7-*O*-méthylquercétine est présenté dans la Figure II.9.

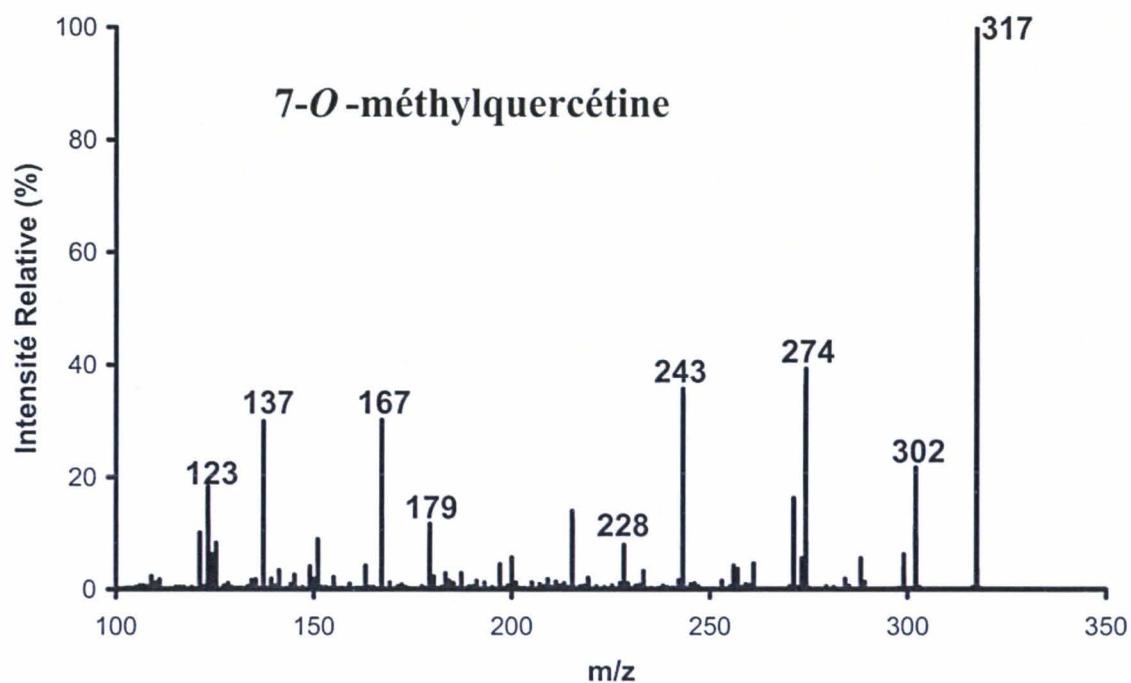


Figure II.9 : Spectre SM/SM obtenu pour le 7-*O*-méthylquercétine; énergie de collision : 38 eV.

IV.1.2. Analyse des analogues méthylés de la quercétine par couplage LC/SM

Après proposition des structures probables pour les ions fragments observés dans le spectre SM/SM de chaque monométhylquercétine et pour identifier ces composés dans un mélange, nous avons déterminé le temps de rétention de chaque monométhylquercétine (Tableau II.1).

Composé	Temps de rétention (min)
Quercétine	21,2
3'- <i>O</i> -méthylquercétine	25,8
4'- <i>O</i> -méthylquercétine	24,5
5- <i>O</i> -méthylquercétine	17,7
3- <i>O</i> -méthylquercétine	23,1
7- <i>O</i> -méthylquercétine	26,3

Tableau II.1 : Temps de rétention obtenu pour la quercétine et ses cinq analogues monométhylés

IV.1.3. Résultats de la méthylation directe de la quercétine

Globalement, quelles que soient les conditions de réaction, la réaction donne un mélange complexe de plusieurs produits présentant divers degrés de méthylation et différentes positions de méthylation.

Ainsi, en présence d'un équivalent de réactif, la réaction conduit à l'obtention de trois composés monométhylés, la 3-*O*-méthylquercétine (20 %), la 7-*O*-méthylquercétine (55 %) et la 4'-*O*-méthylquercétine (25 %) ainsi que deux composés diméthylés, la 3,7-*O*-diméthylquercétine (67 %), et la 3,4'-*O*-diméthylquercétine (33 %). Lorsque le nombre d'équivalents de réactifs est égal à 2, la réaction donne les mêmes trois composés monométhylés et les mêmes composés diméthylés que précédemment mais avec des proportions différentes : la part de composés diméthylés augmente. De plus, le mélange comporte également un composé triméthylé et le rendement de réaction est plus élevé que précédemment. Avec trois équivalents de réactifs, le degré de méthylation augmente globalement sur les produits obtenus ; il se forme un composé tétraméthylé, un composé triméthylé, deux composés diméthylés et la quantité de composés monométhylés diminue fortement.

Les résultats de cette étude sont résumés dans le Tableau II.2. La Figure II.10 présente les traces en LC/SM obtenus dans les différents cas de figure, avec un, deux ou trois équivalents en réactifs.

Conditions	1 eq	2 eq	3 eq
Quercétine (Q)	70	4	0
Quercétine monométhylée (M)	25 (20, 55, 25)	45 (72, 8, 20)	2 (100, 0, 0)
Quercétine diméthylée (D)	4 (67, 33)	46 (63, 37)	57 (77, 23)
Quercétine triméthylée (T)	0	5	35
Quercétine tétraméthylée (TT)	0	0	5

Tableau II.2 : Méthylation directe de la quercétine dans le DMF à température ambiante

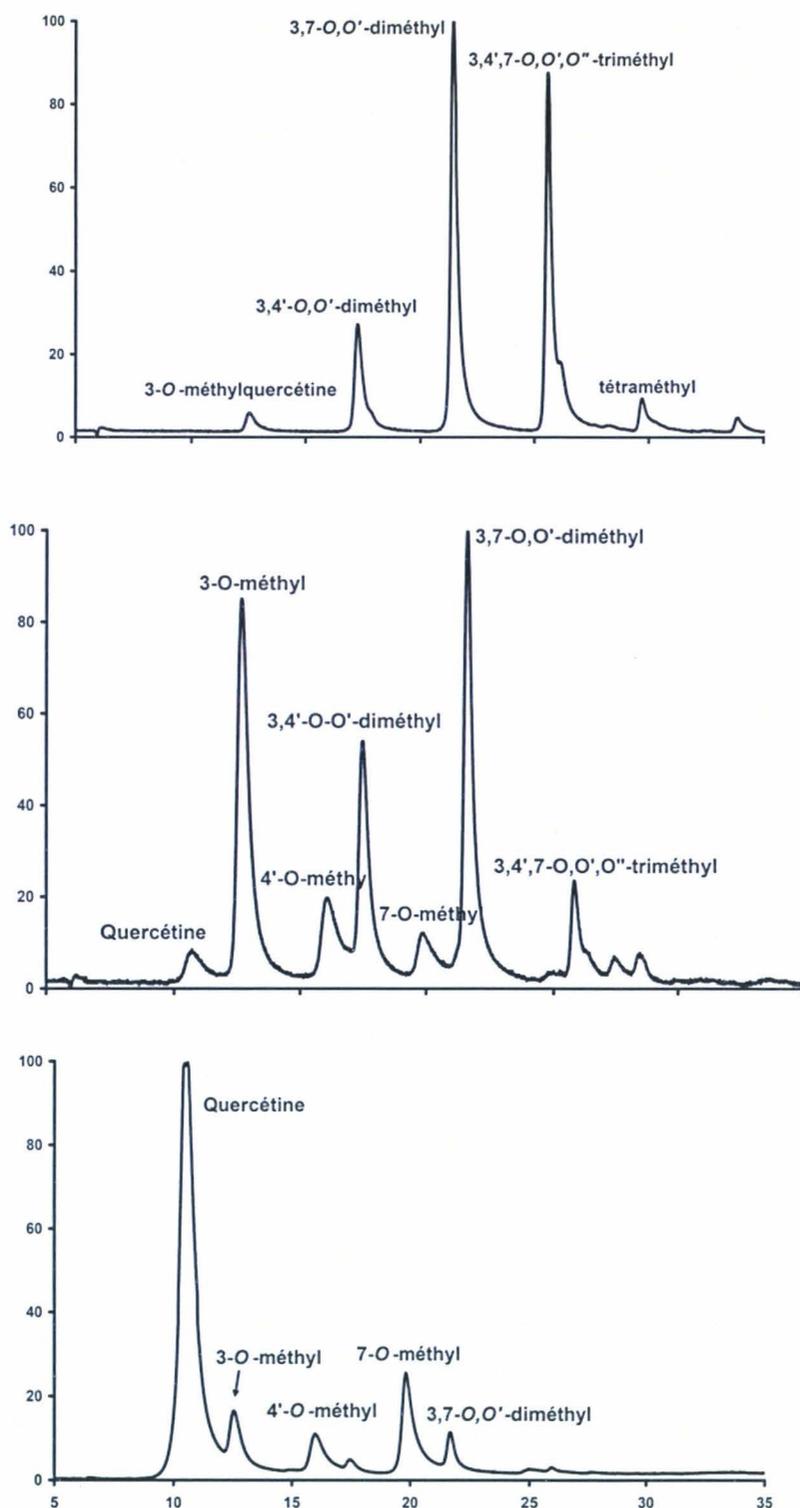


Figure II.10 : Traces UV des mélanges réactionnels obtenus par méthylation directe de la quercétine par l'action de différents nombres d'équivalents de CH_3I . A : un équivalent de réactifs (1 équiv. de CH_3I et 1,25 équiv de K_2CO_3) ; B : deux équivalents de réactifs (2 équiv. de CH_3I et 2,5 équiv de K_2CO_3) ; C : trois équivalents de réactifs (3 équiv. de CH_3I et 3,75 équiv de K_2CO_3).

IV.2. Synthèse d'un métabolite monométhylé : exemple de la 4'-*O*-méthylquercétine

Pour obtenir spécifiquement un dérivé monométhylé de la quercétine, il faut avoir recours à une synthèse en plusieurs étapes ; la stratégie de cette synthèse est basée sur des jeux de protections et de déprotections sélectives des différentes fonctions phénols de la molécule, comme l'illustre le schéma réactionnel ci-dessous (Figure II.11), qui correspond à la préparation sélective du dérivé de la quercétine méthylé en position 4'.

La synthèse de la 4'-*O*-méthylquercétine se prépare en quatre étapes à partir de la quercétine. Dans un premier temps, les deux fonctions phénol du noyau B sont protégées avec le dichlorophénylméthane. Les trois autres fonctions hydroxyles libres sont alors protégées par un groupement benzyle, ce groupement est stable dans les conditions utilisées pour déprotéger le groupement catéchol (noyau B). Après déprotection des deux fonctions -OH du noyau catéchol (acide acétique / H₂O (80/20) à reflux), la réaction de méthylation a lieu. En effet l'action d'un équivalent de CH₃I sur le composé dans le DMF à température ambiante pendant six heures, donne accès au composé 3,7-*O*-dibenzyl-4'-*O*-méthylquercétine **35** avec un rendement de 85 %.

La dernière étape de cette synthèse est la déprotection du composé obtenu ; les deux groupements benzyle sont éliminés par hydrogénolyse en présence d'hydroxyde de palladium dans un mélange EtOH/THF. Le produit désiré, la 4'-*O*-méthylquercétine **36**, est obtenu avec un rendement de 80 %.

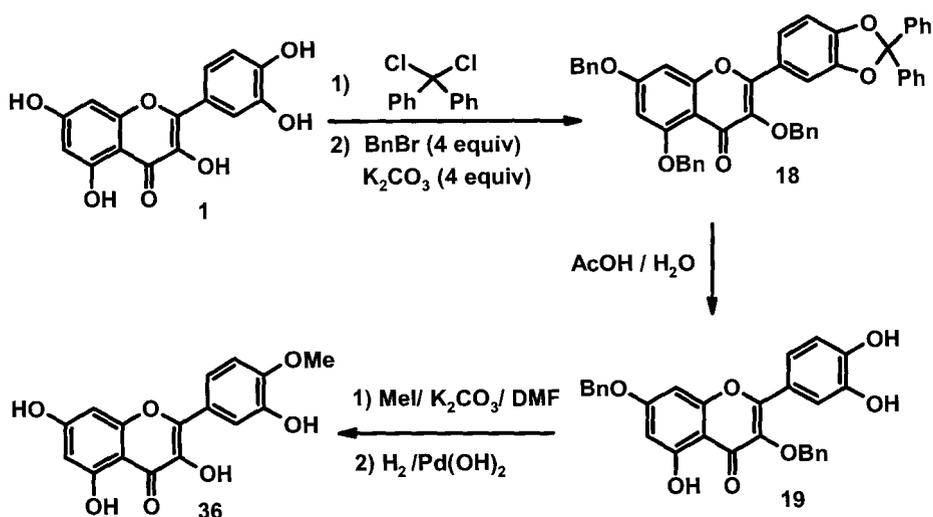


Figure II.11 : Stratégie de synthèse de la 4'-*O*-méthylquercétine.

VI.3. Utilisation d'un mélangeur microfluidique, le Nanomixer™

Le Nanomixer™ de UpChurch Scientific que nous avons utilisé pour ces expériences est construit sur le principe de séparations/recombinaisons (Figures II.12 et II.13). Les deux flux d'entrée A et B sont divisés chacun en 16 sous-flux qui se rencontrent deux par deux avant de reconverger tous ensemble en un flux principal de sortie du Nanomixer™. La taille caractéristique des canaux d'entrée du Nanomixer™ est égale à 75 μm . Ces canaux sont alors divisés en 16 souscanaux de taille caractéristique égale à 4,6875 μm . Pour le système considéré ici, les temps de mélange respectifs peuvent être estimés, avec et sans Nanomixer™. La longueur caractéristique de l'écoulement L est prise égale à 75 μm et le coefficient de diffusion de la quercétine a été pris, dans une première approximation, égal à $10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}^{-1}$. Sans Nanomixer™, le temps de mélange est ainsi d'environ 10 s contre moins de 1 ms si le Nanomixer™ est utilisé.

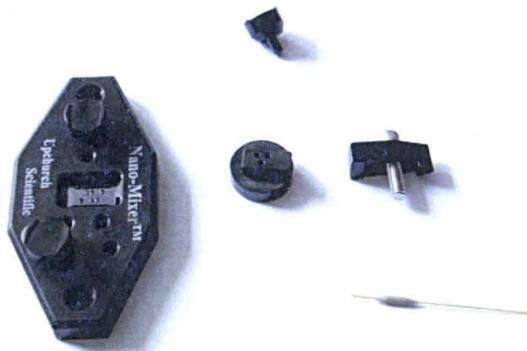


Figure II.12 : Vue éclatée du Nanomixer™



Figure II.13 : Vue agrandie de la puce microfluidique du nanomélangeur

IV.3.1. Optimisation du débit

Avant d'étudier la méthylation de la quercétine dans le nanomixeur nous avons commencé par la méthylation d'un phénol simple ; l'isopropylphénol, afin d'optimiser le débit. Après introduction des réactifs dans les flux A et B, Le mélange réactionnel est récupéré à la sortie du Nanomixeur dans une solution de dichlorométhane. La solution est ensuite analysée par GC/SM afin d'obtenir le rendement de la réaction.

La figure IV.14 présente l'évolution du rendement en fonction du débit. Nous avons obtenu un meilleur rendement en utilisant un débit de 1,5 $\mu\text{L}/\text{min}$

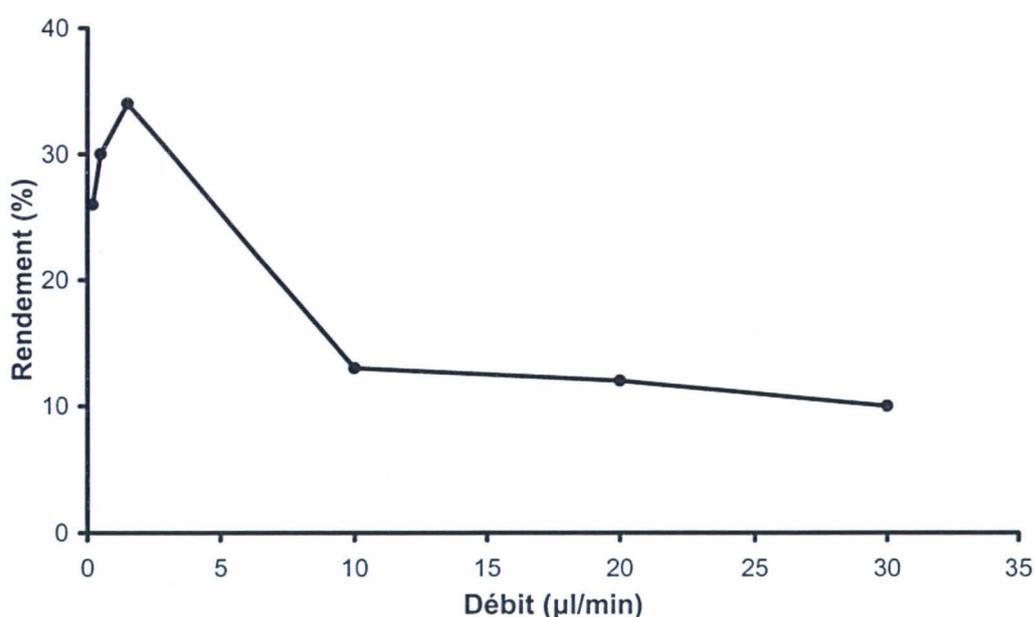


Figure II.14 : Optimisation du débit

IV.3.2. Protocole opératoire

Pour les expériences à l'échelle microfluidique, la réaction de méthylation de la quercétine a été effectuée dans un microréacteur.^[22] Ce microréacteur consiste en un capillaire standard de diamètre interne égal à 75 μm et de 15 cm de longueur. Comme nous l'avons vu précédemment, un mélangeur (Nanomixer™) est placé en amont du capillaire réactionnel afin de favoriser le mélange entre les différents réactifs (Figure II.15). Les réactifs sont introduits à débit fixé, à l'aide de deux pousse-seringues, dans les flux A et B, en entrée du Nanomixer™ (Figure II.16); pour les expériences décrites ici, le débit a été fixé à 1,5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Les différents réactifs, base, quercétine, agent alkylant (iodure de méthyle CH_3I) sont introduits dans les flux A et B, selon toutes les combinaisons possibles (Tableau II.3). Les conditions expérimentales sont alors légèrement changées par rapport à la réaction initiale de méthylation de la quercétine effectuée dans de la verrerie classique. La base initiale K_2CO_3 est remplacée par le DBU qui se dissout plus facilement dans le DMF (K_2CO_3 en suspension dans le DMF a tendance à boucher les capillaires et les microcanaux du NanoMixer).

Le mélange réactionnel est recueilli en sortie de capillaire et analysé ensuite par ESI-SM afin de déterminer la nature du ou des produit(s) formé(s), de même que dans des conditions de réaction classique (verrerie conventionnelle). Une analyse LC-SM/SM permet en plus de déterminer les proportions relatives des différents produits obtenus et détectés en ESI-SM.

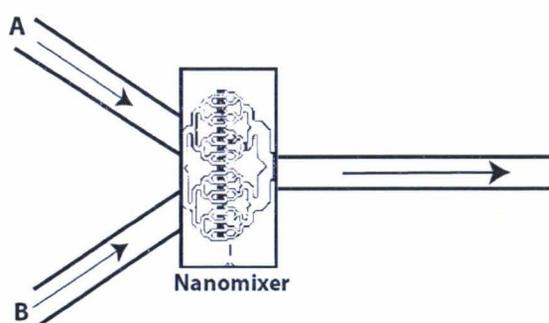


Figure II.15 : Schéma du montage utilisé : le NanoMixer™ UpChurch Scientific est placé en amont du capillaire réactionnel.



Figure II.16 : Photographie du montage avec les deux pousse-seringues qui alimentent le NanoMixer™.

IV.3.3. Résultat

Les résultats pour ces expériences sont rassemblés dans le tableau ci-dessous (Tableau II.3), pour les différents cas de figure d'introduction des réactifs.

Flux A	Flux B	Produits formés
CH ₃ I Quercétine	DBU	3- <i>O</i> -MéthylQuercétine
DBU Quercétine	CH ₃ I	Mélange
Quercétine	DBU CH ₃ I	4'- <i>O</i> -Méthylquercétine

Tableau II.3 : Méthylation de la quercétine à l'échelle microfluidique : composition en réactifs des flux A et B et produits formés dans les différents cas de figure.

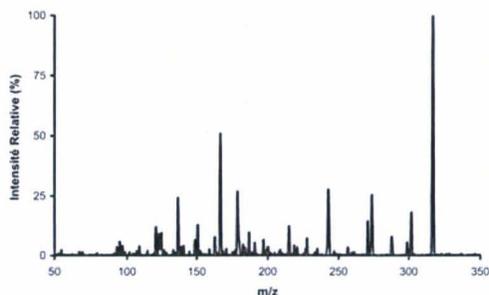
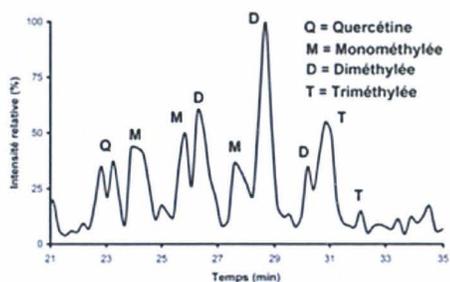
Dans le premier cas, la quercétine est introduite avec l'agent alkylant, et la réaction donne lieu à un composé unique monométhylé, la 3-*O*-méthylquercétine. Seule la réaction de méthylation la plus rapide se produit : la méthylation sur la position 3 de la quercétine.

Dans le deuxième cas, la quercétine et la base cohabitent dans le même flux ; un équilibre acido-basique s'établit, et la quercétine existe sous forme déprotonée, sur différentes fonctions -OH. Ainsi, lorsque la quercétine rencontre l'agent alkylant, la réaction de méthylation se produit sur différentes positions hydroxyles et elle conduit à l'obtention d'un mélange complexe de produits mono- et diméthylés, comme lorsque la réaction est effectuée dans de la verrerie classique.

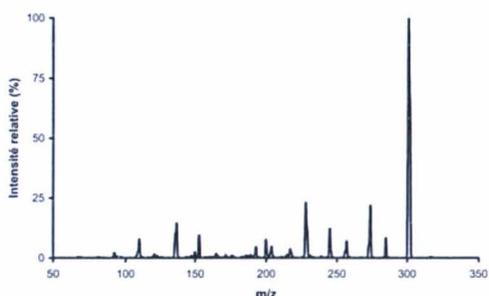
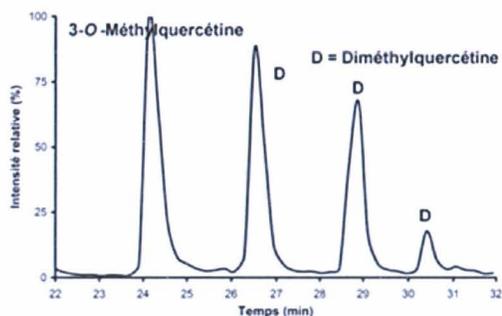
Dans le dernier cas, la base est introduite en mélange avec l'agent alkylant. Dans ce cas, seul un composé monométhylé se forme, la 4'-*O*-Méthylquercétine.

En effet, nous avons observé que l'agent alkylant formait avec la base organique utilisée un complexe très stable qui attaque la molécule de quercétine de façon spécifique, en position 4'.

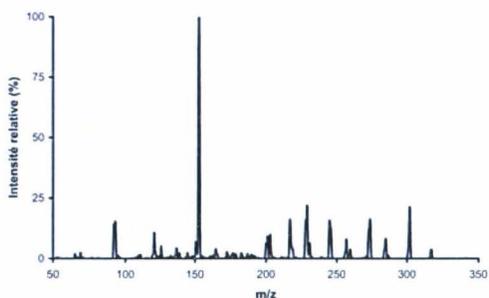
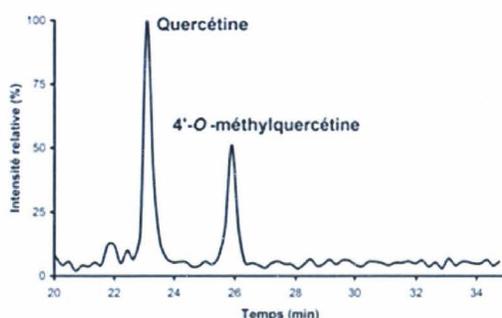
La figure ci-dessous (Figure II.17) présente les résultats obtenus lors de l'analyse LC-ESI-SM/SM : les traces MS de la séparation du mélange réactionnel recueilli en sortie de capillaire réactionnel, ainsi que les spectres de fragmentation du composé obtenu de façon majoritaire.



Flux A : Quercétine
Flux B : CH₃I + Base



Flux A : Quercétine + CH₃I
Flux B : Base



Flux A : Quercétine
Flux B : CH₃I + Base

Figure II.17 : Résultats obtenus lors de l'analyse LC-ESI-MS/MS des mélanges réactionnels recueillis en sortie de microréacteur.

IV.3.2. Discussion

Pour une réaction bimoléculaire de réactifs à des concentrations égales, le temps de réaction est défini par l'équation ci-dessous et il est estimé à 1s pour la réaction d'alkylation.

$$t_c = \frac{1}{kC_0}$$

Le temps de mélange (~ 1 ms) est plus court devant celui de réaction. La réaction observée est donc la réaction la plus rapide ; le système est sous contrôle cinétique.

D'après les études d'acidité des différentes fonctions phénol de la molécule de quercétine, l'ordre décroissant d'acidité des fonctions phénol considérées (4', 3 et 7) est le suivant : $7 > 3 \gg 4'$. Les concentrations en anions relatives pour ces fonctions sont donc, par ordre décroissant $7 > 3 \gg 4'$.^[21] Par ailleurs, la réaction d'alkylation de phénols dans le DMF a une constante de Hammett négative ($\rho \sim -1$).^[23] L'ordre de réactivité des fonctions phénol considérées est donc le suivant : $4' \gg 3 > 7$. Par conséquent, la réactivité cinétique de notre système, dans le cas d'un bon mélange, est gouvernée selon l'ordre décroissant $3 > 7 > 4'$.

Dans le DMF, la quercétine en présence de DBU est pratiquement entièrement sous forme monodéprotonée en positions 7 (majoritaire) et 3 (minoritaire), comme le montrent les études RMN ^{13}C .^[24, 25] La constante de Hammett de la réaction d'alkylation des phénols étant approximativement égale à -1 , la position cinétiquement privilégiée est la position 3 (cas 1). Dans le NanomixerTM, la réaction d'alkylation est rapide devant la réaction acido-basique d'échange de protons entre les molécules de quercétine déprotonée et de quercétine méthylée. Seule la monoalkylation spécifique sur la position la plus réactive est observée. Au contraire, en solution, la réaction d'alkylation est lente devant la réaction acido-basique ce qui conduit à un mélange de produits méthylés (cas 2). L'obtention spécifique du dérivé méthylé en position 4' s'explique par la formation d'un intermédiaire entre le DBU et l'agent alkylant, comme nous l'avons déjà évoqué ci-dessus (cas 3).

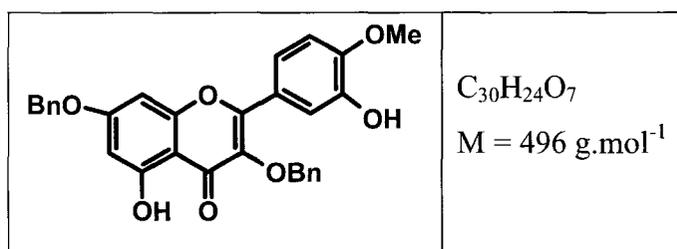
V. Conclusion

Ces expériences réalisées avec un microsystème commercial montrent l'influence considérable des conditions de mélange sur les produits obtenus. Les microsystèmes permettent de descendre à des temps de mélange très faibles de l'ordre de la seconde voire de la milliseconde tout en restant à des échelles préparatives (typiquement quelques millimoles de produit formées pour une nuit de réaction en continu). L'étape future serait le développement de microréacteurs incluant un module de contrôle thermique du milieu réactionnel et des possibilités de chauffage ou refroidissement rapide du milieu réactionnel.

VI. Partie expérimentale

VI.1 Synthèse de la 4'-*O*-méthylquercétine

VI.1.1 3,7-bisbenzyloxy-2-(3-hydroxy-4-méthoxyphényl)-5-hydroxychromen-4-one (35).



Mode opératoire :

Dans un ballon, de 100 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon, on introduit (1,00 g, 2,07 mmoles) du 3,7-bisbenzyloxy-2-(3,4-dihydroxyphényl)-5-hydroxychromen-4-one (**19**) dissout dans 25 mL de DMF. On purge avec de l'argon durant 10 minutes. On ajoute (0,13 mL, 2,07 mmoles) d'iodure de méthyle et (0,34 g, 2,5 mmoles) de carbonate de potassium. La solution est agitée à température ambiante pendant 16 heures. Le milieu réactionnel est dilué avec 100 mL d'acétate d'éthyle et la vé deux fois avec 70 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. La purification du produit est effectuée par chromatographie sur colonne de silice en utilisant comme éluant un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole à 40/60.

Rendement : 90%

Analyses :

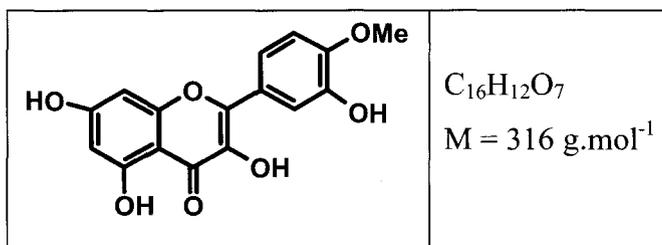
Point de fusion : 144-146°C.

RMN ^1H (CDCl_3) : 3,95 (s, 3 H, OCH_3); 5,05 (s, 2 H, OCH_2Ph); 5,12 (s, 2 H, OCH_2Ph); 6,43 (d, $J = 2,0$ Hz, 1 H, aromatique H); 6,51 (d, $J = 2,0$ Hz, 1 H, aromatique H); 6,88(d, $J = 8,6$ Hz, 1 H, aromatique H); 7,26-7,45 (m, 10 H, aromatiques H); 7,58-7,65 (m, 2 H, aromatiques H).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 56,0 (OCH_3); 70,4 (OCH_2Ph); 74,2 (OCH_2Ph); 93,0; 98,6; 106,2; 110,1; 115,2; 122,0; 123,6; 127,5; 128,2; 128,3; 128,5; 128,7; 128,8; 135,8; 136,4; 137,5; 145,3; 148,7; 156,4; 156,7; 162,0; 164,4; 178,8 (C=O).

Microanalyse: Calculé pour C₃₀H₂₄O₇ (496,52) : C, 72,57; H, 4,87; O, 22,56;
Mesuré : C, 72,27; H, 4,57; O, 22,61.

VI.1.2. 2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one (4'-O-méthylquercétine) (36).



Mode opératoire :

Dans un ballon de 100 mL, on introduit sous agitation magnétique, (0,6 mmoles, 0,30, g) de 3,7-bisbenzyloxy-2-(3',4'-bisbenzyloxyphényl)-5-méthoxychromen-4-one (**35**), 30 mL de THF; 30 mL d'éthanol et 0,06 mmoles d'hydroxyde de palladium sur charbon à 20%. On soumet le milieu réactionnel à une légère surpression d'hydrogène à l'aide d'un ballon de baudruche. La solution est agitée à température ambiante durant 12 heures. On filtre sur Célite 545 et on rince à l'éthanol. Le filtrat est concentré sous vide et le solide recristallisé dans le méthanol donne un solide jaune.

Rendement : 80%

Analyses :

Point de fusion : 252-254°C (Lit. 253-256°C)^[26]

RMN ¹H ([D₆]DMSO) : 3,81 (s, 3 H, OCH₃); 6,17 (s, 1 H, aromatique H); 6,41 (s, 1 H, aromatique H); 7,03 (d, *J* = 8,6 Hz, 1 H, aromatique H); 7,60 (d, *J* = 8,6 Hz, 1 H, aromatique H); 7,63 (s, 1 H, aromatique H).

RMN ¹³C ([D₆]DMSO) : 55,9 (OCH₃); 93,5; 98,3; 102,9; 111,6; 114,4; 119,8; 123,3; 136,0; 146,0; 146,2; 149,3; 156,2; 160,6; 164,2; 175,79 (C=O).

VII. Références bibliographiques

- [1] Fletcher, P.D.I.; Haswell, S.J.; Pombo-Villar, E.; Warrington, B.H.; Watts, P.; Wong, S.Y.F.; Zhang, X. **Micro reactors: principles and applications in organic synthesis.** *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4735-4757.
- [2] Watts, P.; Haswell, S.J. **The application of micro reactors for organic synthesis.** *Chemical Society Reviews* **2005**, *34*, 235-246.
- [3] Arkilic, E.B.; Breuer, K.S.; Schmidt, M.A. **Mass flow and tangential momentum accommodation in silicon micromachined channels.** *Journal of Fluid Mechanics* **2001**, *437*, 29-43.
- [4] Maurer, J.; Tabeling, P.; Joseph, P.; Willaime, H. **Second-order slip laws in microchannels for helium and nitrogen.** *Physics of Fluids* **2003**, *15*, 2613-2621.
- [5] Perkins, T.T.; Smith, D.E.; Chu, S. **Single polymer dynamics in an elongational flow.** *Science (Washington, D. C.)* **1997**, *276*, 2016-2021.
- [6] Ehrfeld, W.; Hessel, V., (Institut fuer Mikrotechnik Mainz G.m.b.H., Germany).
Application: WO
WO, **2001**, p. 36 pp.
- [7] Lowe, H.; Ehrfeld, W. **State-of-the-art in microreaction technology: concepts, manufacturing and applications.** *Electrochimica Acta* **1999**, *44*, 3679-3689.
- [8] Leamon, J.H.; Lee, W.L.; Tartaro, K.R.; Lanza, J.R.; Sarkis, G.J.; deWinter, A.D.; Berka, J.; Lohman, K.L. **A massively parallel PicoTiterPlate based platform for discrete picoliter-scale polymerase chain reactions.** *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3769-3777.
- [9] Woolley, A.T.; Lao, K.; Glazer, A.N.; Mathies, R.A. **Capillary Electrophoresis Chips with Integrated Electrochemical Detection.** *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 684-688.
- [10] Bousse, L.; Mouradian, S.; Minalla, A.; Yee, H.; Williams, K.; Dubrow, R. **Protein sizing on a microchip.** *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 1207-1212.
- [11] Lion, N.; Rohner, T.C.; Dayon, L.; Arnaud, I.L.; Damoc, E.; Youhnovski, N.; Wu, Z.-y.; Roussel, C.; Jossierand, J.; Jensen, H.; Rossier, J.S.; Przybylski, M.; Girault, H.H. **Microfluidic systems in proteomics.** *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3533-3562.
- [12] Marko-varga, G.; Nilsson, J.; Laurell, T. **New directions of miniaturization within the proteomics research area.** *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3521-3532.

- [13] Mouradian, S. **Lab-on-a-chip: applications in proteomics.** *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, *6*, 51-56.
- [14] Oleschuk, R.D.; Harrison, D.J. **Analytical microdevices for mass spectrometry.** *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* **2000**, *19*, 379-388.
- [15] Wiles, C.; Watts, P.; Haswell, S.J.; Pombo-Villar, E. **The preparation and reaction of enolates within micro reactors.** *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10757-10773.
- [16] Ueno, M.; Hisamoto, H.; Kitamori, T.; Kobayashi, S. **Phase-transfer alkylation reactions using microreactors.** *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)* **2003**, 936-937.
- [17] Hisamoto, H.; Saito, T.; Tokeshi, M.; Hibara, A.; Kitamori, T. **Fast and high conversion phase-transfer synthesis exploiting the liquid-liquid interface formed in a microchannel chip.** *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)* **2001**, 2662-2663.
- [18] Bayer, T.; Pysall, D.; Wachsen, O. **Micro mixing effects in continuous radical polymerization.** *Microreaction Technology: Industrial Prospects, Proceedings of the International Conference on Microreaction Technology, 3rd, Frankfurt, Apr. 18-21, 1999* **1999**, 165-170.
- [19] Ehrfeld, W.; Golbig, K.; Hessel, V.; Loewe, H.; Richter, T. **Characterization of Mixing in Micromixers by a Test Reaction: Single Mixing Units and Mixer Arrays.** *Industrial & Engineering Chemistry Research* **1999**, *38*, 1075-1082.
- [20] Bessoth, F.G.; deMello, A.J.; Manz, A. **Microstructure for efficient continuous flow mixing.** *Analytical Communications* **1999**, *36*, 213-215.
- [21] Bouktaib, M.; Lebrun, S.; Atmani, A.; Rolando, C. **Hemisyntesis of all the O-monomethylated analogues of quercetin including the major metabolites, through selective protection of phenolic functions.** *Tetrahedron* **2002**, *58*, 10001-10009.
- [22] Kajjout, M.; Rolando, C.; Le Gac, S. **Microreactors for selective organic reactions.** *Special Publication - Royal Society of Chemistry* **2004**, *297*, 267-269.
- [23] Chantooni, M. K., Jr.; Kolthoff, I. M. **Comparison of substituent effects on dissociation and conjugation of phenols with those of carboxylic acids in acetonitrile, N,N-dimethylformamide, and dimethyl sulfoxide.** *Journal of Physical Chemistry*, **1976**, *80*, 1306-10.
- [24] Cren-Olive, C.; Wieruszkeski, J. M.; Maes, E.; Rolando, C. **Catechin and epicatechin deprotonation followed by ¹³C NMR.** *Tetrahedron Letters*, **2002**, *43*, 4545-4549.

- [25] Cren-Olive, C.; Hapiot, P.; Pinson, J.; Rolando, C. **Free radical chemistry of flavan-3-ols: determination of thermodynamic parameters and of kinetic reactivity from short (ns) to long (ms) time scale.** *Journal of the American Chemical Society*, **2002**, *124*, 14027-14038.
- [26] Le Quesne, P.W.; Levery, S.B.; Menachery, M.D.; Brennan, T.F.; Raffauf, R.F. **Antitumor plants. Part 6. Novel modified germacranolides and other constituents of *Eremanthus elaeagnus* Schultz-Bip (Compositae).** *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)* **1978**, 1572-1570.

Chapitre III : Chimie de surface pour cible MALDI

I. Introduction

Avec l'essor des microsystèmes et des nanotechnologies, le développement de protocoles de chimie de surface apparaît indispensable.^[1, 2] En effet, lorsque les tailles caractéristiques des objets diminuent, le rapport surface-sur-volume augmente en $1/r$. Par conséquent, les surfaces prennent une importance relative et les phénomènes de surface deviennent prépondérants. Ainsi, la miniaturisation des objets et des systèmes analytiques (par exemple, le développement de puces de criblage ou de microcapteurs), va de pair avec une nécessité de traiter les surfaces pour éviter les phénomènes indésirables (adsorption non spécifique) et tirer profit de l'importance relative des surfaces. Deux types de chimies de surface se distinguent : une chimie statique et une chimie dynamique. La première consiste en une simple immobilisation de molécules alors que pour la deuxième, les propriétés de la surface et de fonctionnalisation changent en réponse à un quelconque stimulus extérieur (changement de température, de pH, application d'une tension...). Si cette fonctionnalisation^[3, 4] s'allie, en outre, à la microtechnologie il est possible de créer des motifs dans cette couche de fonctionnalisation de surface, en utilisant plusieurs types de molécules, qui sont déposées successivement en surface. Les procédés microtechnologiques reposent sur l'utilisation d'un tampon en PDMS pour faire du micro-contact printing ou sur celle de photolithographie à l'aide d'une résine.

Le but de ce chapitre est le développement de systèmes intégrés pour la préparation d'échantillons biologiques avant leur analyse par MALDI-TOF. Les étapes de préparation des échantillons sont réalisées sur la cible MALDI elle-même, ces étapes pouvant être le dessalage d'échantillons peptidiques, le piégeage sélectif de protéines données ou la digestion trypsique des protéines pour donner un mélange de peptides. A cette fin, il est nécessaire de fonctionnaliser les plots de la cible MALDI avec une phase stationnaire appropriée. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés au développement d'une fonctionnalisation en volume de la surface à l'aide de brosses de polymère, réticulé ou non réticulé. La composition du polymère est choisie en fonction de l'application visée. Ainsi, nous avons utilisé des monomères ayant une fonctionnalisation hydrophobe pour des applications de dessalage et des monomères comprenant un groupement réactif (cycle époxy) permettant l'ancrage ultérieur d'une protéine, soit une enzyme protéolytique (trypsine), soit un anticorps pour des applications de digestion ou de piégeage sélectif de protéines.

II. Généralités sur les microsystèmes

L'appellation « microsysteme » désigne tout système miniature dédié, ici, à une application analytique ou chimique. Les tailles caractéristiques de ces microsystèmes diffèrent selon le type d'application. Pour des applications biologiques, les dimensions caractéristiques de ces dispositifs sont de l'ordre du micron.^[5] Ces microsystèmes sont issus de procédés de fabrication de la microtechnologie, développés à l'origine pour l'industrie microélectronique, ce qui explique l'utilisation du préfixe « micro » pour les désigner. Les procédés et techniques utilisés pour la fabrication des microsystèmes sont adaptés à la fabrication de structures ayant des dimensions caractéristiques de l'ordre du micron, en raison de leur résolution de fabrication inférieure au millimètre, et pouvant atteindre les quelques dizaines de nanomètres.

II.1. Caractéristiques de l'échelle du micron

Comme nous l'avons vu dans le précédent chapitre, à l'échelle du micron, l'écoulement des fluides est entièrement laminaire. Au contraire, à l'échelle macroscopique, il est turbulent, ce qui se traduit par l'apparition de perturbations locales dans le volume de liquide. Par conséquent, à l'échelle de quelques microns, le flux de liquide est plus homogène et mieux contrôlé dans son ensemble du fait de l'absence de turbulences locales.

Une autre caractéristique inhérente à ces petites structures est la prépondérance des surfaces et des phénomènes de surface. Le rapport surface-sur-volume varie en $1/r$ il résulte donc de la miniaturisation un fort accroissement de ce rapport, qui confère aux surfaces une importance toute relative. Ceci se traduit, en particulier, par un accroissement de l'aire d'échange entre la solution et la surface et par conséquent, des interactions entre composés et surface. Ces interactions peuvent être néfastes avec une adsorption non spécifique intense des composés sur les surfaces et de ce fait, leur perte. En général, pour des applications mettant en jeu un échange entre solutions et surface, une fonctionnalisation de surface et non plus en volume, peut être suffisante.

II.2. Matériaux et microfabrication

Les choix du matériau et du procédé de fabrication sont fortement conditionnés par l'application future du système. Les matériaux utilisés le plus couramment sont le silicium,^[6-8] le verre,^[9, 10] les métaux et les polymères.^[11-13] Le matériau sélectionné pour la fabrication

d'un microsystème donné doit posséder des propriétés physico-chimiques correspondant à l'application. Les procédés de la microfabrication sont basés sur ceux utilisés en microélectronique, et englobent les technologies de croissance, de gravure, de dépôt et d'assemblage. Les premières techniques utilisées ont été la photolithographie, le dépôt de monocouches et la gravure de surface. Récemment, le domaine des microfabrications s'est élargi avec l'apparition de nouveaux matériaux,^[14] non issus de l'héritage microélectronique et celle de nouveaux procédés de fabrication qui leur sont associés pour la préparation de nouveaux types de systèmes.

II.2.1. Matériaux

II.2.1.1. Silicium

Le silicium est le matériau le plus largement répandu dans le secteur de la microélectronique pour la fabrication des microsystèmes. Ses propriétés semi conductrices, ses excellentes propriétés mécaniques, sa très bonne résistance chimique et thermique ont fait du silicium le matériau standard. L'oxydation de sa surface ou la modification de cette dernière à l'aide d'un traitement chimique approprié est aisée, les traitements de surface reposent le plus souvent sur la création de liaisons silanes sur les groupements silanols présents en surface. Un inconvénient majeur de ce matériau est le fait qu'il n'est pas transparent que ce soit dans le visible ou dans l'UV.

II.2.1.2. Verres

Les verres sont transparents en UV, et leur surface est facilement modulable grâce à la présence des fonctions silanols. Ils ont une bonne résistance aussi bien thermique que chimique et ce sont des matériaux biocompatibles. Cependant, les verres sont d'avantage fragiles et même encore onéreux pour une production en masse à moindre coût. Du point de vue de la microfabrication le verre se prête moins bien aux procédés de microtechnologies que les matériaux à base de silicium. Les structures obtenues sont moins belles et moins propres car la gravure par voie chimique du verre ne génère pas des parois parallèles.

II.2.1.3. Polymères

L'avantage de l'utilisation de matériaux de types polymères, réside dans leur moindre coût, dans la facilité de mise en œuvre, et dans la vaste gamme de matériaux disponibles. L'intérêt de cette alternative macromoléculaire est donc une production d'objets (jetables) à usage unique. De plus, cette famille de matériaux est étendue et tous types de propriétés sont accessibles : transparence, bonnes propriétés d'adhésion. Par contre, leur conductivité thermique est limitée, ils ne sont pas stables à haute température et ils se dissolvent plus facilement dans les solvants organiques. Ceci explique qu'ils sont plus facilement utilisés pour des applications biologiques que chimiques pures.

II.2.2. Procédés de fabrication

Les procédés de fabrication utilisés sont intimement liés au choix du ou des matériaux constituant le microsystème. Celui-ci est ainsi conditionné par la nature du matériau, le coût de fabrication, la durée de processus de fabrication, sa fiabilité, sa résolution et enfin la facilité d'accès à ces procédés. Les grands procédés de fabrication sont la lithographie, les procédés de gravure chimique ou physique des matériaux, les méthodes de moulage ou d'empreinte sur des matrices...

II.2.2.1. Photolithographie

La photolithographie^[15] est une technique qui permet la préparation de structures multicouches. Elle consiste à transférer les motifs désirés sur un substrat. La technique nécessite d'abord la fabrication d'un masque avec les motifs que l'on souhaite transférer. Ensuite, une couche de résine sensible au rayonnement UV est appliquée sur le support. La résine est irradiée à travers le masque durant un temps déterminé. A la fin, le substrat est immergé dans un révélateur pour « développer » l'image transférée. Les résines utilisées dans cette technologie sont de nature macromoléculaire et peuvent être de type positif ou négatif.

II.2.2.2. Gravure

L'étape de gravure est fondamentale en usinage de volume. Des exemples typiques sont la gravure humide du silicium dans un mélange acide fluorhydrique, acide nitrique et éthanol

ou encore la gravure humide du verre dans de l'acide fluorhydrique. La gravure humide isotropique présente plusieurs inconvénients : le contrôle délicat du profil dû à la forte influence de l'agitation et l'isotropie qui limite fortement la résolution et la profondeur accessible.

La gravure humide anisotropique du silicium^[16] dans des solutions comme l'hydroxyde de potassium (KOH) ou le l'hydroxide de tetramétyle ammonium (TMAH) permet de créer des motifs définis par les plans d'orientations cristallographiques du silicium. Ce procédé, associé à des techniques de contrôle de la fin de la gravure (géométrique, électrochimique, implantation de bore) permet de réaliser simplement des membranes très fines ou des structures suspendues. Cependant, il est impossible de réaliser certaines formes simples comme un trou circulaire et les produits chimiques utilisés sont relativement agressifs.

II.2.2.3. La technologie en PDMS

Le tampon en PDMS est utilisé pour des applications de fonctionnalisation de surface, avec la création de monocouches organisées de molécules ou SAMs pour Self-Assembled Monolayers (Figure III.1).^[17-19] le tampon est trempé dans une solution de composés. Après mise en contact du tampon avec la surface, les composés sont adsorbés sur la surface à fonctionnaliser selon des motifs bien définis.

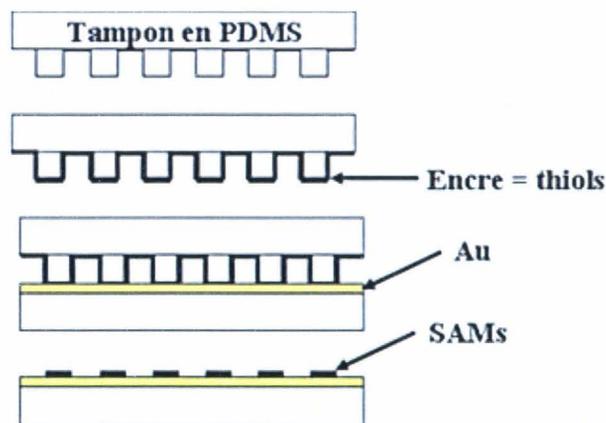


Figure III.1 : principe de procédé d'élaboration de SAMs à base de thiols sur une surface d'or.

Les couches de molécules chimiosorbées présentent un fort degré d'organisation et une épaisseur typique de quelques nanomètres, 2-3 nm. Cette épaisseur peut être très finement

ajustée, à 0,1 nm près, avec l'ajout d'un groupement méthylène.^[20] La fonctionnalité de la surface est donnée par le groupement présent à la surface. Ainsi, cette technique est couramment utilisée pour créer une balance hydrophile/hydrophobe sur une surface. Le plus souvent, les composés utilisés sont des thiols, adsorbés sur des surfaces métallisées d'or, platine, argent^[19, 21]... Les monocouches organisées peuvent servir de masques car elles résistent à l'attaque de solutions chimiques de gravure.^[22-24]

Le même type de moules en PDMS peut aussi servir à la fabrication de structures en polymère organique rigide. La réplique par moulage permet la production de structure en polymère organique par coulage sur la matrice en PDMS et cuisson photochimique.

III. Traitement de surface

Le choix de la chimie de greffage dépend de plusieurs paramètres tels que l'application visée (type d'interaction), et le type du matériau utilisé (métal, silicium, verre...). De façon générale, on introduit souvent une couche d'interface qui sépare le support de la zone biospécifique, appelée aussi bras espaceur. Il peut s'agir de monocouches de molécules organiques ou inorganiques. Cette couche permet de modifier directement les propriétés physico-chimiques de surface du support par l'introduction des chaînes de polymères. Ces molécules sont le plus souvent fonctionnelles (une fonction spécifique à l'extrémité de la chaîne) et apportent les propriétés souhaitées à la surface : hydrophobicité, hydrophilie, compatibilité biochimique.

Dans ce chapitre, nous nous sommes uniquement intéressés à des surfaces d'or sur lesquelles sont immobilisés des composés de type thiols. Néanmoins, la chimie mise en œuvre et décrite ici, peut être appliquée à d'autres types de surfaces si l'ancre est changée et adaptée à un autre type de surface. Deux approches ont été testées : (i) un traitement de surface pour créer une balance hydrophile/hydrophobe, par exemple, (ii) une fonctionnalisation en volume ou en épaisseur avec la création d'une couche de polymère sur la monocouche organisée immobilisée sur la surface. La molécule immobilisée en surface se compose de trois parties: (i) l'ancre qui interagit directement avec la surface, (ii) un bras espaceur et (iii) une tête ou groupement de surface qui confère à la surface ses propriétés finales, ainsi que l'illustre le schéma ci-dessous (Figure III.2). Il est aussi possible de modifier séparément la nature des différentes composantes de la molécule suite au changement de la nature du support ou de la fonctionnalité désirée pour la monocouche immobilisée sur la surface.

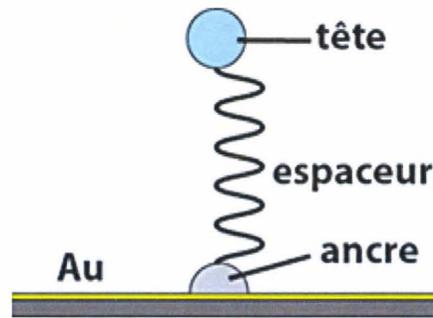


Figure III.2 : Composition des molécules immobilisées.

III.1. Monocouches autoassemblées sur substrat métallique

Des surfaces homogènes peuvent être réalisées par « auto-assemblage » de monocouches organiques (Self Assembled Monolayer, SAMs).^[25, 26] Ce processus se produit à l'interface solide/liquide, par adsorption de molécules à partir d'une solution, en donnant lieu à des assemblages moléculaires qui peuvent être très ordonnés (Figure III.3).

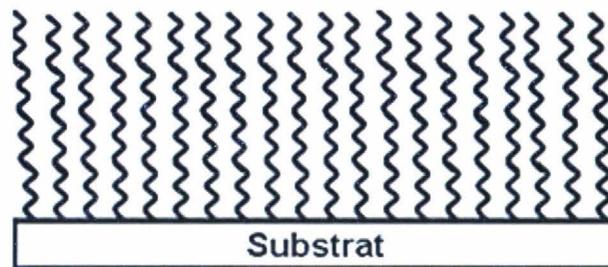


Figure III.3 : Monocouches autoassemblées SAMs sur substrat métallique.

Sous des conditions adéquates (nature et propriétés des solvants, température de la solution) les monocouches se forment spontanément, dans un temps compris entre quelques minutes et plusieurs heures, par simple immersion d'un substrat solide dans une solution de molécules actives. Ces molécules sont généralement constituées d'une longue chaîne carbonée terminée par deux groupements chimiques : l'un a une affinité marquée avec la surface (groupement réactif), l'autre a des fonctions chimiques spécifiques qui seront celles de l'interface organique (groupement fonctionnel).

Par simple variation des groupements réactifs et fonctionnels des molécules, on peut réaliser des surfaces aux fonctionnalités chimiques contrôlées. Ces propriétés remarquables font des SAMs des systèmes modèles pour l'étude des phénomènes interfaciaux tels que le

mouillage, l'adhésion et la lubrification. Ces monocouches ont aussi trouvé une large application en biologie puisqu'elles peuvent être fonctionnalisées avec des molécules biologiquement actives.

III.1.1. SAMs sur supports en or

III.1.1.1 : Avantage de l'or

Depuis la fin des années 80,^[27] il est connu que les alcanethiols peuvent se chimiosorber sur une surface d'or et ainsi former des monocouches auto-organisées.^[27, 28] L'avantage des supports en or est surtout la capacité de ces molécules de type thiols à s'organiser en une couche uniforme et géométrique en surface. De plus, l'or est assez inerte, il ne se forme pas d'oxydes sur sa surface dans les conditions normales, contrairement au cuivre et à l'argent par exemple. Il est également le substrat le plus couramment utilisé dans différentes techniques spectroscopiques et analytiques (spectroscopie SPR, MALDI et l'ellipsométrie par exemple), et il est compatible avec les cellules et les protéines qui peuvent y adhérer et être fonctionnalisées sans toxicité. On peut noter aussi que l'or se prête bien à la réalisation de microsystèmes par les techniques de la microélectronique. Des microsystèmes présentant des disques d'or de taille 400 ou 800 microns (Figure III.4) ont été développés au laboratoire en partenariat avec l'IEMN.

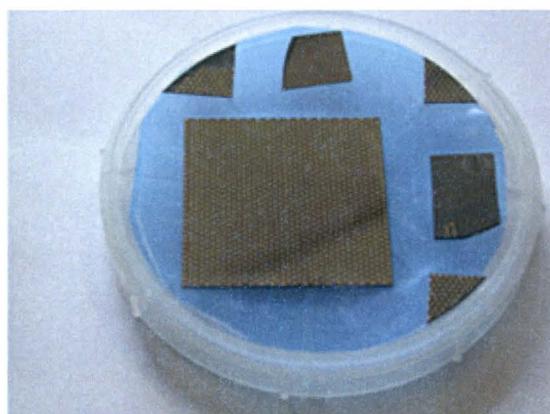


Figure III.4 : Microsystèmes à base d'or.

III.1.1.2 : Les monocouches auto-assemblées sur une surface d'or

Les monocouches auto-assemblées se divisent en deux classes principales : la première formée de thiols, sulfures ou disulfures adsorbés sur un métal pur tel que l'or, l'argent, le cuivre, ou le platine, et la deuxième faite de silanes le plus souvent sur un oxyde de Si ou d'Al. Dans les deux cas l'interaction de la molécule avec le substrat est une liaison covalente, ce qui confère une grande stabilité à la monocouche. En plus, les interactions entre les molécules elles-mêmes, qui peuvent être de nature covalente ou non-covalente selon la nature chimique de la molécule, accroissent la stabilité de la structure.

Dans ce travail nous nous sommes uniquement intéressés aux monocouches auto-assemblées d'alcanethiols sur un substrat d'or polycristallin. Dans ce cas l'interaction entre la molécule de thiol (R-SH) et la surface d'or, porterait à la formation d'une liaison S-Au, ayant une énergie de l'ordre de 40-50 kcal/mol,^[29] et dont le mécanisme de formation est encore controversé. Des études de nature cinétique ont mis en évidence que ce processus d'auto-assemblage se déroule en deux phases distinctes : dans une phase initiale le thiol se lie au substrat d'or, sans ordre d'orientation précise, et dans une deuxième phase, qui représente l'étape lente du mécanisme, les chaînes alkyles de la molécule se réorganisent en établissant des interactions intermoléculaires de van der Waals, les unes avec les autres, qui confèrent ordre et stabilité à la monocouche.^[30]

III.1.2. Traitement de surface

Le traitement de surface consiste en l'immobilisation de composés simples sur une surface; ici, des thiols sur une surface d'or. Notre objectif était double pour cette première approche; le traitement de la surface en vue de changer ses propriétés, et la familiarisation avec l'immobilisation de thiols sur une surface d'or en utilisant des composés commerciaux. Dans un premier temps, nous avons choisi d'immobiliser des molécules qui se terminent soit par un groupement hydrophile soit par un groupement hydrophobe. A cette fin, nous avons utilisé plusieurs composés de type thiols commerciaux qui ont été adsorbés sur une surface d'or.

La surface se compose d'une plaquette de silicium ou de Pyrex, couverte d'une fine couche de titane (200 Å) et d'une surface d'or (5000 Å) (Figure III.5). Les thiols utilisés pour cette première étape sont l'hexadecanethiol et le mercapto-undecanol.

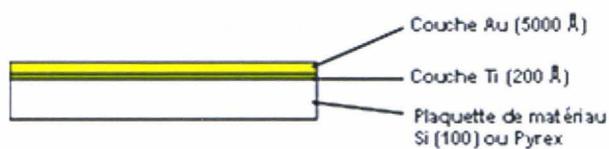


Figure III.5 : Composition de la surface.

III.1.2.1. Protocole d'adsorption

Le protocole d'adsorption est standard : la plaquette de matériau couverte d'or est plongée dans une solution éthanolique de thiol à 1 mM pendant une nuit, après dégazage de la solution par un gaz inerte (argon) (Figure III.6). Après immobilisation des thiols, les surfaces sont caractérisées selon leur caractère hydrophile/ hydrophobe avec la mesure de l'angle de contact que fait une goutte d'eau déionisée sur la surface fonctionnalisée.



Figure III.6 : Protocole d'adsorption.

III.1.2.2. Mesure d'angle de contact

La méthode consiste à mesurer l'angle entre la tangente au profil d'une goutte déposée sur le substrat et la surface du substrat (Figure III.7).

Cette technique permet d'accéder à un nombre élevé d'informations, telles que l'énergie de surface du liquide ou du solide, l'énergie libre de la surface, ou le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface. Nous avons utilisé cette technique dans le but de déterminer le caractère polaire de nos surfaces et d'obtenir ainsi des informations sur la nature chimique de la surface.

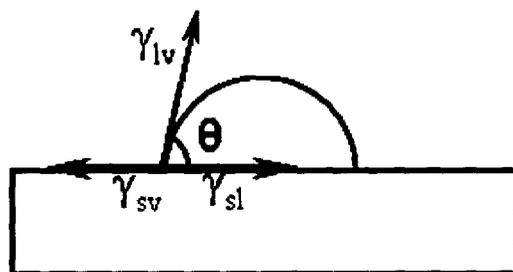


Figure III.7 : Méthode de mesure de l'angle de contact.

Lorsqu'une goutte de liquide est déposée sur une surface solide plane, l'angle entre la tangente à la goutte et la surface solide est appelée angle de contact θ . Souvent, dans un système solide-liquide-vapeur l'angle de contact est défini comme l'angle entre l'interface solide-liquide et l'interface liquide-vapeur. Pour une surface solide homogène idéale, la formule classique, qui prédit l'angle de contact sur la base de l'équilibre des forces agissant sur le système, est donnée par la relation de Young-Dupré (Equation III.1).

$$\cos \theta = (\gamma_{sv} - \gamma_{sl}) / \gamma_{lv}$$

Equation III.1 : Relation de Young-Dupré

où γ est la tension superficielle aux interfaces du système et les indices l, s et v indiquent respectivement le liquide, le solide et la vapeur.

L'instrument utilisé pour les mesures d'angle de contact est un appareil Knuss DSA 10 (Drop Shape Analysis). Des gouttes de volume constant (1 μ L) d'eau distillée, sont déposées sur les différentes surfaces à l'aide d'une microseringue. Une caméra interfacée avec un ordinateur permet de visualiser l'image de la goutte sur la surface et l'angle entre les deux est déterminé par le logiciel. On prend trois mesures d'angle de contact sur chaque échantillon et les valeurs présentées dans ce chapitre sont le résultat de la moyenne de ces trois mesures.

III.1.2.3. Caractère hydrophile/hydrophobe

Après adsorption des composés de type thiols sur la surface, nous avons caractérisé notre surface par sa propriété hydrophile ou hydrophobe en mesurant son angle de contact

avec une goutte d'eau mise sur la surface fonctionnalisée. La Figure III.8 représente les résultats obtenus.

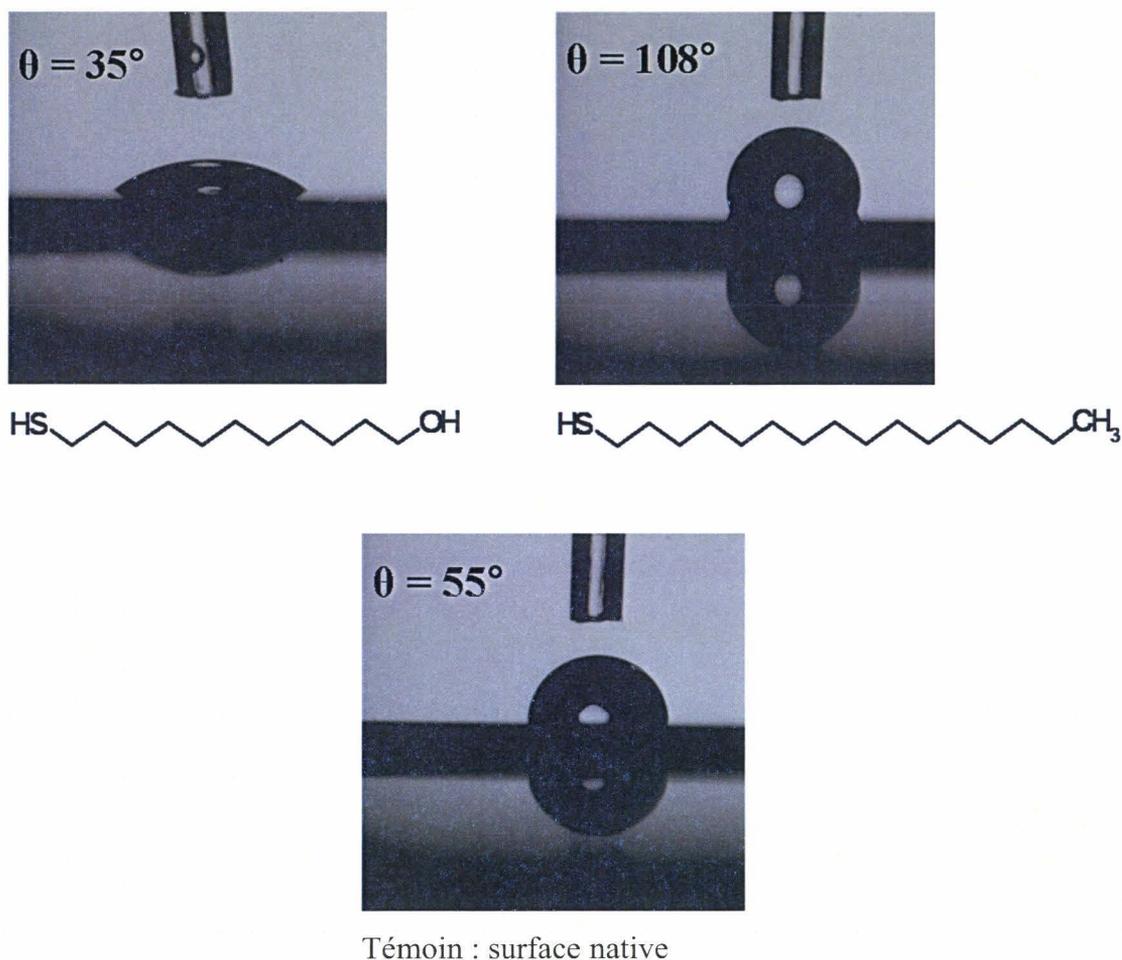


Figure III.8 : Variation de l'angle de contact selon la structure du thiol adsorbé.

La surface native de l'or est plutôt hydrophile et possède un angle de contact de 55° . La valeur d'angle de contact que nous avons mesuré sur la monocouche de l'hexadecanethiol, après déposition de la goutte d'eau, est de 35° , valeur que nous indique que la surface exposée à la goutte, a vraiment un caractère très hydrophile. Par contre sur une monocouche de mercapto-undecanol un angle de contact de 108° est mesuré, ce qui montre que cette surface a un caractère très hydrophobe. On peut conclure que, les molécules ont bien été adsorbées sur la surface d'or.

IV. Fonctionnalisation en volume

Le but de cette approche est de créer une fonctionnalisation en volume de la surface à l'aide de brosses de polymère, réticulé ou non réticulé. La composition du polymère est choisie en fonction de l'application visée. Ainsi, nous avons utilisé des monomères ayant une fonctionnalisation hydrophobe pour des applications de dessalage et des monomères comprenant un groupement réactif (cycle époxy), pour des applications de piégeage sélectif de protéines.

IV.1. Brosses de polymères

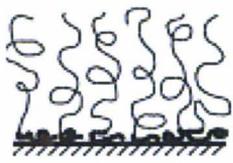
Ces dix dernières années, un grand nombre de travaux ont été consacrés aux polymères aux interfaces. Une attention particulière a été portée aux chaînes fixées à une extrémité sur une surface solide à suffisamment grande densité surfacique. Ces chaînes se repoussent les unes des autres et s'étirent perpendiculairement à la surface, formant une brosse de polymères. Ces brosses de polymères sont très utiles dans plusieurs applications, telles que la préparation de nouveaux matériaux adhésifs, de surfaces biologiques pour l'immobilisation des protéines ou pour la chromatographie.

Le domaine le plus largement étudié est l'utilisation de ces brosses de polymères comme des « ponts chimiques » permettant de rendre une surface « intelligente ». Ce procédé est important dans le domaine des nanocomposites, notamment en microélectronique, et en biocompatibilisation de surface.

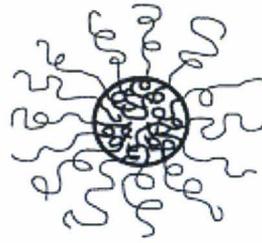
IV.2. Les différents types de polymères brosses

Les brosses de polymères^[31, 32] sont des assemblages de chaînes de polymères fixées par l'une de leur extrémité à une surface ou à une interface. L'assemblage est suffisamment dense pour que les chaînes de polymères soient nombreuses et s'étirent verticalement à la surface afin d'éviter l'entrecroisement.

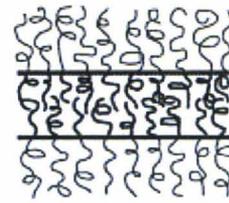
Ces assemblages étirés correspondent à la forme thermodynamiquement stable et ne requièrent aucune géométrie particulière de la surface et pas de milieu réactionnel particulier. Ils servent de modèles pour beaucoup de systèmes de polymères tels que les micelles de polymères ou les copolymères blocs aux interfaces liquide-liquide (microémulsions ou polymères greffés sur une surface solide) (Figure III.9).



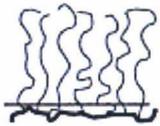
Copolymères dibloc adsorbés



micelle de polymère



Copolymères diblocs fondus



Copolymères gréffés à l'interface liquide-liquide



Copolymères à bloc à l'interface liquide-liquide

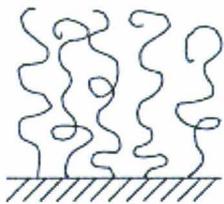


Polymères gréffés en fin de chaîne

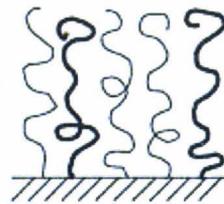
Figure III.9 : Modèles de brosses de polymères.^[31]

Une étude a montré que des défauts dans l'assemblage de ces brosses de polymères affectent leur stabilité et leurs propriétés.³²

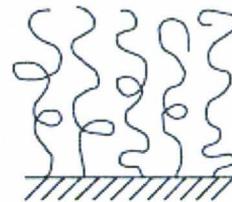
Les brosses de polymères peuvent être divisés en quatre classes^[31] : les homopolymères, les mélanges d'homopolymères, les copolymères statistiques, et les copolymères blocs.



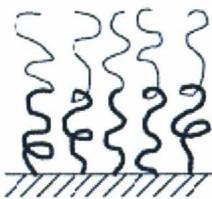
brosses de homopolymères flexibles



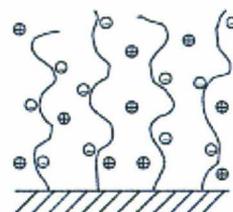
Mélange de brosses de polymères



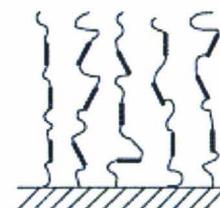
Brosse de polymères désordonnés



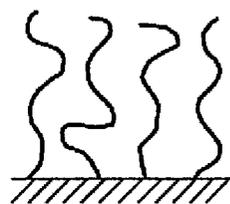
Blocs de brosses de copolymères



Brosses de homopolymères chargés



Brosses de polymères dans un liquide cristallin



Brosses de polymères
semiflexibles

Figure III.10 : Les différents types de polymères brosses.^[31]

L'étude des brosses de polymères s'étend à de nombreux domaines incluant la physique, la chimie, les sciences des matériaux et l'ingénierie. Actuellement, il existe deux voies de fabrication de brosses de polymères sur les substrats solides : la physisorption et la chimisorption avec les approches de greffage par dépôt, « grafting onto », et de greffage par croissance, « grafting from ».

IV.3. Synthèse de brosses de polymères

IV.3.1. Préparation des brosses de polymères par physisorption

La physisorption concerne uniquement les copolymères blocs. Ces copolymères possèdent un bloc qui s'adsorbe préférentiellement sur la surface et l'autre qui forme les brosses de polymères. Dans cette structure il y a une importance capitale du solvant. Le copolymère s'adsorbe sur le solvant qui adhère à la surface.^[33] Les interactions dans la plupart des cas, sont de types Van Der Waals ou liaison Hydrogène. La densité de greffage et toutes les autres dimensions caractéristiques de la structure sont contrôlées par un équilibre thermodynamique bien qu'il est possible de contrôler ce greffage de façon purement cinétique.^[34]

La désorption peut-être réalisée par une exposition des brosses de polymères à un meilleur solvant ou par déplacement à l'aide d'autres polymères ou d'autres composés de faible poids moléculaire. Si la réversibilité de cette démarche est un avantage indéniable, l'instabilité de la structure et la difficulté de la synthèse de ces copolymères en limite l'utilisation.

IV.3.2. Préparation des polymères brosses par chimisorption

IV.3.2.1. Approche « Grafting onto » pour la fabrication des brosses de polymères

Cette technique a souvent été utilisée pour la préparation de brosses de polymères. Elle consiste à greffer de polymères sur une surface réactive par l'intermédiaire de groupements terminaux. Cette voie de préparation concerne des polymères préformés ou fonctionnalisés en bout de chaînes qui forment des brosses de polymères par liaison covalente avec le substrat. La liaison formée rend le polymère beaucoup plus robuste et résistant aux environnements chimiques courants.

Cependant, seule une faible quantité de polymère peut-être immobilisée par cette méthode.^[35, 36] Au fur et à mesure de la formation du film de polymère, les chaînes macromonomères diffusent de plus en plus difficilement à travers le film formé pour atteindre les sites réactifs vacants. Ce problème est encore plus important quand l'épaisseur du film augmente. Ainsi, ceci ne permet pas d'atteindre des densités de greffage très importantes.

Donc cette technique est assez limitée au niveau efficacité et ne permet d'obtenir qu'une faible densité de greffage. Pour éviter ce genre de problèmes, une méthode s'est avérée assez efficace, dans laquelle les chaînes de polymères sont générées directement à partir de la surface du solide « grafting from »^[37-39]

IV.3.2.2. Approche « Grafting from » pour la fabrication des polymères brosses

La méthode du « grafting from », consiste à greffer le polymère sur le support (quel qu'il soit) par croissance des chaînes à partir de la surface (additions successives de monomères à partir d'un site amorçant). Le greffage est donc obtenu en deux étapes distinctes : tout d'abord l'immobilisation de l'amorceur sur le support, puis la croissance des chaînes par polymérisation in-situ. Les initiateurs permettent de préparer la surface pour recevoir les brosses de polymère. Il existe deux types de traitement de surface pour la synthèse des brosses de polymères. Le premier est le traitement plasma, qui est basé sur la formation des groupements peroxydes (Plasma O₂) ou amines (Plasma N₂) à la surface de notre substrat.^[36] Ce traitement permet un contrôle de la réponse de la membrane, grâce à la sensibilité thermique des brosses de polymères, et la stabilité des initiateurs. Par contre, elle ne permet pas le contrôle du type et de la quantité d'initiateurs et le mécanisme de

polymérisation n'est pas bien défini. Le second est l'immobilisation de monocouches organisées, développées précédemment, suivie d'une polymérisation radicalaire contrôlée.

IV.4. Polymérisation radicalaire contrôlée : « polymérisation vivante »

Le développement de nouveaux matériaux polymères est basé sur différentes méthodes et principalement la polymérisation radicalaire contrôlée qui permet une préparation dans des conditions douces de polymères à architecture contrôlée.^[40-42] Cette méthode de polymérisation s'est imposée le choix pour préparer des polymères et copolymères bien définis avec des masses molaires modulables et des indices de polymolécularité faibles. Différentes techniques de polymérisation radicalaire ont été développées, parmi elles on peut citer la polymérisation par transfert d'atome (ATRP), la polymérisation par addition (RAFT), ou encore la polymérisation contrôlée par les nitroxydes (NMP).

IV.4.1. Polymérisation contrôlée par addition : fragmentation (RAFT)

La polymérisation RAFT (Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer) s'appuie sur le principe de transfert de chaîne dégénérative. Rizzardo et ces collaborateurs^[43] ont transposé ce principe à la polymérisation radicalaire. Ce type de polymérisation se déroule toujours en présence d'amorceurs radicalaires, générateurs de radicaux primaires, qui amorcent la polymérisation par addition d'un monomère. Ces oligoradicaux réagissent alors avec l'agent RAFT (Figure III.11) afin de créer le premier radical intermédiaire. L'agent de transfert peut être un dithioester, un trithiocarbonate, un dithiocarbamate, un phosphoryl-(thiophosphoryl)dithioformate ou bien encore un dithiocarbonate.

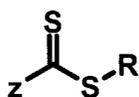


Figure III.11 : Structure générale d'un agent de transfert RAFT.

IV.4.2. Polymérisation contrôlée par les nitroxydes (NMP)

Les nitroxydes sont des espèces radicalaires stables utilisées comme inhibiteurs de radicaux carbonés en polymérisation radicalaire conventionnelle pour donner des

alcoxyamines stables. Ces alcoxyamines sont thermiquement labiles ce qui leur permet de générer une espèce radicalaire stable pour la croissance du polymère.

Le radical TEMPO a été le nitroxyde le plus efficace pour la polymérisation contrôlée des monomères stabilisés comme le styrène et ses dérivés.^[44] Par la suite Tordo et ses collaborateurs,^[45] ont développé un nouveau nitroxyde, le tert-butyl-N-(1-diéthylphosphono-2,2-diméthylpropyl)-N-oxyl appelé SG1, pour la polymérisation non seulement du styrène, mais aussi de certains acryliques.

IV.4.3. Polymérisation par transfert d'atome (ATRP)

Cette technique de polymérisation développée par Matyjaszewski^[46] est basée sur un transfert réversible d'un halogène entre un complexe organométallique et le radical en croissance (Figure III.12).

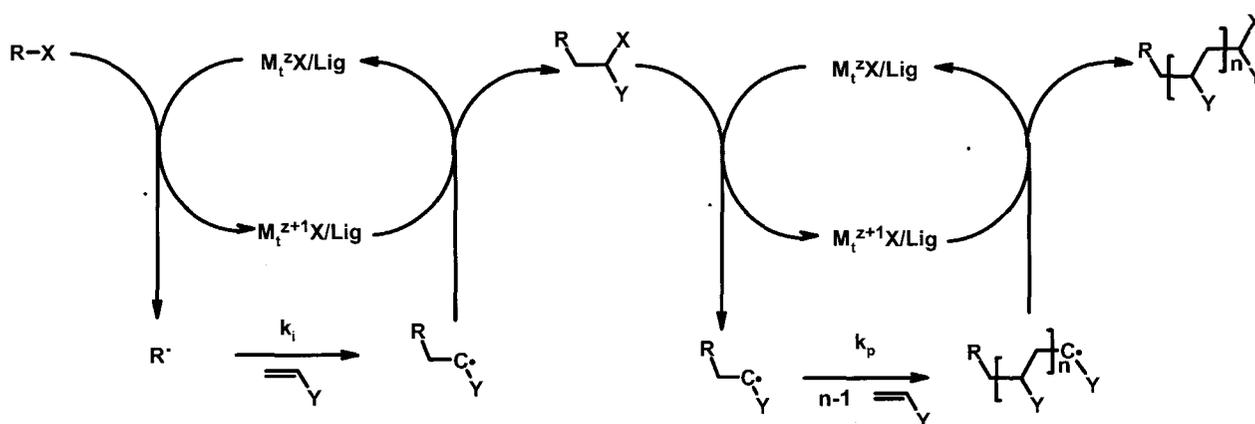


Figure III.12 : Mécanisme de la polymérisation radicalaire par transfert d'atomes (ATRP).

Cette méthode conduit à une distribution en masse molaire étroite et est applicable à un grand nombre de monomères vinyliques tels que le styrène, les méthacrylates, les acrylonitriles...

La réussite de cette technique réside dans l'association optimisée du complexe métallique et du ligand en présence de l'amorceur adéquat. De nombreux métaux de transition peuvent être utilisés^[47] tel que le cuivre, le ruthénium, le nickel, le palladium, le fer ou le rhodium.

IV.5. Notre Choix

Le but de notre travail, comme nous l'avons mentionné précédemment, est le développement de systèmes intégrés pour la préparation d'échantillons biologiques avant leur analyse par MALDI-TOF. Les étapes de préparation des échantillons sont réalisées sur la cible MALDI, ces étapes sont le dessalage d'échantillons peptidiques, l'analyse du plasma humain, et le piégeage sélectif de protéines données.

Nous sommes intéressés à la synthèse de la molécule à immobiliser sur la surface. Pour cela, nous avons synthétisé des molécules composées d'une ancre-double, d'un pont disulfure, d'un bras espaceur de type aliphatique et d'un groupement réactif de type « bromoester ». (Le groupement « bromoester » permet une polymérisation de surface ultérieure après immobilisation du thiol sur la surface) (Figure III.13). Pour la polymérisation nous avons choisi celle par transfert d'atome (ATRP) car elle permet d'obtenir un meilleur contrôle du poids et de la distribution moléculaires et elle est facile à mettre en œuvre. Les monomères que nous avons testés sont de type méthacrylate de méthyle, de butyle, de lauryle, et de glycidyle.

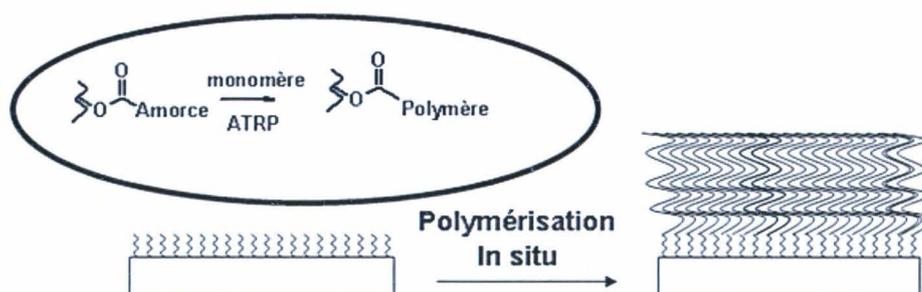


Figure III.13 : Principe de la synthèse de brosses de polymères.

IV.6. Synthèse de l'ancre

Pour la synthèse de la molécule à immobiliser sur la surface, nous nous sommes inspirés dans un premier temps d'un protocole décrit dans la littérature.⁴⁰ Cette molécule se compose de trois parties : un pont disulfure, un espaceur aliphatique et un groupement « bromoester » (Figure III.14).

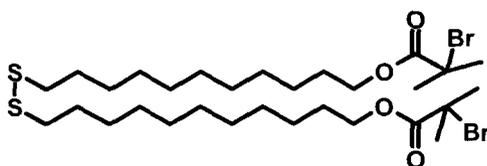


Figure III.14 : Structure de la molécule à adsorber sur la surface.

La première étape de cette synthèse (Figure III.15), est la formation du pont disulfure entre deux molécules de mercapto-alcool.^[48] En effet, le mélange du mercapto-alcool et d'iode en présence d'une base (TEA) dans le dichlorométhane pendant une heure, donne accès quantitativement au disulfure **37**.

La deuxième étape consiste à accrocher la tête « bromoester » sur le composé disulfure. Ainsi, l'action de deux équivalents de bromure de bromoisobutyle en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane sur le composé disulfure **37**, suivie d'une étape de purification sur colonne de chromatographie conduit au composé **38** avec un rendement de 40%.

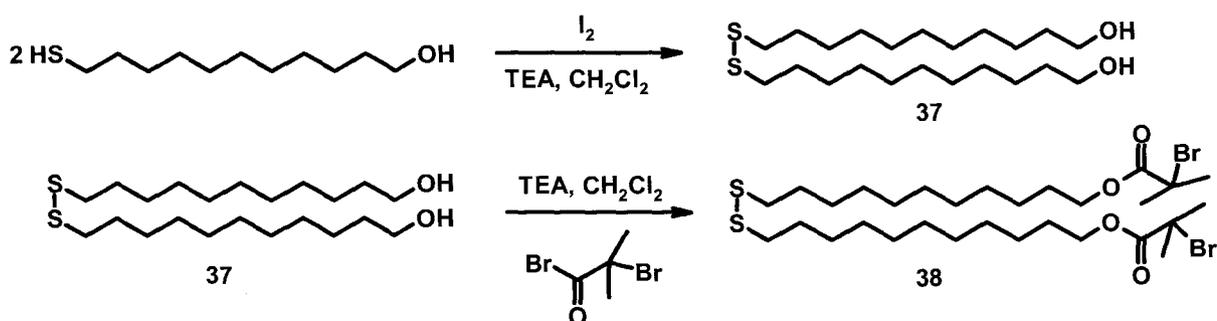


Figure III.15 : Schéma de synthèse du composé à immobiliser sur la surface

Dans un second temps et en partant de la même stratégie qu'avant, nous avons synthétisé une nouvelle molécule à base d'acide lipoïque (Figure III.16). L'acide lipoïque (acide 6,8-dithioloctanoïque) a été choisi pour son pont disulfure, sa chaîne aliphatique, l'excellente stabilité de la liaison S-S du 1,2 dithiolane et une bonne réactivité du groupement -COOH.^[49, 50]

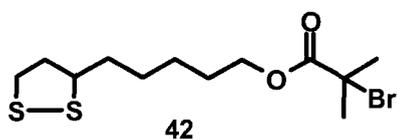


Figure III.16 : structure de la molécule à base d'acide lipoïque.

La synthèse de ce composé **42** comprend quatre étapes. Les deux premières étapes de cette synthèse (Figure III.17) consistent tout d'abord à préparer le lipoate de sodium par une réaction acide base classique en présence de soude dans le méthanol. Ensuite, une activation du lipoate de sodium **39** en présence de chlorure d'oxalyle, a été réalisée. En effet, l'action du chlorure d'oxalyle dans le toluène anhydre sur le lipoate de sodium conduit au chlorure d'acide lipoïque **40** avec un rendement de 85%.

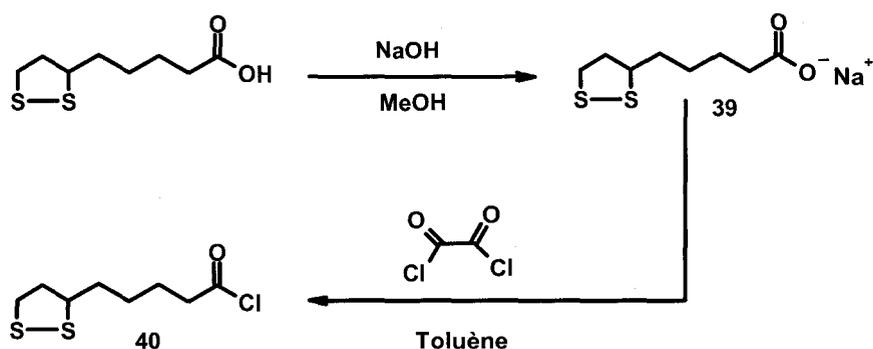


Figure III.17 : Formation de lipoate de sodium suivie d'une activation par chlorure d'acide.

La troisième étape de cette synthèse est la réduction de chlorure de lipoyle en alcool correspondant (Figure III.18). Cette réduction a été réalisée en présence de borohydrure de sodium (NaBH_4) dans le dioxane. Cependant cette voie de synthèse conduit également à la réduction du disulfure en di-thiol, c'est pourquoi une étape supplémentaire d'oxydation à l'iode pour régénérer le disulfure a été imposée.

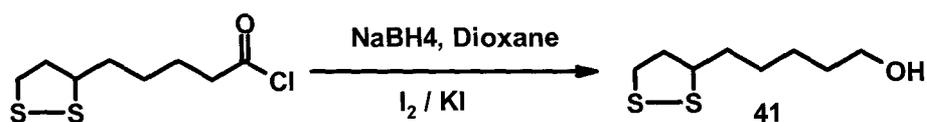


Figure III.18 : Réduction du chlorure de liopyle en alcool correspondant.

La dernière étape de cette synthèse est d'accrocher la tête « bromoester ». En effet l'action de bromure de bromoisobutyle en présence de triéthylamine dans le dichlorométhane sur le lipol **41**, suivi d'une étape de purification conduit au composé **42** avec un rendement de 40% (Figure III.19).

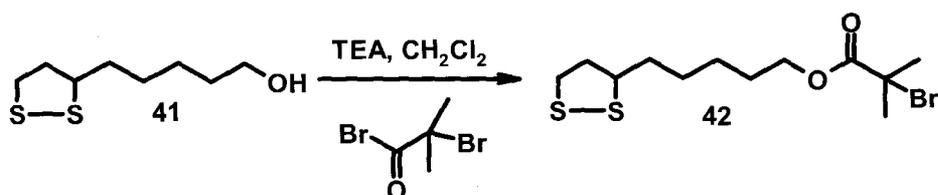


Figure III.19 : Accrochage de la tête « bromoester » sur le lipol.

IV.7. Protocole de polymérisation

Le composé disulfure est alors immobilisé en surface selon le protocole décrit ci-dessus avec l'incubation d'un morceau de plaquette de matériau d'or, sous atmosphère inerte, dans une solution éthanolique à 1 mM de disulfure. Comme précédemment la surface fonctionnalisée est caractérisée par la mesure de l'angle de contact pour valider l'adsorption de la molécule. La polymérisation est effectuée selon les conditions de la polymérisation ATRP (Figure III.20) : elle a eu lieu à température ambiante et sous atmosphère inerte, dans une solution constituée à moitié d'eau/méthanol, à moitié de monomères en présence de bipyridine et de sels de cuivre II (Cu(II)Br) pendant une durée de quatre heures.

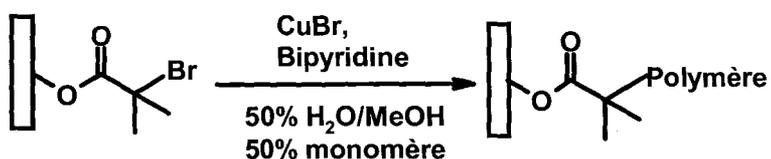


Figure III.20 : Protocole de polymérisation

Divers monomères de méthacrylate ont été utilisés selon l'application visée : méthacrylate de : Glycidyle (GMA), de Méthyle (MMA), de Butyle (BMA), et de Lauryle (LMA). La mesure d'angle de contact (Figure III.21) montre que plus les monomères sont hydrophobes plus la surface est hydrophobe.

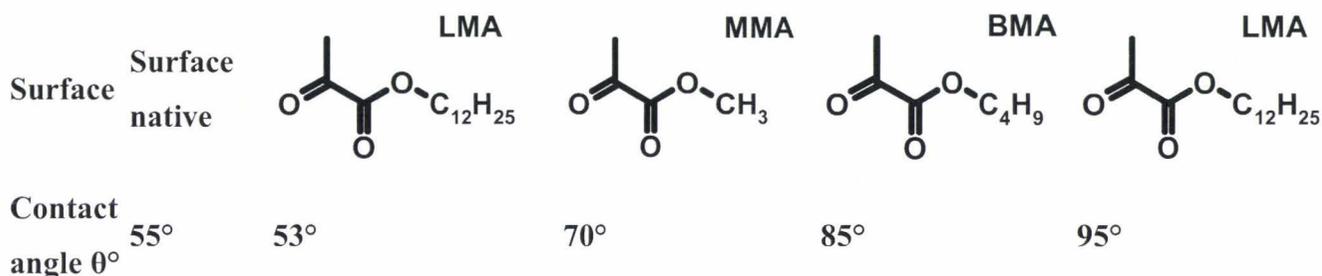


Figure III.21 : Angle de contact selon la structure de monomère

IV.8. Réalisation de dispositifs de dessalage

Habituellement le dessalage des peptides après digestion trypsique, pour éliminer les sels avant l'analyse par spectrométrie de masse, se fait par *Zip Tip* (Figure III.22). Ces phases utilisent des supports hydrophobes de billes de silice fonctionnalisées en C₄, C₈ ou bien encore C₁₈, présents à raison de 1 μ l dans un cône de 10 μ l. Ces supports de dessalage commerciaux sont très efficaces pour le « nettoyage » des échantillons biologiques (élimination des sels) avant leur analyse par spectrométrie de masse.

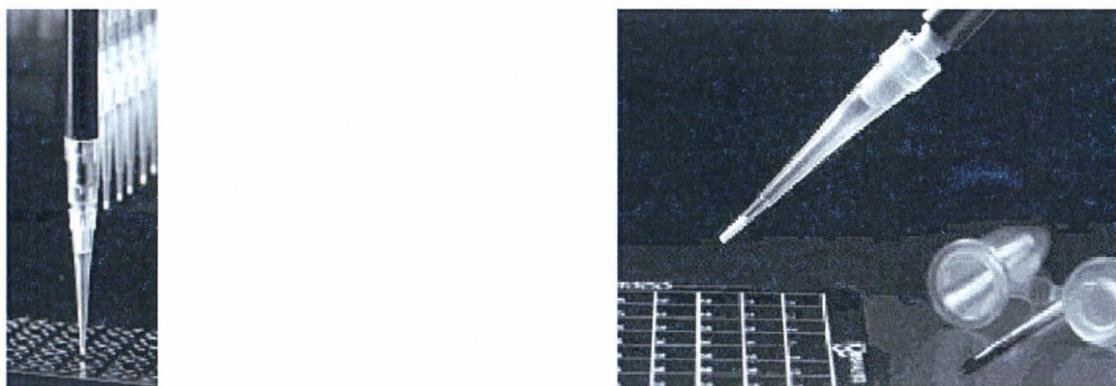


Figure III.22 : Photographies de *ZipTip* commerciaux (Millipore)

Ainsi, nous avons décidé de remplacer ces supports par une surface d'or fonctionnalisée. En effet, nous avons développé une fonctionnalisation de surface en utilisant des monomères ayant une fonctionnalisation hydrophobe (méthacrylate de lauryle ou LMA) pour ces applications de dessalage.^[51] 20% de méthacrylate de diméthyleaminoéthyle (DMAEMA) ont été ajoutés afin d'obtenir une meilleure densité de greffage.^[52] Les surfaces ont été préparées sur une cible MALDI afin de purifier un mélange de peptides avant analyse par la technique MALDI-TOF. Une fois que la solution de peptides (digestion trypsique de Cytochrome C à 80 femtomoles par microlitre) a été déposée sur la surface fonctionnalisée, le spot est séché et la surface est lavée à l'eau. La matrice (DHB) est alors ajoutée sur les spots pour leur analyse par MALDI-TOF.

IV.8.1. Principe du MALDI-TOF

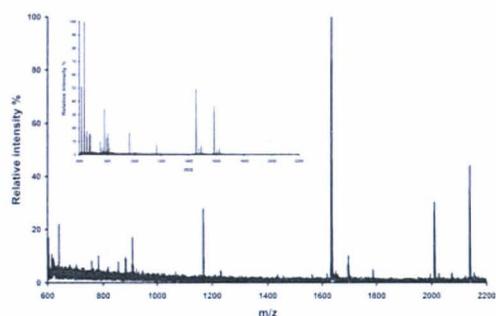
Le MALDI (pour Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) est une méthode d'ionisation permettant d'analyser des molécules de hautes masses moléculaires (peptides, protéines, oligonucléotides,...). Le principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF consiste à irradier un échantillon co-cristallisé dans une matrice absorbant à la longueur d'onde du rayonnement laser. Les ions monochargés ainsi formés sont accélérés puis évoluent selon leur masse dans une zone de vide poussé (le tube de vol) avant d'être détectés par un analyseur. La matrice est choisie pour cristalliser aisément et absorber à la longueur d'onde d'émission du laser (337 nm). Parmi les matrices les plus utilisées on trouve : l'acide 2,5 dihydroxy benzoïque (DHB), l'acide sinapinique,...).



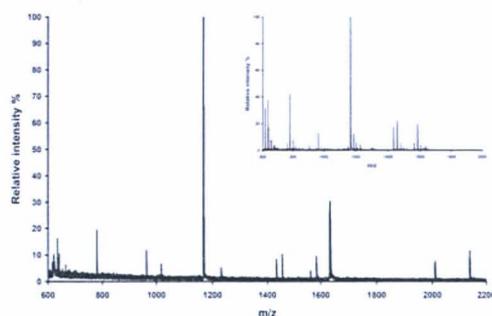
Figure III.23 : Appareil MALDI-TOF équipant le centre commun de spectrométrie de masse de l'université Lille I

IV.8.2. Résultats sur Cytochrome C

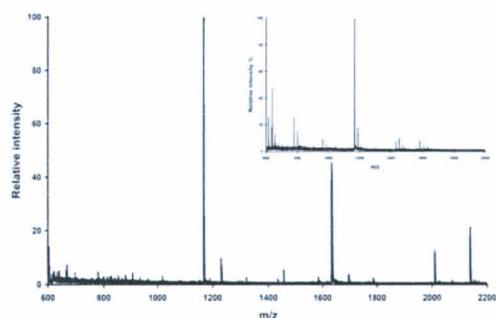
Des tests expérimentaux (Figure III.24) ont démontré que les fragments peptidiques ont été retenus sur la surface polymérisée et que le polymère n'a pas été décroché par le lavage ou l'irradiation laser : il reste bien ancré à la surface. De plus, nous avons pu voir que le dessalage était réussi et efficace pour des concentrations en sels allant jusqu'à 1 M, le MALDI ne supporte pas une concentration supérieure à 10 ou 100 μ M en sel sans traitement de l'échantillon. Nous avons inséré sur chaque spectre obtenu, le spectre MALDI correspondant obtenu avec une cible MALDI conventionnelle (en acier inoxydable) avec la même concentration en sel.



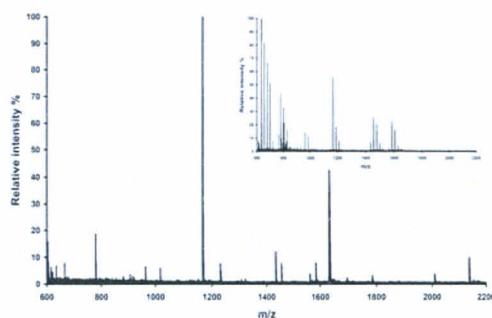
Mélange peptidique dans une solution de NaCl 10^{-3} M



Mélange peptidique dans une solution de NaCl 10^{-2} M



Mélange peptidique dans une solution de NaCl 10^{-1} M



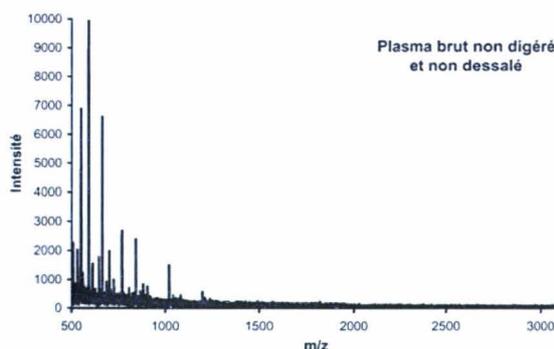
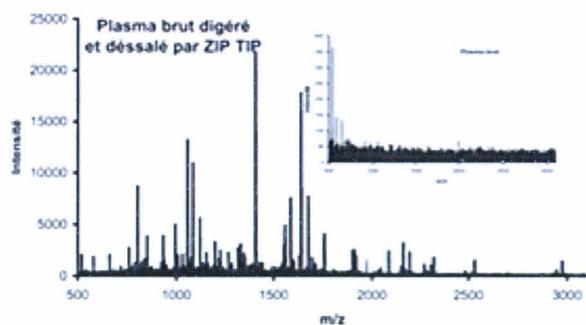
Mélange peptidique dans une solution de NaCl 1 M

Figure III.24 : Spectres de MALDI du Cytochrome C à 80 femtomoles par microlitre avec une concentration en NaCl de 10^{-3} à 1 M. En insertion ; les spectres MALDI correspondant obtenus sur acier inoxydable avec la même concentration en sel.

IV.8.3. Analyse du plasma brut

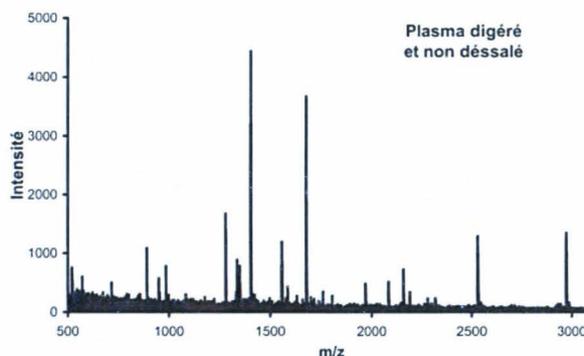
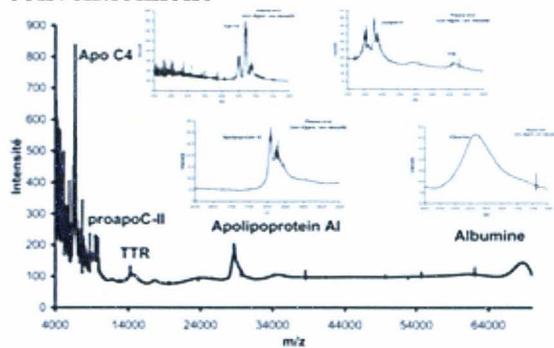
Afin de confirmer les résultats précédemment, une analyse de plasma brut ayant 0,9% de sels, soit près de 0,5 M de NaCl a été réalisée. Avant digestion, l'échantillon de plasma est dilué 10 fois dans une solution de dénaturation/réduction composée de 6 M de guanidine et 50 mM Tris-HCl pour la dénaturation et 4mM de DTT pour la réduction des ponts disulfures. Les échantillons sont maintenus 1 heure à 70°C. Nous procédons ensuite à l'alkylation des fonctions thiols par ajout de 10% en poids de iodoacétamide 50 mM, et nous laissons incuber 2 heures à 0°C à l'abri de la lumière. A chaque échantillon 6µL de trypsine à 10µg/µL provenant de pancréas de bœuf ont été ajoutés, pour réaliser une digestion trypsique à 37°C pendant une nuit. Nous avons également utilisé des échantillons de plasma natif non digéré.

Les peptides ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF en mode réflecteur avec une matrice DHB tandis que les protéines entières ont été analysées en mode linéaire avec l'acide sinapinique comme matrice.



Plasma brut digéré, dessalé au *Zip Tip*, et plasma brut (non digéré, non dessalé) en insertion. Analyse sur notre surface MALDI conventionnelle

Plasma brut (non digéré, non dessalé, faibles masses). Analyse sur notre surface MALDI dynamique



Plasma brut (non digéré, non dessalé, fortes masses). Analyse sur notre surface MALDI dynamique

Plasma digéré, non dessalé. Analyse sur notre surface MALDI dynamique

Figure III.25 : Analyse MALDI de plasma humain brut

La majorité des protéines du plasma a pu être identifiée en utilisant notre cible MALDI sans aucun traitement préalable de notre échantillon.

IV.9. Rétention spécifique des phosphopeptides

IV.9.1. Surfaces de type IMAC

L'étude de la protéomique se concentre aujourd'hui sur l'étude fonctionnelle des protéines. Dans ce contexte, le rôle des modifications post-traductionnelles est primordial (sujet qui sera discuté largement dans la deuxième partie du chapitre IV). L'analyse de ces modifications constitue une étape très importante pour la compréhension des changements des propriétés fonctionnelles de ces protéines après une telle modification. La phosphorylation est la modification la plus étudiée des protéines et joue un rôle majeur dans la signalisation cellulaire. Elle consiste en l'ajout d'un groupement phosphate sur un groupement -OH d'une protéine. Au laboratoire, une technique récente d'isolation des phosphopeptides a été développée. Elle est basée sur la chromatographie d'affinité sur des colonnes dites IMAC (Ion Metal Affinity Chromatography).^[53, 54] Ces phases, qui comprennent un cation métallique servent au piégeage sélectif de composés phosphorylés. En se basant sur ce principe, nous avons développé une fonctionnalisation de surface pour l'isolement sélectif des peptides phosphorylés directement sur la cible MALDI.

IV.9.2. Préparation des surfaces de type IMAC

Les surfaces de type IMAC sont préparées par polymérisation ATRP à base de méthacrylate de glycidyle (GMA) et 20% de DMAEMA avec 50/50 de monomère/solvant, suivant le protocole décrit précédemment. Notre surface comprend donc des groupements réactifs (cycle époxy) qui permettent l'accrochage covalent du ligand utilisé pour préparer la phase IMAC; nous avons utilisé ici l'acide iminodiacétique (IDA) (Figure III.26). Le greffage du groupement chélateur de métaux est réalisé par incubation de la surface dans une solution aqueuse de IDA (0,34 M NaCl, 2 M Na₂CO₃, pH = 10,5) pendant 1 H. Le cation métallique est ensuite chélaté sur le ligand avant le test des phases IMAC.

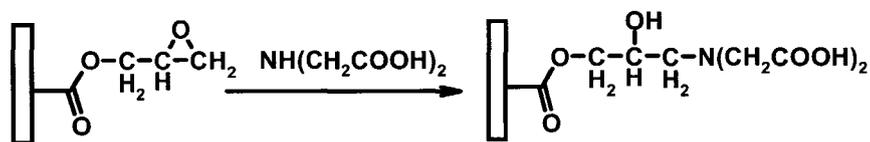


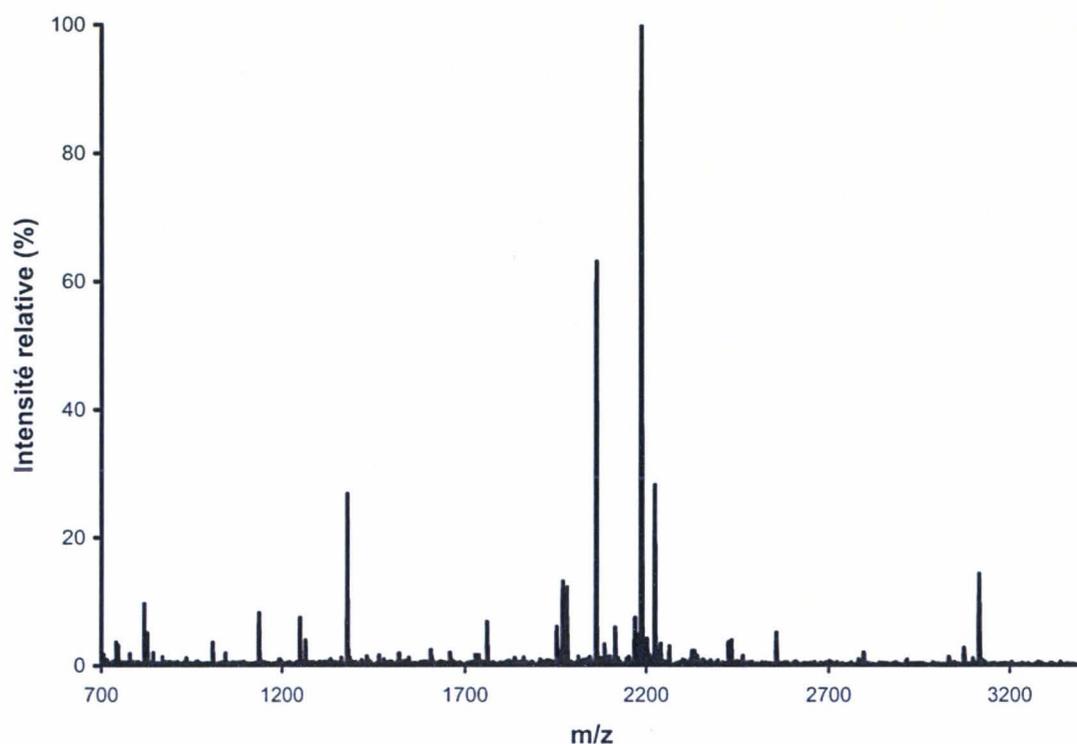
Figure III.26 : Greffage de l'acide iminodiacétique sur la surface

Nous nous sommes intéressés à l'élaboration de surfaces de type IMAC à base de Fe^{3+} pour la purification sélective de phosphopeptides. L'immobilisation de l'ion métallique a été effectuée par incubation de la surface dans une solution de FeCl_3 30 mM dans l'acide acétique 0,1 M, suivi d'un lavage avec une solution aqueuse d'acétate d'ammonium 1% à $\text{pH} = 9,5$.

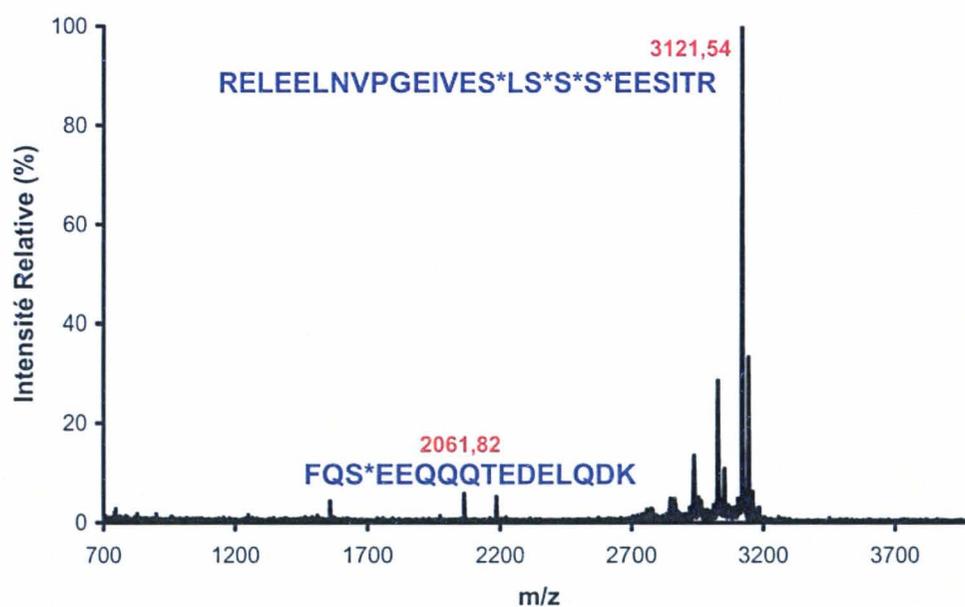
IV.9.3. Résultats

Les tests ont été réalisés sur un mélange peptidique issue de la digestion trypsique de β -Caséine (protéine qui contient des phosphopeptides). Après dépôt d'un microlitre du digestat trypsique de β -caséine sur la surface fonctionnalisée, le spot est séché et la surface est lavée (H_2O , 1% TFA). La matrice (DHB) est alors ajoutée sur les spots pour leur analyse par MALDI-TOF.

Les résultats obtenus (Figure III.27) montrent que la surface de type IMAC à base de Fe^{3+} retient les phosphopeptides de façon quantitative.



Digestat de la β -caséine sur acier inoxydable après dessalage au *Zip Tip*



Digestat de la β -caséine sur la surface de type IMAC

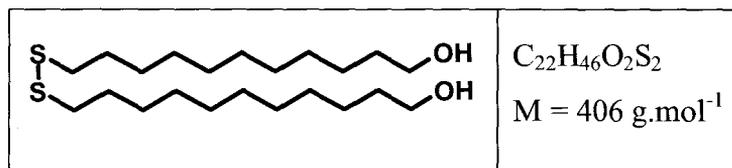
Figure III.27 : Spectres MALDI de la β -caséine sur plaque MALDI classique et sur surface d'or de type IMAC.

V. Conclusion

Nous avons développé une fonctionnalisation en volume de la surface d'or à l'aide de brosse de polymère, réticulé ou non réticulé. Cette fonctionnalisation nous a permis de réaliser des systèmes intégrés pour la préparation d'échantillons biologiques avant leur analyse par MALDI-TOF. Ces étapes ont été réalisées sur la cible même de MALDI. La composition du polymère a été choisie en fonction de l'application visée. Ainsi nous avons réalisé des surfaces hydrophobes pour des applications de dessalage et des surfaces de type IMAC pour le piégeage sélectif des phosphopeptides. Les résultats obtenus ont montré que pour les surfaces hydrophobes le dessalage était efficace même pour des concentration en sels allant jusqu'au 1 M. Pour les surfaces de type IMAC, nous avons obtenu une très bonne rétention des phosphopeptides. D'autres surfaces pour des applications de digestion ou de piégeage sélectif de glycopeptides sont en cours d'élaboration au laboratoire.

VI. Partie expérimentale

VI.1. 11-(11-Hydroxy-undecyldisulfanyl)-undecan-1-ol (37)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 50 mL, (1,00 g, 4,89 mmoles) de 11-mercapto-1-undecanol, (500 mg, 3,10 mmoles) d'iode, dans 30 mL de dichlorométhane, sont agitées pendant 2 h. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution 1M de Na_2SO_4 , puis deux fois avec de l'eau. Après évaporation du solvant on obtient quantitativement un solide blanc (37).

Rendement : quantitatif

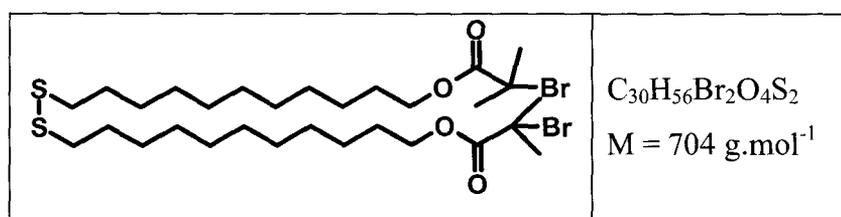
Analyses :

Point de fusion :

RMN 1H ($CDCl_3$) : 3,65 (t, $J = 7,6\text{Hz}$, 4H); 2,70 (t, $J = 4,3\text{Hz}$, 4H); 1,50-1,75 (m, 8H); 1,20-1,40 (m, 28H).

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : 25,7; 28,5; 29,4; 29,2; 29,5; 29,6; 32,8; 39,2; 63,1.

VI.2. 2-Bromo-2-méthyl-propionique 11-[11-(2-bromo-2-méthyl-propionyloxy)-undecyldisulfanyl]-undecyl ester (38)



Mode opératoire :

(183 μl , 1,48 mmoles) de 2-Bromo-2-méthylpropionyl bromide, sont ajoutés goutte à goutte à une solution de disulfide (37) (0,25 g, 0,62 mmoles) et de triéthylamine (418 μl , 3,15 mmoles), dans 15 mL de dichlorométhane à 0°C sous atmosphère inerte. La solution est

agitée vigoureusement à 0°C dans un bain glace/eau pendant une heure, puis deux heures à température ambiante. Le milieu réactionnel est lavé avec une solution aqueuse (2N) de carbonate de sodium saturé avec du chlorure d'ammonium. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant un mélange 70/30 d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle. On obtient un produit visqueux.

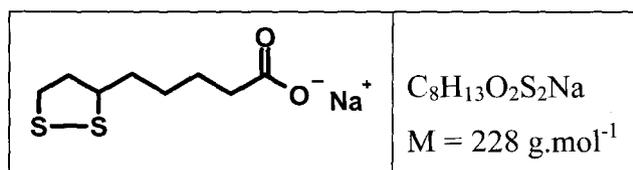
Rendement : 60%

Analyses :

RMN ¹H (CDCl₃) : 1,24-1,32 (m, 28H); 1,57-1,66 (m, 8H); 1,89 (s, 12H,); 2,64 (t, *J* = 7,5Hz, 4H,); 4,13 (t, *J* = 5,0 Hz, 4H)

RMN ¹³C (CDCl₃) : 25,8; 28,3; 28,5; 29,1; 29,2; 29,4; 30,8; 39,2; 56,0, 66,1, 171,7 (C=O).

VI.3. 5-[1,2] dithiolan-3-yl-pentanoate de sodium (39)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 100 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon, on introduit une solution d'acide lipoïque (3,00 g, 14,56 mmoles) et 15 mL de méthanol. 150 mL d'une solution de soude 0,1 M sont ensuite ajoutés. Le mélange réactionnel est porté à ébullition pendant 5 heures puis est filtré. Le solvant est éliminé par évaporation sous vide. On obtient un solide orange

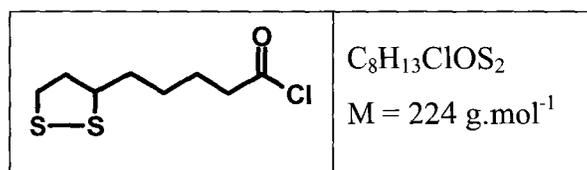
Rendement : 90%

Analyses :

RMN ¹H (CDCl₃) : 1,27 (H₆, m, 2H); 1,42 - 1,61 (H₄, m, 2H,); 1,58 (H₅, m, 2H,); 2,15 (H₇, t, 2H,); 2,35 - 2,47 (H₂, m, 2H,); 2,51 - 2,58 (H₁, m, 2H,); 3,70 (H₃, t, 1H)

RMN ¹³C (CDCl₃) : 25,1; 29,6; 30,93; 34,4; 38,4; 40,2; 56,2; 181,0.

VI.4. Chlorure de 5-[1,2] dithiolan-3-yl-pentanoyle (40)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 100 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon, on introduit (3,0 g, 13,15 mmoles) de lipote de sodium (39) dissout dans 40 mL de toluène anhydre. (10 mL, 0,12 moles) de chlorure d'oxalyle sont ensuite ajoutés. Le mélange est agité pendant 15 minutes à 0°C dans un bain de glace, puis ramené à température ambiante en trois heures. On filtre et le solvant est éliminé par évaporation sous vide.

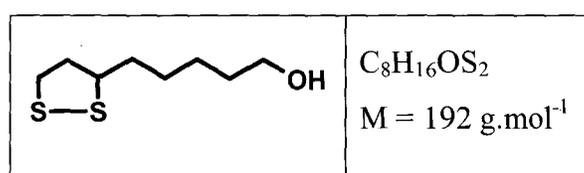
Rendement : 84%

Analyses :

RMN 1H ($CDCl_3$) : 1,32 (m, 2H, H5); 1,60 (m, 2H, H6); 1,62 – 1,81 (m, 2H, H4) ; 2,35; 2,48 (m, 2H, H2); 2,51; 2,58, (m, 2H, H1); 2,88 (m, 2H, H7); 3,71 (t, 1H, H3)

RMN ^{13}C ($CDCl_3$) : 26,8; 35,9; 38,4; 40,0; 56,2; 26,8; 46,9; 173,7

VI.5. 5-[1,2] Dithiolan-3-yl-pentan-1-ol (41)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 100 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon, (1,50 g, 7,81 mmoles) de composé (40) est dissout dans 25 mL de dioxane anhydre dans un bain de glace. (3,00 g 78,94 mmoles) de borohydride de sodium sont ensuite ajoutés. La solution est agitée à température ambiante pendant deux heures. Après ajustasse du pH à 3 avec une solution de HCl 2 M, le mélange est extrait au chloroforme (2 fois 30 mL). Le produit est ensuite oxydé par ajout d'une solution d'iodure de potassium à 10%, jusqu'à ce que la couleur soit permanente. L'excès d'iode est réduit par une solution de bisulfite de sodium. La solution

obtenue est lavée avec une solution diluée de bicarbonate de sodium puis par 50 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé.

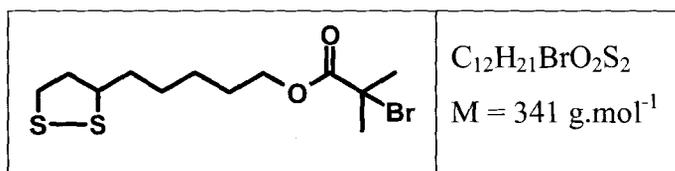
Rendement : 60%

Analyses :

RMN ^1H (CDCl_3) : 1,27 (m, 2H, H_6); 1,27 (m, 2H, H_5); 1,44 – 1,61 (m, 2H, H_4); 1,55 (m, 2H, H_7); 2,35 – 2,48 (m, 2H, H_2); 2,44 (t, 1H, H_3); 2,51 – 2,58 (m, 2H, H_1); 3,71 (t, 2H, H_8).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 25,5; 26,9; 32,6; 34,5; 38,4; 40,0; 56,2; 62,8.

VI.6. 2-Bromo-2-méthyl-propionique acide 5-[1,2] dithiolan-3-yl-pentyl ester (42).



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du composé (39).

Rendement : 35%

Analyses :

RMN ^1H (CDCl_3) : 1,32 (m, 2H, H_6); 1,42 – 1,62 (m, 2H, H_4); 1,44 (m, 2H, H_5); 1,57 (m, 2H, H_7); 1,88 (s, 6H, H_{11}); 2,48 – 2,53 (m, 2H, H_2); 2,51 – 2,58 (m, 2H, H_1); 3,71 (m, 1H, H_3); 4,01 (t, 2H, H_8)

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 2,1; 26,9; 28,8; 30,7; 34,5; 38,4; 40,0; 55,8; 56,2; 64,0; 170,7.

VII. Références bibliographiques

- [1] Xia, Y.; Whitesides, G.M. **Soft lithography**. *Angewandte Chemie, International Edition* **1998**, *37*, 550-575.
- [2] Prucker, O.; Ruehe, J. **Polymer Layers through Self-Assembled Monolayers of Initiators**. *Langmuir* **1998**, *14*, 6893-6898.
- [3] Kataoka, K.; Nagasaki, Y.; Shibata, N.; Hoshino, N., (Nanocarrier Co., Ltd., Japan; Iatron Laboratories, Inc.). Application: WO
WO, **2002**, p. 22 pp.
- [4] Huang, W.; Kim, J.-B.; Bruening, M.L.; Baker, G.L. **Functionalization of Surfaces by Water-Accelerated Atom-Transfer Radical Polymerization of Hydroxyethyl Methacrylate and Subsequent Derivatization**. *Macromolecules* **2002**, *35*, 1175-1179.
- [5] Cefai, J.J.; Barrow, D.A.; Woias, P.; Muller, E. **Integrated chemical analysis microsystems in space life sciences research**. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **1994**, *4*, 172-185.
- [6] Stewart, M.P.; Buriak, J.M. **Chemical and biological applications of porous silicon technology**. *Advanced Materials (Weinheim, Germany)* **2000**, *12*, 859-869.
- [7] Fintschenko, Y.; Van Den Berg, A. **Silicon microtechnology and microstructures in separation science**. *Journal of Chromatography, A* **1998**, *819*, 3-12.
- [8] Harrison, D.J.; Glavina, P.G.; Manz, A. **Towards miniaturized electrophoresis and chemical analysis systems on silicon: an alternative to chemical sensors**. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **1993**, *B10*, 107-116.
- [9] Cheng, J.-Y.; Yen, M.-H.; Wei, C.-W.; Chuang, Y.-C.; Young, T.-H. **Crack-free direct-writing on glass using a low-power UV laser in the manufacture of a microfluidic chip**. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2005**, *15*, 1147-1156.
- [10] Daridon, A.; Fascio, V.; Lichtenberg, J.; Wuetrich, R.; Langen, H.; Verpoorte, E.; de Rooij, N.F. **Multi-layer microfluidic glass chips for microanalytical applications**. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **2001**, *371*, 261-269.
- [11] Bang, H.; Lee, W.G.; Park, J.; Yun, H.; Lee, J.; Chun, S.; Cho, K.; Chung, C.; Han, D.-C.; Chang, J.K. **Active sealing for soft polymer microchips: method and practical applications**. *Journal of Micromechanics and Microengineering* **2006**, *16*, 708-714.

- [12] Poon, J.K.S.; Huang, Y.; Paloczi, G.T.; Yariv, A. **Soft lithography replica molding of critically coupled polymer microring resonators.** *IEEE Photonics Technology Letters* **2004**, *16*, 2496-2498.
- [13] Xia, Y.; Rogers, J.A.; Paul, K.E.; Whitesides, G.M. **Unconventional methods for fabricating and patterning nanostructures.** *Chemical Reviews (Washington, D. C.)* **1999**, *99*, 1823-1848.
- [14] Becker, H.; Locascio, L.E. **Polymer microfluidic devices.** *Talanta* **2002**, *56*, 267-287.
- [15] West, P.R., (General Electric Co., USA). Application: EP
EP, **1986**, p. 6 pp.
- [16] Richter, K.; Orfert, M.; Howitz, S.; Thierbach, S. **Deep plasma silicon etch for microfluidic applications.** *Surface and Coatings Technology* **1999**, *116-119*, 461-467.
- [17] Lahiri, J.; Ostuni, E.; Whitesides, G.M. **Patterning Ligands on Reactive SAMs by Microcontact Printing.** *Langmuir* **1999**, *15*, 2055-2060.
- [18] Kumar, A.; Biebuyck, H.A.; Whitesides, G.M. **Patterning Self-Assembled Monolayers: Applications in Materials Science.** *Langmuir* **1994**, *10*, 1498-1511.
- [19] Laibinis, P.E.; Whitesides, G.M.; Allara, D.L.; Tao, Y.T.; Parikh, A.N.; Nuzzo, R.G. **Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver, and gold.** *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 7152-7167.
- [20] Qin, D.; Xia, Y.; Rogers, J.A.; Jackman, R.J.; Zhao, X.-M.; Whitesides, G.M. **Microfabrication, microstructures and microsystems.** *Topics in Current Chemistry* **1998**, *194*, 1-20.
- [21] Black, A.J.; Paul, K.E.; Aizenberg, J.; Whitesides, G.M. **Patterning disorder in monolayer resists for the fabrication of sub-100-nm structures in silver, gold, silicon, and aluminum.** *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 8356-8365.
- [22] Kumar, A.; Biebuyck, H.A.; Abbott, N.L.; Whitesides, G.M. **The use of self-assembled monolayers and a selective etch to generate patterned gold features.** *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 9188-9189.
- [23] Huck, W.T.S.; Yan, L.; Stroock, A.; Haag, R.; Whitesides, G.M. **Patterned Polymer Multilayers as Etch Resists.** *Langmuir* **1999**, *15*, 6862-6867.

- [24] Love, J.C.; Wolfe, D.B.; Chabynyc, M.L.; Paul, K.E.; Whitesides, G.M. **Self-assembled monolayers of alkanethiolates on palladium are good etch resists.** *Journal of the American Chemical Society* **2002**, *124*, 1576-1577.
- [25] Patel, N.; Davies, M.C.; Hartshorne, M.; Heaton, R.J.; Roberts, C.J.; Tendler, S.J.B.; Williams, P.M. **Immobilization of Protein Molecules onto Homogeneous and Mixed Carboxylate-Terminated Self-Assembled Monolayers.** *Langmuir* **1997**, *13*, 6485-6490.
- [26] Dijkema, M.; Boukamp, B.A.; Kamp, B.; van Bennekom, W.P. **Effect of Hexacyanoferrate(II/III) on Self-Assembled Monolayers of Thioctic Acid and 11-Mercaptoundecanoic Acid on Gold.** *Langmuir* **2002**, *18*, 3105-3112.
- [27] Laibinis, P.E.; Hickman, J.J.; Wrighton, M.S.; Whitesides, G.M. **Orthogonal self-assembled monolayers: alkanethiols on gold and alkane carboxylic acids on alumina.** *Science (Washington, DC, United States)* **1989**, *245*, 845-847.
- [28] Tam-Chang, S.-W.; Biebuyck, H.A.; Whitesides, G.M.; Jeon, N.; Nuzzo, R.G. **Self-Assembled Monolayers on Gold Generated from Alkanethiols with the Structure RNHCOCH₂SH.** *Langmuir* **1995**, *11*, 4371-4382.
- [29] Nuzzo, R.G.; Zegarski, B.R.; Dubois, L.H. **Fundamental studies of the chemisorption of organosulfur compounds on gold(111). Implications for molecular self-assembly on gold surfaces.** *Journal of the American Chemical Society* **1987**, *109*, 733-740.
- [30] Bain, C.D.; Troughton, E.B.; Tao, Y.T.; Evall, J.; Whitesides, G.M.; Nuzzo, R.G. **Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold.** *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111*, 321-335.
- [31] Zhao, B.; Brittain, W.J. **Polymer brushes: surface-immobilized macromolecules.** *Progress in Polymer Science* **2000**, *25*, 677-710.
- [32] Love, J.C.; Estroff, L.A.; Kriebel, J.K.; Nuzzo, R.G.; Whitesides, G.M. **Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology.** *Chemical Reviews (Washington, DC, United States)* **2005**, *105*, 1103-1169.
- [33] Marra, J.; Hair, M.L. **Interactions between two adsorbed layers of poly(ethylene oxide)/polystyrene diblock copolymers in heptane-toluene mixtures.** *Colloids and Surfaces* **1989**, *34*, 215-226.
- [34] Halperin, A.; Tirrell, M.; Lodge, T.P. **Tethered chains in polymer microstructures.** *Advances in Polymer Science* **1992**, *100*, 31-71.

- [35] Auroy, P.; Auvray, L.; Leger, L. **Silica particles stabilized by long grafted polymer chains from electrostatic to steric repulsion.** *Journal of Colloid and Interface Science* **1992**, *150*, 187-194.
- [36] Ito, Y.; Ochiai, Y.; Park, Y.S.; Imanishi, Y. **pH-Sensitive Gating by Conformational Change of a Polypeptide Brush Grafted onto a Porous Polymer Membrane.** *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 1619-1623.
- [37] Bartholome, C.; Beyou, E.; Bourgeat-Lami, E.; Chaumont, P.; Zydowicz, N. **Nitroxide-Mediated Polymerizations from Silica Nanoparticle Surfaces: \"Graft from\" Polymerization of Styrene Using a Triethoxysilyl-Terminated Alkoxyamine Initiator.** *Macromolecules* **2003**, *36*, 7946-7952.
- [38] Parvole, J.; Laruelle, G.; Guimon, C.; Francois, J.; Billon, L. **Initiator-grafted silica particles for controlled free radical polymerization: Influence of the initiator structure on the grafting density.** *Macromolecular Rapid Communications* **2003**, *24*, 1074-1078.
- [39] Yoshinaga, K.; Shimada, J.; Nishida, H.; Komatsu, M. **Effects of Secondary Polymer Covalently Attached to Monodisperse, Poly(maleic anhydride-styrene)-Modified Colloidal Silica on Dispersibility in Organic Solvent.** *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, *214*, 180-188.
- [40] Shah, R.R.; Merreceyes, D.; Husemann, M.; Rees, I.; Abbott, N.L.; Hawker, C.J.; Hedrick, J.L. **Using Atom Transfer Radical Polymerization To Amplify Monolayers of Initiators Patterned by Microcontact Printing into Polymer Brushes for Pattern Transfer.** *Macromolecules* **2000**, *33*, 597-605.
- [41] Pyun, J.; Kowalewski, T.; Matyjaszewski, K. **Synthesis of polymer brushes using atom transfer radical polymerization.** *Macromolecular Rapid Communications* **2003**, *24*, 1043-1059.
- [42] Boyes, S.G.; Granville, A.M.; Baum, M.; Akgun, B.; Mirous, B.K.; Brittain, W.J. **Polymer brushes - surface immobilized polymers.** *Surface Science* **2004**, *570*, 1-12.
- [43] Chiefari, J.; Chong, Y. K.; Ercole, F.; Krstina, J.; Jeffery, J.; Le, T. P. T.; Mayadunne, R. T. A.; Meijs, G. F.; Moad, C. L.; Moad, G.; Rizzardo, E.; Thang, S. H. **Living Free-Radical Polymerization by Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer: The RAFT Process.** *Macromolecules* **1998**, *31*, 5559-5562.
- [44] Georges, M.K.; Veregin, R.P.N.; Kazmaier, P.M.; Hamer, G.K. **Narrow molecular weight resins by a free-radical polymerization process.** *Macromolecules* **1993**, *26*, 2987-2988.

- [45] Chauvin, F.; Dufils, P.-E.; Gimes, D.; Guillaneuf, Y.; Marque, S.R.A.; Tordo, P.; Bertin, D. **Nitroxide-Mediated Polymerization: The Pivotal Role of the k_d Value of the Initiating Alkoxyamine and the Importance of the Experimental Conditions.** *Macromolecules* **2006**, ACS ASAP.
- [46] Patten, T.E.; Matyjaszewski, K. **Atom-transfer radical polymerization and the synthesis of polymeric materials.** *Advanced Materials (Weinheim, Germany)* **1998**, *10*, 901-915.
- [47] Kamigaito, M.; Ando, T.; Sawamoto, M. **Metal-Catalyzed Living Radical Polymerization.** *Chemical Reviews (Washington, D. C.)* **2001**, *101*, 3689-3745.
- [48] Li, X.-M.; Peter, M.; Huskens, J.; Reinhoudt, D.N. **Catalytic Microcontact Printing without Ink.** *Nano Letters* **2003**, *3*, 1449-1453.
- [49] Karamanska, R.; Mukhopadhyay, B.; Russell David, A.; Field Robert, A. **Thioctic acid amides: convenient tethers for achieving low nonspecific protein binding to carbohydrates presented on gold surfaces.** *Chemical communications (Cambridge, England)* **2005**, 3334-3336.
- [50] Wagner, A.F.; Walton, E.; Boxer, G.E.; Pruss, M.P.; Holly, F.W.; Folkers, K. **Properties and derivatives of α -lipoic acid.** *Journal of the American Chemical Society* **1956**, *78*, 5079-5081.
- [51] Kajjout, M.; Rolando, C.; Le Gac, S. **Surface chemistry for in situ sample desalting and dynamic MALDI targets.** *Proceedings of ECSOC-9, International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, 9th, Nov. 1-30, 2005* **2005**, B002/001-B002/007.
- [52] Ma, H.; Hyun, J.; Stiller, P.; Chilkoti, A. **"Non-fouling" oligo(ethylene glycol)-functionalized polymer brushes synthesized by surface-initiated atom transfer radical polymerization.** *Advanced Materials (Weinheim, Germany)* **2004**, *16*, 338-341.
- [53] Huang, S.-Y.; Hsu, J.-L.; Chen, S.-H. **Two-step immobilized metal affinity chromatography (IMAC) for phosphoproteomics using mass spectrometry.** *Journal of the Chinese Chemical Society (Taipei, Taiwan)* **2005**, *52*, 765-772.
- [54] Lund, M.; Ardo, Y. **Purification and identification of water-soluble phosphopeptides from cheese using Fe(III) affinity chromatography and mass spectrometry.** *Journal of agricultural and food chemistry* **2004**, *52*, 6616-6622.

Chapitre IV : Développements de nouveaux colorants et réactifs pour l'analyse protéomique

I- Introduction

Ces dix dernières années, des efforts importants ont permis le séquençage du génome de plusieurs espèces, en particulier celui du génome humain.^[1-3] Néanmoins, la connaissance de la totalité de l'information génétique n'apporte pas toutes les réponses concernant les mécanismes cellulaires, car ce sont les protéines, et elles seules, qui sont actives au sein d'une cellule puisqu'elles assurent les différentes fonctions cellulaires.

Or, la connaissance du génome humain ne conduit pas à la connaissance exhaustive de toutes les protéines d'un organisme pour différentes raisons. Tout d'abord, le découpage du génome humain n'est pas trivial et moins de 50% du génome correspondent à des gènes. Ensuite, la séquence d'un gène ne permet pas de déterminer la séquence protéique qui en découle. En effet, les protéines subissent, une fois produites, de nombreuses étapes de modification, nommées modifications post-traductionnelles.^[4-6] Ainsi, alors que le génome prédit 30000 protéines chez l'homme, le nombre de protéines présentant de telles modifications est estimé à 3 millions, or seulement 10000 protéines sont connues à ce jour (Figure IV.1).

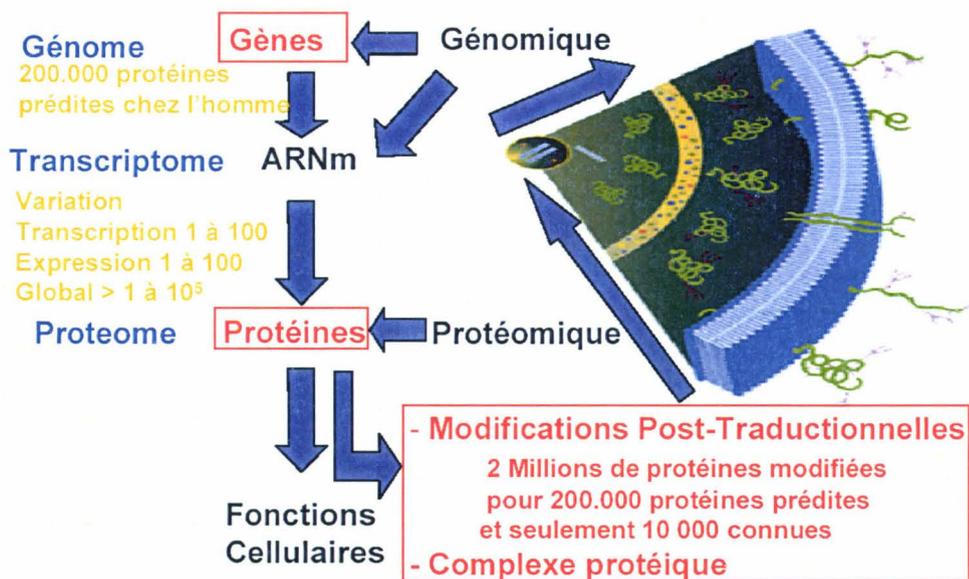


Figure IV.1 : Relations entre génome et protéome.

C'est dans ce contexte qu'en 1995 est apparu le terme protéome qui désigne l'ensemble des produits fonctionnels exprimés par un génome, attestant de la nécessité de comprendre la complexité du fonctionnement cellulaire à partir de l'expression protéique globale. Ce concept a pu se développer grâce à l'évolution de technologies nées dans le milieu des années 1970 telles que l'électrophorèse bidimensionnelle^[7] qui permet de séparer simultanément des milliers de protéines. L'apparition des techniques d'ionisation douce de spectrométrie de masse, à partir de la fin des années 1980, a ensuite rendu possible l'analyse de l'expression protéique dans sa globalité. L'une des principales limites de cette technique de séparation est cependant associée à la dynamique d'expression des protéines dans la cellule. Les protéines de plus faible expression sont présentes dans la cellule à hauteur de 50 à 100 molécules contrairement aux espèces les plus abondantes représentées par quelques 10^7 copies. La sensibilité des techniques de détection ainsi que leur gamme dynamique et leur reproductibilité peuvent donc rapidement devenir des facteurs limitants. Outre ces facteurs propres à la détection, des paramètres évidents de compatibilité avec l'analyse, et plus précisément la spectrométrie de masse, sont à prendre en considération.^[8, 9] L'inconvénient majeur de ces méthodes globales, qui étudient le protéome entier, est donc qu'elles ne conduisent qu'à l'identification des protéines majoritaires dans le mélange qui sont rarement les protéines d'intérêt.

La révélation de protéines séparées sur gel d'électrophorèse mono ou bidimensionnelle est basée sur la différence de réactivité chimique des protéines et du gel de polyacrylamide. Les colorants traditionnels utilisés communément en protéomique étaient et sont encore aujourd'hui les Bleu de Coomassie et les colorants à l'argent. Cependant une nouvelle catégorie de colorants, les colorants fluorescents, a été développée ces dernières années permettant des gains en sensibilité et en linéarité des réponses obtenues. Le Sypro® Ruby^[10] est une solution colorante fluorescente, basée sur un complexe du ruthénium. Cette solution colorante commercialisée par Molecular Probes^[11] s'avère offrir de bonnes qualités de détection mais est vendue à un prix très élevé. Il y a donc un enjeu stratégique et économique pour les laboratoires de protéomique à développer d'autres colorants fluorescents ou à préparer leur propre solution colorante après synthèse du complexe à base de ruthénium.

Le but de ce chapitre est de développer de nouveaux marqueurs pour l'analyse protéomique. D'une part, nous avons synthétisé des colorants fluorescents pour gel d'électrophorèse et nous avons formulé notre solution colorante. D'autre part, nous avons développé la synthèse de réactifs permettant la caractérisation et l'isolation de deux grandes classes de modifications post-traductionnelles : la glycosylation (ASC_GLY_BIOT et

ASCQ_GLY_FLUO) et l'oxydation (ASC_OX_BIOT et ASCQ_OX_FLUO). Ces réactifs originaux sont constitués d'une sonde permettant la reconnaissance de la fonction chimique recherchée, d'un bras espaceur, et d'une poignée permettant la manipulation de la protéine capturée.

II. L'analyse protéomique et la fluorescence

II.1. Les principales étapes de l'analyse protéomique

L'analyse protéomique combine plusieurs étapes, la première étant une étape de séparation des protéines, ensuite une étape de digestion permettant idéalement d'obtenir des polypeptides individualisés, puis une étape de caractérisation permettant d'identifier ces polypeptides. Dans une dernière étape, les données obtenues sont alors comparées aux informations de séquence protéique ou nucléique de bases de données pour identification de la protéine. Les protéines sont repérées sur le gel à l'aide d'une coloration appropriée avant d'être analysées par spectrométrie de masse. Les différentes étapes de préparation telles que l'excision des spots protéiques sur le gel d'électrophorèse, la digestion des protéines par la trypsine, le dépôt des échantillons sur la cible MALDI peuvent être effectuées soit de façon manuelle soit à l'aide des robots compatibles avec le haut débit présent au sein du plateau de protéomique de la génopole Lilloise.

II.1.1. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

L'électrophorèse bidimensionnelle^[7, 12] est la technique possédant le plus grand pouvoir séparatif. Elle peut séparer jusqu'à 10000 protéines sur un seul gel. Bien que d'autres techniques existent pour séparer les protéines, comme les séparations par chromatographie liquide à haute performance sur colonnes capillaires, nous ne nous intéresserons ici qu'à l'électrophorèse sur gel.

Avant tout, les échantillons doivent être modifiés de manière assez radicale pour permettre leur séparation par électrophorèse sur gel. Ainsi, les protéines doivent d'abord être dénaturées par de l'urée, pour annuler au maximum l'organisation tridimensionnelle et rendre les sites de protonation accessibles. Elles doivent ensuite être mises en présence de détergents non ioniques pour assurer leur solubilisation. Enfin, les protéines doivent être réduites et alkylées; les ponts disulfures qui participent à l'organisation structurale de la protéine sont

rompus par le dithioethreitol (DTT). Les fonctions thiols sont ensuite alkylées par l'iodoacétamide.

L'électrophorèse bidimensionnelle consiste à séparer les protéines : la première dimension les sépare selon leur charge (Figure IV.2), la deuxième, perpendiculaire à la première, selon leur poids moléculaire. L'électrofocalisation est une méthode qui sépare les protéines suivant leur charge, ou point isoélectrique, pI. La charge totale (nette) d'une protéine est la somme des charges locales de chaque résidu. Bien sûr, la charge totale varie en fonction de la composition de la protéine et du pH. Le point isoélectrique correspond au pH où la charge nette de la protéine est égale à 0. Les protéines sont chargées positivement à des pH inférieur à leur pI, et négativement à des pH supérieurs. Pour les séparer, les protéines sont placées sur une fine bandelette de polyacrylamide et soumises à un champ électrique pendant quelques heures.

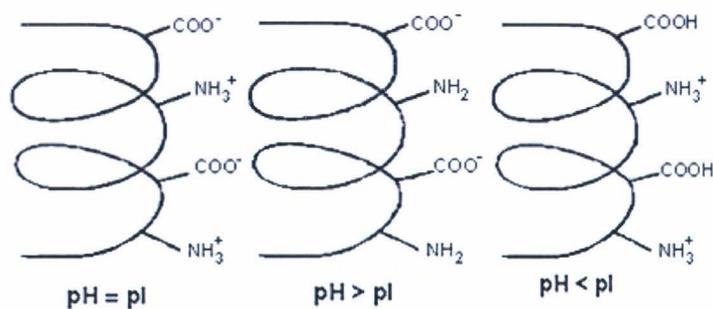


Figure IV.2 : Charges des protéines en fonction du pH et de leur point Isoélectrique.

Dans la deuxième dimension, la migration des protéines est déterminée par leur poids moléculaire (Figure IV.3). Le SDS (sodium dodécylsulfate) est un agent anionique qui se fixe sur les protéines, masquant la charge propre de ces dernières, en formant un complexe anionique ayant une charge nette négative. Le SDS rompt les ponts hydrogènes, bloque les interactions hydrophobes, et déplie partiellement les protéines (surtout en présence d'urée et de β-mercaptoéthanol qui coupe les ponts dissulfures). Les protéines sont totalement dépliées et réduites par addition de DTT et alkylées par addition d'iodoacétamide. Le gel de polyacrylamide sert de tamis moléculaire. La séparation des protéines se fera exclusivement en fonction de leur poids moléculaire. La distance de migration du polypeptide-SDS est proportionnelle au logarithme de son poids moléculaire et varie en fonction de la concentration en polyacrylamide du gel.

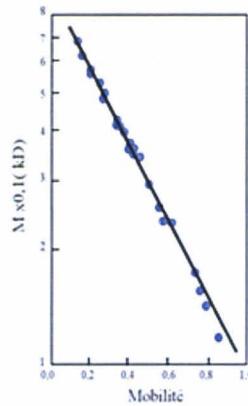


Figure IV.3 : Mobilité électrophorétique en fonction du poids moléculaires d'une protéine.

De manière très majoritaire, la visualisation des protéines est réalisée après la séparation, même si dans certains cas, les protéines sont marquées avant séparation électrophorétique. La détection des protéines sur le gel fera l'objet d'une discussion plus approfondie ultérieurement.

II.1.2. La digestion

Les protéines visualisées après électrophorèse 2D sont excisées du gel, et digérées par une protéase spécifique (en général la trypsine).^[13] La trypsine est une enzyme qui hydrolyse les protéines, en coupant après les résidus lysine et arginine si le résidu suivant n'est pas une proline (Figure IV.4). Elle permet d'obtenir des fragments peptidiques ayant chacun des masses différentes qui peuvent être analysés par spectrométrie de masse. Deux techniques sont utilisables selon les cas : l'analyse d'empreintes peptidiques par MALDI-TOF ou l'analyse de séquences peptidiques en mode MS/MS.

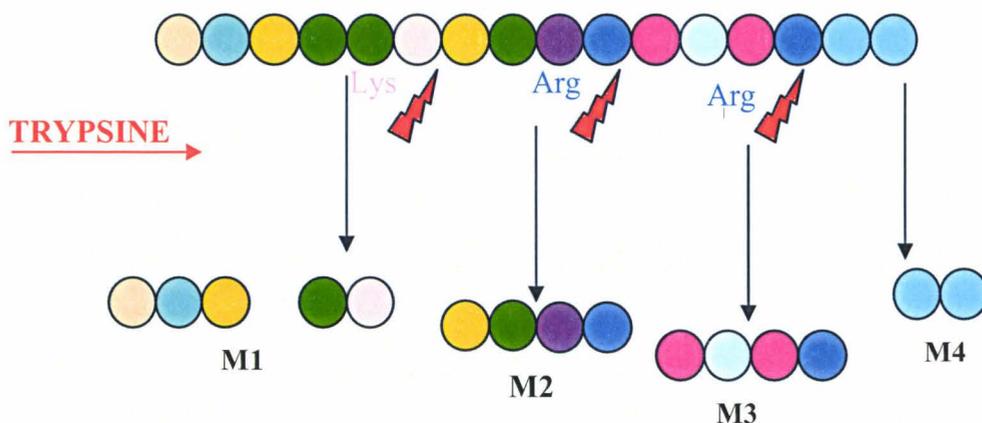


Figure IV.4 : La digestion trypsique.

II.1.3. L'analyse bioinformatique

Les données fournies par la spectrométrie de masse, une liste de peptides avec leur masse et leur séquence (partielle ou totale) sont ensuite confrontées aux données présentes dans des banques de données génomiques et protéomiques et permettent ainsi l'identification des protéines étudiées.

II.2. Détection des protéines sur gel d'électrophorèse

L'étape de coloration qui permet la visualisation des protéines est une étape très importante puisqu'elle nécessite une grande sensibilité afin de repérer toutes les protéines dans le but de les analyser. Les colorants existants sont variés, souvent ils sont à utiliser en Kit ou sous forme de solution colorante prête à l'emploi. Les caractéristiques et qualités de ces colorants sont très différentes tout comme leurs techniques d'utilisations. Une étude comparative des ces colorants va nous permettre de faire le point sur les différentes techniques utilisées actuellement.

II.2.1. Coloration par le nitrate d'argent

Cette méthode, l'une des plus complexes de toutes les colorations de gel, s'inspire de la révélation des photographies. Elle est basée sur l'affinité entre les protéines et les cations argent. Le protocole^[14-18] est composé de nombreuses étapes incluant un traitement de sensibilisation des protéines aux cations argentiques, une exposition à ces cations et enfin, une révélation permettant de visualiser les protéines.

Les procédures de coloration à l'argent peuvent être séparées en deux groupes, dépendant de l'état chimique dans lequel se trouve l'ion argent lors de l'imprégnation du gel.

Le premier groupe de méthodes est basé sur l'utilisation de nitrate d'argent et de formaldéhyde dans une solution alcaline. Le deuxième groupe utilise un complexe ammonium-argent associé au formaldéhyde dans une solution acide.^[14, 15] Différentes sensibilités sont obtenues avec ces méthodes, le seuil de détection protéique se situant à quelques nanogrammes de protéines détectables.

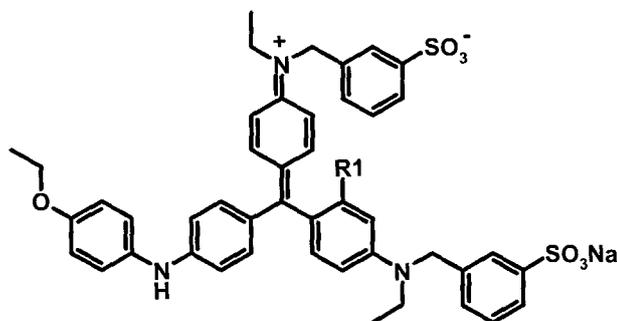
De nombreux protocoles ont été mis au point pour ces colorations à l'argent, cependant un des problèmes majeurs avec ces techniques est leur compatibilité avec la détection en spectrométrie de masse. La méthode la mieux adaptée a été développée par l'équipe de

Mann^[19] suite à de précédents travaux effectués par l'équipe de Rabilloud.^[14, 15] La modification majeure de ce protocole est l'abandon du traitement par le glutaraldéhyde pour éviter toute liaison covalente avec les protéines révélées. Quant à la compatibilité de cette technique avec la spectrométrie de masse, il semblerait qu'elle résulte du caractère de surface de ce type de révélation.

Les colorations à l'argent sont encore très utilisées du fait de leur très grande sensibilité (0.5-2 ng de protéines). Pourtant elles souffrent de nombreux autres inconvénients comme leur complexité d'utilisation ; en effet les protocoles sont des procédés multi-étapes assez fastidieux, de plus les réponses linéaires sont obtenues sur une gamme dynamique limitée de l'ordre de 10. Enfin, de très grandes variabilités gel à gel sont observées, et la méthode est très sale à mettre en oeuvre.

II.2.2. Les colorants organiques

Différents colorants organiques utilisés dans l'industrie alimentaire ou textile ont été adaptés à la détection de protéines séparées par électrophorèse. De tous ces colorants organiques, les plus populaires sont de loin les Brilliant Blue, R et G, plus connus sous le nom de Bleu de Coomassie^[20] (Figure IV.5).



Nom	R1
Bleu Coomassie R	H
Bleu Coomassie G	CH ₃

Figure IV.5 : Structure des bleu de Coomassie R et G.

Ces colorants sont de la famille des triphénylméthanes (Figure IV.5), des molécules à caractère aromatique très fort, avec des coefficients d'extinction molaire élevés. La présence du zwitterion assure la bonne affinité pour les protéines. La limite de détection des Bleus de Coomassie est de l'ordre du microgramme. Même si la reproductibilité gel à gel est difficile à obtenir, les Bleus de Coomassie ont l'avantage de colorer les protéines de manière uniforme, indépendamment de leur composition en acides aminés (à l'exception des pI extrêmes, et des glycoprotéines).

Pour améliorer la sensibilité des Bleus de Coomassie (mille fois moins sensibles que les meilleures colorations à l'argent), une formulation colloïdale a été mise au point^[21]. Les quantités détectées sont de l'ordre de 100 ng. Grâce à sa simplicité, son faible coût, et sa bonne compatibilité avec la microcaractérisation, cette méthode est très compétitive.

II.2.3. Les techniques basées sur la fluorescence

Ces dernières années une nouvelle catégorie de colorants, les colorants fluorescents, a été développée et rencontrent un grand succès. Outre la sensibilité de détection protéique par ces fluorophores, reconnue comme supérieure aux techniques citées précédemment, la fluorescence offre un potentiel de détection linéaire sur trois ordres de grandeur rendant son utilisation idéale pour l'analyse d'un protéome d'un point de vue dynamique et quantitatif.^[22] Ainsi, les techniques utilisant des fluorophores semblent gagner en popularité malgré les coûts d'utilisation non négligeables qu'elles imposent.^[23, 24]

II.2.3.1. Introduction à la fluorescence

La fluorescence est définie comme l'émission électromagnétique, particulièrement de lumière visible, qui a lieu depuis une substance lorsque cette dernière a été soumise à une radiation incidente.

Le processus responsable de la fluorescence d'une sonde fluorescente (ou fluorophore) est illustré par le diagramme des états électroniques, ou diagramme de Jablonski (Figure IV.6).

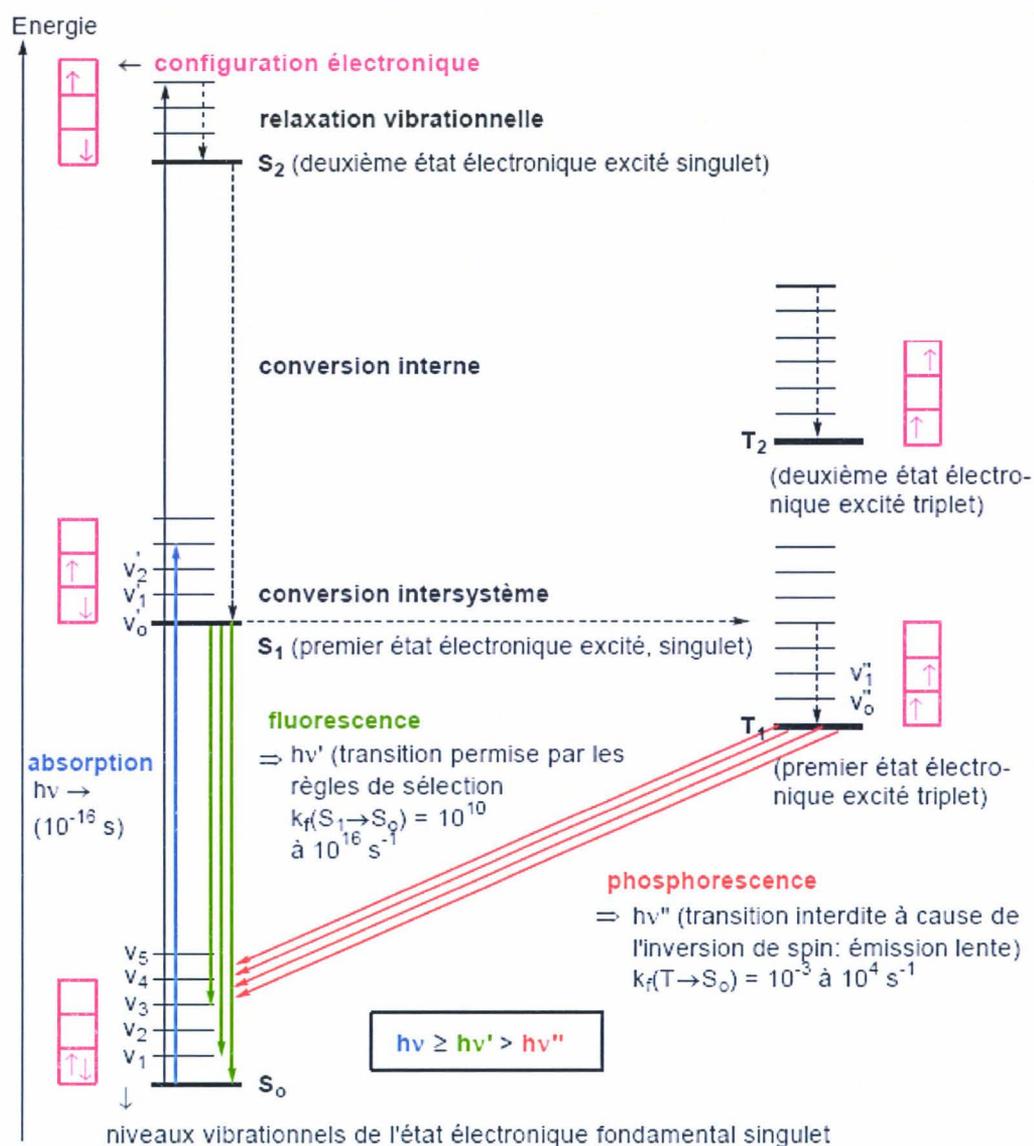


Figure IV.6 : Diagramme de Jablonski.

La molécule est excitée par une radiation appropriée, ce qui l'élève à un état excité pour une durée brève. La durée de vie de fluorescence, c'est à dire le temps passé dans l'état excité est court, de l'ordre de la nanoseconde (pour les fluorophores à longue durée de vie, elle peut atteindre 400 ns). L'énergie de l'état S_1 est partiellement dissipée, conduisant à un état excité singulet relaxé S_1 , depuis lequel les photons sont émis. La fluorescence n'est pas responsable de la totalité de la transition $S_1 \rightarrow S_0$. Des pertes d'énergie, sont également dues à des inhibitions par collision, ou à des conversions inter-systèmes.

La dissipation d'énergie est intimement liée au Stokes' shift (déplacement de Stoke). C'est la différence d'énergie entre les photons absorbés $h\nu$ et les photons émis $h\nu'$.

Le Stokes shift est indissociable de la sensibilité des techniques d'analyse par fluorescence, puisqu'il permet de détecter les photons d'émission indépendamment des photons d'excitation avec un faible bruit de fond. Le Stokes' shift se traduit concrètement par la différence de longueur entre l'excitation et la mesure (Figure IV.7).

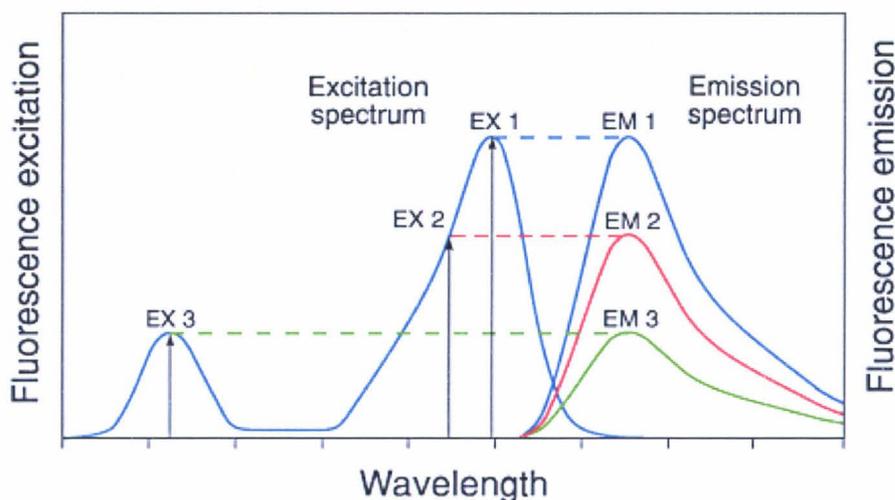


Figure IV.7 : Longueurs d'onde d'absorption et d'émission.

Il convient de distinguer la fluorescence de la phosphorescence, qui provient elle de l'état triplet. La désexcitation de l'état triplet est beaucoup plus lente que celle de l'état singulet, et l'émission de lumière perdue après la fin de l'excitation. Les transitions entre les différents niveaux d'énergie sont soumises à des règles de sélection qui interdisent notamment le passage d'un état singulet à un état triplet (sauf dans des cas extrêmes où les molécules comportent certains atomes lourds).

La fluorescence d'une molécule est mesurée en nombre de photons émis par seconde, et la qualité intrinsèque du fluorophore est donnée par le rendement quantique de fluorescence. Une durée de vie longue et un rendement quantique élevé sont des critères très importants lors du choix d'un fluorophore.

II.2.3.2. Colorants fluorescents en protéomique

Parmi tous les colorants disponibles sur le marché à l'heure actuelle, les propriétés physico-chimiques des marqueurs fluorescents font d'eux les plus intéressants. L'une des plus grandes qualités des colorants fluorescents vient du fait que la détection du signal primaire

fournit une réponse linéaire par rapport à la quantité de protéines sur une bien plus grande gamme que les colorants non fluorescents.

En effet, l'un des grands défis de la protéomique est la détection efficace des protéines de plus basse expression. Dans une cellule, les protéines sont présentes en quantité extrêmement variable, depuis l'unité pour certaines protéines membranaires, jusqu'à quelques dizaines de milliers. Les colorants fluorescents sont ceux qui offrent, la plus forte sensibilité en électrophorèse sur gel. La coloration par fluorescence est très prisée lorsque la détection de protéines de très faible expression est en jeu. Des quantités de protéines de l'ordre du nanogramme sont aisément détectées.

Les colorants fluorescents présentés ci-après sont regroupés en deux grandes classes : ceux liés de manière covalente à la biomolécule, et ceux liés de manière non covalente.

II.2.3.2.1. Marquage covalent

Deux approches sont à distinguer dans le marquage covalent des protéines : une approche réversible et une approche non réversible. Le marquage pré-électrophorétique non réversible a été décrit par exemple pour des colorants comme les cyanines^[25, 26] Cy3 et Cy5.

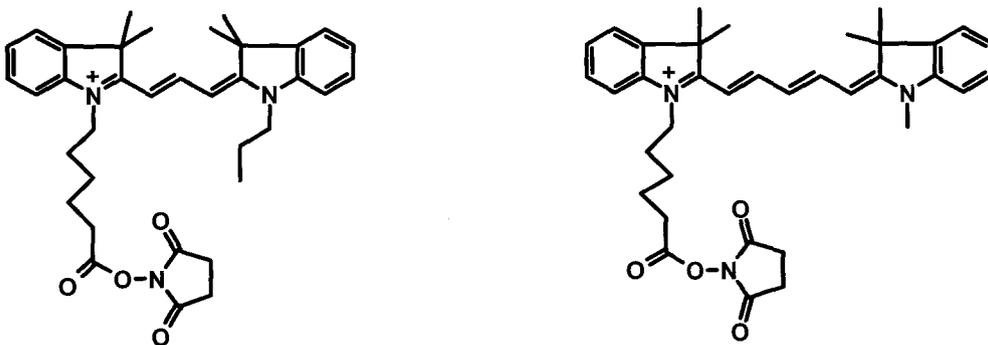


Figure IV.8 : Structure des cyanines Cy3 et Cy5 (marquage sur les lysines).

Ces cyanines ont une structure de type « push-pull » (un centre donneur et un centre accepteur d'électrons reliés par un système conjugué), et portent un ester succinimidyl, utilisé pour réagir avec les amines primaires des lysines, ainsi que les amines α N-terminaux. A l'inverse de certains colorants basés sur la réaction avec les groupes sulfhydryl des cystéines, Cy3 et Cy5 donnent une coloration plus homogène, puisqu'il n'existe que très peu de protéines sans lysine, alors que 14% des protéines ne portent pas de résidus cystéine (par exemple l'anhydrase carbonique bovine).

L'inconvénient majeur des colorations covalentes pré-électrophorétiques réside dans la modification du poids moléculaire de la protéine. Cela ne représente pas un réel problème pour les protéines de haut poids moléculaire, mais peut amener une différence substantielle de migration pour les protéines plus légères. De plus, il a été remarqué que les protéines marquées avaient un profil de migration plus étendu.^[26]

Comparativement, moins de marquages covalents post-électrophorétiques ont été décrits. Notons tout de même une technique récemment développée au laboratoire,^[27] qui utilise un marquage covalent grâce à un complexe de ruthénium (Figure IV.9), par la substitution d'un ester activé.

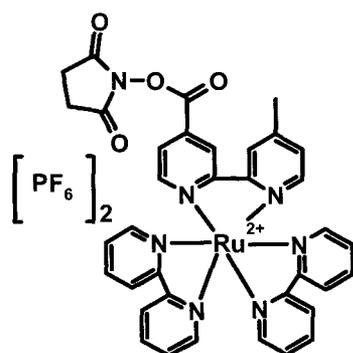


Figure IV.9 : Ru(bipy)₂bipy-OSu.

Cette technique a prouvé son efficacité sur des gels mono et bidimensionnels, pour détecter des quantités de l'ordre du nanogramme. Ces techniques post-électrophorétiques ont l'avantage de ne pas altérer la migration des protéines, mais elles posent le problème de la réactivité dans un milieu aussi visqueux qu'un gel de polyacrylamide.

Les techniques de colorations covalentes ont l'avantage de lier fermement le colorant aux peptides. Cet avantage se transforme en inconvénient lorsque ces mêmes peptides sont analysés en spectrométrie de masse. Les masses des peptides modifiés ne sont pas nécessairement répertoriées dans les banques de données, ce qui rend l'identification des protéines difficiles.

II.2.3.2.2. Marquage non covalent

Le marquage non covalent des protéines concerne la plupart des colorants actuels. Il repose le plus fréquemment sur des interactions électrostatiques directement entre le colorant

et les protéines, ou par l'intermédiaire du surfactant entourant celles-ci. Parmi ces colorants électrostatiques, plusieurs (Sypro Orange,^[28-30] Sypro Rouge,^[29, 30] Sypro Tangerine^[31] et Sypro® Ruby^[10]) ont été commercialisés récemment afin de répondre aux attentes de sensibilité. Ces fluorophores détectent jusqu'à 4 ng de protéines en une seule étape de coloration de 30 à 60 minutes, rivalisant avec les techniques de coloration classique.

L'un de ces fluorophores récemment développés à base de ruthénium, le Sypro® Ruby, se lie de manière non covalente aux protéines et repousse les limites de détection jusque là atteintes. Des quantités de protéines inférieures au nanogramme peuvent ainsi être détectées par ce fluorophore sur une gamme dynamique de trois ordres de grandeur,^{[10],[32]} Cependant, le coût excessif du produit incite les utilisateurs à le diluer^[33] ou à développer leur propre formulation à partir de complexes de ruthénium.

Ce fluorophore est un complexe de ruthénium et de polypyridines, attribué au Ruthénium (II) tris(bathophénantroline) disulfonate selon une publication indépendante^[34] (Figure IV.10).

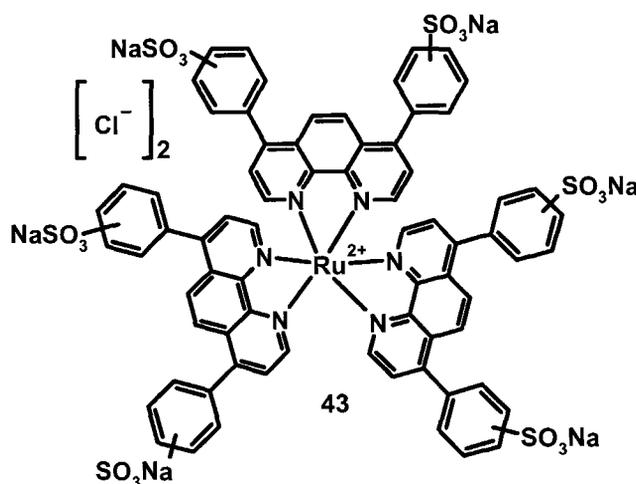


Figure IV.10 : Structure proposée pour le fluorophore de Sypro® Ruby.

III. Développement de nouveaux colorants fluorescents pour l'analyse protéomique

L'électrophorèse bidimensionnelle est aujourd'hui la technique séparative la plus fréquemment utilisée, pour ses qualités résolutive et visuelle. Cependant l'une des principales limites de cette technique est associée à la dynamique d'expression des protéines dans la cellule. Comme nous l'avons vu précédemment les protéines de plus faibles

expressions sont présentes dans une cellule à hauteur de 50 à 100 molécules contrairement aux espèces plus abondantes représentées par 10^7 molécules. Cette gamme d'expression très étendue rend illusoire la visualisation et la caractérisation des protéines minoritaires dans un extrait cellulaire total. C'est pourquoi le développement de nouveaux colorants fluorescents offrant des qualités tant en terme de sensibilité que de dynamique linéaire est essentiel. Nous voulons donc optimiser ces propriétés et comprendre l'influence des différents composants de notre formule sur ces deux paramètres. Nous cherchons dans un premier temps à reformuler le Sypro® Ruby, le colorant offrant actuellement sur le marché les meilleures qualités en terme de limite de détection et de gamme dynamique linéaire, et ensuite à synthétiser de nouveaux complexes aux propriétés voisines de celui de Sypro® Ruby afin d'évaluer leur capacité à révéler les gels d'électrophorèse.

III.1. Formulation d'un colorant fluorescent

Comme nous l'avons vu précédemment, Sypro® Ruby est actuellement le colorant le plus prisé des biochimistes. Le seul inconvénient de son utilisation est son prix (une centaine d'euros pour un gel 2D), qui est souvent prohibitif, et empêche son utilisation en routine. Notre objectif était donc de déformuler puis de reformuler cette solution commerciale pour développer une solution de coloration à la fois sensible et peu onéreuse, et éventuellement améliorer les performances de Sypro® Ruby.

III.1.1. Déformulation de la solution commerciale de Sypro® Ruby

III.1.1.1. Analyse RMN

L'analyse ^1H RMN a permis de mettre en évidence la présence de 1-2 propanediol, de DMSO et d'acide acétique (Figure IV.11)

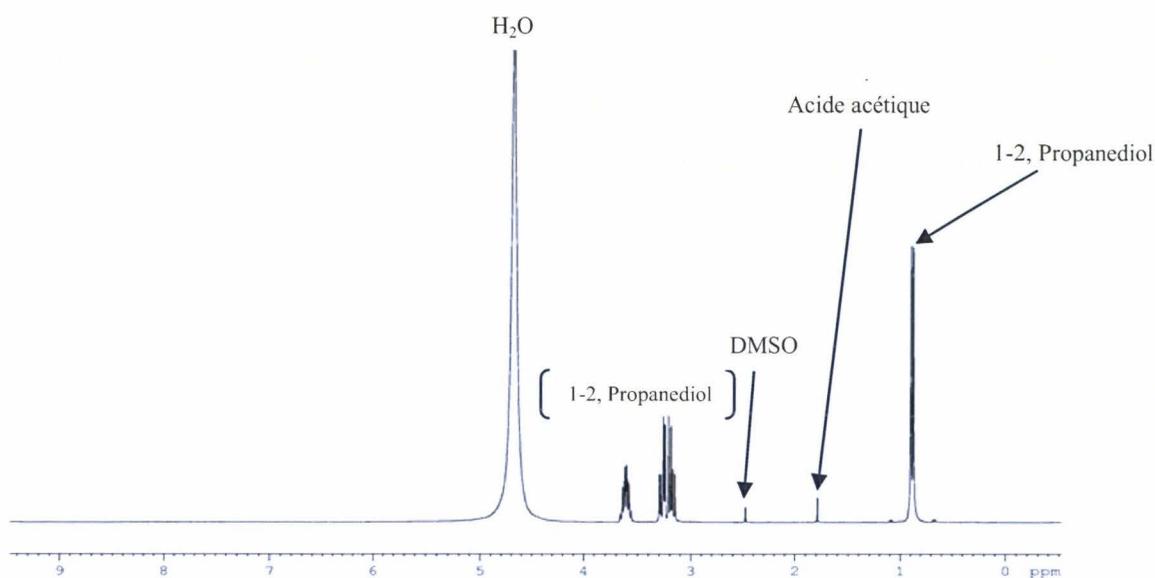


Figure IV.11 : Spectre RMN Du SYPRO Commercial.

III.1.1.2. Analyse Élémentaire

Une évaporation poussée de la solution commerciale de Sypro® Ruby a permis de détecter la présence de sels. Les résultats de l'analyse élémentaire (Tableau IV.1) ont mis en évidence une quantité importante de magnésium. Cependant il est difficile d'interpréter la totalité des résultats puisque les éléments analysés constituent environ 50% de la masse de l'échantillon analysé.

Elément	Concentration
Carbone	31,87%
Hydrogène	7,43%
Azote	<0,10%
Souffre	0,38%
H ₂ O	3,07%
Phosphore	142 ppm

Sodium	1,43%
Potassium	288 ppm
Magnésium	6,73%
Ruthénium	0,45%
Zinc	<20 %

Tableau IV.1 : Analyse élémentaire du Sypro® Ruby.

III.1.2. Stratégie de synthèse de Ru(BPS)₃

Afin de préparer notre propre solution colorante et de la comparer avec celle du Sypro® Ruby, nous avons tout d'abord commencé par la synthèse de notre molécule (Ru(BPS)₃). Plusieurs stratégies sont envisageables pour synthétiser le Ru(BPS)₃ (Figure IV.12). Une première consiste à chauffer à reflux du chlorure de ruthénium et un léger excès de bathophénanthrolinedisulfonate (BPS) dans des solvants protiques pendant de nombreuses heures. Cette méthode a été décrite par Castellano.^[35] Elle implique l'addition progressive des bathophenanthrolines disulphonate sur le métal. La seconde^[36] consiste à mettre en présence du pentachlororuthénate de potassium et trois équivalents de ligand, et de réaliser la réduction par l'ascorbate de sodium (plusieurs réducteurs sont appropriés pour cette méthode, comme les phosphites, ou encore le dihydrogène, mais l'ascorbate s'est montré le plus fiable et le plus facile à mettre en œuvre).³⁶

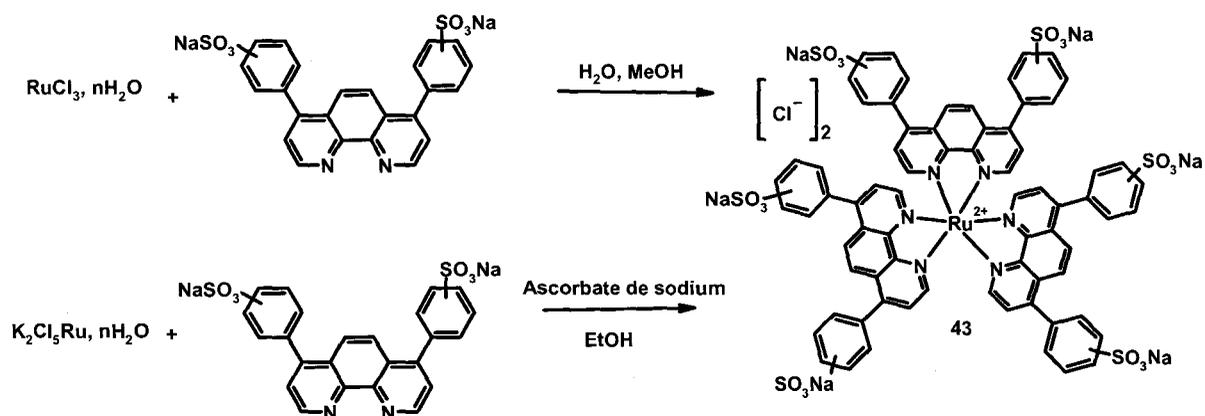


Figure IV.12 : Synthèses de Ru(BPS)₃

La synthèse de Rabilloud^[36] a l'avantage d'être beaucoup plus rapide. Il ne faut en effet qu'une heure environ pour obtenir le produit. Cependant, sa mise en œuvre est légèrement plus contraignante. Elle nécessite l'addition d'ascorbate de sodium, et un ajustement final du pH délicat.

Dans la synthèse de Castellano,^[35] les réactifs sont mis à reflux dans l'eau pendant au moins deux jours, et conduisent à des cristaux noirs, purifiés par chromatographie sur Sephadex L20. Nous avons décidé de modifier cette synthèse, en ajoutant du méthanol à l'eau, en recristallisant le produit dans l'acétone, et en réalisant la purification sur une cartouche de silice C18. Le méthanol a pour effet de diminuer la proportion de sous-produits et la cartouche Si-C18 permet une purification rapide et reproductible. Le rendement est autour de 70%. La caractérisation du produit pur ainsi obtenu est réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF en utilisant l'acide 3,4-dihydroxybenzoïque comme matrice, et les pics observés pour Ru(BPS)₃ sont parfaitement corrélés avec la simulation informatique de la distribution isotopique, comme le montre la Figure IV.13 et IV.13'.

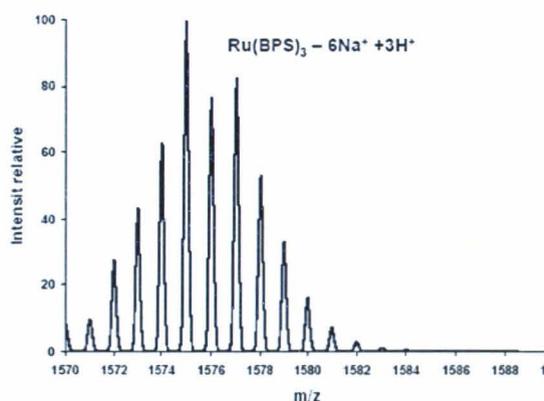


Figure IV.13 : Spectre MALDI de Ru(BPS)₃

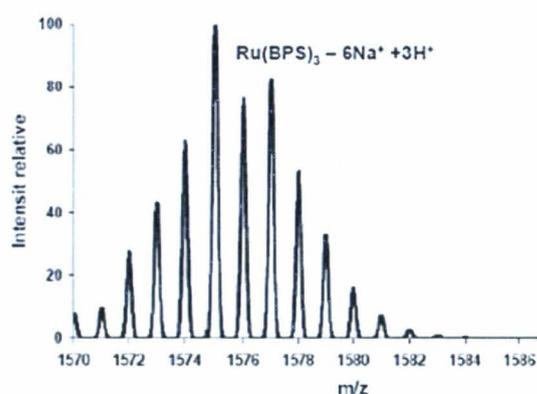


Figure IV.13' : Simulation informatique de la distribution isotopique de Ru(BPS)₃

Le spectre de fluorescence (Figure IV.14) atteste de la similitude entre notre produit et la molécule active de Sypro® Ruby. Le maximum d'intensité est identique autour de 630 nm, et le même épaulement est observé vers 680 nm.

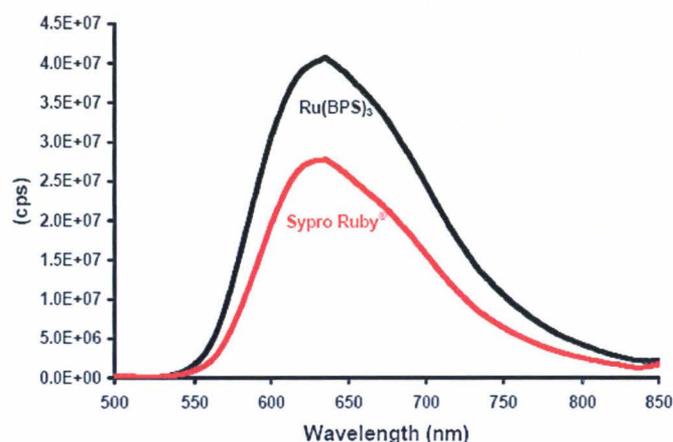


Figure IV.14 : Spectres d'émission de Sypro® Ruby et Ru(BPS)₃

III.1.3. Formulation de la solution colorante à base de Ru(BPS)₃

La révélation des protéines par le complexe Ru(BPS)₃, a fait l'objet d'une grande campagne d'optimisation au laboratoire. Cette phase de développement a été effectuée sur des gels SDS-PAGE monodimensionnel sur lesquels sont séparés des mélanges protéiques issus de kits standards (*High Molecular Weight Calibration Kits, Low Molecular Weight Calibration*, Amersham Biosciences). Le mélange utilisé est composé de 11 protéines présentes en proportions variables (la myosine, l' α_2 -macroglobuline, la β -galactosidase, la transferrine, la glutamate déshydrogénase et la phosphorylase B, l'Albumine, l'ovalbumine, la carbonique anhydrase, un inhibiteur de trypsine et l' α -lactalbumine). A partir d'un échantillon contenant 752 μg de protéines totales (les quantités relatives de chacune des protéines sont présentées sur le tableau **IV.2**), des dilutions successives sont effectuées.

Protéines de hauts poids moléculaires	MW (Dalton)	Quantité (μg)
Myosine	220000	25
α_2 -Macroglobuline	170000	100
β -Galactosidase	116000	16
Transferrine	76000	17
Glutamatedéshydrogénase	53000	18

Phosphorylase b	97000	67
Albumine	66000	83
Ovalbumine	45000	147
Anhydrase Carbonique	30000	83
Inhibiteur de Trypsine	20100	80
α -Lactalbumine	14400	116

Tableau IV.2 : Composition du mélange protéique utilisé.

La coloration post-électrophorétique développée est composée de trois étapes, (i) une fixation, (ii) une coloration des protéines et (iii) un lavage du gel préalablement à l'acquisition d'image. L'étape de fixation des protéines séparées sur gel d'électrophorèse a pour principal objectif d'éviter la diffusion des protéines. Inspirés des solutions de fixation utilisées pour le Sypro® Ruby, nous avons choisi d'utiliser une solution composée de 10% d'éthanol et 7% d'acide acétique. L'étape de lavage est effectuée avec une solution composée de 30% de méthanol et 10% d'acide acétique.

Afin de tester l'influence de différents paramètres nous sommes partis d'une formule de base inspirée des informations trouvées dans la littérature et notamment dans le brevet publié par Molecular PROBE (Tableau IV.3).^[11]

Constituants de la formule	Quantité	Pourcentage massique
Acide Acétique	17,5 mL	7%
Ethanol	63 mL	25%
Ru(BPS) ₃	0,7 mg	4 mg.L ⁻¹
Eau	Qsp 250mL	

Tableau IV.3 : Composition de la formule de départ

III.1.3.1. Influence de la quantité de complexe

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la quantité de complexe nécessaire pour une détection satisfaisante des protéines. Inspirés du Brevet publié par Molecular Probe,¹¹ qui propose des applications avec des solutions ayant une concentration de 1,5 mM à 2 mM de complexe soit une concentration massique comprise environ entre 2,5 et

3,5 mg/L, nous avons choisi de tester quatre concentrations différentes en complexe $\text{Ru}(\text{BPS})_3$ (2 mg/L, 2,8 mg/L, 4 mg/L et 6 mg/L).

Les figures **IV.15** à **IV.18** représentent les gels colorés avec quatre solutions à base d'acide acétique (7%), d'éthanol (25%) et les concentrations en complexe, citées ci-dessus. Les gels représentés ont été scannés après 2 heures de lavage dans une solution contenant 30% de méthanol et 10% d'acide acétique.

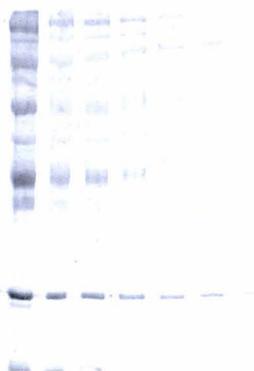


Figure IV.15 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 7% acide acétique, 2 mg/L $\text{Ru}(\text{BPS})_3$

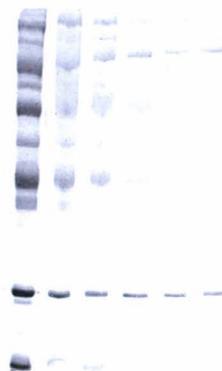


Figure IV.16 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 7% acide acétique, 2,8 mg/L $\text{Ru}(\text{BPS})_3$

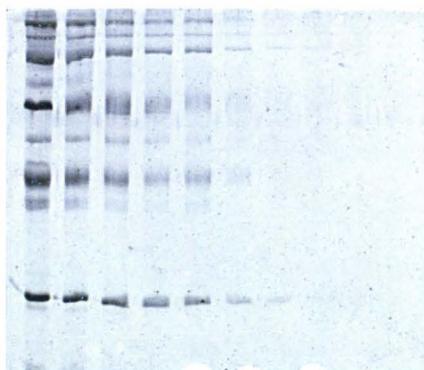


Figure IV.17 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 7% acide acétique, 4 mg/L $\text{Ru}(\text{BPS})_3$



Figure IV.18 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 7% acide acétique, 6 mg/L $\text{Ru}(\text{BPS})_3$

Après deux heures de lavage, les gels présentent des caractéristiques assez proches, on détecte en effet sur les quatre gels les six premières bandes de protéines. Cependant si ces mêmes gels sont comparés après seulement 30 minutes de coloration, les différences sont beaucoup plus marquées. Les Figures **IV.19** à **IV.22** représentent donc ces mêmes gels après 30 minutes de lavages. Dans ce cas les gels colorés avec 4 et 6 mg/L de colorant apparaissent beaucoup moins contrastés.

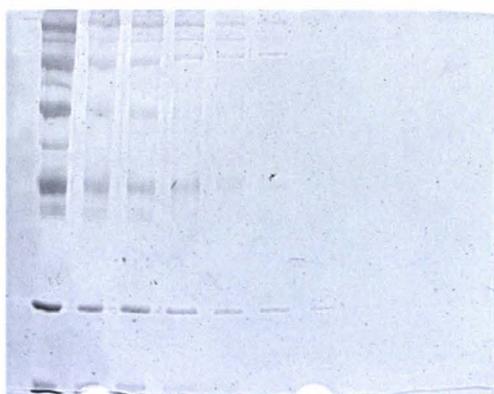


Figure IV.19 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 7% acide acétique, 2 mg/L $\text{Ru}(\text{BPS})_3$

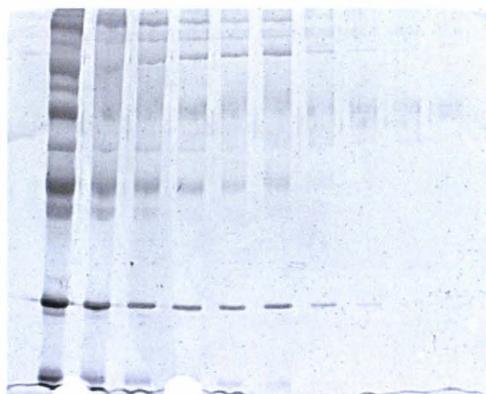


Figure IV.20 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 7% acide acétique, 2,8 mg/L $\text{Ru}(\text{BPS})_3$

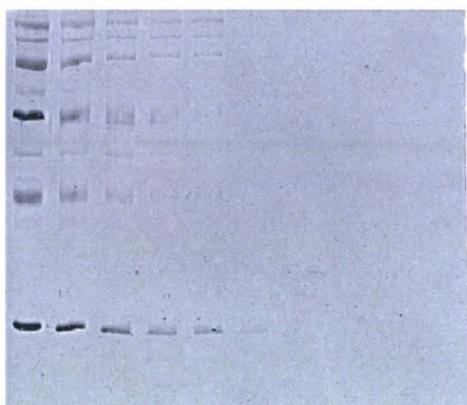


Figure IV.21 : Gel coloré avec une solution contenant 25 % EtOH, 7% acide acétique, 4 mg/L $\text{Ru}(\text{BPS})_3$

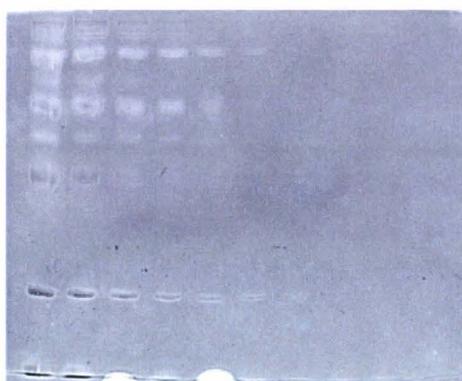


Figure IV.22 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 7% acide acétique, 6 mg/L $\text{Ru}(\text{BPS})_3$

Avec ce type de considération, nous avons donc choisi de poursuivre les expériences suivantes avec des solutions colorantes à 2,8 mg/l de complexe $\text{Ru}(\text{BPS})_3$.

III.1.3.2. Influence du solvant

Le deuxième paramètre que nous avons voulu tester est le solvant. Nous avons donc décidé d'évaluer le propanediol, puisqu'il est présent dans la formule commerciale, l'éthanol et l'acétonitrile. Les Figures **IV.23** à **IV.25** montrent que les résultats concernant la sensibilité de détection semblent meilleurs avec la solution à base d'éthanol : le remplacement de l'acétonitrile par l'éthanol a par exemple multiplié la sensibilité par un facteur deux à trois. Le choix de l'éthanol comme solvant constitutif de la solution de coloration s'est donc imposé à nous pour la suite des expériences.

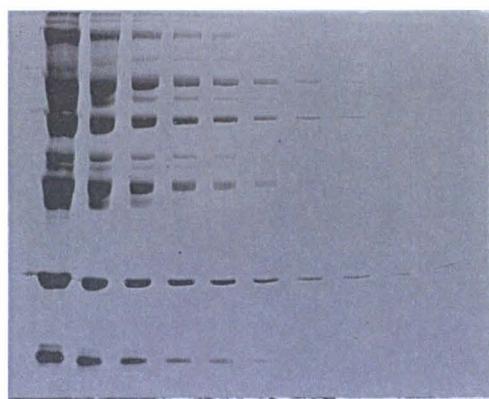


Figure IV.23 : Gel coloré avec une solution contenant 25% Acétonitrile, 7% acide acétique, 2,8 mg/l Ru(BPS)₃

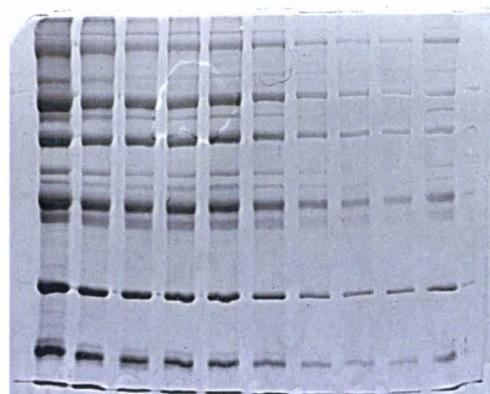


Figure IV.24 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 7% acide acétique, 2,8 mg/l Ru(BPS)₃



Figure IV.25 : Gel coloré avec une solution contenant 25% Propanediol, 7% acide acétique, 2,8 mg/l Ru(BPS)₃

III.1.3.3. Influence de l'acide

Dans la plupart des solutions colorantes où des interactions électrostatiques entre protéines et colorants interviennent, comme celles au bleu de Coomassie, l'acide est utilisé afin de favoriser les interactions entre le colorant et les acides aminés basiques des protéines (liaisons hydrogènes, liaisons de type Van der Waals). Inspirés des solutions alcooliques utilisées pour les colorations au bleu de Coomassie et au regard des résultats de la déformulation, nous nous sommes donc intéressés dans un premier temps à l'acide acétique. Comme le montrent les Figures IV.26 à IV.28 une augmentation de la concentration en acide augmente la sensibilité de la détection. En effet, lorsque la concentration en acide acétique passe de 3,5% à 7 %, puis à 14%, un nombre de bandes supérieur, correspondant à des concentrations décroissantes, est observé.

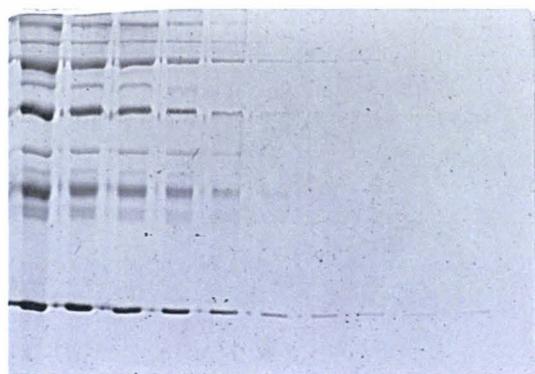


Figure IV.26 : Gel coloré avec une solution contenant EtOH (25%), (3,5%) acide acétique, 2,8 mg/L Ru(BPS)₃



Figure IV.27 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 7% acide acétique, 2,8 mg/L Ru(BPS)₃

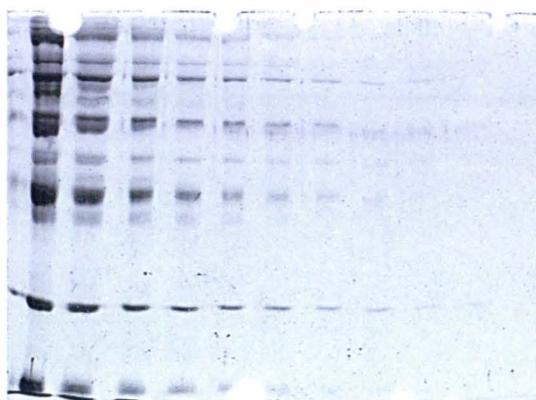


Figure IV.28 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 14% acide acétique, 2,8 mg/L Ru(BPS)₃

Une augmentation de la quantité d'acide semble donc favoriser la coloration des protéines, et plus particulièrement les interactions protéines-colorants. Cependant les variations de concentration en acide acétique appliquées dans ces différentes solutions n'influent que très peu sur le pH. En effet, pour des concentrations en acide acétique de 3,5, 7 et 14% (V/V), le pH prend respectivement les valeurs 2,5, 2,38 et 2,19. Partant de ces premières observations, nous avons alors testé un acide plus fort, l'acide trichloroacétique. Nous avons donc poursuivi l'étude avec des solutions colorantes à base d'acide trichloroacétique mais à des concentrations plus faibles de 0,1%, 1% et 3,5%, pour éviter d'avoir un pH trop bas, ce qui pourrait altérer le complexe de ruthénium et influencer sur les protéines elles-mêmes. Les gels représentés sur les Figures **IV.39** à **IV.31** ont été scannés après 60 min de lavage.

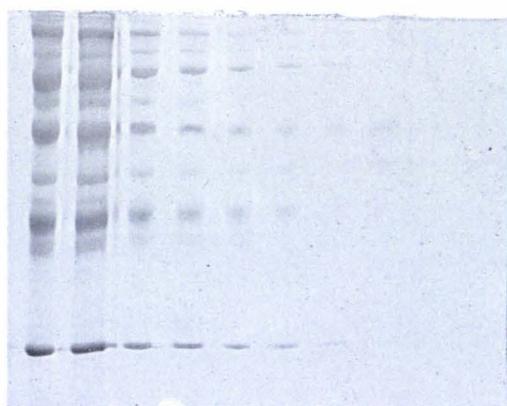


Figure IV.29 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 3% acide trichloroacétique, 2,8 mg/L $\text{Ru}(\text{BPs})_3$ pH=0,3, Lavage 60 min

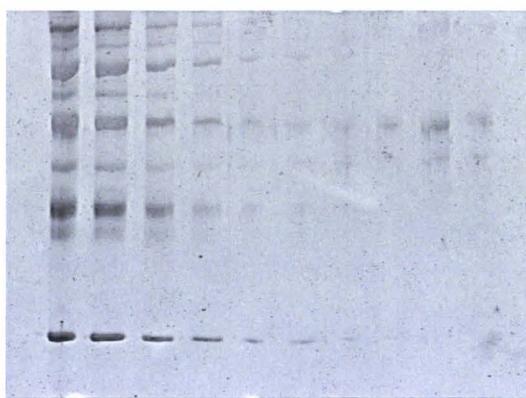


Figure IV.30 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 1% acide trichloroacétique, 2,8 mg/L $\text{Ru}(\text{BPs})_3$ pH = 1,16, Lavage 60 min

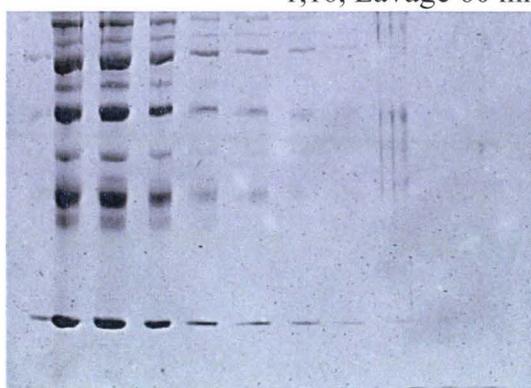


Figure IV.31 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 0,1% acide trichloroacétique, 2,8 mg/L $\text{Ru}(\text{BPS})_3$ pH=0,3, Lavage 60 min

D'après ces résultats nous avons observé que la coloration à l'acide acétique apparaît comme plus performante et nous avons donc décidé de poursuivre les expériences avec une solution constituée d'acide acétique à 14 %.

III.1.3.4. Influence du DMSO

L'analyse RMN du Sypro® Ruby nous a indiquée la présence de DMSO, nous avons donc souhaité évaluer l'influence de ce dernier sur la coloration de nos gels.

Dans les deux cas observés sur les figures **IV.32** à **IV.35**, le DMSO, qu'il soit utilisé dans la solution de coloration à 5 ou 10%, n'améliore pas la coloration et semble même diminuer la sensibilité de la détection. Il est donc surprenant que ce produit soit utilisé dans la solution commerciale de Sypro® Ruby. Il est probable que certains produits utilisés dans la formule commerciale aient pour simple rôle d'en masquer d'autres, présents en quantité

inférieure, mais dont l'influence sur la coloration est sans doute bien supérieure. De plus le DMSO a pu être utilisé pour favoriser la solubilisation de certains autres additifs.

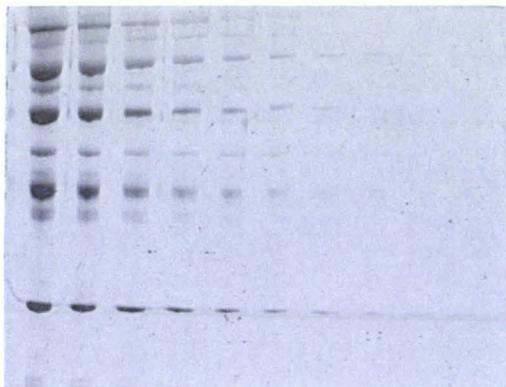


Figure IV.32 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 14% acide acétique, 10% DMSO, 2,8 mg/L Ru(BPS)₃

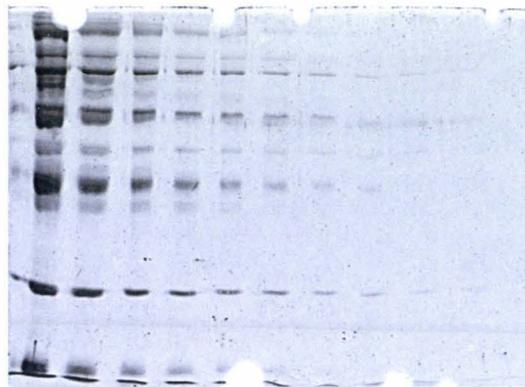


Figure IV.33 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 14% acide acétique, 2,8 mg/L Ru(BPS)₃

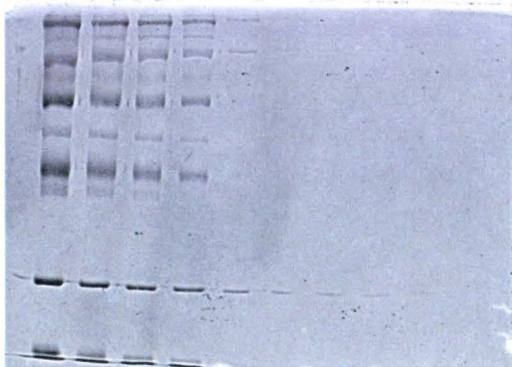


Figure IV.34 : Gel coloré avec une solution contenant EtOH (25%), 7% acide acétique, DMSO (5%), 2,8 mg/L Ru(BPS)₃

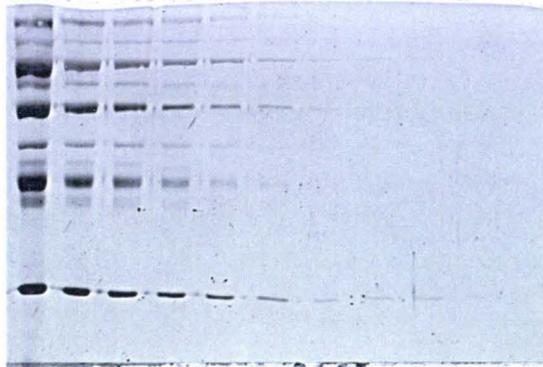


Figure IV.35 : Gel coloré avec une solution contenant EtOH, 7% acide acétique, 2,8 mg/L Ru(BPS)₃

III.1.3.5. Effet de sel

A partir d'observations faites lors de colorations au Sypro® Ruby, qui mettent en évidence un agrandissement du gel au cours de l'étape de coloration, nous nous sommes intéressés aux paramètres pouvant influencer sur le gonflement des gels d'acrylamide. Par ailleurs, l'évaporation du Sypro commercial nous avait conduit à une masse de sels importante. Nous avons donc étudié l'influence des sels sur le gonflement des gels. En effet, lors des étapes de fixation, coloration et lavage, le gel peut subir des phases de gonflement ou de contraction, influant sur la fermeture ou l'ouverture de ses pores et permettant une diffusion plus ou moins grande du colorant à travers la matrice.

Inspirés d'observations faites par Livney et collaborateurs^[37] sur le gonflement de gels d'acrylamide dans des solutions salines, nous avons décidé de tester un sel entraînant un gonflement du gel (NaBr) et un autre conduisant à sa contraction (KF). Nous avons également testé l'influence d'un sel divalent, le $MgCl_2$. (Le magnésium étant d'autant plus présent en grande quantité dans les résultats de l'analyse élémentaire). Les tests ont été effectués à une concentration de 2 molaires de sels dans la solution colorante. Les gels présentés sur les Figures IV.36 à IV.39 ont été scannés après 60 minutes de lavage dans une solution à 25% en EtOH et 14% en acide acétique.

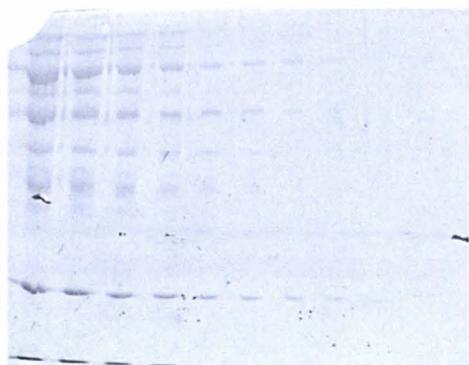


Figure IV.36 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 14% acide acétique, $MgCl_2$ 2 M, 2,8 mg/L de $Ru(BPs)_3$



Figure IV.37 : Gel coloré avec une solution contenant 25% d'EtOH, 14% acide acétique, NaBr 2 M, 2,8 mg/L de $Ru(BPs)_3$

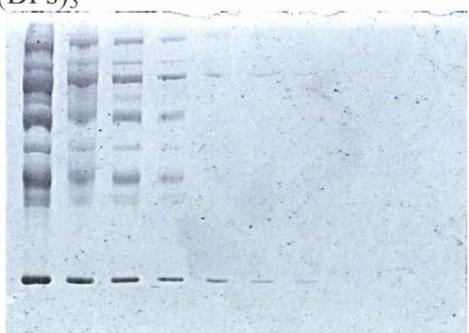


Figure IV.38 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 14% acide acétique, KF 2 M, 2,8 mg/L de $Ru(BPs)_3$

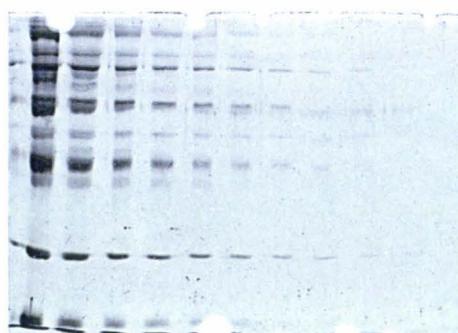


Figure IV.39 : Gel coloré avec une solution contenant 25% d'EtOH, 14% acide acétique, 2,8 mg/L de $Ru(BPs)_3$

Les variations de taille de gels sont en accord avec les observations de Livney et collaborateurs : le gel coloré pendant une nuit dans une solution constituée de NaBr s'est élargi de 8,7% et celui coloré par une solution constituée de KF s'est rétracté d'environ 7%. Enfin l'addition de $MgCl_2$ à la solution de coloration a conduit à un élargissement de plus de 16%. En comparaison, un gel coloré avec une solution « classique » constituée de 25% d'éthanol et de 14% d'acide acétique ne voit sa taille que très peu évoluer durant la phase de

coloration. D'autre part, le nombre de bandes protéiques détectées est sensiblement plus important avec la solution composée de $MgCl_2$, par comparaison avec les gels colorés avec des solutions contenant du $NaBr$ et du KF .

III.1.4. Comparaison avec la solution commerciale Sypro® Ruby

Après ces étapes d'optimisation, nous avons donc comparé notre solution la plus sensible avec la solution commerciale de SyproRuby (Figures IV.40 et IV.41).

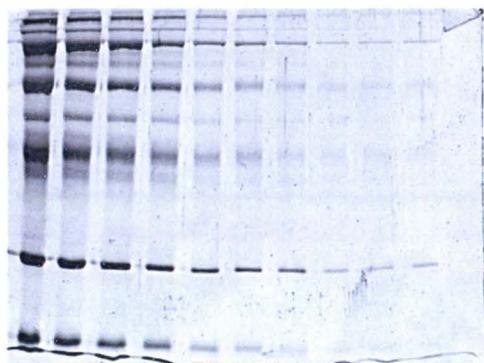


Figure IV.40 : Gel coloré au SyproRuby

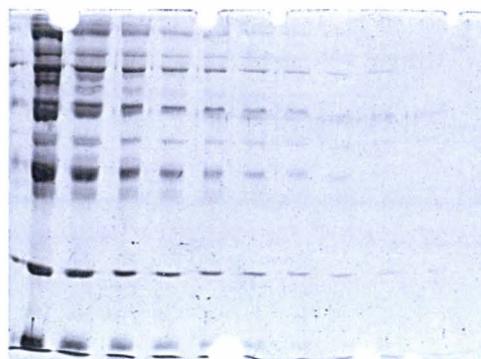


Figure IV.41 : Gel coloré avec une solution contenant 25% EtOH, 14% acide acétique, 2,8 mg/L $Ru(BPS)_3$

Nous remarquons que la détection de protéines avec le gel coloré au Sypro commercial est comparable avec celui coloré avec notre propre solution à base de $Ru(BPS)_3$.

III.1.5. Conclusion

Le travail développé dans cette première partie de ce chapitre avait pour objectif de formuler une solution colorante basée sur un complexe de ruthénium, afin d'obtenir une qualité de détection protéique similaire tant en terme de sensibilité que de gamme dynamique, par rapport à la solution commerciale (Sypro® Ruby). Les premières analyses de déformulation (notamment la RMN) nous ont guidé dans le choix des composés d'une première formule de base constituée d'alcool (Propanediol 25%), d'acide acétique (7%) et du complexe (2,8 mg/L).

Après optimisation des paramètres de la formule, à savoir le choix du solvant (éthanol), sa concentration (25%), le choix de l'acide (acétique), sa concentration (14%) et l'évaluation

de l'influence sur la sensibilité de coloration de l'ajout de certains additifs (DMSO, sels inorganiques), nous sommes parvenus à formuler une solution capable de détecter certaines protéines à des concentrations de l'ordre du nanogramme comparable à celle du Sypro® Ruby.

III.2. Complexes hétéroleptiques

Afin de compléter notre gamme de colorants, nous avons entamé la préparation de complexes hétéroleptiques, en faisant varier le nombre de groupements sulfonates présents sur la molécule, sachant qu'un sulfonate au minimum est nécessaire. Les complexes hétéroleptiques, portant des polypyridines non anioniques, peuvent être préparés en mélangeant, dans les bonnes proportions, le métal et les différents ligands. Cependant, lorsque les ligands ont des propriétés radicalement différentes, comme dans notre cas, il semble que leurs solubilités et leurs réactivités diffèrent suffisamment pour ne pas conduire nécessairement au produit désiré.

III.2.1 Stratégie de synthèse

La réaction de RuCl_3 avec deux équivalents de bathophenanthroline (BP) et un équivalent de bathophénanthrolinedisulfonate (BPS), donne accès à deux combinaisons de ligands, comme nous l'indique le spectre MALDI (Figure IV.42).

Le pic de $\text{RuBP}(\text{BPS})_2$ est le pic majoritaire. Cela nous amène à penser que dans les conditions opératoires utilisées, le ligand BPS est meilleur donneur d'azote que BP. Ceci peut être expliqué par la différence de solubilité des deux ligands dans le milieu réactionnel.

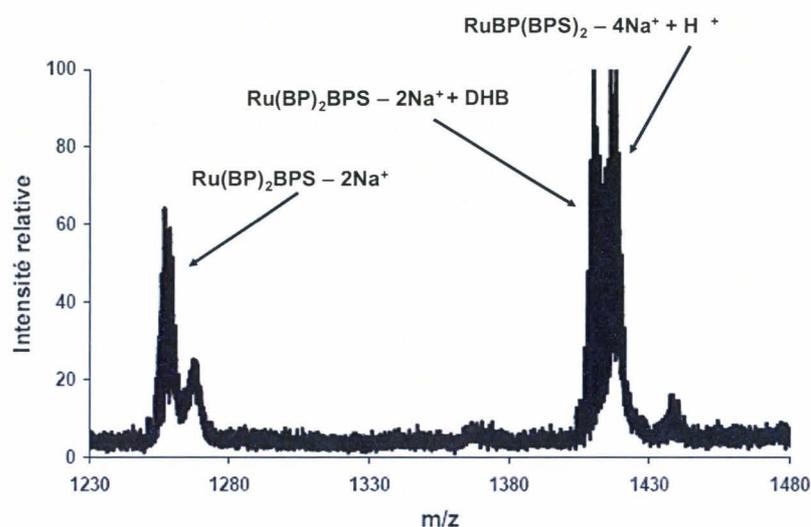


Figure IV.42 : Spectre MALDI de la réaction $\text{RuCl}_3 + 2\text{BP} + \text{BPS}$.

En revanche, la réaction réalisée avec deux équivalents de BPS et un équivalent de BP donne aussi un mélange de deux complexes : majoritairement $\text{RuBP}(\text{BPS})_2$, et une quantité minoritaire de $\text{RuBP}_2(\text{BPS})$ (Figure IV.43).

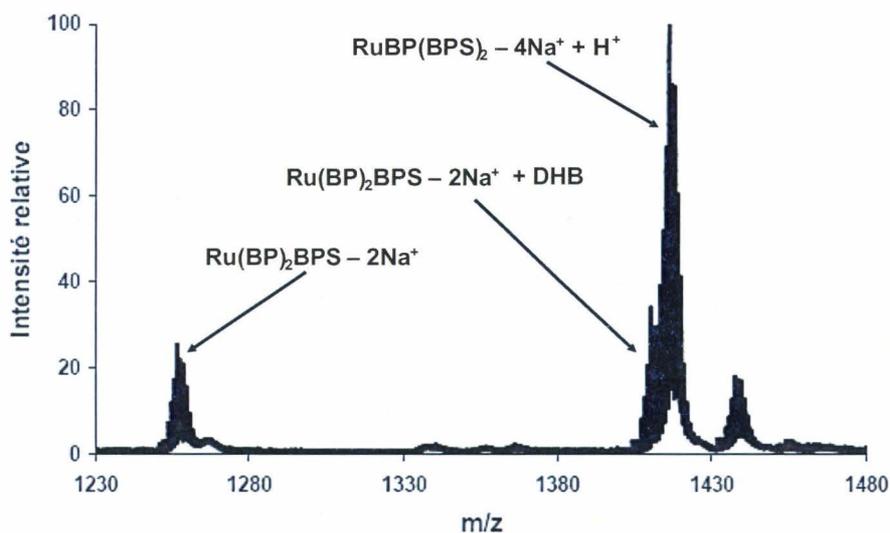


Figure IV.43 : Spectre MALDI de la réaction $\text{RuCl}_3 + \text{BP} + 2\text{BPS}$.

Pour accéder au complexe portant quatre sulfonates, $\text{RuBP}(\text{BPS})_2$, de manière plus sélective, nous avons donc essayé deux méthodes : la première consiste à préparer dans un premier temps le complexe RuBP . En effet, une nuit de reflux dans le DMF a permis la formation majoritairement du complexe RuBP . Après isolation de celui-ci grâce à une colonne C18, un chauffage à reflux dans un mélange eau/méthanol en présence de deux

équivalents de BPS, et une purification par chromatographie nous avons obtenu le complexe voulu, le RuBP(BPS)₂ (Figure IV.44).

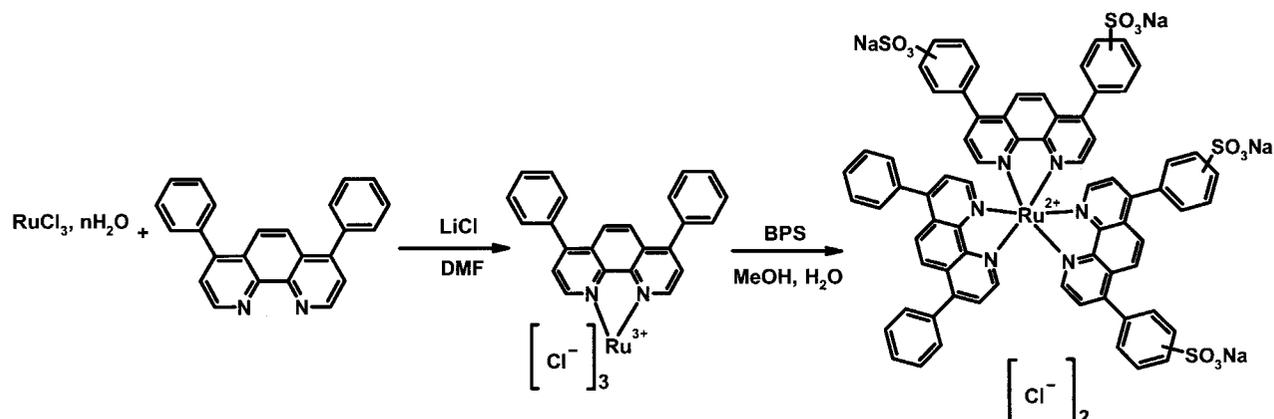


Figure IV.44 : Préparation de RuBP(BPS)₂

La seconde méthode a été inspirée d’une publication d’Evans,^[38] qui utilise un nouveau complexe, Ru(DMSO)₄, pour accéder aux différents complexes à base de ruthénium. Nous avons utilisé le même principe pour accéder sélectivement à RuBP(BPS)₂.

Dans un premier temps nous avons synthétisé le complexe Ru(DMSO)₄, par simple chauffage à reflux du RuCl₃ dans le DMSO, pendant 5 minutes. Ensuite, nous avons effectué la réaction du Ru(DSMO)₄ avec 3 équivalents de BPS dans un mélange EtOH/eau. Le résidu obtenu est ajouté au ligand BP, solubilisé dans un minimum de chloroforme; le mélange est ensuite chauffé à reflux pendant 2 minutes en donnant accès sélectivement au RuBP(BPS)₂ (Figure IV.45).

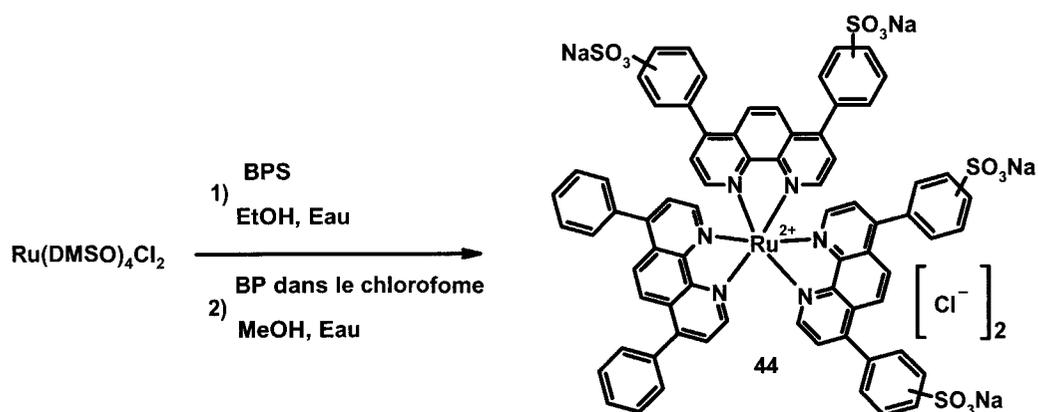


Figure IV.45 : Préparation de RuBP(BPS)₂ à partir du Ru(DMSO)₄

Dans les deux stratégies de synthèse on obtient sélectivement notre complexe.

III.2.2. Coloration par RuBP(BPS)₂

III.2.2.1. Comparaison entre coloration au RuBP(BPS)₂ et celle au Ru(BPS)₃

Nous avons effectué une coloration des protéines (mélange de protéines de haut et bas poids moléculaire : kit Amersham Bioscience) à l'aide du complexe RuBP(BPS)₂, dans les mêmes conditions que le Ru(BPS)₃ (Ethanol 25%, acide acétique (14%) et une concentration du complexe de 2,8 mg/L). Les figures IV.46 et IV.47 montrent une comparaison entre un gel coloré par le Ru(BPS)₃ et un autre coloré par le nouveau colorant RuBP(BPS)₂.

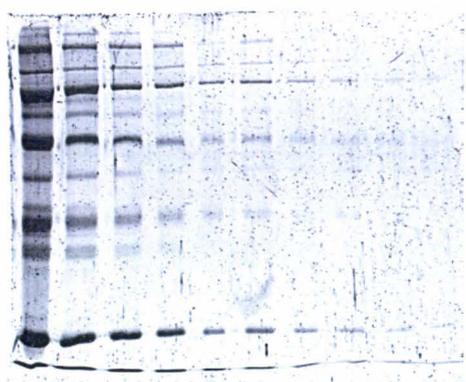


Figure IV.46 : Gel coloré au Ru(BPS)₃

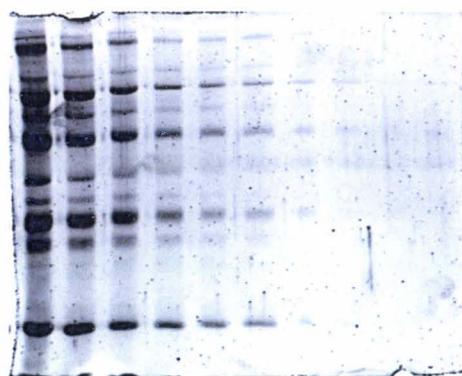


Figure IV.47 : Gel coloré au RuBP(BPS)₂

Nous remarquons que la coloration des protéines au RuBP(BPS)₂ est bonne mais pas aussi sensible que celle au Ru(BPS)₃. Afin d'essayer d'améliorer cette coloration nous avons décidé de regarder l'influence du pH sur la coloration des protéines avec le nouveau colorant (RuBP(BPS)₂).

III.2.2.2. Influence du pH

Nous avons étudié l'influence du pH sur la sensibilité de coloration avec le RuBP(BPS)₂. Pour ce faire nous avons testé trois pH différents pH = 2,2, pH = 5 et pH = 8 pour cette coloration. Les figures IV.48 à IV .50 présentent les résultats obtenus.

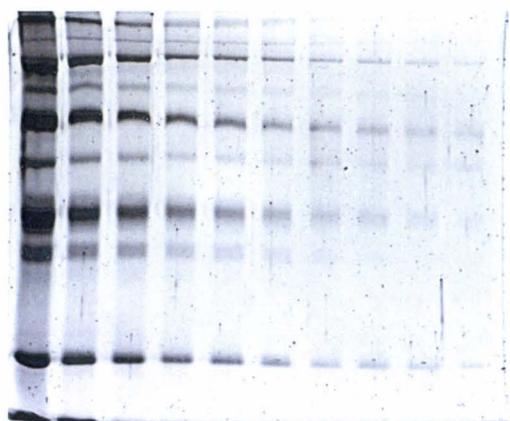


Figure IV.48 : Gel coloré au Ru(BPS)₃ à pH = 2,2

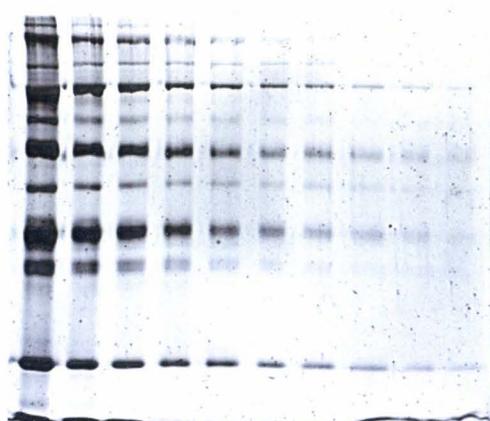


Figure IV.49 : Gel coloré au Ru(BPS)₃ à pH = 5

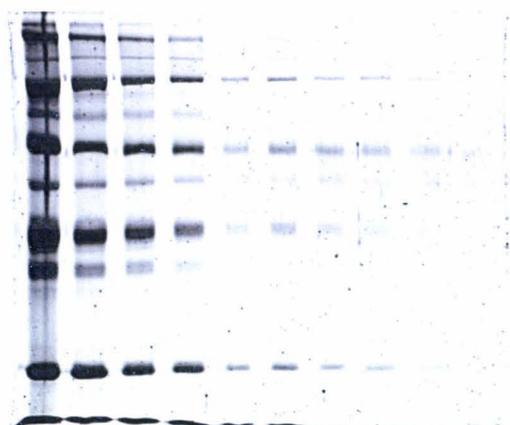


Figure IV.50 : Gel coloré au Ru(BPS)₃ à pH = 8

Nous remarquons que la meilleure coloration est celle obtenue avec une solution de coloration à pH = 5. De plus une coloration un tel pH, et sans acide acétique, a l'avantage de préserver les modifications post-traductionnelles des protéines

III.3. Colorants hydrophobes

A partir de travaux de Schultz et al^[39] et Kang et al,^[40] nous avons envisagé de développer un nouveau type de colorants fluorescents. Schultz et al décrivent la dérivatisation du bleu de Coomassie par des chaînes hydrophobes de taille plus ou moins grande. Cette modification entraîne, dans les cas où la chaîne est suffisamment longue, d'une part un changement de couleur du colorant, qui passe du bleu à un vert intense, mais surtout un changement de comportement. En effet, les chaînes hydrophobes présentes sur la molécule confèrent à cette dernière une affinité particulière pour les micelles de surfactant entourant la protéine dans la matrice polymérique. Ce type de détection offre l'avantage d'être in affecté par la composition

peptidique de la protéine, puisque la présence ou l'absence de certains acides aminés n'influe que très peu sur les micelles formées. Nous avons voulu reprendre les travaux de Schultz *et al* pour vérifier l'efficacité des colorants ainsi modifiés.

III.3.1. Synthèse du vert de coomassie

Le vert de Coomassie, a été préparé en deux étapes à partir du bleu de Coomassie R (Figure IV.51). La première étape de cette synthèse est l'activation de l'acide laurique commercial par le chlorure de thionyle. Le chlorure de thionyle en excès a été éliminé et le chlorure d'acyle **45'** a été stocké sous argon sans autre purification. Enfin, la réaction du bleu de Coomassie R avec le chlorure d'acyle **45'** en présence de pyridine, donne accès au vert de Coomassie **45**. La réaction est totale, comme l'indique la disparition de la tache bleu foncée du bleu de Coomassie R sur CCM, et l'apparition de la tache verte du vert de Coomassie.

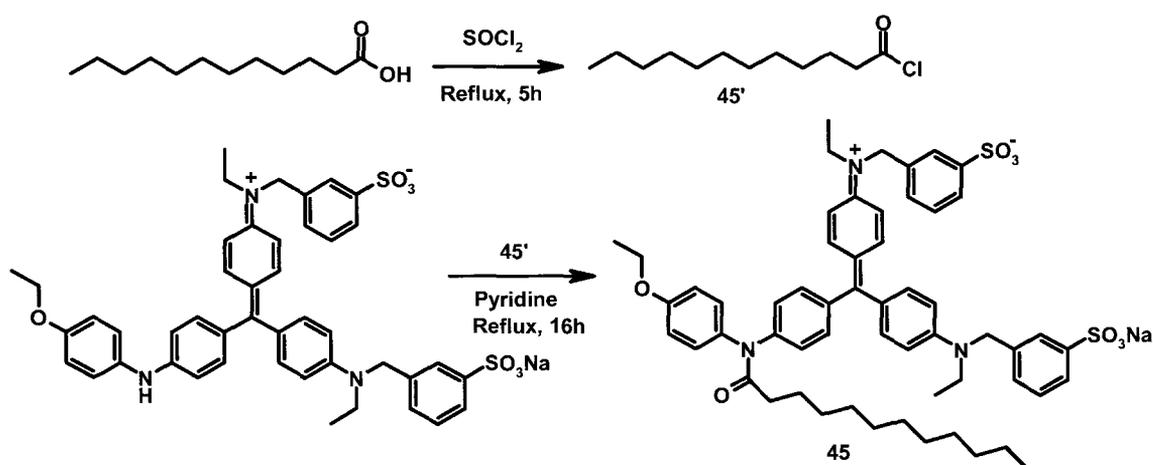


Figure IV.51 : Synthèse du vert de coomassie.

III.3.2. Comparaison entre coloration au et celle au bleu de coomassie

Le vert de coomassie a été testé sur un mélange standard de protéines, et comparé au bleu de coomassie. La coloration au vert de coomassie, dans des conditions identiques à celles au bleu de coomassie (34% d'EtOH, 1,4% d'acide acétique, 17g de sulfate d'ammonium et 66 mg de bleu ou de vert), ne s'est pas révélée efficace. En effet, le vert de coomassie grâce à ses propriétés hydrophobes, préfère rester soluble dans la solution de coloration plutôt que de colorer le gel (Figure IV.52 et IV.55).

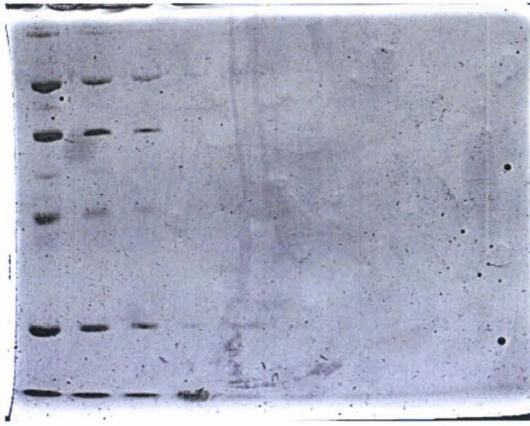


Figure IV.52 : Gel coloré au Vert de Coomassie

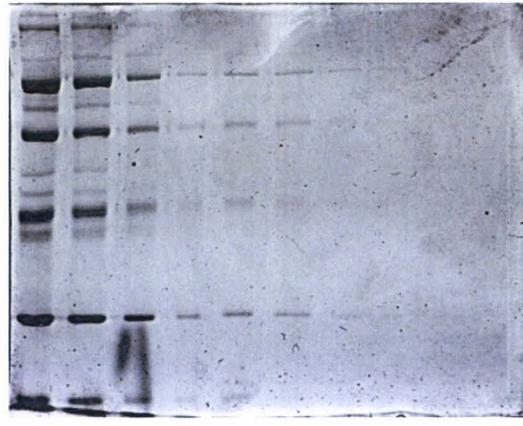


Figure IV.53 : Gel coloré au Bleu de Coomassie

Pour remédier à ce problème, nous avons décidé d'agir sur la quantité d'éthanol. En diminuant progressivement le pourcentage d'éthanol ajouté, nous cherchons à obtenir les conditions optimales qui permettent d'assurer à la fois la solubilité du colorant et un résultat au moins équivalent à celui du bleu de Coomassie. Les figures de **IV.55 à IV.58** représentent les gels obtenus avec des pourcentages d'éthanol allant de 0 à 10%.

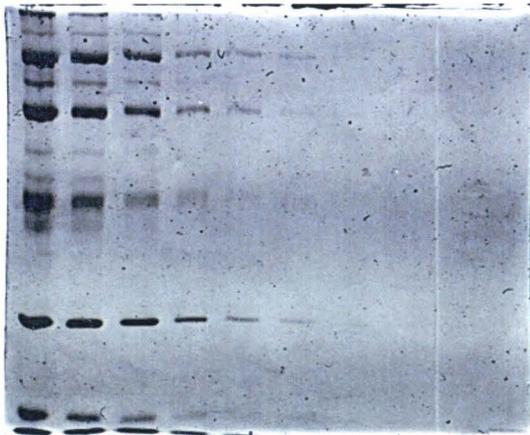


Figure IV.54 : Gel coloré au Vert de Coomassie à 0% EtOH

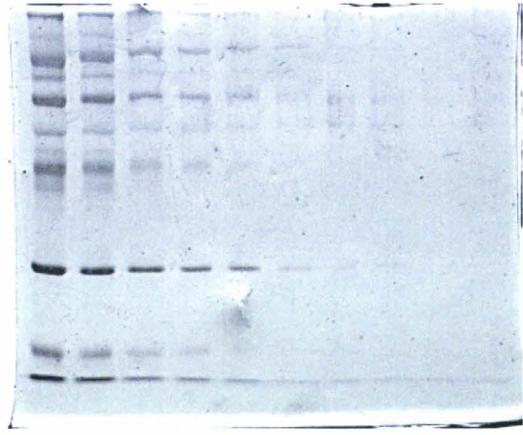


Figure IV.55 : Gel coloré au Vert de Coomassie à 3,75% EtOH

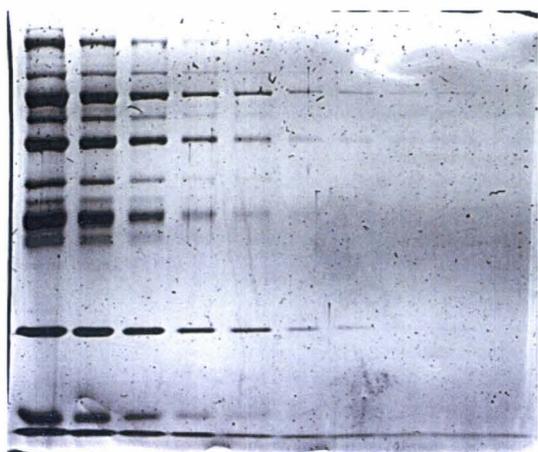


Figure IV.56 : Gel coloré au Vert de coomassie à 5% EtOH

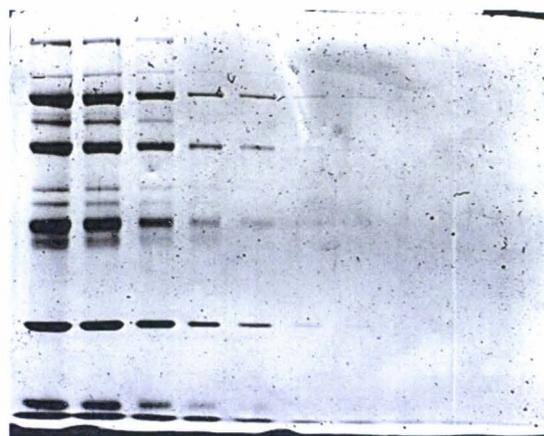


Figure IV.57 : Gel coloré au Vert de coomassie à 10% EtOH

En supprimant totalement l'ethanol (Figure IV.54), la coloration a été nettement moins sensible. Cependant, même avec des pourcentages inférieurs à 4% (Figure IV.55), nous avons constaté que les colorations obtenues ont été semblables à celles au bleu de coomassie.

IV. Nouveaux réactifs pour l'étude sélective de sous-protéomes

IV.1. Introduction

L'analyse des modifications post traductionnelles des protéines est une étape clé pour l'analyse et la compréhension de leurs propriétés et fonctionnalités. Les protéines présentes dans une cellule subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles^[4-6], et bien que la génomique nous fournisse des bases de données de séquences d'ADN extrêmement importantes, elle ne donne aucun renseignement quant à ces modifications. Et pourtant, ce sont ces dernières qui sont responsables entre autres de l'activité, de la localisation, et des interactions protéines-protéines. Parmi les plus communément rencontrées, on notera la phosphorylation, la glycosylation et l'oxydation.

Malgré l'importance majeure de ces modifications, leur étude à grande échelle a été ralentie par le manque de méthodes appropriées. Ainsi, nous ne réalisons peut être pas encore toute leur importance dans le fonctionnement des cellules. C'est pourquoi nous avons développé des réactifs qui permettent d'isoler une sous-classe de protéine.

Notre but est donc de synthétiser des réactifs permettant l'isolement de ces sous-protéomes. Ces réactifs sont constitués d'une sonde permettant la reconnaissance de la

fonction chimique recherchée, d'un bras espaceur, et d'une poignée permettant la manipulation de la protéine capturée (Figure IV.58).



Figure IV.58 : Schématisation de la détection sélective de sous-protéomes.

Suivant l'application visée, la poignée sera de type réactif d'affinité (biotine), ou sondes fluorescentes. Les réactifs portant une biotine permettent l'isolement par affinité, ceux avec une sonde fluorescente permettent la détection sur gel d'électrophorèse. Le bras espaceur peut quant à lui être clivé par voie chimique ou photochimique pour faciliter les séparations, et marqué aux isotopes stables pour les expériences de protéomique différentielle en spectrométrie de masse. La partie sonde est la partie active de la molécule. Notre approche sera une fonction acide boronique pour l'isolement des glycoprotéines, une fonction hydrazine pour l'isolement des protéines oxydées et une forme soluble d'oxyde de zirconium pour l'isolement des phosphoprotéines.

Les trois interactions réversibles sur lesquelles nous comptons travailler sont bien connues, et ont été utilisées depuis de nombreuses années. Les constantes d'association respectives sont suffisamment élevées pour permettre un accrochage efficace, mais il existe certaines conditions pour rompre ces adduits, et ainsi relâcher et récupérer les protéines d'intérêt. Nous proposons d'explorer différents types d'isolation et de caractérisation. Dans un premier aspect, nous développerons une méthode grâce à laquelle les types de protéines ciblées sont révélées sélectivement sur des gels d'électrophorèse. Dans un second aspect, nous nous intéresserons à la chromatographie d'affinité.

IV.2. Les sondes

Les sondes sont des entités chimiques qui se lient de manière spécifique, bien que réversible, aux protéines ciblées. Notre approche comprend une fonction acide boronique pour l'isolement des glycoprotéines, une fonction hydrazine pour l'isolement des protéines oxydées et une forme soluble d'oxyde de zirconium pour l'isolement des phosphoprotéines.

IV.2.1. La sonde spécifique aux protéines glycosylées

Afin de détecter sélectivement les protéines glycosylées,^[4, 41] nous avons besoin d'un groupement capable d'interactions spécifiques avec les sucres. Nous nous sommes orientés vers l'acide boronique, dont l'affinité pour les diols 1,2 ou 1,3 des sucres est connue et largement décrite.^[42-45] La formation d'un ester boronique entre un acide boronique et un diol est l'une des plus fortes interactions connue entre deux molécules organiques dans un milieu aqueux. L'acide boronique réagit avec les diols 1,2 pour former des borolanes et avec les diols 1,3 pour former des borinanes (Figure IV.59).

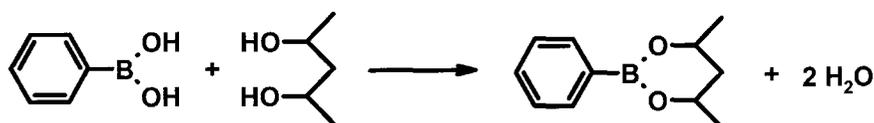


Figure IV.59 : Formation d'un borinane par condensation d'un acide boronique et un diol 1,3.

C'est pourquoi les acides boroniques sont depuis de nombreuses années utilisés dans la reconnaissance de saccharide, d'hydrate de carbone, et dans la construction de transporteurs de nucléotides. Ils sont également utilisés comme ligand d'affinité pour la séparation des hydrates de carbone et des glycoprotéines.

IV.2.2. La sonde spécifique aux protéines oxydées

Inspirés des travaux de Yoo et collaborateurs^[46] qui ont utilisé des dérivés commerciaux d'hydrazides pour la détection des protéines oxydées, nous avons employé une phénylhydrazine comme sonde de reconnaissance. Les hydrazines et les hydrazides sont

connus depuis des décennies pour s'additionner spontanément sur les fonctions carbonyles, formant ainsi des hydrazones^[47-49] (Figure IV.60). Les aldéhydes ou les cétones présents sur les protéines oxydées (issus notamment du stress oxydant dans les cellules) sont des substrats parfaits pour cette réaction de condensation.



Figure IV.60 : Schéma de formation d'une hydrazone

L'hydrazone formée est stable chimiquement, mais elle est facilement clivée en milieu acide pour libérer le dérivé carbonylé.

IV.2.3. La sonde spécifique aux protéines phosphorylées

Depuis longtemps, les zircons sont connus pour interagir particulièrement et fortement avec les groupements phosphates^[50] (Figure IV.61). De nombreux auteurs ont décrit des systèmes dans lesquels le zirconium est utilisé en combinaison avec des phosphates, par exemple, dans des assemblages moléculaires organiques ou inorganiques pour la préparation de puces à ADN.

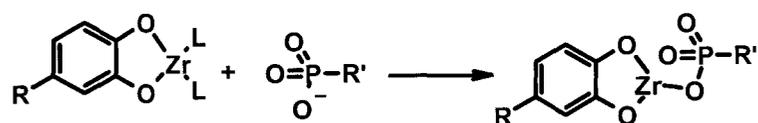


Figure IV.61 : Interaction entre les zircons et les phosphates.

La stratégie d'isolation de protéines phosphorylées reposera sur cette association forte entre les zircons et les phosphates.

IV.3. Le bras espaceur

Le bras espaceur, bien qu'il paraisse simple et sans grande importance, joue un rôle essentiel dans les méthodes. Son rôle primaire est de lier la sonde au détecteur, et d'être suffisamment flexible pour permettre à la sonde d'être mobile, et découpler ainsi ses mouvements de ceux du détecteur. Sa longueur et son hydrophobicité sont des paramètres clés qui doivent être optimisés pour toutes les applications. Par exemple, lors de la coloration sur gel, l'hydrophobicité du bras espaceur a une influence sur la sélectivité. Ses propriétés peuvent être adaptées simplement en changeant sa longueur, ou en incorporant des hétéroatomes pour la flexibilité et l'hydrophobicité. Le bras que nous avons utilisé pour l'instant est un dérivé de l'éthylène glycol : le diaminodioxyoctane dont le nom familier est DADOO (Figure IV.62). Il porte deux amines nucléophiles suffisamment réactives pour la dérivatisation des différentes sondes et poignées.

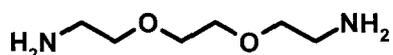


Figure IV.62 : La structure du DADOO.

IV.4. Les poignées

La partie poignée permet la manipulation de la protéine capturée, et suivant l'application visée, cette poignée peut être une biotine pour l'isolement par affinité ou une sonde fluorescente (fluorophore) pour la détection sur gel d'électrophorèse.

IV.4.1. La sonde fluorescente

Nous avons utilisé un fluorophore commercialement disponible pour l'électrophorèse mono -et bi-dimensionnelle, le Bis 2,2'-bispyridine-4'-carboxybipyridien-ruthénium-N-succinimidyl ester-bis (hexafluorophosphate). Ce fluorophore est un marqueur covalent, contenant un groupe partant (N-hydroxysuccinimide), qui permet une réaction spécifique du composé avec la fonction amine du DADOO.

IV.4.2 Chromatographie d'affinité Biotine-Avidine

L'interaction entre l'avidine (une protéine, trouvée également sous forme de streptavidine) et la biotine (vitamine H), son ligand endogène, est la plus forte interaction non covalente connue entre une protéine et son ligand ($K_a=10^{15}M^{-1}$).^[51-54] La formation de la liaison est rapide, et une fois formée, elle n'est pas ou peu affectée par les pH extrêmes, les solvants organiques ou les agents dénaturants. De plus, cette interaction présente l'avantage d'être très hautement sélective.

L'acide valérique sur la chaîne latérale de la biotine peut être activé, et il peut être engagé dans d'autres réactions. L'un des avantages de la biotine est son faible encombrement : une fois attachée à des peptides ou des protéines, elle ne modifie pas vraiment leur poids et donc n'altère pas drastiquement leurs propriétés physico-chimiques. La force et la spécificité de l'interaction avidine-biotine en a fait un outil puissant dans le développement de nombreux systèmes d'analyse. Des colonnes sont disponibles commercialement contenant de l'avidine immobilisée, ce qui les rend exploitables pour la chromatographie d'affinité avec des peptides biotinylés. Deux stratégies peuvent être envisagées : une première dans laquelle les peptides sont biotinylés au préalable puis chargés sur la colonne d'avidine, pour la rétention spécifique des peptides de choix ; une seconde, dans laquelle la colonne est d'abord conditionnée avec notre réactif biotinylé, puis les peptides sont chargés. Les peptides d'intérêt sont ensuite libérés de la colonne en cassant l'une ou l'autre des associations avidine-biotine, en lavant la colonne avec un milieu approprié.

IV.5. Détection sélective des glycoprotéines

La glycosylation^[55, 56] est la modification la plus répandue parmi les modifications post-traductionnelles des protéines, elle affecte plus de la moitié des protéines dans une cellule eucaryote. Pourtant, l'étude précise du site de glycation et de la nature du glycane présent est loin d'être bien maîtrisée. Il y a donc un besoin urgent de nouveaux outils ou réactifs en vue d'une analyse complète de la glycosylation. C'est dans ce but que nous avons développé une stratégie générale de synthèse de réactifs pour la détection sélective des glycoprotéines soit dans les gels de polyacrylamide, soit par chromatographie d'affinité sur colonne d'avidine. Pour la reconnaissance, ces réactifs mettent à profit l'interaction très forte entre les diols 1,2 des sucres et les acides boroniques.

IV.5.1. Détection des glycoprotéines par des kits commerciaux

Dans un premier temps, nous avons essayé d'évaluer quelques kits commerciaux pour la détection sélective des glycoprotéines sur un gel de polyacrylamide. Deux kits ont été testés sur un mélange de protéines glycosylées (en rouge), et non-glycosylées (en vert) : le premier est le kit "Glycoprotein staining" de Geno-Tech (Figure IV.63). Ce kit est basé sur la coloration à l'argent. Le second est le kit "GelCode Glycoprotein" (Figure IV.64) commercialisé par Pierce, il est basé sur l'oxydation des glycoprotéines.

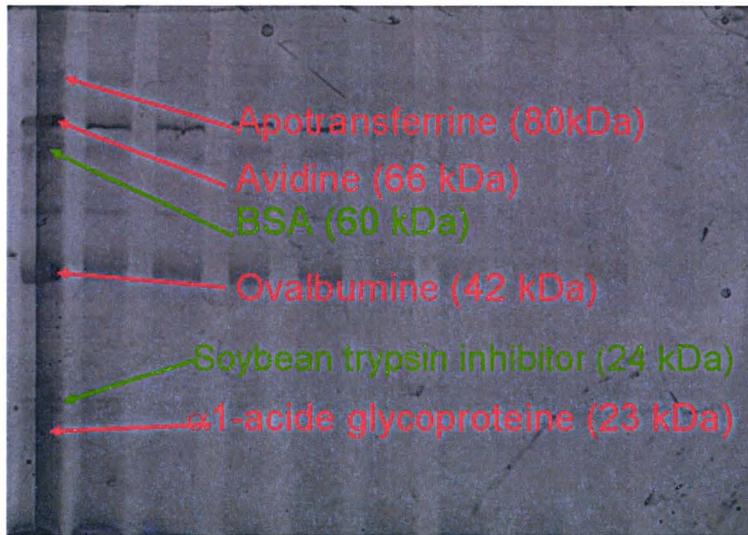


Figure IV.63 : Gel coloré avec le kit de Pierce.

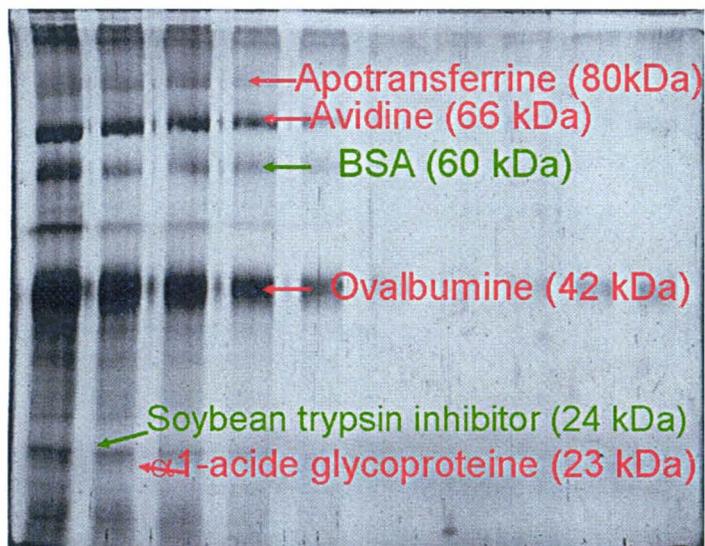


Figure IV.64 : Gel coloré avec le kit de Geno-tech.

Ces deux gels montrent que ces kits ne détectent pas sélectivement les glycoprotéines, puisqu'il y a aussi apparition des protéines non-glycosylées.

Un autre kit commercialisé par Geno-tech, "FOCUSGlyproteins", basé sur la chromatographie d'affinité sur colonne d'avidine, a été testé mais les résultats n'ont pas été satisfaisants.

IV.5.2. ASC_GLY_FLUO, un nouveau colorant fluorescent pour la détection sélective des glycoprotéines

ASC_GLY_FLUO, est un colorant fluorescent pour la détection sélective des glycoprotéines dans les gels de polyacrylamide utilisés en électrophorèse. Pour la reconnaissance, ce réactif met à profit l'interaction très forte entre les diols 1,2 des sucres et les acides boroniques. Notre réactif contient un complexe bipyridine ruthénium comme sonde fluorescente, lié via un bras espaceur à un acide phénylboronique (Figure IV.65).

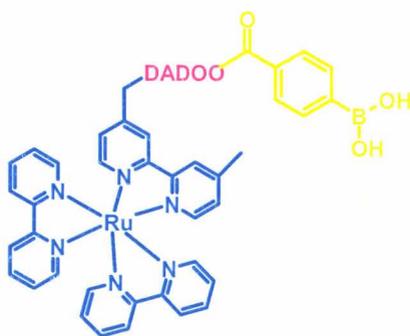


Figure IV.65 : Structure de ASC_GLY_FLUO.

IV.5.2.1 Stratégie de synthèse

Notre réactif, comme nous l'avons vu précédemment, se compose de trois parties : un acide phénylboronique, un espaceur qu'est le DADDOO et un fluorophore. En ce qui concerne le fluorophore, diverses méthodes impliquant la détection de biomolécules par fluorescence nous ont conduit à choisir, pour notre réactif, un complexe de ruthénium et de bipyridine comme fluorophore. Les complexes de ruthénium II et de bipyridine sont connus depuis plus de trente ans pour leurs propriétés fluorescentes. Bien que de nombreux travaux de recherches aient été menés sur l'utilisation de ces complexes, relativement peu de méthodes de

fonctionnalisation de la bipyridine ont été décrites. Les méthodes de fonctionnalisation dissymétrique sont encore plus rares. On peut noter par exemple les travaux de Cook^[57] pour mono-fonctionnaliser les 2,2'-bipyridines en passant par l'intermédiaire N-oxide (Figure IV.66).

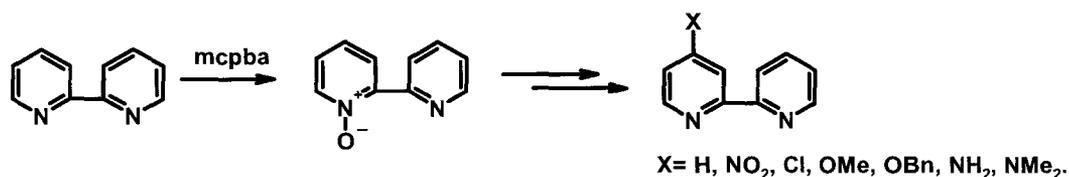


Figure IV.66 : Mono-fonctionnalisation des 2,2'-bipyridines.

Peu de précurseurs de bipyridines dissymétriques sont commerciaux. Parmi eux, on a retenu la mono-oxidation des 4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridines, bien contrôlée grâce à l'oxyde de sélénium, conduisant au 4-formyl-4'-méthyl-2,2'-bipyridines.^[58] Cette réaction, malgré son rendement limité, nous a semblé la plus simple à mettre en œuvre. En effet, l'aldéhyde résultant peut être engagé dans toute la chimie des dérivés carbonylés (Figure IV.67).

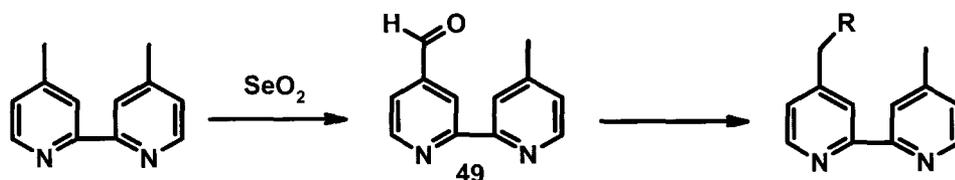


Figure IV.67 : Dérivatisation de la 4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridines.

IV.5.2.1.1 Analyse rétrosynthétique

En examinant le schéma de rétrosynthèse proposé pour notre réactif (Figure IV.68), on constate que la première déconnection logique du ASC_GLY_FLUO, sépare la bipyridine fonctionnalisée du Ru(Bipy)₂, qui peut être préparé par addition de deux équivalents de bipyridine sur du trichlorure de ruthénium. Le couplage du bras espaceur sur la bipyridine est envisageable par amination réductrice de la bipyridine formaldéhyde. Enfin, l'acide phénylboronique et le bras espaceur sont reliés par formation classique de liaison amide.

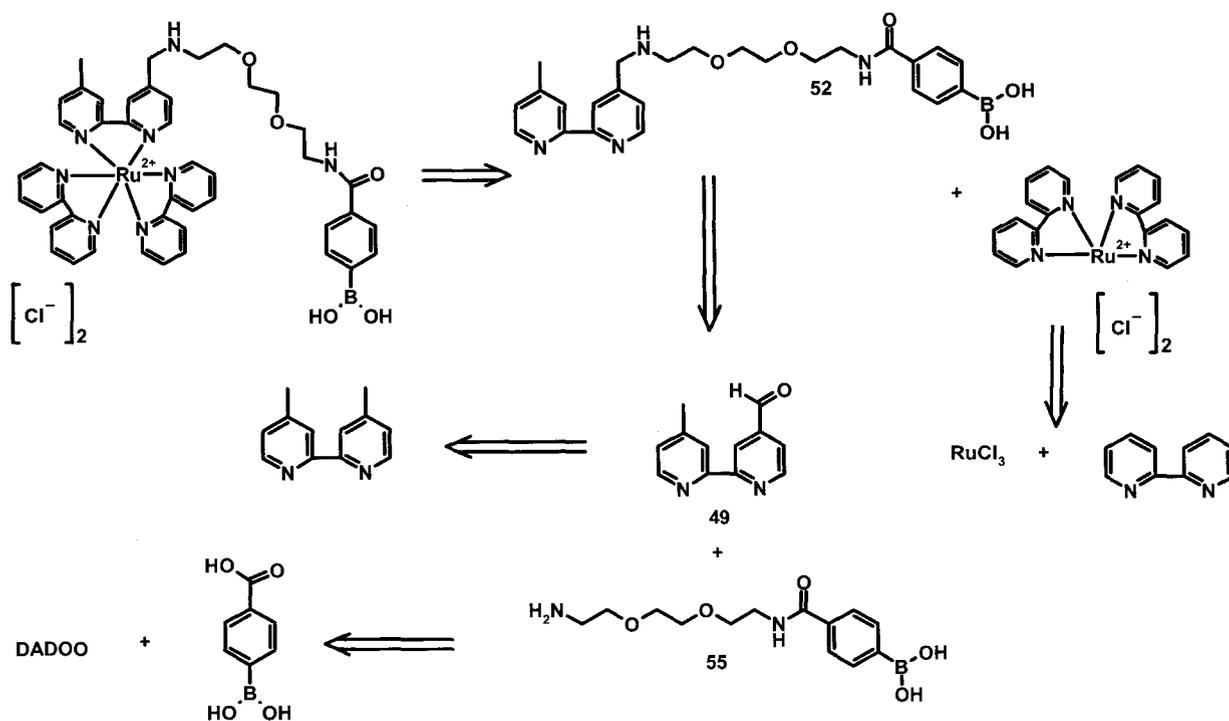


Figure IV.68 : Analyse rétrosynthétique du ASC_GLY_FLUO.

IV.5.2.1.2. Première approche

La première étape de notre première approche de synthèse est de coupler le DADOO à une bipyridine, puis de greffer à cet ensemble l'acide phénylboronique. Pour ce faire, la 4,4'-diméthyl-2-2'-bipyridine est oxydée en l'aldéhyde correspondant **49** (Figure IV.69), par action du dioxyde de sélénium SeO_2 à reflux dans le dioxane. Le rendement maximum obtenu lors des nombreuses répétitions de cette réaction est de 40%, ce qui est faible mais comparable au rendement maximum observé dans la littérature.^[58] Ce faible rendement est expliqué en partie par le faible taux de conversion de la réaction. En effet, une partie non négligeable de la bipyridine non réagie peut être récupérée facilement en fin de synthèse, et être réutilisée sans autre purification.

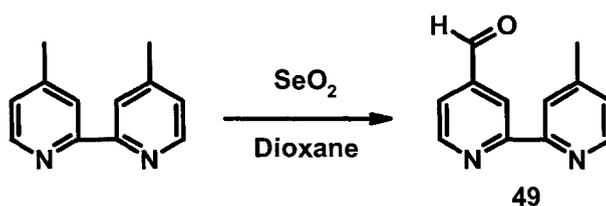


Figure IV.69 : Oxydation du diméthyl bipyridine en aldéhyde correspondant.

En parallèle, une mono-protection de l'espaceur DADDO a été effectuée en présence du $(\text{Boc})_2\text{O}$ ^[59] avec un rendement de 80 %, pour limiter les formations de dimères dans la réaction suivante. L'amination réductrice^[60, 61] en question est réalisée dans l'éthanol à reflux, avec réduction par le borohydrure de sodium. La déprotection de l'amine se fait sans difficulté par l'acide trifluoroacétique et de manière quantitative (Figure IV.70).

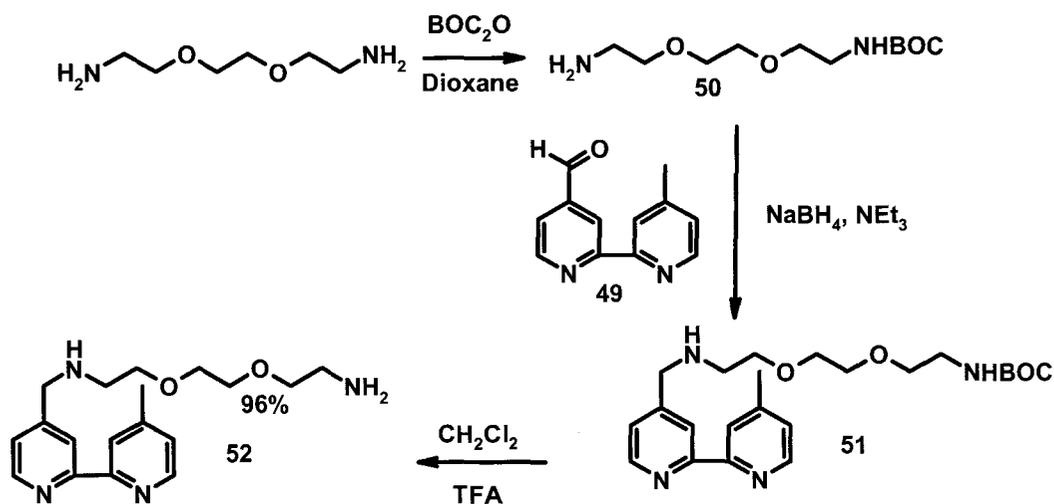


Figure IV.70 : Couplage du DADDO avec la bipydyne formaldéhyde.

Afin d'effectuer le couplage entre l'amine libre du composé 52 et l'acide phénylboronique, l'acide carboxylique doit être activé. Après avoir essayé plusieurs méthodes d'activation (Chlorure d'acide, HOBT-DCC...) nous avons finalement opté pour le groupement pentafluorophényl, introduit par $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ sur le pentafluorophényl-trifluoroacetate.

Cependant, le produit de la réaction entre l'acide ainsi activé 53 et le composé 52 n'a jamais pu être isolé, et ce malgré plusieurs tentatives. La formation du produit a été confirmée par spectrométrie de masse, mais il est resté bloqué dans la colonne de silice malgré des essais d'élution avec divers milieux (Figure IV.71).

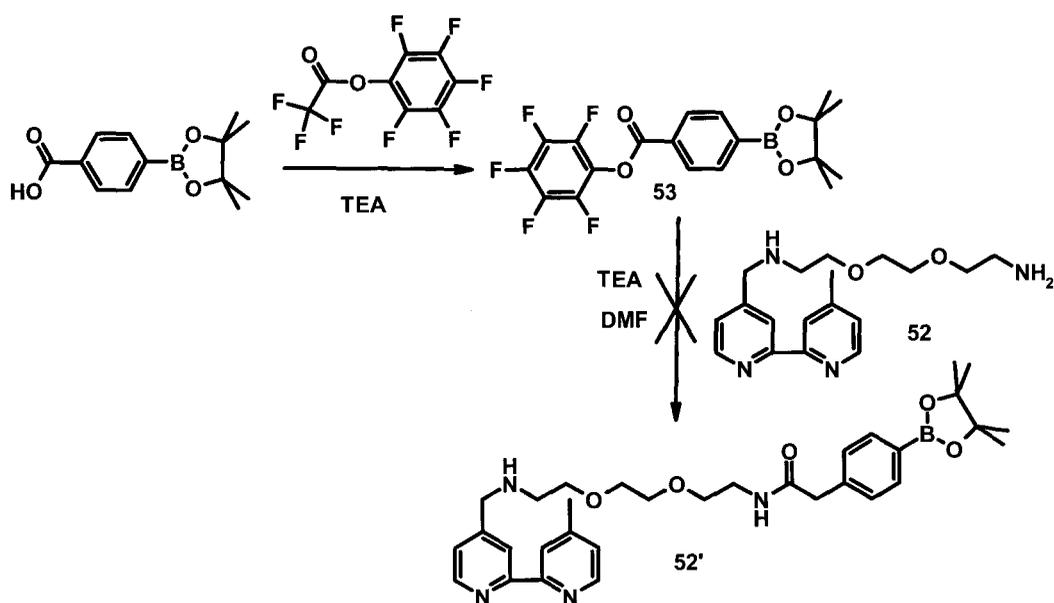


Figure IV.71 : Couplage de l'acide phenylboronique avec le composé 22.

IV.5.2.1.3. Seconde approche

Pour atteindre le produit **52'** en évitant le problème mentionné précédemment, une stratégie alternative a été menée (Figure IV.72) :

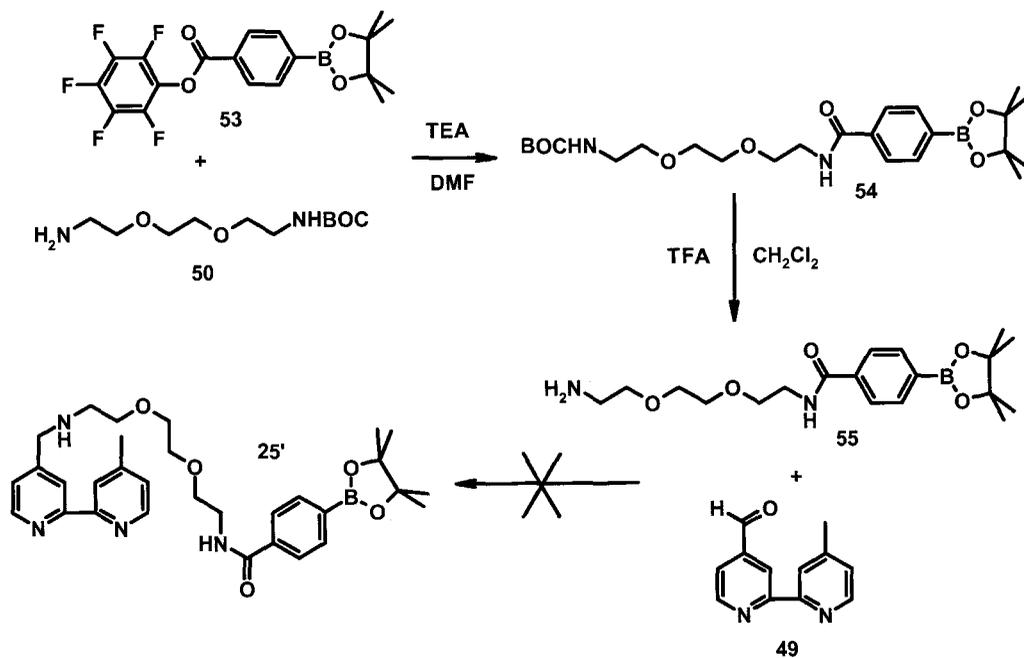


Figure IV.72 : Seconde tentative de préparation d'ASC_GLY_FLUO.

Tout d'abord un couplage entre le DADOO-monoprotégé **50**, et l'acide phénylboronique activé **53** a été réalisé en conduisant à l'amide **54**. La réaction a été menée avec succès (68%), ce qui porte à croire que le motif bipyridine était responsable de la perte du produit dans la synthèse précédente. Le composé **55** est obtenu par déprotection sélective du composé **54**, en présence de TFA dans le dichlorométhane. Cette étape a été suivie par spectrométrie de masse. Malheureusement, la réaction d'amination réductrice entre le composé **55** et l'aldéhyde **49** n'a jamais fonctionné. Toutes les tentatives ont abouti à la disparition de **55**, et à l'obtention de l'alcool issu de la réduction de l'aldéhyde. L'utilisation d'autres solvants, et d'agents complexants (Bu_4NF , source d'ions fluorures pour saturer le bore et éviter sa complexation par l'amine) n'a rien apporté.

IV.5.2.1.4. Dernière approche

Pour éviter tous ces problèmes et afin d'accéder au complexe **57** une solution a été employée (Figure IV.73). L'utilisation du complexe activé a permis d'atteindre le composé **57** en deux étapes supplémentaires. La substitution nucléophile du complexe activé par le composé **55** dans le DMF est totale et ne prend que quelques heures. Enfin, la déprotection de l'acide phénylboronique est effectuée dans l' HCl 2N, pour obtenir le complexe cible **57**, sans modifier la sphère de coordination du ruthénium.

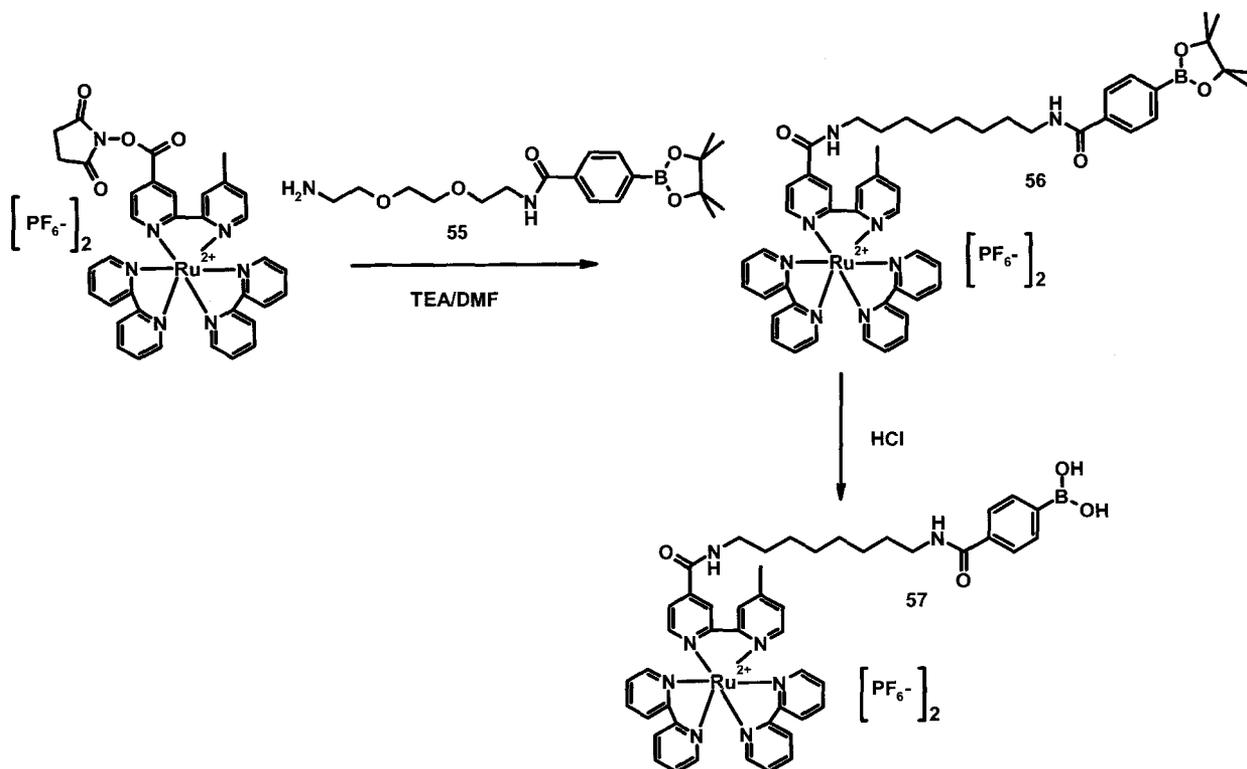


Figure IV.73 : Synthèse de ASC_GLY_FLUO.

IV.5.2.2. Résultats sur gels d'électrophorèse

Les premières colorations, en utilisant ASC_GLY_FLUO ont été effectuées sur un mélange connu de huit protéines, dont cinq sont glycosylées (Apo-transferrine, Avidine, Féтуine, Ovalbumine, α -1 acide glycoprotéine) et trois non-glycosylées (BSA, soybean trypsin inhibitor, lysozyme). Différentes solutions de coloration ont été évaluées, les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant 20 μ M de fluorophore dans un mélange acétonitile/eau à un pH de 3,8. Les résultats ont été très encourageants, tant en terme de sensibilité que de sélectivité (Figure IV.74). En effet, toutes les glycoprotéines ont été détectées, et seule l'albumine de sérum bovin, parmi les non-glycosylées, a été faiblement révélée. De plus, la limite de détection est basse, de l'ordre de quelques dizaines de nanogrammes.

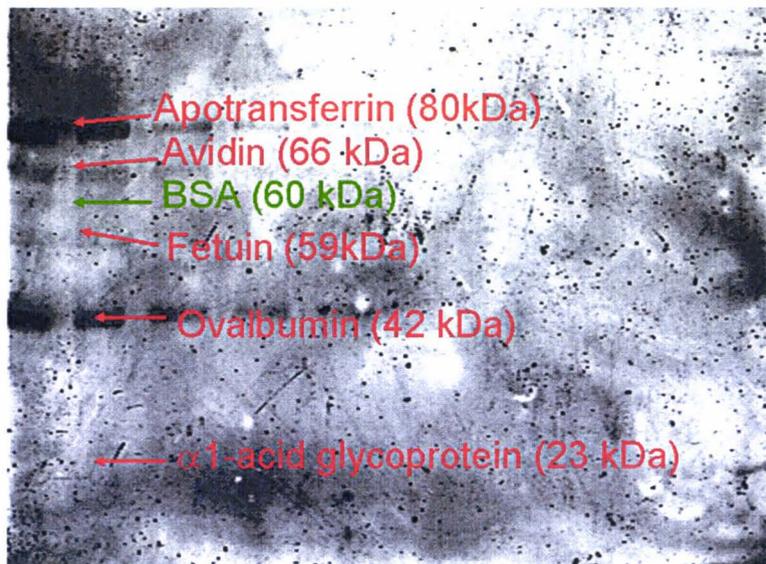
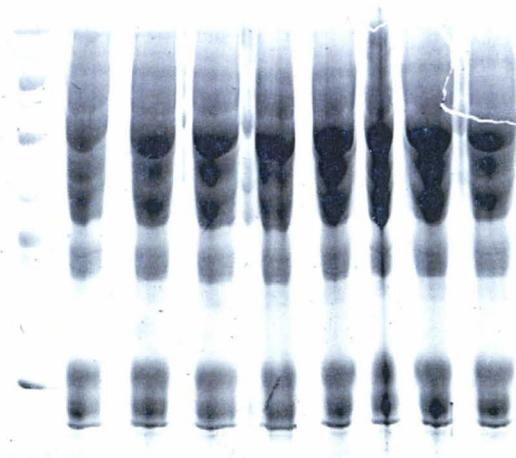
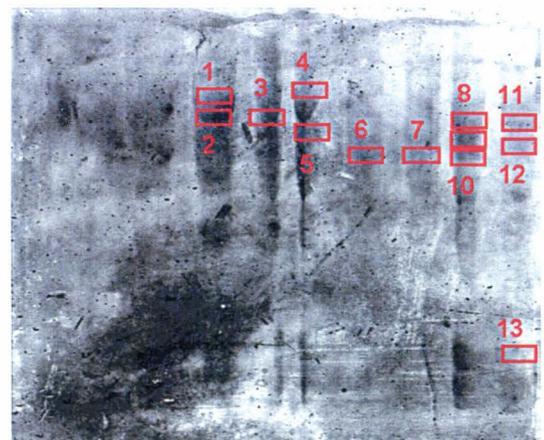


Figure IV.74 : Coloration avec ASC_GLY_FLUO.

Nous avons ensuite évalué les performances de ASC_GLY_FLUO sur un échantillon complexe : le plasma humain. Les Figures **IV.75** et **IV.76** présentent deux gels de plasma le premier a été coloré avec le Ru(BPS)₃ dans des conditions classiques de coloration et le deuxième avec notre nouveau réactif ASC_GLY_FLUO dans les conditions citées ci-dessus.



IV.75 : Plasma dépleté coloré avec Ru(BPS)₃



IV.76 : Plasma dépleté coloré avec ASC_GLY_FLUO

Le gel de plasma humain coloré avec le Ru(BPS)₃ (Figure **IV.75**) révèle presque toutes les protéines présentes dans l'échantillon. Comme prévu, beaucoup de bandes apparaissent, certaines d'entre elles étant majoritaires.

Au contraire, le gel du même échantillon coloré avec ASC_GLY_FLUO (Figure IV.76) montre sélectivement les glycoprotéines : peu de bandes apparaissent. Ces bandes ont été analysées par MALDI-TOF-MS pour identifier les protéines détectées par cette nouvelle méthode de coloration (Tableau IV.4).

	Nom de la protéine	Masse (Da)/pI	% recouvrement	Numéro d'accèsion
1	Serotransferrin precursor (Transferrin)	77051/6,8	24,0	P02787
	Ig gamma-1 chain C region	36106/8,5	33,0	P01857
2	Serotransferrin precursor (Transferrin)	77051/6,8	31,0	P02787
3	Proactivator polypeptide precursor	58113/5,1	15,0	P07602
	HLA class I histocompatibility antigen, E alpha chain precursor	40157/5,6	12,0	P13747
4	Serotransferrin precursor (Transferrin)	77051/6,8	15,0	P02787
5	Serum albumin precursor	69367/5,9	20,0	P02768
	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 precursor	99122/5,6	8,0	Q06033
6	Alpha-1-antitrypsin precursor	46737/5,4	9,0	P01009
	Ig alpha-1 chain C region	37655/6,1	9,0	P01876
	Chromogranin A precursor	50731/4,6	8,0	P10645
7	Alpha-1-antitrypsin precursor	46737/5,4	12,0	P01009
	Tissue factor pathway inhibitor precursor	35015/8,6	10,0	P10646
8	Serotransferrin precursor	77051/6,8	12,0	P02787

	(Transferrin)			
9	Serum albumin precursor	69367/5,9	23,0	P02768
	Lactotransferrin precursor	78339/8,6	12,0	P02788
10	Serum albumin precursor	69367/5,9	35,0	P02768
	Alpha-1-antitrypsin precursor	46737/5,4	30,0	P01009
	Ig alpha-1 chain C region	37655/6,1	20,0	P01876
	Chromogranin A precursor	50731/4,6	15,0	P10645
11	Serotransferrin precursor	77051/6,8	14,0	P02787
12	Angiopoietin-related protein 2 precursor	57105/7,2	10,0	Q9UKU9
13	Transthyretin precursor (Prealbumin)	15887/5,5	67,0	P02766

Tableau IV.4 : Liste des protéines du plasma, détectées par ASC_GLY_FLUO (en rouge les protéines glycosylées et en vert les non-glycosylées).

IV.5.3. ASC_GLY_BIOT, un nouveau réactif pour la détection sélective des glycoprotéines.

ASC_GLY_BIOT (Figure IV.77), est un réactif qui permet la détection sélective des glycoprotéines par chromatographie d'affinité sur colonne d'avidine. Il s'agit d'une molécule comprenant un acide phényleboronique pour l'isolement des glycoprotéines, couplé par l'intermédiaire d'un bras espaceur à une biotine qui permet l'isolement sélectif sur une colonne d'avidine.

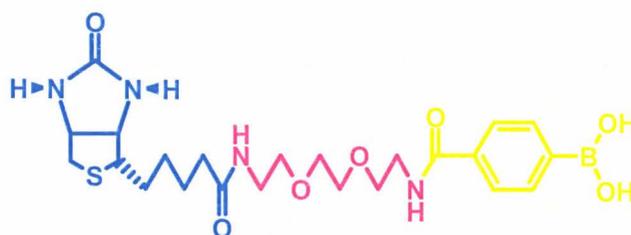


Figure IV.77 : Structure de ASC_GLY_BIOT.

IV.5.3.1 Stratégie de synthèse

La synthèse commence tout d'abord par l'activation de l'acide carboxylique de la biotine. Cette première étape d'activation a été effectuée comme précédemment, en présence du pentafluorophényltrifluoroacétate^[62, 63] car les activations sous forme de chlorure d'acide ou le couplage direct par le biais du couple activant DCC-HOBT n'ont pas donné de résultats satisfaisants. La deuxième étape de cette synthèse consiste à coupler la biotine activée (**58**) au bras-espacer. En effet, l'action d'un large excès de DADOO (en évitant une étape supplémentaire de protection) sur la biotine activée dans le DMF et en présence de TEA, suivi d'une étape de cristallisation dans l'éther diéthylique, donne accès à la partie Biotine-DADOO (Composé **59**), avec un rendement de 70% (Figure IV.78).

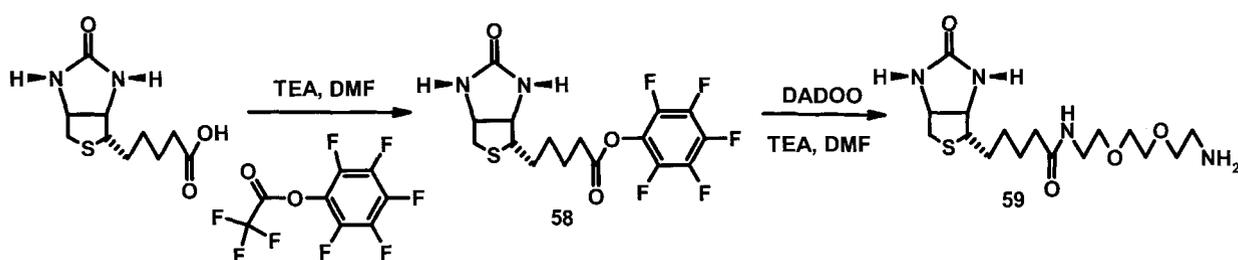


Figure IV.78 : Schéma de synthèse de la partie Biotine-DADOO.

D'autre part, le couplage de l'acide phényleboronique avec l'amine libre de la partie biotine-DADOO a nécessité une activation de l'acide phényleboronique. Pour cela, nous avons travaillé dans les mêmes conditions que précédemment, en présence de pentafluorophényltrifluoroacétate, afin d'éviter toute réaction parasite de complexation. La réaction du biotine-DADOO **59** avec l'acide phényleboronique activé en présence de TEA conduit au composé **60** (Figure IV.79).

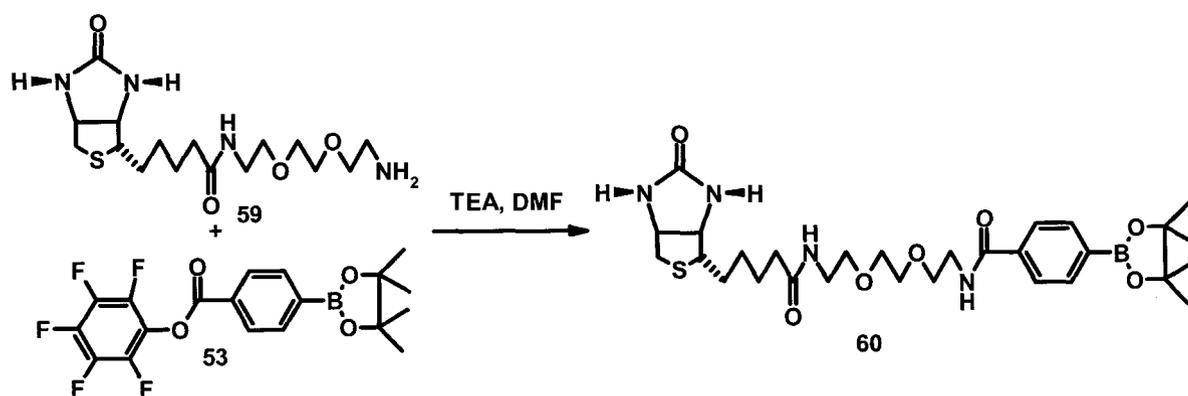


Figure IV.79 : Couplage Biotine-DADOO et l'acide phényleboronique.

La dernière étape de cette synthèse consiste en la déprotection de l'acide phényleboronique. Souvent, dans la littérature, cette déprotection se fait en présence du périodate de sodium^[64, 65], mais dans notre cas, l'utilisation de ce réactif conduit à la transformation de l'atome de soufre de la biotine en un mélange de sulfoxyde et de sulfone, c'est pour cette raison que nous avons opté pour l'acide chlorhydrique^[66] (Figure IV.80).

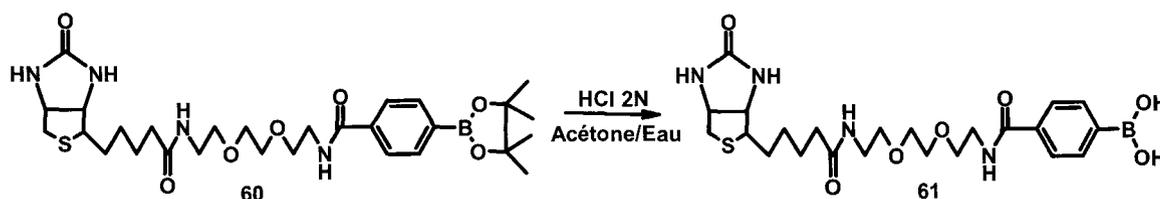


Figure IV.80 : Déprotection de l'acide phényleboronique protégé

IV.5.3.2. Tests réalisés en présence de ASC_GLY_BIOT

IV.5.3.2.1. Procédure générale de l'isolation spécifique des protéines ou peptides glycosylés

La procédure générale de l'isolement spécifique des protéines glycosylées en présence de ASC_GLY_BIOT et en utilisant la chromatographie d'affinité sur colonne d'avidine, se compose de cinq étapes (Figure IV.81). La première est la réaction des protéines avec le réactif, la seconde est la digestion enzymatique pour obtenir les peptides correspondants, la troisième étape de cette stratégie est le chargement du mélange sur la colonne d'avidine, ensuite une étape de lavage pour éliminer les peptides non-glycosylés et enfin l'éluion des peptides glycosylés et leur identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

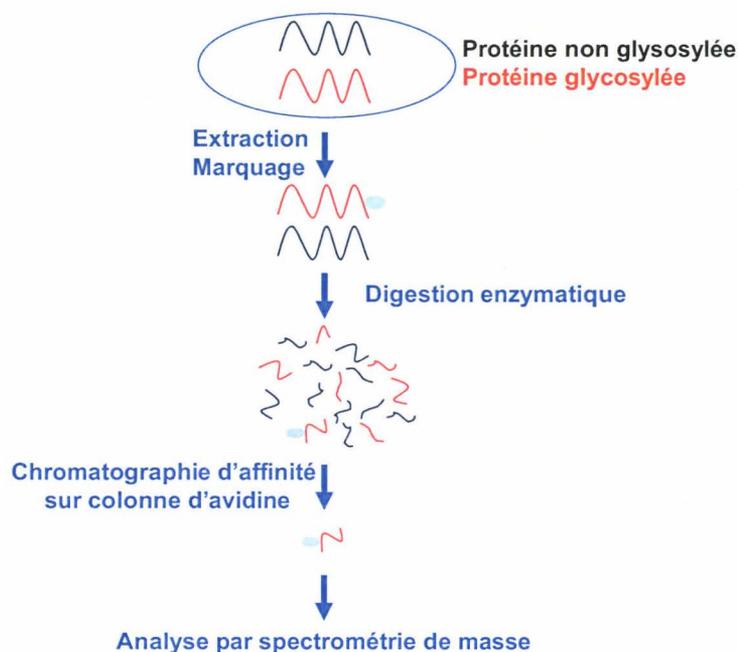


Figure IV.81 : Procédure générale de l'isolation spécifique des protéines glycosylées.

IV.5.3.2.2. Tests du réactif ASC-GLY_BIOT sur la rutine

Dans un premier temps, le réactif ASC_GLY_BIOT a été testé sur un composé glyco-conjugué, la rutine qui est un polyphénol glycosylé en position 3 par le rhamnoside (figure IV.82), ont été effectués.

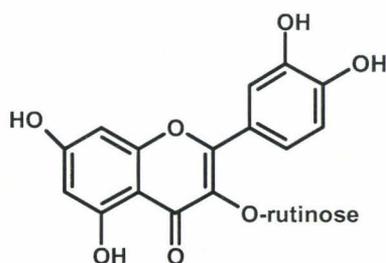


Figure IV.82 : Structure de la rutine.

Le protocole utilisé est le même que pour les glycopeptides mentionné précédemment. La figure IV.83 montre que le produit ASC_GLY-rutine issu de la complexation est sélectivement retenu sur la colonne pendant le chargement et le lavage. Lors de l'étape de l'élution, ASC_GLY-rutine est hydrolysé conduisant à la formation de ASC_GLY et de la rutine.

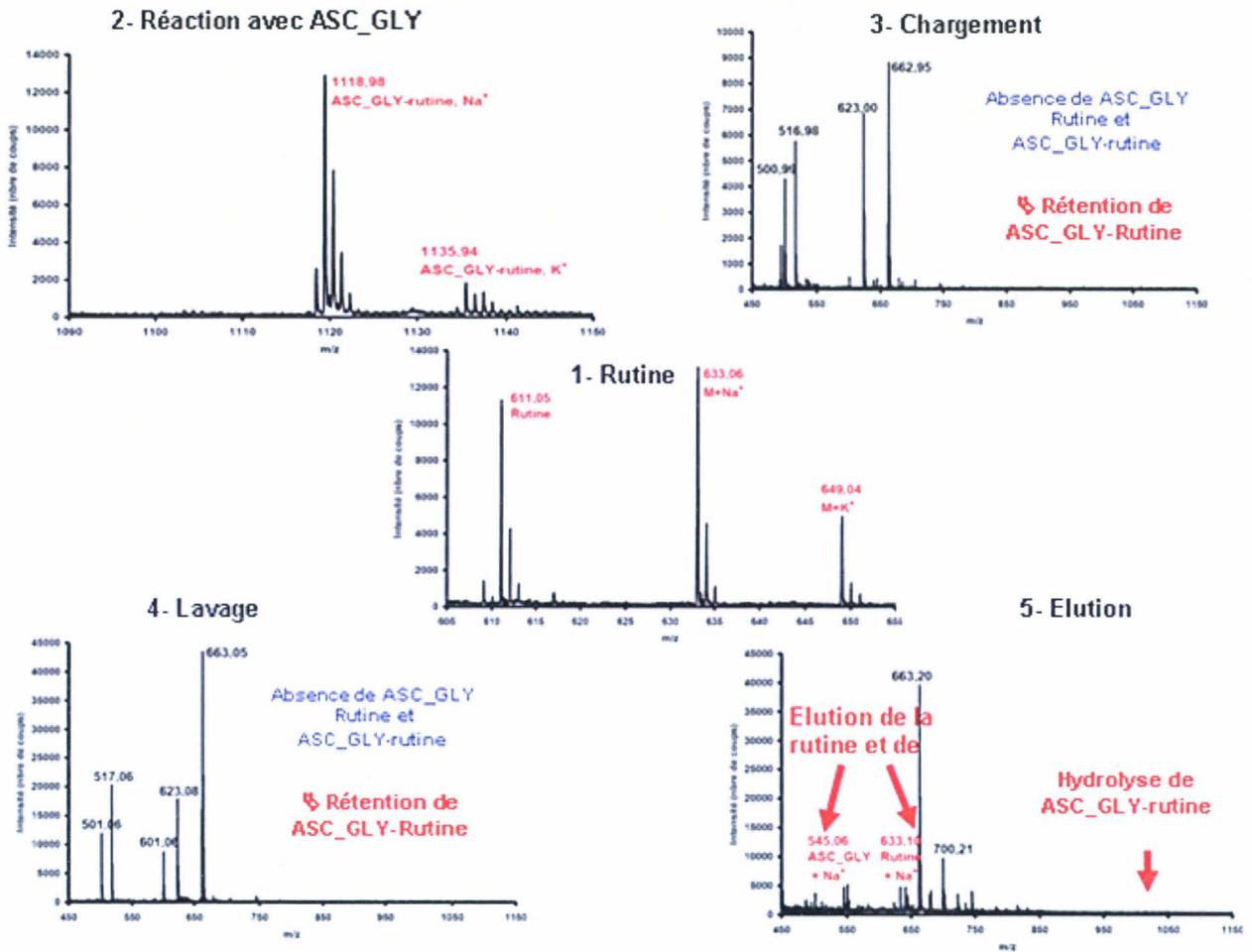


Figure IV.83 : Spectres de masse des différentes fractions obtenues pour les tests de ASC_GLY_BIOT et la rutine

IV.5.3.2.3. Tests sur un mélange de protéines glycosylées et non glycosylées

Les tests ont été réalisés sur un mélange de protéines glycosylées (Transferrine, ovalbumine, fêtuine), et non-glycosylées (albumine, lysozyme). La figure **IV.84** montre que les peptides glycosylés provenant de la digestion des protéines glycosylées du mélange sont sélectivement retenus sur la colonne. Les peptides non glycosylés apparaissent soit dans la fraction de chargement, soit dans la fraction de lavage.

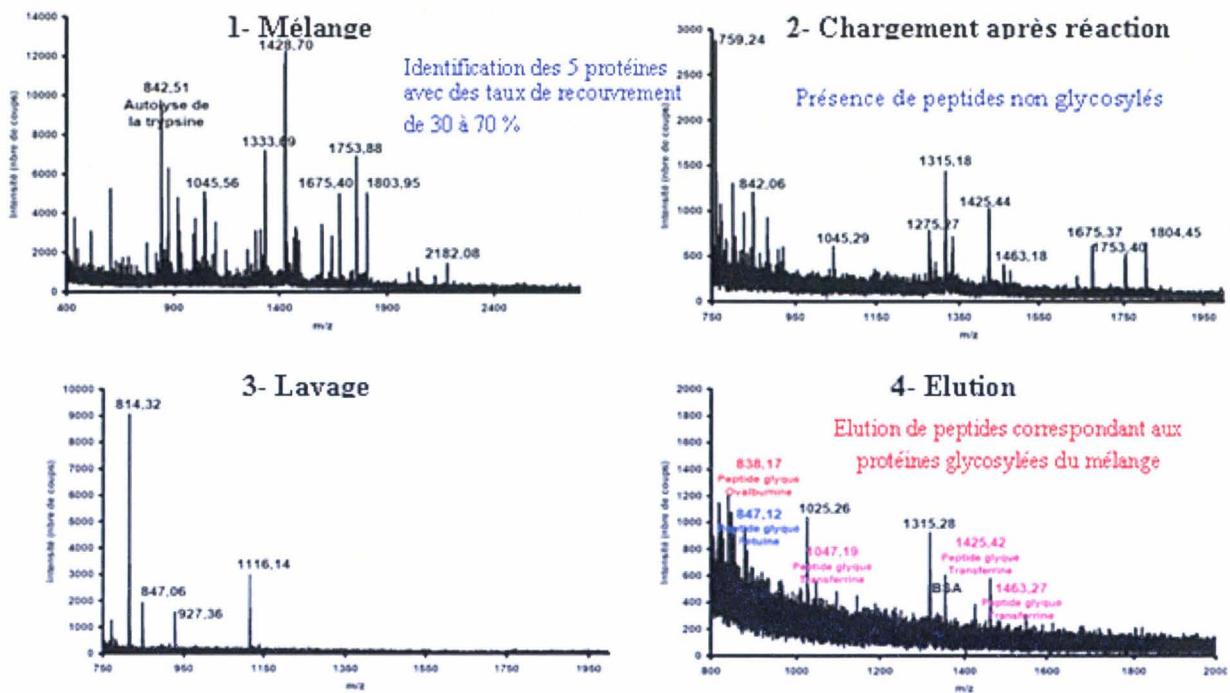


Figure IV.84 : Spectres de masses des différentes fractions obtenues pour les tests de ASC_GLY_BIOT sur un mélange de protéines glycosylées et non-glycosylées

IV.6. Détection sélective des protéines oxydées

IV.6.1. ASC_OX_BIOT, un nouveau réactif pour la détection des protéines oxydées.

Le plasma contient une grande variété de molécules porteuses d'informations dont certaines indiquent des états du métabolisme. Ce sont en particulier des réponses cellulaires, à différents stress mais aussi à des simulations de types hormonales, ou encore elles témoignent de maladies. Pour ces raisons le sang riche en protéines apparaît comme le milieu le plus propice à l'analyse protéomique pour diagnostiquer des maladies. Alors que des stress oxydants impliqués lors de certaines maladies ne cessent de se développer, les potentialités, antioxydantes du plasma quant à elles ne cessent de décroître et de nombreuses protéines sont ainsi oxydées. C'est dans ce cadre que nous avons développé une synthèse d'un réactif, ASC_OX_BIOT (Figure IV.85), comportant une phénylhydrazine pour l'isolement des protéines oxydées, couplée par l'intermédiaire d'un bras espaceur à une molécule de biotine qui permettra l'isolement sélectif sur une colonne d'avidine.

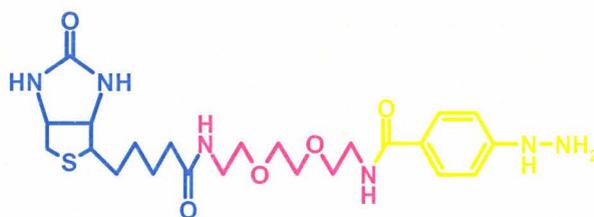


Figure IV.85 : Structure de ASC_OX_BIOT.

IV.6.1.1. Stratégie de synthèse

La synthèse de ASC_OX_BIOT suit la stratégie de synthèse de ASC_GLY_BIOT. La partie « biotine-DADDOO » est synthétisée de la même façon. Nous travaillons donc avec une sonde de type acide phénylhydrazine. Le couplage avec la fonction amine libre de l'espaceur a nécessité une activation de l'acide, nous avons donc procédé comme précédemment en utilisant le pentafluorophényltrifluoroacétate. Or, tel qu'il a été décrit par Leah M.Gayo et *al*^[67], les esters de pentafluorophényles réagissent simultanément comme agents de protection et d'activation avec les dérivés d'acide-amino carboxyliques. En effet, d'une part l'acide carboxylique est activé sous forme d'ester de pentafluorophényle et d'autre part l'amine primaire de l'hydrazine est protégée sous forme de trifluoroacétamide (Figure IV.86).

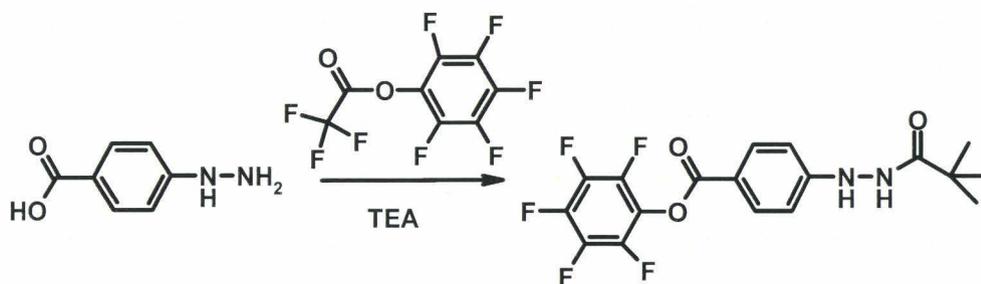


Figure IV.86 : Réaction de l'acide phénylhydrazine avec le pentafluorophényltrifluoroacétate.

Or la déprotection en milieu basique par le méthanolate de sodium et le carbonate de sodium tel qu'il a été décrit dans la littérature pour les fonctions amines^[68, 69] s'est avérée inopérante. En effet, un suivi par spectrométrie de masse du mélange réactionnel nous a toujours montré que la présence du produit protégé. Pour éviter ce problème, nous avons opté pour une étape supplémentaire de monoprotection de l'amine primaire de l'hydrazine avec le BOC;^[70] cette protection a l'avantage de se cliver facilement en milieu acide.^[71] Après la

monoprotection de l'amine nous avons pu cette fois activer la fonction acide carboxylique sans aucun problème. En effet, l'action du pentafluorophenyltrifluoroacétate sur le composé **62** en présence de la TEA dans le DMF donne accès au composé **63** avec un bon rendement (Figure IV.87).

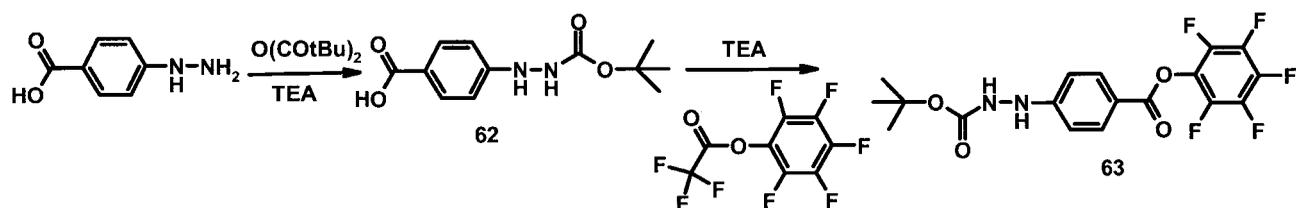


Figure IV.87 : Protection de l'amine primaire de l'hydrazine et activation de l'acide.

Les deux dernières étapes de cette synthèse sont le couplage de l'acide activé **63** avec la partie biotine-DADDOO **59**, et la déprotection finale à l'acide trifluoroacétique. Le couplage entre le composé **63** et le composé **59** a été réalisé avec un bon rendement, dans les conditions standards, en utilisant la TEA comme base et le DMF comme solvant (Figure IV.88).

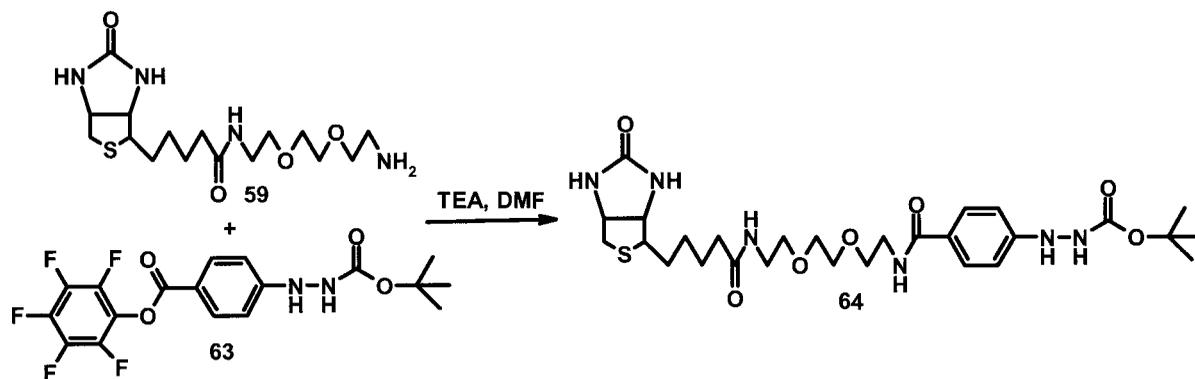


Figure IV.88 : Couplage de la biotine-DADDOO et l'acide phénylhydrazine activé.

Enfin la déprotection du Boc, groupement protecteur de l'amine primaire de l'hydrazine, a été effectuée quantitativement en présence d'acide trifluoroacétique^[71] (Figure IV.89).

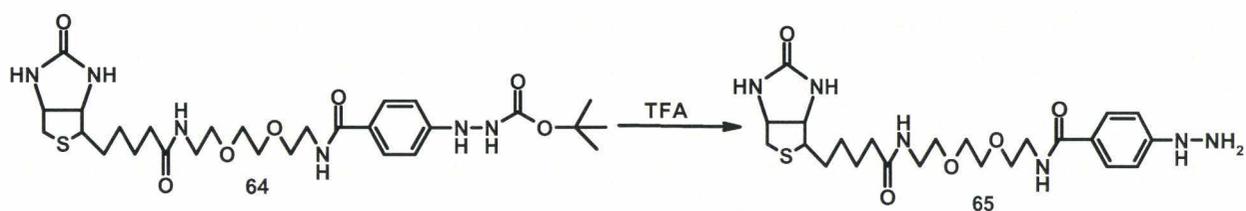


Figure IV.89 : Déprotection de l'amine primaire de l'hydrazine.

IV.6.1.2. Test du ASC_OX_BIOT sur du plasma

Nous avons évalué les performances de notre nouveau réactif ASC_OX_BIOT sur du plasma humain. L'objectif est donc de détecter les protéines oxydées dans ce plasma. Dans ce but, nous avons suivi la même stratégie que pour les tests avec ASC_GLY_BIOT, c'est-à-dire: (i) marquage du plasma avec ASC_OX_BIOT, (ii) digestion de cet échantillon, (iii) isolation des peptides d'intérêt sur colonne d'affinité, (iv) analyse par MALDI-TOF.

Les Figures IV.90 à IV. 93 présentent les spectres des différentes fractions : le plasma natif (Figure IV.90), la fraction obtenue pendant le chargement sur la colonne d'avidine (Figure IV.91), la fraction obtenue lors du lavage de la colonne (Figure IV.92), et enfin la fraction obtenue lors de l'élution (Figure IV.93).

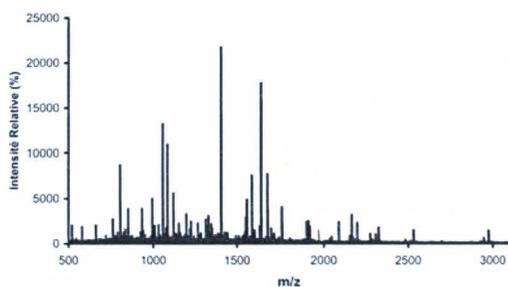


Figure IV.90 : Spectre de plasma.

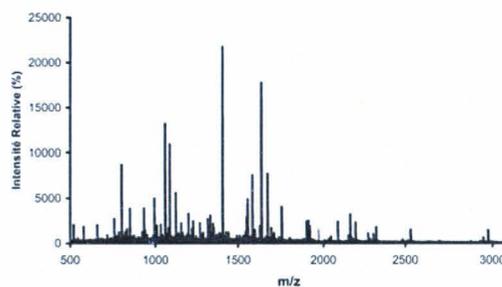


Figure IV.91 : Spectre de la fraction de chargement.

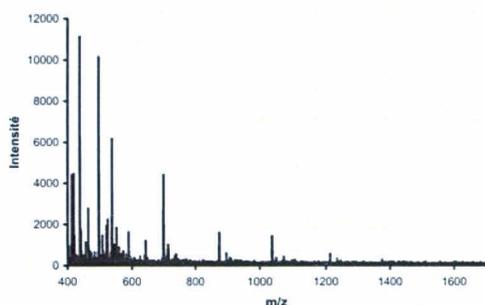


Figure IV.92 : Spectre de la fraction de lavage.

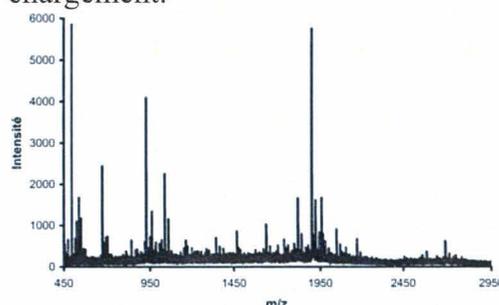


Figure IV.93 : Spectre de la fraction d'élution.

Chacun de ces spectres a conduit à une identification dans les bases de données. Dans le cas de la fraction d'élution, nous avons tenu compte de l'incrément de masse dû au marquage par le réactif ASC_OX_BIOT. Les tableaux 9 à 12 présentent les résultats obtenus.

Nom de la protéine	Masse (Da)/pI	% recouvrement	Numéro d'accèsion
Growth/differentiation factor 8 precursor	42751/6,3	14,0	O14793
P-selectin precursor	90846/6,2	13,0	P16109
Pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 2 precursor	37215/8,2	12,0	P11465
Olfactory receptor 52N2	35940/8,3	10,0	Q8NGI0
Hepatocyte growth factor-like protein precursor	80381/8,0	10,0	P26927
SPARC-like protein 1 precursor	75216/4,7	9,0	Q14515
Alanine aminotransferase	54637/6,8	9,0	P24298
Fibrinogen alpha/alpha-E chain precursor	94974/5,7	9,0	P02671
Olfactory receptor 2L2	35496/8,9	8,0	Q8NH16
Olfactory receptor 2L11	35649/8,9	8,0	Q8NG80
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 precursor	99122/5,6	7,0	Q06033
Very low-density lipoprotein receptor precursor	96099/4,6	7,0	P98155

Tableau IV.5 : Résultats du plasma, protéines identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Nom de la protéine	Masse (Da)/pI	% recouvrement	Numéro d'accèsion
Corticotropin-lipotropin precursor (Pro-opiomelanocortin) (POMC)	29424/7,6	5,0	P01189
Fasciculation and elongation protein zeta 1	45119/4,2	4,0	Q99689
NADH-ubiquinone oxidoreductase 30 kDa subunit, mitochondrial precursor	30242/7,0	4,0	O75489
Fasciculation and elongation protein zeta 2	36167/4,9	3,0	Q9UHY8
Alanine aminotransferase	54637/6,8	2,0	P24298

Tableau IV.6 : Résultats de la fraction de chargement, protéines identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Nom de la protéine	Masse (Da)/pI	% recouvrement	Numéro d'accèsion
Serum albumin precursor	69367/5,9	22,0	P02768
Serotransferrin precursor	77051/6,8	12,0	P02787
Interleukin-12 receptor beta-2 chain precursor	97136/7,9	13,0	Q99665
Endothelin-converting enzyme 2	89223/5,1	11,0	O60344
Apolipoprotein A-IV precursor	45371/5,3	21,0	P06727
Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8 precursor	38154/7,0	25,0	P31997
Estrogen sulfotransferase	35127/6,2	21,0	P49888
Endothelin-converting enzyme-like 1	87818/6,6	9,0	O95672
Apolipoprotein A-I precursor	30778/5,6	22,0	P02647
Glycogen phosphorylase, brain form	96697/6,4	11,0	P11216
Rod cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase alpha-subunit	99635/5,5	7,0	P16499

Tableau IV.7 : Résultats de la fraction de lavage, protéines identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Nom de la protéine	Masse (Da)/pI	% recouvrement	Numéro d'accèsion
Glutathione peroxidase (GSHPx-GI)	21907/7,6	14,0	P18283
NADH-ubiquinone oxidoreductase 30 kDa subunit, mitochondrial precursor	30242/7,0	14,0	O75489
Annexin A2 (Annexin II)	38604/8,7	8,0	P07355
Transcription initiation factor IIB	34833/8,7	9,0	Q00403
Alpha-1-acid glycoprotein 2precursor	23603/5,0	11,0	P19652
Cysteine-rich secretory protein-3 precursor (CRISP-3) (SGP28 protein)	27631/8,1	9,0	P54108
Ku,itz-type protease inhibitor 1precursor	56886/5,8	4,0	O43278

Tableau IV.8 : Résultats de la fraction d'éluion, protéines identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Comme attendu, nous retrouvons dans les trois premières fractions (native, chargement et lavage) des protéines représentatives du plasma et déjà référencées dans ce type d'échantillon : albumine, tranférine, apolipoprotéine, fibrinogène... Ce qui est plus intéressant ce sont les identifications obtenues pour la fraction d'éluion : nous avons pu identifier sept protéines dont trois sont glycosylées. Compte tenu de la structure de ASC_OX_BIOT, il est normal qu'il réagisse sur la fonction carbonyle des sucres. En revanche, quatre protéines ne sont pas glycosylées et comme elles ont réagi avec ASC_OX_BIOT, c'est qu'elles présentent au moins un site qui a subi une oxydation et donc l'apparition d'une fonction carbonyle. Ces protéines, par exemple, la glutathione peroxidase et la NADH-ubiquinone oxidoreductase participent en outre, à des processus redox dans la cellule et ont donc de fortes chances d'être effectivement oxydées, ce qui valide la méthodologie développée.

IV.6.2. Stratégie de synthèse de ASC_OX_FLUO, un nouveau colorant fluorescent pour la détection sélective des protéines oxydées

ASC_OX_FLUO se compose, comme ASC_GLY_FLUO, de trois partis : un fluorophore pour la détection sur gel d'électrophorèse, un espacer et une phénylhydrazine pour la capture sélective des protéines oxydées (Figure IV.94).

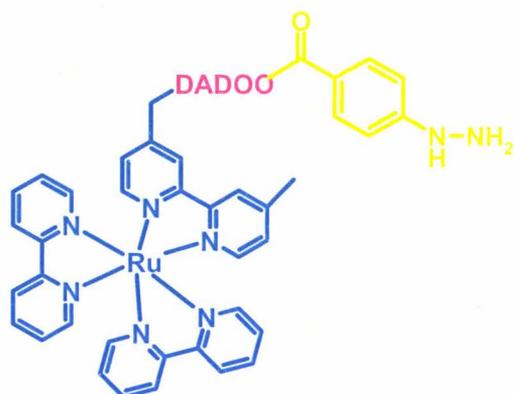


Figure IV.94 : Structure de ASC_OX_FLUO.

La première étape de la synthèse de ASC_OX_FLUO est donc la préparation de la partie fluorophore-DADOO, en effet l'action d'un équivalent de DADOO-Boc **57** sur le composé **58** dans le DMF et en présence de la triéthyleamine suivi d'une étape de déprotection de l'amine du DADOO par l'acide trifluoroacétique (TFA) donne accès avec un bon rendement au composé souhaité **59** (Figure IV.95).

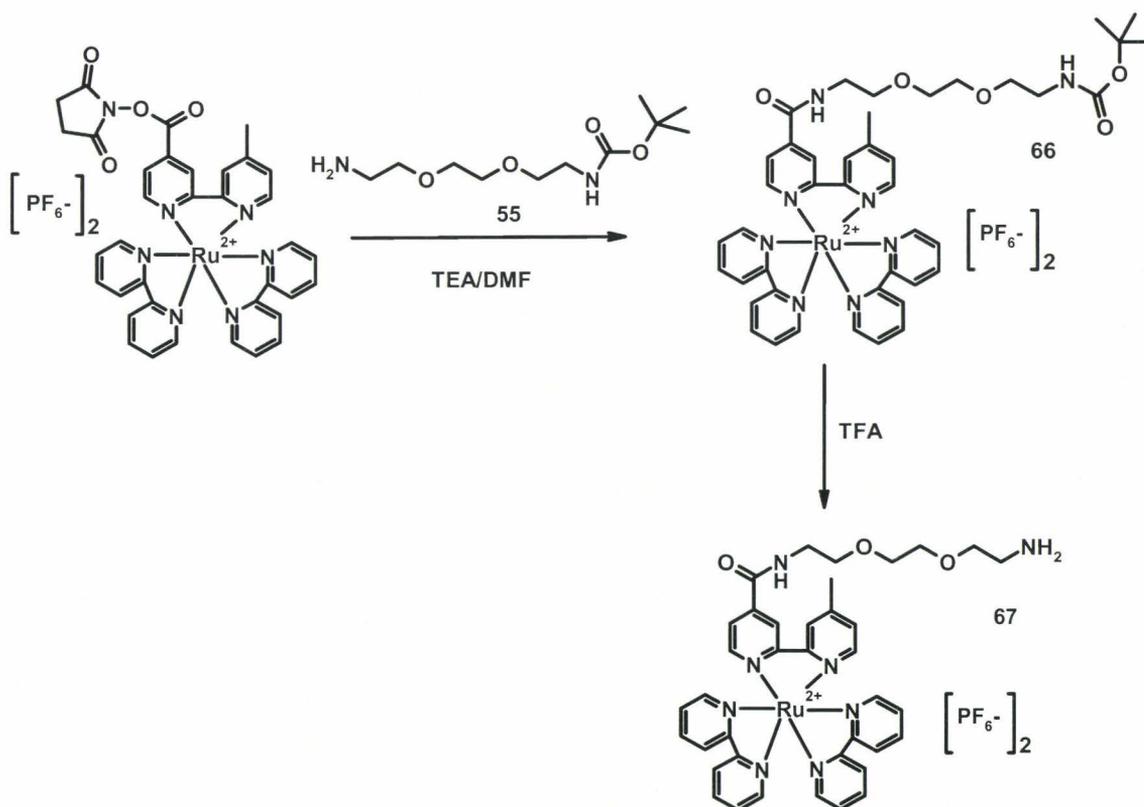


Figure IV.95 : Schéma de synthèse de la partie fluorophore-DADOO

Les deux dernières étapes de cette synthèse sont tout d'abord le couplage entre le composé **67** et la phényle hydrazine protégée au Boc en présence de triéthyleamine. Puis une déprotection de l'amine primaire de la phényle hydrazine au TFA donne accès à notre complexe (ASQ_OX_FLUO) **69** (Figure IV.96).

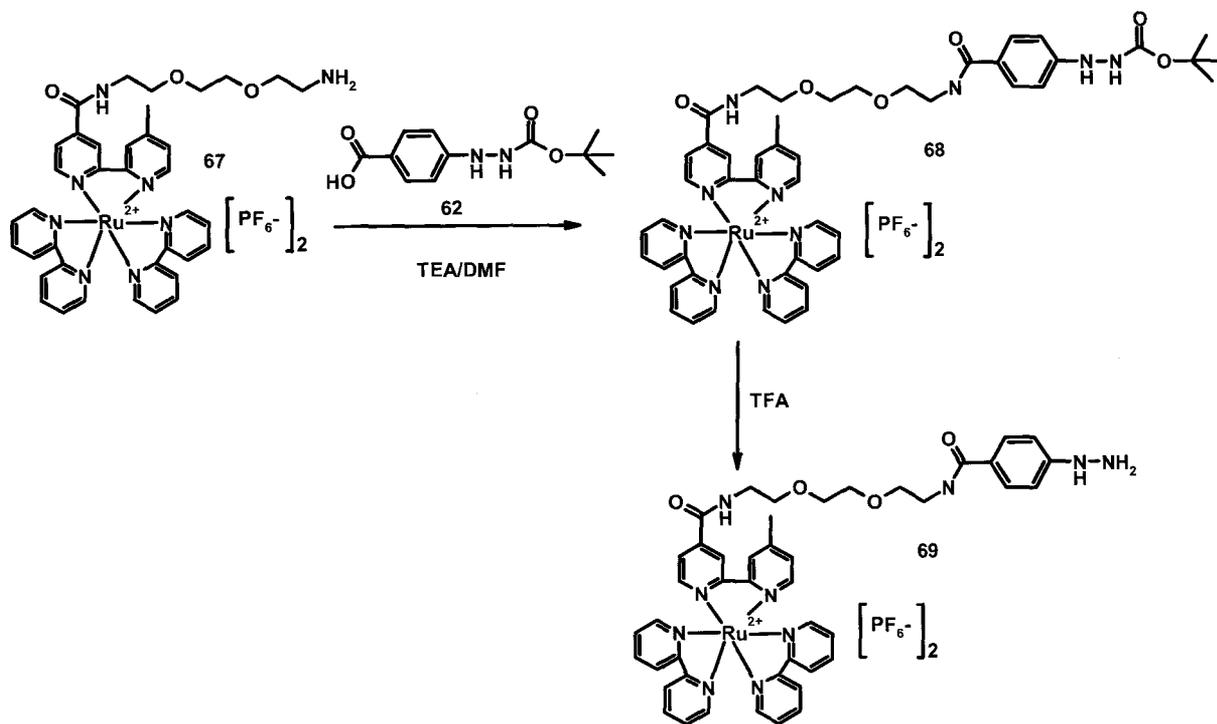


Figure IV.96 : Schéma des deux dernières étapes de la synthèse de ASC_OX_FLUO

IV.7. Conclusion

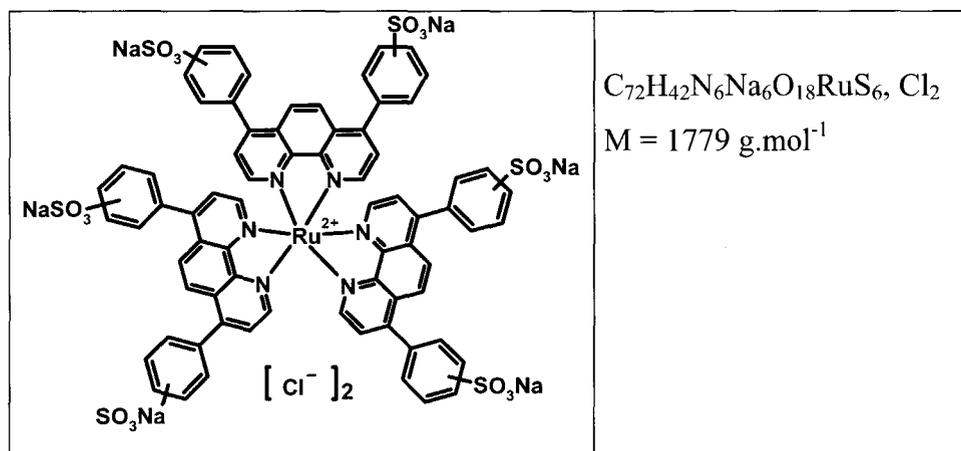
Nous avons développé de nouveaux réactifs pour la détection sélective des glycoprotéines et des protéines oxydées. Ces réactifs sont constitués d'une sonde permettant la reconnaissance de la fonction chimique recherchée, d'un bras espaceur, et d'une poignée permettant la manipulation de la protéine capturée. Suivant l'application voulue, la poignée a été une biotine pour la chromatographie sur colonne d'avidine et un fluorophore pour la détection sur gel d'électrophorèse. Ainsi nous avons synthétisé ASC_GLY_BIOT et ASC_OX_BIOT pour la détection des glycoprotéines et des protéines oxydées par affinité sur colonne d'avidine, et ASC_GLY_FLUO et ASC_OX_FLUO pour leur détection sur gel d'électrophorèse. Les premiers tests protéomiques ont été très encourageants puisqu'on a pu détecter sélectivement les protéines visées; d'autres études d'optimisation sont en cours

d'élaboration au laboratoire. Des molécules analogues (ASC_PHOS_BIOT et ASC_PHOS_FLUO) pour la capture des phosphopeptides sont aussi en cours de synthèse.

V. Partie expérimentale

V.1 Colorants Fluorescents

V.1.1 Ru(BPS)₃ (43)



Mode opératoire :

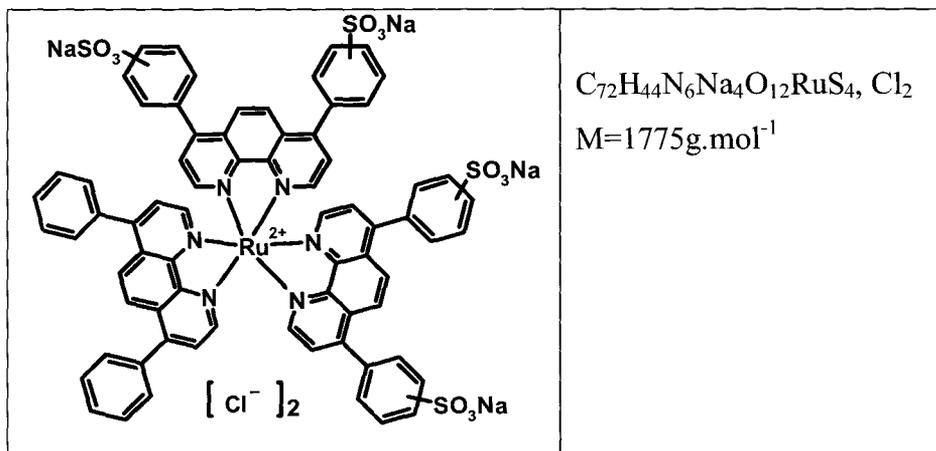
Dans un ballon de 100 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon, (0,05 g, 0,21 mmoles) de chlorure de ruthénium et (0,39 g, 0,73 mmoles) de bathophénanthroline disulfonate disodium sont dissous dans 13 mL de MeOH et 7ml d'eau. Le mélange est porté à reflux pendant 48 heures. Les solvants sont évaporés et le solide noir obtenu est trituré dans l'acétone (20 mL). Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur cartouche LC-SPE avec comme éluant un mélange 30/70 méthanol/eau.

Rendement : 70%

Analyses :

MALDI-TOF-SM (m/z) trouvé : 1572,9245 ; Calculé pour $C_{72}H_{40}N_6O_{18}RuS_6$: 1572,9933 $[MH - 2Cl - 6Na]^+$

V.1.2. RuBP(BPS)₂ (44)



Mode opératoire :

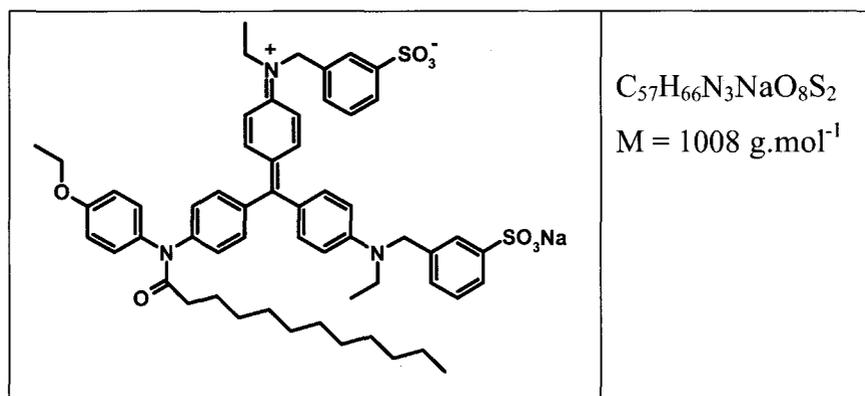
Dans un ballon de 50 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon, (0,05 g, 0,21 mmoles) de chlorure de ruthénium et (0,07 g, 0,21) de bathophénanthroline sont dissous dans 10 mL de MeOH. Le mélange est porté à reflux pendant 12 heures. (0,25g, 0,43 mmoles) de bathophénanthroline disulfonate disodium dans 5 ml d'eau sont ensuite ajoutés. Le mélange est porté encore une à reflux pendant une nuit. Le produit obtenu est purifié par chromatographie sur cartouche LC-SPE avec comme éluant un mélange 30/70 méthanol/eau.

Rendement : 70%

Analyses :

MALDI-TOF-SM (m/z) trouvé : 1414,9752; Calculé pour $C_{72}H_{42}N_6O_{12}RuS_4$: 1415,0955 $[MH - 2Cl - 4Na]^+$.

V.1.3. Vert de coomassie (45)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 100 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon, on introduit (1,0 g, 5,00 mmoles) d'acide laurique (39) dissout dans 10 mL de chlorure de thionyle. Le mélange est agité pendant trois heures à température ambiante. L'excès du chlorure a été éliminé par évaporation. Le chlorure d'acyle est solubilisé dans 10 mL de DMF et (4,00 g, 4,69 mmoles) de bleu de coomasie sont ensuite ajoutés. Le milieu est agité à température ambiante pendant 5 heures. On obtient après évaporation un solide vert.

Rendement : 35%

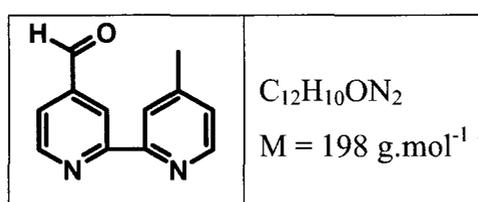
Analyses :

MALDI-TOF-SM (m/z) trouvé : 984,3789; Calculé pour $C_{57}H_{70}N_3O_8S_2$: 984,4285 [MH-Na].

V.2 Synthèse de réactifs pour l'étude sélective de sous-protéomes

V.2.1. Synthèse de ASC_GLY_FLUO

V.2.1.1. 4'-Méthyl-[2,2']bipyridinyl-4-carbaldehyde (49)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 100ml, (2,00 g, 10,92 mmoles) de 4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine et (1,32g, 11,946 mmoles) de SeO₂ sont dissous dans 70 mL de dioxane. Le mélange est porté à reflux pendant 24 heures. Après refroidissement, la suspension est filtrée. Le solvant est évaporé et le résidu solide est suspendu dans 250 mL d'acétate d'éthyle. La suspension est filtrée à nouveau, et le filtrat est lavé avec une solution 1M de Na₂CO₃ (3 fois 75 mL), pour retirer les acides carboxyliques. Les aldéhydes de la phase organique sont extraits avec une solution de Na₂S₂O₅ 0,3M (3 fois 75ml). Les phases aqueuses sont combinées et amenés à pH 10 par addition d'une solution de carbonate de sodium 1M. Les aldéhydes sont alors extraits avec du CH₂Cl₂ (4 fois 75 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium et concentrées sous vide, pour donner un solide blanc.

Rendement : 45%

Analyse :

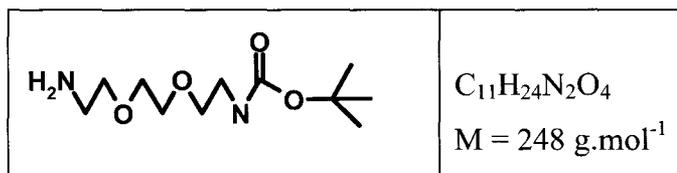
Point de fusion : 110-112 °C

RMN ¹H (CDCl₃) : 2,46 (s, 3H); 7,19 (d, 1H, *J* = 4,9 Hz); 7,72 (dd, 1H, *J* = 1,8Hz; *J* = 4,9 Hz); 8,27 (m, 1H); 8,57 (d, 1H, *J* = 4,9 Hz); 8,82 (m, 1H); 8,85 (d, 1H, *J* = 4,9 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃) : 21,2 (3C); 120,6; 121,4; 122,1; 125,4, 142,6; 148,5; 149,2; 150,3; 154,6; 158,2; 191,8.

HR-FAB-SM (*m/z*) trouvé : 199,0870; Calculé pour C₁₂H₁₁ON₂ : 199,0871 [M+H]⁺.

V.2.1.2. (2-[2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-ethyl)-carbamic acid tert-butyl ester (50)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 100 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon, (2,45g, 11,23 mmoles) de (Boc)₂O dissous dans 30 mL de dioxane sont ajoutés goutte à goutte à une solution de DADOO (12,50 g, 84,45 mmoles) dans 30 ml de dioxane. La solution est agitée à

température ambiante pendant 24 heures, et le solvant est éliminé. 100 mL d'eau sont ajoutés et la solution est filtrée. Le filtrat est ensuite extrait avec du dichlorométhane (3 fois 50 mL), et les phases organiques combinées sont lavées avec de l'eau (2 fois 20 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, et concentrée sous vide pour donner une huile incolore.

Rendement : 80%

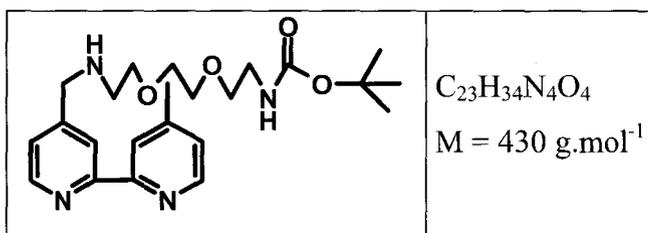
Analyse :

RMN ¹H (CDCl₃) : 1,45 (s, 9H); 3,32 (q, 2H, *J* = 5,2 Hz, *J* = 10,5 Hz); 3,54 (t, 4H, *J* = 5,1 Hz, *J* = 10,5 Hz); 3,61 (s, 4H); 3,70 (s, 2H).

RMN ¹³C (CDCl₃) : 28,36 (3C); 30,95; 40,26; 41,57; 51,12; 70,14; 73,23; 79,16; 155,99.

HR-FAB-SM (*m/z*) trouvé : 249,1817; Calculé pour C₁₁H₂₅N₂O₄ : 249,1814 [M+H]⁺.

V.2.1.3. [2-(2-{2-[(4'-Méthyl-[2,2']bipyridinyl-4-ylméthyl)-amino]-éthoxy}-éthoxy)-éthyl]-carbamic acid tert-butyl ester (51)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 100 mL, (0,06 g, 0,31 mmoles) d'aldéhyde (**49**) et (0,08 g, 0,31 mmoles) du composé (**50**) sont dissous dans 15 mL d'éthanol. Cinq gouttes de triéthylamine sont ensuite ajoutées. La solution est portée à reflux pendant trois heures. Après refroidissement, (0,04 mg, 1,51 mmoles) de NaBH₄ sont ajoutés, et la solution est agitée à température ambiante pendant 24 heures. Le solvant est alors évaporé, et le résidu solide est dilué avec 20 mL d'acétate d'éthyle et lavé avec une solution de Na₂CO₃ 1M (2 fois 15 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, et concentrée sous vide pour donner un solide visqueux.

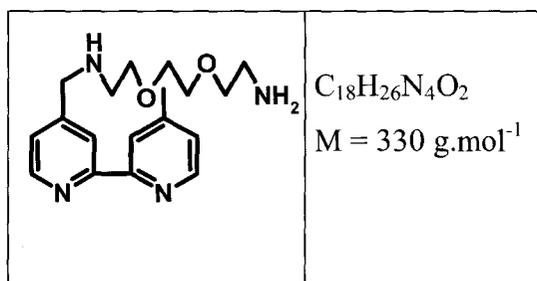
Rendement : 79%

Analyse :

RMN ¹H (CDCl₃) : 1,41 (s, 9H); 2,43 (s, 3H); 2,82 (t, 2H, *J* = 5,3 Hz, *J* = 10,5 Hz); 3,30 (q, 2H, *J* = 5,1 Hz, *J* = 10,1 Hz); 3,51 (t, 2H, *J* = 5,1 Hz, *J* = 5,1 Hz, *J* = 10,3 Hz); 3,62 (m, 6H); 3,91 (s, 2H); 7,22 (d, 1H, *J* = 4,7 Hz); 7,34 (d, 1H, *J* = 4,9 Hz); 8,22 (large s, 1H), 8,33 (large s, 1H), 8,52 (d, 1H, *J* = 4,9 Hz), 8,61 (d, 1H, *J* = 4,9 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃) : 21,3; 41,2; 48,9; 52,5; 67,2; 70,5; 70,5; 117,9; 120,1; 124,8; 127,5; 142,9; 144,2; 147,1; 147,3; 156,8; 157,9.

V.2.1.4. 2-(2-{2-[(4'-Methyl-[2,2']bipyridinyl-4-ylmethyl)-amino]-ethoxy}-ethoxy)-éthylamine (52).



Mode opératoire :

Dans un ballon de 50 mL muni d'un agitateur magnétique, on introduit (0,11 g, 0,24 mmoles) d'aldéhyde (**49**) dissous dans 5 mL de dichlorométhane. On ajoute (1,2 mL, 16 mmoles) d'acide trifluoroacétique. La solution est agitée à température ambiante pendant 12 heures, puis le solvant et le TFA en excès sont évaporés. Le solide visqueux est lavé avec 10 mL d'une solution de potasse 1M et extrait avec du dichlorométhane (3 fois 15 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur sulfate de magnésium, et concentrées sous vide.

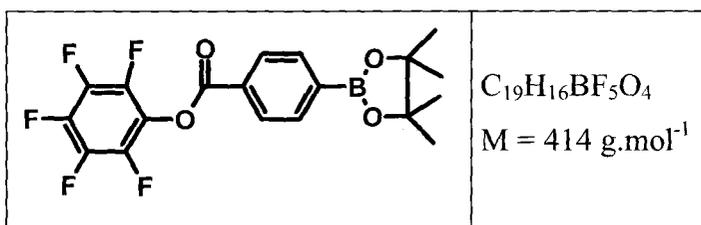
Rendement : 79%

Analyse :

RMN ^1H (CDCl_3) : 2,40 (s, 6H); 2,81 (t, 3H, $J = 4,9$ Hz, $J = 10,4$ Hz); 3,48 (t, 2H, $J = 5,44$ Hz, $J = 10,8$ Hz); 3,58 (m, 4H); 3,87 (s, 2H); 7,10 (d, 1H, $J = 5,3$ Hz); 7,30 (d, 1H, $J = 5,4$ Hz); 8,18 (s, 1H); 8,29 (s, 1H); 8,49 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz); 8,57 (d, 1H, $J = 4,9$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 21,5; 28,4; 39,5; 49,2; 52,3; 68,7; 69,9 70,3; 72,6; 79,4 118,3; 120,1; 124,8; 127,5; 143,3; 144,7; 146,3; 146,7; 155,8;156,8; 157,9.

V.2.1.5. 4-(4,4,5,5-Tetraméthyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzoic acid 1-(1,2-difluoropropenyl)-2,3,4-trifluoro-buta-1,3-dienyl ester (53)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 50ml sous agitation magnétique et courant d'argon on introduit (0,20 g, 0,81mmoles) d'acide phénylboronique dissous dans 10 mL de DMF. On ajoute (0,16ml, 1,61 mmoles) de triéthylamine et (0,21 mL, 1,28 mmoles) de pentafluorophényl trifluoroacétate. La solution est agitée vigoureusement à température ambiante pendant 40 min. Le DMF est évaporé et le résidu solide obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice en utilisant comme éluant un mélange 80/20 acétate d'éthyle/éther de pétrole. On obtient un solide blanc très cristallin.

Rendement : 89%

Analyse :

Point de fusion : 74-76°C.

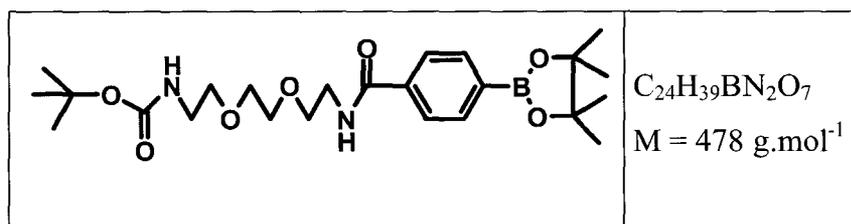
RMN ^1H (CDCl_3) : 1,36 (s, 12H), 7,95 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz); 8,15 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 24,78; 84,39; 125,33; 128,92; 129,58; 135; 136,23; 137,8; 141,2; 142,9; 162,6.

RMN ^{19}F (CDCl_3) : -152,7; -158,3; -162,7

HR-FAB-SM (m/z) trouvé : 415,1151; Calculé pour $C_{19}H_{17}O_4F_5B$: 415,1176
[$M+H$]⁺.

V.2.1.6. [2-(2-{2-[4-(4,4,5,5-Tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzoylamino]-ethoxy}-ethoxy)-ethyl]-carbamic acid tert-butyl ester (54)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 50 mL muni d'un agitateur magnétique et sous courant d'argon, (0,30 g, 0,72 mmoles) d'acide phénylboronique activé (**53**) et (0,20 mg, 0,81 mmoles) de DADDO protégé (**50**) sont dissous dans 7 mL de DMF. Cinq gouttes de triéthylamine sont ensuite ajoutées. La solution est agitée à température ambiante pendant 6 heures. Le DMF est évaporé, le résidu obtenu est dissous dans 30 mL d'acétate d'éthyle et lavé avec de l'eau (3 fois 20 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et concentrée sous vide.

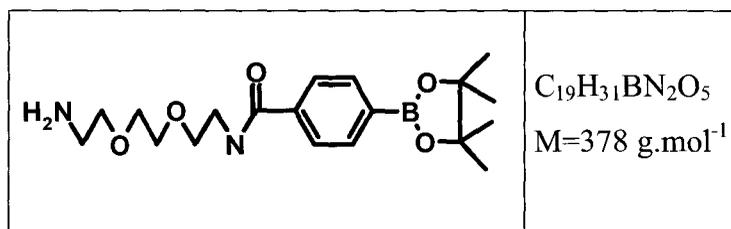
Rendement : 89%

Analyse :

RMN ¹H ($CDCl_3$) : 1,35 (s, 12H); 1,45 (m, 9H); 3,3 (m, 2H); 3,55 (t, 2H); 3,65 (m, 8H); 7,83 (large s, 2H), 7,99 (large s, 2H)

RMN ¹³C ($CDCl_3$) : 24,87 (4C); 28,40 (3C); 39,83; 40,32; 69,82; 70,25; 79,13; 84,15 (2C); 126,31; 128,86; 129,64; 134,8; 135,1; 136,7; 156,3 (2C); 162,88; 167,88.

V.2.1.7. N-{2-[2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-ethyl}-4-(4,4,5,5-tetraméthyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzamide (55)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 50 mL (0,25 g, 0,52 mmoles) du composé (54) sont dissous dans 2 mL de dichlorométhane. On ajoute (0,2 ml, 2,6 mmoles) d'acide trifluoroacétique. La solution est agitée à température ambiante pendant une nuit. La solution est alors concentrée sous vide, puis placée sous vide poussé pendant 2 heures.

Rendement : 95%

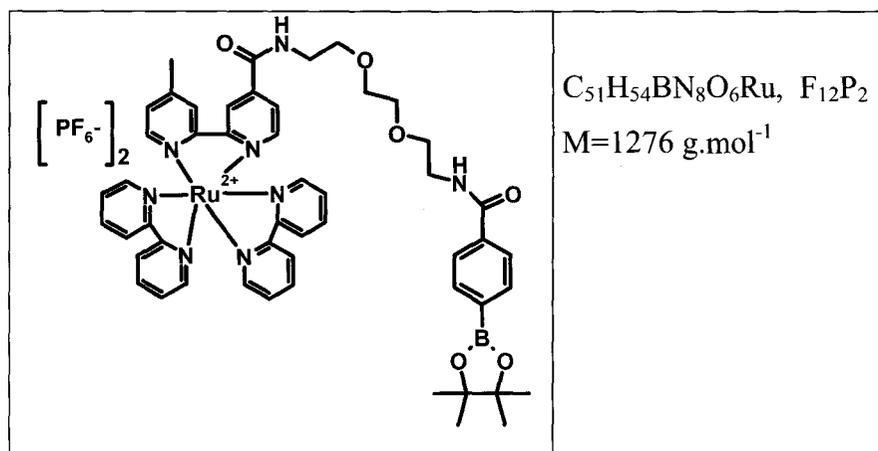
Analyse :

RMN ^1H (CDCl_3) : 1,35 (s, 12H); 3,16 (s, 2H); 3,7 (m, 10H); 7,72 (d, 2H, $J = 8,13$ Hz); 7,85 (d, 2H, $J = 8,13$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3) : 24,8 (4C), 32,1; 37,3; 39,7; 39,9; 69,5; 70; 84,2 (2C); 129,0 (2C); 129,65; 135,0; 135,7 (2C); 169,1.

HR-FAB-SM (m/z) trouvé : 379,2411; Calculé pour $C_{19}H_{32}O_5N_2B$: 379,2408 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

V.2.1.8. ASC_GLY_FLUO_protégé (56)



Mode opératoire :

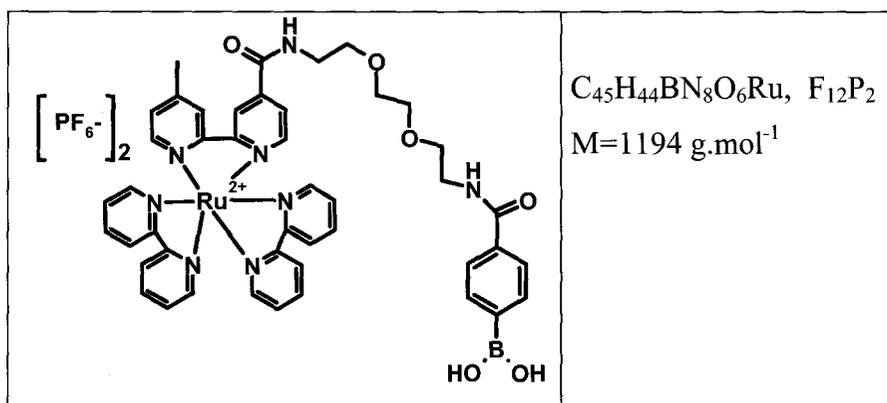
Dans une capsule de 2 mL, sous agitation magnétique (5 mg, 0,005 mmoles) de complexe activé et (2,23 mg, 0,006 mmoles) du composé (**55**) sont dissous dans 0,7 mL de DMF. (1,4 μL , 0,015 mmoles) de triéthylamine sont ensuite ajoutés. La solution est agitée à température ambiante pendant 5 heures, puis le DMF est évaporé sous vide. Le solide rouge obtenu est trituré dans de l'éther diéthylique (5 mL), puis séché sous vide poussé.

Rendement : 80 %

Analyse :

ESI-SM (m/z) trouvé : 1132,2561; Calculé pour $C_{51}H_{55}BN_8O_6Ru, PF_6^-$: 1132,2959 $[MH^+-PF_6]^-$.

V.2.1.9. ASC_GLY_FLUO (57)



Mode opératoire :

(5,00 mg, 0,005 mmoles) du composé **(56)** sont dissous dans 1ml d'une solution de HCl 2N. La solution est agitée à température ambiante pendant une nuit. L'eau est alors évaporée sous vide, et le résidu solide est trituré dans de l'éther diéthylique (5 mL). Le solide rouge obtenu est séché sous vide poussé pendant une heure.

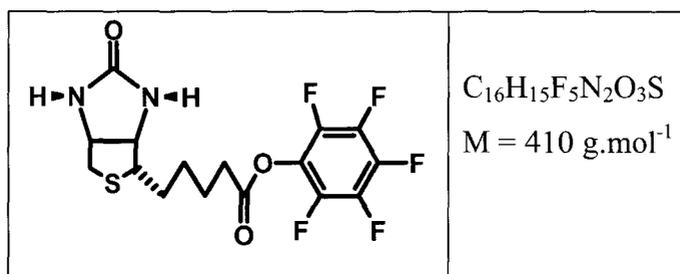
Rendement : 85%

Analyse :

ESI-SM (*m/z*) trouvé : 1050,2556; Calculé pour C₄₅H₄₅BN₈O₆Ru, PF₆ : 1050,2175 [M -PF₆]⁺.

V.2.2. Synthèse de ASC_GLY_BIOT

V.2.2.1. Pentafluorophenyl 5-[(3S,7R)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl]pentanoate (**58**)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 100 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon, on introduit (0,40 g, 1,64 mmoles) de biotine dans 10 ml de DMF à 70°C pour bien dissoudre la biotine. On remet le mélange à température ambiante et on ajoute (0,47 mL, 3,28 mmoles) de TEA et (0,42 mL, 2,64 mmoles) de pentafluorophényl trifluoroacétate. La solution est agitée vigoureusement à température ambiante pendant 40 min. Le DMF est évaporé. Le produit est obtenu par précipitation dans l'éther diéthylique.

Rendement : 85%

Analyse :

Point de fusion : 182-184 °C (182-184).^[72]

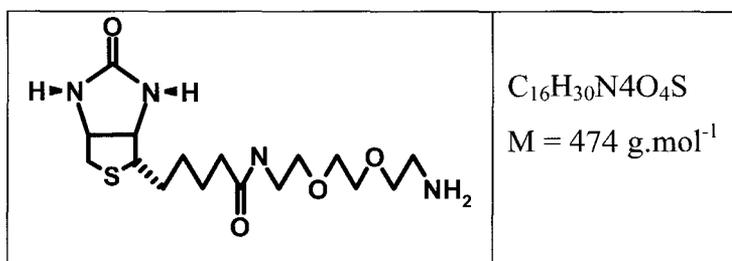
RMN ¹H ([D6]DMSO) : 1,41-1,72 (m, 6H) ; 2,57 (d, 1H $J = 12,2$ Hz); 2,79 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz) ; 2,84 (dd, 1H, $J = 12,4$ Hz, $J = 5,2$ Hz) ; 3,13 (m, 1H) ; 4,12 (m, 1H); 4,31 (m, 1H); 6,39 (s, 1H); 6,47 (s, 1H)

RMN ¹³C ([D6]DMSO) : 24,3; 27,7; 27,9; 32,3; 39,8; 25,3; 59,19; 61,0 ; 124,5; 137,5; 138,0; 140,6; 162,7; 169,5.

RMN ¹⁹F ([D6]DMSO) : -153,6 (t, 2F, $J = 19,8$ Hz); -158,1 (t, 1F, $J = 23,0$ Hz); -162,6 (t, 2F, $J = 21,4$ Hz)

HR-FAB-SM (m/z) trouvé : 411,0794; Calculé pour C₁₆H₁₆O₃N₂F₅S : 411,0802 [M+H]⁺.

V.2.2.2. 5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-pentanoic acid {2-[2-(2-amino-ethoxy)-ethoxy]-ethyl}-amide (59)



Mode opératoire :

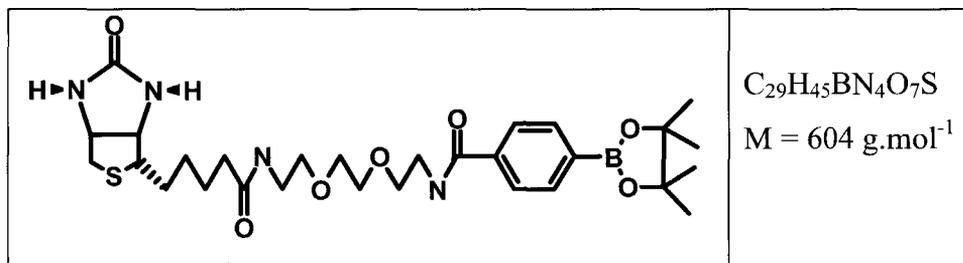
Dans un ballon de 50 mL, sous atmosphère inerte, (0,20, 0,49 mmoles) de biotine activée (59) dissous dans 5 mL de DMF sont ajoutés goutte-à-goutte à une solution de (0,70 mL de 4,90 mmoles) de DADDO et (0,21 mL, 1,47 mmoles) de TEA. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant trois heures. Le DMF est ensuite évaporé. Le produit est obtenu par précipitation dans l'éther diéthylique.

RMN ¹H (CD₃OD) : 1,43-1,78 (m, 6H); 2,21 (d, 2H $J = 7,5$ Hz); 2,67 (d, 1H, $J = 12,7$ Hz), 2,79 (t, 2H, $J = 7,3$ Hz); 2,84 (t, 2H, $J = 5,1$ Hz); 2,91(dd, 1H $J = 12,4$ Hz, $J = 5,2$ Hz); 3,20 (m, 1H); 3,30 (m, 2H); 3,55-3,64 (m, 8H); 4,30 (m, 1H); 4,48 (m, 1H)

RMN ¹³C (CD₃OD) : 26,9; 29,5; 29,8; 36,8; 40,3; 41,7; 57,0; 61,6; 66,9; 70,7; 71,3; 72,1; 166,1; 176,2.

HR-FAB-SM (*m/z*) trouvé : 375,2061; Calculé pour C₁₆H₃₁O₄N₄S : 375,2066
[M+H]⁺.

V.2.2.3. N-[2-(2-{2-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-pentanoylamino]-ethoxy}-ethoxy)-ethyl]-4-(4,4,5,5-tetramethyl-[1,3,2]dioxaborolan-2-yl)-benzamide (60)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 50 mL, sous agitation magnétique et atmosphère inerte (0,20, 0,42 mmoles) de biotine-DADDOO (**59**) dissous dans 4 mL de DMF et (0,12 mL, 1,18 mmoles) de TEA, sont ajoutés goutte-à-goutte à une solution (0,28 g, 0,69 mmoles) d'acide phényl boronique activé (**29**), dans 13 mL de DMF pendant une heure. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant trois heures. Le DMF est ensuite évaporé. Le produit est obtenu par précipitation dans l'éther diéthylique.

Rendement : 85%

Analyse :

RMN ¹H (CD₃OD) : 1,42 (s, 12H, CH₃); 1,53-2,02 (m, 6H); 2,22 (d, 2H, *J* = 7,5 Hz); 2,97 (d, 1H *J* = 12,4 Hz); 3,25 (m, 1H); 3,49-3,64 (m, 8H); 3,55 (m, 4H); 4,30 (1H, m); 4,48 (m, 1H); 4,32 (m, 1H); 4,48 (m, 1H); 8,01 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz); 8,25 (d, 2H, *J* = 8,4 Hz).

RMN ¹³C (CD₃OD) : 26,3; 29,5; 29,7; 36,8; 40,3; 40,8; 57,0; 61,62; 63,4; 70,6; 71,3; 73,5; 84,4; 127,3; 135,8; 136,2; 138,8; 166,1; 170,2; 176,2.

HR-FAB-SM (*m/z*) trouvé : 605,3184; Calculé pour C₂₉H₄₆O₇N₄SB : 605,3186
[M+H]⁺.

Mode opératoire :

Dans un ballon de 50 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon, (0,30 g, 1,30 mmoles) de (Boc)₂O dissous dans 4 mL de DMF sont ajoutés goutte à goutte à une solution d'acide 4-hydrazinobenzoïque (0,20 g, 1,31 mmoles) et de triéthylamine (0,36 mL, 1,96 mmoles) dans 4 ml de DMF. La solution est agitée à température ambiante pendant trois heures. Le milieu réactionnel est dilué avec 30 mL d'acétate d'éthyle, neutralisé par de HCl à 3% et lavé deux fois avec 30 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé. Le produit est obtenu par recristallisation dans le chloroforme.

Rendement : 73%

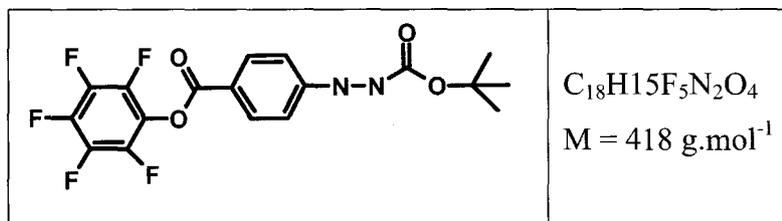
Analyse :

RMN ¹H (CD₃OD) : 1,51 (s, 9 H, CH₃), 6,76 2H, d, *J* = 8,9 Hz); 7,85 (d, 2H, *J* = 8,9 Hz).

RMN ¹³C (CD₃OD) : 28,6; 81,6; 112,0; 121,7; 132,5; 155,0; 158,7; 170,33.

HR-FAB-SM (*m/z*) trouvé : 253,1192; Calculé pour C₁₂H₁₇O₄N₂ : 253,1188 [M+H]⁺.

V.2.3.2. 4-(N'-tert-Butoxycarbonyl-hydrazino)-benzoic acid pentafluorophenyl ester (63)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 50 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon, (0,10 g 1,64 mmoles) du composé (62) sont dissous dans 4 mL de DMF. (0,13 ml, 3,28 mmoles) de triéthylamine et (0,15 mL, 2,46 mmoles) de pentafluorophényltrifluoracétate sont ensuite ajoutés. Le mélange est agité à température ambiante pendant 5 heures. Le milieu réactionnel est dilué avec 30 mL d'acétate d'éthyle puis lavé trois fois avec 30 mL d'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium et le solvant est évaporé, Le produit est ensuite

purifié par chromatographie sur colonne de silice avec comme éluant un mélange 70/30 d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle.

Rendement : 60%

Analyse :

Point de fusion : 105-107°C

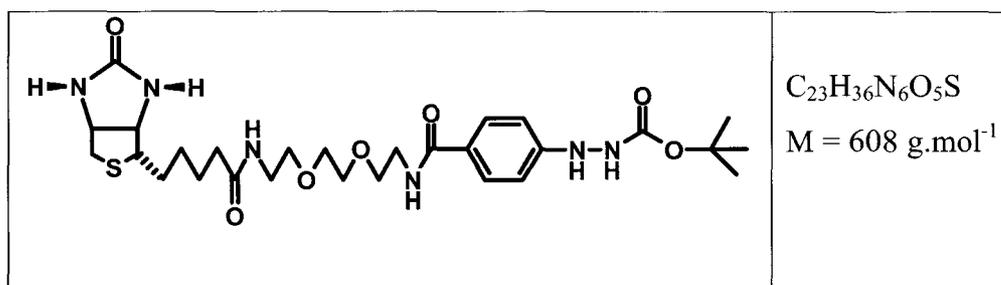
RMN ¹H (CD₃OD) : 1,48 (s, 9H); 6,87 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz); 8,01 (d, 2H, *J* = 8,8 Hz)

RMN ¹³C (CD₃OD) : 28,63; 81,58; 112,03; 121,70; 132,48; 154,99; 158,69; 173,02.

RMN ¹⁹F (CD₃OD) : -152,7 (dd, 2F, *J* = 17,5 Hz, *J* = 5,1 Hz); -158,7 (t, 1F, *J* = 21,7 Hz, -162,8 (t, 2F, *J* = 19,5 Hz).

HR-FAB-SM (*m/z*) trouvé : 419,1022; Calculé pour C₁₈H₁₆O₄N₂F₅ : 419,1030 [M+H]⁺.

V.2.3.3. N'-{4-[2-(2-{2-[5-(2-Oxo-hexahydro-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)-pentanoylamino]-ethoxy}-ethoxy)-ethylcarbamoyl]-phenyl}-hydrazinecarboxylic acid tert-butyl ester (64)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 50 mL, sous agitation magnétique et courant d'argon, (0,10 g, 0,21 mmoles) de biotine-DADDOO (**59**) et (0,06 mL g, 0,42 mmoles) de triéthylamine dans 4 mL de DMF sont ajoutés goutte à goutte à une solution de composé (**63**) dans 4 ml de DMF. La solution est agitée à température ambiante pendant trois heures. Le DMF est évaporé et le produit est obtenu par précipitation dans l'éther diéthylique.

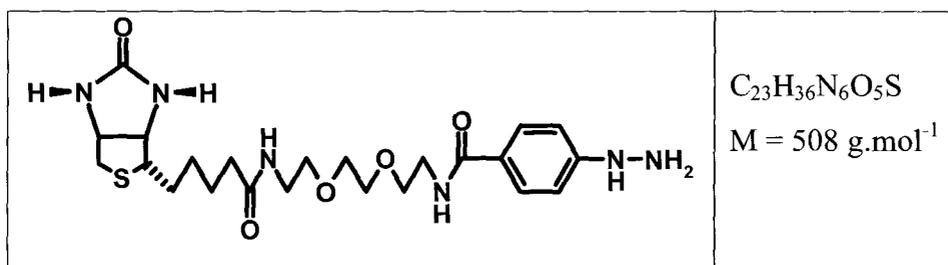
Rendement : 70%

Analyse :

RMN ^1H (CD_3OD) : 1,37 (s, 9H); 1,35-1,98m, 6H) ; 2,23 (d, 2H, $J=7,2$ Hz); 2,6 (d, 1H, $J = 12,6$ Hz, $J = 5,1$ Hz); 2,84(dd, 1H, $J = 13,0$ Hz, $J = 5,8$ Hz); 3,1 (m, 1H); 3,41-3,45 (m, 8H); 3,51-3,55 (m, 4H); 4,18 (m, 1H); 4,30 (m, 1H); 4,38 (1H, m); 6,70 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz); 7,62 (d, 2H, $J = 8,8$).

RMN ^{13}C (CD_3OD) : 26,9; 28,4; 28,7; 29,8; 38,9; 40,8; 41,1; 48,2; 57,1; 61,6; 63,4; 70,5; 70,6; 71,3; 81,5; 112,4; 125,5; 129,8; 153,9; 158,7; 166,1; 170,1; 176,2.

IV.2.3.4. ASC_OX_BIOT (65)



Mode opératoire :

Dans un ballon de 50 mL, on introduit (0,1 g, 0,20 momoles) du composé (64) dans 4 mL de TFA. Le mélange est agité à température ambiante pendant six heures. Le solvant est évaporé et le produit obtenu est séché sous vide poussé.

Rendement : 85%

Analyse :

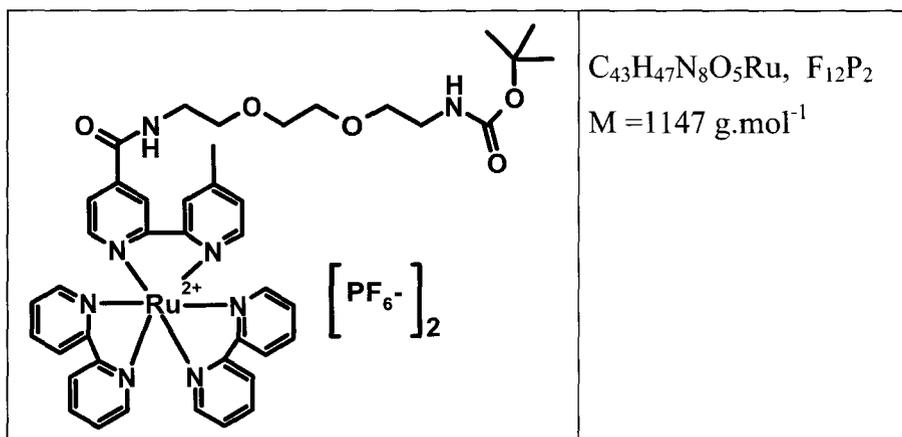
RMN ^1H (CD_3OD) : 1,41-1,67 (m, 6H); 2,23 (d, 2H, $J = 7,2$ Hz); 2,72 (d, 1H, $J = 12,6$, $J = 5,1$ Hz), 2,9 (dd, 1H, $J = 13,0$ Hz, $J = 5,8$ Hz); 3,3 (m, 1H); 3,37-3,45 (m, 8H); 3,55-3,65(m, 4H); 4,38 (m, 1H); 4,59 (m, 1H); 4,47 (m, 1H); 6,84 (2H, d, $J = 8,8$); 6,78 (d, 2H, $J = 8,8$).

RMN ^{13}C (CD_3OD) : 27,2; 28,8; 29,3; 38,9; 40,9; 41,1; 48,2; 57,0; 61,8; 63,3; 70,5; 70,7; 71,3; 113,0; 126,5; 129,9; 153,6; 158,8; 166,1; 170,1; 176,9.

FT-SM (m/z) trouvé : 509,2540; Calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{O}_5\text{N}_6\text{S}$: 509,2541 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

V.2.4. Synthèse de ASC_OX_FLUO

V.2.4.1. Fluorophore-DADOO-Boc (66)



Mode opératoire :

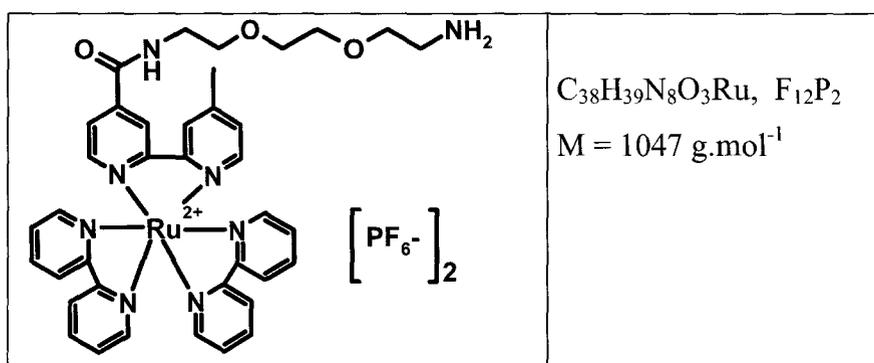
Protocole identique à celui du ASC_GLY_FLUO_protégé (56)

Rendement : 80 %

Analyse :

FT-SM (m/z) trouvé : 429,1397; Calculé pour $C_{23}H_{35}BN_4O_7S$: 429,1396 $[M+H-2PF_6]^{2+}$.

V.2.4.2. Fluorophore-DADOO (67)



Mode opératoire :

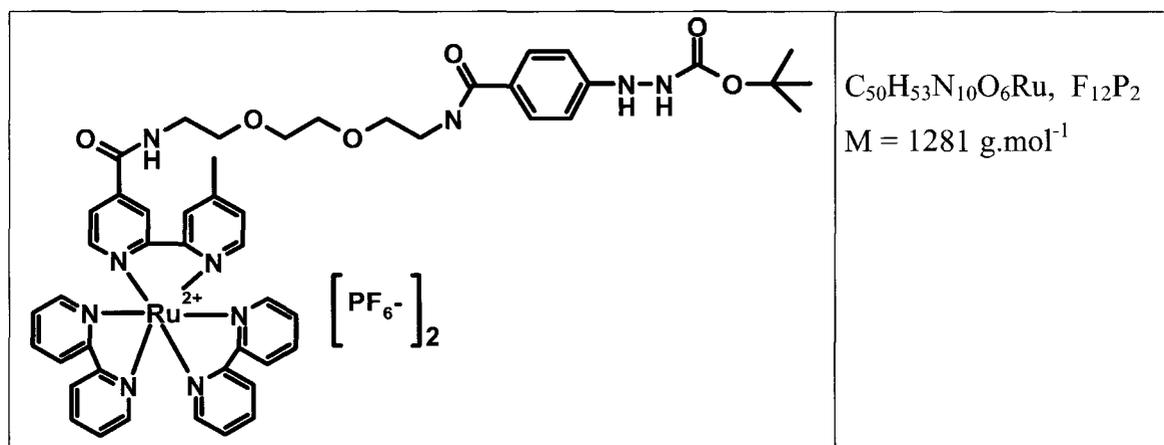
Protocole identique à celui du composé (55).

Rendement : 90%

Analyse :

FT-SM (*m/z*) trouvé : 379,1129; Calculé pour $C_{23}H_{35}BN_4O_7S$: 379,1133 [M+H-2PF₆]²⁺.

V.2.4.3. fluorophore-DADOO (68)



Mode opératoire :

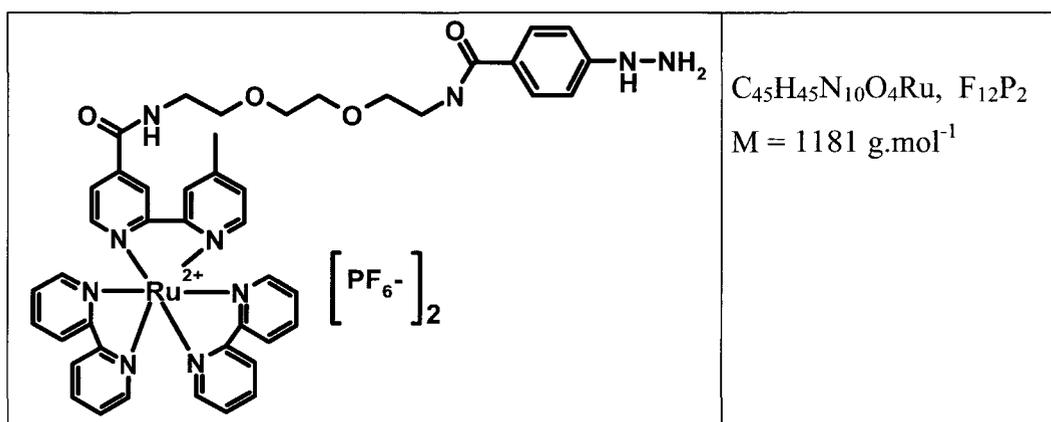
Protocole identique à celui du ASC_GLY_FLUO_protégé (56)

Rendement : 75%

Analyse :

FT-SM (*m/z*) trouvé : 496,1129; Calculé pour $C_{23}H_{35}BN_4O_7S$: 379,1133 [M+H-2PF₆]²⁺.

V.2.4.4. ASC_OX_FLUO (69)



Mode opératoire :

Protocole identique à celui du ASC_OX_BIOT (65).

Rendement : 90%

Analyse :

FT-SM (m/z) trouvé : 446,1368; Calculé pour $C_{23}H_{35}BN_4O_7S$: 446,1374 $[M+H-2PF_6]^{2+}$.

IV. Références bibliographiques

- [1] Bruyns, E.; Mincheva, A.; Bruyns, R.; Kirchgessner, H.; Weitz, S.; Lichter, P.; Meuer, S.; Schraven, B. **Sequence, genomic organization, and chromosomal localization of the human LPAP (PTPRCAP) and mouse CD45-AP/LSM-1 genes.** *Genomics* **1996**, *38*, 79-83.
- [2] Smith, T.M.; Lee, M.K.; Szabo, C.I.; Jerome, N.; McEuen, M.; Taylor, M.; Hood, L.; King, M.-C. **Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1.** *Genome Research* **1996**, *6*, 1029-1049.
- [3] The Sanger, C.; The Washington University Genome Sequencing, C. **Toward a complete human genome sequence.** *Genome Research* **1998**, *8*, 1097-1108.
- [4] Charlwood, J.; Skehel, J.M.; Camilleri, P. **Analysis of N-linked Oligosaccharides Released from Glycoproteins Separated by Two-Dimensional Gel Electrophoresis.** *Analytical Biochemistry* **2000**, *284*, 49-59.
- [5] Goshe, M.B.; Conrads, T.P.; Panisko, E.A.; Angell, N.H.; Veenstra, T.D.; Smith, R.D. **Phosphoprotein isotope-coded affinity tag approach for isolating and quantitating phosphopeptides in proteome-wide analyses.** *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 2578-2586.
- [6] Mills, P.B.; Mills, K.; Johnson, A.W.; Clayton, P.T.; Winchester, B.G. **Analysis by matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry of the post-translational modifications of alpha 1-antitrypsin isoforms separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.** *Proteomics* **2001**, *1*, 778-786.
- [7] O'Farrell, P.H. **High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.** *Journal of Biological Chemistry* **1975**, *250*, 4007-4021.
- [8] Patton, W.F. **A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics.** *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1123-1144.
- [9] Patton, W.F. **Detection technologies in proteome analysis.** *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2002**, *771*, 3-31.
- [10] Berggren, K.; Steinberg, T.H.; Lauber, W.M.; Carroll, J.A.; Lopez, M.F.; Chernokalskaya, E.; Zieske, L.; Diwu, Z.; Haugland, R.P.; Patton, W.F. **A Luminescent Ruthenium Complex for Ultrasensitive Detection of Proteins Immobilized on Membrane Supports.** *Analytical Biochemistry* **1999**, *276*, 129-143.

- [11] Bhalgat, M.K.; Diwu, Z.; Haugland, R.P.; Patton, W.F., (Molecular Probes, Inc., USA). Application: WO
WO, 2000, p. 63 pp.
- [12] Goerg, A.; Weiss, W.; Dunn, M.J. **Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics.** *Proteomics* 2004, 4, 3665-3685.
- [13] Lundell, N.; Schreitmuller, T. **Sample preparation for peptide mapping - α pharmaceutical quality-control perspective.** *Analytical Biochemistry* 1999, 266, 31-47.
- [14] Rabilloud, T. **A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains.** *Electrophoresis* 1992, 13, 429-439.
- [15] Rabilloud, T. **Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis.** *Electrophoresis* 1990, 11, 785-794.
- [16] Merril, C.R.; Goldman, D.; Sedman, S.A.; Ebert, M.H. **Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins.** *Science* 1981, 211, 1437-1438.
- [17] Oakley, B.R.; Kirsch, D.R.; Morris, N.R. **A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels.** *Analytical biochemistry* 1980, 105, 361-363.
- [18] Switzer, R.C., 3rd; Merril, C.R.; Shifrin, S. **A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels.** *Analytical biochemistry* 1979, 98, 231-237.
- [19] Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. **Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.** *Analytical chemistry* 1996, 68, 850-858.
- [20] Wilson, C.M. **An update on protein stains: Amido Black, Coomassie Blue G, and Coomassie Blue R.** *Biotechnic & Histochemistry* 1992, 67, 224-234.
- [21] Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D.; Ehrhardt, W. **Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.** *Electrophoresis* 1988, 9, 255-262.
- [22] Nishihara, J.C.; Champion, K.M. **Quantitative evaluation of proteins in one- and two-dimensional polyacrylamide gels using a fluorescent stain.** *Electrophoresis* 2002, 23, 2203-2215.

- [23] Shaw, J.; Rowlinson, R.; Nickson, J.; Stone, T.; Sweet, A.; Williams, K.; Tonge, R. **Evaluation of saturation labeling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes.** *Proteomics* **2003**, *3*, 1181-1195.
- [24] Tonge, R.; Shaw, J.; Middleton, B.; Rowlinson, R.; Rayner, S.; Young, J.; Pognan, F.; Hawkins, E.; Currie, I.; Davison, M. **Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology.** *Proteomics* **2001**, *1*, 377-396.
- [25] Churchman, L.S.; Oekten, Z.; Rock, R.S.; Dawson, J.F.; Spudich, J.A. **Single molecule high-resolution colocalization of Cy3 and Cy5 attached to macromolecules measures intramolecular distances through time.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 1419-1423.
- [26] Jackson, P.; Urwin, V.E.; Mackay, C.D. **Rapid imaging, using a cooled charge-coupled-device, of fluorescent two-dimensional polyacrylamide gels produced by labelling proteins in the first-dimensional isoelectric focusing gel with the fluorophore 2-methoxy-2,4-diphenyl-3(2H)furanone.** *Electrophoresis* **1988**, *9*, 330-339.
- [27] Tokarski, C.; Cren-Olive, C.; Fillet, M.; Rolando, C. **High-sensitivity staining of proteins for one- and two-dimensional gel electrophoresis using post migration covalent staining with a ruthenium fluorophore.** *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1407-1416.
- [28] Malone, J.P.; Radabaugh, M.R.; Leimgruber, R.M.; Gerstenecker, G.S. **Practical aspects of fluorescent staining for proteomic applications.** *Electrophoresis* **2001**, *22*, 919-932.
- [29] Steinberg, T.H.; Haugland, R.P.; Singer, V.L. **Applications of SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains.** *Analytical biochemistry* **1996**, *239*, 238-245.
- [30] Steinberg, T.H.; Jones, L.J.; Haugland, R.P.; Singer, V.L. **SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein.** *Analytical biochemistry* **1996**, *239*, 223-237.
- [31] Steinberg, T.H.; Lauber, W.M.; Berggren, K.; Kemper, C.; Yue, S.; Patton, W.F. **Fluorescence detection of proteins in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using environmentally benign, nonfixative, saline solution.** *Electrophoresis* **2000**, *21*, 497-508.

- [32] Berggren, K.; Chernokalskaya, E.; Steinberg, T.H.; Kemper, C.; Lopez, M.F.; Diwu, Z.; Haugland, R.P.; Patton, W.F. **Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex.** *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2509-2521.
- [33] Ahnert, N.; Patton, W.F.; Schulenberg, B. **Optimized conditions for diluting and reusing a fluorescent protein gel stain.** *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2506-2510.
- [34] Rabilloud, T.; Strub, J.-M.; Luche, S.; Van Dorsselaer, A.; Lunardi, J. **A comparison between sypro ruby and ruthenium II tris (batho-phenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels.** *Proteomics* **2001**, *1*, 699-704.
- [35] Castellano, F.N.; Lakowicz, J.R. **A water-soluble luminescence oxygen sensor.** *Photochemistry and Photobiology* **1998**, *67*, 179-183.
- [36] Rabilloud T, S.J., Luche S, Girardet J, Van Dorsselaer A, Lunardi J. **Ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate), a powerful fluorescent stain for detection of proteins in gel with minimal interference in subsequent mass spectrometry analysis.** *Proteome* **2000**, 1-14.
- [37] Livney, Y.D.; Portnaya, I.; Faupin, B.; Ramon, O.; Cohen, Y.; Cogan, U.; Mizrahi, S. **Interactions between inorganic salts and polyacrylamide in aqueous solutions and gels.** *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics* **2003**, *41*, 508-519.
- [38] Evans, I.P.; Spencer, A.; Wilkinson, G. **Dichlorotetrakis(dimethyl sulfoxide)ruthenium(II) and its use as a source material for new ruthenium(II) complexes.** *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions: Inorganic Chemistry (1972-1999)* **1973**, 204-209.
- [39] Shultz, J.W.; Leland, D.L., (Promega Corp., USA). Application: WO
WO, **1992**, p. 101 pp.
- [40] Kang, C.; Kim, H.J.; Kang, D.; Jung, D.Y.; Suh, M. **Highly sensitive and simple fluorescence staining of proteins in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide-based gels by using hydrophobic tail-mediated enhancement of fluorescein luminescence.** *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3297-3304.
- [41] Dwek, R.A. **Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars.** *Chemical Reviews (Washington, D. C.)* **1996**, *96*, 683-720.
- [42] Yan, J.; Springsteen, G.; Deeter, S.; Wang, B. **The relationship among pKa, pH, and binding constants in the interactions between boronic acids and diols-it is not as simple as it appears.** *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11205-11209.

- [43] Matsumoto, A.; Ikeda, S.; Harada, A.; Kataoka, K. **Glucose-responsive polymer bearing a novel phenylborate derivative as a glucose-sensing moiety operating at physiological pH conditions.** *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1410-1416.
- [44] Draffin, S.P.; Duggan, P.J.; Duggan, S.A.M.; Norrild, J.C. **Highly selective lipophilic diboronic acid that transports fructose as the tridentate 2,3,6-b-D-fructofuranose ester.** *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9075-9082.
- [45] Ohtake, H.; Li, X.L.; Shiro, M.; Ikegami, S. **A Highly Efficient and Shortcut Synthesis of Cyclitol Derivatives via Spiro Sugar Ortho Esters.** *Tetrahedron* **2000**, *56*, 7109-7122.
- [46] Yoo, B.-S.; Regnier, F.E. **Proteomic analysis of carbonylated proteins in two-dimensional gel electrophoresis using avidin-fluorescein affinity staining.** *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1334-1341.
- [47] Ahmed, M.; Jackstell, R.; Seayad, A.M.; Klein, H.; Beller, M. **Highly selective synthesis of hydrazones and indoles from olefins.** *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 869-873.
- [48] Siddiqui, S.A.; Nadaf, R.N.; Rajagopal, R.; Daniel, T.; Lahoti, R.J.; Srinivasan, K.V. **Ionic liquid-promoted rapid synthesis of aryl hydrazones under ambient conditions.** *Synthetic Communications* **2004**, *34*, 41-48.
- [49] Wu, B.-w.; Zhang, B.; Yu, X.-q.; Liu, J.-n. **Synthesis of 4-(benzeneazo) salicylaldehyde hydrazones and study on their spectral properties.** *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi* **2006**, *26*, 106-108.
- [50] Stynes, J.A.; Clearfield, A., (National Lead Co.). Application: US
US, **1968**, p. 4 pp.
- [51] Hurst, G.B.; Lankford, T.K.; Kennel, S.J. **Mass spectrometric detection of affinity purified crosslinked peptides.** *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2004**, *15*, 832-839.
- [52] Laitinen, O.H.; Nordlund, H.R.; Hytoenen, V.P.; Uotila, S.T.H.; Marttila, A.T.; Savolainen, J.; Airene, K.J.; Livnah, O.; Bayer, E.A.; Wilchek, M.; Kulomaa, M.S. **Rational Design of an Active Avidin Monomer.** *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, 4010-4014.
- [53] Hirsch, J.D.; Eslamizar, L.; Filanoski, B.J.; Malekzadeh, N.; Haugland, R.P.; Beechem, J.M.; Haugland, R.P. **Easily reversible desthiobiotin binding to streptavidin, avidin, and other biotin-binding proteins: uses for protein labeling, detection, and isolation.** *Analytical Biochemistry* **2002**, *308*, 343-357.

- [54] Green, N.M. **Avidin. I. The use of biotin-14C for kinetic studies and for assay.** *Biochemical Journal* **1963**, *89*, 585-591.
- [55] Itoh, S.; Kawasaki, N.; Ohta, M.; Hayakawa, T. **Structural analysis of a glycoprotein by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Application to recombinant human thrombomodulin.** *Journal of Chromatography, A* **2002**, *978*, 141-152.
- [56] Schachter, H. **The clinical relevance of glycobiology.** *Journal of Clinical Investigation* **2001**, *108*, 1579-1582.
- [57] Cook, M.J.; Lewis, A.P.; McAuliffe, G.S.G.; Skarda, V.; Thomson, A.J.; Glasper, J.L.; Robbins, D.J. **Luminescent metal complexes. Part 2. A model for the luminescence properties of the tris-chelates of substituted 2,2'-bipyridyls with ruthenium(II).** *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry (1972-1999)* **1984**, 1303-1307.
- [58] Peek, B.M.; Ross, G.T.; Edwards, S.W.; Meyer, G.J.; Meyer, T.J.; Erickson, B.W. **Synthesis of redox derivatives of lysine and related peptides containing phenothiazine of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II).** *International Journal of Peptide & Protein Research* **1991**, *38*, 114-123.
- [59] Beer, P.D.; Cadman, J.; Lloris, J.M.; Martinez-Manez, R.; Soto, J.; Pardo, T.; Marcos, M.D. **Anion interaction with ferrocene-functionalized cyclic and open-chain polyaza and aza-oxa cycloalkanes.** *Dalton* **2000**, 1805-1812.
- [60] Sagar, K.S.; Chang, C.-C.; Wang, W.-K.; Lin, J.-Y.; Lee, S.-S. **Preparation and anti-HIV activities of retrojusticidin B analogs and azalignans.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 4045-4054.
- [61] Lin, J.; Rajaram, A.R.; Pu, L. **Enantioselective fluorescent recognition of chiral acids by 3- and 3,3'-aminomethyl substituted BINOLs.** *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11277-11281.
- [62] Reizelman, A.; Wigchert, S.C.M.; del-Bianco, C.; Zwanenburg, B. **Synthesis and bioactivity of labelled germination stimulants for the isolation and identification of the strigolactone receptor.** *Organic & Biomolecular Chemistry* **2003**, *1*, 950-959.
- [63] Kan, T.; Tominari, Y.; Morohashi, Y.; Natsugari, H.; Tomita, T.; Iwatsubo, T.; Fukuyama, T. **Solid-phase synthesis of photoaffinity probes: highly efficient incorporation of biotin-tag and cross-linking groups.** *Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom)* **2003**, 2244-2245.

- [64] Eddarir, S.; Cotelle, N.; Bakkour, Y.; Rolando, C. **An efficient synthesis of chalcones based on the Suzuki reaction.** *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 5359-5363.
- [65] Falck, J.R.; Bondlela, M.; Venkataraman, S.K.; Srinivas, D. **Bromo-Boronolactonization of Olefins.** *Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66*, 7148-7150.
- [66] Pennington, T.E.; Kardiman, C.; Hutton, C.A. **Deprotection of pinacolyl boronate esters by transesterification with polystyrene-boronic acid.** *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 6657-6660.
- [67] Gayo, L.M.; Suto, M.J. **Use of pentafluorophenyl esters for one-pot protection/activation of amino and thiol carboxylic acids.** *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 4915-4918.
- [68] Rosso, V.W.; Pazdan, J.L.; Venit, J.J. **Rapid optimization of the hydrolysis of N'-trifluoroacetyl-S-tert-leucine-N-methylamide using high-throughput chemical development techniques.** *Organic Process Research & Development* **2001**, *5*, 294-298.
- [79] Gerber, S.A.; Scott, C.R.; Turecek, F.; Gelb, M.H. **Direct Profiling of Multiple Enzyme Activities in Human Cell Lysates by Affinity Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Application to Clinical Enzymology.** *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 1651-1657.
- [70] Schwartz, D.A.; Abrams, M.J.; Hauser, M.M.; Gaul, F.E.; Larsen, S.K.; Rauh, D.; Zubieta, J.A. **Preparation of hydrazino-modified proteins and their use for the synthesis of ^{99m}Tc-protein conjugates.** *Bioconjugate chemistry* **1991**, *2*, 333-336.
- [71] Asano, T.; Yoshikawa, T.; Usui, T.; Yamamoto, H.; Yamamoto, Y.; Uehara, Y.; Nakamura, H. **Benzamides and benzamidines as specific inhibitors of epidermal growth factor receptor and v-Src protein tyrosine kinases.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 3529-3542.
- [72] Schon, I.; Nyeki, O.; Demeter, A. **Synthesis of biotinylated thymocartins.** *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* **2000**, *43*, 309-322.

Conclusion générale

Dans ce travail de thèse nous avons développé des thématiques de recherche différentes, mais dans un même cadre : la chimie organique appliquée au service de la biologie, au service de la microfluidique et au service de la protéomique.

Tout d'abord, nous avons développé une stratégie de synthèse conduisant aux métabolites et analogues glycosylés et glucuronidés de la quercétine. En effet une nouvelle méthode de synthèse basée sur différents jeux de protections et déprotections sélectives des fonctions phénols et catéchols de la quercétine a été mise en point. Nous avons préparé sélectivement les intermédiaires glycosylés dont l'oxydation sélective de l'alcool primaire par NaOCl en présence de TEMPO conduit aux glucuronides attendus. Ainsi nous avons pu synthétiser les différents analogues monoglycosylés et monométhylés de la quercétine. Des tests biologiques des métabolites glucuronidés de la quercétine et des tests physico-chimiques des différents analogues sont actuellement en cours.

Nous avons ensuite étudié une réaction de méthylation de la quercétine, à l'échelle du laboratoire et à l'échelle microfluidique afin de mettre en évidence les différences entre des réactions menées dans de la verrerie classique, et des réactions menées dans un microréacteur, et aussi illustrer l'apport de la microfluidique à la conduite de réactions de chimie organique classiques. Cette réaction donne lieu en conditions classiques à un mélange complexe de plusieurs produits de méthylation, sur les différentes positions phénols de la molécule et avec divers degrés de méthylation. Nous avons ainsi comparé les résultats obtenus, soit en utilisant de la verrerie classique soit dans un micro-réacteur constitué d'un mélangeur commercial (Nanomixer™, Upchurch Scientific) placé en amont d'un capillaire (d.i. 75 μm). Il ressort de cette étude que la réaction est mieux contrôlée à l'échelle microfluidique, et devient même sélective. Ceci s'explique en partie par la qualité du mélange obtenu à cette échelle. Ces expériences réalisées avec un microsystème commercial montrent l'influence considérable des conditions de mélange sur les produits obtenus. Les microsystèmes permettent de descendre à des temps de mélange très faibles (de l'ordre de la seconde voire de la milliseconde) tout en restant à des échelles préparatives (typiquement quelques millimoles de produit formées pour une nuit de réaction en continu).

A cette échelle microfluidique, nous avons aussi développé une chimie de surface robuste avec la réalisation de systèmes intégrés pour la préparation d'échantillons biologiques avant leur analyse par MALDI-TOF. Ces étapes ont été réalisées sur la cible MALDI même. Ainsi nous avons pu développer une fonctionnalisation en volume de la surface à base d'or à l'aide de brosses de polymère réticulé ou non réticulé. La composition du polymère a été choisie en fonction de l'application visée. Nous avons réalisé des surfaces hydrophobes pour

des applications de dessalage et des surfaces de type IMAC pour le piégeage sélectif des phosphopeptides. D'autres surfaces pour des applications de digestion ou de piégeage sélectif de glycopeptides sont en cours de préparation.

Le dernier thème développé dans cette thèse porte sur la chimie au service de la protéomique avec le développement de différents colorants et réactifs pour l'analyse protéomique. D'une part nous avons synthétisé des colorants fluorescents pour gel d'électrophorèse et nous avons formulé notre solution colorante. En effet, nous avons préparé une solution colorante basée sur un complexe de ruthénium, afin d'obtenir des qualités de détection protéique similaires tant en terme de sensibilité que de gamme dynamique, par rapport à la solution commerciale (Sypro® Ruby). Après optimisation des paramètres de la formule (concentration, solvant, acide, sel,...), nous avons pu détecter certaines protéines à des concentrations de l'ordre du nanogramme, comparable à celle du Sypro® Ruby. Par ailleurs nous avons synthétisé d'autres colorants à base de ruthénium (colorants hétéroleptiques ou colorants hydrophobes) dont la qualité de coloration a été validée. D'autre part nous avons développé la synthèse de réactifs permettant la caractérisation et l'isolation de deux grandes classes de modifications post-traductionnelles (la glycosylation et l'oxydation). Ces réactifs sont constitués d'une sonde permettant la reconnaissance de la fonction chimique recherchée (acide boronique pour les glycoprotéines et phényle-hydrazine pour les protéines oxydées), d'un bras espaceur (DADOO), et d'une poignée permettant la manipulation de la protéine capturée (une biotine pour la chromatographie d'affinité sur colonne d'avidine et un fluorophore pour les gels d'electrophorèse). Les résultats obtenus avec ces réactifs jusqu'à maintenant sont très encourageants. D'autres expériences d'optimisation sont en cours et des molécules analogues pour la capture des phosphopeptides sont en cours d'élaboration au laboratoire.

