



N° 468 - DÉCEMBRE 2021

l'actualité chimique

LE JOURNAL DE LA SOCIÉTÉ CHIMIQUE DE FRANCE

CHÉMOBIOLOGIE

PRIX NOBEL
DE CHIMIE 2021

PESER
LE PROTÉASOME

Des rendements de synthèse plus élevés, des temps de réaction plus courts !

Développez vos synthèses organiques ou peptidiques avec de nouveaux outils !



Discover 2.0

Réacteur sous
micro-ondes
focalisées



MultiPep 1

Synthétiseur de
peptides en parallèle
automatisé



Liberty Blue

Synthétiseur de
peptides par micro-onde
automatisé

Nous créons des solutions innovantes permettant de répondre à de nombreux défis scientifiques. Nos matériels sont utilisés dans le monde entier, pour améliorer les processus de différentes analyses chimiques, contrôler la qualité des productions industrielles et accélérer la synthèse chimique au sens large qui conduira aux médicaments de demain.

Depuis 1978, de nombreuses entreprises profitent de nos technologies plus rapides, plus sûres et plus efficaces.

The logo for CEM, consisting of the letters 'CEM' in a bold, stylized font with horizontal lines through them.

Tél. : +33 (0)1 69 35 57 80
info.fr@cem.com
www.cem.com

l'actualité chimique

Édité par la Société Chimique de France
250 rue Saint-Jacques, 75005 Paris
Tél. 01 40 46 71 60 – scf@societechimiquedefrance.fr
www.societechimiquedefrance.fr
Directeur de la publication : Marc Taillefer
Partenariats : CNRS, Fondation de la Maison de la Chimie

RÉDACTION

SCF, 28 rue Saint-Dominique, 75007 Paris
Tél. : 01 40 46 71 64 – redaction@lactualitechimique.org
www.lactualitechimique.org

Rédactrice en chef : Patricia Pineau
Rédactrice en chef adjointe : Roselyne Messal
Responsable de L'Actualité Chimique Découverte :
Minh-Thu Dinh-Audouin

COMITÉ DE RÉDACTION

J. Barrault, X. Bataille, C. Bresson, J.-M. Campagne, P. Colombar, P. Dauban, C. de Novion, K. Fajerberg, D. Fauque, J.-P. Foulon, J. Fournier, N. Griffete, T. Hamaide, C. Houée-Levin, F. Launay, J. Livage, E. Marceau, V. Marvaud, M.-T. Ménager, C. Monneret, N. Moreau, J.-M. Paris, P. Pichat, A. Picot, A.-V. Ruzette, S. Tencé, H. This, H. Toulhoat, L. Valade, P. Walter, S. Younes

Publication analysée ou indexée par :
Chemical Abstracts, base de données PASCAL

ABONNEMENT

SCF, Martine Maman
250 rue Saint-Jacques, 75005 Paris
Tél. : 01 40 46 71 60/66
abonnement@lactualitechimique.org

FABRICATION

MAQUETTE : Redouane Sahih, sahih.redouane@gmail.com
Mag Design, www.magdesign.fr, mag.design@me.com
IMPRESSION, ROUTAGE : N. Fortin & ses fils imprimeurs
94800 Villejuif, fortimprimerie@wanadoo.fr

PUBLICITÉ

FFE, 15 rue des Sablons, 75116 Paris
Tél. : 01 53 36 20 40 – www.ffe.fr
aurelie.vuillemin@ffe.fr

ISSN version papier 0151 9093
ISSN version électronique 2105 2409

© SCF 2021 – Tous droits de reproduction réservés

Dépôt légal : décembre 2021

Toute représentation ou reproduction, intégrale ou partielle, fait sans le consentement de l'auteur, ou des ayants droits, ou ayant cause, est illicite (loi du 11 mars 1957, alinéa 1er de l'article 40). Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal. La loi du 11 mars 1957 n'autorise, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, que les copies et les reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective d'une part, et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans le but d'exemple ou d'illustration.



Société Chimique de France



Fondation de la Maison de la Chimie



Connaissance et créativité

COP 26, un bilan mitigé

La périodicité de *L'Actualité Chimique* étant mensuelle, il est difficile de réagir sur l'instant. C'est parfois plus sage pour les « Conference Of the Parties » annuelles. En effet, cette année, l'annonce des conclusions a même bénéficié d'un délai supplémentaire pour un bilan en demi-teinte, malgré la prolongation.

Tout l'enjeu étant de maintenir la planète sous un réchauffement de 1,5 degré d'ici la fin du siècle, alors que les prévisionnistes des Nations unies annoncent un réchauffement de 2,2 à 2,4 degrés. Nous reviendrons sur le dossier du réchauffement climatique et de la transition énergétique sans entrer dans les tractations et les tensions, mais en nous inspirant de la déclaration de Jean Jouzel, « *la transition se fera* », même si les échéances et objectifs sont décalés.

Le Nobel, un temps fort de notre communauté

Le prix Nobel de chimie 2021 a été décerné à Benjamin List, professeur au Max Planck Institute à Mülheim, et

David MacMillan, professeur à l'Université de Princeton, pour leurs travaux sur l'organocatalyse asymétrique. Pour relayer l'information, nous avons passé la plume à un jeune chimiste, Jean-François Betzer, qui a eu la chance de les côtoyer. Les deux lauréats enrichissent la boîte à outils du chimiste de synthèse, ce que la Fondation Nobel a résumé en « *An ingenious tool for building molecules* ».

Chémobiologie : interfaces et interactions

Si chimie et biologie se voulaient différentes, le dossier « Chémobiologie » coordonné par Eric Defrancq illustre que ces deux disciplines naturellement imbriquées s'enrichissent mutuellement. À la lecture des articles qui révèlent comment le chimiste explore le vivant, le lecteur appréciera une vision collaborative qui enrichit la connaissance et la créativité.

Bonne lecture !

Patricia Pineau
Rédactrice en chef



ÉDITORIAL	1
Connaissance et créativité, par P. Pineau	1
CLIN D'ŒIL ÉTYMOLOGIQUE	4
À propos de bêtaïnes, par P. Avenas	4
À PROPOS DE	5
Prix Nobel de chimie 2021 : l'organocatalyse asymétrique mise à l'honneur, par J.-F. Betzer	5
LA CHÉMOBIOLOGIE EXPLORE LE VIVANT	7-50
<i>Coordinateur : E. Defrancq</i>	
Chémobiologie : quand le chimiste explore le vivant, par C. Biot, E. Defrancq, D. Guianvarc'h et B. Vauzeilles	7
L'émergence de l'interface chimie-biologie en France : témoignage d'Andrée Marquet et de Francis Schuber recueilli par D. Guianvarc'h	9
De la chimie bioorthogonale au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, par S. Papot et F. Taran	13
Les rapporteurs chimiques bioorthogonaux : une approche au cœur de la chémobiologie, par C. Biot et B. Vauzeilles	16
Les vecteurs peptidiques, GPS du principe actif, par D. Boturyn	21
Acides nucléiques modifiés comme outils en chémobiologie, par M. Hollenstein	23
Des protéines de synthèse taillées sur mesure pour investiguer le vivant, par V. Aucagne, F. Burlina, O. Melnyk et V. Torbeev	26
Horizons de chimistes en imagerie photonique, par B. Adelizzi, R. Chouket, L. Ludvikova, A. Pellissier-Tanon, A. Espagne, L. Jullien, A. Lahlou, A. Lemarchand et T. Le Saux	29
Des sondes fluorogènes innovantes pour éclairer les récepteurs couplés aux protéines G, par D. Bonnet et A. Klymchenko	31
La RMN, un couteau suisse pour disséquer la chimie cellulaire à toutes les échelles, par F.-X. Theillet et J.-M. Franconi	33
Apport des outils de chémobiologie à l'imagerie par spectrométrie de masse, par D. Touboul et I. Fournier	36

La RPE <i>in cellula</i> : étudier la dynamique des protéines dans leur habitat, par A. Pierro, A. Bonucci, V. Belle et E. Mileo	38
Chimie thérapeutique et chémobiologie : un dialogue et une synergie constante au bénéfice de la santé humaine, par R. Deprez-Poulain, F. Schmidt et B. Lesur	42
Outils d'identification de sondes chimiques pour une meilleure compréhension du vivant, par F. Mahuteau-Betzer et H. Munier-Lehmann	45
Petites molécules pour grande médecine, par R. Rodriguez	47
L'apport de la chémobiologie à la biologie synthétique, par G. Truan	49

RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT 51

Analyses multidimensionnelles au service des biocarburants et des molécules biosourcées, par A. Dubuis, A. Le Masle, L. Chahen, N. Charon et E. Destandau	51
Peser le protéasome pour sonder sa structure, par M.-P. Bousquet et J. Marcoux	58

Principes et substances actifs

Nouveaux principes actifs pharmaceutiques et nouvelles substances actives phytopharmaceutiques, par J. Fournier et J.-M. Paris	62
---	----

EN BREF 64

AGENDA 65

ACTUALITÉS DE LA SCF 66

UN POINT SUR 67

Fiche n° 90 : Des nez électroniques pour diagnostiquer des pathologies par analyse de composés gazeux dans l'haleine de patients, par J.-L. Wojkiewicz, C. Duc et N. Redon	67
--	----

INDEX 2021 site*

*L'index est disponible uniquement en format pdf, téléchargeable librement sur le site de la revue (lien dans le sommaire en ligne de ce numéro).



Couverture :

Représentation de la chémobiologie au travers d'un générateur d'art basé sur une intelligence artificielle. © C. Biot.
Conception graphique : magdesign.fr

À propos de bétaines



Le nom *bétaine* est d'usage courant puisqu'on trouve en pharmacie le *citrate de bétaine*, dont l'effet est de faciliter la digestion. Ce nom *bétaine* s'applique à une famille de molécules organiques dont certaines sont obtenues à partir d'acides aminés.

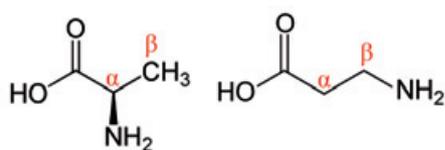
D'où vient ce nom ? Une première idée serait de l'expliquer par la présence dans ces molécules d'un substituant sur un carbone bêta, C_{β} ..., comme c'est le cas pour la bêta-alanine. En chimie organique en effet, les atomes de carbone sont souvent indexés par α , β , γ ...

Du bon usage de l'alphabet grec

Les scientifiques ont abondamment utilisé les lettres grecques pour indexer des séries d'objets apparentés. Sans parler des mathématiques, et sans vouloir être exhaustif, on repère ainsi les étoiles (la β est la deuxième plus brillante d'une constellation), les rayonnements (une particule β est un électron), les variétés minéralogiques (quartz α ou β), les types de récepteurs adrénergiques (les β sont ciblés par les bêta-bloquants)... et donc les atomes de carbone en chimie organique.

Dans un acide aminé, $H_2N-CHR-COOH$, le carbone voisin du groupe carboxylique est indexé C_{α} , puis les carbones du radical R sont C_{β} , C_{γ} ... Les acides aminés naturels, les constituants des protéines, sont toujours des α -acides aminés, c'est-à-dire que l'amine $-NH_2$ est sur le C_{α} , une protéine étant donc un polyamide-2.

Pour l'alanine, $R = -CH_3$, et dans l'alanine naturelle, ou α -alanine, le carbone du méthyle est donc indexé C_{β} . Si le substituant amine est sur le C_{β} , au lieu du C_{α} , on obtient la bêta-alanine (β -alanine), dont le polycondensat est un polyamide-3.



Alanine, ou alpha-alanine (α -alanine) ; bêta-alanine (β -alanine).

On connaît aussi les acides gras de type *oméga-3* (ou ω_3), dont la double liaison est la troisième en partant du carbone C_{ω} . Comme ω est la dernière et 24^e lettre de l'alphabet grec, on peut croire à une très grande molécule. Pas du tout car par convention, en chimie organique on part du C_{α} , voisin du carbone carboxylique, alors qu'en biologie on part du C_{ω} , le carbone d'extrémité de la chaîne carbonée. Un bon acide gras, si l'on ose dire, c'est l'alpha et l'oméga de la nutrition. Cependant, tout cela ne dit pas d'où vient le nom *bétaine*.

Le sucre tiré de la betterave

La production industrielle de sucre à partir de la betterave sucrière a commencé en France vers 1810, en réponse au blocus du sucre de canne imposé par l'Angleterre. Puis cette production s'est développée rapidement dans le monde au cours du XIX^e siècle. C'est ainsi que le chimiste allemand

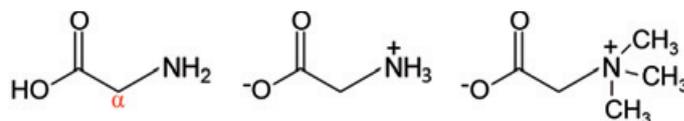


Betterave à sucre.

Scheibler s'est intéressé à la chimie du sucre et à la betterave sucrière dans les années 1860. Il a découvert en 1866 dans le suc de betterave, ou *mélasse*, une substance nouvelle qu'il a nommée *Betain* en allemand, d'où *bétaine* en français, qui

vient donc du nom latin de la betterave, *beta*, d'où aussi les noms *bette* et *betterave* (avec le latin *rapum*, « rave »). Parmi les neuf espèces connues du genre *Beta*, celle nommée par Linné est *Beta vulgaris*, dont les bettes (ou blettes) ainsi que les betteraves rouges, fourragères et sucrières sont des sous-espèces.

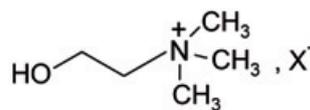
Par la suite, cette bétaine a été obtenue par plusieurs voies de synthèse dont celle réalisée par le chimiste allemand Griess en 1875, la méthylation de la glycine en triméthylglycine (TMG), comportant un cation ammonium quaternaire et un anion carboxylique. La bétaine initiale, ou TMG, se nomme aujourd'hui *glycine bétaine*, le terme *bétaine* tout court s'appliquant à la famille de molécules ayant une structure ionique analogue.



Glycine, glycine ionisée, triméthylglycine ou glycine bétaine.

A posteriori, on voit que *bétaine* ne pouvait pas avoir de rapport avec un carbone bêta puisque la glycine, le plus simple des acides aminés, ne comporte que le C_{α} et pas de C_{β} .

C'est enfin l'occasion d'évoquer ici une molécule de structure voisine de celle de la TMG. Il s'agit de la choline, nommée ainsi du grec *kholê*, « bile », par le



Choline.

chimiste allemand Strecker, qui avait isolé cette substance de la bile de porc dès 1849. La choline s'oxyde en bétaine.

Épilogue

Le nom de la bétaine fait penser à celui de la *Betadine*[®], l'antiseptique bien connu. C'est une tout autre substance, la polyvinylpyrrolidone ou povidone. Ce produit, qui a supplanté l'ancienne teinture d'iode, a été découvert en 1955 et *Betadine*[®] est un nom de marque déposé en anglais en 1963, où l'élément *-dine* vient sans doute de l'anglais *iodine*, « iode », mais où l'élément *beta-* reste inexpliqué, *a priori* sans rapport avec un carbone bêta, ni avec la betterave.

Pierre AVENAS,
ex directeur de la R & D dans l'industrie chimique.
pier.avenas@orange.fr

Prix Nobel de chimie 2021 : l'organocatalyse asymétrique mise à l'honneur

Des transformations chimiques inédites

Depuis le début des années 2000, différents prix Nobel de chimie, science regroupant un large champ disciplinaire, ont été attribués à des avancées majeures de la chimie organique : catalyse asymétrique organométallique (prix Nobel 2001), développement de la réaction de métathèse (2005), réactions de couplage catalysées par le palladium (2010), conception et synthèse de machines moléculaires (2016). Cette année, c'est au tour de l'organocatalyse asymétrique d'être mise à l'honneur avec deux lauréats : l'Allemand Benjamin List, professeur au Max-Planck Institute (Mulheim), et l'Américain David MacMillan, professeur à l'Université de Princeton.

L'organocatalyse asymétrique combine trois concepts majeurs

Le premier concept, celui de la « **catalyse** », permet de transformer une grande quantité de matière en utilisant une substance en quantité substœchiométrique et idéalement en quantité la plus faible possible. Cette substance, dénommée catalyseur, permet d'accroître de manière significative la vitesse de la réaction attendue et doit être régénérée au cours du processus de la transformation afin de pouvoir effectuer plusieurs cycles catalytiques. La catalyse s'inscrit dans le contexte de développement durable que doit relever la chimie moderne : chimie verte, économie d'atomes et d'étapes, et minimisation du E-factor [1].

Le deuxième concept est celui de l'« **organocatalyse** », un concept relativement ancien qui a été formalisé au début des années 2000 [2]. L'organocatalyse est basée sur l'activation de(s) substrat(s), par une « **petite molécule organique** », seulement composée d'atome de carbone, d'hydrogène, d'oxygène, d'azote, de soufre ou de phosphore et ne portant pas de partie métallique. Les organocatalyseurs activent le(s) substrat(s) par formation intermédiaire de liaisons covalentes ou non covalentes, afin de générer *in situ* des espèces réactives qui seront engagées dans des nouvelles transformations chimiques. Le mode d'activation de l'organocatalyse est directement inspiré des transformations chimiques enzymatiques du monde du vivant. En revanche, et contrairement aux enzymes qui sont des objets moléculaires complexes, les organocatalyseurs sont des composés chimiques, de petite taille et facilement accessibles, constitués seulement de la partie active du site catalytique de l'enzyme. Ce nouveau mode de « catalyse » est très attractif et devient complémentaire, voire compétitif, des réactions métallo-assistées. Il présente l'avantage de ne pas utiliser de métaux de transition et de ligands complexes, permettant ainsi de limiter les coûts de production et la formation de résidus toxiques. De plus, la plupart des réactions impliquant l'utilisation d'un organocatalyseur ne nécessitent pas de conditions réactionnelles exigeantes. Pour la plupart des réactions organocatalysées,



Benjamin List
© Frank Vinken.

David MacMillan
© Corinne Strauss Photography.

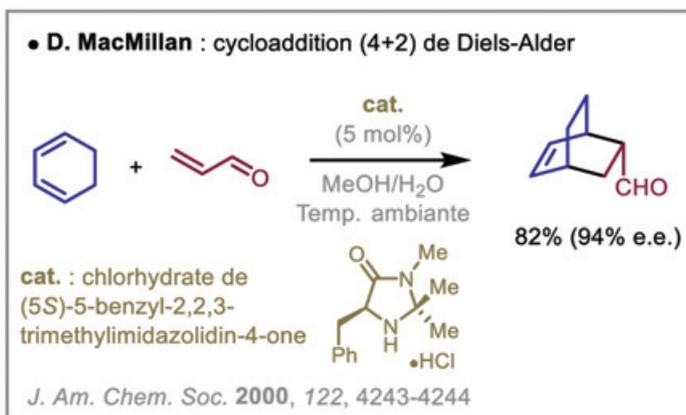
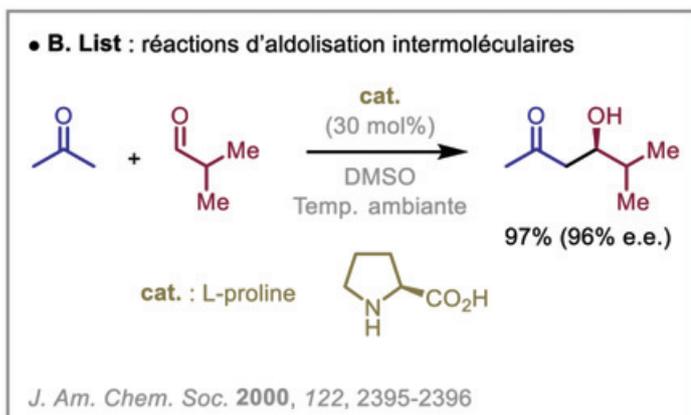
il n'est pas nécessaire de travailler dans des conditions anhydres ou sous atmosphère inerte.

Le dernier concept, « **asymétrique** », associé à cette récompense, précise que les produits issus de ces réactions sont obtenus de manière énantiométrique. De nombreux composés chimiques, notamment les substances naturelles (acides aminés, carbohydrates, alcaloïdes, acides α -hydroxylés, terpènes...), sont chiraux, c'est-à-dire que leur image dans un miroir n'est pas superposable à la structure initiale, ce qui constitue une difficulté supplémentaire pour le chimiste de synthèse. Au-delà du contrôle du processus chimique d'une réaction, une transformation stéréosélective implique de contrôler l'ensemble de cet environnement chimique dans l'espace. Le contrôle de la stéréochimie de composés chiraux est crucial pour les substances qui sont utilisées pour des applications en lien avec le monde du vivant : alimentation, parfumerie, et bien évidemment pour les composés avec des applications thérapeutiques.

Enrichir la boîte à outils des chimistes

Le prix Nobel de chimie 2021 vient récompenser deux personnes qui sont à la fois des pionniers mais également des acteurs majeurs de cette thématique. La même année, en 2000, Benjamin List et David MacMillan ont décrit l'utilisation d'organocatalyseurs pour effectuer des transformations énantiométriques sur deux réactions majeures de la synthèse organique : la réaction d'aldolisation et la cycloaddition (4+2) de Diels-Alder. B. List a décrit des réactions d'aldolisation intermoléculaires croisées énantiométriques entre des dérivés cétones et aldéhydes, catalysées par la L-proline (article cité plus de deux mille fois) [3]. D. MacMillan a décrit des réactions de cycloaddition (4+2) entre des diènes et des aldéhydes α,β -éthyléniques, catalysées par une imidazolidinone (article cité plus de mille fois) [4]. Pour ces réactions, les composés sont obtenus avec d'excellents rendements et excès énantiométriques (voir *figure*).

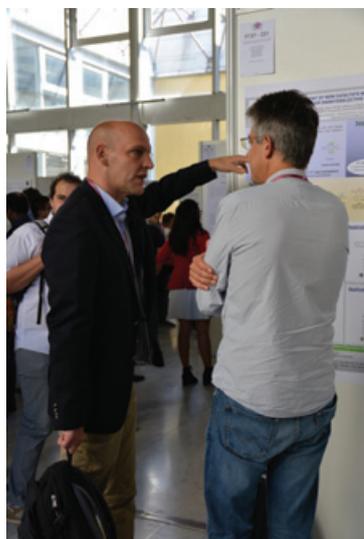
Parmi les points forts de ces systèmes catalytiques, il est important de souligner que ces organocatalyseurs sont très peu coûteux. Ils sont issus du « pool chiral » des acides aminés



et la L-proline naturelle peut être utilisée telle quelle pour les réactions d'aldolisation. Les imidazolidinones sont quant à eux directement préparés à partir de l'acide aminé phénylalanine naturel par réactions d'addition de *N*-méthylamine et d'acétone. Il est important de préciser que ces réactions organocatalysées peuvent être réalisées à l'air libre, avec des solvants non anhydres, sans utilisation de gaz inerte, et sont « multigram-scale » (50 mmol) pour des applications en synthèse à grande échelle.

Depuis le début de ce nouveau concept, ce domaine de recherche a connu un essor exponentiel entre les années 2000 et 2010, et depuis 2010, plus de six cents articles scientifiques sont publiés chaque année (source Web of Knowledge, avec comme mot-clé « organocatalysis »). Les nouvelles méthodologies synthétiques permettent de conduire rapidement, efficacement et de manière stéréosélective à des nouvelles structures chimiques complexes à partir de substrats simples et facilement accessibles.

Au cours de ces travaux, des systèmes catalytiques de plus en plus complexes et performants ont été mis au point, permettant de réaliser des cascades réactionnelles (réactions domino) ainsi que des réactions impliquant plusieurs composants (MCR) [5]. Ces différentes méthodologies permettent d'accéder à une grande diversité moléculaire et à de nombreux composés d'intérêt tels que des produits naturels et/ou des molécules bioactives [6]. De plus, les premiers travaux de B. List et D. MacMillan ont ouvert la voie à de



Benjamin List est une personne très accessible, passionnée de chimie, prête à échanger volontiers autour d'un poster avec d'autres chercheurs ou doctorants ; ici lors d'une session de présentation de posters lors des JCO 2016 à l'École Polytechnique (Palaiseau).

nouveaux modes d'activation de substrat, permettant d'effectuer des transformations chimiques inédites. Parmi ces différents modes d'activation, on peut citer l'utilisation d'acides de Brønsted chiraux [7] ainsi que l'organocatalyse photoredox [8].

J'ai eu l'occasion d'échanger avec Benjamin List lors de son passage en 2012 à l'ICSN, et également en 2016 lors des Journées de chimie organique (JCO). Lors de ce congrès, il avait donné en clôture une conférence plénière intitulée « Asymmetric counteranion directed catalysis (ACDC): a general approach to enantioselective synthesis ».

Félicitations et merci aux deux lauréats, qui ont grandement participé au développement de l'organocatalyse asymétrique. Leurs travaux, et ceux de cette communauté, ont permis d'intégrer cette thématique à la boîte à outils du chimiste de synthèse.

- [1] R.A. Sheldon, *Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design*, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, p. 1437-451.
- [2] B. List, Introduction: organocatalysis, *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, p. 5413-415.
- [3] B. List, R.A. Lerner, C.F. Barbas, Proline-catalyzed direct asymmetric aldol reactions, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, p. 2395-396.
- [4] K.A. Ahrendt, C.J. Borths, D.W.C. MacMillan, New strategies for organic catalysis: the first highly enantioselective organocatalytic diels-alder reaction, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, p. 4243-244.
- [5] C.M.R. Volla, I. Atodiresi, M. Rueping, Catalytic C-C bond-forming multi-component cascade or domino reactions: pushing the boundaries of complexity in asymmetric organocatalysis, *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, p. 2390-431.
- [6] B. Han, X.-H. He, Y.-Q. Liu, G. He, C. Peng, J.-L. Li, Asymmetric organocatalysis: an enabling technology for medicinal chemistry, *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, *50*, p. 1522-586 ; H. Pellissier, Asymmetric organocatalytic tandem/domino reactions to access bioactive products, *Curr. Org. Chem.*, **2021**, *25*, p. 1457-471.
- [7] T. Akiyama, J. Itoh, K. Yokota, K. Fuchibe, Enantioselective Mannich-type reaction catalyzed by a chiral Brønsted acid, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, p. 1566-568 ; D. Uruguchi, M. Terada, Chiral Brønsted acid-catalyzed direct Mannich reactions via electrophilic activation, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, p. 5356-357 ; S. Hoffmann, A.M. Seayad, B.A. List, Powerful Brønsted acid catalyst for the organocatalytic asymmetric transfer hydrogenation of imines, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, p. 7424-427.
- [8] D.A. Nicewicz, D.W.C. MacMillan, Merging photoredox catalysis with organocatalysis: the direct asymmetric alkylation of aldehydes, *Science*, **2008**, *322*, p. 77-80.

Jean-François BETZER,

Chargé de recherche, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Synthesis and Catalytic Methods Department, CNRS UPR 2301, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette.

* jean-françois.betzer@cnrs.fr

Chémobiologie : quand le chimiste explore le vivant

La structuration de la science en différentes disciplines avait pour but initial de l'organiser, voire même de la hiérarchiser, afin d'en simplifier la perception. Toutefois, elle en crée ainsi une représentation discontinue, laissant entre ces disciplines des frontières, des creux, des zones d'interface plus ou moins explorées. Pour la discipline chimie et afin d'en explorer les principales interfaces, les scientifiques ont tour à tour inventé les notions de chimie physique (1752), chimie biologique, ou encore biochimie (1877), physico-chimie (1939) et enfin de « chemical biology », ou chémobiologie (1945). Ce terme est en effet apparu au CalTech au milieu du XX^e siècle (Pauling et Beadle, 1945), pour décrire les travaux menés conjointement par les départements de chimie et de biologie de cette université californienne. Cette notion s'est installée progressivement dans le monde entier et s'est fortement établie en France au cours de cette dernière décennie.

La perception de la chémobiologie a légèrement évolué depuis son apparition initiale, pour aujourd'hui recouvrir un champ disciplinaire dont il reste délicat de définir très précisément le contour, mais qui gravite autour de l'idée d'interroger le vivant avec le langage et les concepts de la chimie. La chémobiologie viserait ainsi à concevoir et élaborer des outils moléculaires susceptibles de venir sonder ou moduler un processus biologique d'intérêt, afin d'en appréhender le fonctionnement, et parfois de le corriger, ainsi qu'à observer et analyser ces outils qui vont réagir ou interagir au sein d'un environnement biologique complexe. Essentiellement positionnée comme une approche fondamentale, elle reste souvent très proche d'applications potentielles puisqu'elle construit des objets moléculaires capables de réagir à un stimulus biologique donné. Elle trouvera donc des développements naturels dans des domaines tels que la santé ou l'environnement, et va se retrouver en interaction forte avec des branches telles que la conception de médicaments, le diagnostic, ou encore l'agrochimie et l'écologie.

C'est dans ce contexte scientifique que le groupe thématique SCF-ChemBio a été créé au sein de la Société Chimique de France, avec pour objectif d'accroître la visibilité de la discipline, mais également de fédérer une communauté de chercheurs. Le groupe a vu le jour en janvier 2020 et, malgré le contexte sanitaire, a déjà entrepris un certain nombre d'actions [1]. Un prix jeune chercheur a été créé et les excellentes candidatures reçues montrent que la relève est en marche ! [2] Des webinaires en partenariat avec Chemistry Europe et le journal *ChemBioChem* ont été organisés, qui ont été l'occasion pour des centaines de participants d'écouter de prestigieux orateurs internationaux du domaine. Des liens avec différentes sociétés préoccupées par la promotion de la chémobiologie ont été tissés afin de partager de façon plus large nos travaux à l'international. C'est d'ailleurs dans ce contexte que le groupe SCF-ChemBio a rejoint cette année l'European Federation for Medicinal Chemistry and Chemical Biology (EFMC). Le groupe sera également présent aux

côtés du Bureau de la division Chimie organique de la SCF (DCO) dans l'organisation des Journées de la division en 2022 (JCO-2022). Enfin, un GDR Chémobiologie a vu le jour en janvier 2021 ; les premières journées scientifiques ont eu lieu les 21 et 22 octobre à Grenoble et une École thématique du CNRS « Méthodes et concepts en chémobiologie » a été organisée au Touquet en novembre dernier.

Dans ce dossier consacré à la chémobiologie, le groupe SCF-ChemBio a proposé à des chercheurs de cette communauté d'illustrer quelques thématiques représentatives des développements actuels montrant la diversité scientifique des recherches menées. Ces dernières années, ces travaux ont eu pour objectif de surmonter plusieurs défis : accéder à des biomolécules complexes, mettre au point des réactions spécifiques, cibler, imager et analyser les réactions et les biomolécules, non plus dans un réacteur simple que constitue le ballon du chimiste mais dans la cellule. La chémobiologie ayant certains recouvrements avec plusieurs communautés, il semblait également essentiel de montrer la diversité des scientifiques qui se reconnaissent dans les travaux menés dans ce domaine.

En introduction, nous avons recueilli le témoignage des professeurs Andrée Marquet et Francis Schuber, qui furent parmi les pionniers en France pour les travaux associant chimie organique et biologie. Ils racontent comment la recherche académique nationale dans ce domaine s'est structurée, ce qu'elle a accompli et les difficultés qu'elle a rencontrées. Cette rétrospective enrichissante et instructive nous montre le chemin parcouru et apporte une vision utile et éclairante pour la communauté actuelle.

Les contributions suivantes décrivent les développements considérables de la chimie bioorthogonale qui offre la possibilité de faire de la chimie *in vivo*, et ouvre la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques prometteuses par un ciblage plus précis (S. Papot et F. Taran), ou encore d'étudier des voies métaboliques *via* l'utilisation de la stratégie du rapporteur chimique (C. Biot et B. Vauzeilles). De même, les progrès importants en matière de synthèse des biomolécules ont permis la conception de peptides vecteurs (D. Boturny), d'acides nucléiques modifiés (M. Hollenstein), ou de protéines *via* la ligation chimique native (V. Aucagne *et coll.*) pour aborder ces questions de ciblage, de vectorisation, mais également de compréhension fine de leur rôle biologique au niveau moléculaire.

L'étude du vivant nécessite également la mise au point de techniques d'imagerie très performantes. Les technologies basées sur la fluorescence sont cruciales dans la compréhension des processus biologiques. Imager la matière vivante se fera grâce aux multiples interactions avec les scientifiques de tous horizons (physiciens, biologistes, spécialistes des données) pour développer de nouvelles sondes, par exemple

fluorogènes ou « Turn-On » (D. Bonnet et A. Klymchenko), et de nouveaux protocoles (L. Jullien). D'autres techniques à la base des méthodes de caractérisation du chimiste comme la RMN et la spectrométrie de masse connaissent également un essor considérable avec des méthodes permettant d'analyser les molécules dans leur habitat biologique. Quelques apports récents de la RMN (F.-X. Theillet et J.-M. Franconi), de l'imagerie par spectrométrie de masse (D. Touboul et I. Fournier) ainsi que de la RPE (E. Mileo) illustrent ces nouveaux défis.

Tous ces progrès trouvent naturellement des applications dans le domaine de la santé ; il existe un lien évident entre chémobiologie et chimie médicinale (R. Deprez *et coll.*). L'article de F. Mahuteau et de H. Munier illustre aussi l'utilisation de petites molécules issues par exemple d'un criblage haut débit pour venir perturber un système biologique d'intérêt thérapeutique et ainsi mieux l'étudier. La découverte et la validation de nouvelles cibles biologiques grâce aux travaux en chémobiologie doivent permettre de trouver et/ou développer de nouvelles molécules à visée thérapeutique (R. Rodriguez). Enfin, l'article de G. Truan qui clôture ce dossier met l'accent sur l'apport considérable de la chémobiologie à la biologie de synthèse et promeut une vision commune des processus du vivant.

En espérant que ce dossier soit inspirant, qu'il contribuera à partager notre enthousiasme et suscitera de nouvelles vocations, nous vous souhaitons une bonne lecture !

[1] Chémobiologie : un nouveau groupe thématique de la SCF, *L'Act. Chim.*, **2021**, 459, p. 58. <https://new.societechimiquedefrance.fr/wp-content/uploads/2021/03/459-actus-groupe-chemobiologie.pdf>

[2] Voir p. 66.

Christophe BIOT, professeur à l'Université de Lille, vice-président du groupe thématique SCF-ChemBio, **Eric DEFRANCO**, professeur à l'Université Grenoble Alpes, vice-président du groupe SCF-ChemBio, **Dominique GUIANVARCH**, professeure à l'Université Paris Saclay, secrétaire du groupe SCF-ChemBio, et **Boris VAUZEILLES**, directeur de recherche au CNRS, président du groupe SCF-ChemBio.

* christophe.biot@univ-lille.fr ;
eric.defrancq@univ-grenoble-alpes.fr ;
dominique.guianvarch@universite-paris-saclay.fr ;
boris.vauzeilles@cnrs.fr





Groupe thématique de Chémobiologie SCF-ChemBio

Large réseau
de chercheurs
en France

Liens avec les
sociétés sœurs
internationales

Site web,
actualités,
offres d'emploi

Prix jeune
chercheur -
jeune
chercheuse

Organisation de
e-symposium
avec Chemistry
Europe

 contact-chemobiologie@societechimiquedefrance.fr

 @chemobiologie

 Groupe de Chémobiologie

 <https://new.societechimiquedefrance.fr/groupes/groupe-de-chemobiologie/>



Président **BORIS VAUZEILLES**

Vice présidents **CHRISTOPHE BIOT - ERIC DEFRANCO**

Secrétaire **DOMINIQUE GUIANVARCH**

Trésorière **MARIE LOPEZ**

Corr. Actualité Chimique **ARNAUD GAUTIER**

Communication **MARIA DUCA**

Membres du bureau **ESTELLE LEONARD – SYLVAIN MARQUE - YUNG-SING WONG**

L'émergence de l'interface chimie-biologie en France

Témoignage d'Andrée Marquet et Francis Schuber recueilli par Dominique Guianvarc'h

Deux pionniers de l'interface entre chimie et biologie en France, Andrée Marquet et Francis Schuber, racontent comment la recherche académique nationale dans le domaine de la chémobiologie s'est structurée, ce qu'elle a accompli et les difficultés rencontrées.

À quel moment la chimie organique s'est-elle intéressée à la compréhension du vivant ?

En France, l'intérêt des chimistes pour l'étude des processus biologiques s'est manifesté et concrétisé dans le milieu universitaire au début des années 1960. Bien sûr, avant cela, l'activité concernant le vivant n'était pas absente et deux domaines étaient bien implantés :

- La chimie médicinale, particulièrement développée dans l'industrie pharmaceutique et dans certaines facultés de pharmacie, qui devait beaucoup à l'expérience et à l'intuition du chimiste. Le besoin de rationalisation a notamment orienté les recherches vers un approfondissement de la méthode dite « quantitative structure activity relationship » (QSAR).

- La chimie des substances naturelles, essentiellement centrée sur les déterminations de structures en utilisant des méthodes chimiques (les bases de données spectroscopiques n'existaient pas...).

Tout cela, c'était avant tout de la chimie. Les tests biologiques, qui étaient souvent réalisés sur organes isolés ou organismes entiers, donnaient peu d'information à l'échelle moléculaire.

La nouveauté à partir des années 1960 a résidé dans la volonté de comprendre, à l'échelle moléculaire, les mécanismes du vivant. La motivation première étant, nous semble-t-il, la soif de connaissance de ce domaine fascinant, sans oublier les retombées possibles en pharmacologie, médecine, biotechnologies, etc. Ceci impliquait notamment la recherche d'outils par une approche rationnelle à l'échelle moléculaire.

Notons en passant que la première structure tridimensionnelle d'une protéine, la myoglobine, a été déterminée en 1958 (John Kendrew *et al.*, Université de Cambridge). Il a fallu attendre 1965 pour obtenir la structure, à haute résolution, d'une enzyme : le lysozyme (David Phillips *et al.*, Université d'Oxford), lançant ainsi le domaine de la biologie structurale et la possibilité de pouvoir ensuite déchiffrer les mécanismes enzymatiques au niveau moléculaire.

L'enthousiasme de ces nouveaux convertis les faisait adhérer à ce qu'exprimera plus tard avec lyrisme Arthur Kornberg, prix Nobel de physiologie et médecine en 1959 pour la DNA polymérase : « *Much of life can be understood in rational terms if expressed in the language of chemistry. It is an international language, a language without dialects, a language for all of time, and a language that explains where we came from, what we are, and where the physical world will allow us to go. Chemical language has great esthetic beauty and links the physical sciences to the biological sciences. Yet when I took my training in medicine, the importance of chemistry was hardly noticed* » (Current Biology, 1996, p. 4-5).

Remarques préliminaires

« Dans cet entretien, nous n'avons pas eu l'ambition de faire œuvre d'historiens du domaine de l'interface chimie-biologie. Le retour d'expérience que nous proposons comporte forcément une part de subjectivité. Même si les différentes fonctions que nous avons exercées nous ont permis d'avoir une vue globale sur la situation française, nous avons fait un choix quant aux thèmes scientifiques mentionnés, en privilégiant probablement nos propres centres d'intérêt. Nos réflexions couvrent la période 1960-2000 où nous étions en activité. Enfin, une autre question qui nous a beaucoup préoccupés fut de savoir si on pouvait citer tous nos collègues, et ils sont nombreux, qui ont œuvré à cette interface ; nous ne l'avons pas fait et les prions de nous en excuser. Cela aurait beaucoup alourdi cette interview et nous avons ainsi évité des oublis impardonnables... »



Andrée Marquet, professeure émérite à Sorbonne Université, directrice (1978-1998) du Laboratoire de Chimie Organique Biologique, Université Pierre et Marie Curie, et Francis Schuber, directeur de recherche émérite au CNRS, directeur (1992-2004) du Laboratoire de Chimie Bioorganique (URA 1386/UMR 7514-CNRS), Faculté de pharmacie, Université de Strasbourg.

Quels ont été les pionniers dans cette interface, et comment le mouvement s'est-il implanté en France ?

Le mouvement a été déclenché en France par quelques collègues qui avaient des contacts internationaux. En effet, des Anglo-Saxons, et des Suisses également, avaient une longueur d'avance dans ce domaine. Citons ainsi quelques noms et laboratoires (impossible d'être exhaustif... – subjectivité assumée...) qui furent parmi les pionniers. Ils avaient un thème de recherche commun, la stéréochimie des réactions enzymatiques, outil important pour le décryptage de leur mécanisme moléculaire (ce qui a conduit, ce faisant, au concept essentiel de prochiralité) : Duilio Arigoni (ETH Zurich), pour l'élucidation des mécanismes de biosynthèse de produits naturels et qui a élevé au rang d'un art l'utilisation de marquages isotopiques/méthyl chiral ; Alan Battersby (Cambridge) ; John W. Cornforth, prix Nobel de chimie en 1975 avec Vladimir Prelog « pour l'étude stéréochimique des réactions enzymatiques » ; Irwin Rose (Université de Pennsylvanie), prix Nobel de chimie en 2004 ; Frank Westheimer (Harvard). Mentionnons aussi Alan Fersht (Cambridge), un des pionniers de l'ingénierie des protéines

et de l'utilisation de la mutagenèse dirigée. Notons enfin la publication lors de ces années d'ouvrages « fondateurs » qui ont eu un impact important, comme par exemple : *Bioorganic Mechanisms*, vol. I et II (Thomas C. Bruice et Stephen J. Benkovic, 1966), *Biological Chemistry* (Henry R. Mahler et Eugene H. Cordes, 1968) et *Catalysis in Chemistry and Enzymology* (William P. Jencks, 1969).

Grâce au développement des contacts internationaux noués par les acteurs les plus ouverts de la chimie française, le mouvement des départs en postdoctorat s'amorçait vers des laboratoires en pointe à l'interface chimie-biologie. À leur retour, certains ont pu créer et développer leur équipe autour de cette thématique. C'est à Paris et Strasbourg qu'ils furent les plus nombreux, mais bien d'autres universités et centres de recherche furent concernés par la suite.

Avez-vous rencontré des difficultés à mettre en place de tels projets d'interface en France ?

N'oublions pas le contexte : en France, les champs disciplinaires étaient encore prévalents tant dans l'enseignement que dans la recherche et l'interdisciplinarité restait balbutiante.

Le développement de ces petits groupes ne s'est donc pas fait sans difficultés.

- Les chercheurs impliqués étaient souvent autodidactes en biochimie, un postdoctorat ne vaut pas un cursus complet ! Même problème pour les étudiants qui les rejoignaient venant de la chimie.

- Les équipements n'existaient pas dans les laboratoires de chimie ; il fallait solliciter l'aide de collègues biochimistes, ou parfois recourir au bricolage !

- Il fallait aussi affronter les critiques des collègues organiciens classiques qui considéraient souvent que la chimie bioorganique, « *ce n'est pas de la chimie* ». Il s'agit d'une question d'objectif ; faire de la synthèse organique originale ou accéder

le plus vite possible aux molécules nécessaires à l'étude du problème biologique sont deux options également défendables.

Malgré ces contraintes, cette nouvelle thématique attirait les étudiants, souvent parmi les meilleurs. Cahin-caha, les choses ont avancé, et la communauté française s'est étoffée et a éprouvé le besoin de se structurer, pour avoir un lieu d'échanges scientifiques et accroître sa visibilité.

Quels actions et lieux d'échange ont été mis en place pour structurer cette communauté ?

De ce souci sont nées les RECOB (Rencontres de chimie organique biologique). La première réunion, dont le format et l'esprit ont pris modèle sur les « Gordon research conferences », eut lieu à Aussois, en 1986 (Francis Schuber). Il aura donc fallu une quinzaine d'années depuis les premiers balbutiements pour arriver à constituer, en France, une communauté suffisamment importante se reconnaissant dans l'interface chimie/biologie.

Parallèlement, la communauté internationale s'était également organisée ; citons :

- L'ancêtre de ces réunions récurrentes est probablement l'ESBOC (« European symposium on biological and organic chemistry ») qui a lieu chaque année (Gregynog, Pays de Galles).

- En 1984, une conférence EUCHEM ayant pour thème « Organic approaches to biological problems » fut organisée par Andrée Marquet à Port Camargue.

- En 1986, ISBOC 1 (International symposium on bioorganic chemistry), organisé par Ronald Breslow à New York.

- En 1997, ISBOC 4, organisé par Andrée Marquet et Solange Lavielle à Biarritz.

- Diverses « Gordon conferences » ont également été pionnières dans ce domaine, notamment celles portant sur l'enzymologie.



Première édition des Rencontres de chimie organique biologique (RECOB) en 1986.

À noter que parallèlement, les sciences pharmaceutiques se sont également très largement structurées à l'interface – GESA (Groupe d'Étude Structure-Activité), GTRV (Groupe Thématique de Recherche sur les Vecteurs).

Aujourd'hui, un grand nombre de chercheurs à l'interface de la chimie et de la biologie se reconnaissent dans un champ thématique assez vaste dénommé chémobiologie (« chemical biology »). Comment se positionnait l'interface à ses débuts au niveau des thématiques et des dénominations ?

La dénomination de cette nouvelle discipline – interface chimie/biologie, chimie organique biologique, chimie bioorganique, biologie chimique (« chemical biology »), etc. –, a varié avec l'évolution des contenus. Les premiers travaux de chimie organique biologique sont encore clairement chimiques. Les techniques sont celles de la chimie, exception faite du marquage isotopique, très utilisé dans le décryptage des voies métaboliques par les biochimistes. Les modes de pensée sont encore ceux de la chimie organique. Mise à part une certaine aide technique, ces travaux n'exigent pas encore vraiment de collaborations soutenues entre chimistes et biologistes. Cette collaboration est d'ailleurs quelques fois regardée avec suspicion, les chimistes craignant d'être réduits à la fabrication de molécules dont l'utilisation leur échapperait. L'ambition des chimistes à l'interface a été rapidement de pouvoir également maîtriser les problèmes biologiques sur lesquels ils étaient amenés à travailler.

Deux grands thèmes sont au cœur de l'activité dans les premières décennies : les voies de biosynthèse et le mécanisme moléculaire des réactions enzymatiques, avec notamment les aspects stéréochimiques (découverte de la prochiralité). C'est toujours de la chimie, et c'est seulement l'objet, ou le catalyseur, qui change. On est ensuite passé de l'examen du devenir des petites molécules à l'étude des mécanismes eux-mêmes avec l'aide des structures 3D des protéines et des complexes protéines/substrats/inhibiteurs. Il est à souligner que l'interface plonge aussi ses racines dans la possibilité de manipuler les systèmes biologiques au niveau moléculaire – à noter ici l'impact pris par des techniques comme la fabrication de protéines recombinantes et la mutagenèse dirigée. Soulignons enfin que la recherche dans l'industrie pharmaceutique a également connu un tournant durant ces années avec le développement de stratégies rationnelles basées sur les connaissances au niveau moléculaire des cibles pharmacologiques. Dans le domaine de l'enzymologie, citons par exemple le développement d'inhibiteurs « analogues d'états de transition » et les « inhibiteurs suicides ».

C'est plus tardivement que s'est développée la chimie bioorganique qui s'est intéressée à l'énorme problème du rôle des métaux en biologie, en utilisant les progrès conceptuels de la chimie inorganique. C'est dans ce domaine que le chemin inverse, la synthèse de modèles chimiques des sites actifs d'enzymes fonctionnels, a été le plus fructueux.

Progressivement, la chimie bioorganique s'est attaquée à des problèmes de biologie beaucoup plus complexes, pour lesquels la collaboration avec les biologistes était devenue indispensable. Même si cette fois, ce sont ces derniers qui restent en général les maîtres d'œuvre, les chimistes ont un rôle essentiel à jouer. Les interactions ligands-récepteurs et protéines-protéines sont au cœur des processus biologiques. Ces interactions relèvent de la reconnaissance moléculaire de mieux en mieux analysée par les chimistes, y compris dans

ses aspects dynamiques. La chimie des peptides, qui permet de moduler finement la structure de ces ensembles, joue un rôle important.

Notre but ici n'est pas de faire un inventaire des thématiques biologiques concernées. L'ensemble de ce dossier illustre bien les préoccupations actuelles des chercheurs œuvrant à l'interface, qui naturellement prennent racine dans les travaux de leurs prédécesseurs.

Concluons cette brève analyse en constatant une interpénétration de plus en plus grande, au fil des années, entre le monde de la chimie et celui de la biologie.

On a assisté à une évolution spectaculaire : les biochimistes ont graduellement abandonné la biochimie aux chimistes et sont devenus biologistes au sens large, tandis que nombre de chimistes ont acquis une vraie double culture. D'une manière intéressante, cette évolution avait été anticipée, par exemple par Henry R. Mahler et Eugene H. Cordes dans leur livre de 1968 : « [...] it seems perfectly possible that in the not-so-distant future biochemistry as an independent field of specialization may either practically disappear or else engulf a good deal of what presently fits into the various classifications of chemistry and biology » (in *Basic Biological Chemistry*, chap. 1, History and scope of biochemistry).

Aujourd'hui, initier un projet en chémobiologie nécessite d'acquérir un certain nombre de notions fondamentales en biologie en complément de la culture initiale en chimie. Avez-vous, en parallèle de vos activités de recherche, cherché à mettre en place des formations dédiées permettant de sensibiliser des étudiants chimistes à cette interface ?

Il est évident qu'un tel développement d'une nouvelle sous-discipline appelait la création de nouveaux enseignements adaptés, ce qui fut fait (avec un peu de décalage) et généralement très bien accueilli par les bénéficiaires. Il est impossible de rapporter les nombreuses initiatives qui furent prises dans différentes universités. Nous mentionnerons simplement deux exemples qui correspondent à l'expérience vécue des auteurs, dans deux universités qui comptent parmi les pionnières dans la mise en place de l'interface.

Laissons parler, par exemple, une ancienne étudiante du cursus de biochimie de l'UPMC : « Pour nombre d'étudiants qui sont passés par la licence de biochimie, la maîtrise et le DEA de chimie organique à l'Université Pierre et Marie Curie, les cours de chimie bioorganique ont été une véritable révélation. Tout ce qui manquait à la biochimie, à savoir l'aspect réactivité et mécanistique des réactions du vivant, et ce qui manquait à la chimie organique, à savoir l'application aux problématiques biologiques, était réuni dans un cours sans équivalent à l'époque. Grâce à ce cours, des « boîtes noires » de la biochimie s'éclairaient soudainement, et la chimie organique prenait une dimension nouvelle et bien plus riche puisqu'elle devenait un moyen d'appréhender la compréhension des phénomènes biologiques au niveau moléculaire. Les cours de second cycle s'adressaient aussi bien aux étudiants biochimistes que chimistes, ce qui a permis à ces deux communautés d'étudiants de se croiser en cours et au laboratoire, de s'enrichir mutuellement et d'apprendre à parler un langage commun, tout en ayant un bagage de connaissances différent. »

À l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, le DEA de pharmacologie et pharmacochimie, créé en 1975, restera longtemps le seul DEA interdisciplinaire des facultés de pharmacie du pays. Ajoutons, dans la même université, la création en 1986

du premier magistère « Chimie bioorganique et bioinorganique ».

D'une manière générale, soulignons que toutes ces initiatives connurent des fortunes diverses, au gré des réformes de l'enseignement supérieur et des changements des équipes de gouvernance. Il n'est pas envisageable d'en faire un bilan ici. On peut cependant formuler quelques recommandations à partir des expériences acquises :

- Il faut impérativement fuir le saupoudrage ; l'expérience montre qu'un enseignement chimie/biochimie (ou biologie) solide est possible. Point n'est besoin d'être encyclopédique.
- Si la balance doit pencher d'un côté ou de l'autre, peut-être vaut-il mieux que ce soit du côté de la chimie lors de la formation initiale.
- Il est judicieux de réunir des étudiants de formations diverses le plus tôt possible.

Comment les tutelles ont-elles soutenu cette interface ?

Le CNRS a créé au sein du Comité national une section d'interface dépendant à la fois des départements Chimie et Sciences de la vie : une belle reconnaissance officielle de cette nouvelle discipline. Dans la pratique, l'investissement des uns et des autres s'est avéré fluctuant, dépendant de la sensibilité des responsables. De manière générale, dans les diverses institutions, le mot interdisciplinarité est un bel étendard mais la réalité ne suit pas toujours.

Un certain nombre de programmes, de durée limitée, ont cependant vu le jour, financés sur des fonds divers, mais majoritairement CNRS (voir encadré). Il faut souligner ici le rôle décisif joué par Pierre Potier, infatigable et tenace défenseur de l'interface. Son influence est repérable derrière le lancement d'une bonne part de ces actions.

L'effort est loin d'être négligeable, mais il faut regretter l'absence de continuité de ces programmes qui provoque un financement en accordéon peu compatible avec une recherche à long terme.

Votre témoignage nous montre que cette interface, si bien implantée dans d'autres pays, a eu du mal à cristalliser en France ; comment expliquez-vous cela ? Selon vous, pourquoi d'autres pays gèrent-ils mieux l'interdisciplinarité pourtant si importante pour répondre aux enjeux complexes actuels ?

Cette question est très intéressante car elle nous interroge collectivement. Comment se fait-il que les générations plus jeunes rencontrent encore aujourd'hui – semble-t-il – des freins au plein épanouissement de notre discipline ? Nous pouvons émettre quelques opinions qui, bien entendu, nous sont toutes personnelles. La France demeure un pays excessivement centralisé et l'autonomie des universités est restée – malheureusement – toute relative. Il en résulte une tendance lourde qui aboutit à l'uniformisation des cursus et à la difficulté de s'affranchir des champs disciplinaires classiques. Ces travers se retrouvent au niveau universitaire, mais également peu ou prou dans les centres de recherche et les instances nationales de financement de la recherche. Pour reprendre votre question, imagine-t-on par exemple l'Université de Harvard devoir demander l'aval d'un quelconque ministère de Boston, voire de Washington, pour créer des cursus multidisciplinaires ? La réponse est évidente. C'est pourtant ce qui est arrivé à certains d'entre nous, par exemple lors de la

Les soutiens institutionnels à l'interface chimie-biologie entre 1970 et 2001

Dans les années 1970 existaient des actions thématiques programmées (ATP, CNRS) ainsi que des actions de la DGRST (Gouvernement) qui étaient un tantinet œcuméniques et permettaient de financer (un peu...) les recherches à l'interface.

1978 : création du **PIRMED** (Programme interdisciplinaire de recherche pour le médicament) par Pierre Potier et Henri-Philippe Husson.

1986 : arrêt du PIRMED, remplacé par l'**ARI** (Action de recherche intégrée) chimie-biologie (Claude Hélène).

1985-1988 : Fondation pour la formation à l'interface chimie-biologie (**F2RCB**).

Attribution de bourses postdoctorales (Andrée Marquet).

1990-1992 : Comité d'interface chimie-biologie.

Financement par les départements Chimie et Sciences de la vie du CNRS (Jean-Claude Chottard).

1995-2001 : **Mission Physique et chimie du vivant (PCV – CNRS)** (Sylvain Blanquet (1995-1997), Daniel Mansuy (1997-2001)); un programme du même intitulé a été repris plus tard par l'ANR.

réforme LMD... qui a signifié un recul pour les cursus interdisciplinaires lentement mis en place précédemment... Heureusement, au niveau individuel, il restera toujours des personnalités qui auront envie de s'aventurer au-delà de leur « zone de confort ». La communauté qui se reconnaît dans l'interface chimie-biologie est semble-t-il suffisamment nombreuse et dynamique au niveau international pour espérer qu'au niveau national on puisse – encore et toujours – faire bouger les lignes. Terminons toutefois sur une note d'espoir en soulignant la mise en place dans certaines de nos universités d'enseignements associant la chimie et la biologie dans le cadre de licences et de masters.

En guise de conclusion, nous dirons que nous sommes raisonnablement, mais résolument, optimistes. En dépit des obstacles, l'interface chimie-biologie, quel que soit le nom qu'on lui donne, progresse. Les problématiques abordées, telles qu'elles sont exposées dans la suite de ce dossier, sont différentes de celles des années soixante. Qui eut songé, à cette époque, à faire par exemple de la chimie à l'intérieur d'une cellule ? Ceci montre que les chimistes ont accompagné ou participé à l'évolution de la biologie, ce qui implique qu'ils aient acquis un niveau de culture adéquat. Remarquons aussi que les biologistes ont également fait une partie du chemin inverse en abordant de plus en plus les problèmes à l'échelle de la molécule. Rêvons du jour où l'on ne parlera plus d'interface puisque les barrières auront disparu. N'est-ce pas d'ailleurs le même état d'esprit qui semble animer le Comité Nobel qui a souvent attribué, au cours des dernières décennies, et notamment l'année dernière, le prix de chimie à des travaux relevant de la biologie et de la médecine ?

Dominique GUIANVARCH,

Professeure à l'Université Paris Saclay, Institut de Chimie moléculaire et des matériaux d'Orsay (ICMMO).

* dominique.guianvarch@universite-paris-saclay.fr

De la chimie bioorthogonale au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques

Résumé La sélectivité exceptionnelle de la chimie bioorthogonale permet de réaliser des réactions chimiques non naturelles dans les milieux biologiques les plus complexes tels que les milieux intracellulaires, le sang ou encore au sein même d'un animal. Par le biais de ces réactions, il devient possible d'envisager des applications thérapeutiques innovantes telles que la délivrance contrôlée de médicaments.

La chimie bioorthogonale – comprise orthogonale par rapport aux fonctions biologiques – regroupe l'ensemble des réactions conduisant à la formation ou la rupture de liaisons au sein des milieux biologiques, sans interagir avec les fonctions chimiques présentes dans les molécules constituant les êtres vivants. Cette chimie peut être réalisée dans les milieux biologiques les plus complexes tels que les milieux intracellulaires, le sang, ou encore au sein même d'un organisme entier. L'équipe de Bertozzi a été la première à introduire ce concept en 2003 [1], et en a brillamment illustré le potentiel pour étudier le glycome (ensemble des sucres d'un organisme) chez le poisson-zèbre et la souris à l'aide de la ligation (réaction qui permet de lier deux molécules) de Staudinger (figure 1.1d).

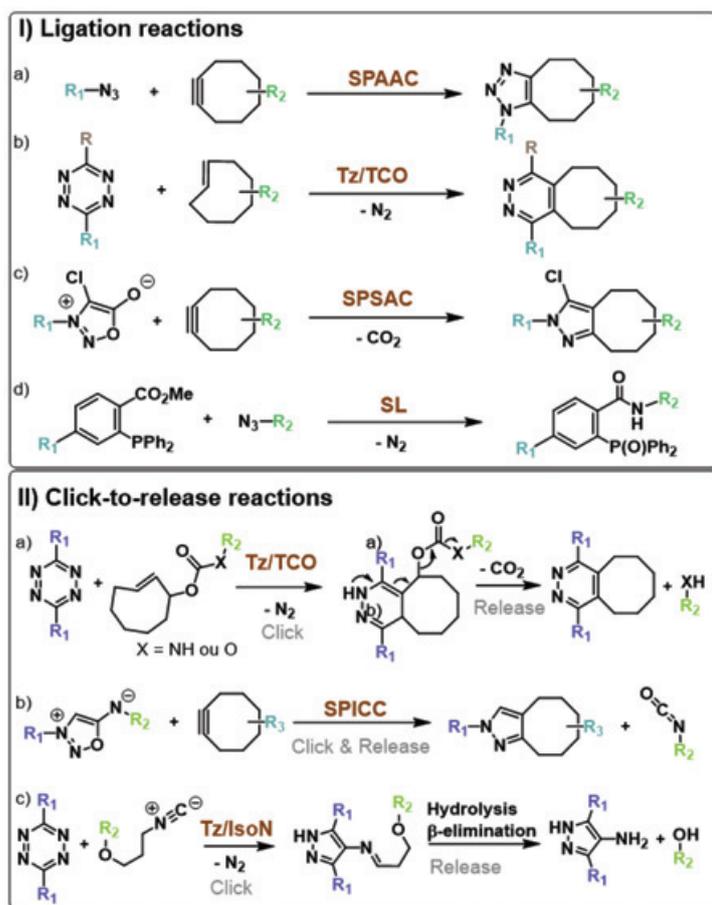


Figure 1 - I) Principales réactions de ligation bioorthogonales en absence de métal: a) SPAAC («strain-promoted azide-alkyne cycloaddition»), b) Tz/TCO (tétrazine/transcyclooctène ou DAInv), c) SPSAC («strain-promoted sydnone-alkyne cycloaddition»), d) SL («Staudinger ligation»). II) Principales réactions de «ligation et libération» bioorthogonales: Tz/TCO (tétrazine/transcyclooctène); SPICC («strain-promoted iminosydnone-cycloalkyne cycloaddition»); Tz/IsoN (tétrazine/isonitrile).

Depuis les travaux pionniers de Bertozzi, de nombreux groupes ont tenté de développer des réactions bioorthogonales pouvant avoir un niveau de sélectivité suffisant pour être utilisées chez l'animal. Les enjeux scientifiques associés à cette thématique, à la fois fondamentaux et appliqués, sont considérables et ouvrent notamment la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques. Par le biais de ces réactions, il devient possible d'envisager de construire un médicament *in vivo*, de moduler sa pharmacocinétique en augmentant par exemple sa vitesse d'excrétion, ou encore de contrôler sa libération spécifique dans des organes d'intérêt [2] (figure 2).

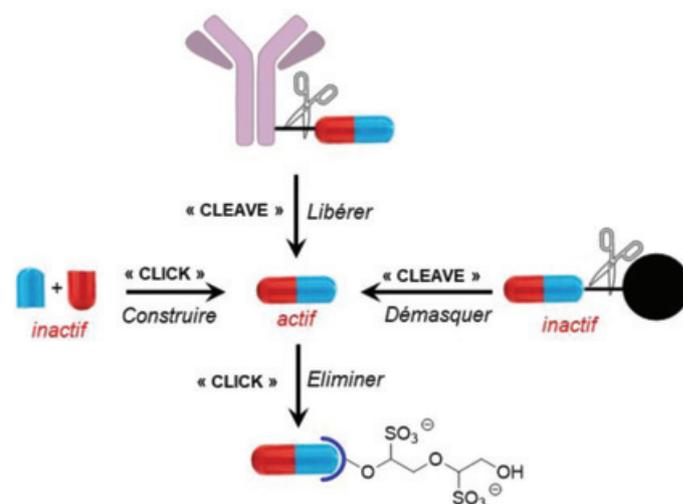


Figure 2 - Exemples d'applications thérapeutiques potentielles de la chimie bioorthogonale. La chimie bioorthogonale permet de libérer ou démasquer un médicament de manière sélective. Elle permet également de construire un médicament dans un tissu particulier à partir de deux précurseurs inertes, et peut aussi être utile pour moduler les paramètres pharmacocinétiques d'une substance active en accélérant par exemple son élimination rénale.

Nouvelles réactions bioorthogonales

Toutefois, malgré de nombreux efforts, peu de réactions chimiques peuvent être réellement considérées comme bioorthogonales, et très peu d'entre elles ont pu être utilisées pour réaliser des réactions chimiques non naturelles au sein d'un animal vivant. Ces réactions sont en grande majorité des cycloadditions, notamment inspirées de la cycloaddition catalysée par le cuivre (CuAAC) : soit la cycloaddition [3+2] des azotures avec les cyclooctynes (réaction SPAAC, figure 1.1a), soit [4+2] pour la cycloaddition des tétrazines (Tz) avec les trans-cyclooctènes (Tz/TCO, figure 1.1b) [3].

Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à la chimie des mésoioniques, composés anciens et en grande partie sous-utilisés par la communauté scientifique. Leur

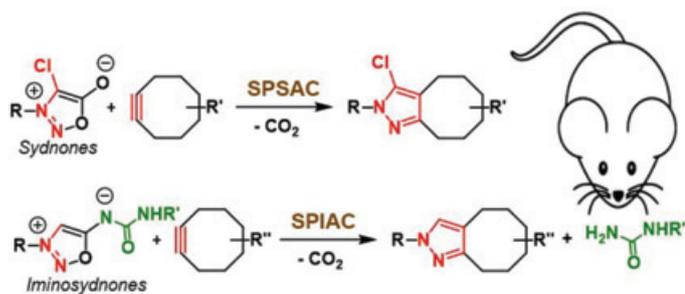


Figure 3 - Nouvelles réactions bioorthogonales développées par le laboratoire pour des applications biomédicales *in vivo*.

réactivité de dipôles a notamment été étudiée assez systématiquement dans notre laboratoire, ce qui a permis d'identifier de nouvelles réactions de ligation et de coupure bioorthogonales. Nous avons notamment mis au jour la réaction de ligation impliquant les chlorosydnone et les cyclooctynes. Nous avons également démontré sa capacité à fonctionner au sein d'une tumeur implantée chez la souris pour des applications en imagerie (réaction SPSAC, figure 1.c et figure 3) [4]. D'autres composés mésoioniques permettent non seulement d'effectuer une réaction de ligation mais aussi de coupure. C'est le cas de composés appelés iminosydnone qui, suite à leur réaction bioorthogonale avec les cyclooctynes, forment à la fois un pyrazole, issu de la réaction de ligation, et libèrent une urée issue de la réaction de coupure (réaction SPIAC, figure 3) [5].

Des micelles clivables sur commande

Nous avons alors cherché à exploiter cette réaction de ligation/coupure bioorthogonale en synthétisant un amphiphile comportant une tête polyéthylène glycol (PEG) reliée à une longue chaîne hydrophobe via une iminosydnone clivable par réaction SPIAC (figure 4).

Cet amphiphile est capable de s'auto-organiser dans l'eau pour former des micelles d'environ 10 nm de diamètre. Le cœur des micelles étant par nature hydrophobe, lorsqu'un cyclooctyne hydrophobe est additionné dans la solution, celui-ci aura une tendance naturelle à se concentrer dans le cœur de la micelle et à déclencher la réaction SPIAC. Ce phénomène se traduit par une réaction extrêmement rapide, conduisant à la complète destruction des micelles en seulement quelques secondes (figure 4).

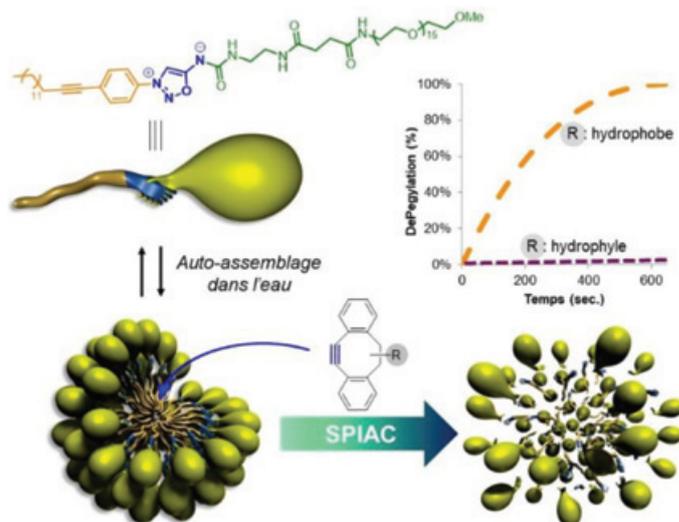


Figure 4 - Décomposition bioorthogonale de micelles par réaction SPIAC.

Libérer le contenu des micelles dans une souris par chimie bioorthogonale

Le développement de nanoparticules capables de libérer de façon sélective des médicaments au sein des tumeurs présente un grand intérêt pour augmenter l'efficacité des chimiothérapies anticancéreuses, tout en limitant les effets secondaires rencontrés lors des traitements classiques. Dans cette optique, nous avons tenté de démontrer que la réaction SPIAC pouvait permettre de libérer de façon bioorthogonale le contenu des micelles dans une tumeur implantée chez la souris (figure 5).

Dans cette approche, les micelles construites avec l'amphiphile contenant une iminosydnone clivable et dans lesquelles un fluorophore est encapsulé ont été dans un premier temps administrées par voie intraveineuse à des souris porteuses de xénogreffes sous-cutanées du cervix. En raison de leur taille, ces micelles se sont alors accumulées sur le site tumoral par effet EPR (« enhanced permeability and retention effect »). Vingt-quatre heures plus tard, l'injection du cyclooctyne DBCO-Glu (figure 5) a été réalisée. En raison de son hydrophilie liée à la présence de plusieurs unités monosaccharidiques, le DBCO-Glu ne peut pénétrer dans le cœur des micelles et déclencher la réaction SPIAC. En revanche, lorsque ce composé atteint le micro-environnement tumoral, l'hydrolyse

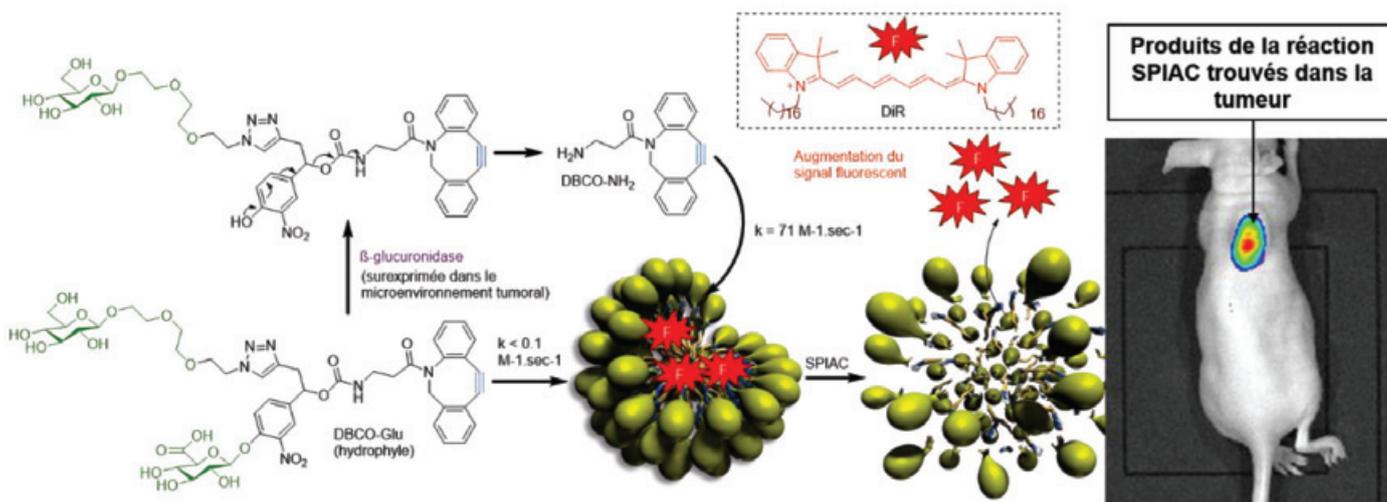


Figure 5 - Libération du contenu des micelles dans une tumeur implantée chez la souris à l'aide de la réaction SPIAC.

enzymatique du glucuronide par la β -glucuronidase extracellulaire présente en concentration importante au sein de la plupart des tumeurs solides [6], conduit à la libération d'un cyclooctyne hydrophobe (DBCO-NH₂). Ce dernier pénètre alors dans les micelles pour les détruire et ainsi libérer leur contenu. Les analyses des tumeurs implantées ont permis de confirmer le déroulement de ces événements : les tumeurs sont significativement plus fluorescentes suite à l'injection du DBCO-Glu, et surtout, le produit de ligation de la réaction SPIAC entre le DBCO-NH₂ et l'amphiphile a été isolé et caractérisé dans les tumeurs des souris traitées [7].

Ces résultats démontrent qu'il est possible, en utilisant la chimie bioorthogonale, de libérer *in vivo* sur commande chimique le contenu de nanoparticules. Cette possibilité ouvre la voie à une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur un double ciblage du micro-environnement tumoral : un ciblage par la nanoparticule et par l'agent déclencheur (ici le glucuronide du cyclooctyne). Il reste à démontrer que cette stratégie peut avoir une efficacité thérapeutique supérieure aux traitements classiques.

[1] H.C. Hang, C. Yu, D.L. Kato, C.R. Bertozzi, A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, p. 14846-851.

[2] Pour des revues récentes dans le domaine, voir : K. Porte *et al.*, Bioorthogonal reactions in animals, *ChemBioChem*, **2021**, *22*, p. 100-113 ; E. Kim, H. Koo, Biomedical applications

of copper-free chemistry: *in vitro*, *in vivo*, and *ex vivo*, *Chem. Sci.*, **2019**, *10*, p. 7835-7851 ; X. Fan, J. Li, P.R. Chen, Bioorthogonal chemistry in living animals, *Nat. Sci. Rev.*, **2017**, *4*, p. 300-302.

[3] H. Wu, N.K. Devaraj, Advances in tetrazine bioorthogonal chemistry driven by the synthesis of novel tetrazines and dienophiles, *Acc. Chem. Res.*, **2018**, *51*, p. 1249-259.

[4] L. Plougastel *et al.*, 4-halogeno-sydnone for fast strain promoted cycloaddition with bicyclo-[6.1.0]-nonyne, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, p. 9376-378 ; M. Richard *et al.*, New fluorine-18 pretargeting PET imaging by bioorthogonal chlorosydnone-cycloalkyne click reaction, *Chem. Commun.*, **2019**, *55*, p. 10400-403.

[5] S. Bernard *et al.*, Bioorthogonal click and release reaction of iminosydnone with cycloalkynes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*, p. 15612-616.

[6] J. Lange *et al.*, Volatile organic compound based probe for induced volatolomics of cancers, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, *58*, p. 17563-566.

[7] K. Porte *et al.*, Controlled release of a micelle payload via sequential enzymatic and bioorthogonal reactions in living systems, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, *58*, p. 6366-370.

Sébastien PAPOT,

Professeur, Université de Poitiers, UMR CNRS 7285, Institut de Chimie des Milieux et des Matériaux de Poitiers (IC2MP), Poitiers.

Frédéric TARAN,

Directeur de recherche au CEA, Université Paris Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), Gif-sur-Yvette.

* sebastien.papot@univ-poitiers.fr ; frederic.taran@cea.fr



DASITGROUP | **CARLO ERBA**
REAGENTS

ERBAdry® : SOLVANTS ANHYDRES "Made in France"

Bouchons et septa nouvelle génération développés par CARLO ERBA Reagents pour des solvants secs plus longtemps et une ergonomie améliorée :

- 3 larges surfaces de piquage pour faciliter les manipulations
- Inertie chimique assurée par le septum double couche
- Toujours prêt à être refermé grâce au capuchon solidaire du bouchon
- Deux bagues d'inviolabilité : double garantie d'un flacon non ouvert
- Disponible en 100ml et 1l, sans tamis moléculaire

Retrouvez les produits disponibles avec ce nouveau packaging sur notre site internet :

www.carloerbareagents.com

Les rapporteurs chimiques bioorthogonaux : une approche au cœur de la chémobiologie

Résumé L'utilisation de la stratégie du rapporteur chimique permet, grâce à des réactions bioorthogonales hautement spécifiques, le marquage de biomolécules dans des systèmes vivants. Les avancées récentes chez les eucaryotes, les bactéries, les virus et les parasites sont présentées dans cet article.

Les technologies basées sur la fluorescence ont bouleversé notre compréhension des processus biologiques, car elles permettent d'étudier de manière non invasive la localisation, la distribution, le trafic et l'activité des biomolécules, non seulement dans des cellules ou des tissus mais également dans des organismes entiers [1]. Toutefois, la visualisation directe de ces biomolécules est rendue difficile car elles ne possèdent généralement pas d'émission de fluorescence ou alors de faible intensité. Afin de surmonter ces limitations, de nombreuses stratégies de marquage pouvant faciliter la détection de ces (macro)molécules ont été développées. Parmi ces techniques de visualisation *in situ*, nombreuses sont celles se basant sur l'utilisation de la « green fluorescent protein » (GFP) et ses mutants afin de pouvoir étudier les biomolécules génétiquement encodées, les protéines. Cependant, cette technologie a également ses propres limites. Dès lors, le développement de la stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal par Bertozzi à la fin du XX^e siècle a offert un nouvel outil pour l'analyse des biomolécules qui ne sont pas génétiquement encodées. Cette approche chimique d'ingénierie moléculaire permet leur étude *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* sans interférer (ou très peu) avec le milieu biologique. La technique consiste à incorporer via les voies métaboliques naturelles un analogue synthétique de la molécule d'intérêt, conçu par le chimiste et modifié avec un groupement

bioorthogonal que l'on appelle « rapporteur » ou marqueur chimique, puis de faire réagir ce groupement avec un fluorophore appelé « sonde », comportant une fonction chimique bioorthogonale complémentaire (figure 1). Dans ce contexte, les sondes, dont la taille est alors négligeable par rapport à celle des biomolécules étudiées, peuvent être choisies pour leurs propriétés photophysiques. Elles peuvent notamment être optimisées pour des études dynamiques de longue durée ou pour les différentes techniques dites de super-résolution. Des rapporteurs chimiques ont été développés avec succès pour diverses biomolécules ou modifications protéiques (glycosylation, lipidation, acétylation, méthylation, sulfénylation...) chez les eucaryotes, les bactéries, les virus et les parasites. En parallèle du développement de rapporteurs chimiques toujours plus performants, les réactions de bioconjugaison de type « chimie click » ont connu un essor considérable, comme cela est décrit dans l'article de F. Taran et S. Papot dans ce dossier. Cette chimie dans le vivant est une parfaite illustration de l'apport que peuvent fournir les chimistes à l'étude des phénomènes biologiques. Cet article présente des exemples de mise en œuvre de cette stratégie du rapporteur chimique illustrée par divers travaux significatifs du paysage français replacés dans leur contexte international [2].

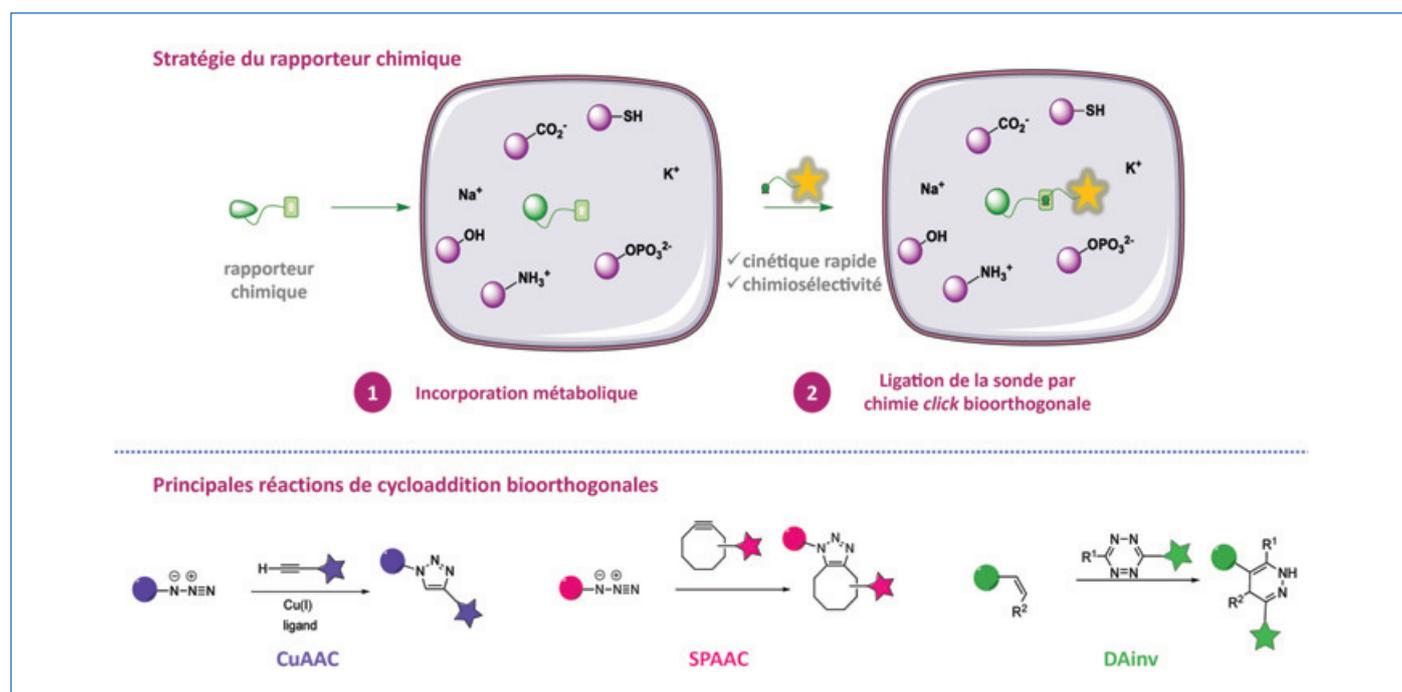


Figure 1 - Représentation schématique de la stratégie du rapporteur chimique et principales réactions bioorthogonales évoquées dans cet article.

Marquage de cellules animales

Les cellules eucaryotes de vertébrés ont été les premières ciblées par le marquage métabolique utilisant la stratégie du rapporteur chimique. Les premiers travaux menés par Bertozzi ont montré que les glycanes de surface pouvaient être modifiés au niveau des acides sialiques terminaux, par incorporation d'analogues de *N*-acétyl-mannosamine (ManNAc), un précurseur des acides sialiques. Ces travaux ont conduit à de nombreux développements et à des méthodologies aujourd'hui très avancées. De nombreux articles ont été publiés concernant des études de marquage à la membrane cellulaire [3-5]. Toutefois, peu d'équipes se sont intéressées à l'utilisation de la stratégie du rapporteur chimique pour la visualisation des glycanes à l'intérieur des cellules. Dès 2006, Hsu *et al.* sont les premiers à incorporer *ex vivo* un analogue du fucose avec une étiquette alcyne et à le détecter au niveau de l'appareil de Golgi [6]. L'année suivante, la même équipe réitère avec un analogue du ManNAc, détecté également au niveau du Golgi. Il faudra attendre 2013 pour que l'équipe de Jan Boons applique la stratégie à la visualisation intracellulaire d'une déficience de glycosylation, en incubant des fibroblastes de patients atteints de la maladie de Niemann-Pick [7]. La même année, l'équipe de C. Biot propose d'exploiter cette stratégie comme outil d'évaluation de défauts de glycosylation et démontre une corrélation entre l'intensité de fluorescence golgienne et la gravité d'un défaut de glycosylation [8]. Cette approche leur a ensuite permis de valider expérimentalement des mécanismes de sialylation postulés par Bardor et Varki [9] (figure 2). Tout en confirmant que l'entrée des acides sialiques exogènes dans les fibroblastes est régie par un mécanisme d'endocytose, l'hypothèse de l'existence d'un transport spécifique jusqu'ici inconnu pour l'import du ManNAc a ainsi pu être émise [10].

Marquage de cellules végétales

Différents outils ont été développés qui permettent de cibler des constituants de la paroi végétale. Cette paroi, riche en polymères tels que des polysaccharides ou la lignine,

représente une cible de choix pour des applications en biologie végétale.

L'équipe d'Anderson a utilisé la CuAAC (« copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition ») dès 2012 afin de visualiser l'incorporation métabolique d'un analogue du fucose (Ac₄FucAl) dans un polysaccharide présent dans les parois végétales de plantules d'*Arabidopsis thaliana* [11]. Des expériences d'extraction et de caractérisation des composés fluorescents ont permis de montrer que le rapporteur chimique est principalement incorporé dans la pectine, et plus précisément dans le domaine rhamnogalacturonane I. La même équipe a reporté l'utilisation d'un analogue du Kdo portant une étiquette azoture (Kdo-N₃) dans la paroi de plantules d'*A. thaliana*, puis en le couplant à un alcyne porté par un fluorophore par CuAAC. Les auteurs ont démontré l'incorporation spécifique du Kdo-N₃ dans les chaînes rhamnogalacturonane II de la pectine [12], réalisant le premier double marquage sur cellules végétales pour visualiser la pectine, avec les rapporteurs de Ac₄FucAl et KdoN₃ au moyen de deux CuAAC consécutives.

Les expériences d'ingénierie métabolique (« metabolic oligosaccharide engineering », MOE) réalisées ces dernières années chez les végétaux ont permis d'étendre la gamme de rapporteurs mimant des monosaccharides disponibles pour l'étude de la régulation de la biosynthèse des glycanes. La stratégie du rapporteur chimique a été étendue à quelques autres biomolécules végétales, telles que l'auxine [13] ou encore la choline [14]. Elle s'est également révélée une méthode pertinente pour visualiser la lignine biosynthétisée *de novo*. Les équipes de Ralph et de Zhu ont publié de façon simultanée en 2014 l'utilisation d'analogues de l'alcool coniférylique afin de visualiser spécifiquement les zones actives de lignification des parois végétales [15-16].

À l'aide de trois rapporteurs chimiques mimant les trois monolignols (portant une étiquette distincte de type alcyne, azoture et méthylcyclopropène) composant la lignine, le groupe de Biot a comparé la distribution des différents rapporteurs lors d'un triple marquage impliquant trois réactions de ligation bioorthogonales (la CuAAC, la SPAAC et la DAinv) chez le lin (*Linum usitatissimum*) (figure 3).



Figure 2 - Marquage séquentiel de monosaccharides (ManNAc et Neu5Ac avec une étiquette alcyne) chez des fibroblastes humains. Les rapporteurs sont incorporés et couplés à un fluorophore par une réaction CuAAC permettant l'étude des voies de métabolisation.

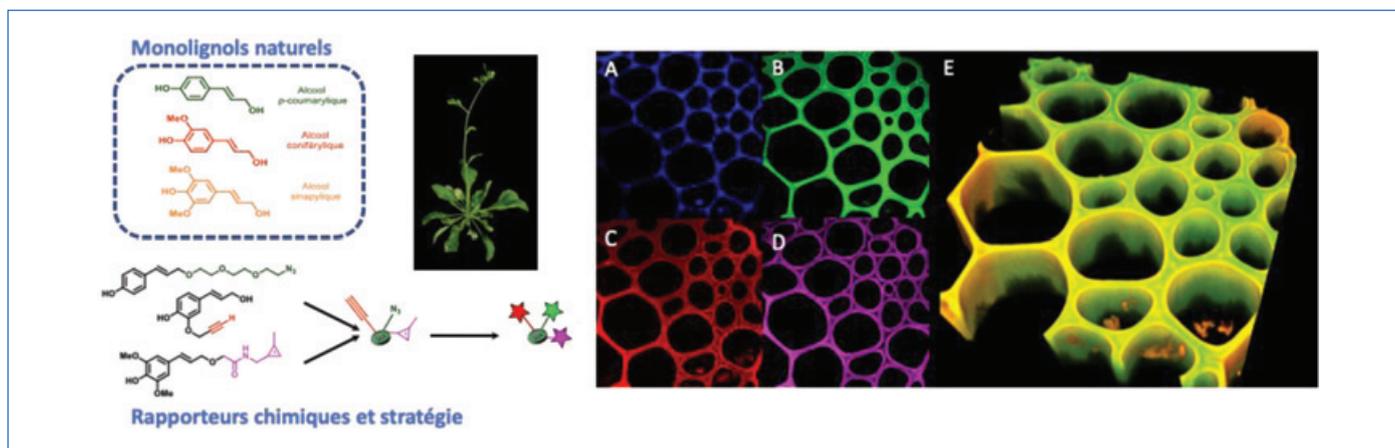


Figure 3 - Triple marquage de monolignols chez *Arabidopsis thaliana* au niveau des fibres interfasciculaires. Chaque rapporteur incorporé est couplé à son fluorophore respectif suivant la séquence 1.DAinv 2.SPAAC 3.CuAAC. A) Autofluorescence des lignines. B) Rapporteur de l'alcool p-coumaryle. (C) Rapporteur de l'alcool coniféryle. (D) Rapporteur de l'alcool sinapyle. (E) Reconstruction tridimensionnelle.

Cette technologie a permis de mettre en évidence la capacité des différentes couches pariétales à incorporer des monolignols étiquetés selon les stades de développement de la plante. De surcroît, cette stratégie est applicable à différents systèmes expérimentaux (sections végétales ou tiges entières) et transposable à d'autres espèces végétales (tabac, peuplier ou *A. thaliana*). Enfin, la détection simultanée de deux polymères pariétaux (lignine et polysaccharides non cellulose) a été réalisée [17-18].

Marquage de bactéries

Différents éléments de l'enveloppe bactérienne peuvent être ciblés par cette approche. La diversité des éléments présents dans cette enveloppe permet d'exploiter à la fois des précurseurs métaboliques non spécifiques (acides aminés ou monosaccharides présents dans les différents règnes du vivant), ou des précurseurs bactériens spécifiques (acides aminés de série D, monosaccharides spécifiques...). Ces approches ont permis de marquer les glycoprotéines de surface, les lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif (ou diderme-LPS), le peptidoglycane, la mycomembrane des corynébactéries et des mycobactéries (diderme-mycomembrane), ou encore les acides teichoïques [19].

Des travaux initiaux menés par Wang avaient montré l'incorporation de dérivés du fucose au sein des lipopolysaccharides de bactéries *Escherichia coli* génétiquement modifiées par introduction d'une voie métabolique permettant l'activation du fucose (« fucose salvage pathway »), voie qui normalement n'existe pas chez cette bactérie [20]. Les premières études de l'équipe de Vauzeilles appliquant une stratégie de MOE pour marquer le lipopolysaccharide de bactéries à Gram négatif sauvages ont exploité en 2012 un analogue azoture du Kdo (Kdo-N₃), permettant le marquage de la surface cellulaire [21], mais aussi l'enrichissement de bactéries spécifiques au sein d'un mélange de bactéries, en utilisant des billes magnétiques recouvertes de streptavidine [22] (figure 4a). Une approche similaire, ciblant désormais un sucre spécifique de *Legionella pneumophila* (acide légionaminique), a permis quant à elle de marquer ce pathogène afin de l'identifier dans des échantillons environnementaux (prélèvement d'eau susceptible d'être contaminée) [23] (figure 4b).

Une autre macromolécule bactérienne, le peptidoglycane, présent chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif

(ou monodermes) dont il constitue la paroi cellulaire, possède quant à lui des acides aminés de série D, assez rares en dehors du monde bactérien. Cette structure peut être ciblée avec des dérivés de D-alanine, porteurs eux aussi d'une fonction rapportrice de type azoture ou alcyne [24].

Les acides teichoïques sont également des constituants de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif qui peuvent être ciblés de manière semblable, par exemple chez *Streptococcus pneumoniae*, en utilisant cette fois-ci des dérivés de choline porteurs d'une fonction bioorthogonale [25].

Les mycobactéries et corynébactéries sont recouvertes d'une mycomembrane très dense, constituée notamment de tréhalose monomycolate (TMM) et dimycolate. Différents outils ont été développés par Guianvarc'h et Bourdreux pour sonder cette mycomembrane, dont récemment des rapporteurs bioorthogonaux basés sur un dérivé d'acide mycolique porteur d'un groupement alcyne terminal et greffé sur un tréhalose [26] (figure 4c).

Marquage de parasites

La stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal a également permis d'étudier différentes parasitoses. *Toxoplasma gondii* est un parasite intracellulaire obligatoire capable de provoquer des infections mortelles chez les individus immunodéprimés et les nouveau-nés. Les tachyzoïtes extracellulaires de *Toxoplasma* sont capables de métaboliser et d'incorporer des rapporteurs de N-acétylglucosamine comportant une étiquette azoture ou alcyne. Par combinaison avec des techniques de spectrométrie de masse, près de 90 protéines parasitaires uniques ont ainsi été identifiées [27]. L'utilisation de mime d'acide sialique portant une étiquette azoture a permis d'étudier d'un point de vue glycobiochimique la membrane trypanostigote de *Trypanosoma cruzi*, le protozoaire responsable de la maladie de Chagas. *Trypanosoma cruzi* ne synthétise pas d'acides sialiques *de novo*; aussi le rapporteur a été introduit à l'aide d'une trans-sialidase via un trisaccharide étiqueté. Non seulement des mucines ont été identifiées, mais également des protéines ancrées au glycosylphosphatidylinositol [28].

Dans le cas de contamination de souris par l'agent responsable du paludisme, des rapporteurs chimiques de galactose ayant une étiquette de type alcène terminal ont permis de mettre en évidence une entrée accrue de ceux-ci dans

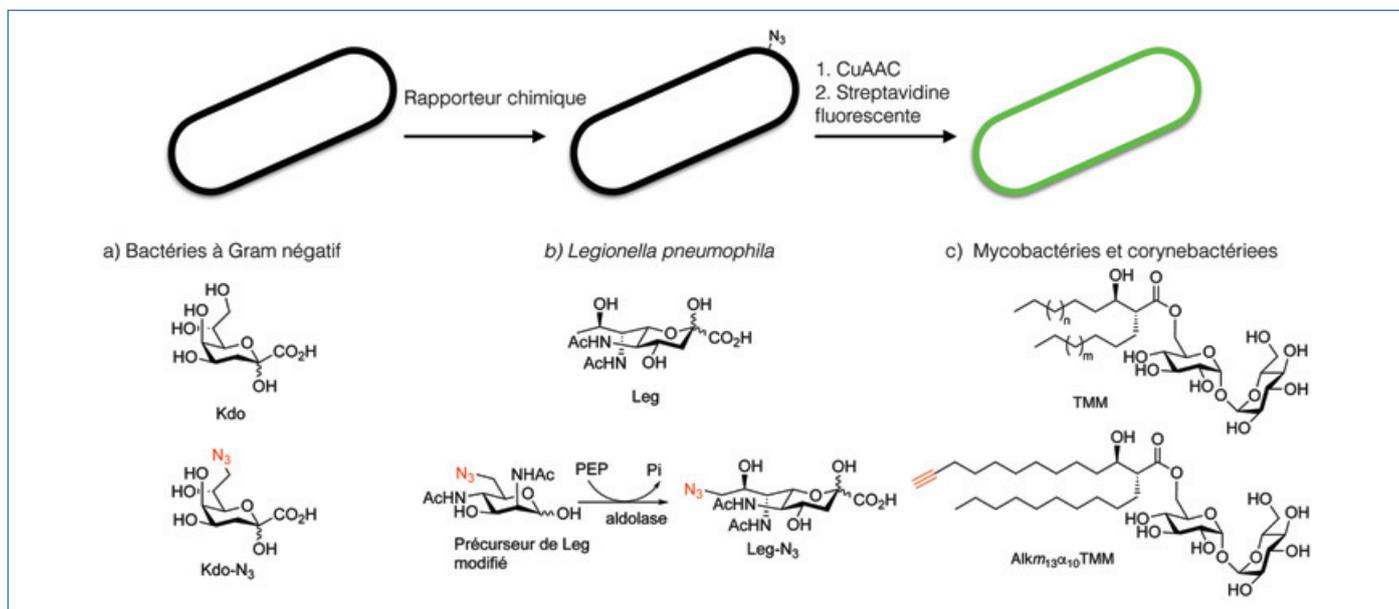


Figure 4 - Marquage spécifique a) de bactéries à Gram négatif avec un analogue azote de Kdo, b) de la bactérie pathogène *Legionella pneumophila* avec un analogue azote du précurseur de l'acide légionaminique (Leg), et c) de mycobactéries et corynebactéries avec un analogue alcyne de tréhalose monomycolate (TMM). Dans le cas de *Legionella pneumophila*, le rapporteur est transformé en acide légionaminique marqué puis incorporé au sein de lipopolysaccharides. Dans les trois exemples, une réaction de CuAAC permet de visualiser les bactéries par fluorescence.

des cellules hépatiques infectées par *Plasmodium berghei* par rapport aux cellules non infectées. Ces analogues non peracétylés sont transférés du moustique hôte au parasite. Cette étude a permis une meilleure compréhension des processus de glycosylation de *Plasmodium* [29].

Marquage de virus

Dès 1995, le groupe de Reutter avait montré qu'après incubation de différentes cellules avec des analogues de ManNAc (dont la chaîne carbonée a été allongée par rapport à l'acétamide naturelle : ManNProp, ManNBut et ManNPent) et incorporation de cette modification chimique dans les acides sialiques de surface, l'infection par trois différents papovavirus (LPV, BKV et SV4069) était inhibée [30].

Le marquage spécifique de cellules humaines infectées par le virus de l'herpès (*Herpes simplex virus 1*, HSV-1) a été réalisé avec un analogue porteur d'un alcyne vrai de la gemcitabine, antiviral nucléosidique. Cette molécule n'est pas un substrat de la thymidine kinase humaine et n'est donc pas phosphorylée par les cellules saines. Les cellules infectées par le HSV expriment la thymidine kinase du virus, peu spécifique. La molécule est donc phosphorylée, ce qui permet son entrée dans les voies métaboliques de la cellule hôte et son incorporation dans l'ADN, puis la révélation de cet ADN marqué par CuAAC [31-32].

Perspectives

La stratégie du rapporteur chimique bioorthogonal est devenue une approche multi-cible, permettant de marquer tous types de biomolécules dans les différents types d'organismes. Le développement de nouvelles réactions bioorthogonales conduit à la mise au point de nouveaux rapporteurs qui trouvent des développements originaux grâce à leur faible encombrement, leur robustesse ou encore leur vitesse de réaction. Initialement développés et valorisés par des chimistes, ces outils deviennent de plus en plus accessibles aux biologistes, au fur et à mesure de leur

commercialisation, et leur utilisation, couplée aux nouvelles technologies d'imagerie au sein de tissus ou *in vivo* permet d'étudier la dynamique de développement de certains organismes et trouve déjà des applications concrètes dans le diagnostic d'infections à *Mycobacterium tuberculosis* [33] ou la détection de *Legionella pneumophila* dans les installations industrielles ou chez les particuliers [23].

La microscopie de fluorescence pourrait être la technique d'imagerie quasi idéale pour étudier la dynamique d'objets vivants si elle était capable de séparer des détails dont la taille est inférieure à 250 nm. Pour augmenter la résolution spatiale malgré la limite de diffraction d'Abbe, il est possible d'utiliser des sondes photo-activables ou susceptibles de clignoter. Avec ces nouvelles techniques de super-localisation, les défis concernent la détection d'un signal provenant d'une infime quantité de sondes fluorescentes activées (microscopie de localisation de molécules uniques) [34].

Nous ne sommes probablement qu'aux balbutiements de cette chimie menée dans le vivant.

[1] L.D. Lavis, R.T. Raines, Bright building blocks for chemical biology, *ACS Chem. Biol.*, **2014**, *9*, p. 855-866.

[2] V. Rigolot, C. Biot, C. Lion, To view your Bioblecule, click inside the cell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*, p. 23084-105.

[3] C. Agatemor *et al.*, Exploiting metabolic glycoengineering to advance healthcare, *Nat. Rev. Chem.*, **2019**, *3*, p. 605-620.

[4] N. Nischan, J.J. Kohler, Advances in cell surface glycoengineering reveal biological function, *Glycobiology*, **2016**, *26*, p. 789-796.

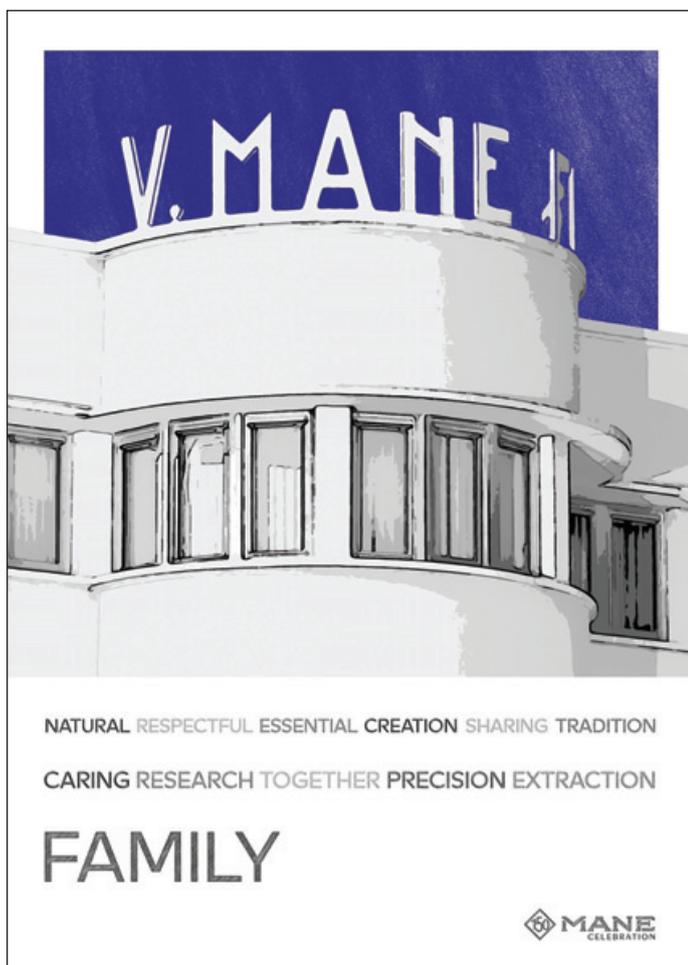
[5] P.R. Wratil, R. Horstkorte, W. Reutter, Metabolic glycoengineering with *N*-acyl side chain modified mannosamines, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, p. 9482-512.

[6] M. Sawa *et al.*, Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans *in vivo*, *PNAS*, **2006**, *103*, p. 12371-376.

[7] N.E. Mbua *et al.*, Abnormal accumulation and recycling of glycoproteins visualized in Niemann-pick type C cells using the chemical reporter strategy, *PNAS*, **2013**, *110*, p. 10207-212.

[8] P.A. Gilormini, *et al.*, Sequential bioorthogonal dual strategy: ManNAI and SiaNAI as distinct tools to unravel sialic acid metabolic pathways, *Chem. Commun.*, **2016**, *52*, p. 2318-2321.

[9] M. Bardor, D.H. Nguyen, S. Diaz, A. Varki, Mechanism of uptake and incorporation of the non-human sialic acid *N*-glycolylneuraminic acid into human cells, *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, p. 4228-237.



[10] P.A. Gilormini *et al.*, Chemical glycomics enrichment: imaging the recycling of sialic acid in living cells, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **2018**, *41*, p. 515-523.

[11] C.T. Anderson, I.S. Wallace, C.R. Somerville, Metabolic click-labeling with a fucose analog reveals pectin delivery, architecture, and dynamics in *Arabidopsis* cell walls, *PNAS*, **2012**, *109*, p. 1329-334.

[12] M. Dumont *et al.*, Plant cell wall imaging by metabolic click-mediated labelling of Rhamnogalacturonan II using azido 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid, *Plant J.*, **2016**, *85*, p. 437-447.

[13] J. Mravec *et al.*, Click chemistry-based tracking reveals putative cell wall-located auxin binding sites in expanding cells, *Sci. Rep.*, **2017**, *7*, 15988.

[14] J.M. Paper, T. Mukherjee, K. Schrick, Bioorthogonal click chemistry for fluorescence imaging of choline phospholipids in plants, *Plant. Methods*, **2018**, *14*, 31.

[15] Y. Tobimatsu *et al.*, A click chemistry strategy for visualization of plant cell wall lignification, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, p. 12262-265.

[16] N. Bukowski *et al.*, Development of a clickable designer monolignol for interrogation of lignification in plant cell walls, *Bioconjug. Chem.*, **2014**, *25*, p. 2189-196.

[17] C. Lion *et al.*, BLISS: a bioorthogonal dual-labeling strategy to unravel lignification dynamics in plants, *Cell Chem. Biol.*, **2017**, *24*, p. 326-338.

[18] C. Simon *et al.*, One, two, three: a bioorthogonal triple labelling strategy for studying the dynamics of plant cell wall formation in vivo, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*, p. 16665-671.

[19] D. Guianvarc'h, Y. Bourdreux, C. Biot, B. Vauzeilles, Metabolic labeling of bacterial glycans, in *Comprehensive Glycoscience*, 2nd ed., J. Barchi (ed.), Elsevier, **2021**, vol. 3, p. 303-328.

[20] W. Yi *et al.*, Remodeling bacterial polysaccharides by metabolic pathway engineering, *PNAS*, **2009**, *106*, p. 4207-212.

[21] A. Dumont, A. Malleron, M. Awwad, S. Dukan, B. Vauzeilles, Click-mediated labeling of bacterial membranes through metabolic modification of the lipopolysaccharide inner core, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, p. 3143-146.

[22] E. Fugier *et al.*, Rapid and specific enrichment of culturable gram negative bacteria using non-lethal copper-free click chemistry coupled with magnetic beads separation, *PLoS ONE*, **2015**, *10*, e0127700.

[23] J. Mas Pons *et al.*, Identification of living *Legionella pneumophila* using species-specific metabolic lipopolysaccharide labeling, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, p. 1275-278.

[24] E. Kuru *et al.*, In situ probing of newly synthesized peptidoglycan in live bacteria with fluorescent D-amino acids, *Angew. Chem.*, **2012**, *124*, p. 12687-691.

[25] A.M. Di Guilmi *et al.*, Specific and spatial labeling of choline-containing teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* by click chemistry, *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, p. 10572-575.

[26] E. Lesur *et al.*, First access to a mycolic acid-based bioorthogonal reporter for the study of the mycomembrane and mycoloyltransferases in *Corynebacteria*, *Chem. Commun.*, **2019**, *55*, p. 13074-077.

[27] L.A. Nazarova, R.J. Ochoa, K.A. Jones, N.S. Morrissette, J.A. Prescher, Extracellular toxoplasma gondii tachyzoites metabolize and incorporate unnatural sugars into cellular proteins, *Microb. Infect.*, **2016**, *18*, p. 199-210.

[28] A.B. Lantos *et al.*, Sialic acid glycobiochemistry unveils *Trypanosoma cruzi* trypanostigote membrane physiology, *PLoS Pathog.*, **2016**, *12*, e1005559.

[29] A. Kitowski, G.J.L. Bernardes, A sweet galactose transfer: metabolic oligosaccharide engineering as a tool to study glycans in *Plasmodium* infection, *ChemBioChem*, **2020**, *21*, p. 2696-700.

[30] O.T. Keppler *et al.*, Biosynthetic modulation of sialic acid-dependent virus-receptor interactions of two primate polyoma viruses, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, p. 1308-314.

[31] A.B. Neef, L. Pernot, V.N. Schreier, L. Scapozza, N.W. Luedtke, A bioorthogonal chemical reporter of viral infection, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, p. 7911-914.

[32] T. Heise *et al.*, Metabolic oligosaccharide engineering with alkyne sialic acids confers neuraminidase resistance and inhibits influenza reproduction, *Bioconjug. Chem.*, **2017**, *28*, p. 1811-815.

[33] M. Kamariza *et al.*, Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum with a solvatochromic trehalose probe, *Sci. Transl. Med.*, **2018**, *10*, eaam6310.

[34] C. Gabriel *et al.*, Combining 3D single molecule localization strategies for reproducible bioimaging, *Nature Commun.*, **2019**, *10*, 1980.

Christophe BIOT,

Professeur à l'Université de Lille, CNRS, UMR 8576, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), Lille.

Boris VAUZEILLES,

Directeur de recherche CNRS, Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR 2301, Gif-sur-Yvette.

* christophe.biot@univ-lille.fr ; boris.vauzeilles@cnrs.fr

EFMC Honorary Fellows, Awards & Prizes 2022

Call for nominations

Deadline: January 31, 2022

The awards ceremony will take place during the XXVII EFMC International Symposium on Medicinal Chemistry (EFMC-ISM2022), scheduled to take place in Nice (France) on September 4-8, 2022.

• www.efmc.info/news-activities-medicinal-chemistry



EUROPEAN FEDERATION
FOR MEDICINAL CHEMISTRY
AND CHEMICAL BIOLOGY

Les vecteurs peptidiques, GPS du principe actif

Résumé Les vecteurs peptidiques ont reçu beaucoup d'attention ces dernières années, notamment afin d'améliorer le ciblage de tissus, de cellules ou autres macromolécules comme le font très bien nos anticorps. Ils permettent de véhiculer des composés cytotoxiques et/ou des agents de détection, et de ce fait peuvent améliorer certains traitements contre des pathologies pour lesquelles les traitements existants ont des effets indésirables.

Avec l'émergence de la chémobiologie, l'exploration de certaines fonctions biologiques, notamment les phénomènes de reconnaissances cellulaires, ont permis de synthétiser de nouveaux systèmes moléculaires conçus pour se diriger sélectivement vers une cible biologique (épitope, récepteur cellulaire, protéine circulante) à l'image de nos anticorps circulants.

Ainsi depuis deux décennies, les protocoles thérapeutiques en oncologie bénéficient de traitements plus ciblés (« targeted therapy ») améliorant le pronostic des patients. À l'instar des systèmes biologiques, les nouveaux composés moléculaires comportent un ou des éléments de reconnaissance, « assistant de navigation GPS », amenant par exemple le principe actif spécifiquement dans les cellules cancéreuses, en s'affranchissant ainsi d'une diffusion dans les cellules saines. Les éléments utilisés pour le ciblage tumoral permettent d'atteindre la zone tumorale par deux voies distinctes, principalement le ciblage passif bénéficiant d'une porosité au niveau du micro-environnement tumoral et qui utilise par exemple les nanoparticules, et le ciblage actif exploitant la surexpression de certaines protéines par la tumeur ou son environnement proche et qui utilise des anticorps monoclonaux ou autres molécules de ciblage. Le choix du système de ciblage va ainsi fortement dépendre de la cible.

Parmi les différents éléments de ciblage, les vecteurs peptidiques constituent une classe de molécules très attractive, que ce soit pour leur accès facile par synthèse chimique, leurs propriétés intrinsèques compatibles avec le vivant, ou leur coût de production inférieur à ceux des anticorps monoclonaux utilisés aujourd'hui pour certaines thérapies. À ce jour,

de nombreux peptides de pénétration cellulaire (« cell-penetrating peptide », CPP) et ligands peptidiques (« cell-targeting peptides », CTP) ont été développés notamment pour la délivrance de cargos – biomolécules (acides nucléiques, protéines) et drogues à des fins thérapeutiques –, ou fluorophores et agents de contraste à des fins diagnostiques [1]. Une problématique concernant les CPP est leur faible exploitation *in vivo* malgré leur fort potentiel *in vitro*. Leur nature polycationique leur confère une efficacité accrue pour délivrer des cargos au niveau cellulaire mais généralement de manière non spécifique.

Pour pallier ce problème, plusieurs approches ont été développées en exploitant les caractéristiques de certaines cellules cancéreuses, notamment la libération de métalloprotéases (MMP) dégradant la matrice extracellulaire. Le groupe de Roger Tsien a ainsi préparé des macromolécules peptidiques composées d'un CPP polycationique relié à un fragment peptidique polyanionique *via* une séquence peptidique sensible à une MMP. Ce composé inactif est activé après coupure enzymatique libérant le masque polyanionique [2] (figure 1A). Une autre caractéristique tumorale qui a été exploitée pour activer un CPP est son environnement acide dû à une adaptation métabolique de la cellule cancéreuse libérant de l'acide lactique. De ce fait, considérant que les amides β -carboxyliques sont stables à pH neutre mais rapidement hydrolysées à pH acide pour régénérer les amines correspondantes, les résidus lysine de certains CPP protégés par ces fonctions amide peuvent être déprotégés au niveau de la tumeur et déclencher la pénétration du CPP [3] (figure 1B). D'autres stratégies ont été développées pour activer/libérer les CPP sur le site tumoral telles que l'utilisation d'une source

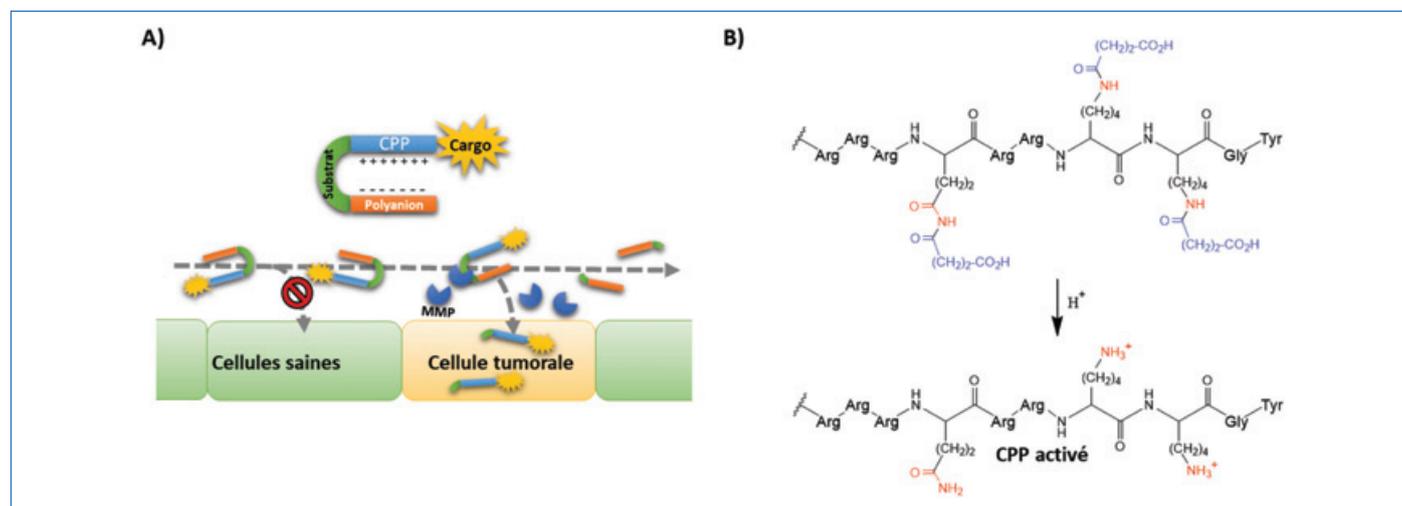


Figure 1 - A) Pénétration cellulaire d'un cargo induite par un CPP polycationique après coupure enzymatique de sa partie polyanionique par une MMP [2]. B) Activation d'un CPP par acidolyse au niveau du milieu tumoral [3].

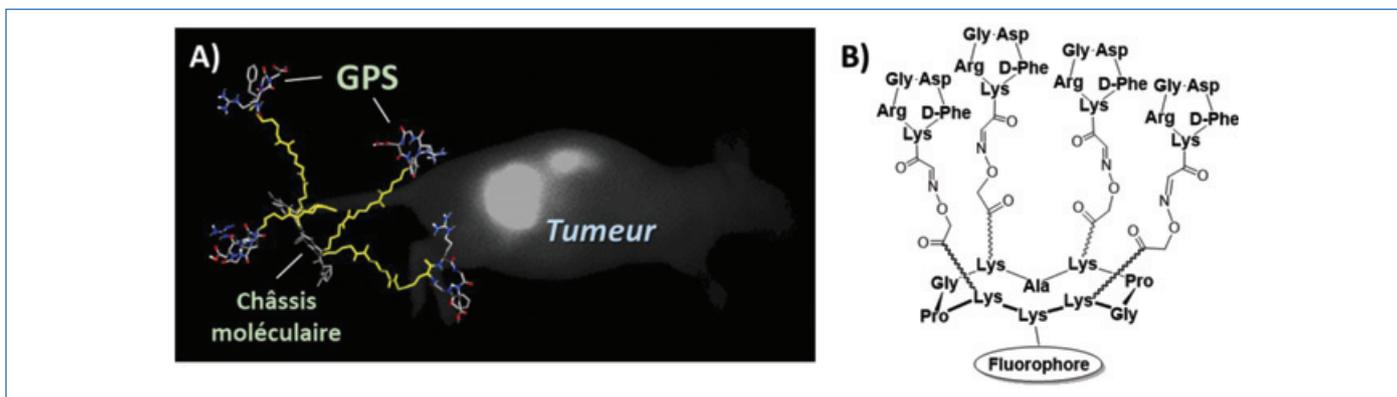


Figure 2 - A) Imagerie non invasive à 5 h d'une souris nude porteuse d'une tumeur sous-cutanée IGROV1 et traitée par 10 nmol d'un vecteur peptidique tétra RGD. B) Structure d'un vecteur présentant quatre motifs RGD.

lumineuse qui peut engendrer la coupure d'un lien amide, ester ou carbamate [4].

A contrario, les CTP ou ligands peptidiques permettent d'adresser un cargo directement vers sa cible cellulaire. La sélectivité provient alors d'une surexpression d'un récepteur cellulaire présent au niveau de la tumeur et absent sur les tissus sains. Depuis une vingtaine d'années, quelques CTP ont été développés [1a, c]. Les plus exploités, suite aux travaux du groupe d'Erkki Ruoslahti [5], sont des peptides contenant la séquence « RGD » (-Arg-Gly-Asp-) qui permettent de cibler avec une très bonne efficacité et spécificité un récepteur transmembranaire, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, surexprimé au sein du micro-environnement tumoral. De nombreux exemples ont été décrits dans la littérature avec beaucoup de développements visant à optimiser la sélectivité et l'affinité du motif de reconnaissance RGD [6] et à concevoir des bras espaceurs (linkers) auto-immolables conçus pour contrôler la libération du cargo [7]. Par ailleurs, des conjugués peptidiques présentant plusieurs ligands RGD confèrent une augmentation de l'affinité de liaison avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, mais également une augmentation de l'internalisation dans la cellule cible, et par conséquent ils peuvent améliorer le diagnostic par imagerie et/ou la régression tumorale [8].

Dans ce contexte, notre équipe a développé des macromolécules constituées d'un châssis moléculaire polyfonctionnel (cyclodécapeptide) pouvant présenter jusqu'à quatre ligands peptidiques RGD et un élément de détection et/ou cytotoxique [9] (figure 2). La flexibilité de notre approche permet de réaliser des composés dotés d'une grande efficacité et pouvant délivrer des molécules anticancéreuses très puissantes telles que la cryptophicine [10], ou encore des radio-isotopes à visée thérapeutique [11]. Pour réaliser ces macromolécules complexes et de poids moléculaires modérés (1 000-4 000 kDa), le chimiste a besoin de réactions efficaces et compatibles avec les milieux aqueux nécessaires à la solubilisation des biomolécules. Pour ce faire, la combinaison de tous les éléments fonctionnels (ligands, drogues, marqueurs, châssis moléculaires, bras espaceurs) est réalisée *via* une approche convergente en utilisant des ligations moléculaires chimiosélectives et orthogonales telles que des liens du type oxime, thioéther, disulfure ou par réaction CuAAC (« copper-catalysed azide alkyne cycloaddition ») [12].

Le développement concomitant d'une chimie plus performante et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques

est en constante progression : elle permet de développer de nouveaux vecteurs synthétiques afin de remédier à certains problèmes liés aux anticorps monoclonaux tels qu'une procédure biotechnologique coûteuse et une taille importante limitant leur accès aux tumeurs solides. La plupart de ces vecteurs peptidiques (à l'exception des vecteurs RGD) sont encore à des stades très précoces de développement, mais certains trouveront sans nul doute dans un futur proche une place dans un arsenal thérapeutique en pleine évolution.

- [1] a) E. Vivès, J. Schmidt, A. Pèlerin, Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery, *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**, *1786*, p. 126-138 ; b) A. Walrant, S. Cardon, F. Burlina, S. Sagan, Membrane crossing and membranotropic activity of cell-penetrating peptides: dangerous liaisons?, *Acc. Chem. Res.*, **2017**, *50*, p. 2968-975 ; c) S. Shah, N. Casanova, G. Antuono, D. Sabatino, Polyamide backbone modified cell targeting and penetrating peptides in cancer detection and treatment, *Front. Chem.*, **2020**, *8*, 218.
- [2] T. Jiang, E.S. Olson, Q.T. Nguyen, M. Roy, P.A. Jennings, R.Y. Tsien, Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, p. 17867-872.
- [3] E. Jin, B. Zhang, X. Sun, Z. Zhou, X. Ma, Q. Sun, J. Tang, Y. Shen, E. Van Kirk, W.J. Murdoch, M. Radosz, Acid-active cell-penetrating peptides for in vivo tumor-targeted drug delivery, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, p. 933-940.
- [4] H. de Jong, K.M. Bongers, D.W.P.M. Löwik, Activatable cell-penetrating peptides: 15 years of research, *RSC Chem. Biol.*, **2020**, *1*, p. 192-203.
- [5] E. Ruoslahti, M.D. Pierschbacher, New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins, *Science*, **1987**, *238*, p. 491-497.
- [6] B. S. Ludwig, H. Kessler, S. Kossatz, U. Reuning, RGD-binding integrins revisited: how recently discovered functions and novel synthetic ligands (re-)shape an ever-evolving field, *Cancers*, **2021**, *13*, 1711.
- [7] L. Battistini, K. Bugatti, A. Sartori, C. Curti, F. Zanardi, RGD peptide-drug conjugates as effective dual targeting platforms: recent advances, *Eur. J. Org. Chem.*, **2021**, *17*, p. 2506-528.
- [8] H. Chen, G. Niu, H. Wu, X. Chen, Clinical application of radiolabeled RGD peptides for PET imaging of integrin $\alpha_v\beta_3$, *Theranostics*, **2016**, *6*, p. 78-92.
- [9] D. Boturny, J.-L. Coll, E. Garanger, M.-C. Favrot, P. Dumy, Template assembled cyclopeptides as multimeric system for integrin targeting and endocytosis, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, p. 5730-739.
- [10] A. Borbély, F. Thoreau, E. Figueras, M. Kadri, J.-L. Coll, D. Boturny, N. Sewald, Synthesis and biological characterization of monomeric and tetrameric RGD-cryptophycin conjugates, *Chem. Eur. J.*, **2020**, *26*, p. 2602-605.
- [11] Z.-H. Jin, D. Boturny *et al.*, Radiotherapeutic agent ^{64}Cu -cyclam-RAFT-c-(RGDFK) $_4$ for management of peritoneal metastasis in ovarian cancer, *Clin. Cancer Res.*, **2020**, *26*, p. 6230-241.
- [12] M. Galibert, O. Renaudet, P. Dumy, D. Boturny, Access to biomolecular assemblies via one-pot triple orthogonal chemoselective ligations, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, p. 1901-904.

Didier BOTURYN,

Directeur de recherche, Université Grenoble Alpes, CNRS,
Département de Chimie Moléculaire, UMR 5250, Grenoble.

* didier.boturny@univ-grenoble-alpes.fr

Acides nucléiques modifiés comme outils en chimobiologie

Résumé L'ADN et l'ARN sont surtout connus pour leurs rôles dans le codage de l'information génétique et de support intermédiaire dans la synthèse de protéines. Toutefois, ces deux types de biopolymères sont couramment utilisés dans des applications qui dévient fortement de leurs fonctions biologiques principales. Cet article décrit succinctement les progrès en synthèse d'oligonucléotides et leurs versions modifiées et quelques applications en chimobiologie.

Les acides nucléiques (ADN et ARN) sont des biopolymères dont l'importance biologique ne doit pas être soulignée davantage ici. Constitués de monomères appelés nucléotides – eux-mêmes formés d'un hétérocycle (nucléobase) et d'un sucre (2'-désoxyribose dans l'ADN et ribose dans l'ARN) –, rattachés par des liaisons phosphodiester, les acides nucléiques forment des chaînes qui peuvent adopter une structure en double hélice, comme c'est le cas pour l'ADN. L'importance biologique des acides nucléiques, leur nature chimique relativement simple, les règles de leur appariement clairement définies ainsi que leur capacité d'amplification enzymatique ont rapidement attiré l'attention en vue de leur application comme outils en chimobiologie, ainsi que pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques. Toutefois, les acides nucléiques naturels présentent certains inconvénients, comme une faible stabilité *in vivo* et un nombre très restreint de groupes fonctionnels capables d'intervenir dans des interactions avec des protéines ou d'autres biomolécules. Il n'est donc guère surprenant que la modification chimique des acides nucléiques ait pris son essor au début des années 1990. Dans cet article, les principales méthodes existantes ainsi que leurs bénéfices sont résumées succinctement en se concentrant particulièrement sur la modification d'une classe d'acides nucléiques appelés aptamères.

Les premières modifications chimiques visaient à façonner des oligonucléotides antisens (ASO) capables de contrôler la régulation et l'expression des gènes en bloquant spécifiquement des portions de l'ARN messager (figure 1).

En effet, les oligonucléotides ASO vont se lier spécifiquement à une séquence ARN messager cible et agir par le biais de deux mécanismes principaux :

- le duplex hybride formé entre l'ASO et l'ARN messager est reconnu par une enzyme de la famille des RNases H qui va

- spécifiquement dégrader le brin ARN du duplex formé et de ce fait empêcher la traduction en protéine ;

- la présence de l'ASO sur l'ARN messager va bloquer la liaison et la reconnaissance par des complexes de protéines de liaison à l'ARN tels que les sous-unité ribosomales.

Toutefois, des oligonucléotides ASO composés d'ARN ou d'ADN naturels n'ont que peu d'utilité thérapeutique car ils ne pourront pas atteindre leurs cibles du fait de leur stabilité très restreinte dans des matrices biologiques. Afin d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques, il est nécessaire d'ajouter des modifications chimiques. Celles-ci permettront non seulement de stabiliser les ASO contre la dégradation par les nucléases, mais également de favoriser leur internalisation dans les cellules et/ou d'améliorer leur sélectivité pour leur cible ARN messager [1a].

De ce fait, de nombreuses modifications ont été introduites notamment au niveau du sucre (par exemple « locked nucleic acids » (LNA) et 2'-OME, figure 2b), de la liaison phosphodiester (par exemple les phosphorothioates, figure 2c) et parfois même au niveau de la nucléobase (5-méthyl-2'-désoxycytosine 5-méthyl-dC, figure 2a). Ces stratégies ont permis de développer après une trentaine d'années de recherche neuf médicaments approuvés par la FDA dont l'ASO nusinersen (Spinraza) pour le traitement de la maladie rare amyotrophie spinale antérieure [1b].

La stratégie antisens a été rejointe par d'autres approches thérapeutiques visant à contrôler l'expression des gènes comme les ARN interférents ou la technologie Crispr-Cas 9, ce qui a conduit à un fort développement de la chimie des acides nucléiques. Plus récemment, l'ajout de nucléotides modifiés tels que la N1-méthylpseudouridine (figure 3) dans les vaccins à ARN messager a permis d'améliorer leur traduction en protéine cible tout en réduisant leur immunogénicité [2].

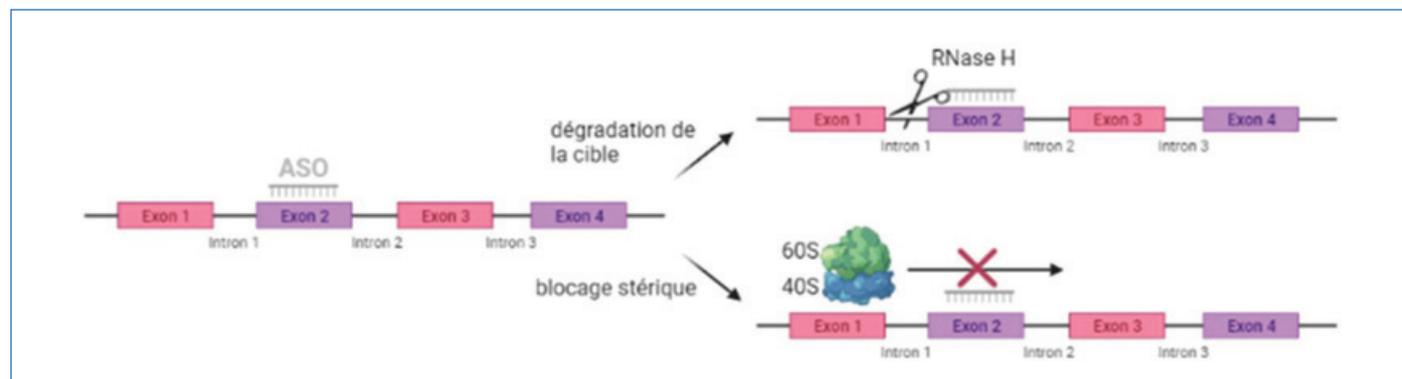


Figure 1 - Principes et mécanismes d'action d'oligonucléotides thérapeutiques du type antisens (ASO). Une fois que l'ASO s'est apparié à sa cible ARN messager par formation de paires de base Watson-Crick, il peut induire une dégradation de la cible par le biais de recrutement d'enzymes de la famille des RNases H ou bloquer la synthèse peptidique par blocage stérique.

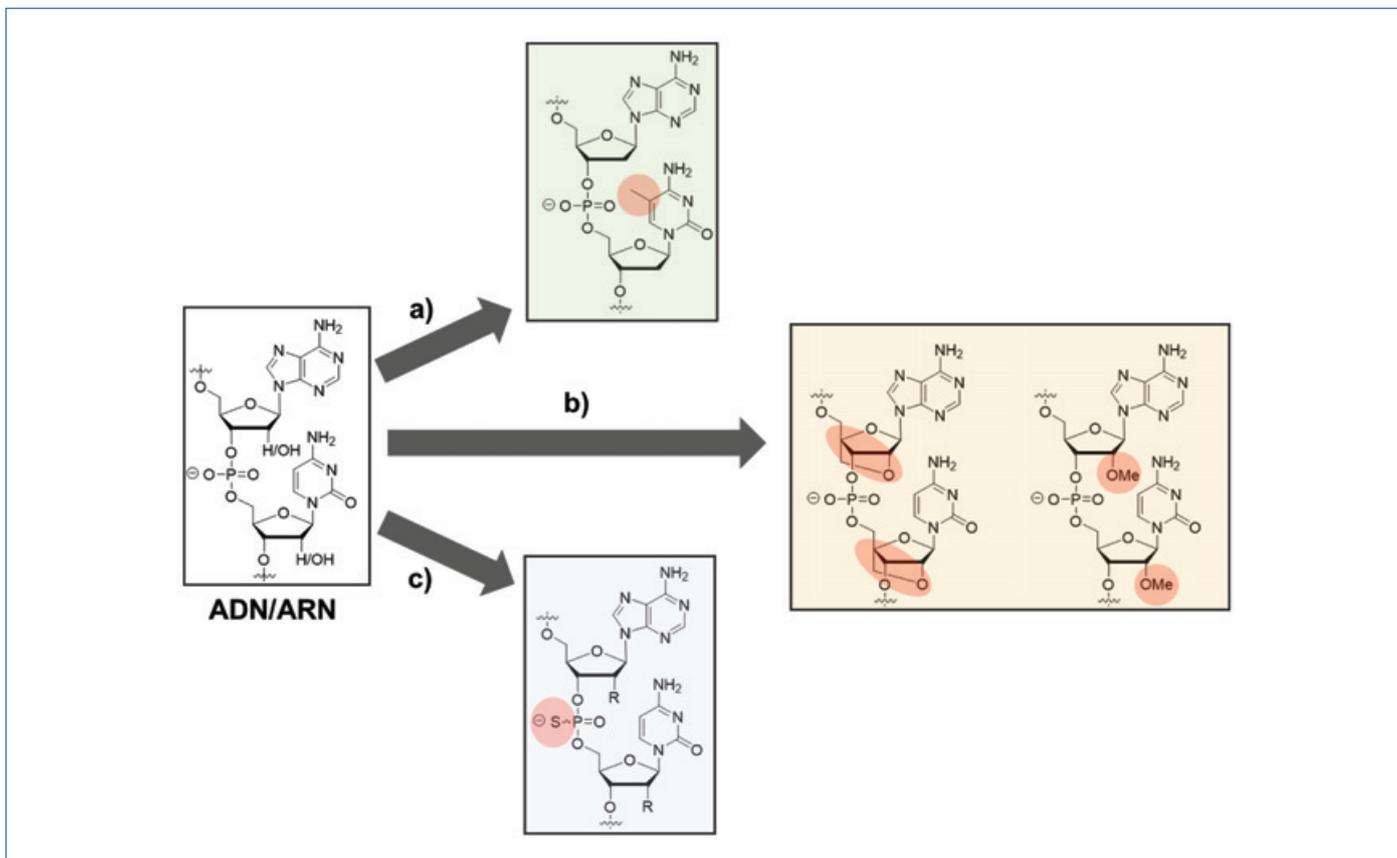


Figure 2 - Modification chimique des acides nucléiques pour augmenter leur biostabilité et leur capacité à agir en tant qu'agent antisens. Modification a) de la nucléobase (5-méthyl-dC), b) du sucre (LNA et 2'-OMe, respectivement), et c) de la liaison phosphodiester (phosphorothioates).

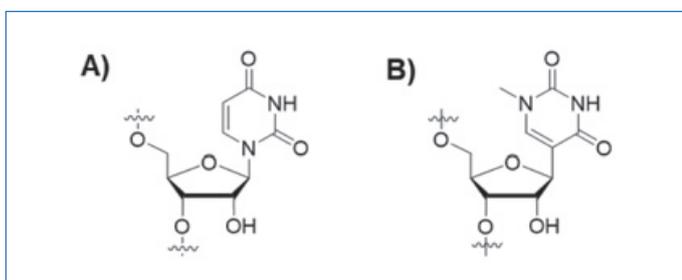


Figure 3 - Structures chimiques de A) l'uridine et B) la N1-méthylpseudouridine.

Bien que la modification chimique des acides nucléiques soit née dans le cadre du développement de nouveaux agents thérapeutiques, cette stratégie a été largement appliquée à d'autres types d'oligonucléotides, ce qui a permis d'étendre le champ d'applications de l'ADN et de l'ARN à des domaines tels que les tests de diagnostics et bio-analytiques, la construction de nanostructures, ou même la catalyse chimique.

La synthèse d'acides nucléiques modifiés peut se faire de manière chimique en utilisant des monomères activés (phosphoramidites) dans des procédés automatisés de synthèse sur support solide, ou par des méthodes chimio-enzymatiques impliquant des nucléosides triphosphates modifiés. Cette dernière technique de polymérisation de nucléotides triphosphates (éventuellement modifiés) permet d'accéder à des séquences sans réelle limitation de longueur ainsi qu'à des techniques de sélection *in vitro* de type SELEX (« systematic evolution of ligands by exponential enrichment »). Cette méthode d'évolution moléculaire est particulièrement intéressante car elle permet de cribler des milliers

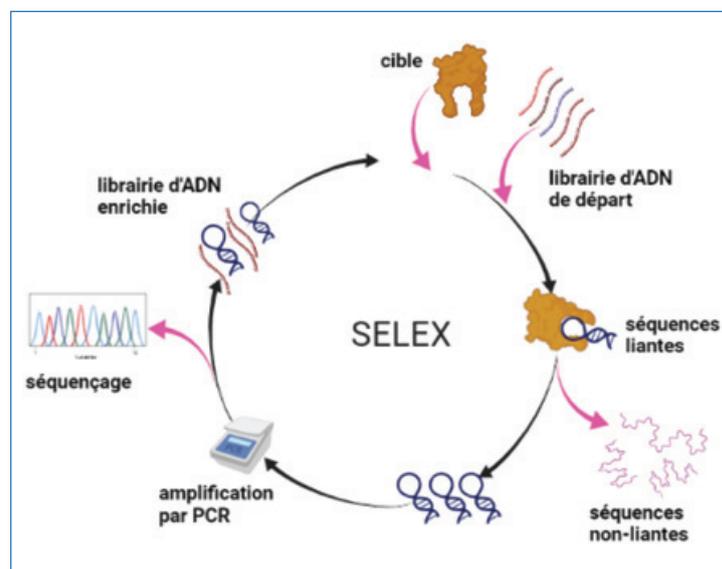


Figure 4 - Représentation schématique du fonctionnement de la technique SELEX. Une bibliothèque d'ADN est incubée avec la cible d'intérêt. Après séparation, les séquences non liantes sont éliminées et les séquences capables de se lier à la cible sont récupérées et amplifiées par PCR. La bibliothèque enrichie en séquences liantes est ensuite soit utilisée dans des cycles de SELEX additionnels ou directement séquencée.

de molécules d'acides nucléiques (typiquement de l'ordre de 10^{13} molécules individuelles) simultanément pour leur capacité à se lier à des cibles d'intérêt (figure 4). Les molécules qui sont isolées à la fin de ce criblage sont appelées aptamères et sont donc des molécules d'ADN ou d'ARN (simple brin) capables de se lier à des cibles avec haute spécificité et affinité [3].

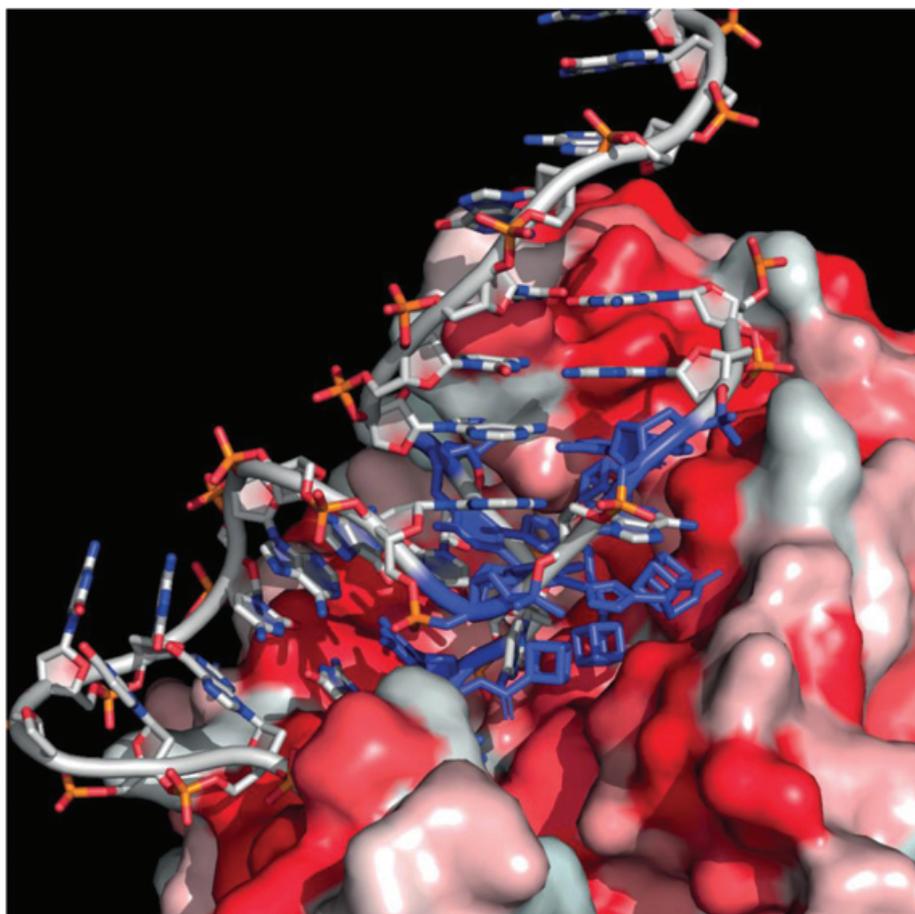


Figure 5 - Structure RX de l'aptamère modifié avec des entités cubane capable de se lier à la lactate déshydrogénase de *P. vivax*, un biomarqueur du paludisme.

Les aptamères, souvent considérés comme l'équivalent des anticorps, ont trouvé de nombreuses applications, surtout pour le développement de tests de diagnostic et d'agents thérapeutiques. Ils sont utilisés par exemple dans des plateformes protéomiques pour la détection de biomarqueurs de maladies dans le sérum ou le plasma humain [4], ainsi que dans des tests de diagnostic pour la détection de virus tels que le SARS-CoV-2 [5]. Comme pour d'autres oligonucléotides thérapeutiques, l'incorporation de groupes fonctionnels par le biais de nucléotides triphosphates modifiés permet d'accroître la stabilité et le temps de résidence des aptamères, mais également leur capacité à se lier à des cibles auxquelles les aptamères naturels ne peuvent pas se fixer telles que les glycoprotéines ou les protéines présentant de faibles points iso-électriques ($\text{pH} < 7$) [6].

Dans notre groupe de recherche, nous suivons cette approche pour générer des aptamères modifiés en vue de leur application dans le domaine du diagnostic, de la thérapie ciblée, ainsi que de la création de biocapteurs. Dans un exemple récent qui illustre parfaitement cette stratégie, nous avons employé des nucléotides équipés d'unité cubane, un isostère du benzène, pour isoler un aptamère capable de se lier avec haute spécificité à un biomarqueur du paludisme pour le développement de tests de diagnostics pour la détection de cette maladie infectieuse (figure 5) [7]. Cet aptamère est non seulement capable de reconnaître la protéine cible, à savoir la lactate déshydrogénase du parasite *P. vivax*, mais la distingue de celle de *P. falciparum* malgré une forte homologie de séquence. Cette haute spécificité résulte de la formation

d'une poche hydrophobe créée par quatre résidus cubane capable d'interagir directement avec un exosite particulier de la protéine combiné avec la formation d'un pont hydrogène $\text{C-H}\cdots\text{O}$ entre un carbonyle d'un acide aminé avec une liaison C-H d'une unité cubane [7].

La modification chimique des acides nucléiques est une stratégie versatile qui permet d'améliorer les propriétés biologiques et fonctionnelles de l'ADN et de l'ARN. Initialement conçue pour développer des agents thérapeutiques à base d'oligonucléotides, notamment les ASO, cette méthode s'est rapidement propagée à d'autres types d'oligonucléotides tels que les aptamères en vue de leur utilisation dans de nombreuses et diverses applications. Il est prévisible que cette méthode se propagera à de nouveaux domaines comme le stockage d'informations dans l'ADN, la synthèse enzymatique contrôlée, l'amélioration de l'efficacité et de la stabilité de vaccins ARN messagers, la création des nouveaux outils pour la chimobiologie, ou la mise au point de tests de diagnostic ou des méthodes de séparation.

- [1] a) Q. Laurent, R. Martinet, D. Moreau, N. Winssinger, N. Sakai, S. Matile, Oligonucleotide phosphorothioates enter cells by thiol-mediated uptake, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*, p. 19102-106; b) S.T. Croke, P.P. Seth, T.A. Vickers, X.-H. Liang, The interaction of phosphorothioate-containing RNA targeted drugs with proteins is a critical determinant of the therapeutic effects of these agents, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*, p. 14754-771.
- [2] K.D. Nance, J.L. Meier, Modifications in an emergency: the role of N1-methylpseudouridine in COVID-19 vaccines, *ACS Cent. Sci.*, **2021**, *7*, p. 748-756.
- [3] M. Debais, A. Lelièvre, M. Smietana, S. Müller, Splitting aptamers and nucleic acid enzymes for the development of advanced biosensors, *Nucleic Acids Res.*, **2020**, *48*, p. 3400-422.
- [4] B.B. Sun *et al.*, Genomic atlas of the human plasma proteome, *Nature*, **2018**, *558*, p. 73-79.
- [5] Z. Zhang, L. Soleymani, J.D. Brennan, Y. Li *et al.*, High affinity dimeric aptamers enable rapid electrochemical detection of wild-type and B.1.1.7 SARS-CoV-2 in unprocessed saliva, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*, p. 24266-274; A. Schmitz, M. Famulok, G. Mayer *et al.*, A SARS-CoV-2 spike binding DNA aptamer that inhibits pseudovirus infection by an RBD-independent mechanism, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*, p. 10279-285.
- [6] L.K. McKenzie, R. El-Khoury, J.D. Thorpe, M.J. Damha, M. Hollenstein, Recent progress in non-native nucleic acid modifications, *Chem. Soc. Rev.*, **2021**, *50*, p. 5126-164.
- [7] Y.-W. Cheung *et al.*, Evolution of abiotic cubane chemistries in a nucleic acid aptamer allows selective recognition of a malaria biomarker, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2020**, *117*, p. 16790-798.

Marcel HOLLENSTEIN,

Chargé de recherche expert, Département de Biologie structurale et chimie, Institut Pasteur, Paris.

* marcel.hollenstein@pasteur.fr

Des protéines de synthèse taillées sur mesure pour investiguer le vivant

Résumé La montée en puissance de la synthèse chimique de protéines alliée à la diversité moléculaire offerte par la chimie organique en fait un outil inédit pour décrypter des phénomènes biologiques et, au-delà, pour accéder à une large palette de propriétés. Cet article décrit un état des lieux de ce domaine illustré par des réalisations récentes d'équipes françaises ainsi qu'une mise en perspective discutant les prochains verrous à lever.

Depuis la synthèse des premiers dipeptides par Curtius et Fischer [1], les protéines ont constitué un objectif fascinant pour des générations de chimistes. Cinquante ans de développements méthodologiques ont été nécessaires pour aboutir en 1954 à la synthèse d'une hormone bioactive de neuf acides aminés, l'ocytocine [2] (figure 1). En 1971, la synthèse d'une enzyme, la ribonucléase A (124 acides aminés), a été réalisée par Merrifield [3] en enchaînant 248 réactions sur un support insoluble. Ce tour de force a démontré la grande efficacité de la synthèse de peptides en phase solide (SPPS), qui est aujourd'hui un outil classique pour la synthèse automatisée de peptides composés de quelques dizaines d'acides aminés. Le dernier jalon marquant de cette épopée scientifique est l'invention du concept de « ligation chimique native », pour lequel des réactions chimiques sélectives sont mises en œuvre pour coupler des segments non protégés obtenus par SPPS ou biotechnologie.

La « native chemical ligation » (NCL) [4-5], découverte il y a vingt-cinq ans, reste de loin la réaction la plus utilisée pour la synthèse de protéines [6]. Elle est basée sur une réaction de trans-thioestérification entre un résidu cystéine N-terminal d'un peptide (rouge) avec un thioester C-terminal d'un autre peptide (bleu), suivi d'un réarrangement (transfert d'acyle intramolécule) pour obtenir la liaison amide native (figure 2A). Elle a permis l'accès à des cibles de plus de 300 acides aminés [7] et a ouvert une voie inédite pour la synthèse parfaitement contrôlée de protéines natives, ou modifiées spécifiquement au niveau de leur squelette ou de certaines chaînes latérales. En ce sens, l'approche « chimique »

de la synthèse de protéines vient compléter les méthodes biotechnologiques exploitant des systèmes vivants, avec l'avantage de pouvoir créer des outils sur mesure pour décrypter le vivant à une résolution atomique.

Aujourd'hui, l'accès par synthèse totale à des protéines arborant diverses structures, linéaires, cycliques ou branchées, est facilité par une riche palette d'outils chimiques qui sont venus élargir la portée de la réaction de NCL. D'importants développements méthodologiques ont porté sur la mise au point de substituts du résidu peptidique thioester, dont la synthèse est restée longtemps problématique. Durant la dernière décennie, les équipes françaises ont été particulièrement actives dans la conception d'amides ayant la capacité de se réarranger spontanément dans l'eau et dans des conditions très douces en thioester transitoire, et donc de jouer le rôle de donneur d'acyle dans des réactions de NCL (figure 2B) [8-10]. Ce processus a pu être considérablement favorisé par catalyse intramolécule ou effet Thorpe-Ingold, pour aboutir, par un jeu de déplacements d'équilibres, à des réactions de NCL efficaces et rapides.

Des travaux récents portent également sur la conception de systèmes de capture qui permettent soit de faciliter l'assemblage des segments peptidiques (e.g. le système redox contrôlé SetCys [11], figure 2C), soit l'accès à des protéines ubiquitinées via un lien isopeptidique natif (e.g. l'auxiliaire de ligation Hdmb [12] greffé sur une lysine, figure 2C). Par ailleurs, des approches alternatives à la NCL ont été élaborées, exploitant la cycloaddition alcyne/azoture catalysée par le cuivre(II)

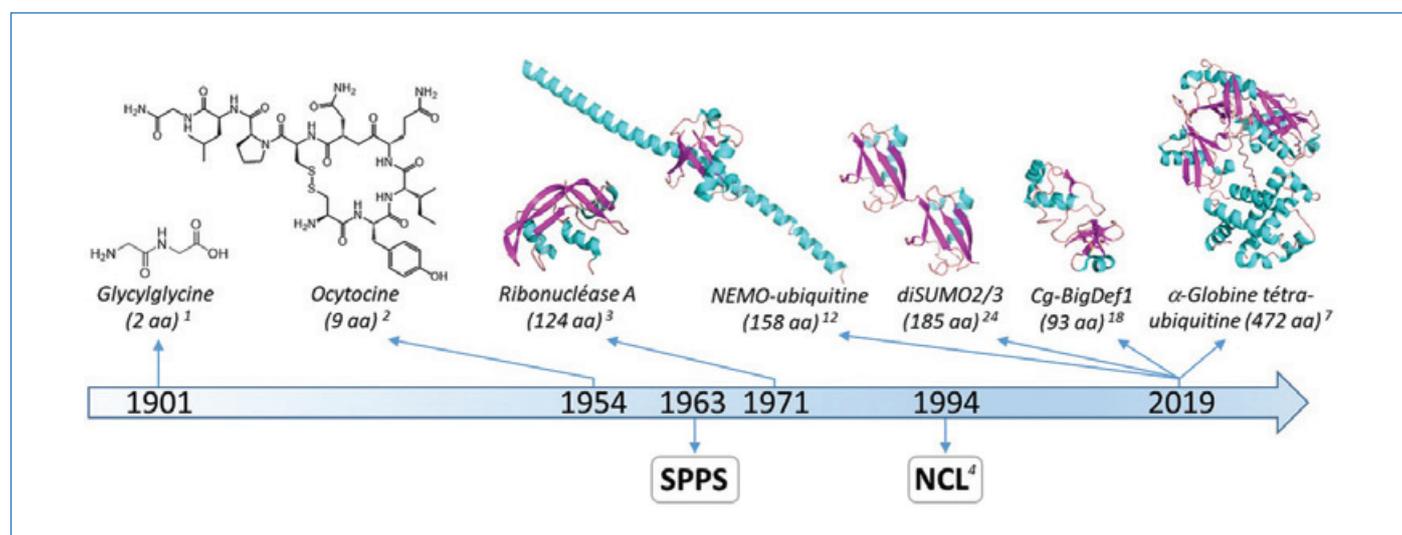


Figure 1 - La synthèse de peptides et de protéines a connu un essor considérable depuis le début du XX^e siècle, et notamment depuis 1994, avec la découverte de la NCL.

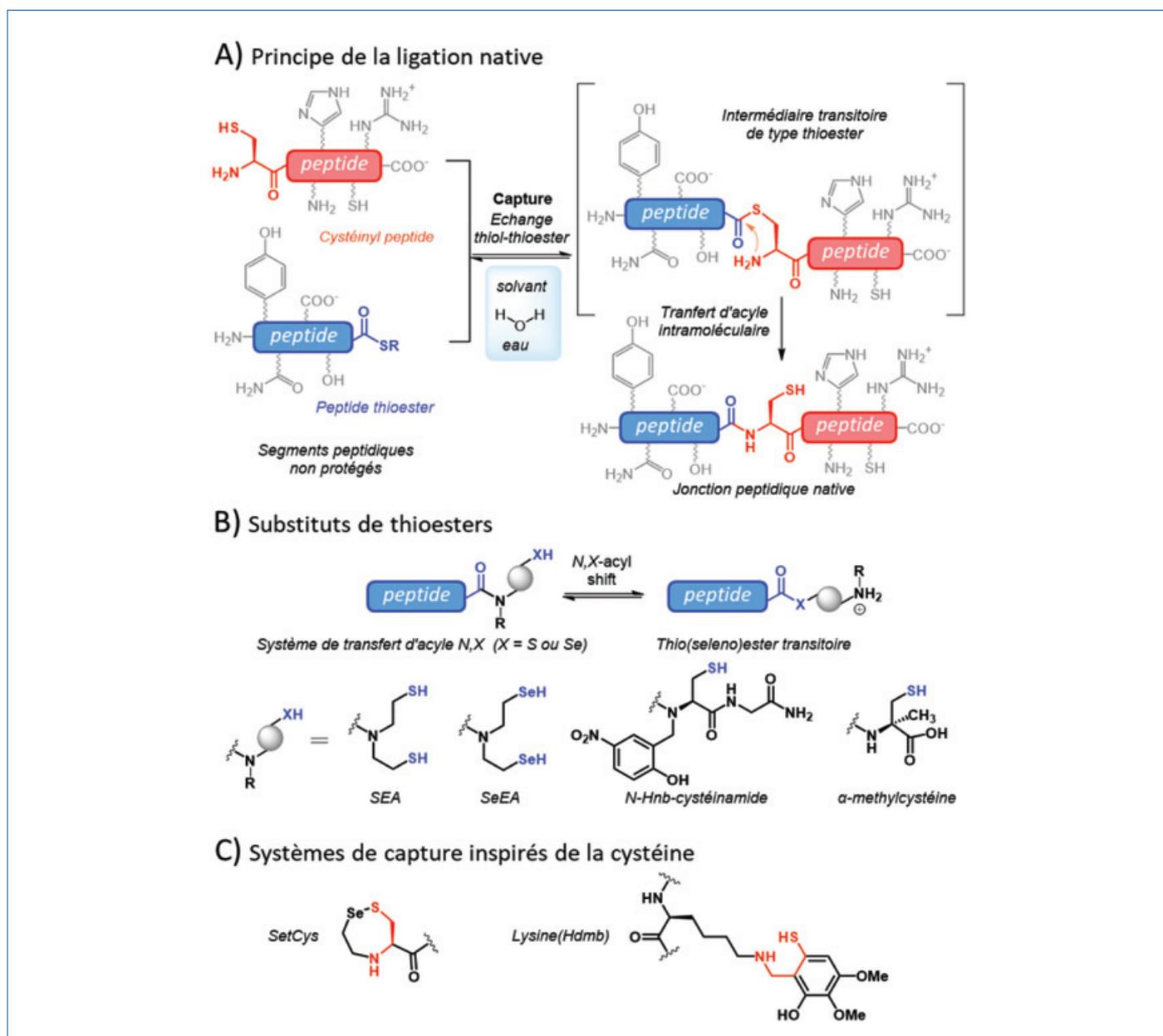


Figure 2 - A) Principe de la réaction de NCL montrant l'intermédiaire de capture thioester. B) Certains amides arborant sur l'azote un groupement β -mercaptoéthyle peuvent servir de donneur d'acyle *in situ* durant la NCL. C) Les systèmes de capture étendent la portée de la NCL en facilitant l'assemblage des segments peptidiques et l'accès à des structures cycliques ou branchées.

qui conduit à un 1,2,3-triazole, excellent mème de liaison amide [13-14]. Enfin, le développement de méthodes pour la synthèse supportée de protéines par assemblage itératif de segments peptidiques vient en complément des méthodes en solution [14-17]. Collectivement, ces techniques simplifient l'accès à des protéines complexes.

En combinant SPPS et techniques de ligation, les chimistes peuvent ainsi accéder à des protéines de structure native pour leur caractérisation biologique et structurale [18-21]. La synthèse d'une mini-protéine riche en ponts disulfure de la famille des « big défensines » (*Cg-BigDef1*, *figure 1*) a ainsi mis en évidence son activité bactéricide vis-à-vis de souches multi-résistantes [18]. L'étude a par ailleurs révélé le mode d'action original de ces composés, produits uniquement par des organismes invertébrés marins, et qui se caractérisent par la présence d'un domaine hydrophobe ancestral leur permettant d'être actifs en milieu salin. Les protéines arborant des modifications post-traductionnelles et difficilement accessibles par biotechnologie sont des cibles de choix pour les

chimistes (*diSUMO2/3*, *NEMO-ubiquitine*, *figure 1*) [12, 22-24]. Par exemple, la protéine NEMO joue un rôle central dans la réponse immunitaire innée. Son activation par liaison covalente de chaînes linéaires d'ubiquitine a été investiguée grâce à la synthèse d'un intermédiaire clé de ce processus, NEMO mono-ubiquitiné (*figure 1*). Cette étude a montré que l'ubiquitination linéaire de NEMO implique deux étapes distinctes d'amorçage et d'extension de chaîne, et a permis d'identifier l'enzyme responsable de l'extension dans les conditions physiologiques [12].

La synthèse chimique donne aussi l'opportunité d'élaborer des systèmes moléculaires non natifs présentant de nouvelles fonctionnalités [25-27]. La synthèse de dérivés multivalents du facteur de croissance des hépatocytes a conduit à la conception d'analogues présentant un potentiel thérapeutique dans le domaine de la régénération tissulaire [25]. Dans un autre domaine, l'ingénierie de protéines amyloïdes ouvre la voie, via la synthèse d'analogues solubles, à une connaissance accrue de leur implication dans la maladie d'Alzheimer (*figure 3*) [26]. Enfin, l'introduction d'acides aminés modifiés

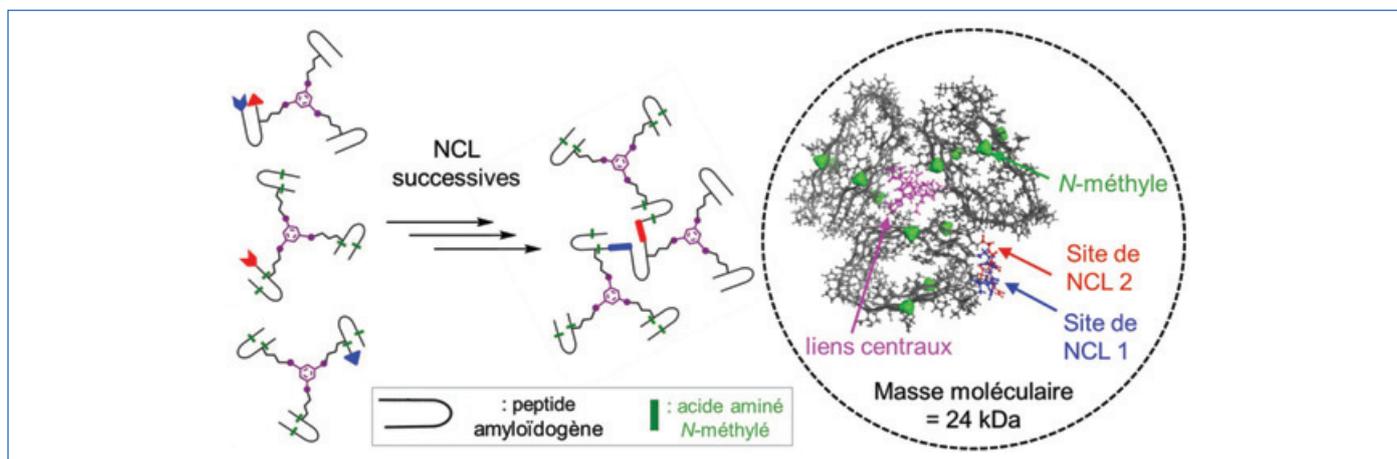


Figure 3 - Conception et synthèse d'un analogue soluble d'oligomère amyloïde. Neuf copies d'un bloc de construction peptidique amyloïdogène sont conjuguées via des liens centraux et des NCL successives. L'agrégation incontrôlée est empêchée par la *N*-méthylation d'acides aminés spécifiques.

dans une protéine intrinsèquement désordonnée a permis d'augmenter sa structuration et son affinité pour son partenaire [27], laissant espérer la conception de puissants inhibiteurs d'interactions protéine-protéine.

Les travaux discutés précédemment sont loin de représenter l'étendue des applications possibles de la synthèse totale des protéines. Potentiellement, toute la diversité fonctionnelle de la chimie organique peut être intégrée dans les protéines à des positions précises et ce, dans le but d'investiguer leurs fonctions ou de créer de nouveaux outils diagnostiques ou thérapeutiques. Il faut admettre que la synthèse totale de protéines de plus de 150 acides aminés nécessite la plupart du temps un réel investissement, même pour les spécialistes. Imaginer des méthodes d'assemblage plus rapides et efficaces constitue un défi et attire l'attention de nombreuses équipes dans le monde. Les équipes françaises participent naturellement à cette quête visant à rendre ces approches chimiques accessibles au plus grand nombre.

[1] E. Fischer, E. Fourneau, Ueber einige Derivate des Glykocolls, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1901**, 34, p. 2868-877.
 [2] V. du Vigneaud, C. Ressler, J.M. Swan, W. Carleton, P.G. Katsoyannis, The synthesis of oxytocin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, 76, p. 3115-121.
 [3] B. Gutte, R.B. Merrifield, The synthesis of ribonuclease A, *J. Biol. Chem.*, **1971**, 246, p. 1922-941.
 [4] P.E. Dawson, T.W. Muir, I. Clark-Lewis, S.B. Kent, Synthesis of proteins by native chemical ligation, *Science*, **1994**, 266, p. 776-779.
 [5] V. Agouridas, O. El Mahdi, V. Diemer, M. Cargoët, J.-C.M. Monbaliu, O. Melnyk, Native chemical ligation and extended methods: mechanisms, catalysis, scope, and limitations, *Chem. Rev.*, **2019**, 119, p. 7328-443.
 [6] V. Agouridas, O. El Mahdi, M. Cargoët, O. Melnyk, A statistical view of protein chemical synthesis using NCL and extended methodologies, *Bioorg. Med. Chem.*, **2017**, 25, p. 4938-945.
 [7] H. Sun *et al.*, Diverse fate of ubiquitin chain moieties: the proximal is degraded with the target, and the distal protects the proximal from removal and recycles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2019**, 116, p. 7805-812.
 [8] N. Ollivier, J. Dheur, R. Mhida, A. Blanpain, O. Melnyk, Bis(2-sulfanylethyl)amino native peptide ligation, *Org. Lett.*, **2010**, 12, p. 5238-241.
 [9] F. Burlina, G. Papageorgiou, C. Morris, P.D. White, J. Offer, In situ thioester formation for protein ligation using α -methylcysteine, *Chem. Sci.*, **2014**, 5, p. 766-770.
 [10] V.P. Terrier, H. Adihou, M. Arnould, A.F. Delmas, V. Aucagne, A straightforward method for automated Fmoc-based synthesis of bio-inspired peptide crypto-thioesters, *Chem. Sci.*, **2016**, 7, p. 339-345.
 [11] V. Diemer, N. Ollivier, B. Leclercq, H. Drobecq, J. Vicogne, V. Agouridas, O. Melnyk, A cysteine selenosulfide redox switch for protein chemical synthesis, *Nat. Commun.*, **2020**, 11, 2558.
 [12] F. Burlina *et al.*, Auxiliary-assisted chemical ubiquitylation of NEMO and linear extension by HOIP, *Commun. Chem.*, **2019**, 2, 111.
 [13] I.E. Valverde, F. Lecaille, G. Lalmanach, V. Aucagne, A.F. Delmas, Synthesis of a biologically active triazole-containing analogue of cystatin. A through successive peptidomimetic alkyne-azide ligations, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, p. 718-722.

[14] V. Aucagne, I.E. Valverde, P. Marceau, M. Galibert, N. Dendane, A.F. Delmas, Towards the simplification of protein synthesis: iterative solid-supported ligations with concomitant purifications, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, 51, p. 11320-324.
 [15] L. Raibaut, H. Adihou, R. Desmet, A.F. Delmas, V. Aucagne, O. Melnyk, Highly efficient solid phase synthesis of large polypeptides by iterative ligations of bis(2-sulfanylethyl)amido (SEA) peptide segments, *Chem. Sci.*, **2013**, 4, p. 4061-066.
 [16] N. Ollivier *et al.*, A simple and traceless solid phase method simplifies the assembly of large peptides and the access to challenging proteins, *Chem. Sci.*, **2017**, 8, p. 5362-370.
 [17] S.A. Abboud, M. Amoura, B. Renoux, S. Papot, V. Piller, V. Aucagne, Enzyme-cleavable linkers for protein chemical synthesis through solid-phase ligations, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, 60, p. 18612-618.
 [18] K. Loth *et al.*, The ancestral N-terminal domain of big defensins drives bacterially triggered assembly into antimicrobial nanonets, *mBio*, **2019**, 10, e01821.
 [19] G. Martinez *et al.*, Spermaurin, an La1-like peptide from the venom of the scorpion *Scorpio Maurus Palmatus* improves sperm motility and fertilization in different mammalian species, *Mol. Hum. Reprod.*, **2016**, 23, p. 116-131.
 [20] C. Zoukiman *et al.*, Synthesis by native chemical ligation and characterization of the scorpion toxin AmmTx3, *Bioorg. Med. Chem.*, **2019**, 27, p. 247-253.
 [21] J. Giribaldi *et al.*, Synthesis, structure and biological activity of CIA and CIB, Two α -conotoxins from the predation-evoked venom of *Conus catus*, *Toxins*, **2018**, 10, 222.
 [22] S. Sanulli *et al.*, Jarid2 methylation via the PRC2 complex regulates H3K27me3 deposition during cell differentiation, *Mol. Cell*, **2015**, 5, p. 769-783.
 [23] J. Bouchenna, M. Sénéchal, H. Drobecq, N. Stankovic-Valentin, J. Vicogne, O. Melnyk, The Role of the conserved SUMO-2/3 cysteine residue on domain structure investigated using protein chemical synthesis, *Bioconjugate Chem.*, **2019**, 30, p. 2684-696.
 [24] J. Bouchenna, M. Sénéchal, H. Drobecq, J. Vicogne, O. Melnyk, Total chemical synthesis of all SUMO-2/3 dimer combinations, *Bioconjugate Chem.*, **2019**, 30, p. 2967-973.
 [25] C. Simonneau *et al.*, Semi-synthesis of a HGF/SF kringle one (K1) domain scaffold generates a potent in vivo MET receptor agonist, *Chem. Sci.*, **2015**, 6, p. 2110-121.
 [26] R. Boehringer, B. Kieffer, V. Torbeev, Total chemical synthesis and biophysical properties of a designed soluble 24 kDa amyloid analogue, *Chem. Sci.*, **2018**, 9, p. 5594-599.
 [27] V. Bauer *et al.*, Conformational editing of intrinsically disordered protein by α -methylation, *Chem. Sci.*, **2021**, 12, p. 1080-089.

Vincent AUCAGNE^a, Fabienne BURLINA^b, Oleg MELNYK^c, directeurs de recherche CNRS, et **Vladimir TORBEEV^d,** professeur des universités.

^aCentre de Biophysique Moléculaire, UPR CNRS 4301, Orléans.

^bLaboratoire des BioMolécules, UMR 7203, Sorbonne Université, ENS, PSL University, CNRS, Paris.

^cUniversité de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 9017, Centre d'infection et d'immunité de Lille (CIIL), Lille.

^dÉcole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, UMR CNRS 7242 Biotechnologie et signalisation cellulaire, Université de Strasbourg.

* vincent.aucagne@cnrs-orleans.fr ; fabienne.burlina@sorbonne-universite.fr ; oleg.melnyk@ibl.cnrs.fr ; torbeev@unistra.fr

Horizons de chimistes en imagerie photonique

Résumé L'imagerie photonique de la matière vivante fournit un riche réservoir de besoins et d'opportunités pour la communauté des chimistes. Plutôt que de promouvoir une recherche spécifique, cet article propose un état des lieux et évoque les défis à relever dans un domaine en constant développement.

La matière vivante fascine les chimistes qui ont développé de puissants outils analytiques pour en interroger la singularité. Elle contient de nombreux constituants chimiques distincts (plus de 10^6) dont les concentrations couvrent une gamme extrêmement étendue (du millimolaire pour les ions abondants comme Na^+ , K^+ , ou Cl^- au picomolaire pour l'ADN). Elle présente de multiples échelles d'hétérogénéité spatiale et de dynamique temporelle et est dans un état hors équilibre. Interroger la matière vivante implique ainsi d'imager de multiples constituants en « temps réel » sans être invasif. Cet objectif est source de défis chimiques :

- **Marquage sélectif** : l'imagerie d'un constituant nécessite une signature spécifique. Mais dans une cellule, les constituants partagent essentiellement les mêmes compositions élémentaires et groupes fonctionnels, ce qui empêche le plus souvent de discriminer directement un constituant cible. Pour surmonter cette limitation, les chimistes développent de puissantes technologies pour introduire des marqueurs (par exemple des fluorophores) sur des biomolécules et les singulariser [1].

- **Sensibilité à ses limites** : la concentration minimale de marqueurs détectable en une durée donnée détermine la sensibilité d'une observable. En imagerie, l'état de l'art donne accès aux concentrations submicromolaires en 10 ms. Cette sensibilité demeure insuffisante pour imager en temps réel des acteurs cellulaires clés (facteurs de transcription, ARN messenger). Les chimistes explorent des stratégies d'amplification du signal s'appuyant sur des cascades de réactions [2] ou le marquage par des enzymes [3].

- **Élimination des interférences** : la matière vivante est hétérogène et diffuse la lumière [4]. Elle contient des constituants endogènes interférents (par exemple autofluorescents [5]). Ces caractéristiques sont préjudiciables pour extraire quantitativement et spatialement les signaux de marqueurs. Les chimistes développent des stratégies visant à surmonter ces interférences par la clarification des tissus [6] ou l'introduction de marqueurs chimiluminescents [7], bioluminescents [8], ou fluorescents dans l'infrarouge où l'autofluorescence est faible [9].

- **Observations multiplexées** : en imagerie, le signal d'un marqueur est couramment extrait dans le domaine spectral. Dans ce domaine, la sélectivité dépend du rapport entre largeur de bande du signal et étendue du domaine spectral de tous les signaux. En imagerie de fluorescence, qui bénéficie d'une excellente sensibilité, ce rapport est souvent supérieur à 0,25. Moins sensible, l'imagerie Raman atteint un rapport de 0,01, ce qui pourrait un jour permettre d'imager 10^2 marqueurs [10]. On reste bien loin de pouvoir imager plus de 10^6 constituants !

Devenue essentielle aux biologistes, l'imagerie de fluorescence en fournit une excellente illustration. Deux dimensions

– les longueurs d'onde d'excitation et d'émission – peuvent être exploitées pour cibler spectralement un marqueur spécifique. Cependant, la largeur à mi-hauteur des bandes d'absorption/émission des fluorophores couramment utilisés (50-100 nm) ne permet de distinguer au maximum que quatre marqueurs dans la gamme de longueurs d'onde UV-visible. Augmenter légèrement ce nombre nécessite une déconvolution, incertaine en précision et coûteuse en temps de calcul [11]. Or les stratégies émergentes de génie génétique [12] peuvent d'ores et déjà marquer un plus grand nombre de biomolécules ou de cellules. L'imagerie de fluorescence multiplexée est ainsi actuellement limitée non par le marquage mais par la discrimination des marqueurs. Comme leur optimisation spectrale – coefficient d'absorption molaire, rendement quantique de fluorescence, largeur des bandes d'absorption/émission – a essentiellement atteint ses limites physiques, discriminer davantage de marqueurs implique de compléter la dimension spectrale par une (ou plusieurs) autre(s) dimension(s).

Les chimistes ont inventé les titrages pour répondre à une telle demande. Un analyte n'y est pas sondé directement mais au travers de la thermodynamique et de la cinétique de sa réaction avec un réactif spécifique [13]. Le photocycle de réactions comprenant absorption de lumière et émission de fluorescence est analogue à une réaction de titrage. Il contient une riche information thermocinétique qui peut être utilisée pour mettre en œuvre un contraste dynamique et discriminer un marqueur au-delà de la seule longueur d'onde de son émission de fluorescence.

Des fluorophores spectralement similaires ont ainsi été discriminés grâce à leurs différences de durée de vie d'émission de fluorescence [14]. Cette première approche a cependant été limitée par la faible dispersion des durées de vie (quelques nanosecondes) des fluorophores brillants dont l'imagerie multiplexée a nécessité des déconvolutions.

Les fluorophores réversiblement photo-commutables ne souffrent pas de cet inconvénient. Leur photochimie dépasse le seul photocycle absorption-émission de fluorescence et engendre des temps de relaxation de photo-commutation de fluorescence à des échelles de temps plus variées qui restent compatibles avec les observations en temps réel des phénomènes biologiques. Plusieurs protocoles ont ainsi exploité la réponse temporelle de leur signal de fluorescence à des variations d'illumination pour les imager sans déconvolution [15]. Néanmoins, ils n'ont permis jusqu'à présent que de discriminer quatre marqueurs spectralement similaires [15d], un nombre encore loin de répondre à la demande de la biologie quantitative d'imager simultanément des dizaines de constituants dans une cellule ou de cellules voisines dans un tissu [16]. Contrairement à la discrimination spectrale qui a bénéficié d'un siècle de développements et atteint ses limites

physiques, le contraste dynamique dispose toutefois de marges d'amélioration considérables énumérées ci-après :

- **Nouveaux marqueurs** : les marqueurs actuellement disponibles n'ont pas été spécifiquement conçus et optimisés pour le contraste dynamique dont les figures de mérite reposent sur la cinétique des réactions et non sur les propriétés spectrales. En imagerie photonique, cette situation incite à concevoir des marqueurs dont les sections efficaces d'absorption, les durées de vie de luminescence, et les diverses constantes cinétiques des réactions impliquées dans leurs photocycles (croisement inter-système, échange de proton, oxydo-réduction, isomérisation...) soient diverses et optimisées. Dans cette perspective, le répertoire du chimiste s'élargit continûment à de nouveaux complexes [17], molécules organiques [18] et clusters métalliques [19].

- **Nouveaux protocoles** : le développement du contraste dynamique ne se limite pas à synthétiser de nouveaux marqueurs et à les intégrer à la matière vivante. Les chimistes doivent également engager des efforts théoriques et instrumentaux pour introduire de nouveaux protocoles d'imagerie exploitant de façon optimale les caractéristiques cinétiques des marqueurs. Il s'agit par exemple de calculer l'évolution temporelle des concentrations et des signaux de réactifs et produits impliqués dans des mécanismes complexes ; de proposer des traitements de données pour extraire l'information cinétique recherchée ; de concevoir et construire des instruments optiques fournissant éclaircissements et acquisitions du signal à façon.

- **Nouvelles observables** : des marqueurs fournissant de nouvelles observables doivent aussi être conçus. Une observable (par exemple l'intensité du signal de fluorescence) rend compte classiquement de la concentration instantanée d'un marqueur. Il faut donc enregistrer un film pour reconstruire l'évolution temporelle du système. Pour obtenir des images tridimensionnelles à haute résolution spatiale, cette approche nécessite d'acquérir, traiter et stocker d'énormes quantités de données, ce qui devient aujourd'hui limitant en bio-imagerie. Un développement prometteur consisterait ainsi à concevoir des marqueurs intégrateurs qui rendraient compte non pas d'un état mais d'une succession d'états, fournissant l'information d'un film dans un format compact. Il est ainsi récemment devenu possible d'identifier *a posteriori* des neurones qui avaient été parcourus par un influx nerveux en conditionnant leur marquage fluorescent par l'internalisation d'ions calcium [20].

- **Nouvelles pratiques** : l'imagerie de la matière vivante demande enfin d'intégrer développements théoriques et instrumentaux, systèmes et marqueurs, dans le cadre de questions scientifiques issues de communautés éloignées. Au-delà des considérations précédentes qui leur montrent qu'il y a beaucoup à faire, les chimistes sont donc encouragés à sortir de leur laboratoire et de leur communauté. Nul doute qu'ils trouveront du plaisir à explorer le domaine de l'imagerie de la matière vivante grâce aux riches interactions avec les scientifiques d'autres horizons (physiciens, biologistes, spécialistes des données, etc.).

[1] K.M. Marks, G.P. Nolan, Chemical labeling strategies for cell biology, *Nat. Methods*, **2006**, *3*, p. 591-596 ; K.M. Dean, A.E. Palmer, Advances in fluorescence labeling strategies for dynamic cellular imaging, *Nat. Chem. Biol.*, **2014**, *10*, p. 512-523 ; E.A. Specht, E. Braselmann, A.E. Palmer, A critical and comparative review of fluorescent tools for live-cells imaging, *Annu. Rev.*, **2017**, *79*, p. 93-117.

[2] X. Sun, D. Shabat, S. T. Phillips and E. V. Anslyn, Self-propagating amplification reactions for molecular detection and signal amplification: advantages, pitfalls, and challenges, *J. Phys. Org. Chem.*, **2018**, *31*, p. e3827-35.

[3] A.P. Demchenko, *Introduction to Fluorescence Sensing*, Springer Science & Business Media, **2008**.

[4] S.L. Jacques, Optical properties of biological tissues: a review, *Phys. Med. Biol.*, **2013**, *58*, p. R37-R61.

[5] A.C. Croce, G. Bottiroli, Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis, *Eur. J. Histochem.*, **2014**, *58*, p. 320-337.

[6] D.S. Richardson, J.W. Lichtman, Clarifying tissue clearing, *Cell*, **2015**, *162*, p. 246-257.

[7] N. Hananya, D. Shabat, Recent advances and challenges in luminescent imaging: bright outlook for chemiluminescence of dioxetanes in water, *ACS Cent. Sci.*, **2019**, *5*, p. 949-959 ; Q. Li, J. Zeng, Q. Miao, M. Gao, Self-illuminating agents for deep-tissue optical imaging, *Front. Bioeng. Biotech.*, **2019**, *7*, 326.

[8] A. Fleiss, K.S. Sarkisyan, A brief review of bioluminescent systems, *Curr. Genet.*, **2019**, *65*, p. 877-882.

[9] G. Hong, A.L. Antaris, H. Dai, Near-infrared fluorophores for biomedical imaging, *Nat. Biomed. Eng.*, **2017**, *1*, 0010.

[10] L. Wei, W. Min *et al.*, Super-multiplex vibrational imaging, *Nature*, **2017**, *544*, p. 465-470.

[11] F. Cutrale, S.E. Fraser *et al.*, Hyperspectral phasor analysis enables multiplexed 5D *in vivo* imaging, *Nat. Methods*, **2017**, *14*, p. 149-152 ; A. Valm, J. Lippincott-Schwartz *et al.*, Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome, *Nature*, **2017**, *546*, p. 162-167.

[12] J. Livet, J.W. Lichtman *et al.*, Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system, *Nature*, **2007**, *450*, p. 56-62 ; M. Mansouri, I. Berger, P. Berger *et al.*, Highly efficient baculovirus-mediated multigene delivery in primary cells, *Nat. Commun.*, **2016**, *7*, 11529 ; Y. Cai, J. Ellenberg *et al.*, Experimental and computational framework for a dynamic protein atlas of human cell division, *Nature*, **2018**, *561*, p. 411-415.

[13] R. Winkler-Oswatitsch, M. Eigen, The art of titration. From classical end points to modern differential and dynamic analysis, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **1979**, *18*, p. 20-49.

[14] J.R. Lakowicz, H. Szmacinski, K. Nowaczyk, K.W. Berndt, M.L. Johnson, Fluorescence lifetime imaging, *J. Fluoresc.*, **1992**, *202*, p. 316-330 ; b) P.I. Bastiaens, A. Squire, Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell, *Trends Cell Biol.*, **1999**, *9*, p. 48-52.

[15] a) G. Marriott *et al.*, Optical lock-in detection imaging microscopy for contrast-enhanced imaging in living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105*, p. 17789-794 ; b) J.-C. Hsiang, A.E. Jablonski, R.M. Dickson, Optically modulated fluorescence bioimaging: visualizing obscured fluorophores in high background, *Acc. Chem. Res.*, **2014**, *47*, p. 1545-554 ; c) J. Widengren, Fluorescence-based transient state monitoring for biomolecular spectroscopy and imaging, *J. R. Soc., Interface*, **2010**, *7*, p. 1135-144 ; d) J. Quérard, T. Le Saux, L. Jullien *et al.*, Resonant out-of-phase fluorescence microscopy and remote imaging overcome spectral limitations, *Nat. Commun.*, **2017**, *8*, 969 ; e) R. Chouket, T. Le Saux, L. Jullien *et al.*, Dynamic contrast with reversibly photoswitchable fluorescent labels for imaging living cells, *Chem. Sci.*, **2020**, *11*, p. 2882-887.

[16] R. Weissleder, M. Nahrendorf, Advancing biomedical imaging, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2015**, *112*, p. 14424-428 ; H. Grecco, S. Imtiaz, E. Zamir, Multiplexed imaging of intracellular protein networks, *Cytometry, Part A*, **2016**, p. 761-775.

[17] D. Jin, J.A. Piper, *Anal. Chem.*, **2011**, *83*, p. 2294-2300, <https://doi.org/10.1021/ac103207r>.

[18] R.M. Rich, I. Gryczynski, R. Fudala *et al.*, Elimination of autofluorescence in fluorescence correlation spectroscopy using the AzaDiOxaTriAngulenium (ADOTA) fluorophore in combination with time-correlated single-photon counting (TCSPC), *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013**, *405*, p. 4887-894.

[19] B.C. Fleischer, J.T. Petty, J.C. Hsiang, R.M. Dickson, Optically activated delayed fluorescence, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2017**, *8*, p. 3536-543.

[20] B.F. Fosse *et al.*, Neural circuits. Labeling of active neural circuits *in vivo* with designed calcium integrators, *Science*, **2015**, *347*, p. 755-760.

Béatrice ADELIZZI^a, Raja CHOUKET^a, Lucie LUDVIKOVA^a et Agnès PELLISSIER-TANON^a, postdoctorants, Agathe ESPAGNE^a, chargée de recherche, Ludovic JULLIEN^a, professeur, Aliénor LAHLOU^{ab}, doctorante, Annie LEMARCHAND^c, directrice de recherche, et Thomas LE SAUX^a, maître de conférences.

^aLaboratoire PASTEUR, Département de Chimie, École Normale Supérieure, Université PSL, Sorbonne Université, CNRS, Paris.

^bSony Computer Science Laboratories, Paris.

^cSorbonne Université, CNRS, Laboratoire de Physique Théorique de la Matière Condensée (LPTMC), Paris.

* Ludovic.Jullien@ens.psl.eu

Des sondes fluorogènes innovantes pour éclairer les récepteurs couplés aux protéines G

Résumé Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont la cible de plus d'un tiers des médicaments actuellement sur le marché. Pour mieux les détecter et les suivre au niveau cellulaire mais également d'un organisme entier, les sondes fluorogènes représentent un outil d'imagerie innovant pour la chémobiologie des RCPG.

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), cibles de plus de 30 % des médicaments actuellement sur le marché, représentent la plus large et la plus diverse des familles de protéines membranaires à la surface des cellules eucaryotes. Les RCPG ont de très nombreux ligands comme des peptides/protéines, des nucléotides ou encore des neurotransmetteurs qui, en se fixant à ces récepteurs, sont capables de les activer et ainsi de transmettre un signal extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. Les RCPG sont exprimés dans tous les organes du corps humain et leur implication dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques de l'organisme en font des cibles privilégiées pour la découverte de nouveaux médicaments [1].

Ces dernières années, différentes stratégies pour l'étude des RCPG basées sur l'utilisation de sondes fluorescentes [2] ont été développées afin de mieux comprendre l'architecture fonctionnelle de ces récepteurs [3], mais également pour les détecter et les visualiser à la surface de cellules vivantes [4], dans un but thérapeutique et/ou de diagnostic. Afin d'améliorer la sensibilité de détection de ces récepteurs, nous avons mis à profit les propriétés très particulières des sondes fluorescentes dites fluorogènes ou « Turn-On » (figure 1). Ces sondes, sensibles à l'environnement, présentent l'avantage majeur de s'éclairer uniquement après liaison à la cible d'intérêt, lorsqu'elles passent d'un milieu aqueux à un environnement hydrophobe comme les membranes biologiques [5]. Afin de valider l'intérêt de ces sondes moléculaires pour détecter et suivre les RCPG à la surface de cellules vivantes mais également *in vivo*, nous avons sélectionné le récepteur de l'ocytocine (figure 1A), RCPG considéré comme une cible potentielle pour le traitement de l'autisme [6]. Nous avons ainsi conçu et développé des sondes fluorogènes dérivées de la carbétocine (figure 1B), un peptide cyclique capable d'activer le récepteur

de l'ocytocine et utilisé couramment en obstétrique pour provoquer les contractions de l'utérus et l'accouchement.

Trois grandes familles de sondes fluorogènes couplées à la carbétocine pour l'étude du récepteur de l'ocytocine ont été récemment décrites par nos équipes (figure 2) :

- les sondes fluorescentes solvatochromes qui comportent un fluorophore « push-pull » à base de rouge de Nil, présentant à l'état excité un transfert intramoléculaire d'une charge : ces sondes ont permis de détecter et de quantifier les récepteurs de l'ocytocine à la surface de cellules vivantes [7], mais également d'évaluer de façon très fine leurs interactions moléculaires avec leur micro-environnement comme la membrane des cellules [8] ;
- les rotors moléculaires à base de dioxaborine exploitant des rotations intramoléculaires à l'état excité : ces sondes sont très sensibles à la viscosité et la polarité de leur environnement et représentent des outils puissants pour une meilleure compréhension des interactions ligand-RCPG à la surface des cellules [9] ;
- les dimères fluorogènes basés sur le principe d'extinction par agrégation de deux fluorophores ; en raison de leur brillance exceptionnelle, ces derniers sont particulièrement prometteurs pour l'imagerie des RCPG (figure 3).

La première génération de sondes dimères fluorogènes a été conçue à partir de la carbétocine, et d'un fluorophore dérivé d'une structure squaraine (dSQ-PEG-CBT, figure 3A), photostable et brillante [10]. La squaraine est capable de s'agréger en solution pour former des interactions de type H-agrégats. La sonde ainsi obtenue n'est pas fluorescente dans l'eau mais, après liaison au récepteur de l'ocytocine, dans un environnement hydrophobe, les fluorophores se dissocient en deux structures extrêmement brillantes (figure 3A). La sonde a ainsi

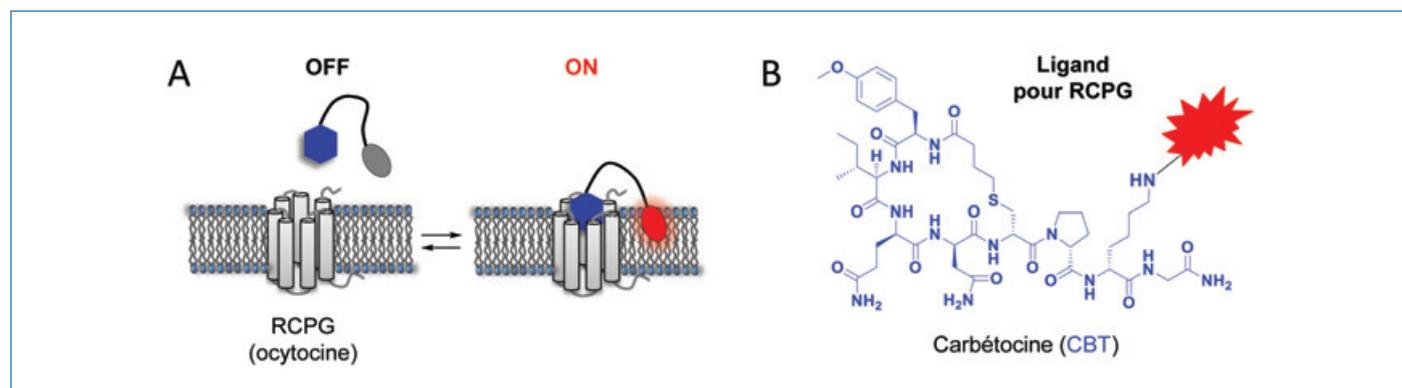


Figure 1 - Sondes fluorescentes fluorogènes pour l'imagerie des RCPG : A) principe de la détection « Turn-On » des RCPG à la surface des cellules ; B) structure chimique de la carbétocine, ligand du récepteur de l'ocytocine.

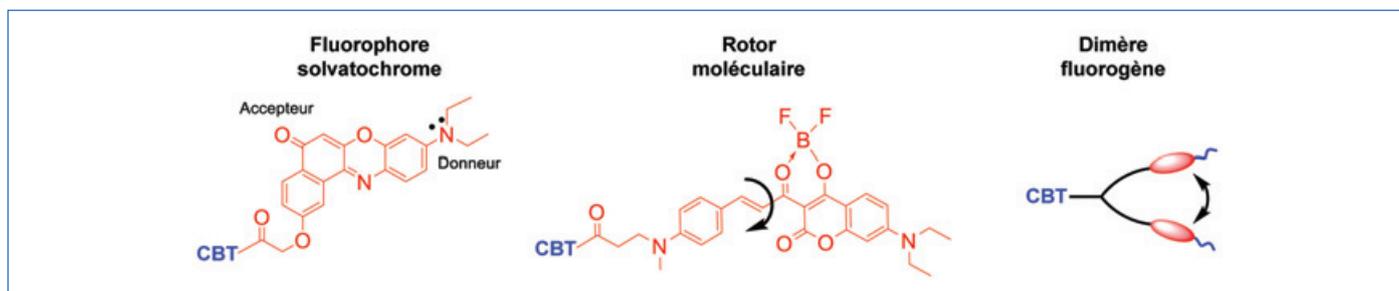


Figure 2 - Trois familles de sondes fluorogènes couplées à la carbétocine (CBT).

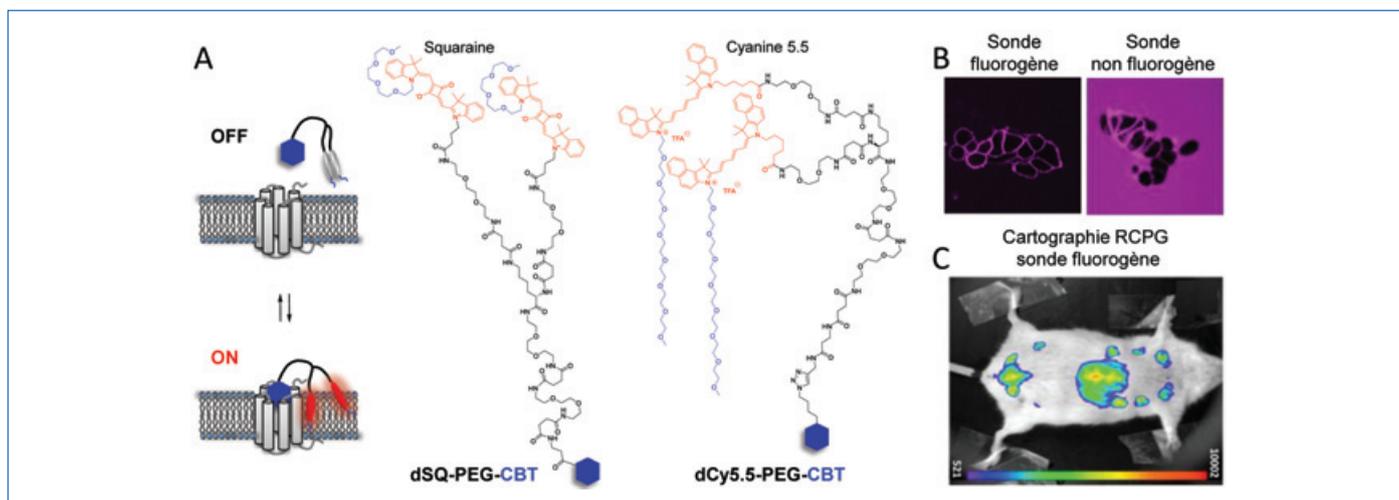


Figure 3 - A) Principe des sondes dimères fluorogènes et structures chimiques de ces sondes couplées à la carbétocine (dSQ-PEG-CBT et dCy5.5-PEG-CBT). B-C) Exemple d'applications de la dernière génération de sondes dimères fluorogènes dans le proche infrarouge pour l'imagerie du récepteur de l'ocytocine à la surface de cellules vivantes en comparaison avec une sonde fluorescente non fluorogène B) et dans l'animal entier C).

permis de détecter de façon spécifique ce récepteur à la surface des cellules avec un excellent rapport signal/bruit [11]. Plus récemment, nous avons mis à profit ce concept pour concevoir la première sonde dimère fluorogène dCy5.5-PEG-CBT utilisable dans le proche infrarouge (700-900 nm) (figure 3A). En raison de son caractère fluorogène, cette sonde présente l'avantage majeur de permettre la visualisation d'un RCPG à la surface de cellules sans étape de lavage intermédiaire, généralement nécessaire lorsqu'une sonde non fluorogène est utilisée (figure 3B). D'autre part, sa fenêtre spectrale dans le proche infrarouge permet une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus, pour visualiser les récepteurs endogènes de l'ocytocine directement chez l'animal [12] (figure 3C).

Ainsi, ces sondes fluorescentes innovantes pour la chémobiologie des RCPG ouvrent la voie à la cartographie de ces récepteurs dans un organisme entier pour le diagnostic, mais également pour l'étude de l'efficacité de traitements médicaux, ou encore pour la chirurgie assistée par la lumière.

- [5] A.S. Klymchenko, Solvatochromic and fluorogenic dyes as environment-sensitive probes: design and biological applications, *Acc. Chem. Res.*, **2017**, *50*, p. 366-375.
 [6] M.C. Frantz, D. Bonnet *et al.*, LIT-001, The first nonpeptide oxytocin receptor agonist that improves social interaction in a mouse model of autism, *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*, p. 8670-692.
 [7] I.A. Karpenko, D. Bonnet, A.S. Klymchenko *et al.*, Red fluorescent turn-on ligands for imaging and quantifying G protein-coupled receptors in living cells, *ChemBioChem*, **2014**, *15*, p. 359-363.
 [8] F. Hanser, A. Klymchenko, D. Bonnet *et al.*, Nile red-based GPCR ligands as ultrasensitive probes of the local lipid microenvironment of the receptor, *ACS ChemBiol.*, **2021**, *16*, p. 651-660.
 [9] I.A. Karpenko, D. Bonnet, A.S. Klymchenko *et al.*, Push-pull dioxaborine as fluorescent molecular rotor: far-red fluorogenic probe for ligand-receptor interactions, *J. Mater. Chem. C*, **2016**, *4*, p. 3002-009.
 [10] I.A. Karpenko, A.S. Klymchenko, D. Bonnet *et al.*, Squaraine as bright, stable and environment-sensitive far-red label for receptor-specific cellular imaging, *Chem. Commun.*, **2015**, *51*, p. 2960-963.
 [11] I.A. Karpenko, D. Bonnet, A.S. Klymchenko *et al.*, Fluorogenic squaraine dimers with polarity-sensitive folding as bright far-red probes for background-free bioimaging, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, p. 405-412.
 [12] L. Esteouille, A.S. Klymchenko, D. Bonnet *et al.*, A near-infrared fluorogenic dimer enables background-free imaging of endogenous GPCRs in living mice, *Chem. Sci.*, **2020**, *11*, p. 6824-829.

- [1] A.S. Hauser, M. Attwood, M. Rask-Andersen, H.B. Schiöth, D.E. Gloriam, Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2017**, *16*, p. 829-842.
 [2] Z. Ma, L. Du, M. Li, Toward fluorescent probes for G-protein-coupled receptors, *J. Med. Chem.*, **2014**, *57*, p. 8187-203.
 [3] C. Hounsou, D. Bonnet *et al.*, Time-resolved FRET binding assay to investigate hetero-oligomer binding properties: proof of concept with dopamine D₁/D₃ heterodimer, *ACS Chem. Biol.*, **2015**, *10*, p. 466-474.
 [4] S. Loison, D. Bonnet *et al.*, Selective fluorescent nonpeptidic antagonists for vasopressin V₂ GPCR: application to ligand screening and oligomerization assays, *J. Med. Chem.*, **2012**, *55*, p. 8588-602.

Dominique BONNET,

Directeur de recherche au CNRS, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Faculté de Pharmacie d'Illkirch, Université de Strasbourg.

Andrey KLYMCHENKO,

Directeur de recherche au CNRS, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie d'Illkirch, Université de Strasbourg.

* dbonnet@unistra.fr ; andrey.klymchenko@unistra.fr

La RMN, un couteau suisse pour disséquer la chimie cellulaire à toutes les échelles

Résumé Cet article présente deux développements récents sur la physico-chimie du vivant utilisant la résonance magnétique nucléaire : la structure des protéines en cellule et la détection d'activité enzymatique avec l'IRM d'agents de contrastes dits « intelligents ».

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est un outil analytique essentiel pour le chimiste au quotidien. Elle trouve aussi de nombreuses applications en biologie et médecine, depuis la conception de médicaments avec la caractérisation structurale des protéines, jusqu'à l'analyse clinique du métabolome, et bien sûr l'imagerie par résonance magnétique (IRM). La RMN a deux atouts : elle est non invasive et fournit de l'information au niveau atomique. Ces caractéristiques permettent désormais aux chercheurs d'observer des processus chimiques dans des systèmes vivants.

L'observation spécifique d'une protéine en cellule par RMN repose sur l'utilisation d'un filtre isotopique : le milieu cellulaire ne contient que de faibles quantités des isotopes stables ^{13}C , ^{15}N ou ^{19}F , une molécule enrichie en ^{13}C , ^{15}N ou ^{19}F devient donc sélectivement détectable au sein de cellules vivantes par RMN (figure 1). Chaque isotope « résonne » dans une gamme de fréquences précises : on peut donc sélectionner un isotope comme on choisit une fréquence radio ou une couleur au microscope. Toutes les questions relatives aux protéines peuvent être explorées par RMN en cellule : les conformations actives ou inactives, la dynamique structurale, les interactions avec des partenaires ou des inhibiteurs, les modifications chimiques (dites post-traductionnelles), etc. Cette approche a permis des avancées fondamentales ces dernières années : la démonstration de l'existence en cellule de protéines dans un état non replié [1], le suivi d'états d'oxydo-réduction de protéines [2] ou de leur interaction avec des inhibiteurs en temps réel [3] (figure 2A). Ces informations RMN à l'échelle atomique sont complémentaires de celles

fournies par la microscopie électronique, la microscopie de fluorescence ou la RPE (résonance paramagnétique électronique), qui ont des capacités de résolution différentes. Les chercheurs perfectionnent en ce moment des bioréacteurs et des techniques spectroscopiques pour l'observation RMN en cellules ou en organoïdes.

Le principe du filtre isotopique est aussi appliqué à l'observation d'activités enzymatiques cellulaires sur des substrats : on peut les quantifier par la disparition et l'apparition de signaux RMN de substrats ou de produits. Cette approche a permis récemment de cribler des candidats inhibiteurs sur des cellules cancéreuses [4] ou des bactéries polyrésistantes aux antibiotiques [5] (figure 2B).

D'autres approches sont développées pour l'imagerie des activités enzymatiques. L'IRM est le plus souvent basée sur la RMN du proton de l'eau, très abondant dans les tissus biologiques. Le contraste est fondé sur les variations de temps de relaxation de ces protons dans les différents tissus. Il peut être modulé par des « agents de contraste » qui accélèrent cette relaxation. Malgré ses atouts, l'IRM souffre d'un manque de sensibilité et de spécificité. Il est notamment difficile de détecter une activité enzymatique dans un tissu : les substrats enzymatiques ont des concentrations et donc des intensités RMN très faibles par rapport à l'eau (quelques mmol/L au mieux, contre 55 mol/L pour l'eau). Pour lever ce verrou, une méthode IRM par effet Overhauser (OMRI) a été développée, fruit d'une collaboration de quinze ans entre l'Institut de Chimie Radicalaire de Marseille (ICR) et le Centre de

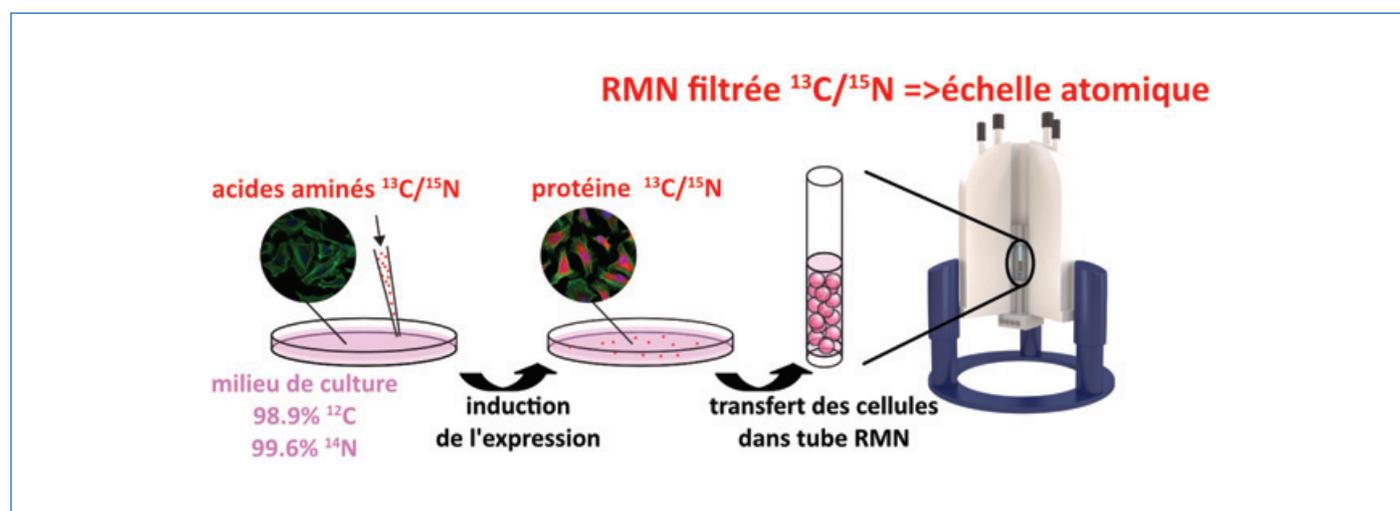


Figure 1 - Représentation schématique de la production d'échantillons pour la RMN « in-cell » avec des cellules de mammifères exprimant la protéine d'intérêt de manière inducible. L'incorporation d'isotopes $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ « visibles » pour la RMN permet leur détection sélective dans le milieu cellulaire contenant majoritairement des isotopes $^{12}\text{C}/^{14}\text{N}$ « invisibles ». La spectroscopie RMN délivre ensuite une information potentiellement très riche à l'échelle atomique.

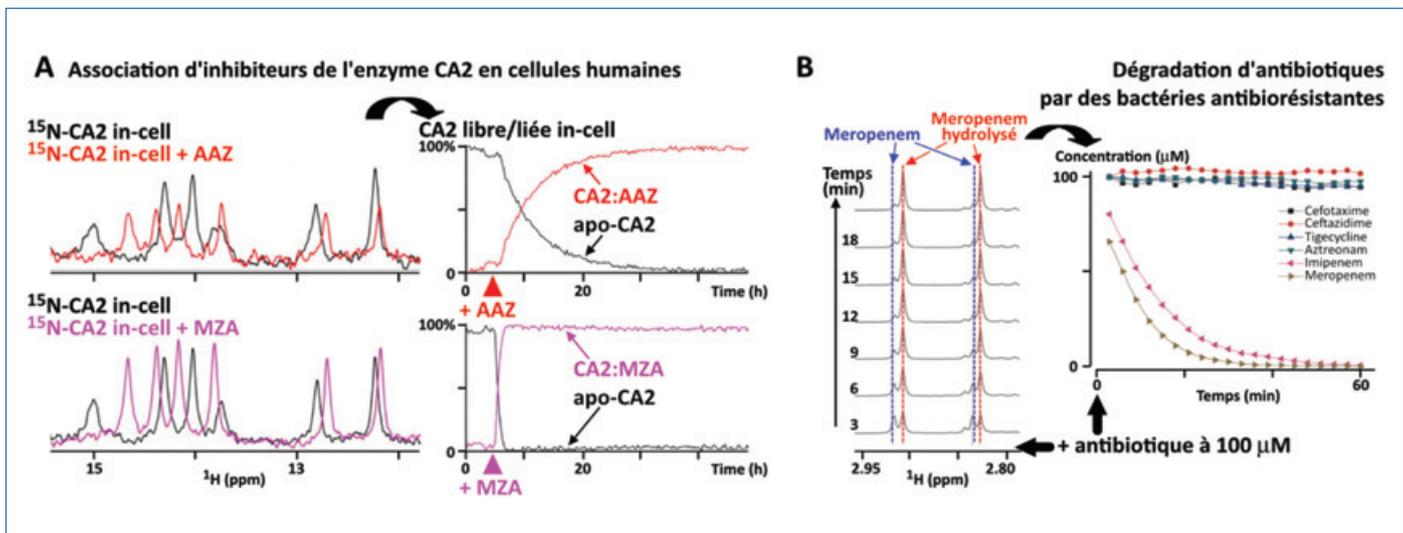


Figure 2 - Suivi en temps réel par RMN d'échantillons cellulaires : une série de spectres RMN successifs est enregistrée, puis les intensités des signaux mesurées dans chaque spectre. L'évolution de ces intensités rapporte les quantités : A) de l'anhydrase carbonique 2 (CA2) libre/liée (l'inhibiteur AAZ traverse la membrane cellulaire plus lentement que MZA ; adapté de Luchinat *et al.*, *Anal. Chem.*, 2020) ; B) d'antibiotiques intacts/hydrolysés par des bactéries exprimant l'enzyme de résistance New Delhi métallob- β -lactamase 1 (NDM-1) ; ce schéma expérimental a permis à ces auteurs d'effectuer un criblé d'inhibiteurs de NDM-1 en bactéries (adapté de [5]).

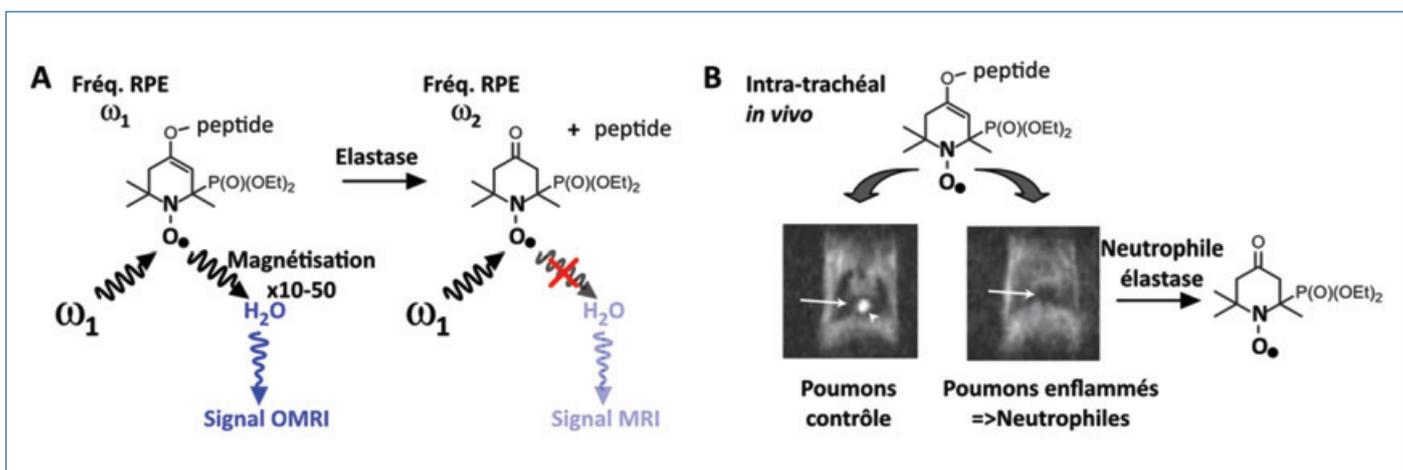


Figure 3 - Principe de fonctionnement des agents de contraste « intelligents » OMRI : A) l'irradiation EPR à la fréquence de résonance du substrat ω_1 permet de polariser la magnétisation des protons de l'eau et de générer un signal OMRI, tandis que le produit issu de l'action de l'élastase ne résonnant pas à ω_1 n'a pas cette action polarisante ; B) l'instillation intra-trachéale du substrat de l'élastase génère un signal OMRI dans les poumons sains de souris, tandis que des poumons enflammés dégradent ce substrat immédiatement [9].

Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques de Bordeaux (CRMSB). Il s'agit de détecter une activité enzymatique sur un substrat portant un radical électronique, engendrant un changement de sa fréquence RPE. La saturation RPE de l'électron est transférée et observée par RMN du proton de l'eau. Un rehaussement du signal a été obtenu, d'un facteur 50 *in vitro*, en irradiant un nitroxyde à 5,4 GHz et en détectant le proton à 8 MHz sur un imageur 0,2 T du CRMSB.

Quelle application trouver à ce gain de sensibilité prometteur ? L'ICR a conçu des agents de contraste « intelligents », des nitroxides phosphorés qui changent de conformation après leur coupure par des enzymes protéases, impliquées notamment dans la progression de cancers (figure 3A). Les changements associés se traduisent par un décalage de fréquence de résonance de l'électron [6] ou un meilleur transfert de saturation de l'électron vers l'eau [7]. La méthode a été validée *in vitro* puis *in vivo* (souris) pour détecter l'activité de l'élastase pancréatique intestinale [7] ou l'inflammation

pulmonaire [8] (figure 3B). Pour appliquer cette méthode sur le gros animal, les équipes du CRMSB et de l'ICR ont obtenu un financement européen FETOPEN (n° 863099), rassemblant sept partenaires dont deux industriels.

En caractérisant des tissus intacts et leur fonctionnement, la RMN *in-cell* complète les approches réductionnistes classiques (séquençage génomique, de biologie cellulaire ou de biochimie *in vitro*...). Nous pouvons finalement évoquer l'utilisation du ¹³C-pyruvate hyperpolarisé, dont la conversion accélérée en ¹³C-lactate est symptomatique d'un métabolisme cancéreux : l'IRM du ¹³C-hyperpolarisé commence à être utilisée pour le diagnostic en oncologie [9] (figure 4). Les informations au niveau atomique par RMN sont donc essentielles pour la chémobiologie fondamentale et clinique. Ainsi, soixante-quinze ans après sa découverte expérimentale, la RMN appuie la compréhension du vivant, le diagnostic de pathologies et la conception de stratégies thérapeutiques. N'hésitons pas à continuer !

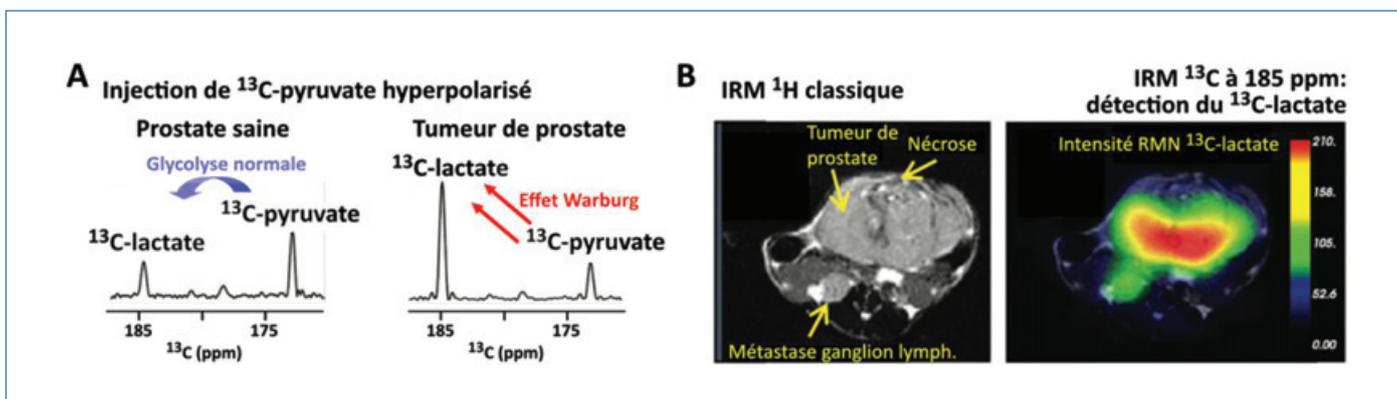


Figure 4 - A) Le ^{13}C -pyruvate hyperpolarisé peut être injecté au sein de tissus, et sa vitesse de conversion en ^{13}C -lactate est alors observable *in vivo* ; B) le ^{13}C -lactate est observable en imagerie par la détection de signaux ^{13}C à 185 ppm. Adapté de [9].

[1] F.-X. Theillet *et al.*, Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells, *Nature*, **2016**, *530*, p. 45-50.

[2] A. Mochizuki *et al.*, Balanced regulation of redox status of intracellular thioredoxin revealed by in-cell NMR, *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*, p. 3784-790.

[3] E. Luchinat *et al.*, Drug screening in human cells by NMR spectroscopy allows the early assessment of drug potency, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*, p. 6535-539.

[4] C. Dalvit, M. Veronesi, A. Vulpetti, Fluorine NMR functional screening: from purified enzymes to human intact living cells, *J. Biomol. NMR*, **2020**, *74*, p. 613-631.

[5] J. Ma, S. McLeod, K. MacCormack, S. Sriram, N. Gao, A.L. Breeze, J. Hu, Real-time monitoring of New Delhi metallo- β -lactamase activity in living bacterial cells by ^1H NMR spectroscopy, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *53*, p. 2130-133.

[6] G. Audran, L. Bosco, P. Brémond, J.-M. Franconi, N. Koonjoo, S.R.A. Marque *et al.*, Enzymatically shifting nitroxides for EPR spectroscopy and Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *127*, p. 13577-582.

[7] N. Koonjoo, E. Parzy, P. Massot, M. Lepetit-Coiffé, S.R.A. Marque, J.-M. Franconi *et al.*, In vivo Overhauser-enhanced MRI of proteolytic activity, *Contrast Media Mol Imaging*, **2014**, *9*, p. 363-371.

[8] A. Rivot, N. Jugnot, S. Jacoutot, N. Vanthuyne, P. Massot, P. Mellet *et al.*, Magnetic resonance imaging of protease-mediated lung tissue inflammation and injury, *ACS Omega*, **2021**, *6*, p. 15012-016.

[9] Z.J. Wang *et al.*, Hyperpolarized ^{13}C MRI: state of the art and future directions, *Radiology*, **2019**, *291*, p. 273-284.

François-Xavier THEILLET,

Chargé de recherches CNRS, Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), Gif-sur-Yvette.

Jean-Michel FRANCONI,

Professeur d'université, Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques, UMR 5536, CNRS, Université de Bordeaux.

* francois-xavier.theillet@cnsr.fr ;

jean-michel.franconi@rmsb.u-bordeaux.fr

45
Sc
21

Culture
iencesChimie



ENS



MINISTÈRE
DE L'ÉDUCATION
NATIONALE, DE
L'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR ET DE
LA RECHERCHE



Mis à disposition
CAPES et
AGRÉGATION
aux épreuves orales

Site de ressources en **Chimie** pour les enseignants

Thèmes en lien avec les
PROGRAMMES
D'ENSEIGNEMENT

Contenu validé par des
CHERCHEURS

Articles, Vidéos, Diaporamas

AGENDA, ACTUALITÉS
événements, conférences, parutions
scientifiques...

http://culturesciences.chimie.ens.fr



Apport des outils de chémobiologie à l'imagerie par spectrométrie de masse

Résumé La spectrométrie de masse (MS) est une technique sensible, robuste et rapide permettant l'analyse de mélanges complexes. Certaines MS permettent d'obtenir une analyse localisée et la réalisation d'images aboutissant à la distribution des composés sur des surfaces. Cependant, l'imagerie MS peut rencontrer des limitations pour l'analyse de composés présents en faible quantité. L'imagerie spécifique permet en s'inspirant des méthodes développées en chémobiologie de pallier ses limitations pour imager des marqueurs d'intérêt dans des tissus biologiques. Cet article présente les différents développements réalisés dans ce domaine.

La spectrométrie de masse (MS) est la science analytique permettant de mesurer la valeur de masse-sur-charge (m/z) d'ions en phase gazeuse et ainsi d'accéder au poids moléculaire des composés avec une grande précision. Elle permet aussi d'obtenir des informations structurales générées soit par fragmentation (spectrométrie de masse tandem, MS/MS), soit par couplage de la MS avec la mobilité ionique (détermination de section efficace de collision). Cette méthodologie peut être appliquée à des échantillons gazeux, liquides ou solides. Dans ce dernier cas, les méthodes de désorption/ionisation permettent de produire les ions en phase gazeuse sous vide ou à pression atmosphérique, qui sont ensuite séparés en fonction de leur valeur m/z dans un analyseur où règnent des champs magnétiques/électriques. En effet, les trajectoires des particules chargées dans ces champs sont bien décrites par la physique classique et dépendent directement de la valeur de m/z . La formation d'ions par désorption/ionisation repose sur l'apport d'énergie en surface de l'échantillon via un faisceau primaire incident conduisant à l'éjection de la matière en phase gazeuse et l'ionisation concomitante des molécules par réactions photochimiques et/ou transferts de protons. Les sources d'énergie utilisées en désorption/ionisation sont principalement de trois types : faisceau laser (LDI, « laser desorption/ionisation » ; MALDI, « matrix-assisted laser desorption/ionisation »), faisceau de particules (SIMS, « secondary ion mass spectrometry ») ou gouttelettes chargées (DESI, « desorption electrospray ionisation »).

D'autres méthodes sont également décrites dans la littérature mais possèdent des domaines d'applications plus restreints, comme la technique LA-ICP (« laser ablation inductively coupled plasma ») pour la spéciation de métaux. Par l'utilisation de sources d'énergie focalisables, il est possible d'enregistrer des spectres de masse représentant l'intensité des signaux détectés en fonction de la valeur de m/z à des points précis d'une surface. En cartographiant point par point la surface d'un échantillon, on peut ainsi obtenir une collection de spectres de masse identifiés par leurs coordonnées (X, Y). Pour chacun des signaux ainsi détectés, une carte de densité ionique sur la surface – i.e. la distribution de l'ion sur la surface en fonction de son intensité ou son aire de pic, normalisée ou non – peut être reconstruite par des logiciels de reconstruction d'images dédiés [1].

Alors que la technique SIMS (échelle de la dizaine de nanomètres) n'est pas adaptée pour l'analyse de biomolécules de poids moléculaire élevé, telles que les peptides ou les protéines [2], le MALDI permet de déterminer la distribution

des composés de faible poids moléculaire, mais également de macromolécules sous leur forme intacte dans des tissus biologiques jusqu'à une résolution en routine de 10 μm [3]. Même si cette technique a connu de nombreux succès depuis son introduction en 1997 par l'équipe de R. Caprioli [4], elle rencontre certaines limitations face à l'analyse de composés de poids moléculaires élevés (> 30 000-40 000 Da) ou peu abondants dans les tissus.

Afin de pallier ces limitations, la spectrométrie s'est inspirée des méthodes développées en chémobiologie afin de permettre une détection efficace et spécifique de macromolécules au sein de tissus biologiques. Un des premiers exemples dans la littérature, publié en 2007 par l'équipe d'I. Fournier et M. Salzet (Lille), a consisté au développement de sondes dirigées contre une cible spécifique et possédant un groupement photoclivable dont le rapporteur est détaché après irradiation par le faisceau laser du MALDI et détecté par MS [5-6] (voir figure). Cette méthode, appelée « Tag-Mass », permet de corréler le niveau d'expression de différents mRNA ou protéines directement sur des coupes de tissus biologiques en multipliant le nombre de sondes et de rapporteurs associés.

Plus récemment en 2016, l'équipe de B. Moon (Séoul, Corée du Sud) a développé une approche visant à détecter un ensemble de biomarqueurs en multiplex en utilisant des tests basés sur des anticorps via l'utilisation de conjugués de type dithioacétal ne nécessitant plus le dépôt de la matrice sur l'échantillon (technique LDI), comme dans le cas du MALDI [7] et limitant la détection de signaux parasites provenant de la matrice ou du système biologique. Par ailleurs, les auteurs ont montré une détection sensible en 4-plex de ces tags en synthétisant des composés proches en masse et en structure. Des niveaux de sensibilité de l'ordre de quelques fmol sont ainsi rapportés pour la détection de protéines.

Sur une même approche sans dépôt de matrice LDI, l'équipe de C. Bieniarz (Ventana Medical Systems, E.-U.) a développé une méthode permettant d'obtenir une plus grande sensibilité de détection via l'application d'une réaction enzyme/substrat. Ce test indirect repose sur l'utilisation d'un premier anticorps spécifique de la cible choisie, puis d'un second anticorps conjugué avec une enzyme [8], catalysant une réaction de bioconversion d'un substrat (dérivés de naphthol) en un produit insoluble précipitant au niveau du complexe associé et qui sera désorbé/ionisé après irradiation laser. Cette méthode a l'avantage d'avoir été validée sur des tissus enrobés dans la paraffine, qui sont ceux principalement stockés dans les

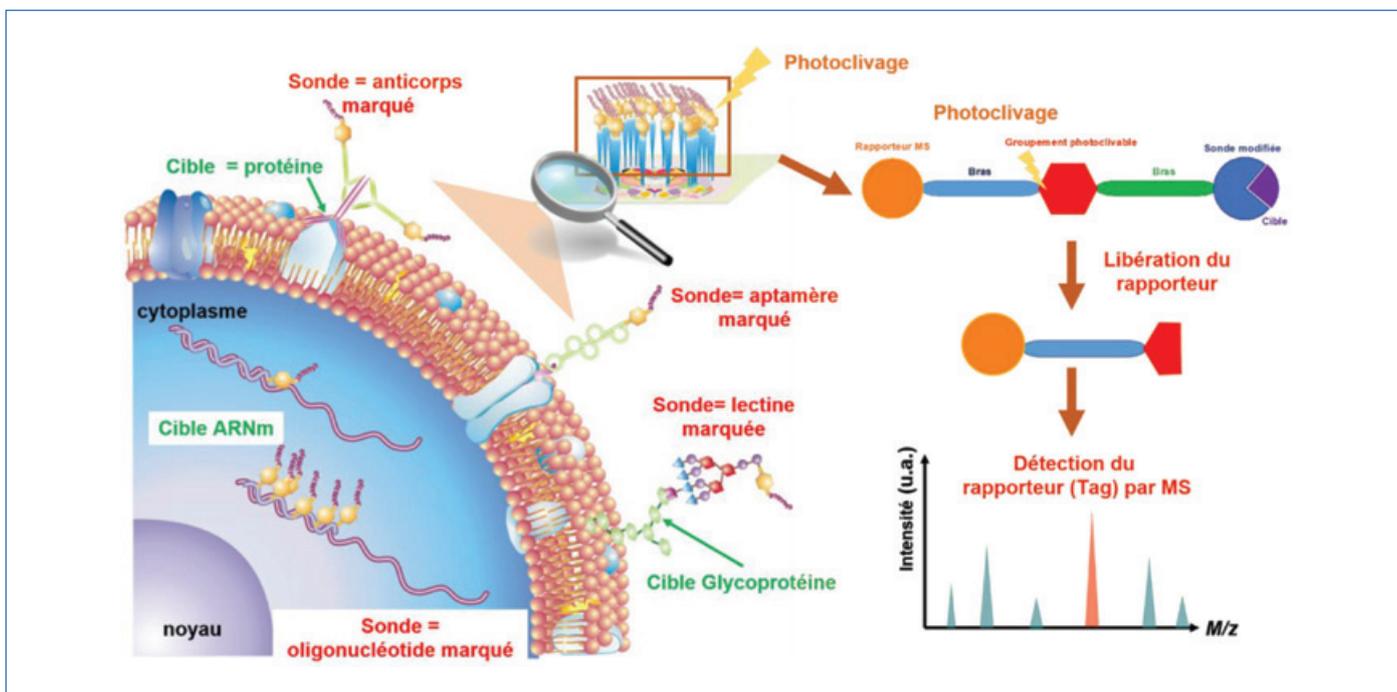


Schéma général de l'approche Tag-Mass [5] ; les sondes marquées peuvent être des anticorps, des oligonucléotides, des lectines...

banques hospitalières. Les auteurs démontrent la capacité d'obtenir la distribution de marqueurs utilisés en routine pour le diagnostic de certains cancers comme la protéine Ki67 dans des tissus ou de HER2 dans des lignées cellulaires. Cette méthode ouvre clairement une piste d'exploration dans la recherche de biomarqueurs du cancer en contexte clinique. Finalement, l'équipe d'A. Casini (Groningen, Pays-Bas) a proposé en 2020 l'utilisation de complexes de Ru(II)-polypyridine comme rapporteurs pour l'imagerie LDI. Ces complexes permettent l'émission d'un fragment chargé sous photoactivation et les fragments présentent un massif isotopique particulier qui permet une identification sans ambiguïté du signal correspondant à la sonde par rapport à des signaux endogènes provenant des tissus biologiques. Ce système a été démontré pour la détection d'intégrines $\alpha v \beta 3$, marqueur de métastases des tumeurs, sur des biopsies de carcinome épidermoïde de l'hypopharynx, démontrant l'intérêt en clinique de ces stratégies d'imagerie MS [9]. Il est à noter que les complexes Ru(II) peuvent être optimisés en termes de ligand afin d'absorber à la longueur d'onde UV des différents lasers présents sur les spectromètres de masse commerciaux (266, 337 et 355 nm), mais aussi dans le domaine IR afin de permettre une meilleure pénétration des photons dans les tissus. Ces développements ont d'ailleurs été source d'inspiration et ont été repris pour développer des stratégies similaires mais reposant sur d'autres techniques d'imagerie MS, comme l'imagerie LA-ICP via des anticorps couplés à des métaux, introduite par Bodenmiller *et coll.* et commercialisée par la société Fluidigm [10].

Ces exemples démontrent un dialogue fructueux entre la spectrométrie de masse et la chémobiologie. Ces travaux pionniers ouvrent la voie à des méthodes de plus en plus efficaces et sensibles de multiplexage permettant la localisation de plusieurs dizaines de cibles en parallèle à partir de tissus conservés en banque dans les hôpitaux. Au-delà de l'imagerie MS, ce dialogue est aussi important dans les

domaines plus larges que sont les sciences omiques, telles que la protéomique, la métabolomique ou l'épigénétique, ouvrant la voie à des projets interdisciplinaires innovants.

- [1] D. Touboul, A. Brunelle, O. Laprévotte, Mass spectrometry imaging: towards a lipid microscope?, *Biochimie*, **2011**, 93, p. 113-119.
- [2] C. Bich, D. Touboul, A. Brunelle, Cluster TOF-SIMS imaging as a tool for micrometric histology of lipids in tissue, *Mass Spectrom. Rev.*, **2014**, 33, p. 442-451.
- [3] J. Quanic, J. Franck, M. Wisztorski, M. Salzet, I. Fournier, Progress and potential of imaging mass spectrometry applied to biomarker discovery, *Methods Mol. Biol.*, **2017**, 1598, p. 21-43.
- [4] R.M. Caprioli, T.B. Farmer, J. Gile, Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, p. 4751-760.
- [5] R. Lemaire *et al.*, Tag-mass: specific molecular imaging of transcriptome and proteome by mass spectrometry based on photocleavable tag, *J. Proteome Res.*, **2007**, 6, p. 2057-067.
- [6] H. Gagnon *et al.*, Targeted mass spectrometry imaging: specific targeting mass spectrometry imaging technologies from history to perspective, *Prog. Histochem. Cytochem.*, **2012**, 47, p. 133-174.
- [7] N. Kang *et al.*, Design and synthesis of new mass tags for matrix-free laser desorption ionization mass spectrometry (LDI-MS) based on 6,11-dihydrothiochromeno[4,3-b]indole, *Tetrahedron*, **2016**, 72, p. 5612-619.
- [8] R. Hong, J. True, C. Bieniarz, Enzymatically amplified mass tags for tissue mass spectrometry imaging, *Anal. Chem.*, **2014**, 86, p. 1459-467.
- [9] J. Han *et al.*, Targeted imaging of integrins in cancer tissues using photocleavable Ru(II) polypyridine complexes as mass-tags, *Chem. Commun.*, **2020**, 56, p. 5941-944.
- [10] B. Bodenmiller *et al.*, Multiplexed mass cytometry profiling of cellular states perturbed by small-molecule regulators, *Nat. Biotechnol.*, **2012**, 30, p. 858-867.

David TOUBOUL,

Directeur de recherche CNRS, Université Paris-Saclay, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301, Gif-sur-Yvette.

Isabelle FOURNIER,

Professeure, Université de Lille, Inserm, U-1192, Laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM), Lille.

* david.touboul@cnsr.fr ; isabelle.fournier@univ-lille.fr

La RPE *in cellula*: étudier la dynamique des protéines dans leur habitat

Résumé La volonté d'explorer la structure et la dynamique des biomolécules, ainsi que suivre leurs interactions dans l'environnement intracellulaire stimule fortement la communauté scientifique depuis quelques années. Parmi les différentes méthodes biophysiques disponibles, la RPE *in cellula*, une approche basée sur l'utilisation des sondes paramagnétiques couplée à la spectroscopie RPE, connaît actuellement un très fort développement et permet d'accéder à des informations sur la dynamique des protéines à l'échelle moléculaire directement dans leur habitat, la cellule.

La multitude de fonctions exercées par les protéines, molécules parmi les principaux acteurs du vivant, est intimement liée à la structure qu'elles adoptent dans leur habitat : la cellule. Il est important de souligner que cette structure n'est pas figée ni dans le temps, ni dans l'espace, et qu'elle est potentiellement flexible et modulable selon son environnement cellulaire. Ainsi, la dynamique et la flexibilité structurale des protéines jouent un rôle central dans leurs fonctions biologiques. L'étude combinée de la structure et de la dynamique des protéines est donc cruciale pour comprendre leur fonctionnement et la biologie structurale est la branche de la biologie qui a cette mission.

La majorité de nos connaissances concernant la structure et la dynamique des protéines à l'échelle moléculaire proviennent d'études réalisées *in vitro*, c'est-à-dire sur des biomolécules purifiées, extraites de leur contexte biologique. Malgré l'importance de ces données, il apparaît clairement que ces études ne sont pas suffisantes pour décrypter finement leur mécanisme d'action, car elles ne tiennent pas compte de la réalité de l'environnement cellulaire et peuvent conduire à des données biaisées. En effet, à l'inverse des conditions utilisées *in vitro*, le milieu cellulaire est incroyablement complexe. Par exemple, dans une cellule de la bactérie *Escherichia coli*, la concentration en protéines et en ARN est de l'ordre de 300 à 400 g/L, celle des ions inorganiques est de l'ordre de 300 mM, et celle des métabolites de 1 à 100 mM [1]. Cela implique un encombrement extrême dans le cytoplasme dû au grand nombre de macromolécules confinées, ainsi qu'une myriade d'interactions spécifiques et aspécifiques qui constituent des facteurs pouvant avoir un impact énorme sur la structure des protéines, leur dynamique et, par conséquent, sur leur fonction.

La volonté d'explorer la structure et la dynamique des biomolécules et de suivre leurs changements structuraux et leurs interactions dans l'environnement intracellulaire connaît depuis quelques années un intérêt très fort dans la communauté scientifique nationale et internationale. Les techniques

de fluorescence et la spectroscopie RMN ont déjà permis des progrès importants dans ce domaine en expansion [2].

Parmi les différentes méthodes biophysiques disponibles pour l'étude de la dynamique structurale des protéines, le marquage de spin couplé à la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE) (SDSL-EPR, « site-directed spin labeling-electron paramagnetic resonance ») connaît ces dernières années un très fort développement et s'avère très puissant. Cette approche repose sur l'introduction spécifique en un site choisi de la protéine (le plus souvent la fonction thiol (-SH) des cystéines) d'une sonde paramagnétique et sur l'analyse du spectre RPE résultant [3] (figure 1). La plus grande famille de sondes paramagnétiques (ou marqueurs de spin) pour le SDSL-EPR est constituée par les radicaux de type nitroxyde qui sont remarquablement stables (figure 2), même si les complexes de gadolinium(III) et les radicaux trityl offrent actuellement des alternatives intéressantes [4].

L'un des principaux avantages des marqueurs de type nitroxyde est leur grande sensibilité à l'environnement local qui, dans l'approche SDSL-EPR, est exploitée pour obtenir des informations structurales concernant la biomolécule sur laquelle le nitroxyde est attaché. Doté d'un spin électronique $S = 1/2$ en interaction hyperfine avec le spin nucléaire du noyau ^{14}N , les radicaux nitroxydes présentent des spectres RPE caractéristiques à trois raies dont la forme est très sensible à la mobilité de la sonde. C'est au travers de cette mobilité que peut être extraite par la simulation des spectres que l'on peut obtenir des informations structurales et dynamiques. Ces radicaux représentent ainsi de véritables « spin-espion » de leur environnement local [5]. Avec les développements plus récents de la spectroscopie RPE impulsionnelle, et notamment de la technique de « double electron-electron resonance » (DEER) [6], le SDSL-EPR permet de mesurer des distances inter-sondes, dans la gamme de 1,5 à 8,0 nm (figure 3). Ainsi, cette approche est capable de fournir des distributions de distances inter-sondes dans le cas de protéines doublement marquées ou de deux protéines mono-marquées en interaction et

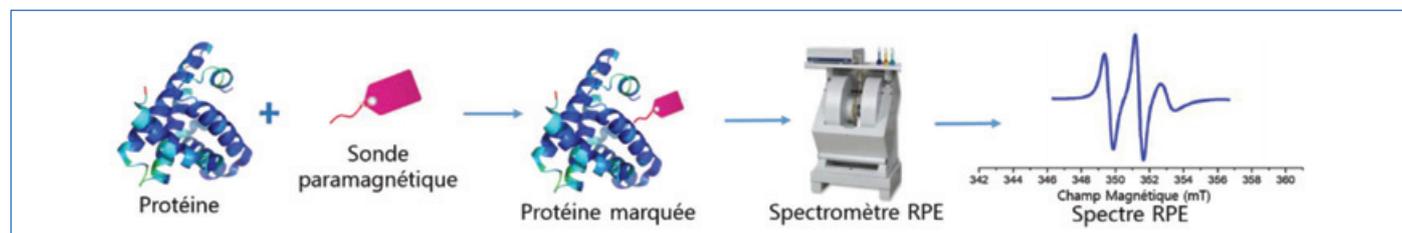


Figure 1 - Illustration d'une expérience type de mono-marquage pour évaluer la dynamique de la sonde paramagnétique.

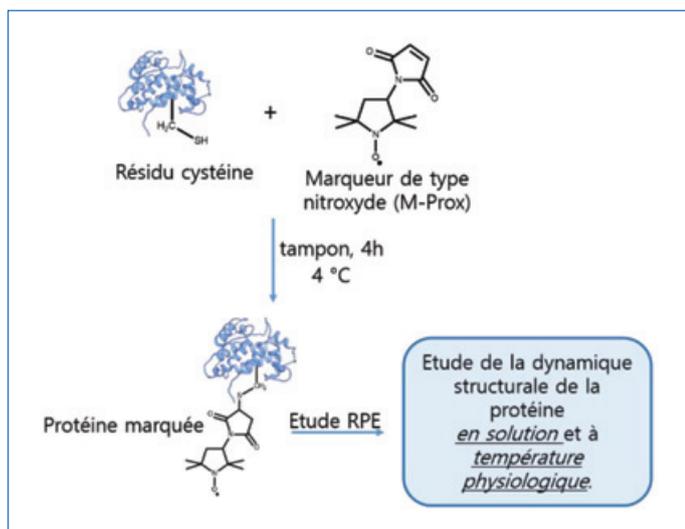


Figure 2 - Schéma représentant une réaction de marquage entre un résidu cystéine d'une protéine et un radical nitroxyde (M-Prox).

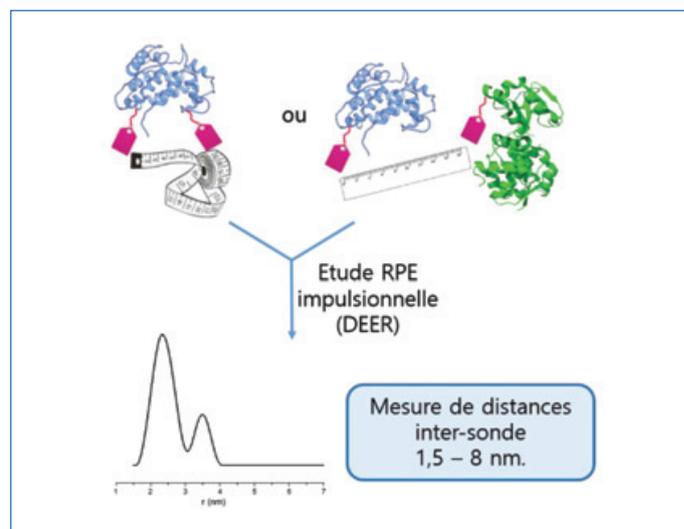


Figure 3 - Illustration d'une expérience type de bi-marquage pour mesurer la distance entre deux sondes paramagnétiques.

constitue une source d'informations précieuses sur l'organisation et les transformations structurales à longue portée des systèmes protéiques complexes [7].

Le marquage de spin *in vitro* a en particulier permis des progrès remarquables dans le suivi des changements conformationnels induits par les interactions protéine-protéine, des repliements induits par la liaison avec un partenaire, ou encore la localisation de site d'interaction protéine-protéine ou protéine-ligand [8] (pour plus de détails sur les potentialités de cette approche, voir [5a]).

La méthode SDSL-EPR bénéficie de nombreux avantages : une grande sensibilité – quelques μL à une concentration de 20-30 μM suffisent à l'acquisition d'un spectre en quelques minutes –, la possibilité de travailler à température physiologique, l'absence de limitation de taille du système d'étude, et également l'absence de bruit de fond associé à l'ensemble des molécules diamagnétiques puisque la RPE ne détecte que les espèces paramagnétiques. Ce dernier point revêt une importance particulière dans l'application à des études cellulaires puisqu'elles ne sont pas gênées par le signal de fond élevé provenant des très nombreux composants cellulaires comme on le rencontre dans d'autres techniques.

Depuis 2010, avec la volonté d'aborder la complexité du milieu cellulaire et d'accéder à des informations sur la dynamique des protéines à l'échelle moléculaire directement « dans leur habitat », la communauté RPE a multiplié ses efforts pour le développement d'une approche de marquage de spin adaptée et optimisée à des études directement dans les cellules : la RPE *in cellula* [9].

La RPE *in cellula* : limitations et solutions

Malgré des succès indéniables, le développement de la RPE *in cellula* est encore exploratoire. Les travaux publiés démontrent actuellement la faisabilité de l'approche et soulignent en même temps les verrous à lever.

Bioréduction des sondes

Une limitation majeure est liée au fait que le milieu réducteur du cytoplasme conduit à une perte rapide du caractère paramagnétique des sondes commerciales de type nitroxyde, et donc à la disparition du signal RPE. En effet, dans le

cytoplasme, la présence d'antioxydants et d'espèces réductrices (ascorbate, glutathion et radicaux semi-quinones notamment) et d'enzymes (thiorédoxine et d'autres enzymes contenant des groupements thiol) induit une réduction rapide du nitroxyde en hydroxylamine, espèce diamagnétique et donc silencieuse en RPE (figure 4A).

Jusqu'à il y a peu, il n'existait aucun nitroxyde pour le marquage de spin résistant à la réduction cytoplasmique, ce qui excluait des études cinétiques à température ambiante par exemple. Récemment, grâce à une collaboration entre notre laboratoire (Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP), CNRS, Aix-Marseille Université) et l'équipe d'O. Ouari (Institut de Chimie Radicalaire (ICR), CNRS, Aix-Marseille Université), nous avons synthétisé une nouvelle sonde nitroxyde protégée de la bioréduction par des groupements éthyls sur le carbone α de la fonction aminoxyle (nitroxyde **1**, M-TETPO, figure 4).

Les performances de résistance vis-à-vis de la bioréduction de la nouvelle sonde (**1**) ont été testées *in vitro* et *in cellula*. La figure 4C montre le profil de réduction du nitroxyde **1** (« M-TETPO ») et de son analogue commercial (« M-Prox », **2**) greffés sur une protéine modèle (NarJ) [10] en présence d'ascorbate, utilisé comme agent réducteur. Les profils de réductions ont été obtenus à température ambiante en suivant l'intensité de la raie centrale du signal RPE du nitroxyde en fonction du temps (figure 4C-D). Après 18 minutes, la moitié du signal du nitroxyde **2** a disparu, alors que la nouvelle sonde **1** enregistre une très faible perte de signal (4 %). Après 50 minutes, le résultat est encore plus spectaculaire avec la disparition complète du signal de la sonde commerciale, alors que 90 % du signal du nouveau marqueur est toujours observable. Nous avons ensuite étudié le profil de réduction des nitroxydes **1** et **2** directement dans des cellules bactériennes intactes (*E. coli*, figure 4D). À nouveau, les résultats obtenus démontrent que ce nouveau marqueur **1** présente des performances de résistance améliorées par rapport aux nitroxydes classiques.

Le développement de la sonde « biorésistante » **1** a ouvert la possibilité d'observer la dynamique structurale de plusieurs protéines directement dans leur habitat, la cellule. En particulier, la figure 5 présente les spectres RPE d'une protéine bactérienne (NarJ chez *E. coli*) marquée avec M-TETPO (**1**) obtenus *in vitro* (Tris 50 mM) et dans les cellules bactériennes.

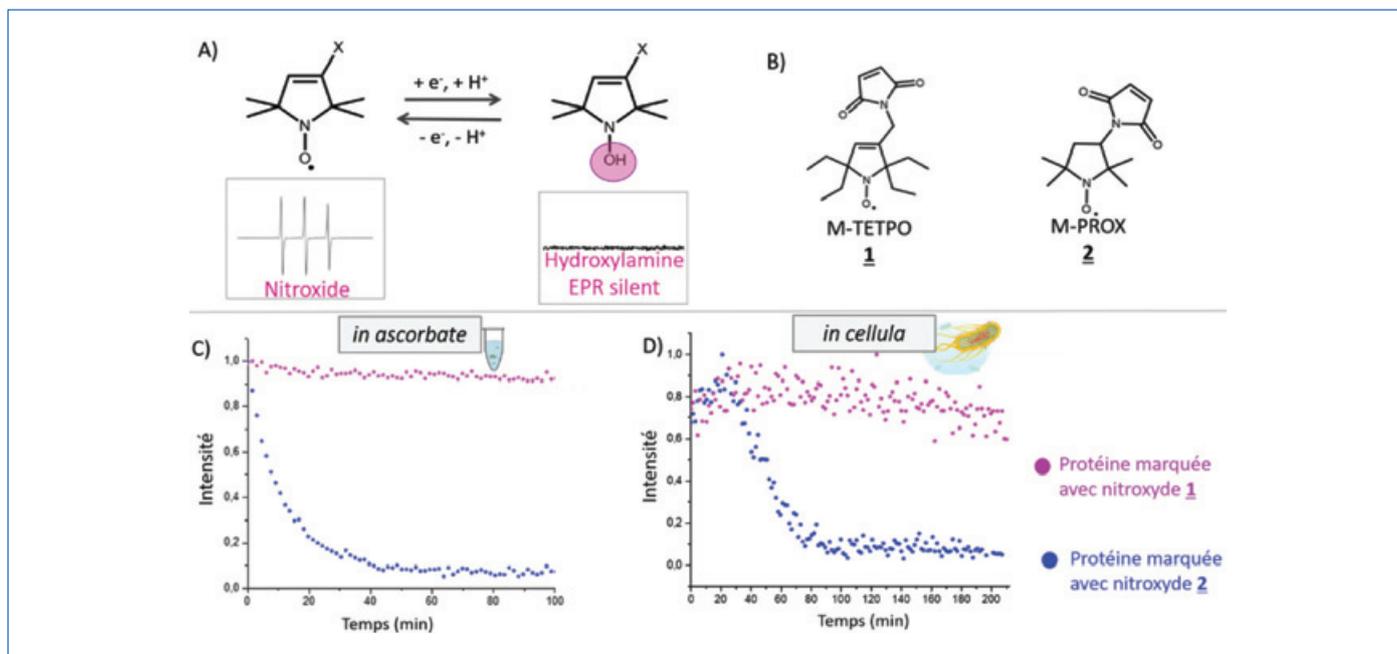


Figure 4 - A) Réaction de réduction d'un nitroxyde en son dérivé diamagnétique, une hydroxylamine. B) Structure d'une sonde paramagnétique de type nitroxyde résistante à la bioréduction « M-TETPO » **1** et d'une sonde commerciale sensible à la réduction Maleimido-Proxyl « M-PROX », **2**. Profils de réduction obtenus en mesurant l'amplitude du signal RPE au cours du temps pour une même protéine marquée soit avec le marqueur **1** (magenta), soit avec **2** (bleu), C) dans une solution d'ascorbate et D) dans des cellules d'*E. coli*.

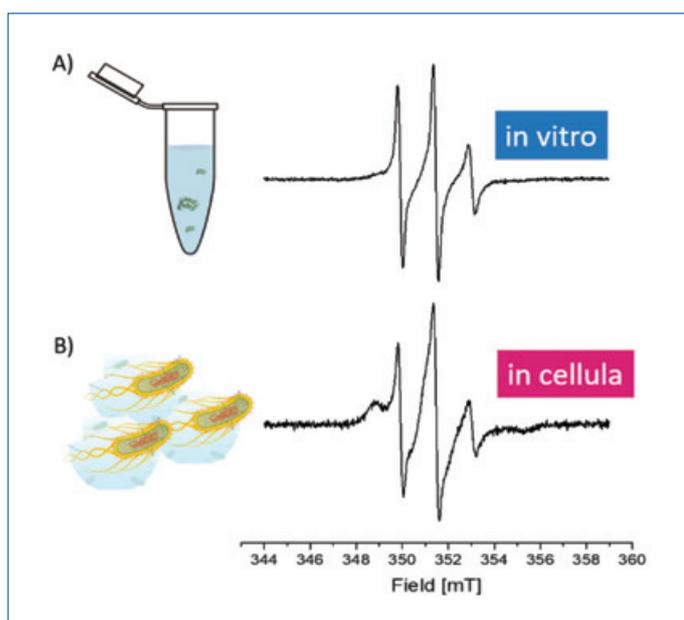


Figure 5 - Illustration d'un changement spectral d'une protéine marquée entre une situation *in vitro* et *in cellula*. Spectres RPE à température ambiante obtenus pour la protéine NarJ marquée avec M-TETPO (**1**) A) Tris 50 mM et B) électroporée dans des cellules d'*E. coli*. L'élargissement du spectre témoigne d'un environnement plus contraint de la sonde en milieu cellulaire.

Les formes spectrales obtenues apparaissent différentes : le spectre *in vitro* est caractéristique d'un nitroxyde ayant un régime de mobilité très rapide, similaire à celui observé pour des protéines ou des régions désordonnées. Dans les cellules, la forme du spectre indique un changement d'environnement du nitroxyde. En effet, le spectre RPE est plus « large » que le spectre RPE *in vitro*, indiquant une réduction de la mobilité de la sonde M-TETPO. Nous démontrons ainsi que le milieu intracellulaire contraint davantage la sonde, ce qui semble indiquer une structuration locale de la région d'étude induite par l'environnement intracellulaire.

Incorporation des protéines marquées dans les cellules

Une autre limitation actuelle de la RPE *in cellula* concerne l'efficacité de la méthode d'incorporation de la protéine marquée dans les cellules d'intérêt. En effet, après le marquage, la protéine doit être introduite dans les cellules d'intérêt. Plusieurs méthodes ont été proposées et sont en cours d'expérimentation et d'optimisation sur différents types cellulaires, telle la micro-injection, bien adaptée à des cellules de grande taille (~ 1 mm) comme les ovocytes de *X. laevis*. Pour des cellules plus petites (~ 50 μm pour des cellules humaines, ~ 2 μm pour des cellules de bactéries), l'incorporation par déstabilisation réversible de la membrane cellulaire via un choc osmotique ou un choc électrique (électroporation) est utilisée. Une approche alternative, récemment proposée par le groupe de S. Un et L. Tabares (Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), Saclay), est basée sur la biosynthèse de la protéine marquée directement dans les cellules. Celle-ci consiste à insérer, par manipulation génétique, dans la séquence de la protéine d'intérêt, un ou plusieurs groupes d'acides aminés capables de coordonner spécifiquement un ion métallique paramagnétique pouvant alors servir de sonde. Dans cette étude, le groupe d'acides aminés (YIDTNDGWIEGDEL) a été inséré aux deux extrémités d'une protéine modèle [11]. En particulier, il permet de lier spécifiquement des ions lanthanides trivalents via les résidus suivants : aspartate (D), glutamate (E), asparagine (N) et tryptophane (W). La protéine modifiée a été produite directement dans des cellules bactériennes (*E. coli*) et, en modulant les conditions de culture avec l'ajout du sel GdCl_3 , des ions Gd(III) (spin électronique $S = 7/2$) ont ainsi été incorporés aux deux extrémités de la protéine modèle. Des mesures de distance entre Gd^{3+} - Gd^{3+} ont pu être réalisées via RPE impulsionnelle (DEER) à haute fréquence (bande W, 94 GHz). Malgré la faible intensité des signaux, les auteurs ont pu mesurer la distribution de distance entre les deux ions Gd(III) directement *in cellula* et comparer ces résultats aux données *in vitro* [11].

La RPE *in cellula* : une approche en plein essor

Les exemples présentés ici montrent que la RPE *in cellula* est une approche en plein essor et dont la faisabilité pour des études structurales dans l'environnement cellulaire a été démontrée. Bien entendu, il reste encore du chemin à faire et des développements méthodologiques et techniques sont encore nécessaires. En particulier, dans un futur proche, nous pensons qu'il est nécessaire d'orienter une partie des efforts vers la conception de sondes paramagnétiques et d'acides aminés non naturels paramagnétiques caractérisés par des propriétés chimiques améliorées (par exemple, concernant leur stabilité dans l'environnement cellulaire) et par des signatures spectroscopiques différentes. Dans ce contexte, les développements actuels en chimobiologie dans le domaine de la modification chimique de protéines seront évidemment des atouts précieux pour lever ces limitations. Des efforts doivent être aussi déployés afin de rendre possible l'étude *in cellula* des interactions protéine-protéine ou protéine-ligand. Évidemment, les questions concernant la viabilité cellulaire et la localisation précise des protéines d'intérêt doivent également faire l'objet d'études expérimentales. En élargissant le regard sur d'autres techniques permettant également ce type d'études structurales au niveau cellulaire, notamment la RMN et la fluorescence, on comprend rapidement que toutes ces approches ont le potentiel de renouveler profondément l'étude des transitions structurales des biomolécules. Ces approches de chimobiologie visant à développer de nouveaux outils physico-chimiques pour étudier le vivant pourraient ainsi fournir des éléments fondamentaux pour comprendre le fonctionnement de la cellule et avoir un impact dans les développements biomédicaux actuels. Combiner ces techniques complémentaires est très certainement une voie à explorer dans le futur.

[1] B.D. Bennet *et al.*, Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*, *Nat. Chem. Biol.*, **2009**, 5, p. 593-599.

[2] F.-X. Theillet *et al.*, Physicochemical properties of cells and their effects on intrinsically disordered proteins (IDPs), *Chem. Rev.*, **2014**, 114, p. 6661-714; R. Quast, E. Margeat, Studying GPCR conformational dynamics by single molecule fluorescence, *Mol. Cell Endocrinol.*, **2019**, 1, 493, p. 110469; M. Kaplan *et al.*, Probing a cell-embedded megadalton protein complex by DNP-supported solid-state NMR, *Nat. Methods*, **2015**, 12, p. 649-652;

E. Luchinat, L. Banci, In-cell NMR in human cells: direct protein expression allows structural studies of protein folding and maturation, *Acc. Chem. Res.*, **2018**, 51, p. 1550-57.

[3] N. Le Breton *et al.*, Exploring intrinsically disordered proteins using site-directed spin labeling electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Front. Mol. Biosci.* **2015**, 2, 21; W.L. Hubbell *et al.*, Watching proteins move using site-directed spin labeling, *Structure*, **1996**, 4, p. 779-783.

[4] B. Joseph *et al.*, Selective high-resolution detection of membrane protein-ligand interaction in native membranes using trityl-nitroxide PELDOR, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, p. 11538-542; E.H. Abdelkader *et al.*, New Gd³⁺ spin label for Gd³⁺-Gd³⁺ distance measurements in proteins produces narrow distance distributions, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2015**, 6, p. 5016-21.

[5] a) E. Fournier *et al.*, Marqueurs de spin : des espions au cœur des protéines, *L'Act. Chim.*, **2019**, 443, p. 13-16; b) M. Martinho *et al.*, Nitroxide spin labels: fabulous spy spin for biostructural EPR applications, in *Electron Paramagnetic Resonance*, RSC, Londres, **2019**, 26, p. 66-88.

[6] M. Pannier *et al.*, Dead-time free measurement of dipole-dipole interactions between electron spins, *J. Magn. Res.*, **2000**, 142, p. 331-340.

[7] G. Jeschke, The contribution of modern EPR to structural biology, *Emerging Top. Life Sci.*, **2018**, 2, p. 9-18.

[8] B. Verhalen *et al.*, Energy transduction and alternative access of the mammalian ABC transporter P-glycoprotein, *Nature*, **2017**, 543, p. 738-741; A. Giannoulis *et al.*, Two closed ATP- and ADP-dependent conformations in yeast Hsp90 chaperone detected by Mn(II) EPR spectroscopic techniques, *PNAS*, **2020**, 117, p. 395-404; M. Palombo *et al.*, The relationship between folding and activity in UreG, an intrinsically disordered enzyme, *Sci. Rep.* **2017**, 7, 5977.

[9] A. Bonucci *et al.*, In-cell EPR: progress towards structural studies inside cells, *ChemBioChem*, **2020**, 21, p. 451-460; A. Nyenhuis *et al.*, Evidence for the supramolecular organization of a bacterial outer-membrane protein from in vivo pulse electron paramagnetic resonance spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, 142, p. 10715-722; M. Qi *et al.*, Gd(III)-PyMTA label is suitable for in-cell EPR, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, p. 15366-378; A. Martorana *et al.*, Probing protein conformation in cells by EPR distance measurements using Gd³⁺ spin labeling, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, p. 13458-465.

[10] M. Lorenzi *et al.*, Conformational selection underlies recognition of a molybdoenzyme by its dedicated chaperone, *PLoS One*, **2012**, 7, e49523.

[11] F.C. Mascali *et al.*, Using genetically encodable self-assembling Gd(III) spin labels to make in-cell nanometric distance measurements, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55, p. 11041-043.

Annalisa PIERRO, doctorante, **Alessio BONUCCI**, postdoctorant, **Valérie BELLE**, professeure, et **Elisabetta MILEO***, chargée de recherche au CNRS, Aix-Marseille Université, CNRS, Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines (BIP), IMM, Marseille.

* emileo@imm.cnrs.fr



Toute l'actualité de la
Société Chimique de France

et bien plus...

societechimiquedefrance.fr

Chimie thérapeutique et chémobiologie

Un dialogue et une synergie constante au bénéfice de la santé humaine

Résumé La chimie thérapeutique, ou médicinale, et la chémobiologie sont deux branches voisines des sciences chimiques appliquées au vivant. Elles sont classées dans deux divisions de l'IUPAC : « Chemistry and Human Health » (div. VII) et « Organic and Biomolecular Chemistry » (div. III). La Société de Chimie Thérapeutique présente dans cet article son point de vue et comment ces disciplines aux finalités respectives différentes se nourrissent mutuellement pour l'étude du vivant et la découverte de nouveaux médicaments.

Chimie thérapeutique et profil du produit

La chimie thérapeutique, appelée aussi chimie médicinale, est une discipline « intégrative » basée sur la chimie et manipulant des concepts issus des sciences biologiques, médicales, pharmaceutiques et du numérique, pour inventer, découvrir, concevoir, identifier et préparer des composés biologiquement actifs, étudier leur métabolisme, comprendre leur mode d'action moléculaire et construire des relations structure-propriétés permettant de sélectionner un candidat médicament utilisable chez l'homme. La chimie thérapeutique ne se résume donc pas uniquement à la synthèse de composés bioactifs. Il s'agit d'une discipline dont l'origine remonte aux premiers principes actifs synthétiques découverts au milieu du XIX^e siècle. Elle est en perpétuelle évolution au rythme de la compréhension des pathologies et de la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Depuis 2019, sous l'impulsion de la Fédération européenne de chimie médicinale et de chémobiologie (EFMC), la chimie thérapeutique est enfin reconnue pour son rôle prépondérant dans le panorama mondial scientifique en étant inscrite en tant que telle dans les panels de l'ERC (European Research Council). L'objectif de la chimie thérapeutique est de développer des molécules visant à corriger, modifier ou restaurer une fonction biologique au sein d'un être humain, ou d'établir un diagnostic médical (figure 1). Ce processus est long, complexe, dynamique et interconnecté (figure 2). Il intègre pour chaque étape une approche « multicritères ». C'est un vrai défi car il n'existe pas de méthodes standards et chaque étape a des conséquences sur le profil final du médicament. Les molécules



Figure 2 - Place de la chimie thérapeutique dans le processus de découverte du médicament, pour répondre à un besoin thérapeutique avec un profil produit.

doivent répondre à un besoin thérapeutique unique, caractérisé par une pathologie, une population cible, d'éventuelles co-morbidités et co-traitements (figure 2). Ce besoin permet de formuler un profil fonctionnel du produit (« target product profile », TPP) qui rassemble des critères pour y répondre : mode d'action, efficacité clinique, distribution, formulation, voie et fréquence d'administration, etc. Le chimiste thérapeutique traduit ces critères en propriétés moléculaires mesurables [1] (figure 2). Par exemple, un TPP pour un produit diagnostique sera différent de celui pour un produit pour l'asthme ou un topique dermatologique (figure 3) : les propriétés moléculaires devront être adaptées et leurs importances relatives reconsidérées. En fin de développement, les propriétés ultimes du principe actif conditionneront l'usage effectif raisonné (précautions d'emploi, interactions...) du médicament (figure 2).

Le défi de la conception d'un médicament

Le chimiste médicinal est un architecte moléculaire qui doit intégrer des données issues de nombreuses disciplines pour concevoir des molécules bioactives, les optimiser et les prioriser pour répondre au TPP. Il interagit donc avec de nombreux professionnels : biologiste structural, biochimiste, clinicien, pharmacologue, biologiste animal, chémobiologiste, biologiste cellulaire, bioanalyste, modélisateur, informaticien, statisticien, mais aussi, galéniste, responsable de propriété intellectuelle, toxicologue et même écotoxicologue. Il doit comprendre et mesurer dans de nombreux modèles les interactions de ses composés avec une grande variété de

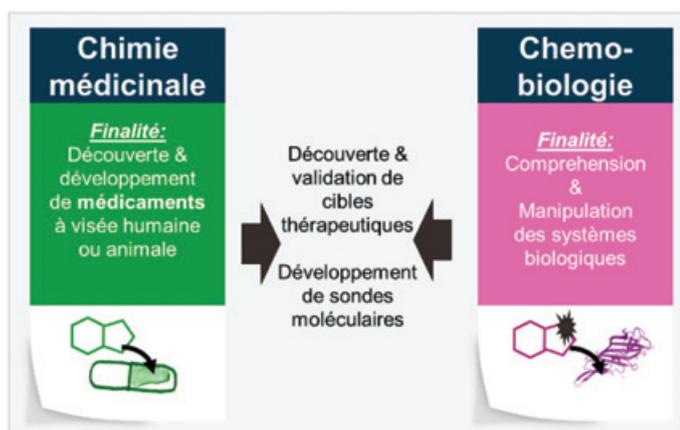


Figure 1 - Finalités et applications de la chimie médicinale et de la chémobiologie.

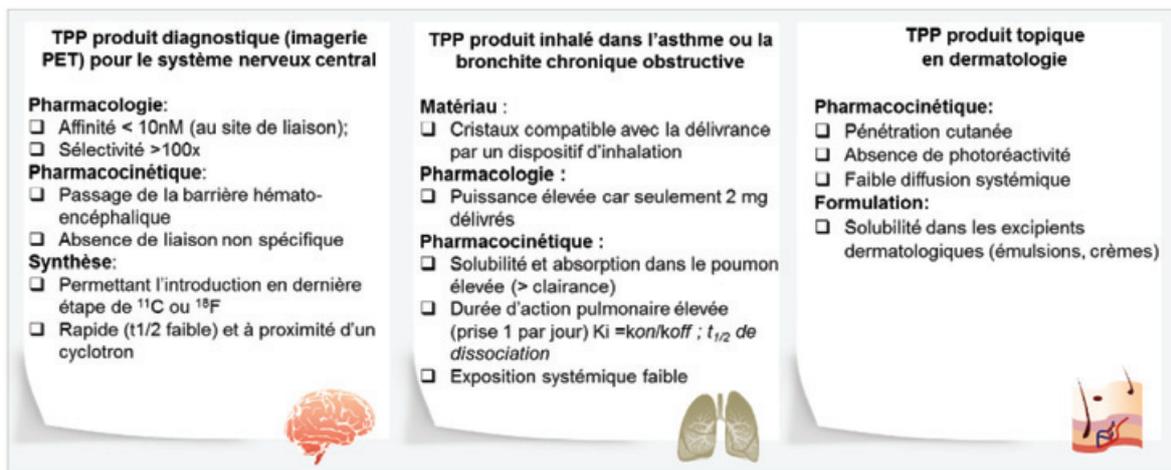


Figure 3 - Exemples de TPP (« target product profile »).

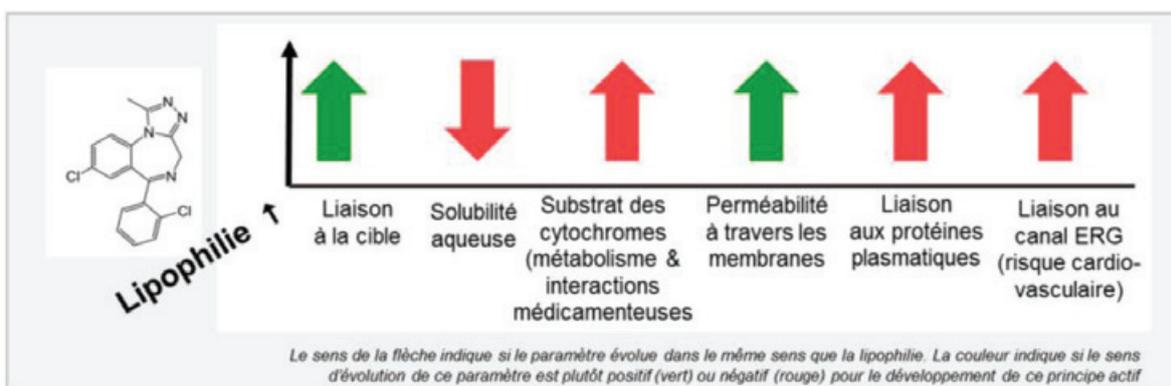


Figure 4 - Toutes les propriétés sont entrelacées dans la structure. Exemple de la lipophilie.

structures chimiques du vivant : l'eau, les membranes lipidiques, les biomolécules. Il optimise la structure pour lui conférer les propriétés physico-chimiques souhaitées, la puissance et l'efficacité par rapport à la cible visée, la cinétique d'association-dissociation, tout en évitant les interactions indésirables avec des protéines induisant des effets secondaires rédhibitoires ou des interactions médicamenteuses. À cette fin, le chimiste médicinal dispose des compétences en synthèse organique pour concevoir les structures et les voies de synthèses efficaces.

Toutes les propriétés, qu'elles soient physico-chimiques (solubilité, état cristallin, point de fusion), pharmacodynamiques (mode d'action, puissance, sélectivité) ou pharmacocinétiques (métabolisme, distribution) sont intrinsèquement entrelacées dans la structure chimique (figure 4). Ainsi, l'ajustement d'une propriété de la molécule en changera d'autres (figure 4). Guider la conception à travers tous les écueils potentiels pour aboutir à un candidat médicament (qui est le meilleur compromis entre tous) est donc un ensemble de tâches extrêmement complexes.

L'évolution du métier de chimiste thérapeutique

En réponse à la révolution génomique, l'introduction des technologies à haut débit (criblage biologique et synthèse parallèle) mais également la chémo-informatique, les nouvelles stratégies de découvertes de molécules actives (« fragment-based », « phenotypic screening », « DNA-encoded libraries », etc.), le répertoire des outils et le métier

du chimiste médicinal ont fortement évolué. Depuis 2014, 60 % des molécules approuvées sont toujours des petites molécules et 60 % d'entre elles représentent des avancées majeures (« breakthrough therapies »), en particulier en oncologie et pour des pathologies à fort besoin médical (hépatite C, mucoviscidose) [2]. Les petites molécules présentent un avantage majeur en ce qu'elles permettent de maîtriser des propriétés clés comme la durée d'action, la pénétration dans les tissus, l'aptitude à être formulées pour de nombreuses voies d'administration (orale, topique...) [3]. Ces dernières années, le répertoire structural des molécules thérapeutiques s'est considérablement étendu et a permis de moduler des cibles pharmacologiques qui ne pouvaient l'être avant, comme les interactions protéine-protéine, mais aussi l'ARN [4]. Historiquement, l'innovation en chimie thérapeutique s'est focalisée sur la conception de nouvelles entités moléculaires permettant la différenciation du médicament par rapport aux traitements existants. Elle incorpore maintenant également la validation des cibles et le décryptage du mécanisme d'action (MOA) des molécules. La validation de nouvelles cibles consiste en la preuve expérimentale du lien causal entre le fonctionnement de la cible et le phénotype de la maladie, au-delà du simple lien d'association génétique, et était initialement apportée par des méthodes d'inactivation expérimentale (ko, siRNA). La chimie apporte désormais, avec les sondes pharmacologiques (inhibiteurs, activateurs), des outils pertinents pour valider une cible dans un organisme modèle, avec l'avantage d'un mode d'action qui préfigure celui d'un futur médicament [5].

Spécificités de la chémobiologie et apports à la chimie thérapeutique

La chémobiologie rassemble des experts des disciplines biologiques, chimiques, bioinformatiques pour créer des molécules-sondes pour étudier et comprendre les processus biologiques en visualisant ou en interagissant avec les structures du vivant (protéines, sucres, ARN, membranes biologiques). La mission de la chémobiologie diffère donc mais est grandement complémentaire de celle de la chimie thérapeutique. À cette première mission s'ajoute aussi le développement de méthodologies de synthèses fonctionnant dans un contexte biologique. Le champ d'application s'étend également à tout le règne vivant, largement au-delà de la biologie humaine.

Chimie thérapeutique et chémobiologie évoluent sur des échelles de temps et un contexte économique différents. En chimie thérapeutique, le temps se compte en dizaines d'années et la stratégie de dépôt de brevet, essentielle pour l'exploitation future du médicament, est différente de celle nécessaire pour valoriser les outils de chémobiologie.

En chémobiologie, on cible encore principalement les modèles cellulaires, plus rarement les organes ou les organismes entiers, mais des avancées importantes en chimie *in vivo* ont été réalisées ces dernières années. Le pont entre le modèle animal et la clinique n'est pas requis, alors que pour amener un principe actif chez l'homme, il faut le valider dans des modèles proxi animaux. Ceci nécessite de vérifier que la cible thérapeutique a le même rôle chez l'homme et dans le modèle et que la molécule a la même efficacité, ce qui peut être un défi si l'homologie de séquence est peu conservée.

La sélectivité des molécules vis-à-vis de la cible est cruciale en chémobiologie pour interpréter les résultats biologiques. En chimie thérapeutique, la sélectivité est importante vis-à-vis des protéines qui pourraient induire de la toxicité, des variations inter-individuelles et des interactions médicamenteuses, mais conditionnée à l'effet souhaité (on peut tolérer, voire rechercher une activité sur des cibles apparentées).

Les outils de la chémobiologie ont fait et font évoluer la chimie thérapeutique en proposant de nouvelles cibles thérapeutiques mais aussi de nouveaux assemblages structuraux pharmacologiquement actifs. Les méthodes de chémoprotéomique ou biophysiques permettent, dans des stratégies dites de « reverse pharmacology », d'identifier les cibles cellulaires d'un composé actif dans un test phénotypique [6] et de valider l'engagement des cibles visées par les molécules [7-8]. Ces apports sont critiques dans les étapes précoces du processus de « drug discovery ». Le développement de sondes moléculaires, en complément de l'inactivation génétique des cibles, permet d'identifier de potentiels points de départ pour la conception et l'optimisation d'un futur médicament. Également, la chémobiologie étend le panel de structures (« new chemical modalities ») avec par exemple les « antibody drug conjugates » (ADC), PROTAC (« protein targeting chimeras »), dérivés de l'ARN, etc., qui peuvent être des outils essentiels pour moduler des cibles « atypiques », le panel de réactions biocompatibles (comme dans les synthèses guidées par la cible) [9] ou de motifs structuraux permettant de modifier de manière covalente une cible protéique [10].

Inversement, la chimie thérapeutique permet, grâce à la synthèse organique et aux études des relations structure-activité et structure-propriétés, d'améliorer la qualité des sondes chimiques découvertes par la chémobiologie afin d'en faire de bons points de départ pour la découverte de médicaments et des outils pharmacologiques utilisables à terme non plus seulement *in vitro* mais *in vivo*. Cette contribution s'accompagne d'une redéfinition des caractéristiques requises pour une sonde pharmacologique (en termes de dose-réponse, durée d'action, de disponibilité d'analogues inactifs comme contrôles et de propriétés pharmacocinétiques, etc.). Ainsi, pour les étapes précoces de sélection de cible et de découverte de mode d'action des composés bioactifs, les frontières entre chimie thérapeutique et chémobiologie s'estompent de plus en plus. Au sein des laboratoires académiques et industriels de « drug discovery », il n'est pas rare de voir ces deux métiers coexister.

Tenant compte de ces constats, la Société de Chimie Thérapeutique (SCT) a œuvré depuis plus d'une dizaine d'années, et continuera à œuvrer, au dialogue entre chimistes thérapeutiques et chémobiologistes [11]. À l'avenir, tout en préservant les spécificités de ces deux disciplines, il sera nécessaire d'accroître encore leur visibilité et de renforcer les synergies pour accélérer la découverte des médicaments du futur au bénéfice des patients.

[1] M.A. Murcko, What makes a great medicinal chemist? A personal perspective, *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*, p. 7419-424.

[2] B. Huck, It's a small-molecule world: medicinal chemistry challenges and opportunities for the next decade, *Int. Symp. EFMC-ISMC*, **2018**, Ljubjana (SI).

[3] I. Hartung, Quo vadis small molecule cancer therapeutics?, *RICT – 55th Int. conf. on medicinal chemistry*, **2019**, Nantes.

[4] E. Valeur *et al.*, New modalities, technologies, and partnerships in probe and lead generation, *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*, p. 9004-29.

[5] I. Gashaw, *et al.*, What makes a good drug target?, *Drug Discov. Today*, **2011**, *16*, p. 1037-43.

[6] Ezetimibe, levetiracetam par exemple.

[7] S. Lundgren, Focusing on relevance: CETSAs-guided medicinal chemistry and lead generation, *ACS Med. Chem. Lett.*, **2019**, *10*, p. 690-693.

[8] K.M. Comess *et al.*, Emerging approaches for the identification of protein targets of small molecules, *J. Med. Chem.*, **2018**, *61*, p. 8504-535.

[9] D. Bosc *et al.*, Kinetic target-guided synthesis: reaching the age of maturity, *J. Med. Chem.*, **2020**, *63*, p. 3817-833.

[10] M. Gehring *et al.*, Emerging and re-emerging warheads for targeted covalent inhibitors, *J. Med. Chem.*, **2019**, *62*, p. 5673-724.

[11] Pour plus d'information sur les actions de la SCT depuis 2008 en lien avec la chémobiologie : http://www.sct-asso.fr/wa_files/SCT_2010_20years_20of_20Chemical_20Biology_EFMC.pdf

Rebecca DEPREZ-POULAIN^{*a}, professeure, présidente de la Société de Chimie Thérapeutique^c, **Frédéric SCHMIDT**^b, PhD, et **Brigitte LESUR**, PhD, vice-présidente de la Société de Chimie Thérapeutique^c.

^aInserm U1177, Université de Lille, Institut Pasteur de Lille.

^bInstitut Curie, PSL Université Paris, CNRS UMR 3666 – Inserm U1143, Paris.

^cwww.sct-asso.fr

* rebecca.deprez@univ-lille.fr

Outils d'identification de sondes chimiques pour une meilleure compréhension du vivant

Résumé La perturbation d'un système biologique complexe par des molécules chimiques s'est avérée une approche gagnante pour une meilleure compréhension du vivant. Cette approche fait appel à des techniques à l'interface de la chimie et de la biologie qui seront détaillées dans cet article. Deux exemples concrets permettent d'illustrer comment le criblage de molécules a permis de résoudre une question biologique et de développer des composés à haute valeur ajoutée.

La chémogénomique, ou génétique chimique, a permis de faire des avancées considérables dans la caractérisation de processus biologiques complexes. Il est question ici d'utiliser des petites molécules pour venir perturber un système biologique d'intérêt au même titre qu'une mutation génétique ou qu'une inhibition de l'expression génétique par un oligonucléotide (siRNA). Comment identifier de telles molécules ? Cette identification s'appuie bien souvent initialement sur le criblage à haut débit (« high-throughput screening », HTS) ou à haut contenu (« high content screening », HCS), qui consiste à tester un très grand nombre de molécules et à sélectionner les molécules actives. Ces approches de criblage ont longtemps été exploitées par les industries pharmaceutiques comme étape préalable au développement de nouveaux médicaments.

Dès le début des années 2000, la communauté académique française s'est emparée de cette opportunité qu'offrait la chémogénomique pour comprendre ou moduler des processus biologiques impliqués dans des pathologies. Ainsi des chimistes, notamment M. Hibert et S. Rault, ont commencé à collecter les molécules synthétisées dans leur laboratoire dans le but de leur donner une seconde vie et de promouvoir les collaborations entre chimistes et biologistes. Cette initiative a conduit à la création de la Chimiothèque Nationale [1-2], qui regroupe maintenant plus de 70 000 composés et 15 000 extraits naturels issus de 45 laboratoires.

De la même façon, les avancées technologiques ont permis à des laboratoires académiques de se doter de plateformes robotisées pour cribler des collections de molécules afin de sélectionner des ligands spécifiques et affins. Le criblage peut être réalisé sur des cibles clairement identifiées ; on sélectionne les petites molécules capables de se lier à des protéines purifiées et de perturber leur fonction (ou leur interaction avec d'autres protéines). Il peut aussi être réalisé sur cellules entières ou sur des organismes modèles ; on l'appelle alors criblage phénotypique car il permet de sélectionner les molécules capables d'induire un phénotype d'intérêt. Dans tous les cas, l'étape préalable est la mise au point d'un test fiable et miniaturisé qui sera réalisé dans des plaques multipuits (de 96 à 1 536). Ce test sera bien évidemment développé en fonction de l'équipement disponible sur la plateforme et devra répondre à des critères stricts de reproductibilité et de robustesse. La communauté académique française autour du criblage et de la découverte de sondes chimiques bioactives s'est fédérée il y a une dizaine d'années en créant le réseau « ChemBioScreen », qui regroupe un ensemble d'équipes de recherche et de plateformes de criblage directement impliquées dans ces approches [3]. Ainsi, plusieurs plateformes

ont une expertise reconnue dans la mise au point de tests basés sur différents modes de détection optique (HTS) ou sur de la microscopie (HCS) et sont capables de réaliser des criblages de chimiothèques composées de quelques centaines jusqu'à des dizaines de milliers de molécules.

Le réseau de chémoinformaticiens organisé en GDR de chémoinformatique (maintenant GDR « BigDataChim ») a aussi joué un rôle essentiel dans ces approches de criblage. En effet, certaines campagnes de criblage ne peuvent pas être réalisées sur des milliers de composés pour des raisons de coût. Le criblage *in silico* permet alors de restreindre le nombre de composés à cribler expérimentalement. La constitution de sous-ensembles représentatifs de la diversité moléculaire (exemple de la Chimiothèque Nationale Essentielle, 1 040 molécules) ou consacrés à une classe de cibles biologiques (kinase, GPCR, inhibiteurs d'interactions protéine-protéine) a été déterminante pour augmenter le ratio de touches issues du criblage [4-5]. Enfin, l'utilisation des résultats de criblages expérimentaux comme sets d'apprentissage dans une approche d'intelligence artificielle peut permettre de comprendre/prédire des activités biologiques, et donc de sélectionner les molécules à cribler expérimentalement.

Plus de 385 criblages de la Chimiothèque Nationale ont été menés, conduisant à plus de 1 500 publications, 84 brevets et sept startups. Les activités de service sont dorénavant intégrées au sein d'une infrastructure de recherche nommée « ChemBioFrance » [6]. Parmi ses nombreux succès, le criblage a généré de nombreuses collaborations, a conduit à l'identification de 65 molécules bioactives qui ont permis de valider une cible *in cellula* ou *in vivo* [7]. Nous avons choisi d'illustrer ces progrès à travers deux exemples : le premier ayant conduit à une avancée en recherche fondamentale et le second ayant conduit à la création d'une startup.

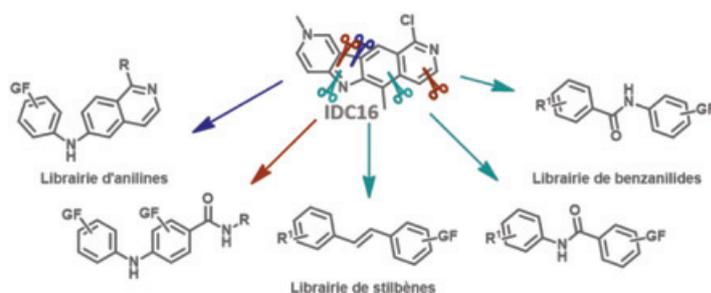
Le premier exemple s'appuie sur un projet visant à identifier des composés antiviraux à large spectre en cherchant non pas des molécules qui vont agir sur le virus, mais des composés qui vont cibler les cellules hôtes, en stimulant leur réponse antivirale innée. Il s'agit ici de rechercher des composés induisant l'expression des ISG (« interferon-stimulated genes »). Ces derniers constituent un vaste ensemble de gènes antiviraux et sont activés en particulier par les interférons de type I (IFN-I). Les IFN-I contrôlent l'expression de plusieurs centaines de gènes codant pour des facteurs capables d'inhiber l'entrée, la réplication et la propagation des virus à différentes étapes de leur cycle. Pour identifier des molécules pharmacologiques capables de mimer l'action des IFN-I, un test phénotypique [8] a été mis au point, basé sur des cellules humaines transfectées

avec un gène rapporteur luciférase sous contrôle d'un élément de réponse aux IFN-I. Cette séquence est classiquement présente dans le promoteur des gènes (ISG) induits par les IFN-I. Ces cellules rapportrices ont été utilisées pour cribler différentes chimiothèques comprenant plusieurs dizaines de milliers de molécules, dont la Chimiothèque Nationale. Cette approche a permis de montrer que des composés inhibant la biosynthèse des pyrimidines induisent un stress cellulaire qui potentialise la réponse aux IFN-I et confère à ces molécules des propriétés antivirales remarquables. Ainsi, un lien fonctionnel jusqu'alors inconnu a pu être établi entre l'homéostasie du pool de nucléosides intracellulaire et la réponse antivirale innée [8-10].

Le second exemple concerne la recherche de modulateurs d'épissage alternatif appliqués à l'ARN viral du VIH. En effet, le virus utilise la machinerie d'épissage alternatif de l'hôte pour préparer les ARN messagers nécessaires à sa réplication. Le criblage de la Chimiothèque Curie-CNRS (qui fait partie de la Chimiothèque Nationale) a été effectué grâce à un test phénotypique faisant aussi appel au gène rapporteur de la luciférase. Cependant, la molécule identifiée (nommée IDC16) possède une structure hétérocyclique plane responsable de propriétés d'intercalation dans l'ADN, toxiques pour la cellule [11-12]. Pour éviter cette toxicité, des molécules analogues plus flexibles ont été préparées par synthèse parallèle à l'Institut Curie (voir figure).

Ainsi, grâce à des efforts de synthèse, des molécules prometteuses ont été obtenues et ont permis de créer une startup en 2008. Cette société, nommée Abivax [13], a achevé en 2015 des essais cliniques en phase 2a dans le domaine du VIH [14] et mène actuellement des phases cliniques dans le domaine de l'inflammation (phase 3 en rectocolite hémorragique et phase 2b en maladie de Crohn et polyarthrite rhumatoïde prévues en 2022). L'identification de la cible, le complexe de liaison de la coiffe de l'ARN (« cap binding complex »), a été réalisée à l'aide d'un outil chimique. Celui-ci est un composé trifonctionnel comportant le principe actif, un groupement photoactivable générant un lien covalent avec la cible et une fonction reportrice permettant la capture (« pull-down ») du complexe covalent drogue-cible [14].

Les molécules identifiées, aussi appelées touches, sont des outils pour comprendre et perturber un phénotype ou peuvent à travers un long processus conduire à des candidats-médicaments. Ces succès n'auraient pas été possibles sans les liens étroits entre les communautés de chimistes et de biologistes. Bien sûr, il reste des défis importants. Le premier concerne la diversification des composés testés pour une plus grande couverture de l'espace chimique. Dans ce contexte, les composés originaux émanant de laboratoires de synthèse organique ne travaillant pas à l'interface chimie biologie représentent une diversité moléculaire nouvelle et riche et devraient intégrer la collection nationale. La Chimiothèque Nationale a aussi pour projet de synthétiser des châssis moléculaires innovants proposés par intelligence artificielle pour combler des espaces chimiques vacants. Le second défi porte sur l'annotation des résultats du criblage afin de permettre dans le futur d'affiner des modèles de prédiction de chémoinformatique et de mieux choisir les composés à cribler ainsi que les touches à développer. Pour le criblage, notamment dans le domaine des antimicrobiens, le problème est de trouver des touches capables de passer à travers la ou les membranes en fonction de l'organisme étudié. Ainsi, des criblages combinant un test biochimique sur une cible bien



Préparation de bibliothèques d'analogues de IDC16 par synthèse parallèle robotisée.

identifiée dans un contexte cellulaire (appelé « target-based whole cell screening ») sont de plus en plus mis en place ; ils permettent de résoudre le problème de la perméabilité tout en s'affranchissant de la recherche de la cible, qui reste dans le cas d'un criblage phénotypique une étape difficile à franchir. L'utilisation de sondes multifonctionnelles issues de la touche, comme celle présentée dans le second exemple, est une stratégie d'intérêt. Cette approche dite « activity-based protein profiling » [15] a déjà fait ses preuves, mais la découverte et l'amélioration de ces outils de chémo-biologie restent nécessaires et permettront l'accélération de cette validation de nouvelles cibles. Dans le domaine des anticancéreux (mais pas uniquement), le développement de tests sur des sphéroïdes et des organoïdes est très prometteur car ils permettent de mieux approcher la complexité de la tumeur ou du tissu considéré.

- [1] M.F. Hibert, French/European academic compound library initiative, *Drug Discov.*, **2009**, *14*, p. 723-725.
- [2] F. Mahuteau-Betzer, The French National Compound Library: advances and future prospects, *Med. Sci.*, **2015**, *31*, p. 417-422.
- [3] www.chembioscreen.fr
- [4] N. Bosc *et al.*, Fr-PPIChem: an academic compound library dedicated to protein-protein interactions, *ACS Chem. Biol.*, **2020**, *15*, p. 1566-574.
- [5] S. Millhas *et al.*, Protein-protein interaction inhibition (2P21)-oriented chemical library accelerates hit discovery, *ACS Chem. Biol.*, **2016**, *11*, p. 2140-148.
- [6] <https://chembiofrance.cn.cnr.fr/fr>
- [7] <https://chembiofrance.cn.cnr.fr/fr/success-stories>
- [8] M. Lucas-Hourani *et al.*, Inhibition of pyrimidine biosynthesis pathway suppresses viral growth through innate immunity, *PLoS Pathog.*, **2013**, *9*, e1003678.
- [9] P.O. Vidalain *et al.*, Stimulation of the antiviral innate immune response by pyrimidine biosynthesis inhibitors: a surprise of phenotypic screening, *Med. Sci.*, **2015**, *31*, p. 98-104.
- [10] M. Lucas-Hourani *et al.*, Original chemical series of pyrimidine biosynthesis inhibitors that boost the antiviral interferon response, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2017**, *61*, e00383-17.
- [11] J. Soret *et al.*, Selective modification of alternative splicing by indole derivatives that target serine-arginine-rich protein splicing factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, p. 8764-769.
- [12] N. Bakkour *et al.*, Small-molecule inhibition of HIV pre-mRNA splicing as a novel antiretroviral therapy to overcome drug resistance, *PLoS Pathog.*, **2007**, *3*, p. 1530-539.
- [13] www.abivax.com/?lang=fr
- [14] N. Campos *et al.*, Long lasting control of viral rebound with a new drug ABX464 targeting Rev - mediated viral RNA biogenesis, *Retrovirology*, **2015**, *12*, 30.
- [15] H. Fang *et al.*, Recent advances in activity-based probes (ABPs) and affinity-based probes (AfBPs) for profiling of enzymes, *Chem. Sci.*, **2021**, *12*, p. 8288-310.

Florence MAHUTEAU-BETZER,

Directrice de recherche CNRS, Institut Curie, UMR 9187-U1196, Université Paris-Saclay.

Hélène MUNIER-LEHMANN,

Chargée de recherche Inserm, Institut Pasteur, Unité de Chimie et Biocatalyse, Paris.

* florence.mahuteau@curie.fr ; hmunier@pasteur.fr

Petites molécules pour grande médecine

Résumé La chémobiologie est la discipline qui se situe au carrefour de la chimie et de la biologie, cette science où la chimie apporte une compréhension atomique et moléculaire de la biologie. La chémobiologie s'impose comme un art par lequel l'invention de nouvelles structures moléculaires et la maîtrise de la réactivité permettent de perturber, d'analyser et de manipuler les processus biologiques. Les origines de la discipline, son évolution et quelques exemples historiques sont décrits dans cet article.

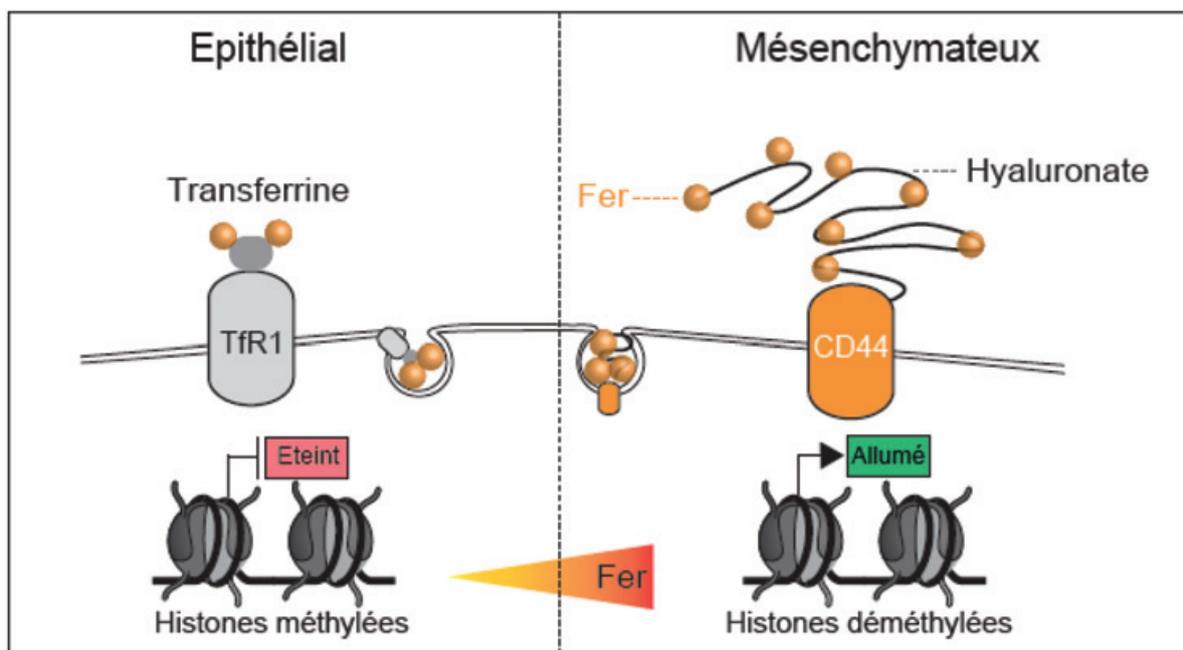
La chimie est une science de créateurs, celles et ceux qui savent comment reprogrammer la matière en agencant des atomes les uns avec les autres afin de produire de nouvelles entités et de nouvelles fonctions. C'est ainsi la science qui permet de briser et de former des liaisons entre éléments de manière contrôlée. C'est aussi celle qui unit la physique et la biologie, passant de la structure même de l'atome, brique élémentaire de la matière, à celle des molécules qui constituent les organismes vivants. La place des chimistes est donc unique en science, car ils peuvent non seulement comprendre la nature du monde mais aussi l'impacter par la création de nouveaux matériaux, de nouveaux catalyseurs, par la manipulation de nouvelles sources d'énergie, ou encore par le développement de nouveaux médicaments.

À la fin des années 1940, Linus Pauling eut une influence majeure mettant en évidence de manière précoce (avant la découverte de la double hélice de l'ADN) l'existence d'une erreur moléculaire dans la séquence d'une protéine, l'hémoglobine, qui donnait lieu à une pathologie hématologique, la drépanocytose [1]. De cette étude naquirent la notion de maladie moléculaire (« molecular disease ») et le concept de médecine moléculaire (« molecular medicine »). Ce dernier repose sur l'idée que la correction moléculaire d'une erreur par des moyens chimiques, biochimiques ou génétiques aurait pour conséquence une compensation du processus pathologique, la célèbre approche basée sur une hypothèse (« hypothesis-driven approach »). Cinq ans plus tôt, dans un courrier de George Beadle à Linus Pauling furent déjà esquissés les contours de la « chemical biology », où la chimie et la biologie s'entremêlent, contrairement à une discipline « à l'interface » n'impliquant ni l'une ni l'autre, différence sémantique suffisamment importante pour être soulignée. Cette discipline fut introduite plus tard comme « le travail en chimie qui a une pertinence biologique, ainsi que le travail en biologie qui nécessite un apport de la chimie afin d'être résolu » [2].

Ce n'est que dans les années 1980 que Stuart Schreiber, incontestablement l'un des chimistes les plus créatifs de sa génération, marqua la biologie en profondeur. Alors qu'il venait d'achever la synthèse totale de la plériplanone B, une phéromone sexuelle produite par une espèce de cafard, son équipe perçut l'impact réel de la chimie sur la biologie en étudiant l'effet du produit naturel sur cet insecte [3]. Cette étude permit à Schreiber de comprendre l'importance d'une stratégie orthogonale à celle annoncée par Pauling, une approche basée sur la découverte (« discovery-based

approach »). Ne connaissant pas le mécanisme d'action de la molécule bioactive, Schreiber comprit rapidement qu'il ne pouvait adopter une approche basée sur une hypothèse de travail mais qu'il devait exploiter le phénotype induit par la molécule pour en découvrir la cible, si bien qu'il se rapprocha conceptuellement des méthodes utilisées en biologie moderne, en particulier celles de la génétique classique (« forward genetics »), qui consistent à identifier le produit d'un gène responsable d'un phénotype, ou en d'autres termes la cible biologique d'une molécule active. C'est en modifiant chimiquement la rapamycine et la trapoxine que Schreiber isola plus tard mTOR et une déacétylase d'histone [4-5], travaux qui ont permis le développement de nouveaux médicaments dérivés de la rapamycine, et qui ont donné naissance à l'épigénétique. Ces travaux furent transformateurs, introduisant l'utilisation systématique de molécules biologiquement actives en qualité de sondes moléculaires pour perturber l'homéostasie cellulaire et identifier de nouveaux processus d'intérêts thérapeutiques. Il est intéressant de constater que Schreiber conduisit ses recherches seul avec son équipe, positionnant ainsi la chimie au centre de la biologie et de la médecine.

Pour notre part, inspirés par les travaux de Pauling, ceux de Woodward, de Lehn et de Schreiber, notre approche résulte essentiellement du mariage entre la réactivité en synthèse organique et la chimie supramoléculaire, afin de comprendre et parfois d'anticiper le phénotype induit par une petite molécule. Cela nous a notamment permis de mettre en évidence le rôle universel du fer et du cuivre dans la régulation de la plasticité épigénétique et métabolique, au cours des processus métastatiques, inflammatoires et immunitaires [6]. Notre équipe a mis en évidence la dépendance des cellules cancéreuses persistantes (aussi nommées cellules souches cancéreuses dans un autre contexte) au fer et au cuivre, ainsi que la vulnérabilité de ces cellules à la mort par ferroptose. Ces travaux nous ont permis de développer de nouvelles molécules dérivées de produits naturels, capables de bloquer le fer dans le compartiment lysosomal, forçant ainsi ces cellules à produire et accumuler des espèces réactives de l'oxygène toxiques. Par ailleurs, nous avons découvert le rôle ubiquitaire de la glycoprotéine transmembranaire CD44 dans l'internalisation de fer complexé aux hyaluronates, une voie endocytaire exacerbée dans les cellules à fort pouvoir métastatique (voir *figure*). Ces travaux ont également permis de montrer que le fer est un facteur limitant dans la régulation épigénétique de la plasticité cellulaire impliquée dans la résistance et les processus métastatiques. Notre immersion dans la biologie du cancer



Rôle de la glycoprotéine transmembranaire CD44 dans l'internalisation de fer. Les cellules cancéreuses dans l'état épithélial maintiennent un niveau basal de fer modéré qui est internalisé par le couple transferrine et son récepteur membranaire TfR1. La marque d'histone répressive H3K9me2 est élevée et les gènes métastatiques sont réprimés au niveau transcriptionnel (éteint). Dans l'état mésenchymateux (métastatique), les cellules internalisent le fer lié aux hyaluronates par endocytose de son récepteur membranaire CD44. Les déméthylases dépendantes du fer réduisent le niveau de H3K9me2 qui conduit à une augmentation de l'expression des gènes mésenchymateux et métastatiques (allumé). Ainsi, la protéine membranaire CD44 régule l'expression des gènes au niveau du noyau en sur-régulant l'internalisation de fer.

à l'Institut Curie a fortement contribué à stimuler notre imagination et à identifier des questions engageantes dont les réponses pourraient conduire à des traitements innovants.

« *Nature is dominated by chemically favoured processes. While biology is prone to evolution, universal principles of physical chemistry are not (at least not on the same time scale). It is my opinion that life has evolved mechanisms to circumvent undesired chemistry. Therefore, it is sensible to exploit small molecules to unravel the many mysteries of cell biology* », tel est l'enseignement que nous avons tiré de nos nombreux échecs et rares succès.

[1] L. Pauling *et al.*, Sickle cell anemia, a molecular disease, *Science*, **1949**, *110*, p. 543-548.

[2] Chemical Biology, *Engineering and Science*, **1954**, *XVII*, p. 9-13.

[3] S.L. Schreiber, C. Santini, Cyclobutene bridgehead olefin route to the American cockroach sex pheromone, periplanone-B, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, p. 4038-39.

[4] S.L. Schreiber *et al.* A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex, *Nature*, **1994**, *369*, p. 756-758.

[5] S.L. Schreiber *et al.*, A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p, *Science*, **1996**, *272*, p. 408-411.

[6] R. Rodriguez *et al.*, CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis, *Nature Chem.*, **2020**, *12*, p. 929-938.

Raphaël RODRIGUEZ,

Directeur de recherche CNRS, Institut Curie, Paris.

* Raphael.Rodriguez@curie.fr

Les défis de la
Chimie

**Chimie et
VACCINS**

Mardi
28 Septembre
2021

Retrouvez l'intégralité du colloque en rediffusion sur la chaîne YouTube de la Fondation :

www.youtube.com/watch?v=eu6cuXYz0ns&list=PLvyl5fvd1nCmb2kftH3SAvJrBDSH2cLyl

Fondation de la Maison de la Chimie



L'apport de la chémobiologie à la biologie synthétique

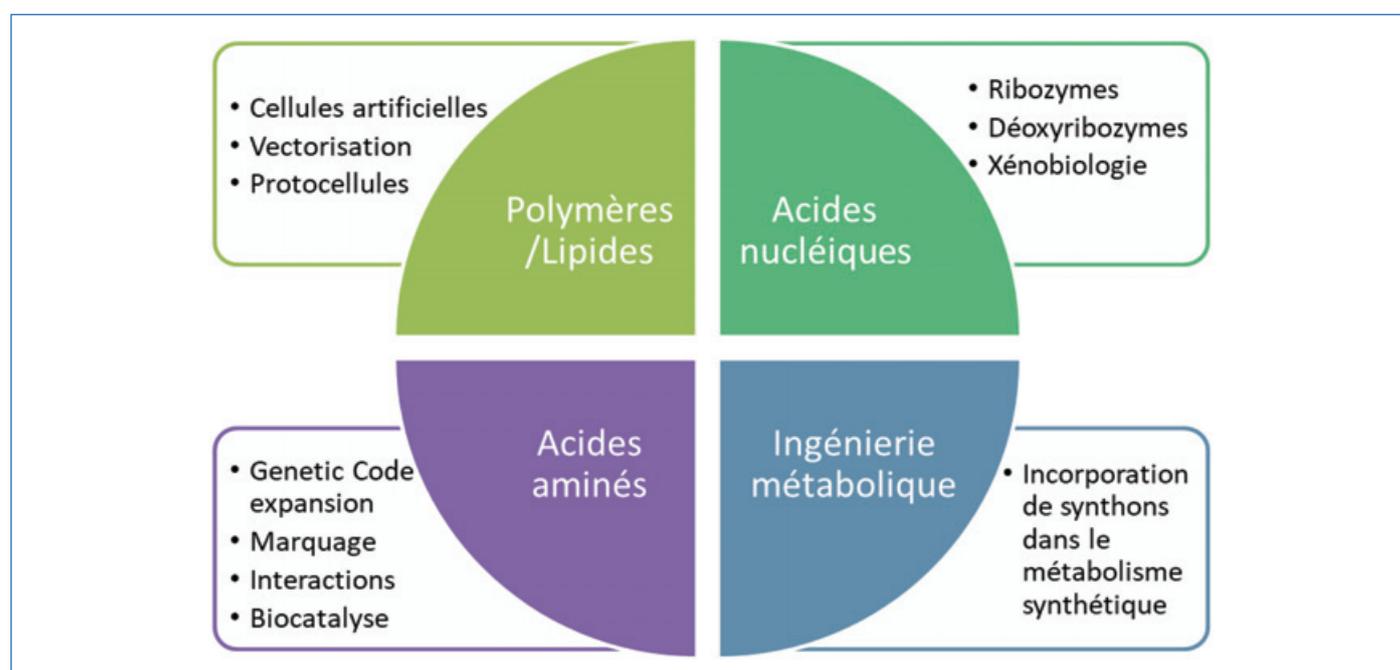
Résumé La biologie synthétique base ses fondations sur des principes d'ingénierie appliqués au vivant. Elle utilise des concepts et techniques issus d'autres disciplines, en particulier la chimie, pour modifier les propriétés fondamentales des macromolécules biologiques (acides nucléiques, protéines, etc.). Cette interaction entre les deux disciplines permet d'étendre le répertoire des fonctions biologiques tant pour des applications fondamentales que biotechnologiques.

La biologie synthétique – ou biologie de synthèse, par référence à la chimie de synthèse – a pour ambition de construire de nouveaux systèmes ou fonctions biologiques en utilisant des principes d'ingénierie. Dans les sciences fondamentales, il s'agit de tester et améliorer notre compréhension des principes gouvernant la biologie – comprendre les mécanismes fondamentaux du vivant en les construisant –, et dans les sciences plus appliquées (biotechnologies), l'idée est de construire de façon fiable des organismes accomplissant des fonctions biologiques complexes répondant à diverses applications.

Tant au niveau technique que conceptuel, la biologie synthétique est à l'interface des autres disciplines scientifiques. Les outils de construction et d'analyse du vivant font largement appel à la physique, la chimie, les mathématiques et l'informatique. Mais c'est véritablement au niveau des concepts que cette interdisciplinarité est la plus marquée : la biologie de synthèse essaie continuellement de s'extraire d'un dogme selon lequel la biologie serait une science à part en ce qu'elle permet difficilement de construire de façon rationnelle des systèmes biologiques artificiels, et au contraire tend à disséminer l'idée qu'un système biologique peut toujours être décomposé en systèmes élémentaires plus simples régis par les lois de la chimie et de la physique. Si les propriétés de ces éléments sont correctement décrites, dans un contexte

tenant compte des propriétés spécifiques des cellules qui les portent, alors il est possible de construire des systèmes biologiques ayant la somme des propriétés.

La chémobiologie construit les outils et concepts permettant de comprendre, au niveau moléculaire, les processus complexes du vivant. C'est donc une composante essentielle de la biologie synthétique. Dresser une liste complètement exhaustive des apports de la chémobiologie à la biologie synthétique serait l'objet d'une revue ; je vais essayer d'extraire les principaux domaines pour lesquels l'intrication entre les deux sciences a permis à la biologie synthétique des avancées spectaculaires. Une des premières publications à l'interface de ces deux disciplines date de 1990 [1]. Basée sur la synthèse chimique combinatoire de fragments d'ADN, Ellington et Szostak ont montré qu'il est possible de sélectionner, dans une banque combinatoire d'oligonucléotides, des molécules possédant des fonctions nouvelles de fixation de ligands, ouvrant la porte à toute une série de développements futurs de ces molécules appelées aptamères (voir dans ce numéro l'article de M. Hollenstein). Cette capacité de synthétiser chimiquement des molécules du vivant ou proches du vivant est complètement exploitée en biologie synthétique. On la retrouve notamment dans quatre grands domaines (voir *figure*) : les polymères et lipides, les acides nucléiques, les acides aminés, et enfin les précurseurs métaboliques.



Les apports de la chémobiologie dans les quatre grands domaines de la biologie de synthèse.

Polymères et lipides

Les polymères et lipides synthétiques sont par exemple utilisés pour servir d'interface entre un milieu extérieur et un milieu intérieur, définissant ainsi une protocellule (cellule synthétique rudimentaire). Les propriétés chimiques et physiques de ces polymères (fluidité, organisation, interface hydrophobe, etc.) sont donc essentielles. Ce domaine, en pleine expansion, est à la fois source de concepts pour comprendre comment les premières cellules vivantes se sont formées, mais également promoteur d'avancées techniques spectaculaires dans la construction de systèmes à l'interface entre vivant/non vivant. L'équipe de C. Danelon (Delft) travaille sur l'encapsulation dans les liposomes artificiels de systèmes capables d'assurer des étapes de réplication, transcription, traduction. En fonction des gènes introduits, son équipe a montré la capacité de ces liposomes à mimer des phénomènes comme la division cellulaire et la croissance membranaire [2].

Acides nucléiques

La synthèse chimique d'acides nucléiques constitue le socle sur lequel la quasi-totalité du génie génétique repose actuellement, que ce soit pour la synthèse d'oligonucléotides mais aussi, plus récemment, sur la synthèse de gènes sans laquelle la biologie synthétique ne pourrait pas avancer. Ces acides nucléiques synthétiques sont également utilisés comme enzymes synthétiques (ribozymes) et la capacité de construire des acides nucléiques non naturels offre bien sûr des développements encore plus spectaculaires à la fois dans le domaine de la (bio)catalyse, mais également dans la construction d'organismes pouvant incorporer d'autres bases de l'ADN que les quatre connues et universelles (xénobiologie) [3]. Par exemple, une bactérie comme *E. coli* peut incorporer un couple de bases modifiées capables de ne s'apparier qu'entre elles dans leur propre ADN. Leur croissance n'est donc efficace qu'en présence de ces bases modifiées et elles sont donc incapables de croître dans des environnements autres qu'un laboratoire ou un fermenteur, garantissant ainsi une absence de contamination environnementale accidentelle [4].

Acides aminés

Cette capacité de la chimobiologie à imaginer et construire des molécules synthétiques proches des briques fondamentales du vivant se retrouve également dans le domaine de l'ingénierie des protéines. Basé sur les travaux de Peter Schultz dans les années 1990 [5], l'incorporation d'acides aminés non canoniques dans les protéines a permis le développement de sondes moléculaires spécifiques pour la compréhension des relations structure-activité des protéines. Bien évidemment, la construction de biocatalyseurs enzymatiques non conventionnels, ayant incorporé des fonctions chimiques non présentes dans le vivant, à l'instar des acides nucléiques catalytiques, est en plein développement [6]. Ces avancées ont notamment permis des progrès importants en biologie structurale avec la possibilité d'introduire des paires de fluorophores dans des protéines pour mesurer de façon précise la distance entre deux domaines d'une protéine, notamment au cours de modifications structurales importantes [7].

Ingénierie métabolique

Enfin, il faut également mentionner le rôle de la chimobiologie dans l'ingénierie métabolique (construction de systèmes vivants capable de produire, de façon autonome,

des molécules naturelles ou artificielles). Beaucoup d'enzymes étant promiscuitaires – elles acceptent différents types de substrats –, l'ingénierie métabolique utilise cette capacité pour introduire des précurseurs, synthétisés chimiquement, et qui, une fois incorporés par l'hôte contenant la voie synthétique, donneront des molécules entièrement nouvelles, non atteignables par des systèmes vivants classiques [8]. Combiné avec l'utilisation de bases modifiées de l'ADN et d'acides aminés non canoniques, le répertoire déjà étendu de la catalyse enzymatique ne sera limité que par l'adaptabilité des systèmes vivants à accepter ces nouvelles molécules.

Comme nous venons de le voir, l'apport de la chimobiologie à la biologie synthétique est immense. Les concepts développés par la chimobiologie entrent parfaitement dans le champ de la biologie synthétique, notamment l'idée de moduler un processus biologique afin d'en appréhender le fonctionnement et de le modifier dans un but thérapeutique. La construction de fonctions synthétiques dans le vivant suppose donc une assez bonne connaissance des concepts mécanistiques de la chimie réactionnelle. Elles seront utilisées à la fois dans des aspects très fondamentaux de la biologie, notamment structurale, la génétique, la compréhension de l'évolution des êtres vivants, etc. Sur un plan plus appliqué, les propriétés nouvelles des catalyseurs construits avec les outils de la chimie offrent des possibilités infinies pour élaborer des molécules nouvelles basées sur les squelettes des substances naturelles. Le domaine de la pharmacie, notamment le « drug discovery », devrait énormément bénéficier de ces stratégies. Ces deux disciplines ont donc vocation à se rencontrer régulièrement autour de colloques communs et à promouvoir une vision chimique des processus vivants, base de la biologie synthétique.

[1] A.D. Ellington, J.W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, **1990**, 346, p. 818-822.

[2] D. Blanken *et al.*, Genetically controlled membrane synthesis in liposomes, *Nat. Commun.*, **2020**, 11, 4317 ; E. Godino *et al.*, Cell-free biogenesis of bacterial division proto-rings that can constrict liposomes, *Commun. Biol.*, **2020**, 3, 539.

[3] M. Nieto-Domínguez, P.I. Nikel, Intersecting xenobiology and neometabolism to bring novel chemistries to life, *ChemBioChem*, **2020**, 21, p. 2551-571.

[4] D.A. Malyshev *et al.*, A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet, *Nature*, **2014**, 509, p. 385-388.

[5] C. Noren *et al.*, A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science*, **1989**, 244, p. 182-188.

[6] T. Vornholt, M. Jeschek, The quest for xenobiotic enzymes: from new enzymes for chemistry to a novel chemistry of life, *ChemBioChem*, **2020**, 21, p. 2241-249.

[7] E.M. Brustad *et al.*, A general and efficient method for the site-specific dual-labeling of proteins for single molecule fluorescence resonance energy transfer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, 130, p. 17664-665.

[8] C. Ignea *et al.*, Orthogonal monoterpene biosynthesis in yeast constructed on an isomeric substrate, *Nat. Commun.*, **2019**, 10, 3799.

Gilles TRUAN,

Directeur de recherche, directeur du GDR 3699, Biologie de Synthèse et des Systèmes, TBI, Université de Toulouse, CNRS, INRAE, INSA, Toulouse.

* gilles.truan@insa-toulouse.fr

Analyses multidimensionnelles au service des biocarburants et des molécules biosourcées

Résumé Une stratégie inédite de fractionnement d'échantillon a été mise au point pour approfondir la connaissance des solutions générées lors de la production de biocarburants et de molécules biosourcées. Appliquée à deux types d'échantillon issus de la transformation biochimique ou thermochimique de paille de blé ou de bois, cette stratégie est adaptable selon les propriétés des produits étudiés et les informations recherchées. En suivant un guide méthodologique détaillé, il est possible d'orienter le choix des techniques de fractionnement pour parvenir à un détail moléculaire de mélanges chimiquement complexes. Ainsi, des séparations sélectives de familles chimiques sont accessibles par la combinaison pertinente de techniques complémentaires comme l'extraction liquide/liquide, la chromatographie de partage centrifuge ou la chromatographie d'exclusion stérique. Les fractions obtenues sont ensuite analysées par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution, décrivant chaque échantillon par des cartographies 3D riches en informations moléculaires.

Mots-clés Biomasse lignocellulosique, composés oxygénés, chromatographies, spectrométrie de masse haute résolution, couplages.

Abstract Multidimensional analyses for biofuels and biosourced molecules

A new sample fractionation strategy was developed to improve knowledge of solutions generated during the production of biofuels and biobased molecules. Applied to two types of sample resulting from biochemical or thermochemical transformation of wheat straw or wood, this strategy can be adapted to properties of products studied and according to information needed. By following a detailed methodological guide, choice of fractionation techniques can be directed to achieve molecular detail of chemically complex mixtures. Thus, selective separations of chemical families are accessible by relevant combination of complementary techniques such as liquid/liquid extraction, centrifugal partition chromatography or size exclusion chromatography. Fractions obtained are then analyzed by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry, describing each sample by 3D maps rich in molecular information.

Keywords Lignocellulosic biomass, oxygenated compounds, chromatographies, high-resolution mass spectrometry, hyphenated techniques.

Une recherche d'innovation motivée par la transition énergétique

L'augmentation de la consommation mondiale en énergie combinée à la raréfaction des ressources fossiles conduit à un intérêt croissant pour les sources d'énergie alternatives [1]. La conversion de la biomasse lignocellulosique (résidus forestiers, déchets agricoles, cultures dédiées) en biocarburants et molécules biosourcées représente une voie d'accès prometteuse à des énergies et des produits d'origine renouvelable [2-5] (voir encadré 1). La lignocellulose est un matériau composite synthétisé par les cellules végétales, constitué principalement de polymères de sucres (cellulose et hémicelluloses) et de macromolécules aromatiques de lignine [6].

Les produits liquides issus de la transformation biochimique ou thermochimique de biomasse lignocellulosique sont des matrices complexes qui sont à l'heure actuelle encore relativement méconnues, et dont une meilleure description détaillée de la composition chimique apporterait assurément un avantage crucial pour le développement de nouveaux procédés de production [7]. Ces produits de transformation montrent une importante diversité en fonctions chimiques oxygénées, lesquelles occupent une large gamme de polarités et de masses moléculaires. Ces caractéristiques complexifient l'analyse de ces produits car l'utilisation d'une technique unique ne permet pas la caractérisation de l'ensemble de l'échantillon. En effet, la chromatographie

Encadré 1

En France, les objectifs 2021 d'incorporation de biocarburants dans les carburants traditionnels sont à hauteur de 8,6 % pour les essences et 8,0 % pour les gazoles. À l'horizon 2028, la priorité sera donnée à la filière de production des biocarburants avancés (2^e génération) avec un objectif d'incorporation de 3,8 % dans les essences et de 2,8 % pour les gazoles [5].

en phase gazeuse (GC), couramment utilisée, est limitée pour les molécules thermosensibles et peu volatiles [8]. La partie moins volatile de la matrice peut être décrite à l'aide de la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS), mais cette technique utilisée seule ne permet pas de quantifier les espèces dans de bonnes conditions [9]. C'est pourquoi des approches multidimensionnelles mises en œuvre au moyen de couplages innovants ont été développées pour associer des techniques de séparation performantes à des détecteurs variés [10-12]. Bien que bénéficiant d'une constante amélioration apportée par les équipes de recherche à travers le monde, ces outils donnent encore à l'heure actuelle une vision incomplète de produits très complexes chimiquement. L'ajout d'une étape de fractionnement maîtrisée en amont de la chaîne analytique a donc été étudié, avec pour objectif d'apporter une organisation chimique pertinente des chromatogrammes. Dans les présents travaux de recherche, le fractionnement vise à investiguer l'ensemble de la matrice liquide oxygénée,

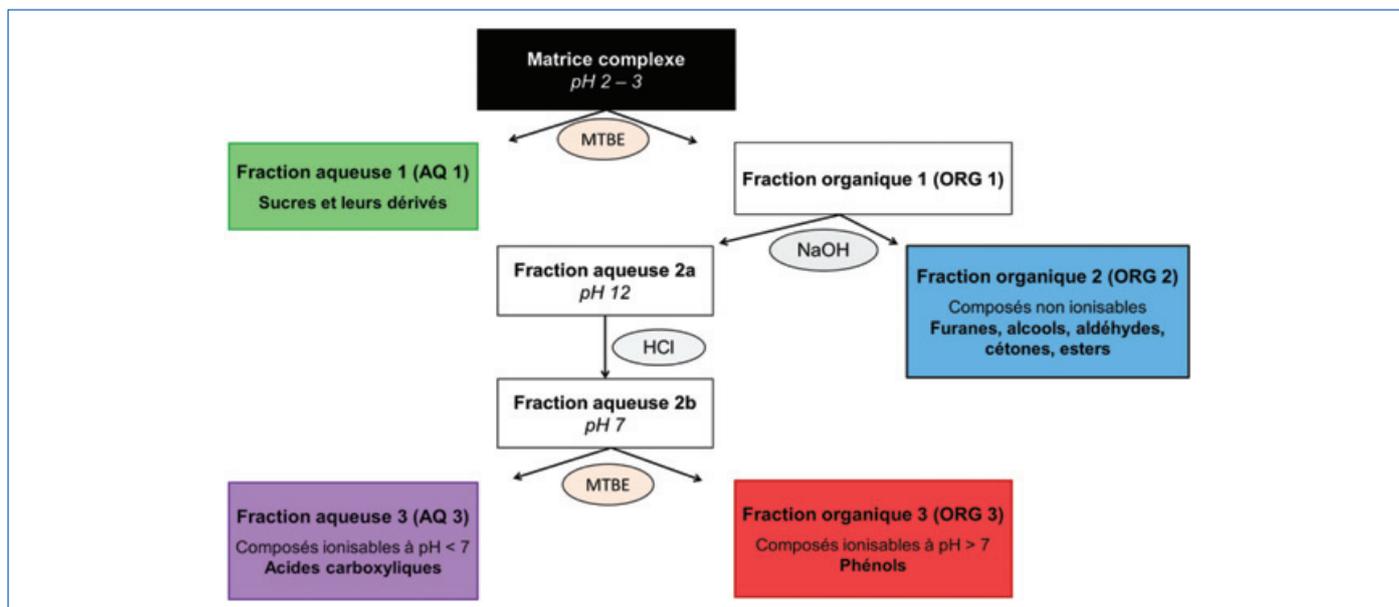


Figure 1 - Stratégie de fractionnement LLE sélectif de familles chimiques clés d'un échantillon issu de la transformation biochimique d'une paille de blé [13].

sans en modifier la composition. Deux axes de fractionnement en accord avec les propriétés des échantillons ont été étudiés : le premier basé sur le partage des composés entre deux phases liquides immiscibles, et un second basé sur la taille moléculaire des espèces constituant les produits de transformation de la biomasse lignocellulosique. Ces deux voies ont pour but de mettre en œuvre des mécanismes de séparation complémentaires.

Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu et d'évaluer la qualité du fractionnement, les fractions générées ont été analysées avec une même technique : la chromatographie en phase liquide à polarité de phase inversée couplée à un détecteur de spectroscopie ultraviolette et à la HRMS (RPLC-UV/HRMS). Deux exemples d'application ont été sélectionnés afin d'illustrer l'apport du fractionnement par partage pour l'analyse de matrices complexes, avec différents niveaux d'informations.

Du fractionnement maîtrisé aux analyses multidimensionnelles

Un fractionnement simple et sélectif peut être réalisé dans un premier temps à l'aide d'extractions liquide-liquide (LLE) qui reposent sur la séparation de composés en fonction de leur coefficient de partage entre deux phases liquides immiscibles. Deux leviers permettent de contrôler la sélectivité chimique des fractions générées : la nature du solvant utilisé, et le pH de la phase aqueuse, qui va dicter l'état d'ionisation des molécules.

Adapté aux phases aqueuses issues de la transformation par voie biochimique de biomasse lignocellulosique, un protocole LLE a été mis au point (figure 1, [13]). Il repose sur l'extraction sélective d'un échantillon aqueux avec un solvant organique, le méthyl *tert*-butyl éther (MTBE) [14]. L'étude du partage des familles de composés oxygénés permet de prédire la répartition chimique suivante :

- Fraction aqueuse 1 (AQ 1) : composés fortement hydrophiles comme les sucres et leurs dérivés ($\log P_{\text{octanol/eau}} < 0$).
- Fraction organique 2 (ORG 2) : composés non ionisés à pH 12 tels que les furanes, alcools, aldéhydes, cétones, esters ($pK_a > 14$).

- Fraction organique 3 (ORG 3) : composés ionisés à $7 < pH < 12$ comme les phénols (pK_a 9-10).

- Fraction aqueuse 3 (AQ 3) : composés ionisés à $pH < 7$ comme les acides carboxyliques (pK_a 4-5).

La qualité du fractionnement en termes de sélectivité chimique et de taux de récupération de la matrice a été contrôlée à l'aide de mélanges modèles représentatifs des familles chimiques ciblées [13]. À titre d'exemple, ce protocole LLE a été appliqué à un échantillon issu d'une transformation biochimique de paille de blé et les chromatogrammes RPLC-UV des fractions LLE obtenues sont représentés sur la figure 2.

La simplification des fractions améliore la résolution des chromatogrammes et permet d'obtenir des spectres UV et MS de meilleure qualité pour l'ensemble des composés. De plus, la levée des co-élutions et le retour à la ligne de base entre les pics chromatographiques permettent d'envisager une quantification des produits détectés ; un exemple a été réalisé à partir de la détection UV des composés phénoliques numérotés de 1 à 9 [13]. Cette quantification, jusque-là réalisée avec

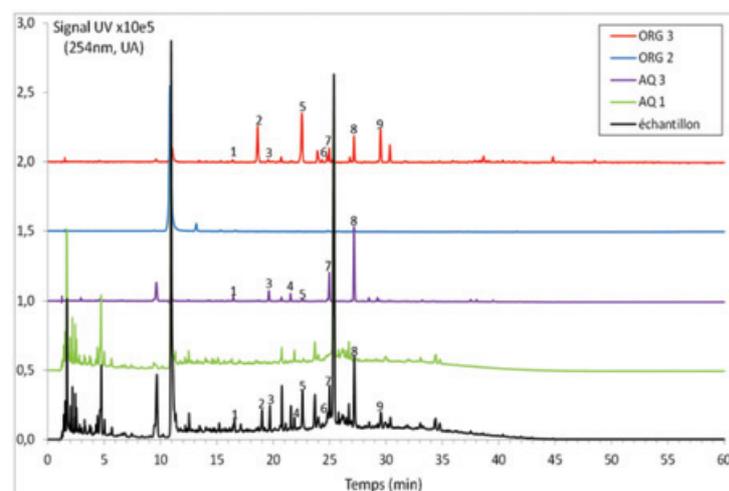
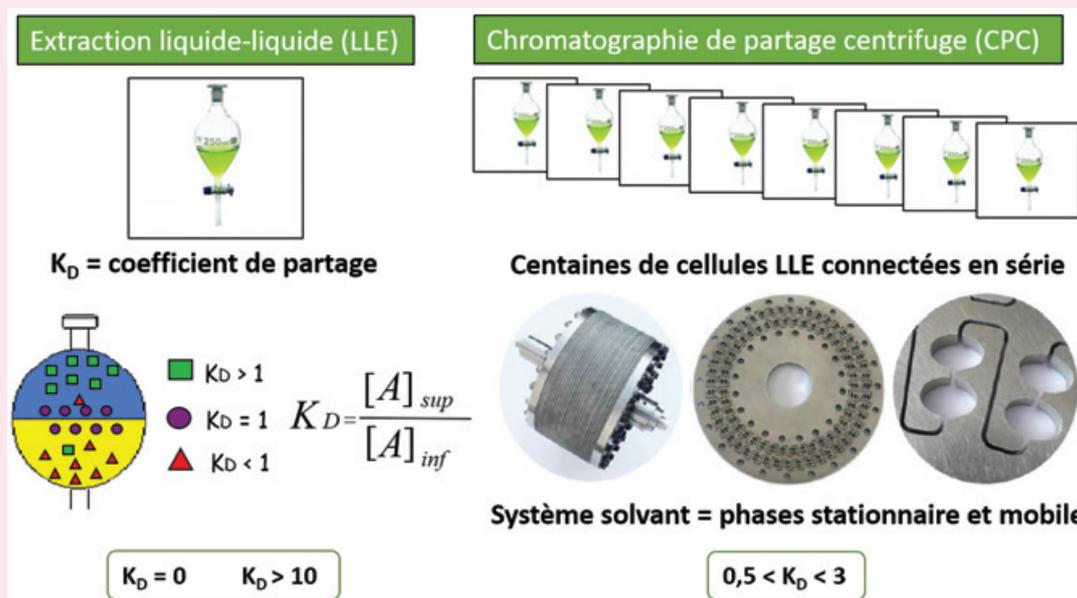


Figure 2 - Chromatogrammes RPLC-UV (254 nm) des fractions d'un échantillon issu de la transformation biochimique d'une paille de blé : (1) acide hydroxybenzoïque, (2) hydroxybenzaldéhyde, (3) acide vanillique, (4) acide syringique, (5) vanilline, (6) syringaldéhyde, (7) acide coumarique, (8) acide férulique, (9) coniféraldéhyde [13].

Encadré 2

Chromatographie de partage centrifuge

En chromatographie de partage centrifuge (CPC), la phase mobile et la phase stationnaire sont deux phases liquides immiscibles en équilibre (système solvant). La phase stationnaire est maintenue dans la colonne (rotor) grâce à une force hydrostatique formée par un champ centrifuge. La phase mobile est alors pompée au travers de la phase stationnaire et les solutés sont séparés en fonction de leur coefficient de partage entre les deux phases. L'instrumentation CPC met en œuvre plusieurs centaines de cellules d'extraction connectées les unes aux autres en série, ce qui permet d'atteindre des efficacités de séparation supérieures à la LLE. La CPC présente également d'autres avantages comme la modularité du système solvant et une importante capacité de charge, ce qui en fait une technique préparative de choix [16-17].



une détection MS, était sujette à des effets de matrice du fait de la complexité des échantillons [14]. Enfin, le classement chimique des fractions LLE a contribué à l'analyse structurale de molécules non décrites dans ce type d'échantillon à l'aide de la spectrométrie de masse haute résolution en tandem (RPLC/HRMS/MSⁿ) [15]. Ainsi, ce fractionnement simple et sélectif apporte des informations importantes avec peu de moyens analytiques.

Approches multidimensionnelles pertinentes pour l'étude d'échantillons complexes

Lorsque le nombre de composés à caractériser augmente, un plus grand pouvoir de séparation est nécessaire. La chromatographie de partage centrifuge (CPC, voir encadré 2) peut alors être déployée comme technique de fractionnement pour bénéficier d'une efficacité plus importante que la LLE, tout en conservant un système sans support solide (risque limité d'adsorptions irréversibles).

Dans cette étude, plusieurs modes chromatographiques ont été utilisés pour reproduire de manière automatisée le classement chimique obtenu en LLE, en exploitant l'efficacité chromatographique supplémentaire de la CPC. Pour cela, la connaissance *a priori* des coefficients de partage dans le système solvant MTBE/eau a permis de prédire trois zones de séparation par élution isocratique, déplacement des espèces ionisables et extrusion de la phase stationnaire (figure 3).

La stratégie repose sur la maîtrise du pH de la phase mobile, modifiée par paliers pour éluer sélectivement les familles chimiques en fonction de leur pKa. Pour contrôler ce paramètre clé, un modèle prédictif de l'évolution des

concentrations au sein de la colonne CPC a été développé [13]. La méthodologie a été éprouvée sur molécules modèles et sur un échantillon complexe issu de la voie thermo-chimique [18].

Afin d'augmenter le pouvoir de séparation, l'intégralité des fractions collectées en CPC a été analysée à l'aide d'une seconde dimension RPLC qui bénéficie d'une plus grande efficacité de séparation (approche « comprehensive »). Ce couplage CPC×RPLC a été réalisé de façon hors ligne afin de limiter les compromis entre les deux dimensions de séparation, et ainsi bénéficier d'une capacité de pics maximale. En plus du gain en séparation offert par l'approche bidimensionnelle, l'analyse a bénéficié en outre de trois modes de détection complémentaires pour la représentation des cartographies: détection UV et détection MS avec ionisation électrospray à polarité négative (ESI⁻) et positive (ESI⁺) (figure 4).

Les cartographies 2D obtenues augmentent la quantité d'informations disponibles par rapport à une analyse monodimensionnelle (1D). Selon une même approche multidimensionnelle, un fractionnement par taille moléculaire a été développé à l'aide de la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) en couplage en ligne ou hors ligne avec l'analyse RPLC-UV/HRMS (non présenté ici) [19]. Le premier critère de comparaison des cartographies 2D est le nombre de pics détectés qui est doublé pour les échantillons les plus complexes [18-19]. Dans l'exemple illustré dans la figure 5, le nombre de formules brutes identifiées a augmenté de 73 par RPLC à 111 par SEC×RPLC ou CPC×RPLC pour un échantillon issu de la conversion biochimique d'une paille de blé, de 105 par RPLC à 246 (SEC×RPLC) et 149 (CPC×RPLC) pour un échantillon issu de la transformation thermo-chimique d'un bois [13].

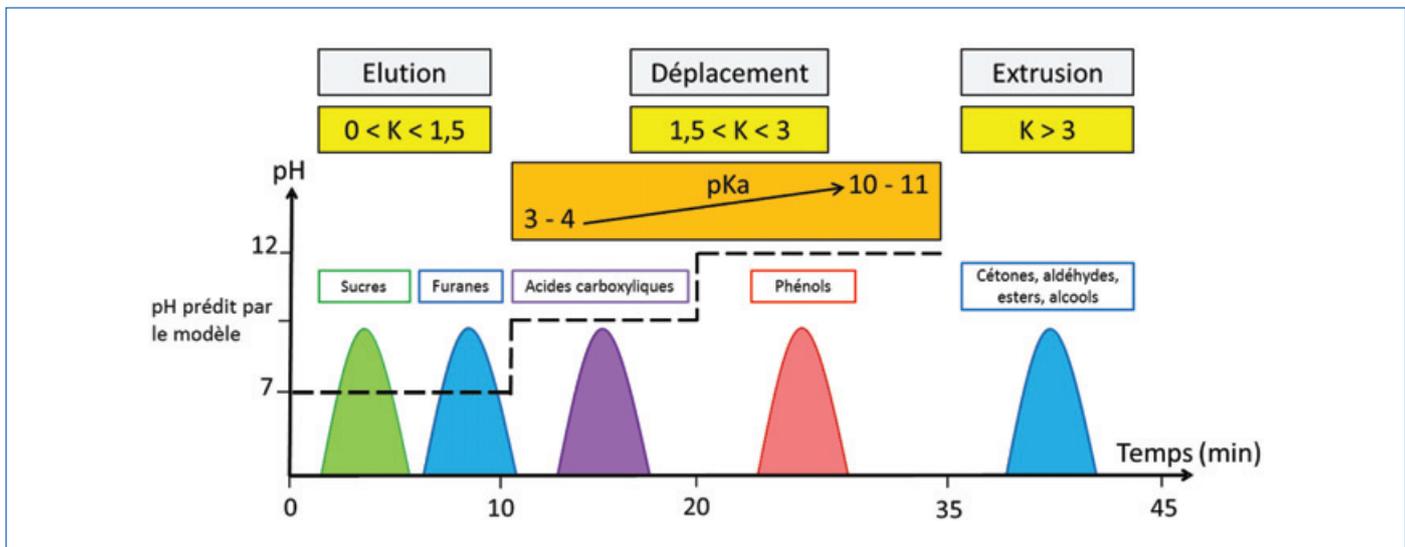


Figure 3 - Stratégie de fractionnement CPC en mode élution, déplacement et extrusion, basée sur : le coefficient de partage K et la constante d'acidité pKa des solutés, le pH de la phase mobile CPC, et le temps de rétention des composés dans la phase stationnaire CPC [18].

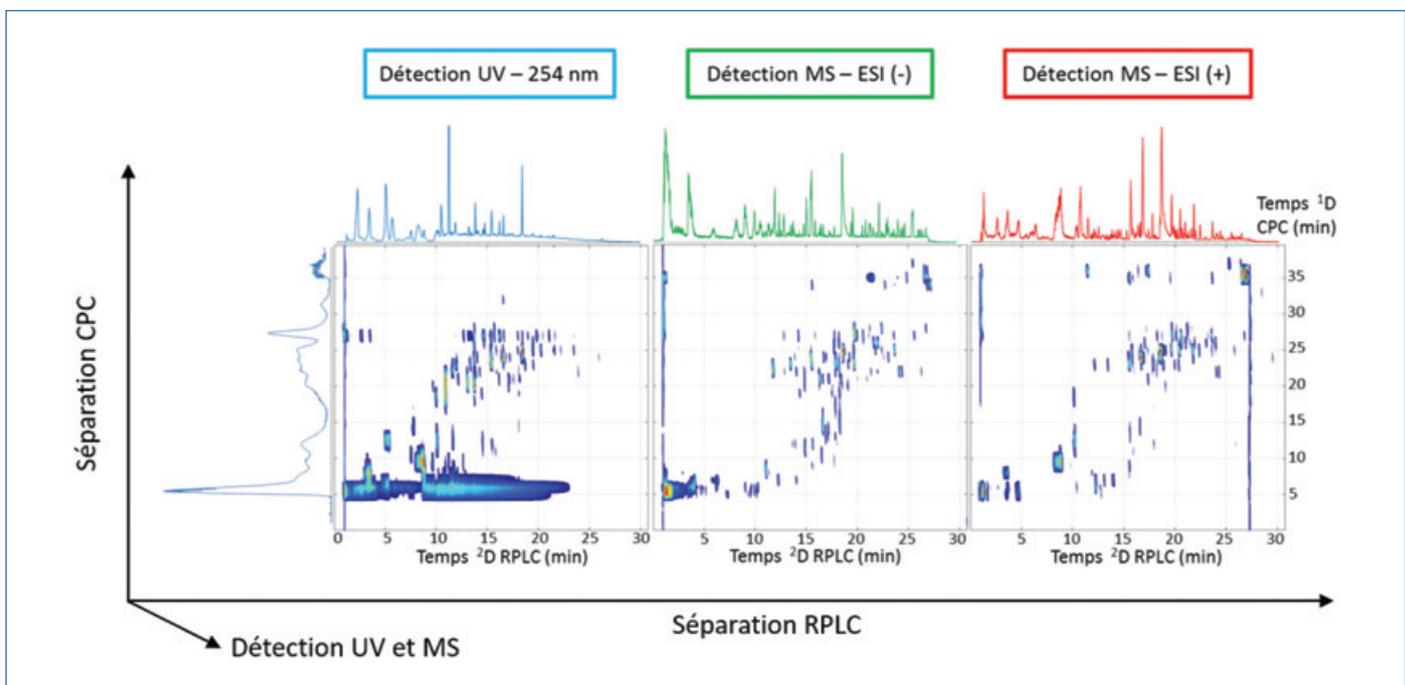


Figure 4 - Cartographies obtenues par le couplage hors ligne CPC×RPLC-UV/HRMS appliqué à un échantillon issu de la transformation thermo-chimique de bois [18].

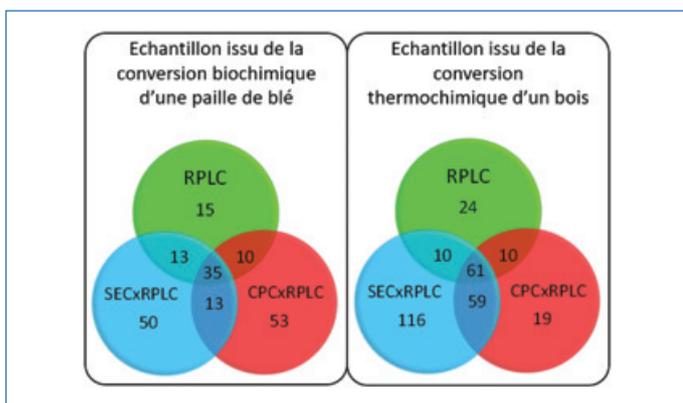


Figure 5 - Diagrammes de Venn des formules brutes détectées en RPLC 1D, SEC×RPLC et CPC×RPLC : exemples de deux échantillons issus de la transformation biochimique d'une paille de blé ou d'une transformation thermo-chimique de bois [13].

La levée des co-élutions améliore nettement la qualité des spectres de masse, ce qui est avantageux pour l'attribution de formules brutes en HRMS [19]. Cette approche bidimensionnelle permet d'identifier les réponses dans chaque mode de détection pour tirer avantage de leur complémentarité. Dans cette optique, les cartographies CPC×RPLC et SEC×RPLC apportent des informations inédites pour la comparaison d'échantillons et une meilleure compréhension de leur réactivité pour un procédé donné. La simplification des fractions permet également d'améliorer les conditions de quantification (effets de matrices limités, retour à la ligne de base) [13]. Enfin, l'organisation chimique souhaitée en première dimension est essentielle pour l'interprétation des données 2D en orientant le choix des familles chimiques. Cet avantage est particulièrement important pour améliorer l'identification structurale au sein des matrices oxygénées [15].

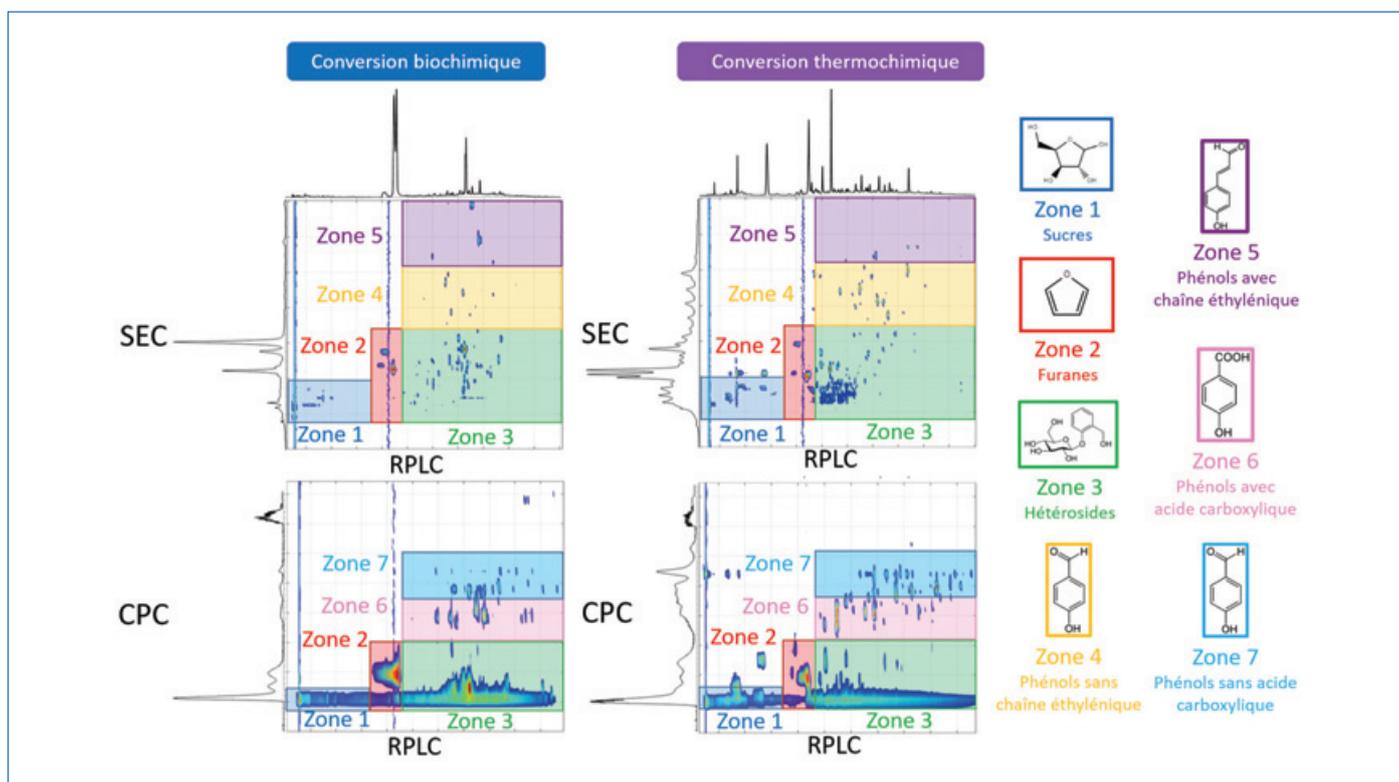


Figure 6 - Zones d'élution identifiées dans les cartographies SEC×RPLC et CPC×RPLC [13].

Comparaison des techniques : vers une stratégie analytique raisonnée

Au-delà de l'augmentation mesurée du nombre de composés détectés [13], les approches bidimensionnelles CPC×RPLC et SEC×RPLC ont été comparées en considérant l'organisation chimique de chacune des trois dimensions. Les données à disposition pour effectuer ces regroupements sont les temps de rétention des composés modèles et des molécules identifiées au sein des échantillons issus des voies biochimique et thermochimique (figure 6).

Les zones 1 à 7 indiquées sur les cartographies avec détection UV de la figure 6 sont représentatives de structures chimiques simples qui dictent la rétention suivant les dimensions RPLC, CPC et SEC. Les molécules utilisées pour illustrer chaque zone sont proposées à titre d'exemple.

La zone 1 correspond aux sucres comme le glucose et le xylose, regroupés au début du chromatogramme pour les trois techniques. Dans la zone 2, les furanes tels que le furfural ou l'hydroxyméthylfurfural se positionnent en début de gradient RPLC, dans la zone d'élution en CPC et dans la zone intermédiaire en SEC. Les hétérosides constitués d'une partie sucre (ose) et d'une partie phénolique (aglycone) sont retrouvés dans la zone 3. Ils sont retenus en RPLC par leur partie aglycone, ont un partage intermédiaire entre les sucres et les furanes en CPC et sont élués après les furanes en SEC. Les zones 4 et 5 sont spécifiques aux cartographies SEC×RPLC. La zone 4 correspond aux phénols non liés à une chaîne éthylénique tels que l'acide syringique, le syringaldéhyde ou la vanilline. La zone 5 est spécifique des phénols liés à une chaîne éthylénique, comme le coniféraldéhyde, l'acide férulique ou l'acide coumarique. Enfin, les zones 6 et 7 concernent uniquement les cartographies CPC×RPLC et la présence ou l'absence d'une fonction acide carboxylique. Les molécules comportant une fonction acide sont retrouvées dans la zone 6 en CPC : c'est le cas de l'acide syringique, l'acide férulique

et l'acide coumarique. Les phénols qui ne portent pas de fonction acide sont élués dans la zone 7 : syringaldéhyde, vanilline et coniféraldéhyde par exemple.

Il est important de noter qu'un produit qui possède la fonction chimique décrite se retrouve dans la zone correspondante, mais la réciproque n'est pas forcément vraie. En effet, il existe potentiellement d'autres structures chimiques encore non identifiées dont les zones pourraient se superposer à celles déjà recensées.

Ces organisations chimiques sont donc des outils permettant de guider l'identification dans les cartographies, de façon complémentaire aux trois modes de détection mis en œuvre. Ils peuvent être enrichis à l'avenir pour inclure d'autres structures.

Proposition d'un guide méthodologique

Quelle stratégie de fractionnement pour quel échantillon ? Le guide décisionnel présenté en figure 7 propose une stratégie de fractionnement et d'analyse d'un échantillon, issu d'une transformation biochimique ou thermochimique de biomasse lignocellulosique. Cette approche s'articule en trois étapes :

- *Étape 1* : le taux de dilution de l'échantillon est évalué à partir des chromatogrammes RPLC-UV/HRMS pour évaporer l'échantillon si nécessaire. La présence d'espèces très polaires est visible dans la première partie du chromatogramme pour s'orienter soit vers la LLE, soit vers la CPC qui apporte un niveau de détail supérieur pour la partie moins polaire de la matrice.

- *Étape 2, cas a* : le protocole LLE est utilisé pour séparer sélectivement les sucres, les composés neutres (furanes, aldéhydes, cétones, alcools, esters), les acides carboxyliques et les phénols. La fraction des sucres est alors réengagée dans un second fractionnement par SEC ou par CPC avec un système solvant butanol/méthanol/eau (BME, 5,7/0,8/12 ; v/v/v) spécialement développé pour les matrices les plus

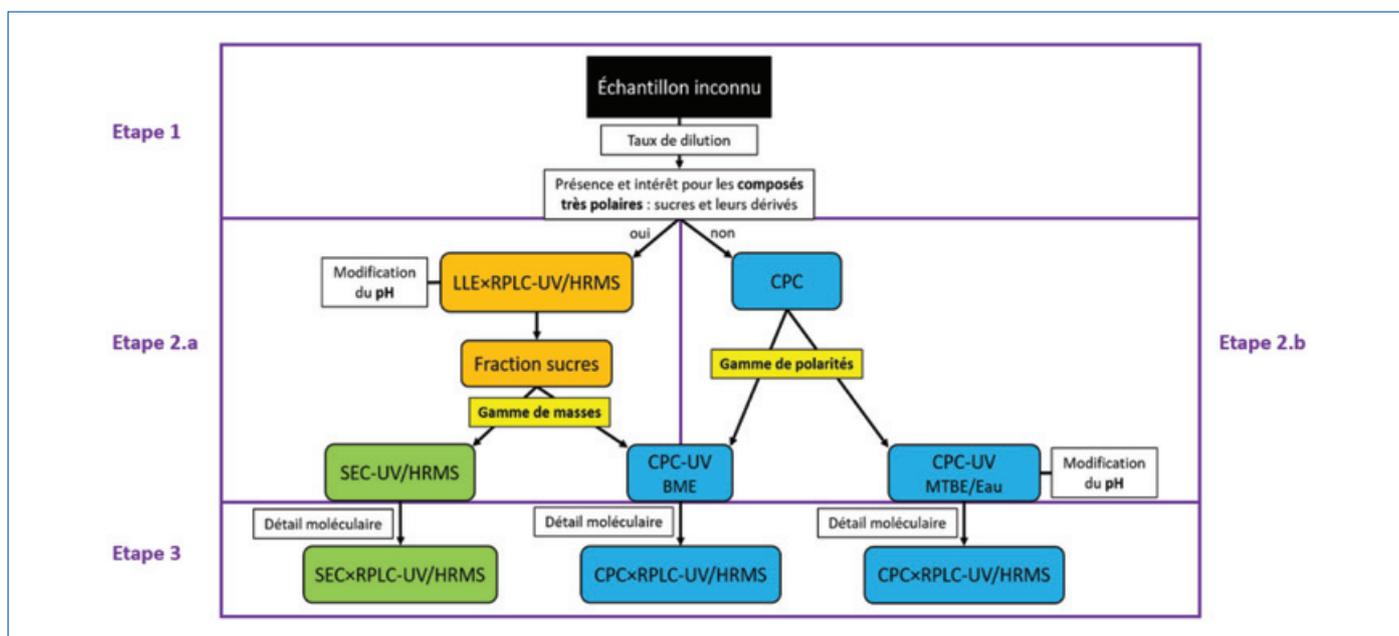


Figure 7 - Guide décisionnel pour le choix des techniques de fractionnement [13].

polaires [13]. L'orientation entre ces deux techniques est réalisée à l'aide de la gamme de masses mesurée en MS. La méthode proposée en SEC est appropriée aux molécules de plus hautes masses moléculaires comprises entre 300 et 1 000 Da [19].

Étape 2, cas b : le choix du système solvant en CPC est déterminé par la gamme de polarités, évaluée à l'aide du dernier composé élué sur le chromatogramme RPLC-UV/HRMS. Il faut noter que la plupart des échantillons issus de la biomasse contiennent des composés phénoliques, ce qui devrait conduire le plus souvent à l'utilisation du système solvant MTBE/eau. À ce niveau, le dosage de l'acidité totale de l'échantillon permet d'évaluer l'intérêt d'une modification du pH pour séparer les acides carboxyliques et les phénols.

• Étape 3 : la déformulation la plus complète des échantillons est obtenue en combinant les approches SEC×RPLC et CPC×RPLC, pour bénéficier d'un détail moléculaire élevé associé à l'identification des sept zones chimiques.

Vers une meilleure connaissance des biocarburants et bioproduits

La méthodologie analytique proposée dans ces travaux de recherche constitue un outil clé pour une meilleure compréhension des biocarburants et produits biosourcés, et peut être déployée en soutien des procédés pour la comparaison globale d'empreintes d'échantillons ou pour identifier des espèces chimiques d'intérêt. Cette approche ouvre notamment la voie à de nouvelles analyses structurales, comme par exemple pour l'étude d'un échantillon issu de la transformation biochimique de paille de blé qui a été soumis à un fractionnement LLE selon le protocole décrit en figure 1 [15]. L'analyse RPLC/HRMS des fractions LLE a permis d'accéder à une vue générale de la composition chimique de l'échantillon étudié (figure 8) : les ratios H/C et O/C déterminés à partir des formules brutes identifiées montrent la présence de différentes familles chimiques (sucres, composés phénoliques et probablement lipides) réparties sélectivement dans les fractions LLE générées.

Il est ensuite possible d'aller au-delà de cette première description en séparant les isomères de formule brute par chromatographie en phase liquide et en procédant à une analyse structurale comme présenté dans l'exemple de la figure 9. Dans ce cas, la fraction aqueuse AQ1 issue de l'extraction LLE de l'échantillon de transformation biochimique de paille de blé a été caractérisée par couplage RPLC/HRMS/MSⁿ. Des structures moléculaires ont pu être proposées à partir des données de fragmentation, comme ici pour l'acide glucuronique ou l'acide méthylglucuronique ; des structures ont été également supposées pour des molécules même non fragmentées en suivant l'évolution des ratios H/C et O/C des composés – ici selon une droite mettant en évidence la présence incrémentielle d'unités de pentose rattachées à la molécule initiale d'acide glucuronique.

Cette approche combinant fractionnement maîtrisé, analyses chromatographiques et spectrométrie de masse haute résolution se révèle donc être un outil très précieux dans la description de la composition chimique de produits oxygénés complexes.

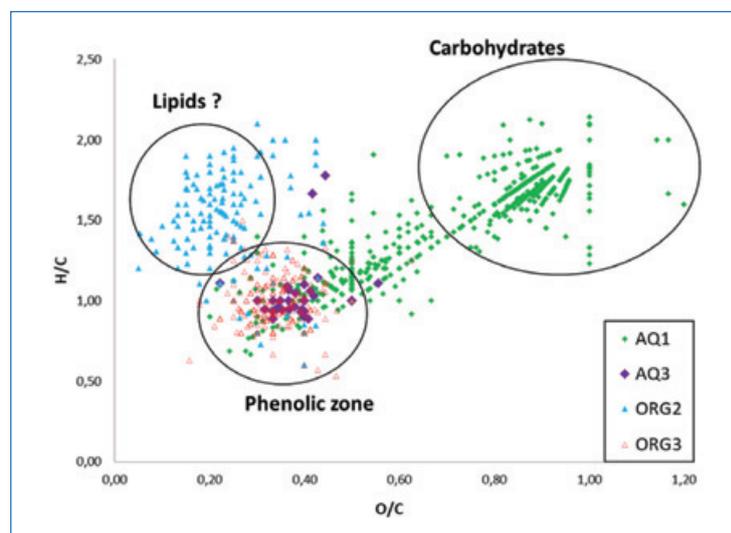


Figure 8 - Diagramme de van Krevelen basé sur l'analyse par RPLC/HRMS de fractions LLE issues d'un échantillon de transformation biochimique de paille de blé [15].

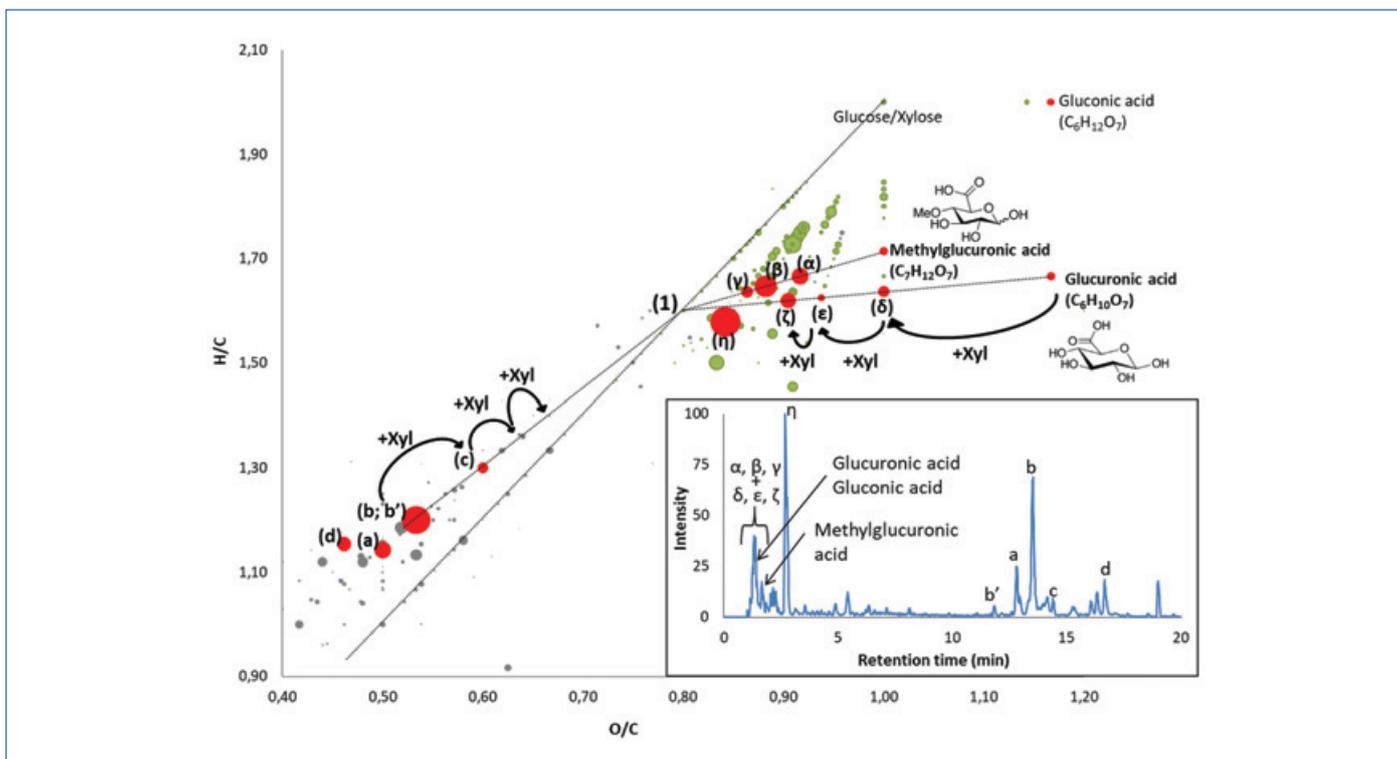


Figure 9 - Diagramme de van Krevelen et propositions de structures moléculaires selon les analyses HPLC/HRMS/MSⁿ de la fraction LLE AQ1 issue d'un échantillon de transformation biochimique de paille de blé [15].

[1] IFP Energies nouvelles, Quel avenir pour les biocarburants ?, www.ifpenergiesnouvelles.fr/enjeux-et-prospective/decryptages/energies-renouvelables/quel-avenir-les-biocarburants (consulté le 28/11/2020).

[2] P.R. Seidl, A.K. Goulart, Pretreatment processes for lignocellulosic biomass conversion to biofuels and bioproducts, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, **2016**, 2, p. 48-53.

[3] A.K. Chandel, V.K. Garlapati, A.K. Singh, F.A.F. Antunes, S.S. da Silva, The path forward for lignocellulose biorefineries: bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization, *Bioresour. Technol.*, **2018**, 264, p. 370-381.

[4] P. Gallezot, Conversion of biomass to selected chemical products, *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, 41, p. 1538-558.

[5] Biocarburants, Ministère de la Transition écologique, www.ecologie.gouv.fr/biocarburants#e4 (consulté le 28/11/2020).

[6] A. Brandt, J. Gräsvik, J.P. Hallett, T. Welton, Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids, *Green Chem.*, **2013**, 15, p. 550-583.

[7] C. Sagnès, M.-F. Chabreille, Biocarburants de deuxième génération une nouvelle étape est franchie, *Panorama IFP Energies nouvelles*, **2015**.

[8] P.K. Kanaujia, Y.K. Sharma, M.O. Garg, D. Tripathi, R. Singh, Review of analytical strategies in the production and upgrading of bio-oils derived from lignocellulosic biomass, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2014**, 105, p. 55-74.

[9] M. Staš, J. Chudoba, D. Kubička, J. Blažek, M. Pospíšil, Petroleomic characterization of pyrolysis bio-oils: a review, *Energy Fuels*, **2017**, 31, p. 10283-299.

[10] A. Le Masle, D. Angot, C. Gouin, A. D'Attoma, J. Ponthus, A. Quignard, S. Heinisch, Development of on-line comprehensive two-dimensional liquid chromatography method for the separation of biomass compounds, *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1340, p. 90-98.

[11] M. Sarrut, A. Corgier, G. Crétier, A. Le Masle, S. Dubant, S. Heinisch, Potential and limitations of on-line comprehensive reversed phase liquid chromatography x supercritical fluid chromatography for the separation of neutral compounds: an approach to separate an aqueous extract of bio-oil, *J. Chromatogr. A*, **2015**, 1402, p. 124-133.

[12] E. Lazzari, K. Arena, E.B. Caramão, M. Herrero, Quantitative analysis of aqueous phases of bio-oils resulting from pyrolysis of different biomasses by two-dimensional comprehensive liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, **2019**, 1602, p. 359-367.

[13] A. Dubuis, Déformulation de matrices complexes, vers une méthodologie raisonnée adaptée aux matrices issues des procédés de valorisation de la biomasse, Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, Ecole doctorale de chimie de Lyon, **2019**.

[14] B. Du, L.N. Sharma, C. Becker, S.-F. Chen, R.A. Mowery, G.P. van Walsum, C.K. Chambliss, Effect of varying feedstock-pretreatment chemistry combinations on the formation and accumulation of potentially inhibitory degradation products in biomass hydrolysates, *Biotechnol. Bioeng.*, **2010**, 107, p. 430-440.

[15] C. Reymond, A. Dubuis, A. Le Masle, C. Colas, L. Chahen, E. Destandau, N. Charon, Characterization of liquid-liquid extraction fractions from lignocellulosic biomass by high performance liquid chromatography hyphenated to tandem high-resolution mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2020**, 1610, 460569.

[16] K. Faure, Chromatographie de partage centrifuge – Principes et applications, *Techniques de l'Ingénieur*, **2016**, 1(P1496).

[17] M. Bojczuk, D. Żyżelewicz, P. Hodurek, Centrifugal partition chromatography – A review of recent applications and some classic references, *J. Sep. Sci.*, **2017**, 40, p. 1597-609.

[18] A. Dubuis, A. Le Masle, L. Chahen, E. Destandau, N. Charon, Centrifugal partition chromatography as a fractionation tool for the analysis of lignocellulosic biomass products by liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **2019**, 1597, p. 159-166.

[19] A. Dubuis, A. Le Masle, L. Chahen, E. Destandau, N. Charon, Off-line comprehensive size exclusion chromatography x reversed-phase liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for the analysis of lignocellulosic biomass products, *J. Chromatogr. A*, **2020**, 1609, 460505.

Alexis DUBUIS*, **Agnès LE MASLE^a**, **Ludovic CHAHEN^a**, **Nadège CHARON^a**, ingénieurs de recherche, et **Emilie DESTANDAU^b**, professeure.

^aIFP Energies nouvelles, Direction Physique et Analyse, Solaize.

^bInstitut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), Université d'Orléans, CNRS UMR 7311, Orléans.



A. Dubuis

Alexis DUBUIS a reçu le prix de thèse Innovation 2020 de l'interdivision SCF Énergie. Ses travaux de thèse ont été réalisés au sein d'IFPEN^a, sous la direction de Nadège CHARON.

* alexis.dubuis@rd.loreal.com

Peser le protéasome pour sonder sa structure

Résumé Grâce à leur structure tridimensionnelle, les protéines assurent différentes fonctions qui sont essentielles au bon fonctionnement cellulaire. Cependant, leur concentration doit être très finement régulée. De plus, l'accumulation de protéines mal repliées ou vieillissantes peut être fatale pour la cellule et l'organisme. En digérant ces protéines indésirables, le protéasome permet leur recyclage et est ainsi le garant du maintien de l'homéostasie protéique intracellulaire, mais il participe aussi à la réponse immunitaire en présentant certains peptides à la surface des cellules. Cet article présente comment la spectrométrie de masse (SM) peut apporter des informations sur la structure de complexes multiprotéiques, et plus particulièrement sur le protéasome humain. Cet assemblage macromoléculaire essentiel est un exemple idéal pour illustrer l'apport de la SM à la biologie structurale.

Mots-clés Spectrométrie de masse, biologie structurale, protéasome.

Abstract Weighing the proteasome to probe its structure

Thanks to their three-dimensional structure, proteins perform various functions that are essential for proper cell function. However, their concentration must be very tightly regulated. In addition, the accumulation of misfolded or aging proteins can be fatal to the cell and the organism. By digesting these unwanted proteins, the proteasome allows their recycling and thus guarantees the maintenance of intracellular protein homeostasis and also participates to cell immune response by presenting some peptides to the cell surface. This article presents how mass spectrometry (MS) can provide information on the structure of multiprotein complexes, and more particularly on the human proteasome. This essential macromolecular assembly is an ideal example to illustrate the contribution of MS to structural biology.

Keywords Mass spectrometry, structural biology, proteasome.

La spectrométrie de masse structurale, un domaine en pleine expansion

Autrefois cantonné à l'étude de petites molécules (i.e. < 200 Da), le champ d'application de la spectrométrie de masse (SM) s'est fortement diversifié depuis l'invention des sources d'ionisations dites « douces » au début des années 1980. Dans le domaine des biomolécules, et des protéines en particulier, une première révolution a consisté à déchiffrer leur séquence primaire par protéomique. En parallèle, différents groupes de recherche ont mis au point des méthodes, dites de « SM structurale », visant à obtenir un maximum d'informations sur la structure tridimensionnelle des protéines et complexes protéiques. Au cours des vingt dernières années, les développements technologiques et méthodologiques ont permis de faire de la SM structurale un pilier incontournable de la biologie structurale.

La régulation du protéasome est assurée par une grande hétérogénéité structurale

Le protéasome est un complexe protéique composé de vingt-huit sous-unités. Il est formé de quatre anneaux heptamériques empilés les uns sur les autres (figure 1). Conservé au cours de l'évolution, le protéasome s'est progressivement complexifié pour assurer des fonctions cellulaires de plus en plus diverses. Alors que le protéasome procaryote est constitué uniquement des sous-unités α et β (quatorze copies identiques), on compte chez l'homme pas moins de quinze sous-unités α différentes et dix-huit sous-unités β différentes, conduisant à plusieurs sous-types de protéasome, dont certains sont spécifiques de certains tissus [1]. C'est le cas de l'immunoprotéasome (i20S) dans les cellules lymphocytaires, du spermatoprotéasome (spt20S) dans les cellules germinales, ou du thymoprotéasome (t20S) dans le thymus.

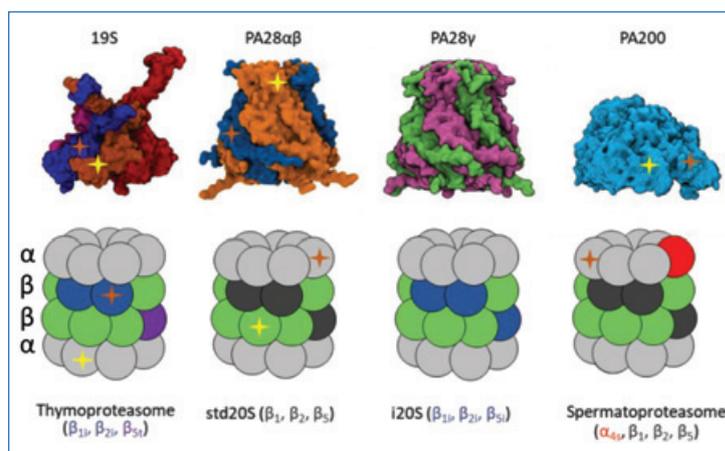


Figure 1 - Complexité des sous-types de protéasome. Chaque sous-type, défini par ses vingt-huit sous-unités α_{1-7} et β_{1-7} , peut interagir avec un ou deux régulateurs, via ses deux anneaux α . Les étoiles correspondent à des modifications post-traductionnelles éventuelles.

La fonction principale du protéasome est de digérer en peptides les protéines qui lui sont adressées. Ceci permet entre autres d'éviter l'accumulation de protéines anormales afin de les éliminer avant qu'elles ne constituent un risque pour l'organisme. Dans les cellules immunitaires, l'immunoprotéasome est capable de générer des peptides antigéniques d'origine pathogène, qui seront ensuite exprimés à la surface de la cellule par le complexe majeur d'histocompatibilité, afin d'activer les lymphocytes T cytotoxiques et d'induire une réponse immunitaire ciblée contre le pathogène en question.

La régulation du protéasome est donc cruciale au bon fonctionnement de la cellule et de nombreuses pathologies incluant certains cancers, maladies neurodégénératives ou auto-immunes, ont été liées à un dysfonctionnement de ce complexe. L'activité protéolytique du protéasome peut être

régulée par l'incorporation de sous-unités alternatives, mais également par l'interaction avec des protéines ou complexes protéiques régulateurs protéiques tels que le 19S, PA28 $\alpha\beta$, PA28 γ et PA200 (figure 1).

Outre ces quatre activateurs majoritaires, plus de trois cent protéines interagissant avec le protéasome (PIP) ont été répertoriées dans la littérature, mais les bases structurales de ces interactions sont le plus souvent inconnues. De par son hétérogénéité, sa taille (0,7 MDa pour le cœur catalytique 20S) et les aspects dynamiques de ses interactions, le protéasome est un sujet d'étude idéal pour la protéomique et la SM structurale.

Sonder la structure et la dynamique du protéasome

Un protéasome plus dynamique dans les cellules germinales, à l'origine de nouvelles interactions intracellulaires

Le spermatoprotéasome, sous-type exprimé exclusivement dans les cellules germinales, est essentiel à leur bonne maturation. Les spermatozoïdes proviennent de spermatogonies (SPG) qui se différencient en spermatocytes (SPC), puis en spermatozoïdes (SPT). Le spermatoprotéasome diffère du protéasome standard uniquement par l'incorporation d'une sous-unité $\alpha 4s$ différente de la sous-unité $\alpha 4$ constitutive. Son expression est essentielle à la fertilité chez les eucaryotes supérieurs. Nous nous sommes dès lors posé les questions suivantes :

- En quoi cette substitution de sous-unité est nécessaire au bon développement des spermatozoïdes ?
- Quelles sont les modifications fonctionnelles liées à cette substitution (substrats et/ou partenaires spécifiques du spermatoprotéasome, localisation subcellulaire) ?
- Quels sont les réarrangements structuraux induits par $\alpha 4s$ pouvant expliquer sa spécificité fonctionnelle ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé différentes méthodes basées sur la SM : la protéomique bottom-up, consistant à digérer les protéines immunopurifiées avec le protéasome 20S, puis à séquencer et quantifier ces peptides,

nous a permis de suivre l'abondance relative des sous-unités $\alpha 4$ et $\alpha 4s$ au cours de la spermatogenèse chez le rat. Nos résultats ont montré que la sous-unité $\alpha 4$ était l'espèce exclusive des cellules de Sertoli et des spermatogonies, puis était remplacée presque totalement par $\alpha 4s$ dans les spermatozoïdes et spermatozoïdes [2] (figure 2A).

Nous avons ensuite identifié les partenaires spécifiques du spermatoprotéasome chez le rat et avons ainsi observé une réorganisation des régulateurs du 20S dans les dernières phases de développement des cellules germinales mâles : les activateurs 19S et, dans une moindre mesure PA200, sont favorisés au détriment de l'activateur PA28 $\alpha\beta$ (figure 2B). D'autre part, nous avons identifié plusieurs partenaires dont P131 et FbxO7 qui semblent localiser le spermatoprotéasome au complexe synaptonémal qui permet d'initier la méiose en associant les chromosomes homologues entre eux.

La protéomique top-down consiste à analyser les protéines sous formes entières (sans étape protéolytique), afin d'obtenir toutes les masses moléculaires des espèces présentes dans l'échantillon. En effet, si l'approche classique par bottom-up est très efficace pour détecter et quantifier un très grand nombre de protéines, même à l'état de traces, l'étape de digestion est cependant source de limitations : les protéines sont souvent identifiées/quantifiées par quelques peptides seulement, et même si certains peuvent être modifiés, il est impossible de savoir quelles étaient la ou les séquences primaires avant digestion. Le terme de protéoforme désigne ainsi n'importe quel produit d'un gène [3], mais en incluant ses étapes de maturation, de troncation, ainsi que ses combinaisons éventuelles de mutation(s) et/ou modification(s) post-traductionnelle(s) (MPT).

Nous avons ainsi mis au point une stratégie expérimentale intégrée permettant de générer de véritables empreintes de protéoformes sous forme de cartes bidimensionnelles [4-5]. Appliquée au spermatoprotéasome, cette méthode nous indique de façon très précise les combinaisons de MPT de chacune des sous-unités et nous permet de les comparer au protéasome immunopurifié à partir de tissu musculaire [2] (figure 2C).

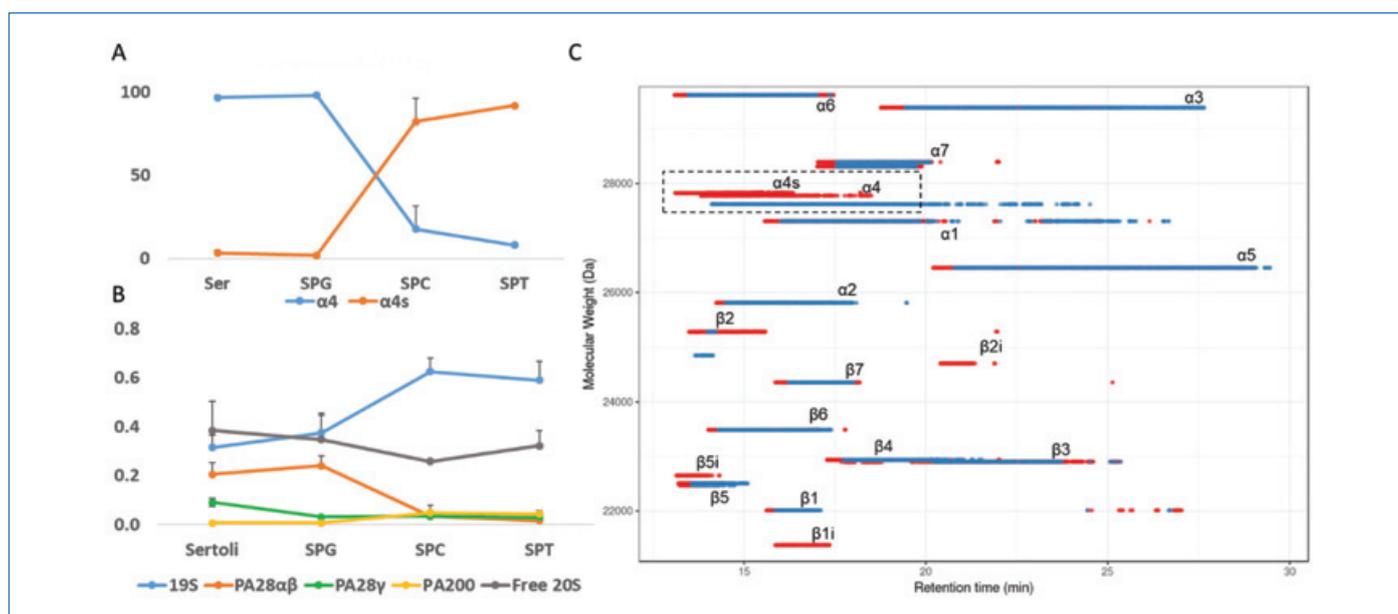


Figure 2 - Étude du spermatoprotéasome par protéomique bottom-up et top-down. Abondance relative (A) des sous-unités $\alpha 4$ et $\alpha 4s$ et (B) des principaux activateurs du 20S dans des cellules de Sertoli (Ser), des spermatogonies (SPG), spermatocytes (SPC) et spermatozoïdes (SPT) de rat. (C) Cartographie des protéoformes du 20S immunopurifié à partir de testicules (rouge) et de muscle (bleu) bovin.

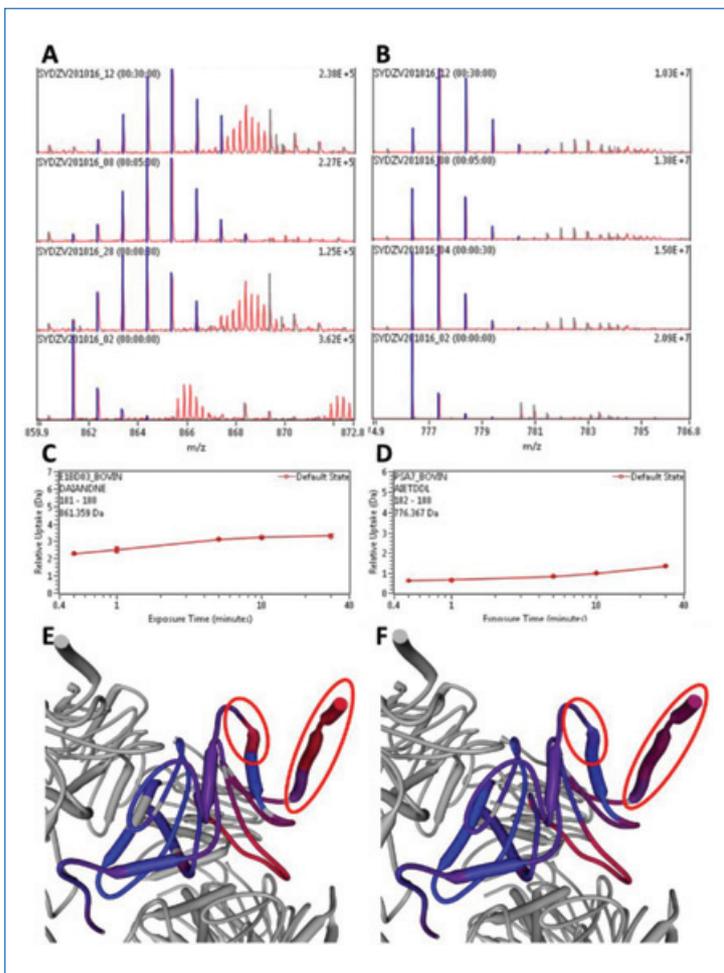


Figure 3 - Échange hydrogène-deutérium couplé à la spectrométrie de masse. (A) Incorporation progressive (0 min, 0,5 min, 5 min, 30 min) du deutérium sur les peptides [181-188] d' $\alpha 4s$ (A) et [182-188] d' $\alpha 4$ (B) montrant une deutération plus importante chez $\alpha 4s$ (C) que chez $\alpha 4$ (D). La deutération relative est représentée de 0 % (bleu) à 50 % (rouge) sur la structure du protéasome 20S bovin (PDB 1IRU), permettant de localiser les régions plus dynamiques chez $\alpha 4s$ (E) que chez $\alpha 4$ (F).

appelée échange hydrogène-deutérium couplé à la spectrométrie de masse (HDX-MS). Le concept consiste à diluer la ou les protéines d'intérêt dans un tampon physiologique (PBS, Tris, HEPES à pH 7-8) deutéré et à suivre l'incorporation du deutérium sur les peptides obtenus après digestion protéolytique. La vitesse d'échange des protons amidiques dépendant de leur accessibilité au solvant et de leur implication dans la stabilisation de structures secondaires, on peut ainsi différencier les régions accessibles/flexibles des régions enfouies/rigides de la protéine. Il est alors possible de comparer les cinétiques de deutération de protéines seules et en complexe, afin d'identifier, par exemple, le site d'interaction d'un peptide sur un complexe protéique [6]. En comparant les taux de deutération d' $\alpha 4$ et d' $\alpha 4s$, nous avons observé que certains peptides étaient beaucoup plus rapidement deutérés chez $\alpha 4s$ que chez $\alpha 4$ [2] (figure 3A-D). Ces peptides sont localisés au niveau des deux dernières hélices α de la sous-unité et font face au solvant (figure 3E-F). Nous en avons déduit que les différences d'interaction et de fonction observées au niveau cellulaire étaient liées à cette plus forte dynamique structurale chez $\alpha 4s$.

Un dialogue intramoléculaire pour expliquer la régulation du protéasome

Un des points qu'il reste à élucider concerne certains mécanismes de régulation du protéasome, et notamment « Comment expliquer que l'insertion d'une sous-unité catalytique alternative modifie l'interactome du protéasome ? » En effet, ces sous-unités étant enfouies au cœur du protéasome, et non à sa surface comme $\alpha 4$ et $\alpha 4s$, nous avons dès lors envisagé l'existence de changements conformationnels allostériques.

Pour répondre à cette question, nous avons immunopurifié du protéasome standard (std20S) ainsi que de l'i20S à partir de lignées cellulaires exprimant uniquement l'une ou l'autre de ces isoformes. Nous avons tout d'abord vérifié le degré de pureté de ces échantillons par protéomique bottom-up et top-down (figure 4A-B). Nous avons ensuite utilisé l'échange hydrogène-deutérium pour étudier le protéasome 20S seul ou en complexe avec les régulateurs PA28 α ou PA28 γ [7]. En dehors du défi méthodologique (système le plus large et hétérogène jamais étudié par cette technique), cette étude

Afin de déterminer les mécanismes structuraux à l'origine de ces différences d'interactomes et donc fonctionnelles du spermatoprotéasome par rapport au protéasome standard, nous avons utilisé une méthode de marquage isotopique

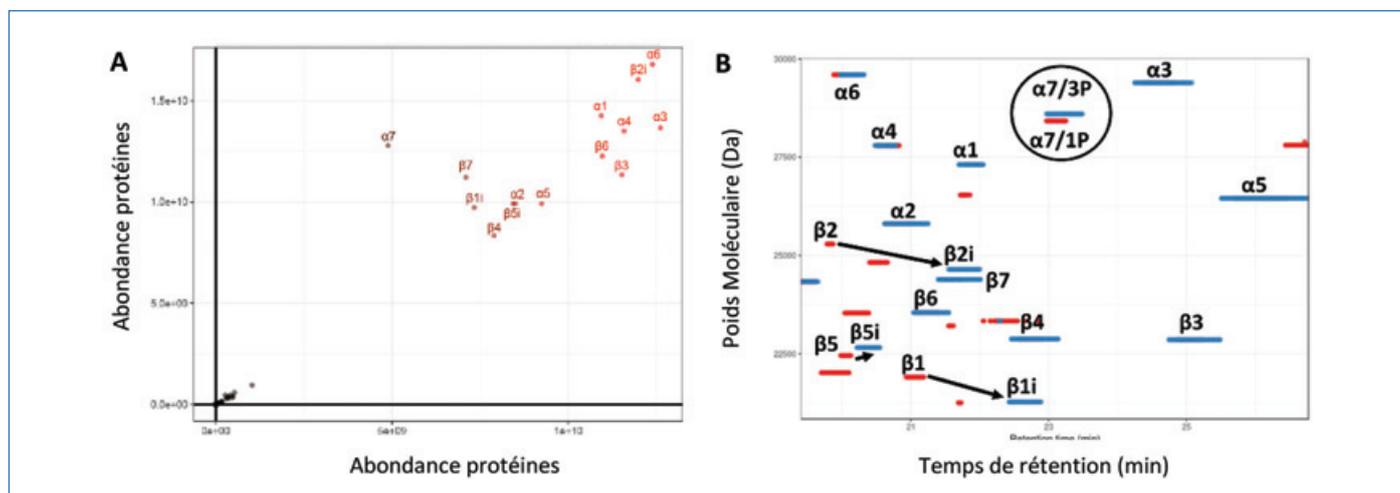


Figure 4 - A) Analyse bottom-up d'un complexe de i20S immunopurifié. La représentation de l'abondance des protéines de deux répliquats permet de s'assurer que l'échantillon contient exclusivement les protéines attendues (sous-unités α et β de l'i20S). Les autres protéines identifiées (points noirs) sont présentes sous forme de traces. B) Analyses top-down de complexes de protéasome après immunopurification à partir de cellules HEK-EBNA exprimant soit le protéasome std20S (rouge), soit l'immunoprotéasome i20S (bleu). Le remplacement des sous-unités catalytiques standards ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) par les sous-unités immuno ($\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$) peut être facilement détecté, tout comme la présence de différentes protéoformes pour la sous-unité $\alpha 7$.

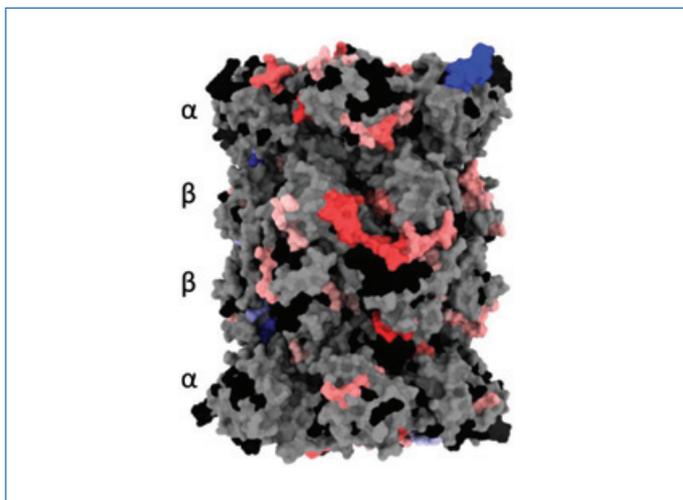


Figure 5 - Représentation tridimensionnelle (PDB : 5LE5) du cœur catalytique du protéasome 20S humain. Les régions plus ou moins flexibles/accessibles suite à l'interaction avec l'activateur PA28αβ sont représentées en rouge et bleu, respectivement. Ces résultats d'HDX-MS permettent ainsi d'identifier les régions directement affectées, ou qui subissent des réarrangements allostériques suite à l'interaction d'un partenaire.

a fourni quantité d'informations difficilement accessibles par d'autres méthodes classiques de biophysique. La comparaison des protéasomes std20S et i20S a permis de mettre en évidence des changements structuraux, non seulement autour des sous-unités catalytiques qui sont différentes, mais également à la surface du protéasome 20S, ce qui peut expliquer des différences d'interaction avec certains régulateurs, comme observé précédemment par protéomique [8]. À l'inverse, la comparaison des cinétiques de deutération avec et sans activateur (figure 5) a montré que le contact à la surface de l'anneau α pouvait être répercuté jusqu'à l'intérieur de la structure du protéasome 20S, et notamment proche des sites catalytiques, suggérant comment l'interaction avec un activateur peut modifier de façon spécifique l'activité protéolytique du protéasome [7].

Vers une protéomique holistique ?

Autrefois l'apanage de certains groupes spécialisés, les méthodes de SM structurale se sont démocratisées, notamment grâce au développement et à la commercialisation d'instruments permettant d'effectuer ces analyses en routine. Dès lors, un nombre croissant de groupes de recherche sont parvenus à combiner ces approches qui sont tout à fait complémentaires entre elles [9] (voir tableau) puisqu'elles apportent des informations à la fois sur l'interactome (protéomique bottom-up et interactomique par pontage covalent), les protéoformes (protéomique top-down), la stœchiométrie et les ligands non covalents (SM native), ainsi que sur la structure (pontage covalent) et la dynamique (HDX-MS) des systèmes étudiés. D'autre part, les frontières entre certaines méthodes sont de plus en plus poreuses : c'est le cas par exemple de la « NativeOmics » qui combine à la fois SM native, protéomique top-down et lipidomique [10]. Enfin, la sensibilité accrue des spectromètres de masse ouvre la voie vers les analyses protéomiques sur cellule unique. On peut donc

Méthode	Digestion	Information
Bottom-up	Oui	Séquence, modifications, partenaires, quantification
Top-down	Non	Séquence, protéoformes
SM native	Non	Stœchiométrie, partenaires
Cross-link	Oui	Contraintes de distance, partenaires
HDX-MS	Oui	Accessibilité, dynamique, interface d'interaction

Glossaire des différentes méthodes d'analyses de protéines par protéomique et SM structurale.

s'attendre à l'avenir à obtenir un plus grand nombre d'informations à partir d'une seule analyse MS, en partant d'un échantillon protéique de moins en moins concentré. La spectrométrie de masse intégrative s'inscrit tout à fait dans la tendance actuelle visant à promouvoir la biologie structurale intégrative [11].

- [1] A. Kniepert, M. Groettrup, The unique functions of tissue-specific proteasomes, *Trends Biochem Sci.*, **2014**, *39*, p. 17-24.
- [2] D. Živković, J. Marcoux, M.-P. Bousquet *et al.*, Proteasome complexes experience profound structural and functional rearrangements throughout mammalian spermatogenesis, *bioRxiv*, **2021**, doi.org/10.1101/2021.06.18.447862.
- [3] L.M. Smith, N.L. Kelleher & Consortium for top down proteomics, Proteoform: a single term describing protein complexity, *Nat. Methods*, **2013**, *10*, p. 186-187.
- [4] J. Lesne, M.-P. Bousquet, J. Marcoux, M. Locard-Paulet, Top-down and intact protein mass spectrometry data visualization for proteoform analysis using VisioProt-MS, *Bioinform. Biol. Insights*, **2019**, *13*, doi.org/10.1177/1177932219868223.
- [5] M. Locard-Paulet, J. Marcoux *et al.*, VisioProt-MS: interactive 2D maps from intact protein mass spectrometry, *Bioinformatics*, **2019**, *35*, p. 679-681.
- [6] V. Guillet, J. Marcoux, P. Genevoux, L. Mourey *et al.*, Structural insights into chaperone addition of toxin-antitoxin systems, *Nat. Commun.*, **2019**, *10*, 782.
- [7] J. Lesne, M.-P. Bousquet, J. Marcoux *et al.*, Conformational maps of human 20S proteasomes reveal PA28- and immuno-dependent inter-ring crosstalks, *Nat. Commun.*, **2020**, *11*, 6140.
- [8] B. Fabre, O. Bulet-Schiltz, M.-P. Bousquet-Dubouch *et al.*, Deciphering preferential interactions within supramolecular protein complexes: the proteasome case, *Mol. Syst. Biol.*, **2015**, *11*, 771.
- [9] J. Marcoux, S. Cianféroni, Towards integrative structural mass spectrometry: benefits from hybrid approaches, *Methods*, **2015**, *89*, p. 4-12.
- [10] J. Gault, C.V. Robinson *et al.*, High-resolution mass spectrometry of small molecules bound to membrane proteins, *Nat. Methods*, **2016**, *13*, p. 333-336.
- [11] M. Faini, F. Stengel, R. Aebersold, The evolving contribution of mass spectrometry to integrative structural biology, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2016**, *27*, p. 966-974.

Marie-Pierre BOUSQUET, maître de conférences à l'Université Paul Sabatier Toulouse III, et **Julien MARCOUX***, chargé de recherche au CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Toulouse.



Julien MARCOUX a reçu la Médaille de bronze du CNRS en 2020.

* julien.marcoux@ipbs.fr

J. Marcoux

Nouveaux principes actifs pharmaceutiques

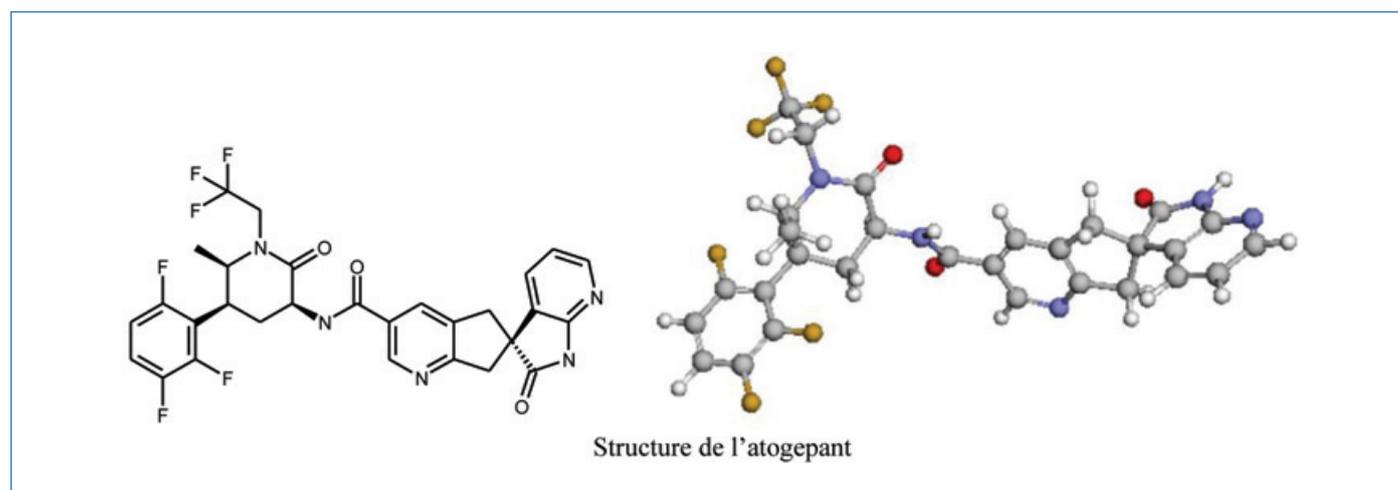
Bilan des approbations FDA en septembre 2021

Au cours de cette période, trois nouvelles molécules de synthèse et une nouvelle molécule biologique ont été approuvées.

Molécules de synthèse

Principe actif	Compagnie	Indication
Mobocertinib succinate	Takeda Pharms USA	Cancer du poumon à non petites cellules avancé ou métastaté
Atogepant	Abbvie Inc.	Prévention de la migraine
Maralixibat	Mirum Pharma Inc.	Prurit cholestatique associé au syndrome d'Alagille

L'arsenal des molécules traitant la migraine par action sur les récepteurs du CGRP (« calcitonin gene-related peptide ») s'enrichit d'une nouvelle molécule : l'**atogepant**, qui est le premier antagoniste des CGRP utilisé pour le traitement préventif de la migraine par voie orale. Les molécules précédentes de la famille des « gépants », l'ubrogepant et le rimegepant, sont utilisées pour le traitement de la crise aiguë des migraines⁽¹⁾.



N° CAS : 1374248-81-3 ; nom IUPAC : (6S)-N-[(3S,5S,6R)-6-methyl-2-oxo-1-(2,2,2-trifluoroethyl)-5-(2,3,6-trifluorophenyl)-3-piperidinyl]-2'-oxo-1',2',5,7-tetrahydrospiro[cyclopenta[b]pyridine-6,3'-pyrrolo[2,3-b]pyridine]-3-carboxamide.

*La représentation 3D provient du site Drugbank⁽²⁾ (https://go.drugbank.com/structures/small_molecule_drugs/DB16098).

Molécule d'origine biologique

Principe actif	Type de molécule	Compagnie	Indication
Tisotumab vedotin-tftv	Anticorps conjugué à un cytostatique	Seagen	Cancer du col de l'utérus récurrent ou métastatique

Le **tisotumab** est un anticorps ciblant le facteur tissulaire (aussi appelé « facteur III » ou « thromboplastine »). Il est conjugué par un lien à la monométhyl auristatin E, un puissant cytostatique agissant sur les microtubules qui détruit les cellules cibles⁽³⁾.

⁽¹⁾Voir *L'Act. Chim.*, **2020**, 448, p. 21 et 451, p. 39.

⁽²⁾Drugbank est une banque de données sur les principes actifs accessible sur Internet : D.S. Wishart *et al.*, DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018, *Nucleic Acids Res.*, **2018**, 46, p. D1074-D1082, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>

⁽³⁾Voir *L'Act Chim.*, **2020-2021**, 456-457-458, p. 192.

Nouvelles substances actives phytopharmaceutiques

Fin d'utilisation et retraits

Le *Bulletin* d'octobre 2021 de l'ANSES fait état du retrait d'AMM des produits à base d'alpha-cyperméthrine à compter du 7 décembre. En outre sont privés d'AMM quatre herbicides professionnels à base d'orizalin associé au pénoxsulame ou à l'isoxabène.

Le *Bulletin* de novembre rappelle la fin d'utilisation et de vente de produits à base de famoxadone le 16 mars 2022. Cinq herbicides sont retirés du marché, l'un à base de bentazone, les autres à base de napropamide. De même disparaît du marché un adjuvant à base de polymère d'amines grasses associé au polysorbate 20.

Nouvelles autorisations

En octobre, six AMM sont délivrées pour usages professionnels à trois fongicides, deux régulateurs de croissance et un insecticide. Les fongicides sont à base de dithianon en granulés dispersables pour arboriculture, et de méfentrifluconazole associé à la pyraclostrobine ou au fluxapyroxade, en concentré émulsionnable, utilisés en grandes cultures.

Les régulateurs de croissance sont à base d'éthéphon en concentré soluble, ou d'acide gibbérellique en granulés solubles dans l'eau, pour grandes cultures.

L'insecticide est à base de téfluthrine en microgranulés pour grandes cultures, cultures porte-graines et légumières.

Un herbicide pour usages amateurs à base d'acide pélargonique est autorisé en concentré émulsionnable en arboriculture, cultures porte-graines et tropicales, plantes à parfum, aromatiques, médicinales et condimentaires, cultures ornementales et zones non agricoles.

En novembre, de nouvelles AMM sont accordées à trois herbicides et à un insecticide. Les herbicides sont à base de floryrauxifène-benzyle associé au cyhalofop-butyl en concentré émulsionnable pour grandes cultures, à base de glyphosate en concentré soluble pour arboriculture, plantes porte-graines et ornementales, et zones non agricoles, et à base de clomazone en suspension de capsules pour grandes cultures, cultures légumières, plantes porte-graines et tropicales, plantes à parfum, aromatiques, médicinales et condimentaires.

L'insecticide est à base de deltaméthrine associé au butoxyde de pipéronyle, en concentré émulsionnable pour grandes cultures, plantes porte-graines et tropicales, plantes à parfum, aromatiques, médicinales et condimentaires.

Renouvellements et modifications d'usage

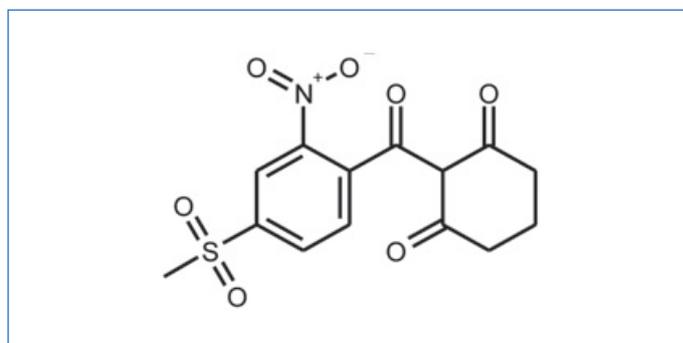
Dans le *Bulletin* d'octobre, sont concernés cinq herbicides, trois fongicides, un régulateur de croissance et un insecticide, tous professionnels. Les herbicides sont à base de metsulfuron-méthyl pour extension d'usage majeur, et à base de

napropamide, de clopyralide associé au florasulame, de 2,4-D et MCPA sous forme de sels de diméthylammonium, pour réapprobation de substance active. Un herbicide à base de pyridate est renouvelé avec extension d'usage mineur.

Deux fongicides sont à base de champignons *Trichoderma*, le troisième à base de soufre avec modification des conditions d'emploi.

Le régulateur de croissance est à base de chlorure de mépiquat associé à la prohexadione-calcium. L'insecticide est à base de flonicamide avec retrait d'usage.

En novembre, douze herbicides sont concernés. L'un est à base de florasulame associé au fluroxypyr-méthyl après réexamen d'une substance active. Deux autres sont respectivement à base de métamitron associée à l'éthofumésate, et à base de metsulfuron-méthyl, avec modification des conditions d'emploi. Un autre, à base de quizalofop-P-éthyl après extension d'usage majeur. Huit sont à base de **mésotrione**, associée pour l'un au nicosulfuron, et pour un autre au nicosulfuron et au dicamba, après réapprobation de la mésotrione.



La mésotrione (2-(4-mésyl-2-nitrobenzoyl)cyclohexane-1,3-dione ou 2-[4-méthylsulfonyl]-2-nitrobenzoyl]-1,3-cyclohexanedione). CAS : 104206-82-8.

Présentée en 1999, développée en 2001 par Syngenta dont le brevet a expiré en 2012, cette molécule inhibe la p-hydroxyphényl pyruvate dioxygénase et affecte la biosynthèse des caroténoïdes.

En 2020, l'Index phytosanitaire recensait dix-neuf spécialités à base de mésotrione seule et dix spécialités en association.

Cette rubrique est coordonnée et alimentée par **Josette FOURNIER**, qui a présidé de 2007 à 2010 le comité d'orientation et de prospective scientifique de l'Observatoire des résidus de pesticides (ORP) (josette.fournier4@orange.fr), et **Jean-Marc PARIS**, ancien directeur de recherche pharmaceutique dans le groupe Rhône-Poulenc et ancien directeur scientifique de la chimie organique et biotechnologies de Rhodia (jeanmarc.paris@free.fr).

Recherche et développement

Des mousses pour récupérer proprement les métaux des e-déchets

La récupération des métaux contenus dans les déchets d'équipements électriques et électroniques (e-déchets) est un enjeu majeur. L'hydrométallurgie, traditionnellement utilisée par l'industrie minière pour traiter des minerais, est basée sur le principe de lixiviation. Son développement est cependant freiné par les grandes quantités d'effluents polluants générés par ce procédé (cyanure, acide sulfurique).

Dans ce contexte, des chimistes du laboratoire Sciences et ingénierie de la matière molle (CNRS/ESPCI Paris/Sorbonne Université), en collaboration avec une équipe de l'Institut de Recherche de Chimie Paris (CNRS/Chimie Paristech), ont mis au point une alternative qui consiste à utiliser des mousses aqueuses plutôt que des liquides de lixiviation. L'avantage est que les mousses contiennent entre 74 et 99 % d'air et sont par conséquent d'excellentes candidates pour réduire les volumes d'effluents. Une première preuve de concept a été obtenue pour le cuivre lixivié à l'aide d'une mousse contenant de l'acide chlorhydrique et stabilisée par l'éther alkylique de polyoxyéthylène comme tensioactif. Ils ont ici mis à profit le pouvoir oxydant du dioxygène présent dans les bulles d'air et ont démontré que le transfert rapide d'O₂ à travers les mousses permet une oxydation rapide et efficace du cuivre. En utilisant l'ozone, ils ont également montré que ces mousses peuvent être appliquées à la lixiviation de l'argent, un métal plus précieux.

Ce concept, extensible à d'autres métaux, ouvre de nouvelles voies prometteuses pour recycler les métaux contenus dans les e-déchets avec une empreinte environnementale faible.

• Source : CNRS, 26/10/2021.

Réf. : P. Trinh, A. Mikhailovskaya, M. Zhang, P. Perrin, N. Pantoustier, G. Lefèvre, C. Monteux, *Leaching foams for copper and silver dissolution: a proof of concept of a more environmentally friendly process for the recovery of critical metals*, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, oct. 2021, <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c02258>

Industrie

Les lauréats du prix Pierre Potier 2021

Créé en 2006 par la Fédération Française pour les sciences de la Chimie, le Ministère de l'Économie, des Finances et de l'Industrie et France Chimie, et porté aujourd'hui par la Fondation de la Maison de la Chimie et France Chimie, le prix Pierre Potier met en lumière et récompense chaque année les initiatives de la chimie en faveur du développement durable et les démarches écoresponsables.

- **Trophée à Minafin**, par l'intermédiaire de sa filiale Pennakem Europa, pour **EcoXtract**[®], un produit biosourcé issu de bagasse de canne à sucre, capable de substituer l'hexane, solvant pétrochimique utilisé dans la production d'huiles et de protéines. EcoXtract[®] est biodégradable, recyclable, non toxique pour l'environnement et est dix fois plus sûr que l'hexane en ingestion et vingt fois en inhalation. Il offre des performances d'extraction similaires voire supérieures à celles de l'hexane, et sa production, à partir de déchets agricoles, émet dix fois moins de CO₂ que celle d'un solvant pétrochimique.

- **Trophée à Solvay** pour **Addibond**[™], une innovation qui permet de rallonger la durée de vie des collages de pièces automobiles et de diminuer leur impact environnemental. Aujourd'hui, la technologie de collage de deux pièces métalliques pour la construction d'un châssis de véhicule est de plus en plus utilisée comme alternative à la soudure, au boulonnage ou au rivetage. Addibond[™] permet le traitement des pièces d'aluminium intervenant avant l'étape de collage structural. Cette technologie s'inscrit dans la logique d'allègement des véhicules, laquelle induit un remplacement de l'acier par l'aluminium à l'échelle industrielle.

- **Trophée à Scanae** pour le développement de **BioDScreen**[®], une technologie innovante de screening pour l'analyse rapide de la biodégradabilité des ingrédients et des produits finis. Cet outil s'adresse aux industriels de la chimie, la biodégradabilité étant un indicateur de la persistance des composés organiques dans l'environnement. Les tests de biodégradabilité réalisés par cet outil sont jusqu'à quatre fois plus rapides que les analyses traditionnelles, à un coût plus économique associé à la possibilité d'analyser un grand nombre de substances en parallèle.

- **Médaille à BASF France** pour **EcoSun Pass**[®], une méthodologie d'évaluation environnementale des filtres UV. Cet outil permet d'évaluer l'impact des filtres solaires sur les écosystèmes terrestres et marins. L'impact écologique d'un filtre UV doit être considéré dans sa globalité en incluant sa biodégradation, sa bioaccumulation dans les organismes marins, la toxicité des sédiments, terrestre et aquatique. Ce dispositif qui repose sur tous ces critères d'évaluation met en lumière le cycle de vie du produit solaire formulé depuis sa conception jusqu'à sa fin de vie.

- **Médaille à Calyxia** pour **NaturaCaps**, des microcapsules biodégradables et biosourcées. Les microcapsules utilisées actuellement dans de nombreux produits comme les lessives ou les produits phytosanitaires sont conçues avec des matières premières d'origine fossile et des matériaux plastiques toxiques qui seront interdits d'ici 2024. La technologie NaturaCaps permet la suppression de ces microplastiques, la réduction de l'empreinte carbone par l'utilisation de matériaux biosourcés, ainsi que le remplacement d'actifs toxiques par des alternatives non toxiques.

Prix Pierre Potier des lycéens

Ce prix a été créé à l'occasion de l'Année de la chimie de l'école à l'université (2018-2019), par le Ministère de l'Éducation nationale, de la Jeunesse et des Sports, la Fondation de la Maison de la Chimie, France Chimie et le Réseau des Jeunes chimistes de la Société Chimique de France (RJ-SCF).

- **Trophée à Kemica Coatings**, pour **SANFLAMM**, une résine haute performance issue de produits volatils biosourcés. Cette résine d'étanchéité, non inflammable, est développée pour les secteurs de la construction, de l'industrie et les revêtements de tunnels. Ce revêtement anticorrosion, destiné à protéger les rétentions chimiques, les sols et murs dans les industries (chimie, pharmacie, nucléaire, raffineries, industries de gaz et de pétrole), n'émet dans l'atmosphère aucun composant nocif et permet d'éviter la propagation de flammes en cas d'incendie. Les prix ont été remis aux lauréats en octobre dernier lors de la journée « Accélérons demain » qui célébrait les cent ans de France Chimie, mettant en lumière les grandes innovations et le dynamisme des industries de la chimie.

20 janvier 2022

Rencontres Jeunes chimistes et chimie durable

Webinaire

www.eventbrite.com/e/rencontre-entreprises-engagees-pour-une-chimie-durable-tickets-193137608787

20-22 janvier 2022

French Swiss photochemistry symposium

Grenoble

<https://forms.gle/qtmMQtta9358fgUv6>

25-28 janvier 2022

JIREC 2022

Journées Innovation et recherche dans l'enseignement de la chimie

Toulouse

<https://new.societechimiquedefrance.fr/divisions/enseignement-formation/jirec-2022-a-toulouse>

26-28 janvier 2022

HTC 17

17th International symposium on hyphenated techniques in chromatography and separation technology

Ghent (Belgique)

<https://htc-17.com>

31 janvier-3 février 2022

XVII^e Colloque du Groupe français de bioélectrochimie

Saint-Dié-des-Vosges

www.bioelectrochimie.fr

31 janvier-3 février 2022

Natural and artificial metalloenzymes

Faraday discussion

Online

www.rsc.org/events/detail/46673/natural-and-artificial-metalloenzymes-faraday-discussion

3 février 2022

L'essentiel de la métrologie

Paris ou webconférence

www.cfmetrologie.com/fr/journee-technique/essentiel-metrologie-detail

3-4 février 2022

JCC 2022

Journées de chimie de coordination

Villeneuve d'Ascq

www.sciencesconf.org/browse/conference/?confid=11550

11-12 février 2022

Village de la chimie

Paris

www.villagedelachimie.org

13-17 février 2022

CECP 2022

Central European conference on photochemistry

Bad Hofgastein (Autriche)

www.cecp.at

16-18 février 2022

YRFM 2022

29th Young research fellows meeting

Nantes

www.sct-asso.fr/yrfm.html

14-18 mars 2022

2nd Catalysis energy chemistry (CatEnerChem) winter school

Aussois

<https://catenerchem.cpe.fr>

20-24 mars 2022

ACS spring 2022

In-person & virtual

San Diego (CA, E.-U.)

www.acs.org/content/acs/en/meetings/acs-meetings/abstract-submission/call-for-abstracts.html?sc=210809_mtg_em_SPR22_prospects_od

20-24 mars 2022

RECOB 18

Rencontres de chimie organique biologique

Aussois

<https://recob18.sciencesconf.org>

29-31 mars 2022

Eurocoat 2022

Paris

www.eurocoat-expo.com/conferences

1^{er} avril 2022

FICS 2022

French industrial chemistry symposium

Paris

<https://new.societechimiquedefrance.fr/divisions/chimie-industrielle/contact-chimie-industrielle>

5-8 avril 2022

ECMoIs

3rd European conference on molecular spintronics

Dortmund (Allemagne)

<https://ecmols2020.tu-dortmund.de>

2-6 mai 2022

GECOM-CONCOORD

Sévrier

<https://gecomconcoord22.sciencesconf.org>

3-6 mai 2022

CBRNE research & innovation

5th International conference

Lille

www.cbrneconference.fr

16-19 mai 2022

CFCF 2022

3^e Colloque français de chimie du fluor

Forges-les-Eaux

<https://cfcf2022.sciencesconf.org>

16-20 mai 2022

ISGC 2022

International symposium on green chemistry

La Rochelle

www.isgc-symposium.com

30 mai-3 juin 2022

FFCat 2022

French conference on catalysis

Ronce-les-Bains

<https://ffcat2022.sciencesconf.org>

En raison des mesures sanitaires liées au Covid-19, certaines manifestations peuvent être annulées, modifiées et/ou reportées. Vous trouverez de nombreuses autres manifestations sur le site de la SCF : societechimiquedefrance.fr/Events

En direct du Bureau

Après la mise en place de son nouveau site web, la SCF poursuit la modernisation de ses moyens de communication avec le lancement en septembre dernier du nouveau format de *SCF Info*.

Organisée en rubriques claires et modulables – Les temps forts, Nos membres se distinguent, En direct de nos partenaires, En direct de l'industrie, En direct du RJ-SCF, Éducation et société, Enseignement, À ne pas manquer, Chimie insolite –, la nouvelle newsletter est formatée pour être consultable sur son téléphone portable.

Prix des entités 2021

Division Chimie industrielle

Prix de la division



• Hervé Plessix

Hervé Plessix est diplômé de l'École Polytechnique et titulaire d'un doctorat en chimie organique de l'Université Paris XI (dir. Jean-Yves Lallemand). Il a d'abord effectué sa carrière chez L'Oréal puis au sein du groupe

Danone en occupant diverses fonctions en R&D. C'est en 2016 qu'il rejoint puis prend la direction de la Stéarinerie Dubois*.

Créée en 1820, la Stéarinerie Dubois a vécu au rythme des évolutions scientifiques et industrielles de la chimie. Initialement spécialisée dans la fabrication de l'acide stéarique et la transformation de celui-ci en bougies, l'entreprise s'est réinventée à partir de 1980 en fabricant d'esters gras de spécialités et en prenant résolument le tournant de la « chimie verte », depuis le choix des matières premières jusqu'aux procédés de fabrication (chimie douce, respectueuse de l'environnement, sans solvants, réduction sensible des déchets, démarche RSE, etc.).

La société compte 150 collaborateurs et 70 % de son chiffre d'affaires est réalisé à l'international. Elle dispose de deux sites de production, en France et en Malaisie (via une joint-venture, Dubois Natural Esters). Une de ses dernières innovations, Dub Estoline®, un polymère multifonctionnel biosourcé et biodégradable pour la cosmétique, a été sélectionnée pour la deuxième édition de la Grande Exposition du Fabriqué en France qui s'est tenue à l'Élysée en juillet dernier.

* www.stearinerie-dubois.com

Voir son article « La Stéarinerie Dubois : de la bougie aux corps gras technologiques, 200 ans d'aventure industrielle, *L'Act. Chim.*, 2021, 462, p. 20-24.

Prix de thèse



• Romain Laher

Après avoir obtenu son diplôme de l'ENSCP, Romain Laher a travaillé deux ans pour l'entreprise Expressions Parfumées avant d'effectuer à l'Institut de Chimie de Nice (Université Côte d'Azur) sa thèse financée par cette société (dir. Véronique Michelet). Basée à Grasse, Expressions Parfumées est une société de parfumerie créée en 1982 dont un axe fort est la création de nouvelles fragrances

en utilisant les innovations technologiques les plus récentes et la richesse des matières premières de parfumerie naturelles et synthétiques.

Ses travaux ont permis de découvrir de nouveaux squelettes originaux pour des molécules odorantes, selon des méthodologies impliquant la catalyse à l'or. Dans le cadre de ses travaux, plus de 220 molécules ont été soumises en olfaction dont 135 nouvelles molécules jamais décrites auparavant. Vingt-cinq ont été particulièrement retenues et sont en cours de tests pour entrer dans différents parfums.

* www.epparfums.com

Voir La catalyse à l'or en parfumerie, *L'Act. Chim.*, 2021, 467, p. 55-56.

Groupe Chémobiologie

Prix Jeune chercheur



• Wadih Ghattas

Après l'obtention en 2007 de son doctorat en chimie bioinorganique (Aix-Marseille Université, dir. A.J. Simaan et M. Réglie), Wadih Ghattas a effectué un postdoctorat dans le groupe de M. Albrecht (University College Dublin) puis dans celui de C.E. Müller (Université de Bonn). En 2012, une bourse de l'ANR lui est décernée dans le cadre du programme « Retour post-doctorant » pour développer des enzymes artificielles pour la catalyse *in vivo* à l'Université Paris Saclay. Il est recruté en 2016 comme chargé de recherche au CNRS à l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO, UMR 8182). Ses recherches se focalisent sur la préparation d'enzymes artificielles pour la synthèse chimique, l'énergie renouvelable et des outils de théranostic.

Il a reçu cette année la Médaille de bronze du CNRS.

À propos du groupe Histoire de la chimie

Depuis septembre dernier, un nouveau Bureau a été élu, constitué de Xavier Bataille (président), Eric Jacques (vice-président), Danielle Fauque (trésorière), Antoine Renier-Lajeunie (secrétaire) et Paul Rigny. La nouvelle équipe animera le GHC dans la continuité des activités menées par l'ancien Bureau.

Le nouveau groupe fait suite à un partage des activités entre celui-ci et l'association éponyme (loi 1901). Il a pour but de réunir les membres de la SCF qui souhaitent échanger et diffuser dans le domaine de l'histoire de la chimie sous ses différentes facettes : chimie théorique, expérimentale, instrumentale, appliquée, industrielle et patrimoniale. Son rattachement à la division SCF Enseignement et Formation traduit sa priorité : valoriser l'apport de l'histoire à l'enseignement des sciences physiques et chimiques. Les activités engagées pour 2021-2022 seront de différentes natures : création d'une rubrique « lecture du mois », séminaires en ligne et en présentiel, formations et conférences à l'usage de l'histoire des sciences dans l'enseignement, promenades et visites.

• ghc@societechimiquedefrance.fr

<https://new.societechimiquedefrance.fr/groupe/groupe-histoire-de-la-chimie>

Des nez électroniques pour diagnostiquer des pathologies par analyse de composés gazeux dans l'haleine de patients

L'analyse d'haleine

Détecter des maladies en utilisant l'air exhalé n'est pas un nouveau concept. La médecine traditionnelle chinoise faisait le lien entre odeur de l'haleine et état de santé. De même, Socrate associait une odeur sucrée au diabète, une odeur de poisson aux problèmes de foie, une odeur d'urine aux dysfonctionnements des reins. L'approche moderne vient dans les années 1970 avec le développement de la chromatographie en phase gazeuse [1]. Cette technologie a permis de mettre en évidence plus d'un millier de composés gazeux (organiques ou non) dans l'haleine. Il a été montré que la composition gazeuse de l'air exhalé peut être reliée à l'état métabolique du corps. Il est donc possible de relier la composition gazeuse de l'air exhalé avec des perturbations biochimiques engendrées par des pathologies (cancers, maladies des reins, du foie, etc.) ; ce nouveau domaine scientifique est appelé **exhalomique**. Ainsi pour chaque pathologie, on peut mettre en évidence une signature chimique particulière de l'haleine de patients. Les techniques de la chimie analytique moderne permettent d'identifier et de quantifier ces biomarqueurs à l'état de traces et font partie des méthodes de référence pour cette application [2]. Cependant, leur utilisation demande des personnels hautement qualifiés et leurs coûts limitent leur usage dans une pratique quotidienne de la médecine. Pour ces raisons, la demande est forte pour des instruments peu chers, portables, fiables, faciles d'utilisation, donnant les résultats en temps réel pour réaliser des diagnostics précoces et non invasifs de maladies. Dans ce cadre, les nez électroniques apparaissent comme des technologies émergentes très prometteuses.

Nez électronique

Un nez électronique ne fournit pas d'informations sur la composition de l'haleine, mais il est entraîné à détecter une empreinte numérique de l'haleine en utilisant des méthodes de reconnaissance de formes. Il est composé d'une matrice de capteurs électroniques, d'un système d'acquisition et de traitement des données et d'un algorithme de classification permettant de donner les résultats de l'analyse (figure 1).

Nous avons appliqué ces principes à la détection de l'ammoniac dans l'haleine qui est l'un des biomarqueurs de l'insuffisance rénale chronique.

L'ammoniac, un biomarqueur de l'insuffisance rénale

Pour des personnes en bonne santé, l'ammoniac est converti en urée dans le foie. L'urée est alors transportée via le flux sanguin et éliminée dans l'urine par les reins. Pour les personnes atteintes d'insuffisance rénale chronique, l'urée accumulée est dégradée par uréase salivaire en ammoniac qui se retrouve dans l'air exhalé. L'ammoniac constitue donc un marqueur d'anomalie dans l'élimination des déchets azotés. La mesure de concentration de l'ammoniac dans l'haleine peut donc être un outil simple, rapide et non invasif pour la détection de l'insuffisance rénale. Les concentrations d'ammoniac à mesurer sont de

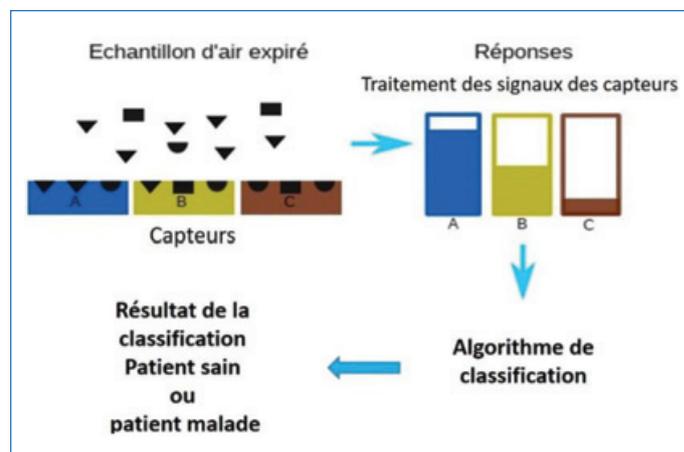


Figure 1 - Architecture simplifiée d'un nez électronique.

quelques ppm (partie par millions) et même ppb (partie par milliard) ; les capteurs doivent donc être suffisamment sensibles à ces niveaux de concentration. Pour des concentrations dans l'haleine supérieures à 1,6 ppm, la personne est malade, et pour des concentrations inférieures à 1,1 ppm, la personne est en bonne santé.

Matrice de capteurs et nez électronique

Nous avons constitué une matrice de onze capteurs de nanocomposites à base de polyaniline (PANI) dont nous connaissons leurs aptitudes à détecter l'ammoniac avec des seuils de quantification de l'ordre de la dizaine de ppb et avec des sensibilités suffisantes dans la gamme de concentrations visée (voir *tableau*). L'échantillon 1 est de la PANI dopée avec de l'acide camphosphosulfonique (CSA), les deux et trois sont des composites PANI/chitosan où la PANI est dopée avec le CSA, obtenus par co-dissolution. Les autres échantillons sont des composites PANI/TiO₂ avec la PANI dopée par l'acide dodécyl benzène sulfonique (DBSA). Ces acides sulfoniques sont utilisés car ils permettent la mise en solution de la polyaniline dans sa forme conductrice. Ces matériaux présentent des morphologies et des réactivités différentes à l'ammoniac. Par exemple, les composites PANI/TiO₂ présentent une structure sous forme de cœur-écorce avec un cœur de TiO₂ de 10 nm de diamètre et une écorce de PANI de 2 nm d'épaisseur [3] ; ce type de structure permet d'amplifier la réponse des capteurs.

Sous l'effet de l'ammoniac, la PANI perd un proton et l'ammoniac est transformé en ion ammonium. Ce mécanisme correspond à un dédopage de la PANI qui induit l'augmentation de la résistance électrique du matériau. Cette réaction étant réversible, quand le matériau est remis à l'air libre, l'ammonium est transformé en ammoniac et le proton retourne sur la chaîne de polymère, restaurant ainsi sa résistance initiale.

Les expérimentations sont réalisées dans un environnement strictement contrôlé en température et humidité, avec des concentrations en ammoniac calculées et contrôlées par un analyseur de référence.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
PANI	Chit	Chit	Chit	CNT	TiO ₂					
100	20	50	75	80,3	8,7	18,9	36,1	79,2	79,2	79,2

Composition des nanocomposites utilisés pour la détection de l'ammoniac. Les chiffres indiquent le pourcentage de polyaniline dans les nanocomposites.

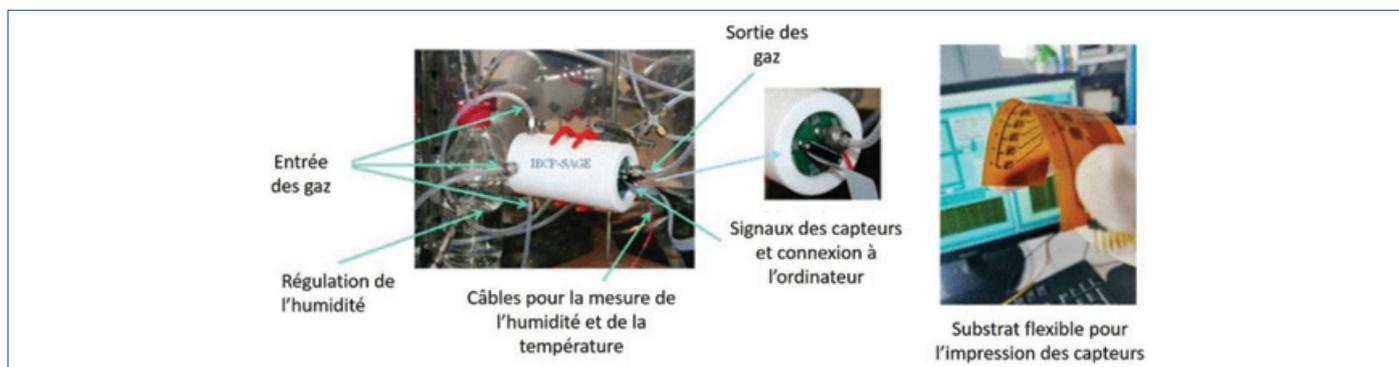


Figure 2 - Banc de caractérisation des capteurs.

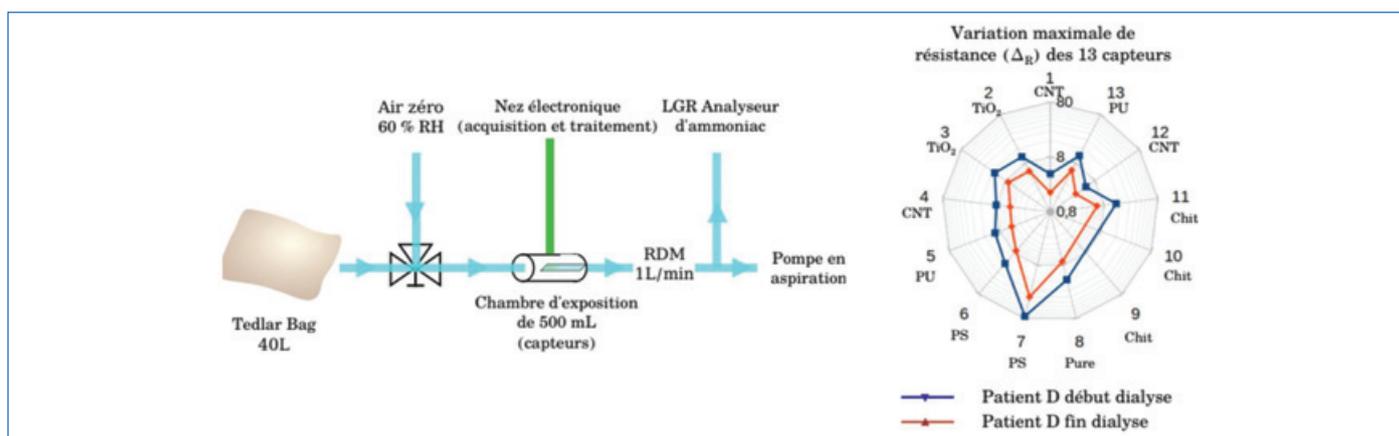


Figure 3 - Dispositif expérimental et signature électronique de l'haleine d'un patient avant et après dialyse.

La figure 2 montre le banc de caractérisation des capteurs. Ce système constitue la base du nez électronique, et nous travaillons actuellement à sa miniaturisation.

En laboratoire, les capteurs sont soumis à un mélange de gaz avec une humidité importante pour simuler l'haleine d'une personne saine. Des pulses d'ammoniac sont alors envoyés dans la gamme de concentrations correspondant aux différents états du patient (malade ou sain). À l'aide d'algorithmes d'apprentissage supervisé de type machine à vecteurs de support (SVM), les concentrations d'ammoniac correspondant aux personnes malades, en bonne santé ou incertaines ont été alors discriminées avec une précision de classification de 97 %.

Pour valider la démarche, l'haleine de patients atteints d'insuffisance rénale a été recueillie dans des sacs Tedlar avant et après la dialyse. Dans cette démarche, on considère qu'avant dialyse, la situation est représentative d'un patient malade et que juste après dialyse, le sang étant purifié, on obtient un état représentatif d'un patient sain. Les échantillons d'haleine sont alors envoyés vers le nez électronique pour analyse [4] (figure 3). Sur ce dispositif, on envoie à débit constant l'air provenant du sac Tedlar sur le nez électronique ; les concentrations sont vérifiées par un analyseur d'ammoniac de référence (LGR). Sur un petit nombre de patients, une signature électronique correspondant à l'état du patient a été mise en évidence. La courbe en bleu représente la réponse des treize capteurs du nez pour un patient avant dialyse et celle en rouge la réponse des mêmes capteurs et du même patient après dialyse (figure 3). Cela montre l'efficacité de la dialyse qui diminue la concentration en ammoniac dans l'haleine du patient et la capacité du nez électronique à discriminer les états du patient. Ces premiers résultats sont encourageants.

Cependant, la détection d'un seul composé n'est pas suffisante car elle peut donner lieu à de faux diagnostics. En effet, l'élévation du taux d'ammoniac dans l'haleine peut également être un indice de plusieurs autres pathologies telles que la cirrhose du foie, l'hépatite, l'encéphalopathie hépatique, l'asthme, l'halitose ou les ulcères gastro-duodénaux [5]. C'est pourquoi nous avons entrepris une étude approfondie de recherche de biomarqueurs de l'insuffisance rénale par chromatographie en phase gazeuse, méthode de chimie analytique de référence (GC-MS), en collaboration avec le service de néphrologie du CHU de Lille. Il a été mis en évidence un certain nombre de composés organiques volatils susceptibles d'être symptomatiques de l'insuffisance rénale chronique [6]. Cette étude va nous permettre d'insérer dans le nez électronique d'autres formulations de capteurs aptes à détecter ces nouveaux biomarqueurs, pour améliorer son efficacité et la précision du diagnostic.

- [1] L. Pauling *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences, **1978**, *68*, p. 2374-376.
- [2] B. Buszewski, M. Keszy, T. Ligor, A. Amann, Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases, *Biomed. Chromatogr.*, **2007**, *21*, p. 553-566.
- [3] S. Mikhaylov, J.-L. Wojkiewicz *et al.*, Ammonia/amines electronic gas sensors based on hybrid polyaniline- TiO_2 nanocomposites. The influence of titania and the surface active doping acid, *RSC Advances*, **2015**, *5*, p. 20218-2226.
- [4] P. Le Maout, J.-L. Wojkiewicz *et al.*, Polyaniline nanocomposites based sensor array for breath ammonia analysis. Portable e-nose approach to noninvasive diagnosis of chronic kidney disease, *Sens. Actuators, B. Chem.*, **2018**, *274*, p. 616-626.
- [5] S. Bevc *et al.*, Measurement of breath ammonia for detection of patients with chronic kidney disease, *Clin. Nephrol.*, **2017**, *88*, 514-517.
- [6] M. Akiki, J.-L. Wojkiewicz *et al.*, Detection of VOC biomarkers specific to chronic kidney disease by analysis of exhaled air from dialysis patients at advanced stages, Digital Breath Biopsy Conference 2020, 10-11 nov. **2020**.

Cette fiche a été réalisée par **Jean-Luc WOJKIEWICZ***, **Caroline DUC** et **Nathalie REDON**, enseignants-chercheurs au Centre Energie Environnement (IMT Lille Douai) suite à la thèse de Paul Le Maout (IMT Atlantique, équipe de Cyril Lahuec). La recherche de biomarqueurs par GC-MS est réalisée par Nadine Locoge, professeure, et Maria Akiki, doctorante (IMT Lille Douai en collaboration avec le CHU de Lille).

* jean-luc.wojkiewicz@imt-lille-douai.fr

Les fiches « Un point sur » sont coordonnées par Jean-Pierre FOULON (jpfoulon@wanadoo.fr). Elles sont regroupées et en téléchargement libre sur www.lactualitechimique.org.

Abonnez-vous pour un an (numéros spéciaux inclus)

Cochez la case qui correspond à l'abonnement auquel vous voulez souscrire :

	Abonnement papier + électronique*			Abonnement électronique seul*	
	France métropolitaine	DROM-COM / Zone 1**	Zone 2**	France / Étranger	
Particuliers	<input type="checkbox"/> 105 €	<input type="checkbox"/> 145 €	<input type="checkbox"/> 160 €	Particuliers	<input type="checkbox"/> 55 €
Lycées	<input type="checkbox"/> 120 €	<input type="checkbox"/> 160 €	<input type="checkbox"/> 175 €	Lycées	<input type="checkbox"/> 70 €
Institutions	<input type="checkbox"/> 205 €	<input type="checkbox"/> 245 €	<input type="checkbox"/> 260 €	Institutions	<input type="checkbox"/> 155 €

* Courriel obligatoire ** Zone 1 : Union européenne, Royaume-Uni et Suisse ; Zone 2 : reste du monde.

Complétez votre collection

Les sommaires de tous les numéros peuvent être consultés sur notre site www.lactualitechimique.org

Tous les articles et numéros de plus de cinq ans sont téléchargeables gratuitement

Numéros spéciaux également disponibles en **version électronique** sur le site à un tarif préférentiel

Dernières parutions :

- La chimobiologie explore le vivant (décembre 2021) : 20 €
- Hydrogène décarboné (octobre 2021) : 20 €
- De la chimie du solide aux batteries de demain (juillet-août 2021) : 20 €
- Substances naturelles et chimie durable (mai 2021) : 20 €
- Radiochimie et chimie sous rayonnement (mars-avril 2021) : 32 €
- Le jubilé du Groupe Français d'Études & d'Applications des Polymères (nov.-déc.-janv. 2020-2021) : 32 €
- Pigments et colorants (oct.-nov. 2019) : 32 €
- La montée en puissance de la RPE (sept. 2019) : 20 €
- Les applications actuelles de la calorimétrie (juin 2019) : 20 €
- Quelles réponses aux menaces chimiques, biologiques et radiobiologiques ? (mai 2019) : 20 €
- Les startups de la chimie (mars-avril 2019) : 32 €
- La chimie supramoléculaire (juin-juil.-août 2018) : 32 €
- Chimie et développement durable (mars-avril 2018) : 32 €
- Polymères de demain, boosters d'innovations (oct.-nov. 2017) : 32 €
- Chimie et miniaturisation (mai-juin 2017) : 32 €
- La sonochimie, ou comment les ultrasons font vibrer la chimie ! (sept. 2016) : 20 €
- Chimie et transition énergétique (juin-juil.-août 2016) : 32 €
- L'électrochimie au cœur des sciences (oct.-nov. 2015) : 32 €



Collection "Chimie et...", co-éditée et diffusée par EDP Sciences

Dernières parutions :

- Chimie et lumière (janv. 2021) : 25 €
- Chimie et nouvelles thérapies (sept. 2020) : 25 €
- Chimie et Alexandrie dans l'Antiquité (janv. 2020) : 25 €
- Chimie, nanomatériaux, nanotechnologies (sept. 2019) : 25 €
- Chimie et biologie de synthèse - Les applications (janv. 2019) : 25 €
- Chimie, aéronautique et espace (sept. 2018) : 25 €
- La chimie et les sens (janv. 2018) : 25 €
- La chimie et les grandes villes (sept. 2017) : 25 €
- Chimie, dermo-cosmétique et beauté (janv. 2017) : 25 €
- Chimie et changement climatique (sept. 2016) : 25 €
- Chimie et expertise : santé et environnement (janv. 2016) : 25 €



À commander
chez votre libraire
ou directement sur
laboutique.edpsciences.fr

Bon de commande

Nom Prénom

Adresse (pour les particuliers, préciser l'adresse personnelle)

Code postal Ville Pays

Tél Courriel

Adresse IP (pour l'abonnement multiple).....

Montant total de la commande (frais de port inclus) :

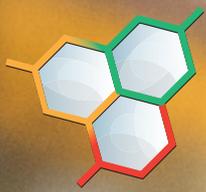
Mode de règlement

- sur facturation (joindre obligatoirement le bon de commande)
- par chèque bancaire ou postal libellé à l'ordre de la SCF souhaite recevoir une facture acquittée
- par virement bancaire ou postal
France Société Générale Paris Seine Amont, 03081/00037265820/87 CCP Paris 30041 Compte 070786U020/90
Étranger IBAN FR7630003030810003726582087 Swift.Sogefrpp
- par carte bancaire (Visa, Eurocard Mastercard) Validité
Cryptogramme visuel (les trois derniers chiffres du numéro imprimé au dos)

L'Actualité Chimique

SCF, Service Abonnement, 250 rue Saint-Jacques, 75005 Paris - Tél. : 01 40 46 71 66/60.

abonnement@lactualitechimique.org - www.lactualitechimique.org



SEIRICH

Évaluer le risque chimique



“L’outil pratique
et évolutif pour
prévenir les
risques chimiques
en entreprise”

Éric L.
Chef d’entreprise

Télécharger librement sur
www.seirich.fr



FRANCE
CHIMIE



EN PARTENARIAT AVEC
ms
santé
famille
retraite
services