

## Sondes fluorogènes pour l'imagerie à très haute sensibilité de peptidases et glycosidases

M. Prost<sup>1</sup>, O. Thorn-Seshold<sup>1</sup>, L. Canaple<sup>2</sup>, J. Hasserodt<sup>1</sup><sup>1</sup>Laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon, Equipe de Chimie Bio-Organique, Ecole Normale Supérieure de Lyon<sup>2</sup>Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Ecole Normale Supérieure de Lyon

....

Détecter et localiser précisément l'activité d'une enzyme donnée au sein d'un organisme vivant est d'une importance capitale pour mieux comprendre les mécanismes biologiques qui sont à l'origine de certaines pathologies, et ainsi mieux les traiter. D'immenses progrès ont été réalisés dans ce domaine, notamment avec la conception de sondes ciblant les enzymes activées, évitant la détection de zymogènes.<sup>1</sup> Cependant, les sondes classiques souffrent de certaines faiblesses comme la diffusion du signal loin du site actif ou la production d'un fluorophore à faible déplacement de Stokes, favorisant la détection de l'autofluorescence des tissus.<sup>2</sup> Pour dépasser ces désavantages, notre équipe a élaboré des sondes basées sur un fluorophore ESIPT (Excited State Intramolecular Proton Transfer), insoluble en conditions physiologiques, qui fonctionnent selon un principe off→ON permettant l'imagerie très sensible d'une activité enzymatique souhaitée.

Nos sondes sont basées sur un système à trois composantes permettant de bénéficier des propriétés exceptionnelles des fluorophores ESIPT. Un des rares exemples de l'utilisation de tels fluorophores a été popularisé par Molecular Probes qui a développé une sonde pour phosphatase basée sur l'alcool ELF-97,<sup>3</sup> un fluorophore insoluble qui produit une intense fluorescence verte, et exhibe un déplacement de Stokes de plus de 130nm. Cependant, ce fluorophore n'a pas rencontré un franc succès pour la détection d'autres enzymes comme les peptidases ou les glycosidases, probablement à cause de l'instabilité de la liaison reliant le fluorophore au substrat. Notre équipe a solutionné ce problème en incorporant un espaceur intelligent, relié au fluorophore par une liaison stable d'un côté, et au substrat d'intérêt de l'autre. Le fluorophore ainsi lié est privé de son caractère ESIPT, et sa fluorescence est inhibée (off). Après clivage enzymatique, le nucléophile généré va cycliser instantanément, provoquant la libération du fluorophore (ON) qui précipite à l'endroit même de l'activité enzymatique (Figure 1).

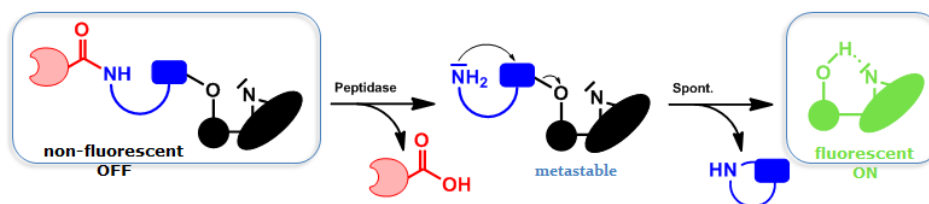
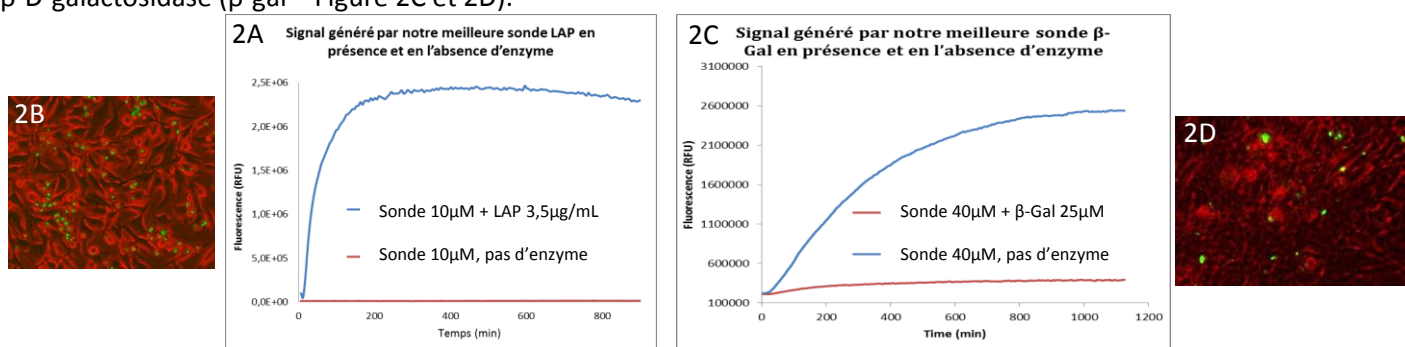


Figure 1 – Principe de fonctionnement des sondes à trois composantes

Nous avons ainsi mis au point une synthèse courte et versatile nous permettant de produire facilement des sondes pour détecter *in vitro* et imager *in cellulo* l'activité de la LeucineAminoPeptidase<sup>4</sup> (LAP – Figure 2A et 2B), et de la  $\beta$ -D-galactosidase ( $\beta$ -gal – Figure 2C et 2D).

Figure 2 – Signal généré par l'incubation de nos sondes avec les enzymes purifiées (2A : LAP ; 2C :  $\beta$ -Gal) et images de cellules HeLa incubées avec nos sondes après 24h à 37°C (2B : LAP ; 2D :  $\beta$ -Gal)

En conclusion, nous avons développé des sondes modulables qui permettent l'imagerie très précise d'enzymes de classes diverses. Cette précision est obtenue grâce à l'insolubilité de l'intense fluorophore ESIPT généré et à la grande stabilité de nos sondes apportant un rapport signal/bruit immense. Des recherches sont en cours pour varier les fluorophores afin de parvenir à une imagerie dans la fenêtre de transparence biologique et au multiplexing.

....

1. A. Baruch *et al.* Trends in Cell Biology, 14: 29-35, 2004.
2. E. Boonacker *et al.* J. Histochem. Cytochem., 49: 1473-1486, 2001.
3. V.B. Paragas *et al.* J. Microscopy, 206: 106-119, 2002.
4. O. Thorn-Seshold *et al.* Chem. Commun., 48: 6253-6255, 2012.