



HAL
open science

Développement et caractérisation de récepteurs d'anions et applications thérapeutiques dans les canalopathies

Guy Gouarin

► **To cite this version:**

Guy Gouarin. Développement et caractérisation de récepteurs d'anions et applications thérapeutiques dans les canalopathies. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-03205048

HAL Id: dumas-03205048

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03205048>

Submitted on 22 Apr 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE
UFR SANTE – Département PHARMACIE

Année 2019
N°

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 18 Novembre 2019

par

GOUARIN Guy

Né(e) le 05/09/1993 à Rouen

**Développement et Caractérisation de Récepteurs
d'Anions et leurs Applications Thérapeutiques
dans les Canalopathies**

Président du jury : *VERITE, Philippe, Professeur des Universités*

Membres du jury : *GAUCHER, Anne, Maitre de conférences des
Universités*

DUBUS, Isabelle, Professeur des Universités

LAFONT, Olivier, Professeur Honoraire

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord au Dr. Anne GAUCHER, ma directrice de thèse, qui a su me guider et m'encourager dans mon travail, ainsi que pour ses nombreux conseils durant le stage et la rédaction de cette thèse.

Ma gratitude va également au Pr. Philippe Vérité qui a co-dirigé cette thèse, a su répondre à mes questions et m'assister tout au long de ce travail et plus largement au cours de mes études en pharmacie.

Je désire également témoigner de ma reconnaissance au Pr. Isabelle DUBUS et au Pr. Olivier LAFONT pour leur participation dans l'évaluation de ce travail.

Je tiens également à remercier le Pr. Damien PRIM pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour la confiance qu'il m'a accordée.

Je désire également remercier Mr. Romain PLAIS pour les conseils et la disponibilité dont il a su faire preuve, ainsi que pour son aide au cours de ce travail et les discussions enrichissantes que nous avons pu partager.

J'adresse également mes remerciements au Dr. Gilles CLAVIER pour son aide précieuse pour les travaux de photophysique, ainsi qu'à Mr. Flavien BOURDREUX pour son assistance en RMN et également à Melle. Aurélie DAMOND pour ses analyses en spectrométrie de masse.

J'adresse ma reconnaissance au directeur de l'Institut Lavoisier de Versailles, le Dr. Emmanuel MAGNIER, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Enfin, je désire remercier l'ensemble de l'équipe Melle. Vanessa MUSSARD, Melle. Safa AZZOUNI, Mr. Benjamin LARGE et le Dr. Florent LE GUERN, pour leur sympathie et leur assistance au cours de ces six mois.

« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs. »

ANNEE UNIVERSITAIRE 2019 - 2020

U.F.R. SANTÉ DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Benoît VEBER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**

Professeur Agnès LIARD

Professeur Guillaume SAVOYE

I – MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Gisèle APTER	Havre	Pédopsychiatrie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Jean-Marc BASTE	HCN	Chirurgie Thoracique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mme Sophie CANDON	HCN	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HCN	Médecine interne (gériatrie)
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CHB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CHB	Radiothérapie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale

Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER (<i>surnombre</i>)	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Claude HOUDAYER	HCN	Génétique
Mr Fabrice JARDIN	CHB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato – Vénérologie
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HCN	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HCN	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HCN	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépto-gastro-entérologie
M. Benoit MISSET (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation Médicale
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophtalmologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN (<i>disponibilité</i>)	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie – Pathologie
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépto-gastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Lilian SCHWARZ	HCN	Chirurgie Viscérale et Digestive

Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Hervé TILLY (<i>surnombre</i>)	CHB	Hématologie et transfusion
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CHB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	Les Herbiers	Médecine Physique et de Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HC	Rhumatologie
Mme Marie-Laure WELTER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Najate ACHAMRAH	HCN	Nutrition
Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Emmanuel BESNIER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Neurophysiologie
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
M. Florent MARGUET	HCN	Histologie
Mme Chloé MELCHIOR	HCN	Gastroentérologie
Mr Thomas MOUREZ (<i>détachement</i>)	HCN	Virologie
Mr Gaël NICOLAS	UFR	Génétique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie
Mr Julien WILS	HCN	Pharmacologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mr Thierry WABLE	UFR	Communication
Mme Mélanie AUVRAY-HAMEL	UFR	Anglais

II – PHARMACIE

PROFESSEUR DES UNIVERSITES

Mr Jérémy BELLIEN (PU-PH)	Pharmacologie
Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Thomas CASTANHEIRO-MATIAS	Chimie Organique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO)	Statistiques
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER	Pharmacologie
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mme Hong LU	Biologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
M. Jérémie MARTINET (MCU-PH)	Immunologie
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile **GUERARD-DETUNCQ**
Mme Caroline **BERTOUX**

Pharmacie officinale
Pharmacie

PAU-PH

M. Mikaël **DAOUPHARS**

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde **GUERIN**

Anglais

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES

Mme Alice **MOISAN**
M. Henri **GONDÉ**

Virologie
Pharmacie

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. Abdel **MOUHAJIR**
M. Maxime **GRAND**

Parasitologie
Bactériologie

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT

Mme Ramla **SALHI**

Pharmacognosie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Abdelhakim EL OMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
M. Jean-Marie VAUGEOIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR MEDECINE GENERALE

Mr Jean-Loup **HERMIL** (PU-MG) UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCE MEDECINE GENERALE

Mr Matthieu **SCHUERS** (MCU-MG) UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTE

Mr Emmanuel LEFEBVRE	UFR	Médecine générale
Mme Elisabeth MAUVIARD	UFR	Médecine générale
Mr Philippe NGUYEN THANH	UFR	Médecine générale
Mme Yveline SEVRIN	UFR	Médecine générale
Mme Marie Thérèse THUEUX	UFR	Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS – MEDECINS GENERALISTES

Mr Pascal BOULET	UFR	Médecine générale
Mme Laëtitia BOURDON	UFR	Médecine générale
Mr Emmanuel HAZARD	UFR	Médecine générale
Mme Lucile PELLERIN	UFR	Médecine générale

III – ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEUR

Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain FRAINEAU (med)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline GAILDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel LETELLIER (med)	Physiologie
Mr Antoine OUVRRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Christine RONDANINO (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Youssan Var TAN	Immunologie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

SJ – Saint Julien Rouen

Table des matières

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS	4
MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS.....	6
PROFESSEUR AGREGÉ OU CERTIFIÉ	6
PROFESSEUR.....	10
Introduction	17
Partie I : Etude Bibliographique	18
1. Les canalopathies	18
1.1. Présentation générale	18
1.2. Revue des canalopathies par organe et leurs thérapeutiques associées.....	20
1.2.1. Canalopathies du système nerveux central	20
1.2.2. Canalopathies du système nerveux périphérique.....	26
1.2.3. Canalopathies du Cœur	29
1.2.4. Canalopathies des Muscles Squelettiques	34
1.2.5. Canalopathies des Reins.....	40
1.2.6. Canalopathie du Système Respiratoire	45
1.2.7. Canalopathies du Système Endocrinien	49
1.2.8. Canalopathies du Système Immunitaire	52
1.3. Innovations futures et Approches Thérapeutiques Innovantes.....	59
2. Concepts de chimie pour le développement de transporteurs d'ions	66
2.1. Mode de liaison aux ions	66
2.1.1. Liaison Hydrogène	66
2.1.2. Interactions impliquant un site électrophile – Liaisons Halogène et Chalcogène	68
2.1.3. Interaction π -anion.....	70
2.2. Mode d'étude des liaisons aux ions	71
2.2.1. Photophysique.....	71
2.2.2. RMN.....	74
3. Conclusion de l'étude bibliographique	76
Partie II : Travaux Expérimentaux	77
1. Design du récepteur	77
1.1. Design Général du Récepteur	77
1.2. Choix des donneurs de liaisons hydrogène	77
1.3. Choix du ligand π	78
1.4. Modulations du bras espaceur	78
2. Modélisation moléculaire	79

3. Synthèse des récepteurs.....	81
3.1. Stratégie générale de synthèse	81
3.2. Synthèse des récepteurs alkyles 1 et 2 :.....	82
3.3. Synthèse des récepteurs symétriques alkyles 3 et 4 :.....	82
3.4. Synthèse du récepteur asymétrique alkyle 5 :.....	83
3.5. Synthèse du récepteur aromatique 6 :.....	83
4. Dosage par RMN	87
4.1. Matériel et Méthodes	87
4.2. Résultats et Discussion	88
5. Dosage photophysique du composé 2	94
5.1. Matériel et Méthodes	94
5.2. Résultats et Discussion	94
6. Conclusion des travaux expérimentaux.....	99
Bibliographie	101
Partie expérimentale :	114

Table des figures

Figure 1 : Schéma de l'électrocardiogramme physiologique © Agateller (Anthony Atkielski), Wikipédia, DP	29
Figure 2 : Quelques exemples de donneurs de liaisons Hydrogènes employés en reconnaissance d'anions, A : Phénylurée B : Isophthalamides, C : Acide Arylboronique, D : Polyols, E : Squaramide	67
Figure 3 : Mécanisme de Transport de la Prodigiosine	68
Figure 4 : Récepteur d'anion proposé par Langton	69
Figure 5 : Structure cristalline de [(Me ₂ N) ₃ S] ⁺ [69.F] ⁻	70
Figure 6 : Principe de la fluorescence prompte	74
Figure 7 : Design Général du Récepteur	77
Figure 8 : Motif 1-(3,5-bis(trifluorométhyl)phényl)urée électroattracteur	77
Figure 9 : Structure de la dichlorotétrazine.	78
Figure 10 : Structures des récepteurs synthétisés au cours du stage	79
Figure 11 : Stratégie générale de synthèse des récepteurs	81
Figure 12 : Attribution des signaux RMN ¹³ C caractéristiques de la tétrazine sur le composé 1 et 2	82
Figure 13 : Synthèse du composé 10	83
Figure 14 : Synthèse initialement proposée pour le composé 6 .	83
Figure 15 : Formes mésomères limites de l'alcoolate	84
Figure 16 : Deuxième synthèse proposée pour le composé 6	84
Figure 17 : Réaction observée en pratique.	84
Figure 18 : Synthèse en stratégie Boc du précurseur du composé 10	85
Figure 19 : Mécanisme proposé pour le réarrangement au cours de la déprotection en milieu acide.	86
Figure 20 : Synthèse du composé 14 selon une stratégie de protection-déprotection à l'aide d'un groupement Fmoc	87
Figure 21 : Spectres RMN ¹ H du titrage du composé 2 par TBACl : (a) Spectre RMN ¹ H (b) Attribution des protons	88
Figure 22 : Fit des données RMN ¹ H du titrage par TBACl : (a) proton a , (b) proton b , et (c) proton c	89
Figure 23 : Spectres RMN ¹ H du titrage du composé 2 par TBAF : (a) Spectre RMN ¹ H (b) Attribution des protons	90
Figure 24 : Equilibre Acido-Basique proposé pour le composé 2	91
Figure 25 : Fit des données RMN ¹ H du titrage par TBAF : (a) proton a , (b) proton b , et (c) proton c	91
Figure 26 : Spectres RMN ¹⁹ F du titrage du composé 2 par TBAF : (a) Spectre RMN ¹ H (b) Attribution des fluors	92
Figure 27: Evolution des signaux RMN ¹⁹ F dans la région entre -62,00 et -62,60 ppm du spectre du composé 2	93
Figure 28 : Comparaison des variations de déplacements chimiques du composé 2 en fonction de l'ion.	93
Figure 29 : Structure de la Rhodamine-6G	94
Figure 30 : Structures et Rendements Quantiques de Tétrazines reportées par Gong	95
Figure 31 : Titrage en Absorbance du composé 2 par TBACl et attribution des bandes d'absorption	95
Figure 32 : Extinction de fluorescence par complexation d'ion	96

Figure 33 : Titration en Fluorescence du composé 2 par TBACl	96
Figure 34 : Fit du titration en fluorescence du composé 2 par TBACl	97
Figure 35 : Titration en déclin de fluorescence par TBACl	97
Figure 36 : Analyses des déclin : (a) τ mesurés, (b) Poids relatifs des τ	98

Table des Tableaux

Tableau 1 : Canalopathies du Système Nerveux Central.....	25
Tableau 2 : Canalopathies du Système Nerveux Périphérique	28
Tableau 3 : Canalopathies du Cœur	33
Tableau 4 : Canalopathies des Reins	44
Tableau 5 : Canalopathies du Système Endocrinien	51
Tableau 6 : Canalopathies Auto-Immunes	57
Tableau 7 : Canalopathies Auto-Immunes (suite)	58
Tableau 8 : Liste des canalopathies impliquant un déficit du transport des ions chlorures	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 9 : Résultats d'optimisations géométriques au niveau B3LYP 6-31G + (d,p) et énergies totales des complexes formés	79
Tableau 10 : Récapitulatif des Constantes d'Association Ka avec l'ion chlorure	89
Tableau 11 : pKa calculés.....	90
Tableau 12 : Récapitulatif des Constantes d'Association Ka avec l'ion fluorure.....	91
Tableau 13 : Rendements quantiques mesurés	94

Table des Abréviations

Å : Angström

ACN : Acétonitrile

AcOEt: Acétate d'Ethyle

ADN : Acide Désoxyribonucléique

Boc : tert-Butoxycarbonyle

Boc₂O : Dicarbonate de di-tert-butyle

DCM : Dichlorométhane

DFT : Théorie de la Fonctionnelle de Densité

DMAP : 4-diméthylaminopyridine

DMF : N,N-Diméthylformamide

EP: Ether de Pétrole EtOH : Ethanol

Fmoc : Fluorénylméthoxycarbonyle

FmocOSu : 9-Fluorénylmethyl N-succinimidyl carbonate

Ha : Hartree

ns : Nanoseconde

ppm : Parties par millions

OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man

QY : Rendement quantique

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RMSD : Ecart quadratique moyen

S_NAr : Substitution Nucléophile Aromatique

TBACl : Chlorure de tétrabutylammonium

TBAF : Fluorure de tétrabutylammonium

TFA : Acide trifluoroacétique

UV/Vis : Ultra-Violet/Visible

Introduction

La chimie supramoléculaire s'est intéressée au développement de récepteurs d'anions et à leur application dans le domaine du transport transmembranaire. La répartition ionique de part et d'autre de la membrane cellulaire est un élément majeur gouvernant les processus biologiques dans le corps humain. L'existence d'un gradient de concentration est impliquée dans des processus physiologiques majeurs, parmi lesquels il est possible de citer : la transmission nerveuse, la contraction musculaire ou encore le contrôle du rythme cardiaque.

Les perturbations de ces phénomènes électrophysiologiques entraînent des pathologies graves telles que la mucoviscidose ou bien le syndrome de Bartter. Ces maladies ne disposent à l'heure actuelle d'aucune thérapie efficace conduisant à la rémission totale du patient. Le développement de molécules capables de reconnaître sélectivement les ions pour ensuite les transporter à travers les membranes cellulaires est devenu un enjeu majeur dans la recherche de nouvelles thérapies de substitution des canaux innovantes.

La combinaison de différents types de liaisons faibles offre une variété d'approches pour la découverte de telles substances actives. Il est ainsi possible de modifier différents paramètres comme la nature, la force, la directionnalité et les combinaisons d'interactions. Une sélection judicieuse de ces paramètres permet de concevoir des transporteurs sélectifs d'ion.

Dans un premier temps nous développerons le sujet des canalopathies en passant en revue les diverses pathologies de cette famille et en discutant des thérapies possibles. La suite de notre travail se concentrera sur la présentation de quelques concepts de chimie nécessaires au développement de transporteurs d'anions ayant un intérêt thérapeutique. Enfin nous présenterons les travaux expérimentaux ayant été réalisés dans le cadre de ce projet.

Mots-clés : Canalopathies, Reconnaissance d'Anions, Interactions π -anion, Photophysique

Partie I : Etude Bibliographique

1. Les canalopathies

1.1. Présentation générale

Les canaux ioniques sont des protéines membranaires ayant la capacité de réguler de manière sélective les flux d'ions à travers les membranes des cellules et des organelles. Leurs mécanismes d'ouverture sont finement régulés et peuvent dépendre de différents stimuli. Parmi les stimuli possibles, on trouve les changements de potentiel de membrane, les liaisons ligand-hôte ou les stimulations physiques. Pour chaque canal, il existe différents isoformes et leur expression est tissu-spécifique ainsi qu'âge-dépendante, permettant ainsi une régulation fine de nombreuses fonctions. Parmi ces fonctions, on peut retrouver l'excitabilité cellulaire, la contraction musculaire, la libération d'hormones et de neurotransmetteurs, l'expression de gènes, le maintien de l'homéostasie en ions et en eau dans l'organisme, la prolifération et la différenciation cellulaire, la réponse immunitaire ou encore la protection des voies respiratoires.

L'ubiquité des canaux ioniques dans l'organisme est à l'origine de la variété des symptômes exprimés par les patients. Dans le génome humain, plus de 400 gènes encodent pour les canaux ioniques. Ces derniers sont présents dans tous les types cellulaires de l'organisme. Malgré une grande variété d'organes touchés et l'immense variabilité des symptômes possibles, les canalopathies partagent toutes un certain nombre de caractéristiques communes du point de vue de leur physiopathologie et des approches thérapeutiques. De manière générale, celles-ci impliqueront une mutation du gène codant pour le canal. Cette dernière pourra induire une perte ou bien un gain de fonctions de la protéine avec un retentissement sur un organe spécifique.

Les manifestations cliniques de ces maladies dépendront du type de mutation et de leurs conséquences fonctionnelles sur l'activité du canal, la localisation cellulaire, l'isoforme ou encore l'assemblage d'oligomères. Dans certains cas, les symptômes observés sont complexes à expliquer du point de vue moléculaire et fonctionnel. Ils peuvent être la résultante de plusieurs mutations de gènes différents, ainsi que d'influences épigénétiques venant moduler l'expression de la maladie. D'autre part, la présence de comorbidité vient complexifier les tableaux cliniques pouvant conduire à des syndromes de défaillance multiviscérale.

En conséquence d'une telle diversité génétique et clinique, mais aussi de la rareté des patients affectés, l'élaboration de diagnostics précis est difficile. D'autre part, la corrélation entre génotype et phénotype peut devenir très complexe à définir. Il en résulte un choix délicat des thérapeutiques appropriées. Celles-ci sont le plus souvent empiriques et symptomatiques, peu efficaces et difficiles à tolérer sur le long terme pour de nombreux patients. Le coût élevé en recherche et développement de nouveaux médicaments pour des maladies ne touchant que peu de patients conduit à un manque d'intérêt des compagnies pharmaceutiques pour la recherche de thérapies efficaces contre les canalopathies. Paradoxalement, quand des molécules prometteuses sont élaborées, l'étape des essais cliniques s'avère extrêmement difficile à passer. En effet, les critères requis pour démontrer de manière statistiquement significative, l'efficacité des nouvelles thérapeutiques ne peuvent que très difficilement être remplies du fait du très faible nombre de patients atteints par ces pathologies. Aujourd'hui, seulement 5% des médicaments disponibles sur le marché sont de petites molécules capables de moduler l'activité des canaux ioniques. Ces dernières sont donc des cibles de choix pour le développement de nouvelles molécules (Imbrici et al. 2016).

1.2. Revue des canalopathies par organe et leurs thérapeutiques associées.

1.2.1. Canalopathies du système nerveux central

Pathologies d'origine cérébrale :

L'épilepsie est une pathologie atteignant le système nerveux se caractérisant par des décharges dans le réseau de neurones conduisant à des spasmes musculaires, des convulsions et très souvent une perte de conscience. Il existe de multiples syndromes épileptiques. L'émission de signaux excitateur ou inhibiteur dans le cerveau est contrôlée par un grand nombre de canaux ioniques. Ainsi, les mutations des gènes contrôlant l'expression de ces canaux peuvent conduire diverses formes d'épilepsie.

En 2014, l'équipe de Catterall (Catterall 2014) a mis en évidence la relation entre différents canaux sodiques voltage-dépendants : $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ et $Na_v1.6$. Ainsi plus de 300 mutations du gène $SCN1A$ codant pour le canal $Na_v1.1$ ont pu être associées à une gamme de syndromes épileptiques allant de la simple convulsion fébrile à l'épilepsie généralisée avec convulsions fébriles. Les mutations dominantes du gène $SCN2A$ codant pour le canal $Na_v1.2$ conduisent au développement de convulsions néonatales-infantiles bénignes familiales touchant moins d'un nouveau-né sur mille. Cependant, la réponse au traitement antiépileptique s'avère positive et généralement le patient entrera en rémission une fois l'âge d'un an passé (Berkovic et al. 2004).

Les canaux potassiques voltage-dépendants sont également associés à une crise convulsive. En effet, ces canaux participent à la repolarisation des membranes et au maintien d'un potentiel de repos pouvant ainsi moduler la durée des périodes réfractaires limitant la surexcitation des neurones. Ainsi, les patients atteints d'ataxie épisodique de type 1 avec myokymie, souffrent d'une mutation du gène $KCN1A$ codant pour le canal $K_v1.1$ entraînant sa perte de fonctions et le plus souvent des électroencéphalogrammes anormaux. L'expérimentation sur des modèles de souris par Smart et son équipe (Smart et al. 1998) a permis de mettre en évidence l'impact de cette mutation sur les crises convulsives. Les mutations des gènes $KCNQ2$ et $KCNQ3$, codant respectivement les canaux $K_v7.2$ et $K_v7.3$ sont liés au développement d'épilepsie néonatale bénigne familiale (Miceli et al. 2015).

L'implication des canaux chloriques dans certaines formes d'épilepsie reste controversée. Cependant, quelques études ont reporté la présence de mutations des gènes CLCN2 et CLCN1, codant respectivement pour les canaux ClC-2 et ClC-1 (Saint-Martin et al. 2009),(Wilkins 2013).

La mutation du gène CACNA1C codant pour le canal Ca_v1.2, est associée au développement du syndrome de Timothy, une maladie orpheline rare impliquant un syndrome de QT allongé, des crises convulsives, certains traits du spectre autistique ainsi qu'un retard de développement et une immunodéficience (Diep et Seaver 2015).

Les stratégies thérapeutiques communes associées au traitement des syndromes épileptiques reposent sur la modulation des transmissions GABAergiques ainsi que la diminution des transmissions nerveuses excitatrices au travers de l'inhibition de canaux sodiques et calciques voltage-dépendants. Ainsi, la plupart des médicaments antiépileptiques ignorent l'origine génétique de ces troubles tout en démontrant une bonne efficacité dans la suppression de l'activité neuronale anormale responsable des crises d'épilepsie. Parmi ces médicaments, on peut citer certaines benzodiazépines (clobazam et clonazépam), le topiramate ou encore la retigabine (Imbrici et al. 2016). Cependant, il existe une population importante de patients, présentant des crises résistantes à ces traitements et/ou expérimentant fréquemment des effets indésirables.

La phénytoïne, la carbamazépine, la lamotrigine et le valproate de sodium, sont des inhibiteurs non sélectifs des canaux sodiques se liant à ceux-ci et stabilisant le canal dans sa forme inactive (Catterall et Swanson 2015). Ceux-ci sont particulièrement employés dans le traitement des épilepsies partielles ou généralisées mais pas dans les épilepsies-absences. Aujourd'hui, la pharmacologie des canaux sodiques se concentre sur le développement de molécules sélectives des différents sous-types de canaux Na_v.

Le blocage des canaux sodiques n'est cependant pas toujours indiqué. Dans le syndrome de Dravet, ainsi que dans différents troubles associés à des mutations de SCN1A, la phénytoïne, la carbamazépine et la lamotrigine sont contre-indiquées du fait d'une possible augmentation de la fréquence et de la sévérité des crises (Miller et Sotero de Menezes 1993). Dans ce cas, les thérapies se concentreront sur la modulation des transmissions GABAergiques des interneurons inhibiteurs. Les traitements de référence dans ces formes impliqueront une combinaison de stiripentol, de valproate et de clobazam (Schoonjans et al. 2015).

La quinidine, un anti-malarique et anti-arythmique, s'est avérée capable de corriger les effets de mutation du gène KCNT1 in vitro. Cela a permis la rémission de trois patients atteints de ces mutations, présentant une résistance aux agents antiépileptiques conventionnels (Lim et al. 2016). Cependant, cette molécule agit également sur les canaux potassiques cardiaques pouvant conduire à des intervalles QT allongés, voir des arrêts cardiaques. Ainsi, le développement d'inhibiteurs plus spécifiques avec une bonne pénétration au travers de la barrière hémato-encéphalique serait une alternative plus sûre et efficace pour le patient.

Une autre stratégie thérapeutique repose sur la régulation de la balance excitation/inhibition dans le cerveau des courants potassiques. Cette stratégie est employée au travers de la retigabine qui vient stabiliser la forme ouverte des canaux K_v7 et pourra induire une hyperpolarisation (Miceli et al. 2015).

Le ciblage des canaux calciques est également envisageable, notamment dans le traitement des épilepsies absences de l'enfant. Ainsi, l'éthosuximide inhibe les canaux $Ca_v3.1$, 3.2 et 3.3 . Cependant, environ 50% des enfants traités ne répondent pas à cette molécule. En effet, la majorité d'entre eux portent une mutation affectant les canaux $Ca_v3.2$ (Glauser et al. 2013). La gabapentine et la prégabaline se sont imposées comme des molécules prometteuses dans le traitement de l'épilepsie et des douleurs. Celles-ci ciblent les canaux Ca_v2 en modifiant leur trafic membranaire et inhibant les transmissions nerveuses excitatrices (Catterall et Swanson 2015).

Pathologies d'origine cérébelleuses :

Les ataxies épisodiques sont un groupe de pathologies autosomales rares, se caractérisant par des épisodes de vertiges accompagnés de troubles de la coordination des mouvements (Jen et al. 2007). Comme nous l'avons précédemment cité, l'ataxie épisodique de type 1 peut inclure des symptômes épileptiformes. Celle-ci est due à la mutation du gène KCNA1 codant pour le canal $K_v1.1$. Les études réalisées sur un modèle de souris knock-in ont suggéré que l'augmentation de l'excitabilité neuronale, accompagnée d'une altération des transmissions GABAergiques des noyaux cérébelleux serait à l'origine de la maladie (Herson et al. 2003).

L'ataxie épisodique de type 2 est liée à une mutation du gène CACNA1A, encodant pour une sous-unité du canal calcique $Ca_v2.1$, causant une perte de fonctions. Il s'agit du sous-type d'ataxie épisodique le plus fréquent. Le canal $Ca_v2.1$ est majoritairement présent au niveau du cortex cérébelleux, plus précisément dans les cellules granulaires et les cellules de Purkinje. Dans cette pathologie, les épisodes de pertes de contrôle des mouvements durent plus longtemps et s'associent à des maux de tête et des nystagmus, présents pendant et entre les crises. Cependant, le patient ne présentera pas de myokymie (Graves et al. 2008). Le trouble progressera souvent jusqu'à l'ataxie permanente accompagnée d'une atrophie cérébelleuse.

Les ataxies spinocérébelleuses sont un groupe très hétérogène de troubles neurologiques d'origine autosomale. Celles-ci présentent un grand nombre de phénotypes. Parmi ceux-ci, l'ataxie spinocérébelleuse de type 6 est bien caractérisée, et se manifeste par une ataxie lentement progressive. Celle-ci est due à une région riche en glutamine de l'extrémité C-terminal des canaux $Ca_v2.1$ (Pietrobon 2010). Cette anomalie entraîne une accumulation de la protéine dans le cytoplasme, l'empêchant de jouer son rôle au niveau de la membrane cellulaire. L'ataxie spinocérébelleuse de type 13 est liée à une mutation de KCNC3 codant pour le canal potassique $K_v3.3$ altérant son fonctionnement. Ce canal est presque exclusivement exprimé dans les neurones à impulsion rapide. Lorsqu'il dysfonctionne, il affecte alors la vitesse d'émission des influx nerveux ainsi que celle de la libération des neurotransmetteurs (Minassian et al. 2012). Enfin, une perte de fonctions du canal $K_v4.3$ causée par une mutation du gène KCND3 serait à l'origine des ataxies spinocérébelleuses de type 19 et 22 (Duarri et al. 2012),(Lee et al. 2012).

La migraine hémiplégique familiale de type 1 est une forme rare et sévère de migraine avec aura hémiplégique, associée dans 50% des cas à un déficit cérébelleux (Pietrobon et Moskowitz 2013). Celle-ci est liée à une mutation non-sens affectant le pore et la sous-unité voltage-dépendante du canal $Ca_v2.1$ (Jen 1993). La migraine hémiplégique familiale de type 3 est associée à une mutation du gène SCN1A codant pour le canal $Na_v1.1$ probablement responsable d'une hyperexcitabilité des neurones GABAergiques (Cestèle et al. 2013).

Le traitement des patients atteints d'ataxie épisodique de type 1 ou 2 est complexe. En effet, l'ensemble de la pharmacopée manque malheureusement de molécules capables d'ouvrir les canaux $K_v1.1$ et $Ca_v2.1$. Les patients atteints sont le plus souvent traités avec de l'acétazolamide, un inhibiteur de l'anhydrase carbonique, avec une efficacité variable et des effets indésirables comme la néphrocalcinose, l'hyperhydrose ou encore des paresthésies (D'Adamo et al. 2015). Cependant le mécanisme d'action de cette molécule dans cette pathologie reste incompris.

Un autre traitement de choix de l'ataxie épisodique de type 2 est la 4-aminopyridine. A la concentration d'usage, celle-ci semble cibler les canaux potassiques de types K_v1 principalement. Cependant, à une concentration plus élevée, elle s'avère bien moins sélective, bloquant de nombreux types de canaux potassiques et entraînant un effet pro-convulsivant. A l'heure actuelle, un essai clinique randomisé en double aveugle contre l'acétazolamide et contre le placebo est en cours pour certifier de son efficacité (étude EAT2TREAT),(Kalla et al. 2016). Une autre approche thérapeutique à l'étude est l'activation de canaux potassiques Ca^{2+} -dépendants pour restaurer une activité neuronale correcte. Les équipes de Walter (Walter et al. 2006) et d'Alvina (Alviña et Khodakhah 2010) ont obtenu des résultats dans ce sens sur des modèles de souris, en employant respectivement le 1-ethyl-2-benzimidazolinone et la chlorzoxazone, deux activateurs des canaux précédemment cités.

Les ataxies spinocérébelleuses n'ont pas de traitement efficace. A l'heure actuelle, l'acétazolamide est employée pour diminuer l'intensité des épisodes paroxystiques (Ilg et al. 2014) et des essais cliniques semblent avoir montré une certaine efficacité de la gabapentine dans l'ataxie spinocérébelleuse de type 6 (Nakamura et al. 2009).

Le traitement des migraines hémiplégiques familiales en période de crise migraineuse est uniquement symptomatique. Les traitements prophylactiques employés sont les mêmes que pour les migraines standard, incluant les antidépresseurs imipraminiques (amitriptyline notamment), les bêtabloquants, le topiramate ou encore la famille des triptans.²¹ L'utilisation d'injections de toxine botulique dans le traitement de fond de la migraine est à l'étude (Herd et al. 2018).

Pathologies	Gènes (protéines)	Thérapeutiques Actuelles	Perspectives Thérapeutiques
Syndrome épileptique	SCN1A (Nav1.1)	<i>Amélioration des transmissions GABAergiques :</i> benzodiazépines, phénobarbital, valproate de sodium, stiripentol, topiramate	Développement de molécules plus spécifiques des canaux sodiques impliqués dans la pathologie pour en améliorer la sécurité et l'efficacité Développement de chaperonnes dans le cas des mutants causant un mauvais repliement de la protéine, notamment pour les canaux sodiques, potassiques et chloriques. Développement de molécules capables d'une ouverture sélective des canaux potassiques.
	SCN2A (Nav1.2)		
	SCN3A (Nav1.3)		
	SCN8A (Nav1.6)	<i>Inhibition des transmissions glutamatergiques :</i> topiramate	
	SCN1B (Nav2.1)		
	KCNA1 (Kv1.1)		
	KCNA2 (Kv1.2)	<i>Inhibition des canaux sodiques :</i> phenytoïne, carbamazépine, lamotrigine, valproate de sodium, topiramate, lacosamide, eslicarbazépine	
	KCNC3 (Kv3.3)		
	KCND2 (Kv4.2)		
	KCND3 (Kv4.3)		
	KCNQ2 (Kv7.2)		
	KCNQ3 (Kv7.3)	<i>Ouverture des canaux sodiques :</i> retigabine, acetazolide	
	KCNH5 (Kv10.1)		
	KCNJ10 (Kir4.1)		
	KCNJ11 (Kir6.2)	<i>Inhibition de canaux calciques :</i> ethosuximide, gabapentine, pregabaline	
ABCC8 (SUR1)			
KCNMA1 (KCa1.1)	<i>Action sur les vésicules synaptiques :</i> leviracetam		
KCNT1 (KCa4.1)			
CACNA1C (Cav1.2)			
CACNA1A (Cav2.1)	<i>Inhibition de l'anhydrase carbonique :</i> acetazolamide		
CACNA1H (Cav3.2)			
CLCN2 (ClC-2)			
Ataxies épisodiques et spinocérébelleuses	KCNA1 (Kv1.1)	<i>Inhibition de l'anhydrase carbonique :</i> acetazolamide	Ciblage des canaux potassiques Ca ²⁺ -dépendant, essai chez l'animal prometteur de la chlorzoxazone et du 1-ethyl-2-benzimidazolinone.
	CACNA1A (Cav2.1)		
	KCNC3 (Kv3.3)	<i>Inhibition des canaux potassiques :</i> 4-aminopyridine	
	KCND3 (Kv4.3)		
Migraine Familiale Hémiplégique	CACNA1A (Cav2.1)	<i>Traitements prophylactiques et symptomatiques :</i> amitriptyline, bêtabloquants, topiramate, triptans.	Essai sur l'injection de toxine botulique
	SCN1A (Nav1.1)		

Tableau 1 : Canalopathies du Système Nerveux Central

1.2.2. Canalopathies du système nerveux périphérique

Le système nerveux périphérique est principalement composé de neurones assurant des fonctions somatiques, autonomes ou sensitives. Comme dans le système nerveux central, les canaux ioniques y jouent un rôle primordial. De nombreux sous-types de canaux sodiques sont exprimés dans le système nerveux périphérique. Par exemple, le canal $Na_v1.3$ est physiologiquement exprimé pendant la période de développement embryonnaire. Cependant, il apparaît également après une lésion ou une inflammation des nerfs, suggérant une relation possible avec les douleurs neuropathiques.

Les canaux sodiques $Na_v1.1$, 1.2 et 1.6 sont exprimés aussi bien dans le système nerveux central que le système nerveux périphérique. Comme nous l'avons vu, leur altération peut conduire à différentes formes d'épilepsie. Les canaux $Na_v1.7$, 1.8 et 1.9 , respectivement codées par les gènes SCNA9, SCNA10 et SCNA11 sont, eux, considérés comme spécifiques du système nerveux périphérique (Catterall 2012). Des mutations de ces gènes sont associées au développement de troubles de la douleur. Ainsi, la perte de fonctions des canaux $Na_v1.7$ est associée à des insensibilités congénitales à la douleur (Cox et al. 2006).

Au contraire, sa surexpression ou sa modification sans perte de fonctions conduit à trois troubles : érythromélgie héréditaire (Yang et al. 2004), syndrome de douleur extrême paroxystique (Fertleman et al. 2006) et la neuropathie à petites fibres (Faber et al. 2012). Dans le cas de l'érythromélgie héréditaire, les $Na_v1.7$ mutants se caractérisent par une augmentation de leur activation liée à la diminution de leur seuil d'ouverture. Dans le cas du syndrome de douleur extrême paroxystique, la mutation cause une diminution de la vitesse d'inactivation conduisant à une ouverture prolongée du canal (Lampert et al. 2014). Dans le cas des neuropathies à petites fibres, il s'agit d'une combinaison de ces phénomènes conduisant à l'hyperexcitabilité des neurones, exacerbant ainsi la douleur. Cependant, cette pathologie semble également liée à des mutations des canaux $Na_v1.8$ (Han et al. 2014).

Les canaux $Na_v1.7$ et 1.8 sont associés à de brusques augmentations du potentiel d'action des nocicepteurs. Le canal $Na_v1.9$ quant à lui, présente une cinétique plus lente et est actif à des potentiels plus proches du potentiel de repos, diminuant de ce fait son seuil d'excitabilité. Ainsi, il a été reporté par l'équipe de Leipold que certaines mutations de SCNA11 (codant pour $Na_v1.9$), conduisent à des syndromes douloureux épisodiques familiaux (Leipold et al. 2015). Paradoxalement, les mêmes auteurs, reportaient deux ans

auparavant une autre mutation de ce même gène conduisant à une perte de la sensation douloureuse (Leipold et al. 2013).

L'hyperexcitabilité des nerfs périphériques a également été reliée à certains canaux potassiques, notamment le canal $K_v7.2$ (Wuttke et al. 2007).

La stratégie thérapeutique attribuée aux traitements des syndromes douloureux familiaux requiert l'utilisation d'une combinaison d'analgésiques et de compresses froides. Ces pathologies sont extrêmement handicapantes tant sur le plan physique que psychologique et nécessitent le plus souvent une combinaison de différents médicaments très spécifiques au patient. Si le paracétamol et les anti-inflammatoires non-stéroïdiens peuvent provoquer un certain soulagement de la douleur, un nombre important de patients n'expérimentent aucune amélioration.

L'injection intrathécale de ziconotide, inhibiteur des canaux calciques s'est avérée efficace chez quelques patients (Russo et al. 2015). Cependant, le mode d'injection dans l'espace sous-arachnoïdien est complexe et peut présenter des risques, notamment infectieux. D'autre part, dans un avis du 19 mars 2018, la Haute Autorité de Santé a considéré le service médical rendu de cette molécule, faible en raison d'un manque de données sur son utilisation (Commission de transparence de la HAS 2018). Elle est considérée comme une option pharmacologique de dernier recours pour des douleurs chroniques sévères réfractaires et ne doit être employée qu'après un échec des opioïdes (eux-mêmes administrés par voie intrathécale) et de la neurostimulation.

Le ciblage des canaux sodiques est une stratégie courante dans le traitement de la douleur. La lidocaïne, un anesthésique local, et très utilisé pour le traitement de douleurs neuropathiques (Finnerup et al. 2015). Le butamben est un autre anesthésique local (non commercialisé en France) administré parfois en voie épidurale, pour diminuer l'intensité des douleurs chroniques. Il verrait lui aussi ses effets liés à une modulation des canaux sodiques (Thériault et al. 2014). Malheureusement, le blocage des canaux sodiques n'est pas totalement fiable et il existe une large portion de patients ne répondant pas à ces traitements. L'équipe de Sheets a pu mettre en évidence que certaines mutations des canaux $Na_v1.7$ affectent la capacité de la lidocaïne à se fixer au canal (Sheets et al. 2007). L'équipe de Choi a reporté une mutation du canal $Na_v1.7$ augmentant la sensibilité du canal à la mexilétine, inhibiteur des canaux sodiques classiquement employé dans le traitement symptomatique des syndromes myotoniques (Choi et al. 2009). La carbamazépine a également démontré une efficacité partielle chez les patients atteints de syndrome de

douleur extrême paroxystique (Fertleman et al. 2007), mais aussi chez certains patients atteints d'érythromélgie héréditaire (Fischer et al. 2009).

Pathologies	Gènes (protéines)	Thérapeutiques Actuelles	Perspectives Thérapeutiques
Syndrome douloureux		<i>Traitements symptomatiques visant à réduire la douleur :</i>	
- Erythromélgie héréditaire		antidépresseurs tricycliques et inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine,	Développement de molécules inhibitrices des canaux sodiques sélectifs des neuropathies et des douleurs inflammatoires
- Syndrome de douleur extrême paroxystique	SCN9A (Nav1.7) SCN10A (Nav1.8)	gabapentinoïdes,	Extension des indications des patches à la capsaïcine
- Neuropathie à petites fibres	SCN11A (Nav1.9) TRPA1 (Trpa1)	ziconotide, inhibiteur des canaux calciques lidocaïne et carbamazépine, inhibiteurs des canaux sodiques,	Utilisation de la toxine botulique Utilisation des cannabinoïde
- Syndrome douloureux épisodique familial		paracétamol et anti-inflammatoires non stéroïdiens, opioïdes	
Défaut de perception de la douleur			
- Insensibilité congénitale à la douleur	SCN9A (Nav1.7)	<i>Aucun traitement disponible</i>	Ciblage des canaux potassiques Ca ²⁺ -dépendants, essai chez l'animal prometteur de la chlorzoxazone et du 1-ethyl-2-benzimidazolinone.
- Neuropathie idiopatique à petites fibres			

Tableau 2 : Canalopathies du Système Nerveux Périphérique

1.2.3. Canalopathies du Cœur

Les canalopathies cardiaques englobent un large spectre de pathologies se caractérisant par des arythmies, des troubles de la conduction et des cardiomyopathies. Les canalopathies proarythmiques sont : le syndrome du QT long, le syndrome du QT court, le syndrome de Brugada et la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique. A ces quatre grandes canalopathies cardiaques viennent s'ajouter diverses mutations entraînant de rares cas de cardiomyopathies familiales (Kline et Costantini 2019). Le schéma de l'électrocardiogramme en *Figure 1* permet d'identifier plus facilement les différentes régions de l'électrocardiogramme affecté.

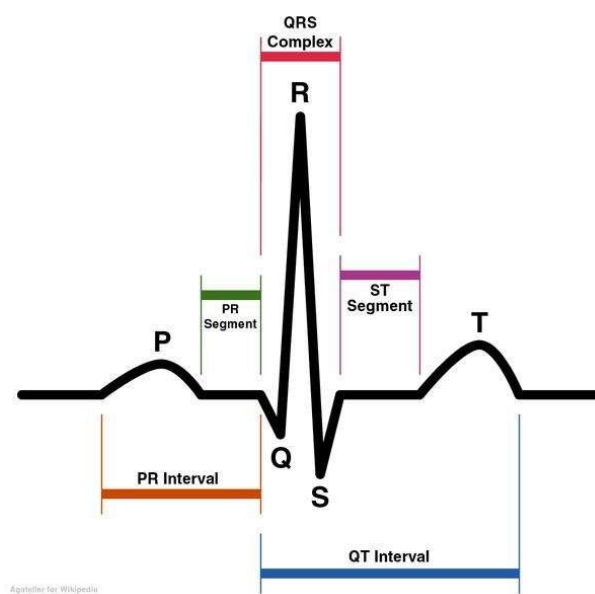


Figure 1 : Schéma de l'électrocardiogramme physiologique
© Agateller (Anthony Atkielski), Wikipédia, DP

En 1996, Wang et son équipe décrivent la première canalopathie cardiaque reportée en tant que telle (Wang et al. 1996). Il s'agit d'une forme congénitale du syndrome du QT long (abrégié LQT1) due à une mutation du gène *KCNQ1* codant pour le canal $K_v7.1$ qui perd ainsi sa fonction. Ce canal est responsable d'un courant potassique rectifiant retardé impliqué dans la définition du potentiel de repos. La perte de fonction de ce canal retardera la fin du potentiel d'action et augmentera l'intervalle QT de l'électrocardiogramme de 470 ms pour les hommes et 480 ms pour les femmes. Ce retard peut être responsable de post-dépolarisation, d'arythmie ventriculaire, de torsade de pointe, de syncope ou encore de mort subite. Depuis, au moins quinze autres sous-types de syndromes du QT long ont été reportés. Spears et Gollob ont reporté en 2015 que neuf de ces formes sont liées à une mutation d'un gène codant directement pour la sous-unité d'un canal ionique. Les six autres

formes affectent des protéines interagissant avec les canaux ioniques (Spears et Gollob 2015). Les syndromes du QT long de types 1, 2, 5, 6, 7 impliquent une diminution du courant potassiques. Les formes 3, 9 et 10 quant à elles sont lié à une augmentation de courants sodiques. La formes 8 est causée par une augmentation de courants calciques. Enfin la forme 4 est reliée à plusieurs types de courants ioniques en même temps.

Le syndrome du QT court a pour la première fois été décrit dans les années 2000. Bien plus rare, il est aussi plus mortel que le syndrome du QT long (Gaita et al. 2003). Initialement attribué à des mutations entraînant des gains de fonctions des canaux potassiques, il a plus tard été démontré que certaines formes pouvaient être reliées à des pertes de fonctions des canaux calciques (Betzenhauser et al. 2015). Les mutations observées dans ces troubles entraînent principalement un raccourcissement de la phase de repolarisation (phase 3) du potentiel d'action cardiaque, venant ainsi réduire l'espace QT. Le diagnostic est établi lorsque qu'un intervalle de 330 ms maximum sera observé à l'électrocardiogramme. Les patients atteints de ce syndrome expérimentent des arythmies atriales et ventriculaires. Cela peut éventuellement conduire à la mort subite du patient en période de repos ou pendant le sommeil à un jeune âge.

Le syndrome de Brugada se caractérise par plusieurs altérations de l'électrocardiogramme. On observera notamment une augmentation du segment ST ainsi qu'une onde T négative (Havakuk et Viskin 2016). Les patients présenteront des symptômes tels que la syncope, la respiration agonale nocturne, des palpitations ou des inconforts dans la poitrine au repos ou pendant le sommeil. Si la mutation la plus courante reportée est celle du gène SCN5A codant pour le canal sodique $Na_v1.5$ (Chen et al. 1998), d'autres mutations ont également pu être reportées. On peut notamment citer celles des gènes SCN1B et SCN3B, conduisant toutes à une diminution des courants sodiques. Chez les patients présentant le syndrome de Brugada ainsi que le syndrome du QT court, on a pu observer une mutation touchant les canaux calciques. Chez les patients présentant des dysfonctionnements des nœuds sino-atriales et atrio-ventriculaires, une mutation affectant le canal HCN4, responsable de transports de sodium et de potassium, a été reportée (Milanesi et al. 2015).

La tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique se caractérise par une arythmie ventriculaire déclenchée par l'exercice physique, le stress émotionnel ou l'administration de catécholamine, même en l'absence d'anomalie morphologique du cœur. Une de ces formes est connue sous le nom de syndrome des cœurs brisés découverte par

une équipe japonaise en 1977 (Kuramoto et al. 1977). En 2002, l'équipe de Priori a identifié une mutation du gène codant pour le récepteur RyR2 ryanodine, un canal calcique intracellulaire inséré dans le réticulum sarcoplasmique des cellules myocardiques (Priori Silvia G. et al. 2002).

La première manifestation des canalopathies cardiaques est la syncope. Si le patient n'est pas traité rapidement, le risque de mort subite est très élevé. Pour choisir un traitement approprié, il peut être intéressant d'avoir recours aux tests génétiques, non seulement dans le diagnostic du patient, mais également dans une démarche de dépistage chez les membres de la famille. Chez les patients à haut risque, présentant des arythmies sévères, il sera souvent approprié d'employer un défibrillateur automatique implantable pour corriger ces troubles. C'est notamment le cas pour le syndrome du QT court et du syndrome de Brugada où le défibrillateur automatique est le seul traitement ayant démontré son efficacité, notamment pour les patients asymptomatiques. Des essais sur l'utilisation de la quinidine dans le traitement de ces deux pathologies sont en cours (Gaita et al. 2004),(Probst Vincent et Gourraud Jean-Baptiste 2015). L'isoprotérénol est une autre molécule étudiée dans le cadre du syndrome de Brugada. Comme la quinidine, il augmente le courant calcique de type L.(Jongman et al. 2007) Le diagnostic du syndrome de Brugada, n'employant pas de méthode génétique, repose sur l'utilisation de molécules provoquant une augmentation du segment ST après une injection intra-veineuse. On retrouve deux molécules pour ce test, l'ajmaline et le flecaïnide (Rolf et al. 2003).

Dans le cadre des syndromes de QT long et de la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique, il existe des déclencheurs qui peuvent être limités. Ainsi, l'exercice physique intense ou le stress émotionnel peuvent conduire à l'arythmie ventriculaire. Par ailleurs, l'utilisation de bêtabloquants sera recommandée sur le plan pharmacologique pour réduire les stimulations adrénériques et sympathiques. Pour la tachycardie on préférera en première intention, l'utilisation de nadolol ou de propranolol. Le nadolol est particulièrement apprécié, notamment pour son action à long terme et son absence d'effet intrinsèque sympathomimétique (Priori et al. 2013). La dose maximale pour contrôler l'arythmie devra être employée et l'exercice physique restreint.

Cependant, chez certains patients traités, des arythmies peuvent se manifester malgré le traitement. Dans ce cas, l'adjonction de flécaïnide, un antiarythmique agissant sur les canaux sodiques $Na_v1.5$ et calciques de type RyR2 est nécessaire. Les mêmes molécules sont également recommandées dans le traitement de tous les sous-types de syndrome de

QT long (Al-Khatib et al. 2018). En complément de ce traitement, des bloqueurs des canaux sodiques responsables de courants tardifs, comme la mexiletine ou le ranolazine (non commercialisé en France) peuvent être employés dans le cadre du sous-type 3 (Pérez-Riera et al. 2017). Cependant, l'effet de la mexiletine est discuté. En effet, si elle est efficace pour réduire l'intervalle QT, celle-ci pourrait permettre de faciliter le trafic des protéines mutantes vers la membrane pouvant à long terme exacerber l'allongement du QT (Ruan Yanfei et al. 2010).

Malheureusement, la majorité des morts subites ne sont pas reliées à des mutations spécifiques. Nous pouvons également remarquer qu'un grand nombre de canaux ioniques peuvent être impliqués dans les canalopathies cardiaques. Cependant, peu de molécules sont disponibles pour l'ensemble de ces cibles. Il en résulte des options thérapeutiques limitées et des approches principalement symptomatiques. Des approches basées sur le diagnostic génétique et des thérapies ciblées seront à développer.

Pathologies	Gènes (protéines)	Thérapeutiques Actuelles	Perspectives Thérapeutiques
Syndrome du QT long	KCNQ1 (Kv7.1)	<i>Traitements symptomatiques visant à restaurer le rythme cardiaque :</i> défibrillateur automatique implantable, association de beta-bloquants et éventuellement de flécaïnide, mexiletine ou ranolazine (type 3 uniquement), dénervation cardiaque sympathique gauche si échec des traitements pharmacologiques(Cho 2016)	Molécule spécifique des gènes et mutants
	KCNH2 (HERG)		
	KCNE1 (Mink)		
	KCNE2 (MiRP1)		
	KCNJ2 (Kir2.1)		
	KCNJ5 (Kir3.4)		
	SCN5A (Nav1.5)		
	SCN4B (Nav2.4)		
	CACNA1C (Cav1.2)		
	Non canal : AKAP9 (yatio)		
Syndrome du QT court	KCNH2 (HERG)	défibrillateur automatique implantable,	
	KCNQ1 (Kv7.1)		
	KCNJ2 (Kir2.1)	quinidine dans le sous type 1	
Syndrome de Brugada	SCN5A (Nav1.5)	défibrillateur automatique implantable unique thérapeutique efficace, quinidine ou isoproterenol pour les arythmies aiguës, (encore discuter).	Molécule spécifique des gènes et mutants
	SCN1B (Nav2.1)		
	SCN3B (Nav2.3)		
	KCNE3 (MiRP2)		
Tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique	CACNA1C (Cav1.2)	association de beta-bloquants et éventuellement de flécaïnide, dénervation cardiaque sympathique gauche si échec des traitements pharmacologiques	Molécule spécifique des gènes et mutants
	CACNB2 (Cavb2)		
	HCN4 (Hcn4)		
	RYR2 (RyR2)		
	Non-channel: CASQ2 (calsequestrine-2)		
	CALM1 (calmoduline-1) TRDN (triadine)		

Tableau 3 : Canalopathies du Cœur

1.2.4. Canalopathies des Muscles Squelettiques

Paralysies Périodiques :

Les paralysies périodiques familiales sont des troubles autosomiques dominants se caractérisant par une perte temporaire d'excitabilité des muscles conduisant à une paralysie flasque avec une faiblesse musculaire. Les paralysies périodiques sont classées en trois grandes catégories : la paralysie périodique hyperkaliémique, la paralysie périodique hypokaliémique (ou maladie de Westphal) et le syndrome de Andersen-Tawil. Ces différentes pathologies sont dues à des mutations affectant les canaux sodiques ($Na_v1.4$), calciques ($Ca_v1.1$) et potassiques ($K_{ir}2.1$, $K_{ir}2.6$ et $K_{ir}3.4$) (Statland et al. 2018).

La paralysie périodique hyperkaliémique est associée à de très haut taux d'ion potassium dans le sérum, pouvant atteindre jusqu'à 6 mEq/L (normes : 3,5 – 4,5 mEq/L). Cette hyperkaliémie peut être déclenchée, notamment par une prise alimentaire riche en potassium, le repos après un effort physique intense ou encore l'exposition au froid. Cette pathologie est liée à une mutation affectant les canaux sodiques $Na_v1.4$ codés par le gène SCN4A. Ceux-ci voient leur inactivation altérée conduisant à un influx de sodium persistant et une dépolarisation cellulaire. Pour compenser la dépolarisation, un efflux d'ions potassiques a alors lieu conduisant à l'élévation de la kaliémie (Khogali et al. 2015).

Dans le cas de la paralysie périodique hypokaliémique, le taux d'ions potassium dans le sérum descend en dessous de 3,2 mEq/L. Les déclencheurs, de même que pour la paralysie périodique hyperkaliémique peuvent être le repos après l'effort ou l'exposition au froid. De plus, une prise alimentaire riche en carbohydrates peut également être à l'origine d'une crise. Deux gènes sont principalement impliqués dans cette pathologie. SCN4A codant pour le canal sodique $Na_v1.4$ (10% des cas) et le gène CACNA1S codant pour le canal calcique $Ca_v1.1$ (70% des cas). La charge de certains résidus des protéines formant ces canaux est altérée à la suite de ces mutations. Il en résulte l'apparition de courants ioniques aberrants et un déséquilibre dans l'homéostasie membranaire. Cela conduira à une déstabilisation du potentiel de membrane de repos, de l'activité des connexines et des phénomènes de contractions (Moreau et al. 2014) L'équilibre entre la dépolarisation et la repolarisation à l'aide des canaux potassiques K_{ir} et sarco-KATP est responsable de l'hypokaliémie observée chez le patient.

La paralysie périodique thyrotoxique est une pathologie neurologique rare se manifestant par une paralysie et une hypokaliémie au cours d'une crise de thyrotoxicose. Les attaques sont principalement nocturnes, parfois précédées de crampes musculaires, de

douleur ou de raideur. Le patient peut également présenter des manifestations oculaires, bulbaires ou respiratoires. Comme pour les autres formes de paralysies impliquant un trouble de la kaliémie, les crises peuvent être déclenchées par le repos après un effort physique ou bien un régime alimentaire inapproprié (riche en carbohydrates). La crise aura lieu au cours d'une hyperthyroïdie mais les symptômes d'hyperthyroïdie seront le plus souvent absents pendant la première crise. Ce trouble peut survenir dans le cadre de la maladie de Basedow. L'origine génétique de cette pathologie est incertaine, ainsi les gènes CACNA1S, GABRA3X, rs623011, SUR1Ala1369Ser et KCNJ18. Ces trois derniers sont impliqués dans la genèse de différents canaux potassiques ($K_{ir}2.1$, $K_{ir}2.6$ et KATP) (Orphanet), (Chu et al. 2012), (Jongjaroenprasert et al. 2012).

Le syndrome d'Andersen-Tawil se caractérise par des paralysies périodiques accompagnées d'arythmies ventriculaires avec un intervalle QT allongé et de malformations squelettiques (scoliose, petite taille, etc...) (Tawil et al. 1994). Les paralysies peuvent apparaître à la suite d'hyperkaliémie ou d'hypokaliémie. Le courant potassique rectifiant assuré par $K_{ir}2.1$ se voit supprimé ou amplifié par une mutation du gène KCNJ2 causant la pathologie (Veerapandiyar et al. 2004).

La prise en charge des paralysies périodiques se concentre sur deux axes. D'une part, on trouve un traitement des crises aiguës et d'autre part un traitement prophylactique. La première mesure à prendre pour le patient sera l'éviction de tous les facteurs déclencheurs. Dans le cas de la paralysie périodique hyperkaliémique, les crises peuvent être contrôlées par l'inhalation de salbutamol ou bien par des thérapies associant glucose et insuline qui vont permettre la repolarisation de la membrane en stimulant la pompe $3Na^+/2K^+$ -ATPase, permettant de restaurer une kaliémie. Dans sa forme hypokaliémique, le traitement de crise sera une supplémentation immédiate en potassium.

Il est également possible de contrôler hyperkaliémie et hypokaliémie par l'administration de diurétiques thiazidiques ou de diurétiques épargnant le potassium respectivement. Le traitement prophylactique impliquera l'utilisation d'inhibiteurs de l'anhydrase carbonique comme l'acetazolamide ou bien le diclofenamide. Ce dernier est un médicament orphelin ayant montré son efficacité dans un essai clinique en 2016 (Sansone et al. 2016). En 2013, le bumétamide, un diurétique de l'anse inhibant le co-transporteur NKCC, a été testé avec succès pour évaluer son efficacité comme traitement préventif sur la souris (Wu et al. 2013).

Le traitement du syndrome de Andersen-Tawil est plus complexe. Il nécessite d'une part le contrôle des arythmies cardiaques du patient et d'autre part la réduction des crises de paralysie. Ainsi l'acétazolamide est le traitement prophylactique le plus efficace, même si le diclofénamide est aussi une option thérapeutique intéressante. D'autre part, une supplémentation en potassium peut contribuer à diminuer les crises tout en réduisant l'intervalle QT du patient. Le traitement de l'aspect cardiaque de la pathologie impliquera l'utilisation de β -bloquants ou encore du flécaïnide (Nguyen et al. 2013).

Myotonies non-dystrophiques :

Les myotonies non-dystrophiques se différencient des myotonies dystrophiques par l'absence de caractère évolutif de la maladie tant du point de vue de la faiblesse musculaire que des aspects systémiques. Parmi cette classe de pathologies on peut retrouver la myotonie congénitale, la paramyotonie congénitale, les myotonies aggravées par le potassium et la myotonie aggravée par le froid (Matthews et al. 2010). Toutes se manifestent par des défauts de la relaxation musculaire.

La myotonie congénitale est associée à la perte de fonction des canaux chloriques CIC-1 codés par le gène CLCN1 (Pedersen et al. 2016). Le mode de transmission récessif ou dominant permet de distinguer deux formes de la pathologie, respectivement myotonie de Thomsen et myotonie de Becker. Cette dernière présente le plus souvent des symptômes plus sévères et des crises fréquentes. Il est possible d'améliorer les symptômes du patient par certains exercices physiques d'échauffement (Luca et al. 2003). Les mutations du gène CLCN1 ont aussi été reportées dans certaines pathologies dystrophiques comme la myopathie de Duchenne (Cardani et al. 2012). Les canaux chloriques tempèrent l'excitabilité membranaire et participent à la stabilisation du potentiel de repos à la suite d'un potentiel d'action. S'ils ne sont plus en mesure d'exercer leur activité régulatrice, il en résulte un risque de potentiels d'actions spontanés et des décharges anormales qui entraveront la relaxation du muscle.

Si les mutations du gène SCN4A codant le canal sodique $\text{Na}_v1.4$ peuvent conduire à des paralysies périodiques, celles-ci ont également pu être mises en cause dans la paramyotonie congénitale ainsi que dans les myotonies aggravées par le potassium (Cannon 2015). La paramyotonie de Von Eulenburg (congénitale) se caractérise par une myotonie persistante provoquée par l'exercice et aggravée par les chutes de température. Le patient expérimentera le plus souvent une faiblesse musculaire également.

Les myotonies aggravées par le potassium se séparent en trois sous-catégories : la myotonie fluctuante, la myotonie permanente et la myotonie sensible à l'acétazolamide. Toutes voient leurs symptômes considérablement aggravés par l'ingestion de potassium, et parfois par une exposition au froid. La myotonie fluctuante se présente sous la forme d'épisodes de raideurs de gravité et fréquence variable. Les crises sont entrecoupées de longues périodes de normalité. Le début d'une crise peut avoir lieu de 10 à 30 minutes après la fin de l'exercice (Matthews et al. 2010). La myotonie permanente se déclenche durant l'enfance. Elle est plus sévère et touche principalement les muscles faciaux, cervicaux, et des membres. Il peut également exister une raideur des muscles pharyngés et respiratoires pouvant induire une hypoxie et une acidose respiratoire. La myotonie sensible à l'acétazolamide présente les mêmes caractéristiques que la myotonie permanente, cependant elle s'améliore de façon considérable à la suite d'un traitement par l'acétazolamide. Si les effets indésirables de ce dernier sont présents, il pourra être remplacé par la méxilétine.

La mutation du gène SCN4A va modifier la phase d'inactivation rapide du canal sodique, conduisant à sa réactivation rapide à l'origine des salves myotoniques. Il y aura des influx répétés de sodium dans les fibres musculaires conduisant à des décharges répétitives persistant au-delà de toute stimulation. On parlera de courant sodique réurgent (Jarecki et al. 2010). Certaines mutations, en plus d'affecter la phase d'inactivation peuvent également conduire à une augmentation de la sensibilité du canal aux stimuli, conduisant à des phénotypes aggravés.

La prise en charge des syndromes myotoniques non dystrophiques reposera tout d'abord sur l'éviction des éléments déclencheurs tels que le potassium ou le froid. Les contractions brusques et efforts importants doivent également être limités et des échauffements doivent être pratiqués consciencieusement. L'approche pharmacologique de choix pour le traitement de ces pathologies reposera sur l'emploi de bloqueurs des canaux sodiques. A ce titre, la méxilétine représente un traitement de choix. Cependant, la carbamazépine peut également être employée. Enfin, d'autres molécules inhibitrices des canaux sodiques comme la ranolazine sont à l'étude (Desaphy et al. 2014). Bien évidemment, dans le cas des myotonies sensibles à l'acétazolamide, ce dernier sera le traitement de première intention.

La prise en charge de la myotonie congénitale représente à ce jour une problématique importante. En effet, il n'existe pas de traitement spécifique et la thérapie sera le plus souvent symptomatique, reposant sur des molécules similaires à celles utilisées dans les autres formes de myotonie. La restauration des courants chloriques représente une approche très importante pouvant permettre de développer un traitement. Des travaux de recherche débutés dès 1992, ont permis de découvrir diverses molécules permettant de restaurer un courant chlorique. Cependant, celles-ci n'ont à ce jour pas permis d'avancées thérapeutiques majeures. (De Luca et al. 1992),(De Luca et al. 2004). A ce jour, il est possible d'employer, la méxiletine, le tocaïnide et le flécaïnide, cependant il ne s'agit pas de traitement curatif.

Les stratégies thérapeutiques des canalopathies musculaires ignorent le plus souvent le canal muté responsable de la pathologie pour se concentrer sur l'activation de canaux fonctionnels de manière compensatoire. Cela met en évidence une certaine variété de cibles pouvant être exploitées. Cependant, il ne faut pas oublier qu'en ciblant des canaux non mutés, et donc moins spécifiques, le patient s'expose à un risque d'effets secondaires. Dans une démarche visant à garantir la sécurité du patient, le développement de molécules ciblant les canaux mutés est nécessaire.

Pathologies	Gènes (protéines)	Thérapeutiques Actuelles	Perspectives Thérapeutiques
Paralysies périodiques : Hyperkaliémique, Hypokaliémique, Thyrotoxique, Syndrome de Andersen-Tawil	SCN4A (Nav1.4) CACNA1S (Cav1.1) KCNJ2 (Kir2.1) KCNJ6 (Kir2.6)	<i>Traitements symptomatiques visant à restaurer la contractilité musculaire :</i> acétazolamide, inhibiteur de l'anhydrase carbonique salbutamol et association glucose/insuline, pour stimuler la pompe Na ⁺ /K ⁺ ATPase dans la forme hyperkaliémique supplémentation en potassium ou diurétique épargnant le potassium, dans la forme hypokaliémique diurétique thiazidique pour favoriser l'élimination du potassium	Développement de molécules favorisant l'ouverture des canaux KATP Bumétanide, inhibiteur du transporteur NKCC Développement de dérivés de guanidinium pour l'ouverture des canaux Igp
		<i>Traitements symptomatiques visant à diminuer l'hyperexcitabilité musculaire :</i> méxiletine, carbamazépine, flécaïnide, propafenone inhibiteurs des canaux sodiques acetazolamide, inhibiteur de l'anhydrase carbonique	Ralentissement de l'inactivation des canaux sodiques (ranolazine, lacosamide) Développement de molécules sélectives des canaux mutés Développement de l'approche pharmacogénétique

Tableau 4 : Canalopathies des Muscles

1.2.5. Canalopathies des Reins

Syndromes de Bartter et de Gitelman :

Les syndromes de Bartter sont un groupe hétérogène se caractérisant par la présence de tubulopathies avec fuite sodée, se produisant au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henle (Kleta et Bockenhauer 2018). Plusieurs génotypes existent pour cette pathologie, les plus représentés étant le type III et le type IV. Les manifestations de ces syndromes sont nombreuses. Parmi lesquelles, on dénombre la polyurie, la polydipsie, l'hypokaliémie, l'alcalose, l'hypercalciurie et parfois des néphrocalcinoses.

Le type III, ou syndrome de Bartter classique, implique une mutation du gène CLCNKB codant pour le canal ClC-Kb et sa sous-unité accessoire. Ce canal est exprimé dans la branche ascendante de l'anse de Henle et dans le tube contourné distale. Ce canal est également exprimé au niveau des stries vasculaires de l'oreille interne où il participe à la régulation de la composition du liquide de Scarpa (ou endolymph) nécessaire à l'audition et au sens de l'équilibre. Au niveau du rein, ce canal permet la réabsorption du chlorure de sodium. En 2015, Andrini et son équipe ont reporté des mutations non-sens et faux-sens conduisant à des troubles du trafic cytoplasmique des protéines vers la membrane ou bien une diminution de la probabilité d'ouverture du canal (Andrini et al. 2015).

Le syndrome de Bartter anténatale (ou type IV), est causé par des mutations non-sens ou faux-sens du gène BSDN codant pour la Barttine, sous-unité accessoire des canaux ClC-Kb (de Pablos et al. 2014). Il se caractérisera par un polyhydramnios au cours de la grossesse et souvent une naissance prématurée. Le nouveau-né présentera une surdité neurosensorielle. L'équipe de Steinke a également pu identifier en 2015, une modification post-traductionnelle, une palmitoylation, pouvant être reliée à la pathologie (Steinke et al. 2015).

Les syndromes de Bartter de type I et II sont moins représentés. Ainsi, le syndrome de Bartter de type I est lié à une mutation du gène codant pour NKCC2, l'une des deux isoformes de co-transporteurs actifs impliqués dans le déplacement du chlore, du sodium et du potassium de part et d'autre de la membrane cellulaire (Kömhoff et Laghmani 2017). Le syndrome de Bartter de type II est lui relié à une mutation du gène KCNJ1, codant pour le canal Kir1.1, le canal sécréteur principal du rein (Welling et Ho 2009).

Plus récemment, en 2017, un nouveau type de syndrome de Bartter a pu être identifié. Le syndrome de Bartter de type V a été relié à une mutation du gène MAGED2. Cette forme présente des manifestations plus sévères en anténatale avec un très fort taux

de mortalité. Cependant, pour les fœtus touchés arrivant à survivre et se développer, on observe une résolution spontanée des symptômes au cours du dernier trimestre de la grossesse. Le fonctionnement du point de vue de la biologie moléculaire de cette forme est encore peu compris et toujours discuté (Kömhoff et Laghmani 2017).

Le syndrome de Gitelman, est quant à lui lié à une mutation du gène SLC12A3 codant pour le canal NCC, un co-transporteur de sodium et chlorure. Il se manifeste après l'âge de 6 ans. Les patients présentent le plus souvent des périodes transitoires de faiblesses musculaires, voire de tétanie. Des symptômes supplémentaires comme des douleurs abdominales, des vomissements ou de la fièvre peuvent se manifester. Il est à noter que les patients présenteront le plus souvent une pression sanguine inférieure à la population générale.

La prise en charge des patients présentant un syndrome de Bartter se concentre sur la correction des anomalies aiguës et chroniques pouvant être présentes. Les défauts de réabsorption peuvent être compensés relativement facilement. En effet, un régime enrichi en sel et complété en potassium et magnésium doit être mis en place. L'utilisation de diurétiques peut également être nécessaire pour contrôler tension et volémie. Cependant, il sera nécessaire d'employer des diurétiques épargnant le potassium, comme la spironolactone, l'éplérone ou encore l'amiloride.

Les hypovolémies déclenchées par les diurétiques peuvent entraîner des phénomènes de rétrocontrôle positif au niveau de la prostaglandine E2 en favorisant sa sécrétion. Celle-ci est impliquée dans la sécrétion de rénine qui limitera la perte de volémie. Cela n'étant pas désiré dans le cadre du traitement du syndrome de Bartter, le recours à l'indométhacine est courant. Il s'agit d'un inhibiteur des cyclooxygénases ayant montré une efficacité certaine chez les patients atteints du syndrome de Bartter. Cependant, cette molécule peut induire des gastrites, des ulcères avec saignements et des entérocolites nécrosantes. Ces stratégies bien qu'empiriques présentent une bonne efficacité. Cependant, elles exposent le patient à un risque iatrogène de dommage au rein, pouvant aller jusqu'à entraîner des insuffisances rénales chroniques (Unwin et Capasso 2006).

Le développement de stratégies thérapeutiques visant à rétablir les courants ioniques et l'identification de molécules spécifiques ciblant ces canaux, est aujourd'hui très important. Ces pathologies peuvent avoir des conséquences graves liées aux thérapeutiques au long cours qu'elles impliquent. L'acide niflumique est une molécule intéressante ciblant les canaux CLC-K d'une espèce d'amphibien, *Xenopus oocyte*. Cependant, chez les canaux

d'origine humaine, l'effet n'a pu être répliqué (Imbrici et al. 2014). Il s'agit néanmoins d'un potentiel lead pour le développement de molécules efficaces chez l'homme.

Maladie de Dent :

La maladie de Dent est une tubulopathie rénale d'origine génétique affectant le tube contourné proximal. La prévalence de cette maladie est mal estimée avec environ 250 familles l'exprimant déjà reportées. Les patients atteints présentent des symptômes comme une protéinurie de bas poids moléculaire, une hypercalciurie, une néphrolithiase, une néphrocalcinose. Ils développent progressivement une insuffisance rénale. Cette pathologie est parfois compliquée par un rachitisme ou encore une ostéomalacie. Deux sous-types ont été découverts pour cette pathologie.

Le type 1 est causé par une mutation du gène *CLCN5* codant pour le canal CLC-5. Cette protéine agit comme un antiport assurant le transport de $2\text{Cl}^-/\text{H}^+$ (Picollo et Pusch 2005). Ce canal est co-distribué à la membrane par des endosomes avec la V-ATPase, celle-ci assurant la réabsorption et l'albumine ainsi que d'autres protéines de bas poids moléculaire filtrées par le glomérule. En reliant cela au symptôme de protéinurie de bas poids moléculaire, il semble que la pathologie soit donc liée à une perturbation de l'endocytose se répercutant sur d'autres protéines de la membrane des cellules du tube contourné proximal.

La maladie de Dent de type 2 est associée à une mutation du gène *OCRL1*. Ce dernier code pour une phosphatase (PIP2). En plus des troubles rénaux, une mutation peut conduire à des symptômes de cataracte, d'hypotonie centrale ou encore de déficit intellectuel. La combinaison des symptômes rénaux et cérébraux définira alors le syndrome de Lowe. Les études sur des modèles de souris ont permis de mettre en évidence des similarités notamment en termes d'adressage des protéines à la membrane. Ainsi, il semblerait que les endolysosomes accumulent du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate perturbant le trafic des vésicules (Festa et al. 2019).

La prise en charge thérapeutique des patients atteints de la maladie de Dent est symptomatique et vise d'une part à éviter la néphrolithiase par un apport généreux en liquide. Des diurétiques thiazidiques peuvent également être employés pour traiter l'hypercalciurie. Malheureusement, leur utilisation expose les patients à des effets indésirables comme l'hypovolémie ou l'hypokaliémie. La supplémentation en vitamine D au cours de la vie du patient est également complexe, celle-ci pouvant favoriser l'hypercalciurie. Cebotaru et son équipe ont suggéré en 2005, dans une étude sur un modèle animal, qu'un régime enrichi en citrate pourrait éventuellement ralentir la progression de la

pathologie. Cependant, ce résultat ne semble pas avoir été mis à l'épreuve par des essais chez l'homme (Cebotaru et al. 2005). Cette pathologie présente un challenge au point de vue thérapeutique pour deux raisons. En effet, d'une part, les ligands au canal CLC-5 sont manquants pour restaurer son activité, d'autre part l'implication des voies d'adressage à la membrane doit faire réfléchir. Ainsi, si la pathologie n'est pas uniquement liée au mauvais fonctionnement de la protéine, mais à la répercussion sur d'autres protéines de son adressage défaillant, il faut alors trouver des chaperonnes pouvant favoriser le transport vers la membrane et favoriser son expression à la surface des cellules.

**Syndrome EAST/SeSAME (Epilepsy, Ataxia, Sensorineural deafness, Tubulopathy)/
(Seizures, Sensorineural deafness, Ataxia, Mental retardation, and Electrolyte imbalance) :**

Le syndrome EAST/SeSAME est un trouble affectant de nombreux organes avec une variété de symptômes. Le patient le plus vieux ayant été décrit pour cette pathologie a atteint l'âge de 24 ans. Cependant, de par la découverte récente de la maladie, l'existence d'individus plus âgés n'ayant pas été diagnostiqués, est possible. Ce syndrome fut décrit initialement par Bockenhauer et Scholl en 2009 (Bockenhauer et al. 2009). Il est dû à une mutation du gène KCNJ10 codant pour la sous-unité de base du canal potassique $K_{ir}4.1$ exprimée dans le cerveau, l'oreille interne, le rein et les yeux. A ce jour, vingt-huit cas ont été reportés et seize mutations ont pu être identifiées. Certaines mutations causent une absence d'expression à la surface des cellules, d'autres diminuent la quantité de protéines exprimées en surface quand d'autres mutations peuvent conduire à une augmentation de son expression malgré une perte de fonction de la protéine.

La prise en charge des patients atteints de ce syndrome se doit d'être pluridisciplinaire. Aucun traitement spécifique n'existe pour ces patients. Ainsi, les manifestations épileptiques sont contrôlées à l'aide d'antiépileptiques comme l'acide valproïque, la lamotrigine, la carbamazépine seule ou associée au topiramate. Cependant, certains patients continuent de subir des crises résistantes au traitement. La compensation des pertes en électrolyte est décrite dans la prise en charge de ces patients, occasionnellement de l'indométhacine ou encore de diurétiques épargnant le potassium comme la spironolactone ou encore l'amiloride (Celmina et al. 2019).

Il s'agit d'une pathologie nécessitant le développement de méthodes permettant son diagnostic rapide pour une prise en charge rapide des désordres électrolytiques. Le diagnostic différentiel est complexe. Ainsi, certains patients se sont vus diagnostiquer des pathologies plus courantes, comme le syndrome de Bartter ou de Gitelman. Les aspects génétiques et physiopathologiques doivent être plus étudiés et le développement de modèles animaliers pourrait permettre d'acquérir de précieuses informations sur la pathologie.

Pathologies	Gènes (protéines)	Thérapeutiques Actuelles	Perspectives Thérapeutiques
Syndrome de Bartter	CLCNKB (ClC-Kb) BSDN (Barttine) ROMK1 (Kir1.1)	<i>Traitements symptomatiques visant à restaurer l'équilibre électrolytique :</i> diurétique épargnant le potassium, indométhacine, supplémentation en électrolytes	Développement d'activateurs de canaux sélectifs, Développement de chaperonnes
Maladie de Dent	CLCN5 (ClC-5) OCRL1 (PIP2)	<i>Traitements symptomatiques visant à restaurer l'équilibre électrolytique :</i> diurétique thiazidique, régime enrichi en citrate	Développement d'activateurs du canal CLC-5, Développement de chaperonnes
Syndrome EAST/SeSAME	KCNJ11 (Kir4.1)	<i>Traitements symptomatiques visant à restaurer l'équilibre électrolytique et contrôler l'épilepsie :</i> traitement anti-épileptiques, indométhacine, supplémentation en électrolytes	Sensibilisation au diagnostic, Développement de modèles d'étude

Tableau 5 : Canalopathies des Reins

1.2.6. Canalopathie du Système Respiratoire

Mucoviscidose :

La mucoviscidose (ou fibrose kystique) est la pathologie d'origine génétique la plus prévalente parmi la population caucasienne avec environ 1 cas sur 2500 à 3500 naissances. Il est à noter que celle-ci touche bien plus faiblement les populations afro-américaines (1 cas pour 17 000 naissances) ou asiatiques (1 cas pour 31 000 naissances) (Genetics Home Reference). Les patients atteints sont vulnérables à des infections et inflammations pulmonaires à répétition. Cela conduira à des lésions des voies respiratoires irréversibles et l'insuffisance respiratoire. Le spectre des symptômes pouvant être exprimé par les patients est très varié. Ainsi, s'il peut exister des formes douces qui ne seront détectées que tardivement et n'affectant qu'un seul organe, d'autres formes pourront s'avérer plus sévères. Dans ces formes, les troubles pourront également toucher le système digestif et reproducteur.

L'origine de la pathologie est associée à diverses mutations du gène CFTR codant pour le canal du même nom dont plus de 1900 mutations ont pu être identifiées. La protéine CFTR est un canal ionique responsable du transport des ions chlorures principalement, et thiocyanates dans une moindre mesure à travers l'épithélium respiratoire. Différentes stimulations permettent de moduler le transport des ions à travers la membrane, comme des phosphorylations de son domaine de régulation, ou l'hydrolyse de l'ATP sur des domaines d'interactions. En plus de cette fonction de canal ionique, la protéine est impliquée dans la régulation d'autres canaux, comme le canal chlorique à rectification sortante, le canal sodium épithélial, et des canaux potassiques à rectification entrante (Schwiebert et al. 1999). Il en résulte un rôle majeur dans l'organisme de celle-ci.

La plus commune étant la mutation F508del, conduisant à la délétion de la phénylalanine en position 508 (Orenstein et al. 2002). Six classes de mutations ont pu être mises en évidence. La classe I concerne entre 2 et 5% des patients et se caractérisera par l'absence totale de protéine CFTR. La classe II touche 70% des patients américains atteints et se caractérisera par une mauvaise localisation de la protéine au niveau cellulaire en lien avec des modifications post-traductionnelles anormales. La classe III correspond au patient présentant un canal à activité réduite en lien avec des défauts de régulation de celle-ci. La classe IV concerne les patients présentant des troubles de la conduction conduisant à des flux d'ions irréguliers et aberrants. Les patients atteints par une mutation de classe V présentent un taux trop faible de protéine CFTR même si celle-ci est fonctionnelle. Enfin les

mutations de classe VI conduisent à une augmentation du turn-over et un faible temps d'activité au niveau de la membrane de la protéine qui sera rapidement détruite (Rafeeq et Murad 2017).

Quel que soit la mutation, le patient présentera un déficit en ions chlorure extracellulaire et en thiocyanate. Il y aura une réabsorption trop importante de l'eau au niveau des différents épithéliums causant un épaississement des sécrétions épithéliales. Les manifestations pourront alors toucher les poumons, le pancréas et le foie. Au niveau du pancréas, un défaut d'excrétion des enzymes de la digestion apparaîtra en raison de canaux bouchés par des sécrétions ne permettant plus la délivrance de celles-ci dans le tube digestif. Ces enzymes s'attaqueront alors au pancréas entraînant une fibrose de ce dernier. Celui-ci sera perturbé tant dans ses fonctions endocrines qu'exocrines. Au niveau du foie, on observera une augmentation de la viscosité de la bile qui sera à l'origine d'une obstruction des voies hépato-biliaires. Il en résultera une cirrhose biliaire et souvent une hépatomégalie. Le patient pourra nécessiter une greffe hépatique en raison des hypertensions de la veine porte, hémorragies digestives et insuffisance hépatocellulaire. Enfin, au niveau des poumons, le liquide de surface tapissant l'arbre bronchique s'épaissira. Il perdra alors ses propriétés rhéologiques diminuant l'efficacité de la clairance muco-ciliaire. En effet, ne pouvant plus être éliminé correctement, le mucus bronchique s'enrichira en poussières et agents infectieux. Le patient verra alors ses voies respiratoires colonisées par diverses bactéries, causant une inflammation et conduisant à des lésions des tissus bronchiques et à une insuffisance respiratoire.

La stratégie thérapeutique est complexe et devra prendre en compte la totalité des organes pouvant être touchés. D'une part, le traitement devra permettre de restaurer une fonction respiratoire convenable et limiter infections et inflammations. A ce titre, diverses antibiothérapies inhalées peuvent être employées, on peut citer de manière non exhaustive l'utilisation d'azithromycine, de tobramycine, de levofloxacin ou encore de doxycycline. L'inflammation peut être contrôlée à l'aide d'anti-inflammatoires, notamment des corticoïdes inhalés ou bien par voie systémique et l'utilisation de cromolyne (Flume et al. 2007). Il est également nécessaire de favoriser l'élimination du mucus. A ce titre, il est possible d'employer des agonistes beta, des solutions salines hypertoniques ou encore la dormase α , une enzyme issue du génie génétique capable d'hydrolyser l'ADN extracellulaire accumulé dans le mucus (Salvatore et D'Andria 2002),(Robinson et al. 1996),(Quan et al. 2001).

Le traitement du système digestif est aussi nécessaire pour éviter tout risque d'obstruction intestinale. L'utilisation de laxatif osmotique et de soluté de réhydratation orale peut être nécessaire dans le cas de blocage partiel. Si le blocage est total, un lavage intestinal sera nécessaire (Colombo et al. 2011). Pour éviter toute récurrence, une administration régulière de polyéthylène glycol 3350 peut être donnée pour une durée de 6 mois à 1 an. Le déficit en enzyme issu du pancréas doit également être comblé pour restaurer les fonctions digestives chez le patient. Pour ce faire, il est possible de recourir à des thérapies substitutives consistant à administrer au patient les enzymes dont il a besoin par voie orale (Somaraju et Solis-Moya 2016).

La principale cible pharmacologique pour un traitement plus spécifique et efficace de la mucoviscidose se concentre sur la protéine CFTR. En effet, celle-ci reste à l'origine de l'ensemble du tableau clinique présenté par les patients. Ainsi, il existe une recherche active de molécules permettant de corriger ces déficits structuraux et/ou fonctionnels. C'est avec cet objectif en tête que l'ivacaftor a été mis sur le marché en 2012 à la suite d'essais cliniques multicentriques de grande envergure (Ramsey et al. 2011). Ce médicament agit en augmentant l'ouverture du canal, améliorant de fait le transport des ions chlorures. Son mécanisme n'est cependant pas totalement élucidé. Aujourd'hui cependant, il n'est indiqué que pour les patients de plus de 6 ans porteurs d'au moins une mutation de classe III et chez certains patients de plus de 18 ans atteint d'une mutation de classe IV, la mutation R117H. Cependant pour un certain nombre d'autres mutations, notamment la F508del qui touche presque 70% des patients européens, cette molécule s'est avérée inefficace. Rappelons également qu'avec un coût de traitement de plus de 18000 euros par mois pour cette seule molécule, ce traitement représente une dépense de santé importante.

Le second modulateur de la protéine CFTR important est le lumacaftor. Celui-ci a montré de bons résultats dans le traitement de patients atteints par la mutation F508del. Cette mutation conduit à un mauvais repliement de la protéine conduisant à sa destruction avant son insertion dans la membrane pour récupérer sa structure finale. Le lumacaftor va donc agir en augmentant le transport vers la membrane pour permettre à la protéine son action, qui sera souvent limitée dans sa fonction par son défaut de structure (Van Goor et al. 2011). Cette molécule est très intéressante de par la population large qu'elle permet de traiter.

Si le lumacaftor permet d'augmenter le trafic vers la membrane de protéine avec des défauts de structures et que l'ivacaftor permet d'activer des canaux présents à la membrane avec un défaut, alors il semble naturel de vouloir les associer. En effet, des essais de phase II puis de phase III ont donné des résultats prometteurs dans ce sens (Elborn et al. 2016). Ainsi chez les patients de plus de 12 ans homozygotes delta F508, des améliorations modérées mais significatives ont pu être mises en évidence permettant la délivrance d'une AMM européenne en 2018 sous le nom de marque Orkambi®.

Le développement de ces modulateurs de la protéines CFTR a considérablement amélioré la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose. Cependant, des limitations se présentent parmi lesquelles nous pouvons citer, la nécessité de continuer les autres traitements symptomatiques quotidiens, des interactions avec les inducteurs et inhibiteurs du CYP3A, des effets indésirables graves tels que l'augmentation des transaminases, la cataracte, des douleurs oro-pharyngés, des infections des voies respiratoires hautes liées à une perte d'efficacité de certains antibiotiques et antifongiques. Il est également à noter que le bénéfice de ces traitements pour les jeunes patients de moins de 12 ans est limité et que de fortes doses doivent être maintenues pour obtenir une bonne efficacité. Enfin la combinaison de l'ivacaftor et du lumacaftor conduit à une escalade des doses. En effet, leur interaction mutuelle conduit à une augmentation du métabolisme de l'ivacaftor. Il existe un grand nombre de molécules actuellement soumises à diverses phases d'essai dans le but de développer de nouveaux agents correcteurs du transport par CFTR comme le CTP656, une molécule d'ivacaftor deutérée pour augmenter sa demi-vie ou encore la duramycine qui vise à activer les canaux CaCC pour restaurer le transport des ions chlorures au travers d'une protéine non mutée (Rafeeq et Murad 2017).

1.2.7. Canalopathies du Système Endocrinien

Diabète Sucré Néonatal et Hyperinsulinisme Congénitale :

Les cellules β des îlots de Langerhans participent à la libération d'insuline, hormone hypoglycémisante majeure de la régulation de la glycémie. La membrane de ces cellules présente un canal potassique ATP-dépendant (KATP) impliqué dans la régulation de ces sécrétions (McTaggart et al. 2010).

Les mutations des gènes ABCC8 et KCNJ11 entraînant une perte de fonction des canaux sont à l'origine de la majorité des hyperinsulinismes congénitaux. La conséquence principale de ce trouble est l'hypoglycémie. Celle-ci est particulièrement sévère pendant la période néonatale et doit être traitée rapidement au risque de causer des dommages cérébraux si elle n'est pas prise en charge. La plupart des nourrissons naissent macrosomiques, très souvent par césarienne (Arnoux et al. 2011).

Les mutations entraînant un gain de fonction de la protéine pour les mêmes gènes, seront à l'origine de diabète sucré ou encore du syndrome DEND. Ce dernier est une forme sévère de diabète néonatal caractérisé par la présence d'une triade de symptômes, incluant retard de développement, épilepsie et diabète néonatal.

Le traitement de l'hyperinsulinisme congénital implique l'utilisation de diazoxide capable d'ouvrir le canal KATP ainsi que des analogues de la somatostatine permettant de réduire la sécrétion d'insuline. Cependant il est à noter qu'une part non négligeable de nourrissons peut manifester une résistance à ce traitement dans les premiers mois de la vie. Le diabète néonatal et le syndrome DEND sont traités à l'aide d'insuline et de glibenclamide, une molécule bloquant le canal KATP et augmentant la sécrétion d'insuline (Evllyaoğlu et al. 2018).

Le canal KATP est régulé par le ratio ATP/ADP dans la cellule. Lorsque la quantité d'ATP augmente dans la cellule à la suite de la glycolyse, ce canal se ferme induisant une dépolarisation de la membrane qui active un second canal ionique. Ce dernier permet un influx de calcium à l'intérieur de la cellule. L'augmentation du taux de calcium intra-cellulaire provoque alors l'exocytose et la libération d'insuline (Demirbilek et Hussain 2017). Cette chaîne de transduction du signal, met en évidence la possibilité d'agir à plusieurs niveaux pour limiter l'impact de la mutation. Ainsi, un axe de recherche pourrait être le développement de molécules plus spécifiques des protéines mutées des patients. En effet, la sous-unité où vient se fixer un certain nombre de molécules bloquant ce canal, (comme le glimepiride ou encore le repaglinide) est affectée par la mutation induisant une perte

d'efficacité des molécules connues. D'autres part, le développement de molécules permettant d'activer ou de bloquer le canal calcique au besoin, représente une piste de recherche intéressante.

Pathologie osseuse :

L'ostéopétrose ou maladie des os de marbre se réfère à un groupe d'anomalies osseuses héréditaires. Celles-ci se caractérisent par une augmentation de la densité osseuse due à un défaut de développement ou de fonction des ostéoclastes, cellules impliquées dans la résorption de l'os. La présentation clinique de la pathologie est variable. Ainsi il a pu être constaté des complications néonatales mortelles comme l'aplasie médullaire, mais également des découvertes fortuites à la radiographie. Classiquement, les patients présentent des fractures, une petite taille, des neuropathies compressives et parfois une pancytopénie.

Une défaillance du gène TCIRG1 codant pour une sous-unité de la V-ATPase a pu être mise en évidence dans 50% des cas. Celle-ci induit alors un défaut du trafic vésiculaire dans la cellule et une acidification des lysosomes. Cela provoque une incapacité des ostéoclastes à résorber le tissu osseux (Sobacchi et al. 2013). Plus rarement, des mutations des gènes CLCN7 et OSTM1 ont pu être constatées. Ces gènes codent, respectivement, pour le canal chlorique CLC-7 et sa sous-unité accessoire Ostm1 (Ou et al. 2019),(Pata et Vacher 2018). Leur mutation entraîne une perte de fonction du canal.

Une transplantation de cellules souches hématopoïétiques est à l'heure actuelle le seul traitement curatif connu de diverses formes d'ostéopétrose. Cependant, si le patient peut expérimenter un rejet de greffe, il s'expose également à des effets indésirables comme une toxicité hépatique ou pulmonaire ou bien encore des maladies veino-occlusives (Orchard et al. 2015). Le calcitriol est également employé en association à l'interféron gamma. Ce traitement vise à moduler le taux de calcium dans le sang pour augmenter l'activité des ostéoclastes (Key et al. 1995). Le développement de nouvelles thérapeutiques se concentre actuellement, d'une part sur la thérapie génique et d'autre part sur des molécules capables de cibler CLC-7.

Pathologies	Gènes (protéines)	Thérapeutiques Actuelles	Perspectives Thérapeutiques
Hyperinsulinisme congénital	KCNJ11 (K _{ir} 6.2) ABCC8 (SUR1)	diazoxide pour ouvrir les canaux KATP, analogues de somatostatine pour réduire la sécrétion d'insuline	Développement de molécules hyperglycémiantes, Développement de molécules agissant à d'autres niveaux de la transduction du signal
Diabète sucré néonatal et syndrome DEND	KCNJ11 (K _{ir} 6.2) ABCC8 (SUR1)	insuline, glibenclamide, un sulfamide hypoglycémiant	Développement de molécules hypoglycémiantes spécifiques des mutants, Développement de molécules agissant à d'autres niveaux de la transduction du signal
Ostéopétrose	CLCN7 (CLC-7) OSTM1 (CLC-7 accessory subunit Ostm1)	<i>Traitements visant à augmenter la résorption osseuse :</i> greffe de cellules souches hématopoïétiques, calcitriol et interferon gamme, corticostéroïdes	Développement de molécules ciblant CLC-7, Thérapie génique

Tableau 6 : Canalopathies du Système Endocrinien

1.2.8. Canalopathies du Système Immunitaire

Si la plupart des canalopathies sont des pathologies d'origine génétique, quelques-unes de ces pathologies sont acquises. En effet, il existe un certain nombre de pathologies affectant les canaux présentant une origine auto-immune. Ainsi, chez certains patients, il est possible de retrouver des anticorps dirigés vers les canaux ioniques ou leur protéine associée. On retrouve décrit dans la littérature, une douzaine de pathologies d'origine auto-immune allant de la myasthénie grave à l'encéphalite. Les canalopathies apparaissent le plus souvent en présence d'un syndrome paranéoplasique favorisant l'expression d'auto-anticorps.

La myasthénie grave est une pathologie de ce groupe bien connue. Les patients présentent des anticorps ciblant les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChRs) perméables aux ions sodium et potassium. Ces récepteurs sont exprimés sur la membrane des cellules post synaptiques de la plaque motrice. En ciblant ce récepteur, les anticorps provoqueront une abolition de la fonction de ceux-ci. En raison de ce blocage, le patient présentera une certaine faiblesse musculaire avec une fatigabilité. Le plus souvent, il s'agira de faiblesse oculaire, même si des manifestations oropharyngées ou bien au niveau des membres sont possibles. Le traitement doit être adapté à chaque cas et sera le plus souvent symptomatique, notamment avec des anticholinestérasiques visant à augmenter la concentration en acétylcholine de la synapse pour augmenter la stimulation du muscle. Une autre cible des auto-anticorps est la protéine MuSK, participant au regroupement des sous-unités constituant nAChRs. Une modulation de la réponse immunitaire est souvent nécessaire pour diminuer le taux d'anticorps. Ainsi il est possible d'employer corticoïdes, azathioprine, cyclosporine et mycophénolate mofétil. En cas de crise grave, la plasmaphérèse ou l'injection d'immunoglobulines par voie intraveineuse peut être requise (Jayam Truth et al. 2012).

La ganglionopathie autonome auto-immune est une autre pathologie apparaissant à la suite d'une auto-immunité à l'encore de nAChRs. Cette fois-ci au niveau cérébral. Ceux-ci sont notamment exprimés au niveau des ganglions synaptiques sympathiques, parasympathiques et entériques. Les patients présenteront des hypotensions orthostatiques, une hypohydrose, des pupilles fixes en mydriase, une sécheresse oculaire et buccale, éventuellement une rétention urinaire, une constipation ou une diarrhée. La pathologie étant rare, aucun traitement standard n'a pu être établi. Ainsi une modulation de la réponse immunitaire sera le plus souvent entreprise avec l'emploi

d'immunosuppresseurs, ou de corticostéroïdes. La plasmaphérèse ou l'administration intraveineuse d'immunoglobuline est également conseillée. Un traitement symptomatique peut également présenter un intérêt, notamment les larmes artificielles et certains sprays buccaux, pour traiter les symptômes de sécheresse (Gibbons et al. 2008),(Parize et al. 2010).

Le syndrome myasthénique de Lambert-Eaton est un trouble présynaptique se caractérisant par une faiblesse des muscles proximaux, des dysfonctionnements du système nerveux autonomes et une abolition des réflexes. Dans cette pathologie des auto-anticorps vont cibler le canal calcique présynaptique voltage-dépendant P/Q. Ce canal est impliqué dans les influx en ions calcium à la suite d'une dépolarisation responsable de la libération de neurotransmetteurs. Ainsi par son action, l'anticorps induira une baisse importante des influx calciques et une diminution de la libération d'acétylcholine. 50% des patients présentant ce syndrome développent une tumeur sous-jacente, comme par exemple un cancer du poumon à petite cellule dans lequel la cellule cancéreuse exprime ce même canal. Il n'existe pas de traitement curatif pour ce syndrome. Sa prise en charge implique l'utilisation d'amifampridine, un bloqueur de canaux potassique voltage-dépendants. Cette stratégie vise à augmenter la durée de dépolarisation de la membrane pour permettre une libération suffisante de neurotransmetteurs. La pyridostigmine peut également être employée ; cet inhibiteur de l'acétylcholinestérase permettra d'augmenter la concentration synaptique en acétylcholine. L'immunosuppression peut être entreprise également soit par l'emploi de prednisolone seule ou combinée à l'azathioprine. La plasmaphérèse et l'administration intra-veineuse d'immunoglobulines ne possèdent malheureusement que des effets de courtes durées. La tumeur sous-jacente doit être traitée si elle est présente (Titulaer et al. 2011).

La neuromyotonie est une forme d'hyperexcitabilité des nerfs périphériques se caractérisant par des fasciculations musculaires, des crampes ou encore des pseudomyotonies, mais également d'hyperhydrose et éventuellement de paresthésie. Si cette pathologie peut être héréditaire, il existe également une forme acquise, le syndrome d'Isaac.(Tomimitsu et al. 2004) Dans cette forme, le patient présente des auto-anticorps dirigés vers le canal calcique α -dendrotoxine-sensible voltage-dépendant (VGKC) ou ses protéines associées comme le gliome inactivé 1 riche en leucine (LGI1), la protéine 2 associée aux contactines (CASPR2) ou encore la contactine-2. Ces protéines aident à la repolarisation de la membrane cellulaire et contribuent aux périodes réfractaires limitant la surstimulation. Les auto-anticorps vont donc provoquer une diminution de l'influx potassique conduisant à l'hyperexcitabilité nerveuse et l'augmentation des contractions

musculaires. A ces manifestations musculaires peuvent s'associer des symptômes neurologiques comme des hallucinations, une confusion, une amnésie, un myoclonus. Des signes d'hyperactivité autonome (variation de pression sanguine, hyperhydrose). Dans le cas où ces symptômes apparaissent, on parlera alors du syndrome de Morvan (Masood et Sitammagari 2019). La qualité de vie du patient peut être améliorée à l'aide d'un traitement symptomatiques. Ainsi l'utilisation de traitements permettant la réduction de la dépolarisation sera privilégiée. L'utilisation d'antiépileptiques comme la carbamazépine, la lamotrigine ou bien le valproate de sodium peut être utile, si nécessaire en combinaison. La plasmaphérèse permet une amélioration des symptômes pour une période d'environ 6 semaines. L'immunosuppression est aussi envisageable même si les effets bénéfiques à long terme de celle-ci n'ont pu être démontrés (Skeie et al. 2010).

L'encéphalite limbique, dans certaines formes, a pu être reliée à une augmentation du niveau d'anticorps visant les canaux VGKC. Elle se caractérise par des amnésies aiguës, une confusion, des changements de personnalité ou encore une psychose. Celle-ci peut être repérée par IRM, par la présence d'une zone d'inflammation au niveau des lobes temporaux médians. Le canal VGKC n'est pas le seul à pouvoir être ciblé dans cette pathologie. Ainsi le récepteur à l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4isoxazolepropanoïque (AMPA), les récepteurs au GABA ou encore le récepteur au N-méthyl-D-aspartate (NMDAR) sont également concernés. Comme la plupart des pathologies auto-immunes décrites, les encéphalites auto-immunes peuvent apparaître dans un contexte de syndrome paranéoplasique.

Les encéphalites anti-NMDAR sont reconnues comme les encéphalites auto-immunes les plus prévalentes. Le patient présentera des symptômes comme la psychose, l'amnésie, la confusion, la dysphasie, des instabilités respiratoires qui nécessiteront le plus souvent une hospitalisation pour des soins lourds. La plupart des patients sont des enfants ou bien de jeunes adultes avec ou sans tumeurs. Les anticorps sont présents dans le sang et le liquide cébrospinal. Ceux-ci diminuent la densité membranaire de ce récepteur en augmentant son internalisation et sa dégradation diminuant l'excitabilité des neurones GABAergiques (Dalmau et al. 2019).

Le traitement des encéphalites auto-immunes nécessitera le plus souvent une immunosuppression. Les corticostéroïdes sont indiqués en première intention pour limiter les processus inflammatoires mais leur efficacité est limitée par leur faible spécificité. L'administration d'immunoglobulines par voie intra-veineuse est également possible de

même que la plasmaphérèse. En complément, l'utilisation d'immunomodulateur peut être nécessaire comme le rituximab et les cyclophosphamides. Cependant le rituximab ne passe pas la barrière hémato-encéphalique et par conséquent voit son efficacité limitée. Des thérapies alternatives comme le tocilizumab, l'interleukine-2, l'azathioprine et le mycophénolate mofétil ont également été reportées (Shin et al. 2017).

La neuromyéélite optique est un terme englobant un vaste spectre de maladies inflammatoires démyélinisantes. Ce phénomène affecte principalement les nerfs optiques et la moëlle épinière. En raison de la disparition de la gaine de myéline les patients développeront des névrites optiques pouvant conduire à la cécité, mais également des paralysies, des troubles des sens, des dysfonctionnements vésicaux. Le plus souvent, les patients présentent des anticorps ciblant l'aquaporine 4, le principal canal responsable du passage de l'eau dans le système nerveux central. Cette protéine est principalement retrouvée sur la membrane des astrocytes participant à de nombreuses tâches dans le système nerveux comme la régulation des neurotransmissions, la réponse immunitaire, la régulation du flux sanguin, le métabolisme énergétique ou encore l'entretien de la barrière hémato-encéphalique. En endommageant les astrocytes les auto-anticorps vont provoquer une inflammation locale pouvant conduire à une défaillance de la barrière hémato-encéphalique et des dommages neuronaux (Chang et Chang 2019). Le traitement de cette pathologie repose sur une gestion des épisodes aigus à l'aide de corticostéroïdes par voie intraveineuse et en l'absence de réponse par une plasmaphérèse. Le traitement à long terme implique l'utilisation d'immunosuppresseurs comme l'azathioprine, ou le mycophénolate mofétil (Wingerchuk et al. 2007).

Les canalopathies d'origine auto-immunes sont des pathologies dont l'étude a commencé récemment et de nombreux éléments restent encore à définir pour permettre de mieux les comprendre pour mieux les traiter. Ainsi le développement de nouveaux modèles d'études *in vivo* et *in silico* s'avère nécessaire pour mieux comprendre les processus physiopathologiques impliqués dans ces troubles. Ces informations permettront d'envisager le développement de nouvelles molécules spécifiques efficaces pour traiter les patients. Le diagnostic de ces pathologies est également complexe avec parfois de nombreux diagnostics différentiels possibles devant être éliminés. Pour faciliter le diagnostic et ainsi augmenter la rapidité de prise en charge des patients, la recherche sur les biomarqueurs spécifiques de ces pathologies est importante pour développer des outils fiables de dépistage de ces pathologies. Pour un certain nombre de ces pathologies les recommandations thérapeutiques sont souvent floues et peu développées en raison d'un manque de données

permettant d'établir un consensus. De par la faible prévalence de ces troubles, il est souvent complexe de réaliser des études et essais cliniques rigoureux, et par conséquent le design de nouveaux types d'essais cliniques adaptés doit être une préoccupation importante à garder en tête pour s'assurer d'obtenir des données statistiquement significatives.

Pathologie	Canal ciblé	Thérapeutiques Actuelles
Myasthénie grave	nAChRs MuSK	<i>Traitement symptomatique :</i> anticholinestérasiques injection d'immunoglobulines par voie intraveineuse, plasmaphérèse
		<i>Immunosuppression :</i> corticoïdes, azathioprine, cyclosporine, mycophénolate mofétil
Ganglionopathie autonome auto-immune	nAChRs	<i>Traitement symptomatique :</i> larmes artificielles, sprays buccaux
		<i>Immunosuppression :</i> injection d'immunoglobulines par voie intraveineuse, plasmaphérèse
Syndrome myasthénique de Lambert-Eaton	CCVD	<i>Traitement symptomatique :</i> amifampridine pyridostigmine injection d'immunoglobulines par voie intraveineuse, plasmaphérèse
		<i>Immunosuppression :</i> prednisolone, azathioprine
Syndrome d'Isaac	VGKC LGI1 CASPR2	<i>Traitement symptomatique :</i> carbamazépine, lamotrigine, valproate de sodium acétazolamide injection d'immunoglobulines par voie intraveineuse, plasmaphérèse
		<i>Immunosuppression :</i> corticostéroïdes oraux, méthotrexate, azathioprine
Syndrome de Morvan	VGKC LGI1 CASPR2	<i>Traitement symptomatique :</i> carbamazépine, lamotrigine, valproate de sodium acétazolamide injection d'immunoglobulines par voie intraveineuse, plasmaphérèse
		<i>Immunosuppression :</i> corticostéroïdes oraux, méthotrexate, azathioprine

Tableau 7 : Canalopathies Auto-Immunes

Pathologies	Canaux ciblés	Thérapeutiques Actuelles
Encéphalite limbique	VGKC AMPA GABABR NMDAR	<p><i>Traitement symptomatique :</i></p> <p>corticostéroïdes</p> <p>injection d'immunoglobulines par voie intraveineuse, plasmaphérèse</p> <p><i>Immunosuppression :</i></p> <p>corticostéroïdes</p> <p>rituximab, clophosphamides, tocilizumab, azothioprine, mycophenolate mofétil</p>
Encéphalites anti-NMDAR	NMDAR	<p><i>Traitement symptomatique :</i></p> <p>corticostéroïdes</p> <p>injection d'immunoglobulines par voie intraveineuse, plasmaphérèse</p> <p><i>Immunosuppression :</i></p> <p>corticostéroïdes</p> <p>rituximab, clophosphamides, tocilizumab, azothioprine, mycophenolate mofétil</p>
Neuromyéélite optique	AQP4	<p><i>Traitement symptomatique :</i></p> <p>corticostéroïdes par voie intraveineuse</p> <p><i>Immunosuppression :</i></p> <p>azathioprine, mycophénolate mofétil</p>

Tableau 8 : Canalopathies Auto-Immunes (suite)

1.3. Innovations futures et Approches Thérapeutiques Innovantes

Comme nous avons pu le voir, les canalopathies représentent une famille de maladies vaste incluant de nombreux désordres souvent très différents. Il n'existe à ce jour que peu de pathologies impliquant une pharmacothérapie ciblée, spécifique et efficace. La multitude des mutations et variations possibles, complexifie fortement les traitements, et une molécule efficace pour un certain génotype ne le sera pas nécessairement pour un autre. La plupart des approches développées par les médecins impliquent le plus souvent une prise en charge symptomatique appuyée par des connaissances empiriques de ces pathologies. A ce manque de principe actif efficace, s'ajoutent les risques de résistance, ou encore les effets indésirables parfois graves que peuvent subir les patients. Enfin certaines canalopathies nécessitent des approches complexes pour déterminer les mécanismes physiopathologiques et moléculaires à leur origine. C'est pourquoi les canalopathies représentent un sujet brûlant pour les chercheurs. Ces pathologies les mettent au défi de concevoir de nouveaux modèles permettant l'étude de ces maladies, ainsi que d'imaginer de nouveaux concepts pour des traitements innovants.

Dans un premier temps, pour comprendre comment corriger les troubles des patients, il est nécessaire de comprendre les mécanismes sous-jacents à leur origine. L'utilisation de modèle cellulaire est un premier niveau d'étude permettant de comprendre les mécanismes à une petite échelle. Bien entendu, quand cela est possible le meilleur choix sera l'utilisation de cellule humaine. Ainsi il est possible d'employer des cellules issues des biopsies de patient, ou bien des cellules souches pluripotentes induites. Cette approche permet d'identifier de manière efficace les canaux et les réactions causant la maladie, mais autorise également de conduire des essais criblage à haut débit pour découvrir de nouvelles molécules. Dans ce sens, nous pouvons citer une étude récente employant des cellules souches employées comme modèle pour l'étude du syndrome de Brugada (de la Roche et al. 2019). Dans cette publication, l'équipe de chercheurs a pu démontrer qu'il est possible de contourner les limitations des cellules souches pouvant exprimer des phénotypes immatures par une culture favorisant la maturation de celle-ci. Il démontre également, à l'aide de méthodes électrophysiologiques, un transit plus lent des cations sodium au travers de la membrane causé par la mutation p.A735V-Nav1.5 et le compare à un autre modèle cellulaire, HEK293T. De par la faible disponibilité des cellules issues de biopsies de patient, l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites est une approche séduisante permettant de pallier le manque de disponibilité des premières. Cependant, il s'agit d'une

approche présentant des limites. Tout d'abord les modèles doivent pouvoir être validés et autoriser l'extrapolation au cas des patients. D'autre part, l'étape de montée en échelle doit également être envisagée. En effet, pour permettre leur utilisation pour l'identification de nouvelles molécules, ces modèles doivent pouvoir être produits facilement en grande quantité.

Comme nous l'avons vu, certaines de ces canalopathies sont également susceptibles d'être causées par des erreurs de modifications post-traductionnelles, ou des mutations causant des modifications mineures dans le repliement de la protéine. Il existe également des cas où la protéine est en mesure de prendre sa structure tertiaire finale une fois correctement localisée, mais en raison de mutations, cette localisation n'est pas atteinte. Pour contrer ce problème, une approche intéressante consiste à recourir à l'utilisation de chaperonne pharmacologique. Ces molécules permettent la stabilisation de la protéine dans une conformation désirée, favorisant de ce fait le transport, la localisation et la fonction de la protéine. Les représentants les plus connues de cette classe pharmacologique sont l'ivacaftor et le lumacaftor employés dans le traitement de la mucoviscidose (Mall et Galletta 2015). La principale limite de cette approche est souvent liée à l'action inhibitrice des chaperonnes, celles-ci pouvant stabiliser la protéine au point de ne pas lui laisser la liberté suffisante pour subir les changements conformationnels nécessaires au bon fonctionnement de la protéine chaperonnée. Ces limitations ont pu être mise en évidence dans certains travaux sur les canaux sodiques à l'origine de diverses épilepsies (Bechi et al. 2015).

Une stratégie récente déployée par l'industrie pharmaceutique pour réduire les coûts de recherche et développement et également gagner du temps est le repositionnement de médicaments. Cette pratique vise à étudier des molécules ayant déjà démontré leur efficacité et obtenu l'AMM. Comme nous l'avons vu, les inhibiteurs des canaux sodiques voltage dépendant sont déjà employés de manière empirique pour le traitement de pathologies en dehors de leur indications initiales, par exemple pour le traitement de pathologie neuromusculaire (Matthews et Hanna 2014). Cette approche présente l'avantage de ne pas avoir à réitérer les essais cliniques de sécurité et de toxicité leur permettant de passer directement des essais précliniques à la phase II des essais cliniques. A l'heure du "Big Data" le recourt aux bases de données de pharmacovigilance pourrait également être un outil précieux dans cette stratégie. Conceptuellement, l'approche est simple et peut être automatisée. Il suffit d'étudier les données pour mettre en évidence un effet indésirable d'un médicament sur le marché. Certains effets indésirables

peuvent être reliés à un canal ionique touché par la molécule, ainsi il devient plus simple de cibler les molécules présentant un potentiel de repositionnements. Les bases de données de pharmacovigilance sont à l'origine un système de surveillance passif visant à collecter des signalements spontanés par les professionnels de santé, les patients ou les associations de patients et les entreprises pharmaceutiques à la suite d'un évènement indésirable. Attention cependant, il existe un piège à éviter. En effet, la plupart des signalements ne permettent généralement pas d'établir un lien causal entre l'effet indésirable et le médicament. A l'heure de la médecine basée sur les preuves, seuls les essais cliniques sont considérés comme pouvant démontrer la causalité. Cependant, les corrélations soulevées par les bases de données sont susceptibles de donner de précieux indices pouvant être étudiés *in vitro* puis *in vivo*.

Un certain nombre de canaux concernés dans les canalopathies sont dit voltage-dépendants. Un changement du potentiel de membrane est détecté par un domaine spécifique de la protéine entraînant un changement conformationnel de celle-ci. Ce phénomène est possible en raison de la présence de résidus chargés hautement conservés et leur modification peut entraîner des pathologies, notamment celle impliquant des courants résiduels. La plupart des molécules ciblant les canaux interagissent avec le pore central et non ce domaine détectant les variations de potentiel. La création de modulateur des domaines de détection du potentiel membranaire représente une option pharmacologique devant être envisagée. Ces molécules existent déjà mais ont été principalement employées comme outil d'étude (Osteen et al. 2017),(Cardoso et al. 2017). Un certain nombre de canaux peuvent être ciblés par ce type de molécules notamment les canaux sodiques $Na_v1.1/1.3/1.4/1.7$, les canaux potassiques $K_v2/7.2$ et les canaux calciques Ca_v3 .

In vitro, il a pu être constaté que la sensibilité des molécules aux différentes molécules testées pouvait être reliée à certains défauts spécifiquement induits par les mutations. A partir de ce constat, il devient possible d'envisager une approche pharmacogénétique au traitement des canalopathies. Ce type de phénomène a pu être mis en évidence avec certaines molécules comme la mélixétine dans les syndromes myotoniques ou encore avec le flécaïnide dans le même type de pathologies (Desaphy et al. 2013). Il en résulte que la caractérisation spécifique des mutants que présentent les patients sera une étape nécessaire au développement de thérapie ciblée avec une forte efficacité. La caractérisation de ces spécificités propres aux patients permettra d'améliorer la sécurité des

nouvelles thérapies en limitant leurs effets secondaires par une action non désirée sur des protéines n'ayant pas d'implication dans le traitement de la maladie.

Comme nous l'avons vu, la grande majorité de ces pathologies présente une origine génétique. C'est pourquoi la communauté scientifique s'est tournée vers l'utilisation de la thérapie génique pour proposer de nouvelles alternatives thérapeutiques. Il s'agit d'un sujet de recherche particulièrement développé, notamment pour le traitement des canalopathies neurologiques. Une approche classique est l'utilisation de vecteurs viraux permettant d'introduire le gène que l'on désire en remplacement du gène muté. Cette approche présente un certain nombre de challenges devant être surmontés. Tout d'abord, rappelons qu'il s'agit à ce jour d'une approche majoritairement employée dans les laboratoires de recherche et non directement auprès des patients, avec un faible nombre d'essais cliniques dans ce domaine.

Pour que la thérapie génétique soit couronnée de succès, il est nécessaire de pouvoir identifier les cellules porteuses de la mutation à supprimer et d'y accéder. Il est ensuite nécessaire de mettre au point un vecteur efficace pour transporter le gène désiré. Il va sans dire que la pathologie doit être parfaitement caractérisée du point de vue génétique et la mutation en cause bien identifiée. Rappelons que deux grands types cellulaires peuvent être modifiés par ces thérapies. Il est possible de cibler les gamètes permettant de rendre la modification transmissible et ainsi lutter contre les pathologies héréditaires tout en limitant leur transmission. On peut également cibler les autres types cellulaires, mais le traitement dans ce cas se limitera au patient qui pourra toujours transmettre la pathologie à sa descendance. La délivrance du gène est complexe. En effet, il faut s'assurer qu'il soit correctement introduit à la bonne position dans le génome de la cellule pour ne pas créer de nouvelles aberrations. Enfin, il a été reporté des cas de thérapies géniques dont les effets ont pu disparaître au cours du temps, le patient redéveloppant la pathologie, cela est particulièrement vrai dans le cas où la mutation est présente dans une lignée cellulaire à renouvellement rapide (Gonçalves et Paiva 2017).

Malgré les défis que cette approche nous impose, il s'agit d'un type de thérapie offrant de grands espoirs en permettant de traiter le patient définitivement lui évitant la prise de médicaments et l'exposition à des effets secondaires, mais également d'en supprimer l'hérédité épargnant les générations suivantes. Ce dernier point soulève toujours de vifs débats bioéthiques dans la communauté scientifique. En effet, si le traitement des

cellules somatiques ne pose généralement pas de problème, le traitement des gamètes porte à controverse, notamment de par le risque de dérives eugénistes.

En développant notre compréhension des canalopathies, des cibles alternatives sont découvertes. En effet, la plupart des canalopathies impliquent des cascades de réactions entre de nombreuses protéines. Par conséquent, la protéine mutée à l'origine de la pathologie n'est pas toujours la seule cible, une protéine annexe régulée par le canal muté peut être ciblée pour rétablir la fonction affectée. Ces cibles alternatives offrent des options thérapeutiques supplémentaires (Brignone et al. 2015). Il est envisageable de corriger le déficit primaire d'un canal en activant un autre en compensation pour rétablir le potentiel de membrane désiré par exemple. Cette approche est particulièrement étudiée dans le cas de la mucoviscidose ou les canaux ENaC et CaCC sont des cibles très sérieusement étudiées pour palier au défaut de CFTR (Donaldson et Galiotta 2013).

Enfin, une dernière approche est possible pour traiter ces troubles. Il s'agit des thérapies visant à remplacer les canaux ioniques par des petites molécules capables de transporter les ions à travers les membranes et ainsi rétablir les courants défailants. L'avantage de ce type de thérapie réside dans la possibilité d'ignorer totalement l'aspect génétique propre de chaque patient. Ainsi les phénomènes de résistance observés du fait de mutation modifiant l'efficacité des molécules sont évités. Il devient également possible de traiter le patient sans avoir recours à des tests génétiques coûteux pour déterminer le génotype du patient et donc la thérapie la plus appropriée. D'un point de vue économique pour les industriels il devient possible de regrouper des populations de patients qui auraient nécessité le développement de deux traitements spécifiques, réduisant les coûts et faisant gagner du temps de recherche.

Cependant cette approche présente également des défis non négligeables qui devront être surmontés pour le développement de thérapies sûres. Le premier de ceux-ci est la spécificité du type cellulaire, en effet si les mutations peuvent être ignorées par cette approche, il est nécessaire de s'assurer que ces molécules ne transportent les ions qu'au niveau des cellules présentant les canaux défailants. L'emploi de techniques de vectorisation pourra être nécessaire pour atteindre cet objectif. Une autre limite, repose dans la sélectivité des ions transportés et dans le sens du transport. Chaque transporteur doit être capable de déplacer spécifiquement l'ion nécessaire et dans le bon sens. Si la sélectivité d'ion peut être achevée grâce à une modulation du mode de liaison, le sens lui est plus complexe à gérer. Il est possible d'envisager des molécules pouvant être dégradées

dans leur milieu d'arrivée, cependant le traitement ne sera pas définitif et la prise de médicament à vie sera nécessaire.

Cette approche a principalement été supportée par la chimie supramoléculaire qui a permis de concevoir un grand nombre de molécules capables de transporter les anions au travers des membranes et d'optimiser leur capacité par l'étude de relation structure-activité. Trois mécanismes de transports ont pu être conçus : les transporteurs mobiles, de petites molécules traversant la membrane avec leur ion, les canaux monomériques, canaux ioniques artificiels possédant un pore laissant passer les ions et enfin les canaux multimériques autoassemblés, plus complexes. Ces canaux composés de plusieurs sous-unités viendront s'assembler en un canal (McNALLY et al. 2007).

Les premiers sont les plus simples à former, ils peuvent être libres ou bien ancrés dans la membrane. L'ancrage à la membrane est une nécessité pour éviter que les transporteurs ne rejoignent librement des cellules qu'ils ne doivent pas affecter. Leur principale limite repose dans le nombre d'ions qu'ils peuvent transporter, un transporteur ne peut en effet déplacer qu'un à deux ions à la fois à travers la membrane, ne permettant que très difficilement de rétablir des courants ioniques impliquant plusieurs dizaines voire centaines d'ions. Ils peuvent cependant être utiles pour créer de faibles variations visant à stimuler un canal secondaire.

Les canaux synthétiques qu'ils soient monomérique ou non, présentent un intérêt important de par leur capacité à remplacer les fonctions de transport des protéines. La sélectivité d'ions peut être obtenue en modifiant les fonctions chimiques à l'intérieur du canal et une fois ancrés à la membrane, ceux-ci ne doivent plus la quitter limitant le risque d'effet secondaire. Il est cependant nécessaire de les vectoriser correctement. Les canaux monomériques présentent l'inconvénient d'être peu modulables dans le temps, et présentent le risque d'être constamment ouverts induisant des courants résiduels non désirés, il devient nécessaire de les optimiser pour limiter ce risque. Les canaux multimériques permettent une souplesse plus grande, en effet il est possible d'envisager des arrangements différents des monomères permettant ainsi de répliquer plus facilement l'état ouvert ou fermé des canaux ioniques naturels.

Les preuves de concepts pour ces transporteurs d'ions existent depuis quelques années (Gale et al. 2017). Celles-ci sont le plus souvent établies *in silico* ou sur des modèles de membranes vésiculaires. Aujourd'hui, il devient nécessaire d'établir une communication entre biologistes, biochimistes et chimistes supramoléculaires pour développer ces approches sur des modèles cellulaires et mettre ces thérapies à l'épreuve du vivant.

2. Concepts de chimie pour le développement de transporteurs d'ions

2.1. Mode de liaison aux ions

2.1.1. Liaison Hydrogène

Les liaisons hydrogène sont un cas particulier d'interactions dipôle-dipôle avec une force d'interactions intermédiaires entre la liaison covalente et la liaison de Van der Waals (2-10 kJ.mol⁻¹). Elles ont été découvertes en 1928 par Pauling.¹(Pauling 1928)¹ Il s'agit de liaisons impliquant des forces électrostatiques (Martin et Derewenda 1999). Elles apparaissent entre un dipôle donneur formé d'un atome d'hydrogène porté par un atome électronégatif et un dipôle accepteur porteur d'un atome électronégatif comme l'oxygène, l'azote ou encore les halogènes. La liaison hydrogène est une composante primordiale de nombreuses architectures supramoléculaires. Ainsi, dans le vivant, elle joue un rôle majeur dans le repliement et le maintien de la structure tridimensionnelle des protéines mais également dans la structuration de la double hélice de l'ADN.

La liaison hydrogène a été particulièrement étudiée dans la reconnaissance d'anions. Classiquement, celle-ci met en jeu des groupements donneurs tels que des alcools OH ou des amines NH. De par la variété de motifs donneurs de liaisons hydrogène, ces derniers s'avèrent modulables en intensité et en directionnalité. Les motifs classiquement employés en reconnaissance d'anion sont les phénylurées et les isophtalamides.

Les découvertes récentes ont permis de développer une large variété de donneurs comme les acides arylboroniques de Martinez-Aguirre et Yatsimirsky¹(Martínez-Aguirre et Yatsimirsky 2015)¹ ou les polyols de Shokri (Shokri et al. 2013) (*Figure 2*). L'équipe de Elmes (Elmes et al. 2013) s'est notamment intéressée à l'emploi de squaramides dont le comportement est inhabituel vis-à-vis des anions chlorures peu basiques dans le DMSO. Les titrages réalisés en RMN ¹H et les changements de couleur ont conduit à postuler une possible déprotonation du récepteur à forte concentration en anions chlorure.

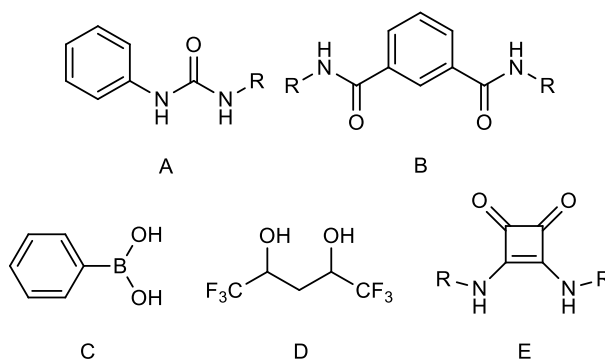


Figure 2 : Quelques exemples de donneurs de liaisons Hydrogènes employés en reconnaissance d'anions, A : Phénylurée B : Isophthalamides, C : Acide Arylboronique, D : Polyols, E : Squaramide

L'implication de liaisons hydrogène dans des mécanismes de transport transmembranaire a pu être mise en évidence par la découverte d'une molécule naturelle, la prodigiosine issue d'une souche bactérienne de *Serratia*. Celle-ci, une fois protonée, présente la capacité de faire passer les ions chlorures à travers les membranes cellulaires en se liant aux anions par trois liaisons hydrogène (Figure 3). Les effets du transport d'anions par la prodigiosine ont été enregistrés en temps réel par l'équipe de Cheung en 2018 (Cheung et al. 2018).

La prodigiosine non protonée est une petite molécule capable de traverser les membranes cellulaires. Dès lors qu'elle se retrouve protonée, elle perd sa capacité de diffusion. La complexation d'un anion chlorure permet de compenser la charge positive de la prodigiosine protonée. Le transport transmembranaire sera ainsi restauré. Le mécanisme permet aussi bien l'entrée que la sortie de la paire d'ions proton-chlorure.

Il s'agit d'un transport non électrogénique. Il ne provoque donc pas de variation du potentiel de membrane, du fait de la translocation simultanée d'une charge positive et d'une charge négative. Son application thérapeutique pourrait être intéressante, dans le cas où il est nécessaire de faire varier les concentrations en ions dans le milieu intra- ou extra-cellulaire, sans pour autant modifier le potentiel de membrane.

Dans le cadre des canalopathies impliquant un trouble du potentiel de membrane lié à une défaillance des canaux transmembranaires, la prodigiosine est une source d'inspiration intéressante. Il est possible d'envisager des modulations de sa structure conduisant à un transport électrogénique.

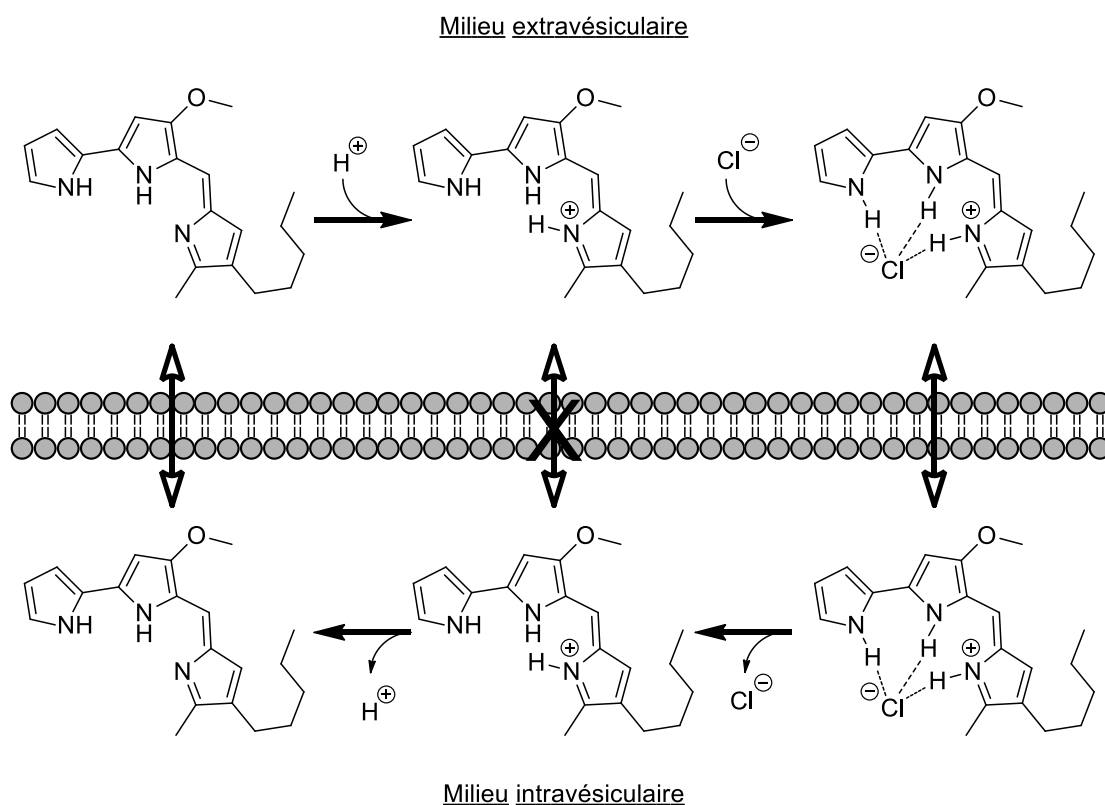


Figure 3 : Mécanisme de Transport de la Prodigiosine

2.1.2. Interactions impliquant un site électrophile – Liaisons Halogène et Chalcogène

La liaison halogène (Cavallo et al. 2016) a été mise en évidence par Hassel en 1954 par l'utilisation de la diffraction des rayons X (Hassel et al. 1954) pour résoudre la structure du 1,4-dioxane dibrome. Celle-ci s'est avérée être une interaction intéressante entre la région électropositive d'un atome d'halogène polarisé et une base de Lewis, ici le 1,4-dioxane. L'équipe de Langton (Langton et al. 2014) a pu mettre en évidence l'efficacité de ce mode de liaison aux anions. Il a ainsi réussi à lier des anions dans l'eau à l'aide de récepteurs incluant des motifs cyclodextrines et rotaxanes.

Il a été observé une affinité supérieure pour les anions (2200 M^{-1}) du composé **F**, en comparaison d'un autre dérivé **G** (Figure 4), ne formant que des liaisons hydrogène ($\leq 50 \text{ M}^{-1}$).

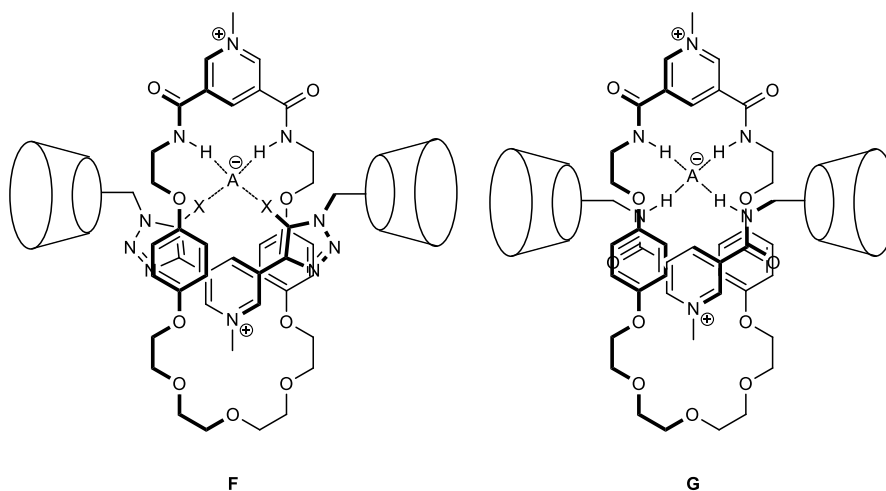


Figure 4 : Récepteur d'anion proposé par Langton

Le développement de liaisons halogènes a initié le développement d'autres interactions non covalentes entre des atomes σ électrodéficients et une base de Lewis. Une classification des interactions faibles a alors été proposée pour les éléments des groupes I et II ainsi que XII à XVII (Cavallo et al. 2014) de la classification périodique.

Parmi l'ensemble de ces nouvelles interactions, seule la liaison chalcogène a été étudiée pour la reconnaissance d'anions. Il s'agit d'une liaison analogue à la liaison halogène, dans laquelle un chalcogène électrodéficient joue le rôle d'acide de Lewis pour complexer l'anion. Son intérêt dans la reconnaissance d'anions a été mis en lumière par les équipes de Semenov (Semenov et al. 2014) et de Garrett (Garrett et al. 2015). L'équipe de Semenov a réussi à obtenir des cristaux mettant en évidence la liaison chalcogène entre différents anions et leurs donneurs de liaisons chalcogènes (Figure 5). Sur la base de calculs de chimie quantique, elle a montré que la force de la liaison chalcogène augmente avec la masse du chalcogène ($\text{Te} > \text{Se} > \text{S}$) et la densité de charge de l'anion ($\text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$). Sur la base de ces calculs, les auteurs ont conclu à un transfert de charge de l'anion vers le récepteur comme principale composante responsable de la liaison.

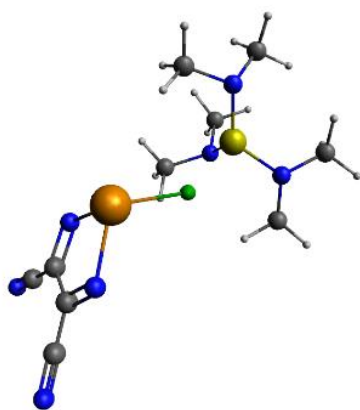


Figure 5 : Structure cristalline de $[(\text{Me}_2\text{N})_3\text{S}]^+[\text{69.F}]^-$

2.1.3. Interaction π -anion

Les interactions π -anion ont été découvertes en 1987 par Hiraoka (Hiraoka et al. 2002) entre un anion fluorure et une molécule d'hexafluorobenzène en phase gazeuse. Il s'agit d'une interaction de type Van der Waals entre un anion et un cycle aromatique électrodéficient, d'une énergie comprise entre 20 et 70 kJ/mol.

Ces liaisons sont influencées par de nombreux paramètres tels que la présence de charges positives (dans le milieu, sur l'aromatique ou sous la forme de cations venant se coordonner par une liaison de type π -cation).

La présence de plusieurs noyaux aromatiques permet également d'ajouter leurs interactions π -anion propres ou de les renforcer par " π -stacking". La force des interactions π -anion a pu être corrélée avec le moment quadripolaire des cycles aromatiques. Une première étape du développement d'un récepteur est donc un calcul quantique au niveau Density Functional Theory (DFT), permettant ainsi de prévoir la force de ces interactions et évaluer les motifs répondant aux critères des récepteurs.

On s'intéresse ici plus particulièrement au motif tétrazine donneur de liaisons π -anion. L'équipe de Savastano (Savastano et al. 2016) a synthétisé des ligands à base de tétrazine. Elle a ainsi pu obtenir la structure cristalline d'un complexe stable en milieu aqueux. Il s'agit d'une propriété intéressante, ouvrant la possibilité de développer des molécules liant des ions en milieu biologique. La tétrazine possède également des propriétés photophysiques (Gong et al. 2009) qui peuvent être mises à profit pour développer des sondes moléculaires pour l'étude des canalopathies.

2.2. Mode d'étude des liaisons aux ions

2.2.1. Photophysique

2.2.1.1. Absorption

En 1949, Benesi et Hildebrand ont développé une méthode visant à expliquer les changements de couleurs observés pour une solution de solvants aromatiques contenant de l'iode. Ils attribuèrent ce changement à la formation d'un complexe entre l'iode et le solvant (Benesi et Hildebrand 1949). Cette méthode est devenue une méthode de référence. Elle mena au développement de plusieurs techniques d'analyse des équilibres de complexation (cf. *paragraphe 3) b.*).

Lors d'une étude d'absorbance en UV/Visible, l'absorbance A de la solution est égale à la somme des absorbances A^L , A^H , A^{LH} des différentes espèces présentes (l'hôte H , le Ligand L et le complexe LH) :

$$(1) : A = A^{LH} + A^L + A^H$$

En considérant que la concentration initiale en ligand $[L_0]$ est bien supérieure à celle en hôte $[H_0]$, on peut écrire :

$$(2) : A = A^{LH} + A^L$$

De manière expérimentale, il est possible de collecter l'absorbance avant (A_0) et après (A) la formation du complexe. On observera alors une variation de l'absorbance ΔA de la solution pouvant être exprimée ainsi :

$$(3) : \Delta A = A - A_0$$

En utilisant la loi de Beer-Lambert, l'équation (3) peut être réécrite pour exprimer cette variation en fonction des coefficients d'absorption (ϵ), des concentrations de chaque composé et de la longueur de la cuve (b) :

$$(4) : \Delta A = \epsilon^{HL}[HL]b + \epsilon^L[L]b - \epsilon^L[L]_0b$$

A un instant t , la concentration en ligand libre $[L]$ est exprimée comme la différence $[L] = [L]_0 - [HL]$. Nous pouvons également définir la variation $\Delta\epsilon$ du coefficient d'extinction molaire entre le complexe et le ligand et réécrire l'équation ainsi :

$$(5) : \Delta A = \Delta\epsilon[HL]b$$

La constante d'association est définie par l'équation :

$$(6) : K_a = \frac{[HL]}{[H][L]}$$

D'autre part, à tout instant t d'un dosage, il est possible de définir la concentration en hôte libre [H] comme la différence entre la concentration initiale en hôte $[H]_0$ et celle en complexe [HL] :

$$(7) : [H] = [H]_0 - [HL]$$

Il devient alors possible d'exprimer la concentration en complexe [HL] mesurée comme une fonction de la concentration initiale en complexe $[H]_0$ connue, de la concentration en ligand [L] et la constante d'association K_a .

$$(8) : K_a = \frac{[HL]}{([H]_0 - [HL])[L]}$$

$$(9) : K_a[L]([H]_0 - [HL]) = [HL]$$

$$(10) : K_a[L][H]_0 - K_a[L][HL] = [HL]$$

$$(11) : K_a[L][H]_0 = [HL] + K_a[L][HL]$$

$$(12) : K_a[L][H]_0 = [HL](1 + K_a[L])$$

$$(13) : [HL] = \frac{[H]_0 K_a [L]}{1 + K_a [L]}$$

L'équation (5) peut alors être réécrite ainsi :

$$(14) : \Delta A = b \Delta \varepsilon \frac{[H]_0 K_a [L]}{1 + K_a [L]}$$

$$(15) \Delta A = \frac{b \Delta \varepsilon [H]_0 K_a [L]}{1 + K_a [L]}$$

$$(16) \frac{1}{\Delta A} = \frac{1 + K_a [L]}{b \Delta \varepsilon [H]_0 K_a [L]}$$

$$(17) \frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{b \Delta \varepsilon [H]_0 K_a [L]} + \frac{K_a [L]}{b \Delta \varepsilon [H]_0 K_a [L]}$$

$$(18) \frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{b \Delta \varepsilon [H]_0 K_a [L]} + \frac{1}{b \Delta \varepsilon [H]_0}$$

En faisant varier la concentration en ligand au cours de l'expérience et en mesurant la différence d'absorbance à chaque point, il devient possible d'estimer la constante d'association K_a comme la pente de la courbe $\frac{1}{\Delta A} = f\left(\frac{1}{[L]}\right)$.

Cependant, cette méthode présente des limites. En effet, les différences de coefficients d'absorption peuvent varier pour des échelles de concentrations différentes. De plus, si l'hypothèse $[L_0] \gg [H_0]$ est fautive, ces calculs deviennent invalides. Ainsi, la courbe ne sera plus linéaire et prendra la forme d'un nuage de points. Enfin, la présence de plusieurs types de complexes dans le milieu n'autorise pas ces calculs. Par conséquent, leur utilisation se limite à l'étude des complexes en proportion ligand/ion de type 1 :1. Pour surmonter ces limites, un algorithme de minimisation de la différence quadratique est

employé. Ce dernier nécessite de donner une estimation initiale pour que l'algorithme puisse ensuite calculer la constante.

2.2.1.2. Fluorescence

La méthode de Benesi-Hildebrand a pu être étendue à d'autres techniques d'analyse des équilibres de complexation. Les équipes de Mukhopadhyay (Mukhopadhyay et al. 2005) et Frontera (Frontera et al. 2006) ont ainsi appliqué cette méthodologie à des calculs de constantes d'association en fluorescence.

En effet, pour un complexe ligand/ion de type 1 :1, il devient possible de relier l'intensité de fluorescence à la concentration en ligand et la constante d'association ligand-ion selon l'équation suivante proposée par Mukhopadhyay :

$$(19) \quad \frac{1}{I - I_0} = \frac{1}{I_l - I_0} + \frac{1}{K_a[H](I_l - I_0)}$$

où I_0 est l'intensité initiale de fluorescence de l'hôte, I_l l'intensité du complexe et K la constante d'association. Les relations mesurées n'étant en pratique pas linéaires, il est également nécessaire de réaliser une minimisation de la somme des différences quadratiques pour obtenir les constantes d'association.

2.2.1.3. Rendement Quantique

Le rendement quantique (Brouwer 2011) est une propriété importante des espèces photoluminescentes. Sa mesure est une étape importante de la caractérisation de tels composés. Il s'agit du rapport du nombre de photons émis par une espèce chimique sur le nombre de photons absorbés. Cependant, la mesure directe de cette valeur nécessite l'accès à des appareillages sensibles et extrêmement coûteux.

En pratique, le rendement quantique sera mesuré à l'aide des spectres d'émission et d'absorption du composé, et comparé à une référence de rendement quantique connu. Le rendement quantique sera alors obtenu à l'aide la relation suivante :

$$(20) \quad \Phi_f^i = \frac{F^i f_s n_i^2}{F^s f_i n_s^2} \Phi_f^s$$

Ici, Φ_f^i et Φ_f^s représentent les rendements quantiques respectifs de l'échantillon et du standard de référence. F^i et F^s sont les intégrations des aires sous la courbe respective de l'échantillon et au standard, exprimées en photons issus des spectres de fluorescence. f_i et f_s sont les facteurs d'absorption de l'échantillon et de la référence, calculés selon la formule $f_x = 1 - 10^{-A_x}$, où A_x est l'absorbance de l'espèce x . Enfin, n_i et n_s correspondent aux indices de réfraction, respectifs de l'échantillon et du standard.

2.2.1.4. Déclins de fluorescence

Un fluorophore à un état initial singulet S_0 , est excité par un photon, pour atteindre un état excité singulet S_1 . Pour revenir à l'état S_0 , plusieurs chemins de désexcitation sont possibles (Noomnarm et Clegg 2009). Il y a deux types de désexcitation : les désexcitations radiatives et non radiatives. On s'intéresse ici uniquement aux désexcitations radiatives de type fluorescence prompt. Le mécanisme consiste en l'émission d'un photon de fluorescence permettant de revenir à l'état S_0 (Figure 6). Ici, le temps de vie de l'état excité singulet sera noté τ_f exprimé en seconde.

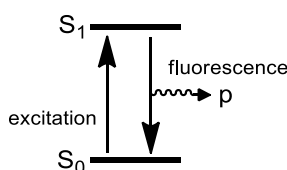


Figure 6 : Principe de la fluorescence prompte

Lors de l'étude de la complexation entre un ligand fluorescent et une espèce piégée, les temps de désexcitation peuvent être affectés (Albani 2004). Il est possible que le complexe formé ne soit pas fluorescent. Dès lors, après irradiation, aucun photon ne sera émis. On parlera de complexe statique : l'intensité de fluorescence mesurée sera celle du fluorophore libre et diminuera avec l'augmentation de la concentration en complexe.

Le mécanisme d'extinction est également susceptible de faire intervenir un complexe présentant une fluorescence résiduelle. Dans ce cas, l'intensité de fluorescence mesurée va diminuer. Les études de déclin de fluorescence nous permettent de ce fait, d'observer l'apparition d'un deuxième temps de vie plus court, dont le poids relatif augmentera avec la concentration en complexe formé. On pourra ainsi obtenir des informations sur le mécanisme de formation du complexe et sa fluorescence.

2.2.2. RMN

En 2004, Tardajos et Gonzalez-Gaitano ont exposé une méthode d'étude des équilibres chimiques supramoléculaires par résonance magnétique nucléaire (RMN) en s'appuyant sur un modèle d'interaction cyclodextrine-anion. En effet, la complexation conduit à l'apparition d'un deuxième environnement chimique non équivalent à celui du récepteur libre. Or, l'utilisation de la RMN repose sur la modification des déplacements chimiques observés lorsqu'un noyau est exposé à deux environnements magnétiques non équivalents. La fréquence mesurée est alors une moyenne pondérée par le poids de chaque espèce impliquée dans l'équilibre. Le déplacement chimique global δ peut ainsi être exprimé comme la somme des contributions du déplacement chimique du complexe δ_{cx} et du

récepteur seul δ_i , pondéré par des coefficients fonction de leur concentrations respectives χ_i et χ_{cx} :

$$(19) : \delta = \chi_i \delta_i + \chi_{cx} \delta_{cx}$$

Si l'on maintient la concentration en hôte $[H]_0$ constante, l'équation devient alors :

$$(21) : \delta = \left(1 - \frac{[L:H]}{[H]_0}\right) \delta_H + \frac{[L:H]}{[H]_0} \delta_{cx} = \delta_H + \frac{[L:H]}{[H]_0} (\delta_{cx} - \delta_H)$$

Ici $[L:H]$ est la concentration en complexe hôte-ligand. Il devient possible de définir $\Delta\delta$ comme la différence de déplacements chimiques mesurée pour le récepteur seul et mesurée pour chaque concentration du complexe.

On définit également $\Delta\delta_0$ comme la différence de déplacements chimiques limite, observée lorsque l'ensemble des récepteurs seront complexés. L'équation devient alors :

$$(15) : \Delta\delta = \frac{[L:H]}{[H]_0} \Delta\delta_0$$

La concentration en complexe $[L:H]$ est donnée par la loi d'action de masse. Elle nous permet de définir K_a la constante d'association comme :

$$(22) : K_a = \frac{[L:H]}{[L][H]} = \frac{[L:H]}{([L]_0 - [L:H])([H]_0 - [L:H])}$$

Cette équation peut être développée pour exprimer $[L:H]$ comme une fonction de la constante d'association K_a et de la fraction molaire R définie comme $R = [L]_0/[H]_0$ où n est le nombre de spectres mesurés. On obtient alors l'équation quadratique suivante :

$$(23) : [L:H] = \frac{1}{2} [H]_0 \left(1 + R + \frac{1}{[H]_0 K_a} \pm \sqrt{\left(1 + R + \frac{1}{[H]_0 K_a}\right)^2 - 4R} \right)$$

Pour une série de fractions molaires R_n , si l'on introduit les résultats obtenus dans la moyenne pondérée initiale, il devient possible d'obtenir un panel de déplacements chimiques calculés notés δ_{cal} . Pour déduire la constante d'association, il faut alors trouver un vecteur de coordonnées $(K, \Delta\delta_{lim})$ qui minimise la somme des différences quadratiques.

Un algorithme permet alors de trouver le minimum de la fonction à plusieurs variables définies par l'équation (5). Une estimation initiale est nécessaire pour permettre à l'algorithme de calculer le minimum. Cette méthode utilisant la RMN 1H sera ici appliquée à l'étude des liaisons hydrogène avec les anions.

3. Conclusion de l'étude bibliographique

Les canalopathies sont un groupe hétérogène de pathologies. Celles-ci touchent un grand nombre de fonctions physiologiques majeures et peuvent avoir une origine génétique comme auto-immune. Le rôle des canaux ioniques dans l'ensemble de l'organisme les conduits à participer à un grand nombre de phénomènes physiologiques et leur modification entraîne de nombreuses pathologies. Ces maladies n'ont que peu de traitement curatif, et le plus souvent les stratégies thérapeutiques reposent sur une prise en charge symptomatique et des connaissances empiriques.

Le développement de nouveaux modèles et d'approches thérapeutiques innovantes est nécessaire pour améliorer la prise en charge de ces troubles. Parmi ces approches, l'utilisation de transporteurs synthétiques d'ion présente des avantages non négligeables mais nécessite une coopération pluridisciplinaire pour réaliser des avancées significatives. Le développement de telles molécules nécessite de caractériser les interactions faibles permettant la complexation, pour s'assurer d'une liaison efficace mais réversible. La combinaison des interactions est une piste intéressante pour obtenir une sélectivité du transport ionique ciblé, limitant ainsi les perturbations dues au transport d'autres ions.

Partie II : Travaux Expérimentaux

1. Design du récepteur

1.1. Design Général du Récepteur

L'objectif de ce stage est de synthétiser puis d'étudier de nouveaux récepteurs d'anions. Ceux-ci reposent sur la combinaison inédite de deux interactions faibles : la liaison hydrogène et l'interaction π -anion, reliées par un bras espaceur (Figure 7). Ces trois éléments permettent d'envisager de multiples variations modulant les propriétés du récepteur.

Les deux interactions sont intéressantes du point de vue analytique car leurs caractérisations font appel à des techniques analytiques différentes. Ainsi, la complexation sera étudiée par titrage en RMN du proton (et dans certains cas du fluor) ainsi que par des études photophysiques (absorption, émission et temps de vie).

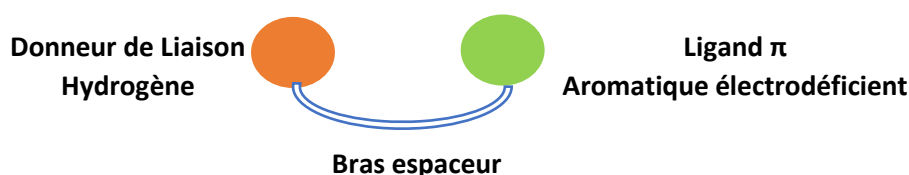
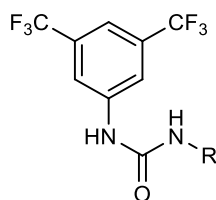


Figure 7 : Design Général du Récepteur

1.2. Choix des donneurs de liaisons hydrogène

Le choix du donneur de liaisons hydrogène s'est porté sur une urée, très couramment employée comme donneur de liaisons hydrogène. Afin de renforcer le pouvoir donneur de liaison hydrogène et ainsi ses capacités de piégeage d'anions, l'urée est substituée par le 3,5-bis(trifluorométhyl) exerçant un effet électroattracteur (Figure 8).

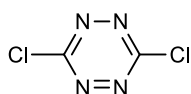


1

Figure 8 : Motif 1-(3,5-bis(trifluorométhyl)phényl)urée électroattracteur

1.3. Choix du ligand π

Les interactions π -anion nécessitent l'utilisation d'un groupement aromatique électrodéficient. Pour augmenter la contribution électrostatique du noyau aromatique dans l'interaction π -anion, il est nécessaire de choisir un noyau aromatique de moment quadripolaire positif, ce qui est le cas des azines. D'autre part, l'objectif du projet est de pouvoir évaluer la complexation par des techniques photophysiques, comme la fluorescence et le déclin de fluorescence. Il était donc nécessaire de choisir un noyau possédant des propriétés compatibles avec ce type d'analyses. Notre choix s'est porté sur la dichlorotétrazine **2** (Figure 9). La présence des atomes de chlore permet d'envisager la fonctionnalisation par Substitution Nucléophile Aromatique (S_NAr).



2

Figure 9 : Structure de la dichlorotétrazine.

1.4. Modulations du bras espaceur

Pour moduler la sélectivité de notre récepteur, il peut être intéressant de modifier un bras espaceur possédant à chaque extrémité une fonction alcool et une fonction amine, reliant le donneur de liaisons hydrogène à la tétrazine. Ainsi, il est possible d'augmenter l'espacement entre les deux entités liées de notre molécule de moduler la flexibilité du récepteur.

Une première modulation de l'espacement est susceptible de faire varier la taille de la région complexée à l'anion et ainsi de créer des récepteurs capables de lier des anions de tailles et de formes diversifiées. Cette modification pourra être réalisée par l'emploi de chaînes alkyles incorporant plusieurs atomes de carbone. Les chaînes alkyles permettent d'obtenir des récepteurs flexibles.

Une seconde modulation permet de rigidifier l'édifice en employant un noyau aromatique à la place de l'amino-alcool aliphatique. Notre choix s'est porté sur le motif ortho-disubstitué de type aminophénol.

Une dernière variation possible consiste à introduire un bras sur chaque position substituable de la dichlorotétrazine. En effet, une double substitution permettra non seulement d'augmenter le nombre de donneurs de liaisons hydrogènes, mais également la taille et la forme de la cavité de complexation.

La Figure 10 rassemble les cibles de cette étude :

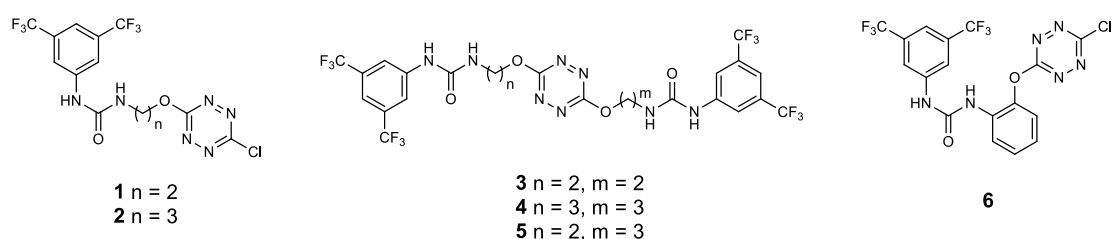


Figure 10 : Structures des récepteurs synthétisés au cours du stage

2. Modélisation moléculaire

Une modélisation moléculaire avec des niveaux de calculs DFT des différents récepteurs seuls et de leurs interactions avec les anions a été réalisée à l'aide du logiciel Gaussian 09® (Frisch. M. J. et al. 2016). L'ensemble des résultats obtenus est résumé dans le Tableau 9 :

Composé	Géométrie Ligand Seul	Géométrie complexe Cl ⁻	Géométrie Complexe Br ⁻	Superposition
1	 E = -2039,041 Ha	 E = -2499,386 Ha	 E = -4610,925 Ha	 RMSD = 0,233 Å
a2	 E = -2078,362 Ha E = -2078,359 Ha	 E = - 2538,702 Ha	 E = - 4650,192 Ha	 RMSD = 1,459 Å

Tableau 9 : Résultats d'optimisations géométriques au niveau B3LYP 6-31G + (d,p) et énergies totales des complexes formés

La géométrie adoptée par les deux complexes du composé **1** en présence d'un ion bromure ou d'un ion chlorure sont similaires (*Tableau 9*). Une superposition des deux complexes nous permet d'obtenir une déviation quadratique moyenne des positions atomiques (RSMD) de 0.233Å. Les deux complexes adoptent donc des géométries très similaires et quasiment superposables. Les valeurs des énergies totales de ces complexes sont cohérentes avec un mécanisme de complexation. En effet, il y a une diminution de l'énergie pour les formes complexées par rapport à celle des formes libres.

Pour le composé **2**, une augmentation de la longueur de la chaîne carbonée laisse supposer l'existence d'un équilibre conformationnel entre une forme dépliée et une forme repliée (*Tableau 9*). La différence d'énergie entre les deux conformations de la molécule est très faible (de l'ordre 10^{-2} Hartree). Par conséquent, le passage d'une conformation à une autre est aisé. Un équilibre à proportions égales entre les deux conformères peut ainsi être anticipé.

L'optimisation en présence d'ions chlorure et bromure conduit à deux géométries relativement différentes. Ainsi, en présence d'un ion chlorure, l'urée se place parallèlement à la tétrazine. L'ion chlorure se coordonne aux deux protons de l'urée et est en position centrale au-dessus de la tétrazine.

Dans le cas de l'ion bromure plus volumineux, la flexibilité du bras permet la formation d'une pince autour de l'anion. Ainsi, on observe que la fonction urée prend une position quasiment perpendiculaire au plan de la tétrazine, tout en conservant les liaisons hydrogène et l'interaction π -anion avec la tétrazine.

La superposition des géométries indique une variation importante de géométrie entre les deux complexes (RMSD de 1.459Å). Les énergies totales des complexes sont cohérentes avec une complexation, comme pour le composé **1**.

La réalisation de calculs similaires pour les composés **3**, **4** et **5** est en cours pour vérifier l'influence théorique des modulations de la structure sur la complexation des anions. D'autre part, des calculs sont également en cours pour tester les autres ions halogénure (F⁻, I⁻) ainsi que d'autres géométries d'anions (linéaire SCN⁻, trigonale plan NO₃⁻, tétraédrique HSO₄⁻, octaédrique PF₆⁻), afin de déterminer s'il existe une sélectivité accrue pour certaines géométries d'ions.

3. Synthèse des récepteurs

3.1. Stratégie générale de synthèse

Nous avons cherché à employer une stratégie de synthèse (*Figure 11*) simple en deux étapes pour accéder à nos récepteurs. Celle-ci doit être efficace et autoriser une modulation facile des différents constituants de nos récepteurs.

La première étape de notre synthèse repose sur la condensation de la fonction amine libre du bras espaceur choisi sur la fonction isocyanate du 1-isocyanato-3,5-bis(trifluorométhyl)benzène **7**. Dans la seconde étape, une ou deux substitutions nucléophiles aromatiques de la dichlorotétrazine sont réalisées selon le récepteur désiré.

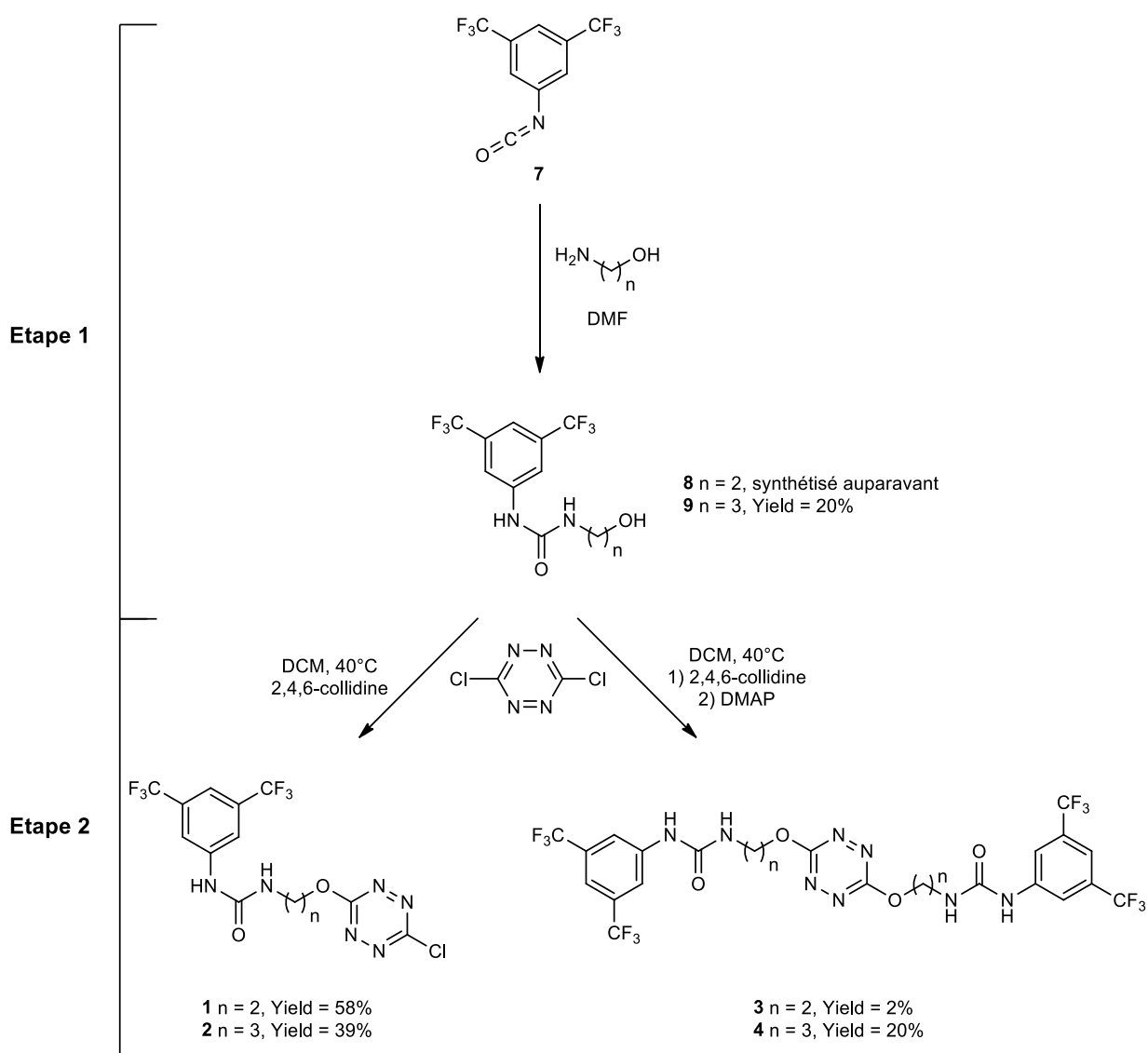


Figure 11 : Stratégie générale de synthèse des récepteurs

3.2. Synthèse des récepteurs alkyles 1 et 2 :

La synthèse du composé **1** est réalisée à partir du précurseur **8** préalablement préparé au laboratoire. Une substitution nucléophile aromatique de la dichlorotétrazine a été réalisée, en présence de 2,4,6-collidine dans le DCM. Une purification par chromatographie a permis d'isoler le produit avec 58% de rendement, caractérisé par spectroscopie RMN (Figure 12) et spectrométrie de masse.

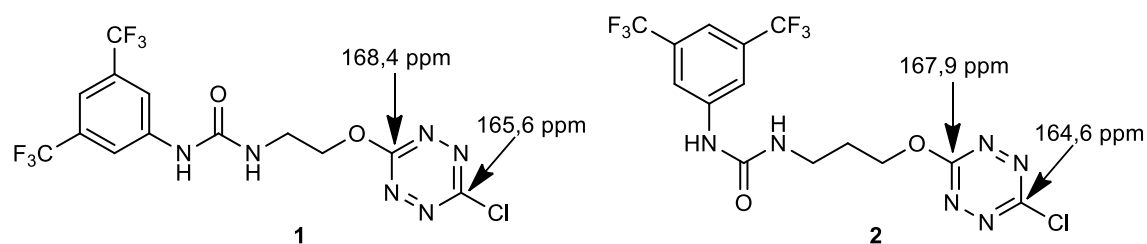


Figure 12 : Attribution des signaux RMN ¹³C caractéristiques de la tétrazine sur le composé **1** et **2**

La synthèse du composé **2** a été réalisée en deux étapes. Tout d'abord, une condensation du 3-aminopropanol sur le 1-isocyanato-3,5-bis(trifluorométhyl)benzène est effectuée dans le DMF à température ambiante. Une purification par simple précipitation dans le DCM permet d'obtenir le précurseur **9** avec un rendement de 20%.

La seconde étape de substitution nucléophile aromatique a été réalisée en suivant le mode opératoire employé pour **1**. Cependant, le milieu réactionnel a, cette fois, été chauffé à 40°C. Le composé **2** a été purifié par chromatographie avec un rendement initial de 23%. Une optimisation a été effectuée en ajoutant au milieu réactionnel du tamis moléculaire 4 Å, afin d'éliminer les traces résiduelles d'eau. Dans ces conditions, **2** est obtenu après purification avec un rendement de 39%, caractérisé par spectroscopie RMN (Figure 12) et spectrométrie de masse.

3.3. Synthèse des récepteurs symétriques alkyles 3 et 4 :

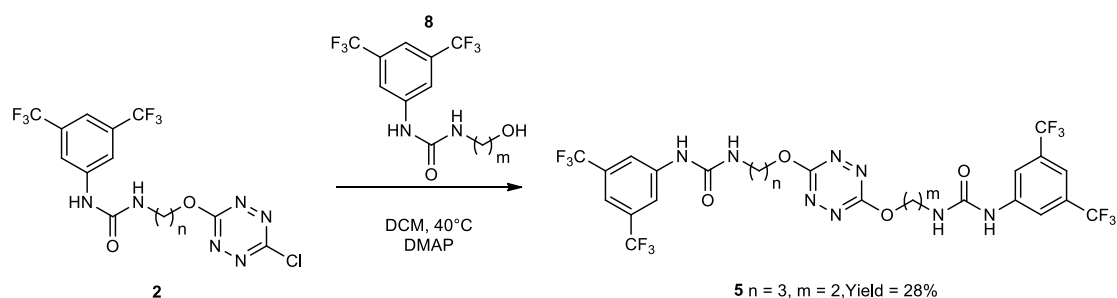
Le récepteur **3** est réalisé à partir du précurseur **8** préalablement préparé au laboratoire. Deux substitutions nucléophiles aromatiques successives ont été réalisées selon un processus monotope, la première en présence de 2,4,6-collidine et la seconde par ajout de DMAP au milieu réactionnel. Après purification par chromatographie, le produit a été isolé avec un rendement de 2%. La présence du produit **3** a été confirmée par RMN.

Le composé **4** a été préparé à partir du précurseur **9** selon le mode opératoire appliqué à la synthèse de **3**. Cette fois, en raison des faibles rendements observés lors de la préparation de **3**, la température a été diminuée à 30°C pour limiter la dégradation potentielle de la tétrazine. Après purification par chromatographie flash sur gel de silice, la

structure du composé **4** a été confirmée par RMN et spectrométrie de masse. La distinction entre monosubstitution et disubstitution étant complexe en RMN, c'est la spectroscopie de masse par l'observation de l'ion $[M+H]^+$, de rapport m/z 739,1651 qui a permis de confirmer la présence du produit. Le produit a été obtenu avec un rendement de 20%.

3.4. Synthèse du récepteur asymétrique alkyle **5** :

Le composé **5** a été synthétisé à partir du composé **2** et du précurseur **8** selon la réaction décrite ci-dessous (*Figure 13*) :

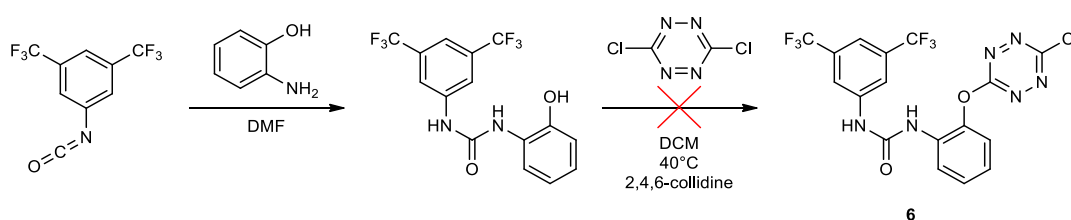


*Figure 13 : Synthèse du composé **10***

La réaction de S_NAr de l'urée **8** sur la tétrazine **2** a été réalisée dans le DCM. Après purification par chromatographie, le produit a été isolé avec un rendement de 28%.

3.5. Synthèse du récepteur aromatique **6** :

La voie de synthèse de **6** en deux étapes (*Figure 14*), telle que précédemment utilisée sur les chaînes aliphatiques, avait déjà été testée. Dans ce cas les réactifs ont été retrouvés dans le milieu réactionnel lors de la seconde étape (Plais soutenance prévu en).



*Figure 14 : Synthèse initialement proposée pour le composé **6**.*

L'hypothèse avancée pour expliquer cette absence de réactivité pourrait être la délocalisation de la charge de l'alcoolate déprotoné (*Figure 15*) ou la complexation intramoléculaire de l'alcoolate par la fonction urée.

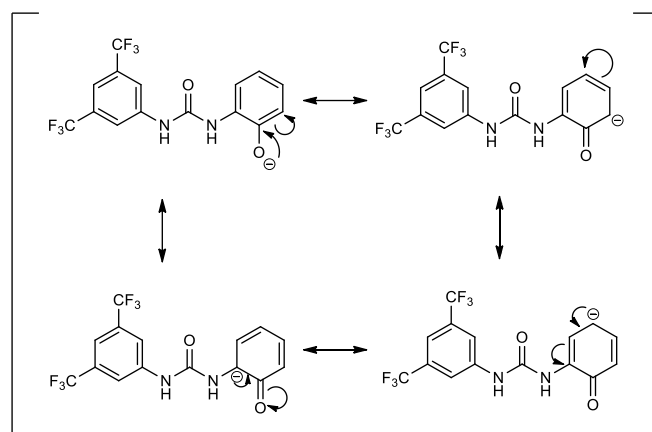


Figure 15 : Formes mésomères limites de l'alcoolate

Une délocalisation trop importante diminue la disponibilité de la charge négative pour réaliser l'attaque nucléophile. Ici, les électrons font partie d'un système totalement conjugué. La présence d'une urée électroattractrice en position ortho de l'hydroxyle, désactive alors la fonction alcool.

L'inversion de la séquence (Figure 16) a été étudiée précédemment par l'équipe d'accueil. L'objectif était de réaliser la substitution nucléophile aromatique par l'ortho-aminophénol sur la dichlorotétrazine, puis de réaliser la condensation de la tétrazine sur le 1-isocyanato-3,5-bis(trifluorométhyl)benzène pour donner le composé **6** attendu.

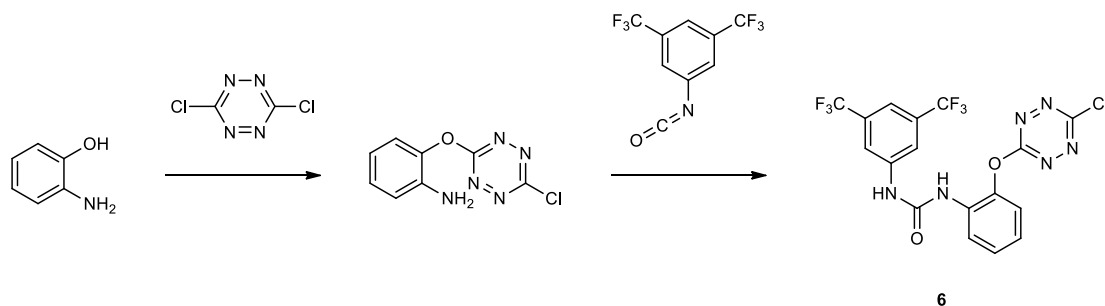


Figure 16 : Deuxième synthèse proposée pour le composé **6**

Au cours de la première étape, il a été observé que la fonction amine de l'ortho-aminophénol était plus réactive que la fonction alcool dans la réaction de S_NAr (Figure 17). Cela rend impossible la formation de l'urée à la seconde étape.

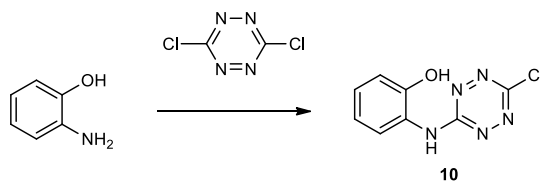


Figure 17 : Réaction observée en pratique.

L'utilisation de l'ortho-aminoaniline à la place de l'ortho-aminophénol semble être une alternative intéressante, pour contourner les problèmes de chimiosélectivité. Cette option n'a cependant pas été choisie du fait des faibles rendements quantiques reportés dans la littérature pour les tétrazines substituées par des atomes d'azote.^[19]

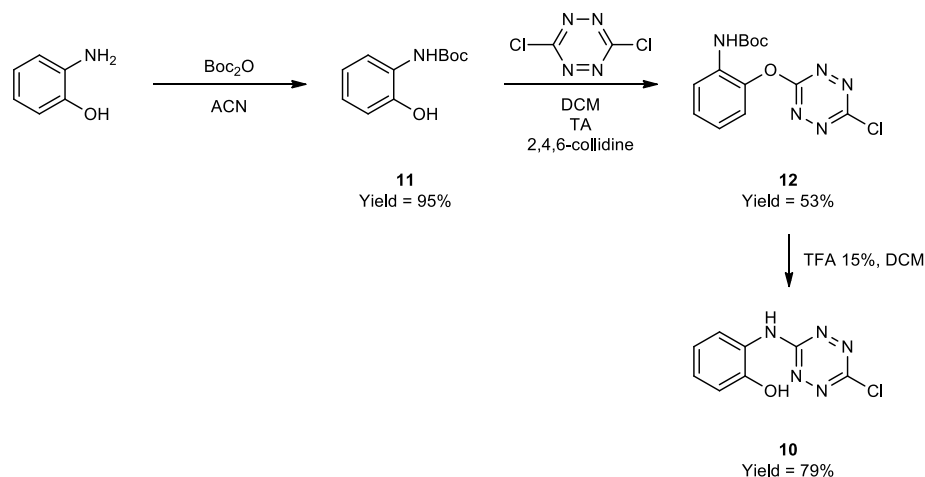


Figure 18 : Synthèse en stratégie Boc du précurseur du composé **10**

Une approche faisant intervenir une stratégie de protection-déprotection de la fonction amine a alors été mise en place (Figure 18). Nous avons opté pour l'emploi du groupement protecteur Boc compatible avec les fonctions présentes sur la cible.

La protection de l'ortho-aminophénol suivie de la substitution de la dichlorotétrazine a permis d'obtenir le composé **12** avec un rendement global sur deux étapes de 62%. En revanche, l'étape de déprotection en milieu acide (TFA 15%/DCM) s'est avérée plus délicate. En effet, les données RMN du proton ont mis en évidence la présence de deux signaux différents de deux protons mobiles, alors que la fonction amine primaire ne devrait donner qu'un seul signal intégrant pour deux protons.

Une expérience de corrélation hétéronucléaire proton/azote du composé **10** a mis en évidence que seul un des deux protons mobiles était corrélé avec un atome d'azote. Le second appartient donc à la fonction hydroxyle. Il semblerait donc qu'il y ait eu un phénomène de réarrangement induit en milieu acide.

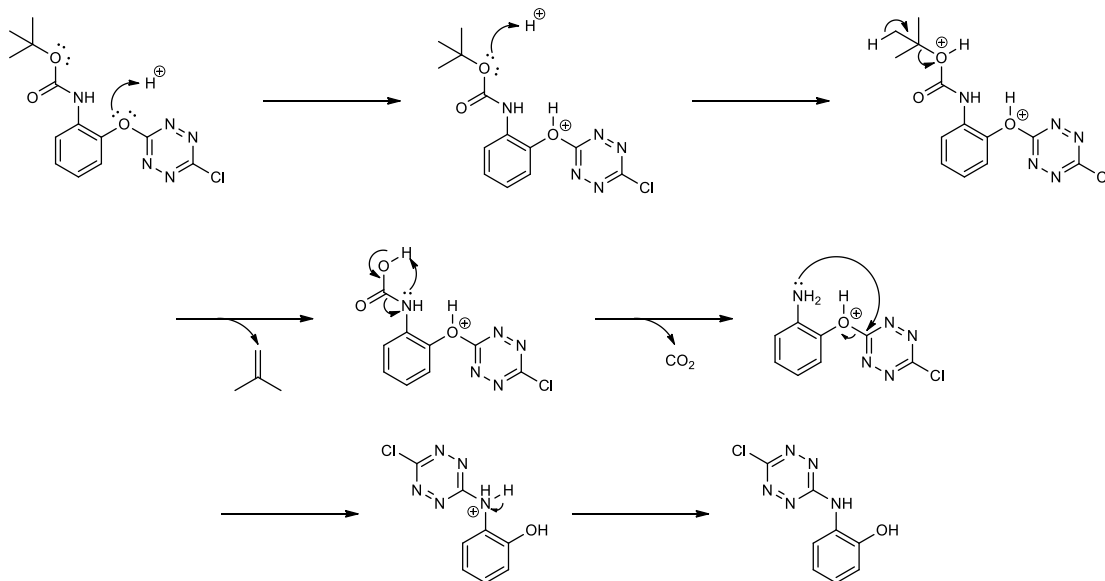


Figure 19 : Mécanisme proposé pour le réarrangement au cours de la déprotection en milieu acide.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé un calcul DFT sur un système constitué de **12** en présence d'un proton libre. Ce dernier a confirmé la tendance du proton à former un oxonium lié à la tétrazine.

Nous avons donc postulé que ce phénomène pouvait induire la migration de la tétrazine selon un mécanisme de substitution nucléophile aromatique intramoléculaire (Figure 19). Nous avons conclu que les conditions acides de déprotection n'étaient pas adaptées à notre cible.

Nous avons alors choisi de faire intervenir une stratégie de protection-déprotection employant des conditions basiques. Notre choix s'est porté sur le groupement protecteur Fmoc. La *Figure 20* ci-dessous décrit la synthèse selon cette stratégie :

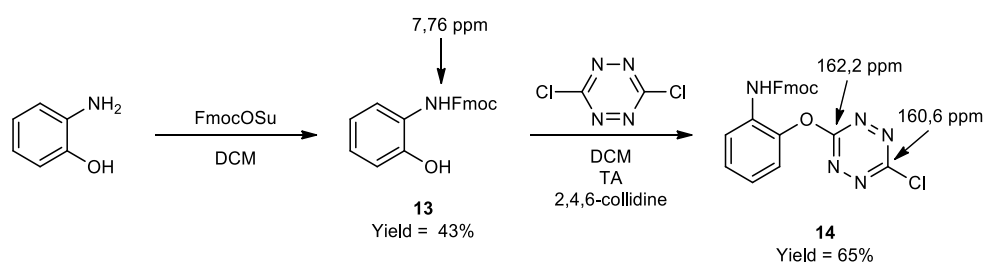


Figure 20 : Synthèse du composé 14 selon une stratégie de protection-déprotection à l'aide d'un groupement Fmoc

L'étape de protection a pu être réalisée dans des conditions classiques. Après purification par chromatographie, le composé **13** a été isolé avec un rendement de 43%. Les données RMN du proton nous ont permis de confirmer la structure du produit, notamment par la présence d'un signal à 7,76 ppm de proton mobile caractéristique de la fonction carbamate substituant un aromatique.

La substitution nucléophile aromatique sur la tétrazine a pu être réalisée à température ambiante. Le produit **14** a été isolé avec un rendement de 65%. La structure a pu être confirmée par RMN du carbone grâce à l'observation des pics des carbones quaternaires de la tétrazine à 162,2 ppm et 160,6 ppm.

Les étapes de déprotection et condensation pour former l'urée n'ont pas pu être réalisées par manque de temps.

4. Dosage par RMN

4.1. Matériel et Méthodes

Les titrages RMN ainsi que l'analyse des données collectées ont été réalisées pour le composé **2** selon la méthode de Tardajos et Gonzalez-Gaitano.^[18] Le récepteur, placé dans l'acétonitrile deutéré, a été testé en présence de sels de fluorure de tétrabutylammonium et de chlorure de tétrabutylammonium.

Durant le titrage, la concentration en récepteur (10^{-3} mol.L⁻¹) a été maintenue constante tout en augmentant progressivement la concentration en sel. Après chaque ajout, des acquisitions d'un spectre proton et éventuellement d'un spectre fluor ont été réalisées.

4.2. Résultats et Discussion

Afin de favoriser la dissociation de la paire d'ions et la probabilité d'interactions parasites (par exemple, π -cation), nous avons utilisé des sels de tétrabutylammonium possédant un contre-ion de grande taille, dissocié en solution.

4.2.1. Titration par Chlorure de Tétrabutylammonium.

Le titrage a été réalisé de 0 à 3,3 équivalents en TBACl. Les spectres sont reportés dans la *Figure 21* ci-dessous :

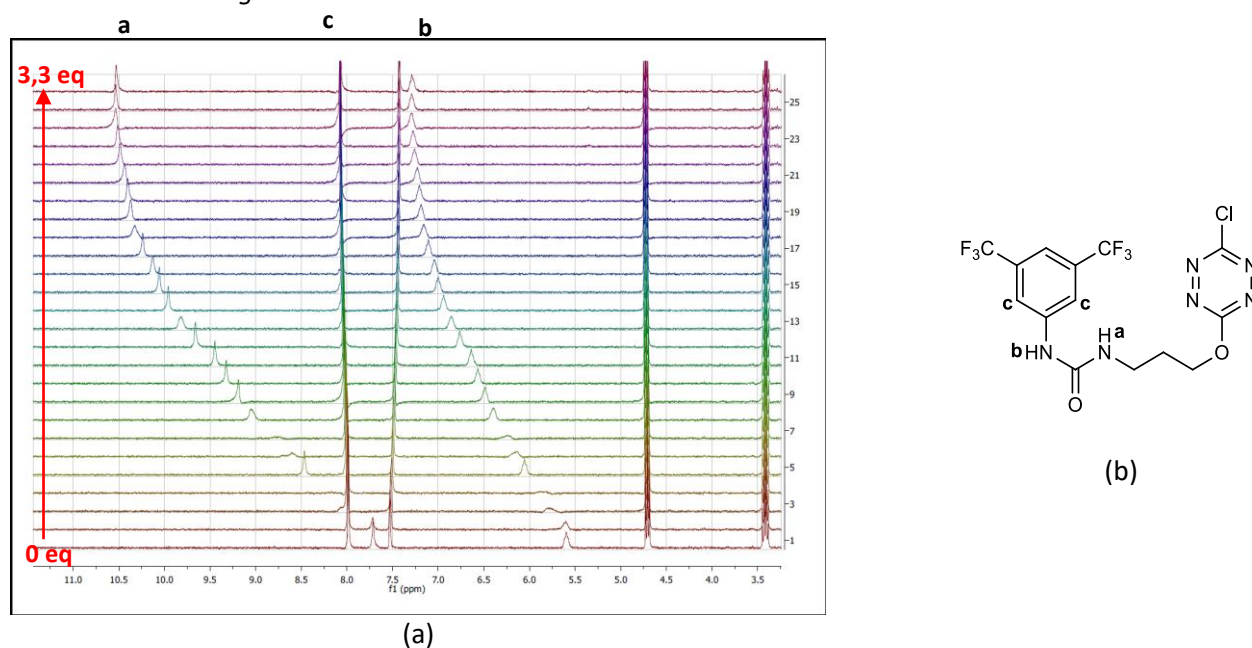
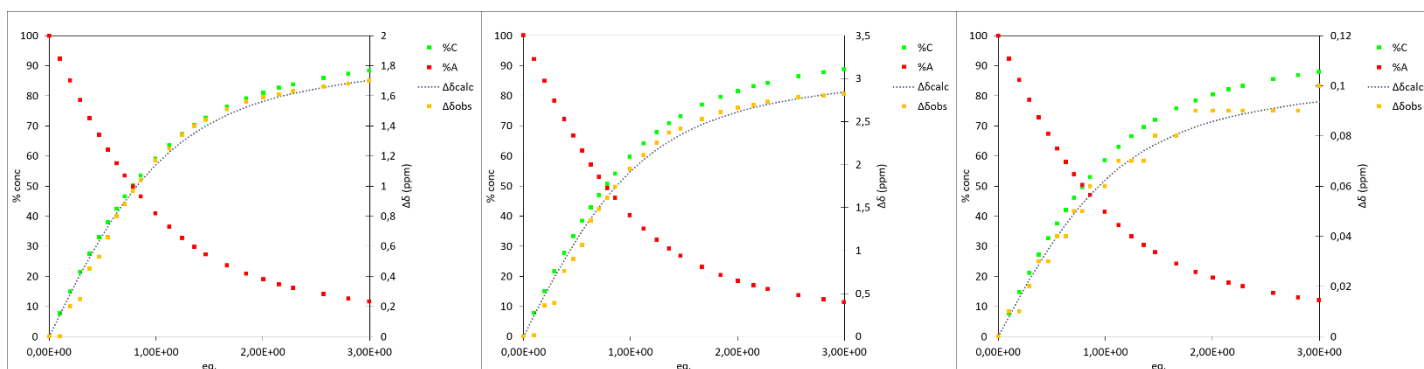


Figure 21 : Spectres RMN ^1H du titrage du composé **2** par TBACl : (a) Spectre RMN ^1H (b) Attribution des protons

Nous pouvons observer une augmentation des valeurs de déplacements chimiques des protons **a**, **b** et **c** lors d'une augmentation progressive de la concentration de 0 à 3,3 équivalents d'anion.

Les données recueillies nous ont permis de tracer l'évolution de la concentration en récepteur libre (a), en récepteur complexé (c), ainsi que la différence de déplacement chimique ($\Delta\delta_{\text{obs}}$) en fonction du nombre d'équivalents de sel ajouté. Nous faisons l'hypothèse d'un modèle récepteur : anion n:n. Un traitement par minimisation de la somme des différences quadratiques (*Figure 22*) nous permet de déterminer des valeurs de la constante d'association avec chacun des deux protons de l'urée et celui du fragment phényl.



(a) (b) (c)

Figure 22 : Fit des données RMN ^1H du titrage par TBACl : (a) proton **a**, (b) proton **b**, et (c) proton **c**

La corrélation avec le modèle n:n semble être cohérente. Les constantes d'association calculées ont pu être comparées à celles du composé **1** déjà testé par notre équipe (Tableau 10) :

Composé	K_a proton a	K_a proton b	K_a proton c
1	9642 M^{-1}	$10\ 135 \text{ M}^{-1}$	3432 M^{-1}
2	1022 M^{-1}	1062 M^{-1}	983 M^{-1}

Tableau 10 : Récapitulatif des Constantes d'Association K_a avec l'ion chlorure

Pour le composé **2**, les valeurs des constantes d'association obtenues sont d'ordre de grandeur comparable. Comparativement au composé **1**, les constantes mesurées sont plus faibles pour le composé **2**, indiquant une complexation des ions chlorures probablement plus faible.

4.2.2. Titrage par Fluorure de Tétrabutylammonium

Le titrage a été réalisé de 0 à 10 équivalents en TBAF. Les spectres RMN ^1H sont reportés dans la Figure 23 ci-dessous :

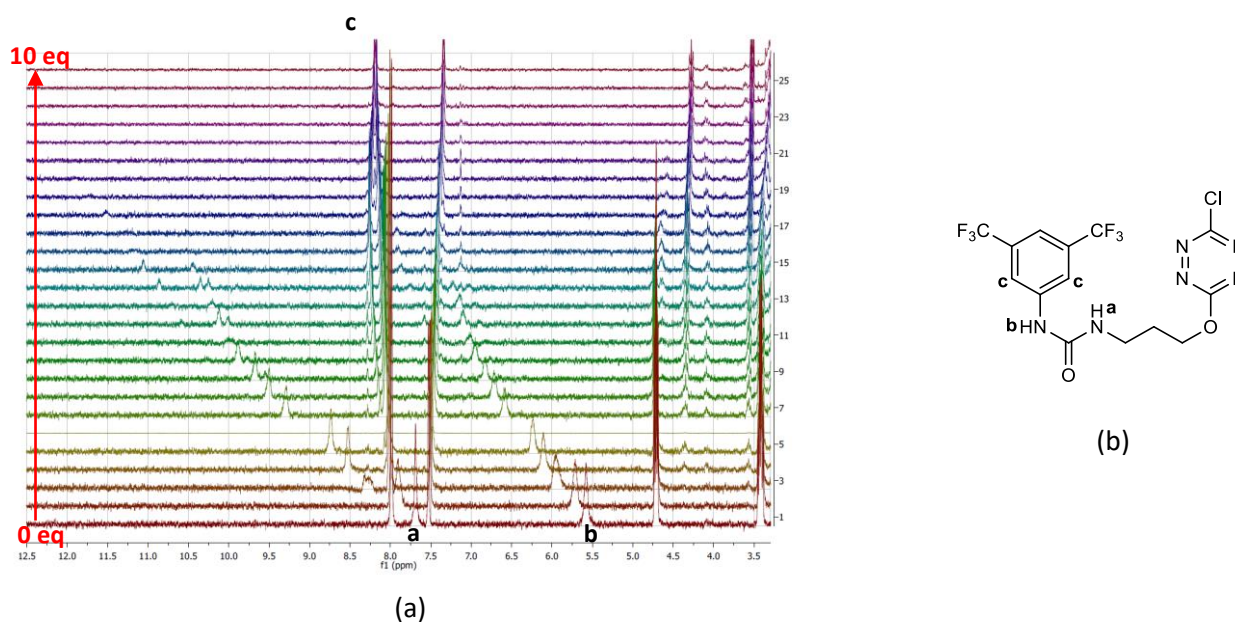


Figure 23 : Spectres RMN ^1H du titrage du composé 2 par TBAF : (a) Spectre RMN ^1H (b) Attribution des protons

De manière similaire, nous pouvons observer une augmentation des valeurs de déplacements chimiques des protons **a**, **b** et **c** lors d'une augmentation progressive de la concentration de 0 à 10 équivalents d'anion.

La déprotonation de l'urée a été postulée comme une des explications à la disparition des signaux des protons mobiles. Les pKa des protons mobiles de l'urée ont été calculés à l'aide de MarvinSketch® (Tableau 11).

Couple Acide-Base	NHCONH/NHCON ⁻	HCl/F ⁻
pKa	13,08	3,7

Tableau 11 : pKa calculés

Le mécanisme semble être donc une complexation de l'anion suivie d'une déprotonation du récepteur favorisée par la proximité de l'anion complexé. Les valeurs de pKa sont compatibles avec une déprotonation, dont nous proposons l'équation à la *Figure 24* :

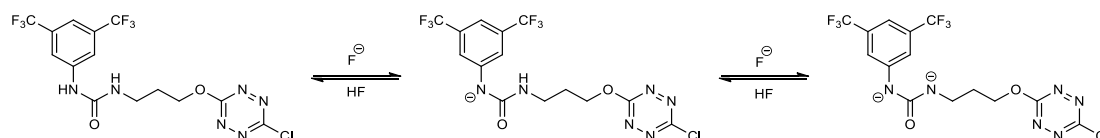


Figure 24 : Equilibre Acido-Basique proposé pour le composé 2

Les données nous ont permis de tracer l'évolution de la concentration en récepteur libre (a), en récepteur complexé (c), ainsi que la différence de déplacement chimique ($\Delta\delta_{\text{obs}}$) en fonction du nombre d'équivalents de sel ajouté. Un traitement par minimisation de la somme des différences quadratiques (*Figure 25*) a été réalisé.

Pour les protons **a** et **b**, le traitement mathématique n'a pas été réalisé sur l'intégralité des données du titrage en raison de la disparition des signaux des protons mobiles de l'urée au-delà de 2 équivalents. Pour le proton **c**, le traitement a été réalisé sur la totalité des points de la gamme. Néanmoins, la faible corrélation du fit calculé avec les valeurs expérimentales laisse sous-entendre que la complexation ne semble pas suivre un modèle n:n.

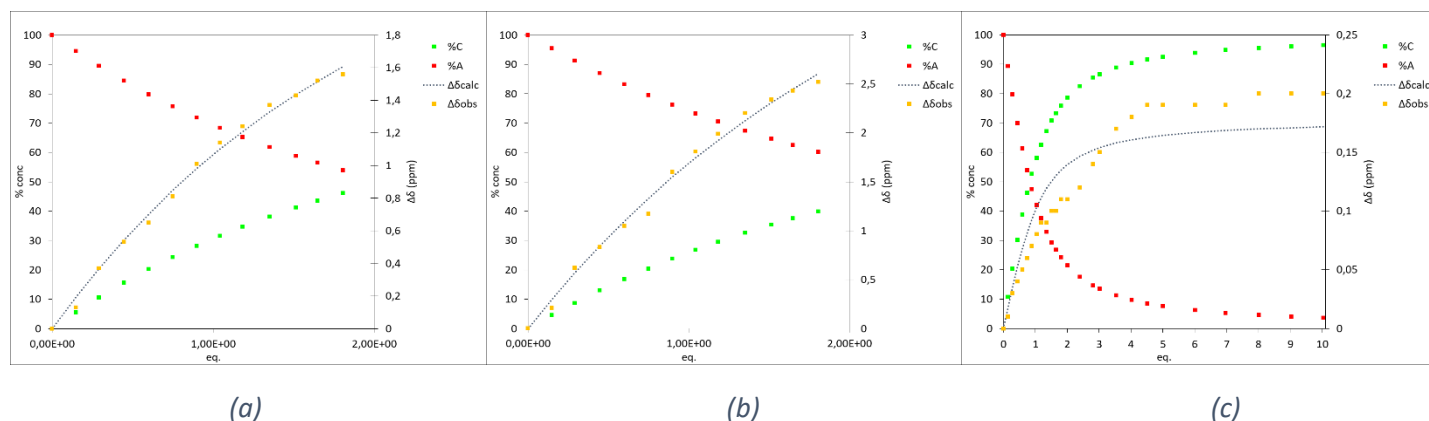


Figure 25 : Fit des données RMN ¹H du titrage par TBAF : (a) proton a, (b) proton b, et (c) proton c

Les constantes d'association ont pu être calculées (*Tableau 12*). Cependant, à cause de la déprotonation le traitement n'est pas réalisé sur le même intervalle de concentrations. Les constantes ne sont pas comparables avec celles calculées en présence d'ions chlorures :

Composé	K _a proton a	K _a proton b	K _a proton c
2	182 M ⁻¹	135 M ⁻¹	855 M ⁻¹

Tableau 12 : Récapitulatif des Constantes d'Association Ka avec l'ion fluorure

Afin d'essayer de caractériser les espèces fluorées formées durant le titrage, un suivi de la complexation par RMN ^{19}F a également été réalisé, en prenant le CFCl_3 comme référence externes, dont les spectres sont reportés dans la *Figure 26* :

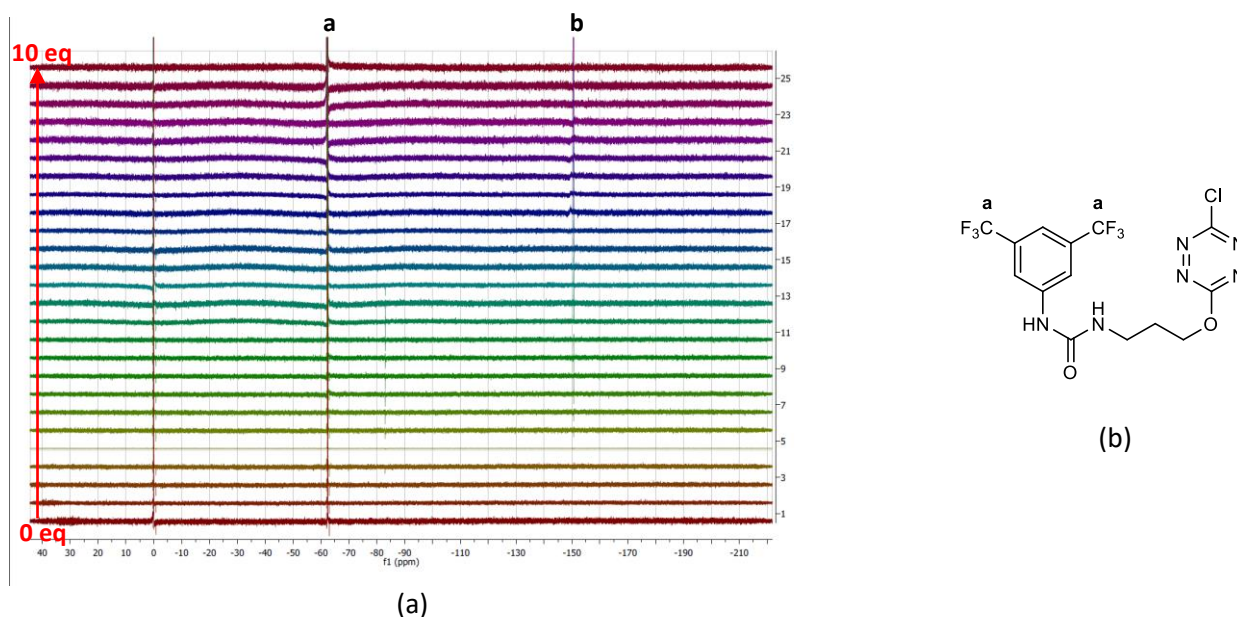


Figure 26 : Spectres RMN ^{19}F du titrage du composé **2** par TBAF : (a) Spectre RMN ^1H (b) Attribution des fluors

Le signal à -63,37 ppm est attribué aux groupements trifluorométhyles du récepteur. A partir de 2 équivalents, on voit apparaître un signal **b** à -151,90 ppm, attribué au sel de TBAF libre.

Un zoom sur la région entre -62,00 et -62,60 ppm (*Figure 27*) nous permet d'observer le déplacement du pic fluor du récepteur libre de 0 à 3,5 équivalents. A partir d'un équivalent, un deuxième signal apparaît à -62.30 ppm. Nous faisons l'hypothèse qu'il s'agit du récepteur monodéprotoné. Au-delà de 3,5 équivalents, on observe la disparition du signal du récepteur libre et l'apparition d'un nouveau signal. Nous faisons l'hypothèse que ce signal correspond au récepteur doublement déprotoné.

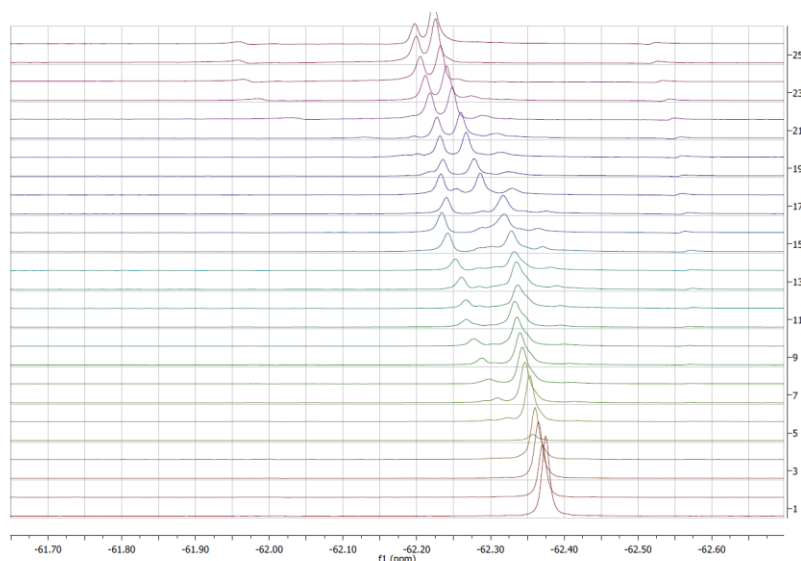


Figure 27: Evolution des signaux RMN ^{19}F dans la région entre $-62,00$ et $-62,60$ ppm du spectre du composé **2**

4.2.3. Comparaison des titrages

Afin de pouvoir comparer les aptitudes à la complexation, les courbes de déplacement chimique en fonction de la concentration en sel, ont été superposées (Figure 28) :

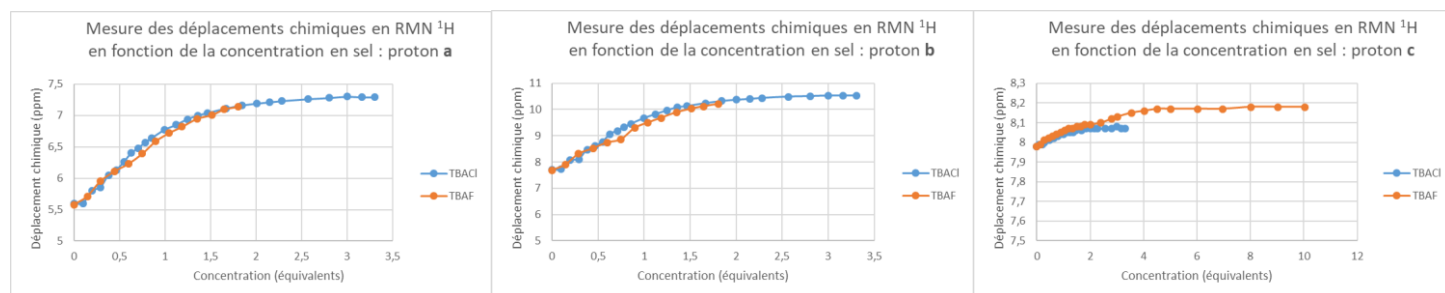


Figure 28 : Comparaison des variations de déplacements chimiques du composé **2** en fonction de l'ion.

Nous pouvons observer que les évolutions des déplacements chimiques au cours des dosages sont superposables pour les protons de l'urée **a** et **b**. L'évolution des déplacements chimiques pour les protons **c** du groupement phényle est similaire jusqu'à deux équivalents. Au-delà, dans le cas des ions chlorures, on semble atteindre un plateau. Dans le cas du dosage par les ions fluorures, on voit une rupture de pente suivie d'une hausse pour atteindre un plateau vers les quatre équivalents, indiquant une saturation du récepteur.

Le mode de complexation des ions fluorures et des ions chlorures semble donc similaire. Cependant, il est impossible de comparer les constantes d'association, en raison de l'existence probable de plusieurs espèces en présence de l'anion fluorure. La disparition des signaux des protons de l'urée au-delà de deux équivalents en présence de fluorure empêche de réaliser des calculs comparables.

5. Dosage photophysique du composé 2

Les études photophysiques ont été réalisées au laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaire et Macromoléculaire de l'ENS Paris-Saclay en collaboration avec le Dr. Gilles CLAVIER.

5.1. Matériel et Méthodes

Le rendement quantique du composé **2** a été mesuré en utilisant la Rhodamine-6G **17** (Figure 29) comme référence de rendement quantique connu $\Phi_f = 91\%$ dans l'EtOH. (Würth et al. 2013)

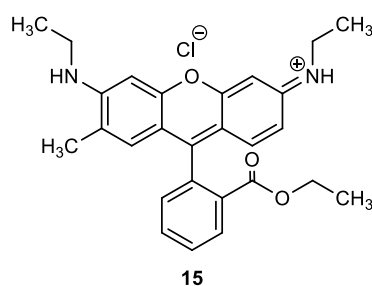


Figure 29 : Structure de la Rhodamine-6G

Nous avons ensuite réalisé un dosage, dans l'ACN, avec suivi des propriétés photophysiques (absorption, émission et temps de vie). La concentration en récepteur d'anions a été adaptée pour les mesures photophysiques. En effet, ces mesures nécessitent une concentration en espèces fluorescentes de l'ordre de 10^{-5} mol.L⁻¹, pour éviter la saturation des détecteurs.

Pour réaliser chaque point de la gamme, la concentration en récepteur a été maintenue stable tout en faisant progressivement augmenter la concentration en sel. A chaque point, nous avons réalisé l'acquisition d'un spectre d'absorbance, d'un spectre de fluorescence et d'un spectre de déclin de fluorescence.

5.2. Résultats et Discussion

5.2.1. Mesure du rendement quantique

Les rendements quantiques mesurés pour le composé **2**, ainsi que ceux précédemment mesurés des composés **2** et **3** sont reportés dans le *Tableau 13* ci-dessous :

Composé	Rendement Quantique Φ_f^2 (QY)
1	39%
2	42%
3	8%

Tableau 13 : Rendements quantiques mesurés

Pour les composés **1** et **2**, les rendements quantiques sont du même ordre de grandeur, d'environ 40%. Pour le composé **3**, il tombe à 8%. Dans la littérature, les rendements quantiques de différentes tétrazines sont reportés par l'équipe de Gong (Figure 30) (Gong et al. 2009).

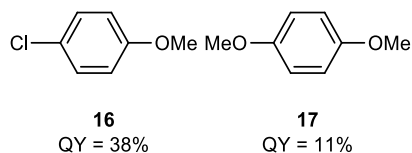


Figure 30 : Structures et Rendements Quantiques de Tétrazines reportées par Gong

En s'appuyant sur ces données, nous pouvons émettre l'hypothèse que la baisse de rendement quantique mesurée est liée à la nature des atomes substituants la tétrazine du récepteur. Les composés **1** et **2** présentent une monosubstitution comme pour le composé **16**, alors que la tétrazine du composé **3** est disubstituée, comme pour le composé **17**.

5.2.2. Titrage en Absorbance

Nous avons réalisé un calcul théorique du spectre UV/Visible à l'aide de Gaussian®, à partir des résultats des optimisations géométriques précédentes. Nous avons pu attribuer, à chaque bande d'absorption, le fragment de la molécule correspondante et la nature de la transition électronique mise en jeu. L'attribution de chaque bande, ainsi que les spectres d'absorption réalisés au cours du titrage entre 0 et 16 équivalents de TBACl sont détaillés dans la Figure 31 :

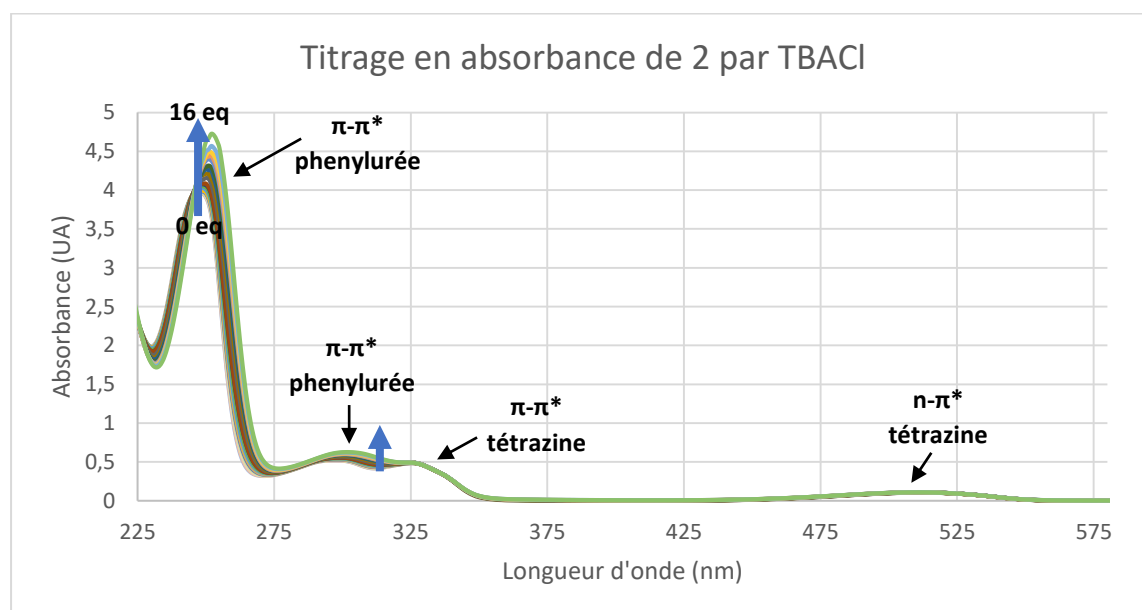


Figure 31 : Titrage en Absorbance du composé **2** par TBACl et attribution des bandes d'absorption

Au cours de ce titrage, nous observons une évolution des bandes d'absorption de la phénylurée, l'intensité des bandes d'absorption augmente. Les bandes d'absorption de la tétrazine ne semblent pas être affectées par l'augmentation de la concentration en ion chlorure. Nous pouvons conclure que la complexation de l'anion s'effectue majoritairement par interaction avec le fragment urée.

5.2.3. Titrage en Fluorescence

L'utilisation d'un récepteur présentant un fluorophore permet d'étudier les interactions entre le récepteur et ligand, au travers d'un mécanisme d'extinction de fluorescence (Figure 32).

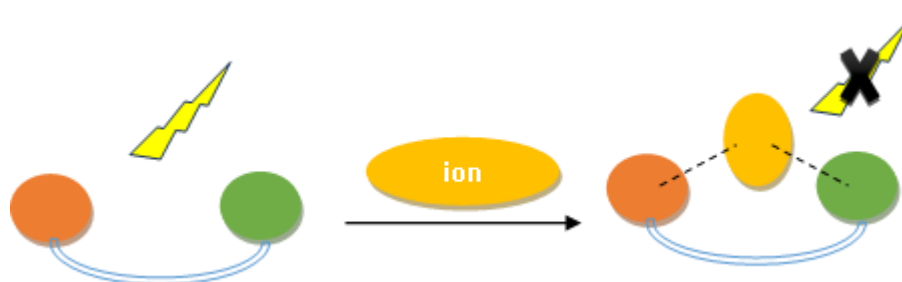


Figure 32 : Extinction de fluorescence par complexation d'ion

Au cours du titrage en fluorescence, nous pouvons observer une diminution de l'intensité de la bande d'émission à 560 nm du composé **2** (Figure 33). L'ajout de sel au milieu vient éteindre la fluorescence du composé **2**.

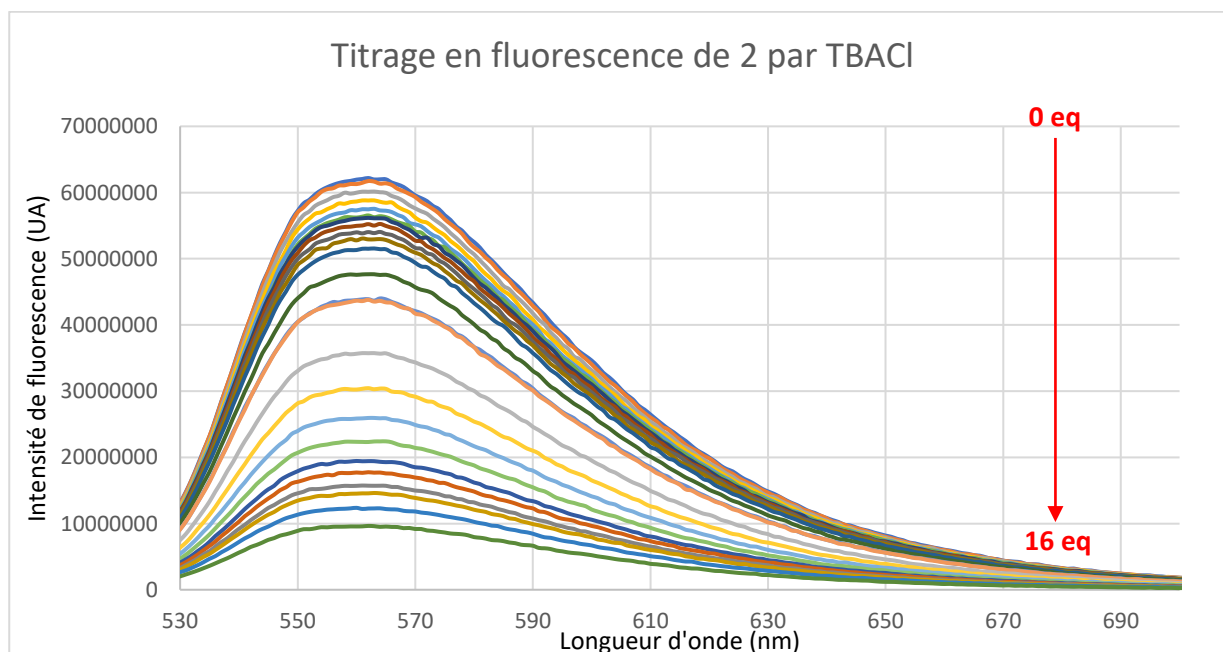


Figure 33 : Titrage en Fluorescence du composé **2** par TBACl

A l'aide des données des spectres de fluorescence, une minimisation de la somme des différences quadratiques a pu être réalisée (Figure 34) pour estimer la valeur de la constante d'association. La constante obtenue est de $K_a = 1520 \text{ M}^{-1}$.

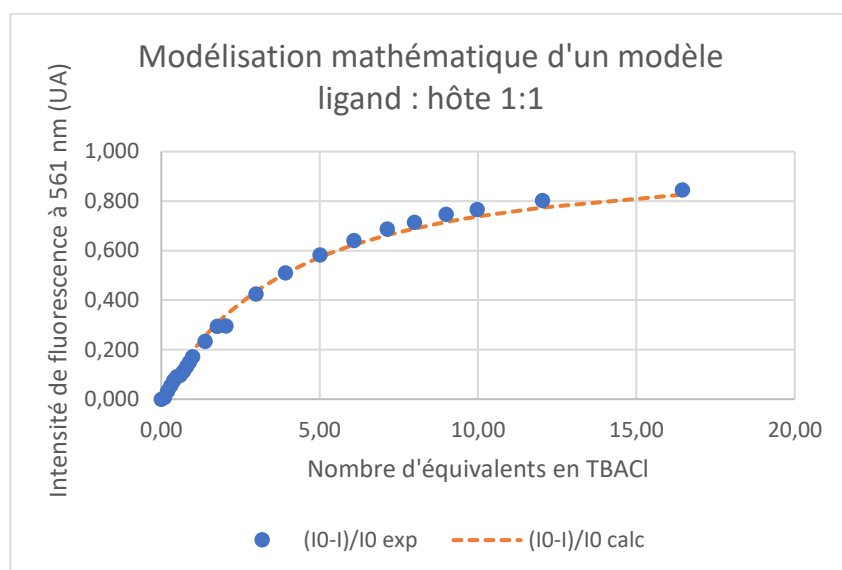


Figure 34 : Fit du titrage en fluorescence du composé 2 par TBACI

La valeur de l'intensité de fluorescence limite I_{lim} correspondant à la complexation de la totalité des récepteurs en solution est nulle.

5.2.4. Titrage en déclin de fluorescence

Le titrage en déclin de fluorescence a été réalisé entre 0 et 16 équivalents de TBACI. L'ensemble des déclins sont représentés en échelle logarithmique dans la Figure 35.

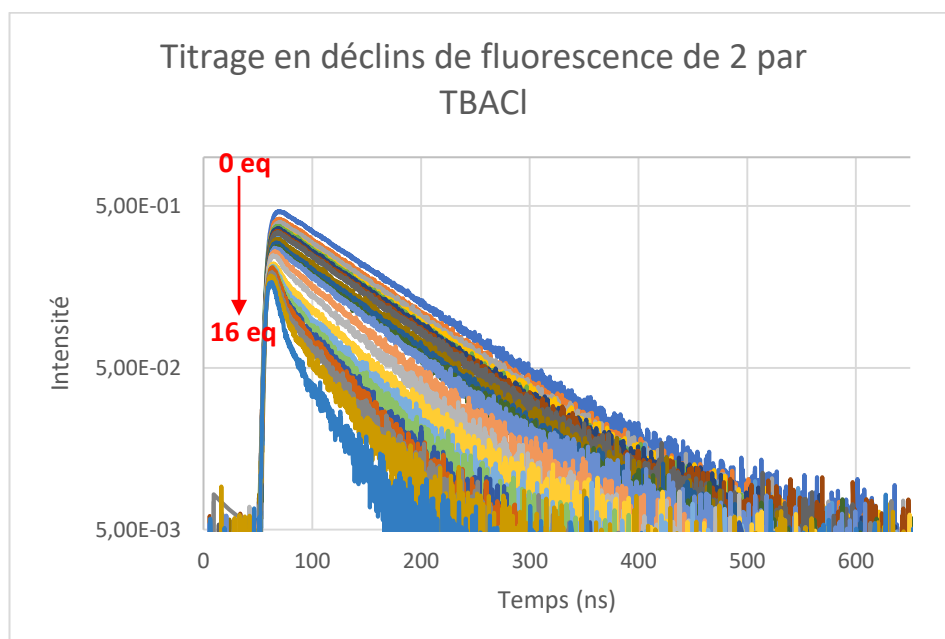


Figure 35 : Titrage en déclin de fluorescence par TBACI

Nous observons une diminution de l'intensité de fluorescence ainsi qu'un changement de la pente des courbes.

Nous avons ensuite modélisé ces déclinés comme une somme d'une ou de deux exponentielles, possédant chacune un temps de vie caractéristique, représentant les temps de vie de deux espèces en solution (Figure 36).

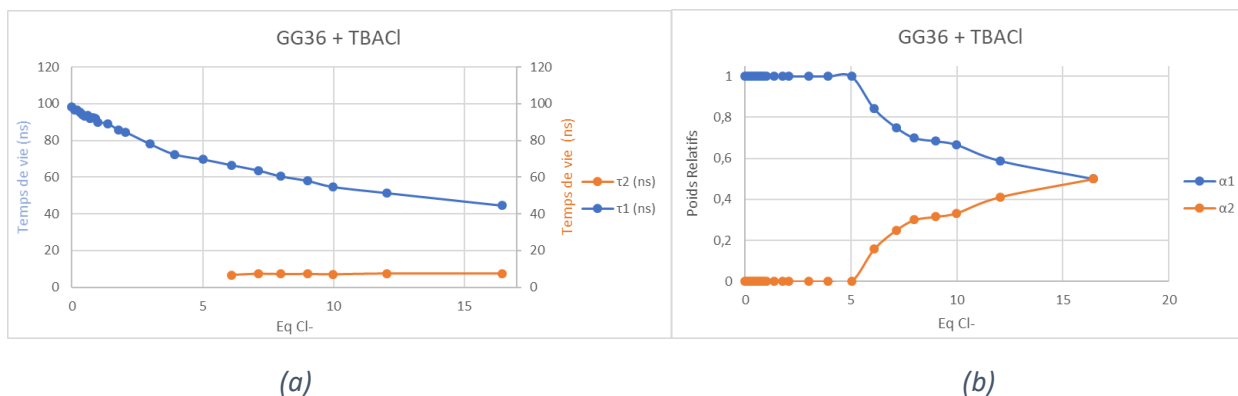


Figure 36 : Analyses des déclinés : (a) τ mesurés, (b) Poids relatifs des τ

Nous observons que le récepteur seul, modélisé initialement par une seule exponentielle, présente une fluorescence longue initiale avec un temps de vie unique τ_1 . Lorsque la concentration en ions chlorures augmente, la complexation s'effectue, ce qui diminue la concentration de récepteurs libres en solution et donc le temps de vie moyen.

Dans un deuxième temps, au-delà de cinq équivalents, on observe l'apparition d'un deuxième temps de vie court. Son poids relatif augmente alors avec le nombre d'équivalents de sel ajouté. Nous avons donc attribué ce deuxième temps de vie au récepteur complexé. Notre hypothèse est corrélée avec les données de nos dosages en fluorescence, où l'intensité limite est pratiquement nulle. Nous en déduisons donc que la fluorescence résiduelle du complexe est très faible.

6. Conclusion des travaux expérimentaux

Le design initialement proposé pour un récepteur d'anion combinant liaison hydrogène et interaction π -anion, s'est avéré prometteur. A l'issue de calculs DFT, nous avons pu mettre en évidence une probable complexation des ions halogénures avec des récepteurs monosubstitués.

Nous avons ensuite synthétisé avec succès cinq récepteurs d'anions : deux récepteurs monosubstitués (**1** et **2**), deux récepteurs disubstitués symétriques (**3** et **4**) et un récepteur disubstitué asymétrique (**5**). La synthèse d'un récepteur possédant un bras aromatique s'est avérée complexe. La stratégie de synthèse initiale s'est avérée inefficace. Une inversion de la séquence réactionnelle a mis en évidence une chimiosélectivité défavorable à la synthèse de notre récepteur. Une stratégie de protection-déprotection par le groupement Boc a été testée. Cependant, un réarrangement au cours de la déprotection a pu être mis en évidence, nous empêchant de former l'urée. L'hypothèse selon laquelle les conditions acides de déprotection sont à l'origine du réarrangement, nous a conduit à adopter une stratégie employant un groupement Fmoc, que nous sommes encore en train d'étudier.

Le composé **2** a fait l'objet d'analyses par RMN ^1H et ^{19}F , ainsi que par étude photophysique. En présence de l'ion chlorure, nous avons pu mettre en évidence une interaction entre l'ion et l'urée de notre récepteur grâce à la RMN ^1H .

Les analyses photophysiques ont permis de montrer une prédominance de l'interaction avec l'urée lors de la complexation avec les anions chlorures. Nous avons cependant pu observer une extinction de la fluorescence corrélée avec l'augmentation de la concentration en anions dans le milieu. Les analyses photophysiques ont mis en évidence une fluorescence résiduelle propre au complexe.

En présence d'ion fluorure, une disparition des signaux des protons mobiles de l'urée en RMN nous a conduit à postuler une déprotonation de notre récepteur par les anions fluorures.

Les synthèses et les analyses de ce récepteur devront être poursuivies par l'étude de la complexation avec les autres halogénures. Des études similaires sur les autres récepteurs synthétisés seront prochainement réalisées. D'autre part, il sera intéressant de faire varier la nature des bras espaceurs et des donneurs de liaisons hydrogènes. En introduisant de la chiralité au niveau du bras espaceur, il devient possible d'envisager une application en catalyse asymétrique. En modulant le donneur de liaisons hydrogène, tant en force qu'en

directionnalité, nous pouvons envisager d'obtenir une bonne sélectivité au niveau des anions piégés par nos récepteurs.

Enfin, dans l'objectif d'une application thérapeutique, dans le traitement des canalopathies, des essais devront être réalisées sur des modèles de membranes pour vérifier la capacité des récepteurs à faire passer les ions à travers les membranes cellulaires.

Bibliographie

- Albani JR. Chapter 4 - Fluorescence Quenching. In: Albani JR, éditeur. *Structure and Dynamics of Macromolecules: Absorption and Fluorescence Studies* [Internet]. Amsterdam: Elsevier Science; 2004 [cité 9 juin 2019]. p. 141-92. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444514493500046>
- Al-Khatib SM, Stevenson WG, Ackerman MJ, Bryant WJ, Callans DJ, Curtis AB, et al. 2017 AHA/ACC/HRS Guideline for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. *J Am Coll Cardiol*. 2 oct 2018;72(14):e91-220.
- Alviña K, Khodakhah K. KCa Channels as Therapeutic Targets in Episodic Ataxia Type-2. *J Neurosci*. 26 mai 2010;30(21):7249-57.
- Andrini O, Keck M, Briones R, Lourdel S, Vargas-Poussou R, Teulon J. ClC-K chloride channels: emerging pathophysiology of Bartter syndrome type 3. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 25 mars 2015;308(12):F1324-34.
- Arnoux J-B, Verkarre V, Saint-Martin C, Montravers F, Brassier A, Valayannopoulos V, et al. Congenital hyperinsulinism: current trends in diagnosis and therapy. *Orphanet J Rare Dis*. déc 2011;6(1):1-14.
- Bechi G, Rusconi R, Cestèle S, Striano P, Franceschetti S, Mantegazza M. Rescuable folding defective NaV1.1 (SCN1A) mutants in epilepsy: properties, occurrence, and novel rescuing strategy with peptides targeted to the endoplasmic reticulum. *Neurobiol Dis*. mars 2015;75:100-14.
- Benesi HA, Hildebrand JH. A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *J Am Chem Soc*. 1 août 1949;71(8):2703-7.
- Berkovic SF, Heron SE, Giordano L, Marini C, Guerrini R, Kaplan RE, et al. Benign familial neonatal-infantile seizures: Characterization of a new sodium channelopathy. *Annals of Neurology*. 2004;55(4):550-7.
- Betzenhauser MJ, Pitt GS, Antzelevitch C. Calcium Channel Mutations in Cardiac Arrhythmia Syndromes. *Curr Mol Pharmacol*. 2015;8(2):133-42.
- Bockenbauer D, Feather S, Stanescu HC, Bandulik S, Zdebik AA, Reichold M, et al. Epilepsy, Ataxia, Sensorineural Deafness, Tubulopathy, and KCNJ10 Mutations. *New England Journal of Medicine*. 7 mai 2009;360(19):1960-70.
- Brignone MS, Lanciotti A, Camerini S, De Nuccio C, Petrucci TC, Visentin S, et al. MLC1 protein: a likely link between leukodystrophies and brain channelopathies. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015 [cité 26 sept 2019];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2015.00106/full>
- Brouwer AM. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2011;83(12):2213-2228.

- Cannon SC. Channelopathies of Skeletal Muscle Excitability. In: *Comprehensive Physiology* [Internet]. American Cancer Society; 2015 [cité 13 sept 2019]. p. 761-90. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cphy.c140062>
- Cardani R, Giagnacovo M, Botta A, Rinaldi F, Morgante A, Udd B, et al. Co-segregation of DM2 with a recessive CLCN1 mutation in juvenile onset of myotonic dystrophy type 2. *J Neurol.* oct 2012;259(10):2090-9.
- Cardoso FC, Dekan Z, Smith JJ, Deuis JR, Vetter I, Herzig V, et al. Modulatory features of the novel spider toxin μ -TRTX-Df1a isolated from the venom of the spider *Davus fasciatus*. *Br J Pharmacol.* 2017;174(15):2528-44.
- Catterall WA. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J Physiol (Lond).* 1 juin 2012;590(11):2577-89.
- Catterall WA. Sodium channels, inherited epilepsy, and antiepileptic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014;54:317-38.
- Catterall WA, Swanson TM. Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels. *Mol Pharmacol.* 1 juill 2015;88(1):141-50.
- Cavallo G, Metrangolo P, Milani R, Pilati T, Priimagi A, Resnati G, et al. The Halogen Bond [Internet]. 2016 [cité 21 mai 2019]. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.chemrev.5b00484>
- Cavallo G, Metrangolo P, Pilati T, Resnati G, Terraneo G. Naming Interactions from the Electrophilic Site. *Crystal Growth & Design.* 4 juin 2014;14(6):2697-702.
- Cebotaru V, Kaul S, Devuyst O, Cai HUI, Racusen L, B Guggino W, et al. High citrate diet delays progression of renal insufficiency in the CIC-5 knockout mouse model of Dent's disease. *Kidney International.* 1 août 2005;68(2):642-52.
- Celmina M, Micule I, Inashkina I, Audere M, Kuske S, Pereca J, et al. EAST/SeSAME syndrome: Review of the literature and introduction of four new Latvian patients. *Clinical Genetics.* 2019;95(1):63-78.
- Cestèle S, Schiavon E, Rusconi R, Franceschetti S, Mantegazza M. Nonfunctional NaV1.1 familial hemiplegic migraine mutant transformed into gain of function by partial rescue of folding defects. *PNAS.* 22 oct 2013;110(43):17546-51.
- Chang VTW, Chang H-M. Review: Recent advances in the understanding of the pathophysiology of neuromyelitis optica spectrum disorder. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 28 juill 2019;
- Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, et al. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature.* 19 mars 1998;392(6673):293-6.
- Cheung S, Wu D, Daly HC, Busschaert N, Morgunova M, Simpson JC, et al. Real-Time Recording of the Cellular Effects of the Anion Transporter Prodigiosin. *Chem.* 12 avr 2018;4(4):879-95.

- Cho Y. Left cardiac sympathetic denervation: An important treatment option for patients with hereditary ventricular arrhythmias. *J Arrhythm.* oct 2016;32(5):340-3.
- Choi J-S, Zhang L, Dib-Hajj SD, Han C, Tyrrell L, Lin Z, et al. Mexiletine-responsive erythromelalgia due to a new Na(v)1.7 mutation showing use-dependent current fall-off. *Exp Neurol.* avr 2009;216(2):383-9.
- Chu P-Y, Cheng C-J, Tseng M-H, Yang S-S, Chen H-C, Lin S-H. Genetic variant rs623011 (17q24.3) associates with non-familial thyrotoxic and sporadic hypokalemic paralysis. *Clin Chim Acta.* 24 déc 2012;414:105-8.
- Colombo C, Ellemunter H, Houwen R, Munck A, Taylor C, Wilschanski M, et al. Guidelines for the diagnosis and management of distal intestinal obstruction syndrome in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* juin 2011;10 Suppl 2:S24-28.
- Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, et al. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature.* déc 2006;444(7121):894-8.
- D'Adamo MC, Hasan S, Guglielmi L, Servettini I, Cenciarini M, Catacuzzeno L, et al. New insights into the pathogenesis and therapeutics of episodic ataxia type 1. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015 [cité 23 août 2019];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2015.00317/full>
- Dalmau J, Armangué T, Planagumà J, Radosevic M, Mannara F, Leypoldt F, et al. An update on anti-NMDA receptor encephalitis for neurologists and psychiatrists: mechanisms and models. *Lancet Neurol.* 17 juill 2019;
- De AL, Pierno S, Liantonio A, Desaphy JF, Natuzzi F, Didonna MP, et al. New potent mexiletine and tocainide analogues evaluated in vivo and in vitro as antimyotonic agents on the myotonic ADR mouse. *Neuromuscul Disord.* juill 2004;14(7):405-16.
- De Luca A, Tricarico D, Wagner R, Bryant SH, Tortorella V, Conte Camerino D. Opposite effects of enantiomers of clofibrac acid derivative on rat skeletal muscle chloride conductance: antagonism studies and theoretical modeling of two different receptor site interactions. *J Pharmacol Exp Ther.* janv 1992;260(1):364-8.
- Demirbilek H, Hussain K. Congenital Hyperinsulinism: Diagnosis and Treatment Update. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* déc 2017;9(Suppl 2):69-87.
- Desaphy J-F, Carbonara R, Costanza T, Conte Camerino D. Preclinical evaluation of marketed sodium channel blockers in a rat model of myotonia discloses promising antimyotonic drugs. *Exp Neurol.* mai 2014;255:96-102.
- Desaphy J-F, Modoni A, LoMonaco M, Camerino DC. Dramatic improvement of myotonia permanens with flecainide: a two-case report of a possible bench-to bedside pharmacogenetics strategy. *Eur J Clin Pharmacol.* 1 avr 2013;69(4):1037-9.
- Diep V, Seaver LH. Long QT syndrome with craniofacial, digital, and neurologic features: Is it useful to distinguish between timothy syndrome types 1 and 2? *American Journal of Medical Genetics Part A.* 2015;167(11):2780-5.

- Donaldson SH, Galiotta L. New Pulmonary Therapies Directed at Targets Other than CFTR. Cold Spring Harb Perspect Med [Internet]. juin 2013 [cité 26 sept 2019];3(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3662351/>
- Duarri A, Jezierska J, Fokkens M, Meijer M, Schelhaas HJ, Dunnen WFA den, et al. Mutations in potassium channel *kcnd3* cause spinocerebellar ataxia type 19. *Annals of Neurology*. 2012;72(6):870-80.
- Elborn JS, Ramsey BW, Boyle MP, Konstan MW, Huang X, Marigowda G, et al. Efficacy and safety of lumacaftor/ivacaftor combination therapy in patients with cystic fibrosis homozygous for Phe508del CFTR by pulmonary function subgroup: a pooled analysis. *Lancet Respir Med*. 2016;4(8):617-26.
- Elmes RBP, Turner P, Jolliffe KA. Colorimetric and Luminescent Sensors for Chloride: Hydrogen Bonding vs Deprotonation. *Org Lett*. 15 nov 2013;15(22):5638-41.
- Evlıyaođlu O, Ercan O, Atalođlu E, Zübariođlu Ü, Özcabı B, Dađdeviren A, et al. Neonatal Diabetes: Two Cases with Isolated Pancreas Agenesis due to Homozygous PTF1A Enhancer Mutations and One with Developmental Delay, Epilepsy, and Neonatal Diabetes Syndrome due to KCNJ11 Mutation. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. juin 2018;10(2):168-74.
- Faber CG, Hoeijmakers JGJ, Ahn H-S, Cheng X, Han C, Choi J-S, et al. Gain of function Nav1.7 mutations in idiopathic small fiber neuropathy. *Annals of Neurology*. 2012;71(1):26-39.
- Fertleman CR, Baker MD, Parker KA, Moffatt S, Elmslie FV, Abrahamsen B, et al. SCN9A Mutations in Paroxysmal Extreme Pain Disorder: Allelic Variants Underlie Distinct Channel Defects and Phenotypes. *Neuron*. 7 déc 2006;52(5):767-74.
- Fertleman CR, Ferrie CD, Aicardi J, Bednarek N a. F, Eeg-Olofsson O, Elmslie FV, et al. Paroxysmal extreme pain disorder (previously familial rectal pain syndrome). *Neurology*. 7 août 2007;69(6):586-95.
- Festa BP, Berquez M, Gassama A, Amrein I, Ismail HM, Samardzija M, et al. OCRL deficiency impairs endolysosomal function in a humanized mouse model for Lowe syndrome and Dent disease. *Hum Mol Genet*. 15 juin 2019;28(12):1931-46.
- Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, et al. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. févr 2015;14(2):162-73.
- Fischer TZ, Gilmore ES, Estacion M, Eastman E, Taylor S, Melanson M, et al. A novel Nav1.7 mutation producing carbamazepine-responsive erythromelalgia. *Annals of Neurology*. 2009;65(6):733-41.
- Flume PA, O'Sullivan BP, Robinson KA, Goss CH, Mogayzel PJ, Willey-Courand DB, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 nov 2007;176(10):957-69.
- Frisch. M. J., Trucks. G. W., Schlegel. H. B., Scuseria. G. E., Robb. M. A., Cheeseman. J. R., et al. Gaussian 09, Revision D.01. Gaussian, Inc., Wallingford CT; 2016.

- Frontera A, Morey J, Oliver A, Piña MN, Quiñonero D, Costa A, et al. Rational Design, Synthesis, and Application of a New Receptor for the Molecular Recognition of Tricarboxylate Salts in Aqueous Media. *J Org Chem*. 1 sept 2006;71(19):7185-95.
- Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, Schimpf R, Haissaguerre M, Calò L, et al. Short QT syndrome: pharmacological treatment. *J Am Coll Cardiol*. 21 avr 2004;43(8):1494-9.
- Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, Wolpert C, Schimpf R, Riccardi R, et al. Short QT Syndrome: a familial cause of sudden death. *Circulation*. 26 août 2003;108(8):965-70.
- Gale PA, Davis JT, Quesada R. Anion transport and supramolecular medicinal chemistry. *Chem Soc Rev*. 9 mai 2017;46(9):2497-519.
- Garrett GE, Gibson GL, Straus RN, Seferos DS, Taylor MS. Chalcogen Bonding in Solution: Interactions of Benzotelluradiazoles with Anionic and Uncharged Lewis Bases. *J Am Chem Soc*. 1 avr 2015;137(12):4126-33.
- Genetics Home Reference GH. Cystic fibrosis [Internet]. Genetics Home Reference. [cité 19 sept 2019]. Disponible sur: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/cystic-fibrosis>
- Gibbons CH, Vernino SA, Freeman R. Combined Immunomodulatory Therapy in Autoimmune Autonomic Ganglionopathy. *Arch Neurol*. 1 févr 2008;65(2):213-7.
- Glauser TA, Cnaan A, Shinnar S, Hirtz DG, Dlugos D, Masur D, et al. Ethosuximide, valproic acid, and lamotrigine in childhood absence epilepsy: Initial monotherapy outcomes at 12 months. *Epilepsia*. 2013;54(1):141-55.
- Gonçalves GAR, Paiva R de MA. Gene therapy: advances, challenges and perspectives. *Einstein (Sao Paulo)*. 2017;15(3):369-75.
- Gong Y-H, Miomandre F, Méallet-Renault R, Badré S, Galmiche L, Tang J, et al. Synthesis and Physical Chemistry of s-Tetrazines: Which Ones are Fluorescent and Why? *European Journal of Organic Chemistry*. 2009;2009(35):6121-8.
- Graves TD, Imbrici P, Kors EE, Terwindt GM, Eunson LH, Frants RR, et al. Premature stop codons in a facilitating EF-hand splice variant of CaV2.1 cause episodic ataxia type 2. *Neurobiol Dis*. oct 2008;32(1):10-5.
- Han C, Vasylyev D, Macala LJ, Gerrits MM, Hoeijmakers JGJ, Bekelaar KJ, et al. The G1662S NaV1.8 mutation in small fibre neuropathy: impaired inactivation underlying DRG neuron hyperexcitability. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1 mai 2014;85(5):499-505.
- Hassel O, Hvoslef J, Vihovde EH, Sörensen NA. The Structure of Bromine 1,4-Dioxanate. *Acta Chem Scand*. 1954;8:873-873.
- Havakuk O, Viskin S. A Tale of 2 Diseases: The History of Long-QT Syndrome and Brugada Syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 5 janv 2016;67(1):100-8.
- Herd CP, Tomlinson CL, Rick C, Scotton WJ, Edwards J, Ives N, et al. Botulinum toxins for the prevention of migraine in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet]*. 2018 [cité 23 août 2019];(6). Disponible sur: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD011616.pub2/full>

- Herson PS, Virk M, Rustay NR, Bond CT, Crabbe JC, Adelman JP, et al. A mouse model of episodic ataxia type-1. *Nature Neuroscience*. avr 2003;6(4):378-83.
- Hiraoka K, Mizuse S, Yamabe S. High-symmetric structure of the gas-phase cluster ions X-
.cntdot..cntdot..cntdot.C6F6 (X = Cl, Br, and I) [Internet]. 2002 [cité 21 mai 2019].
Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100304a032>
- Ilg W, Bastian AJ, Boesch S, Burciu RG, Celnik P, Claaßen J, et al. Consensus Paper: Management of Degenerative Cerebellar Disorders. *Cerebellum*. 1 avr 2014;13(2):248-68.
- Imbrici P, Liantonio A, Camerino GM, De Bellis M, Camerino C, Mele A, et al. Therapeutic Approaches to Genetic Ion Channelopathies and Perspectives in Drug Discovery. *Front Pharmacol* [Internet]. 10 mai 2016 [cité 27 août 2019];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4861771/>
- Imbrici P, Liantonio A, Gradogna A, Pusch M, Camerino DC. Targeting kidney CLC-K channels: Pharmacological profile in a human cell line versus *Xenopus* oocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1 oct 2014;1838(10):2484-91.
- Jarecki BW, Piekarz AD, Jackson JO, Cummins TR. Human voltage-gated sodium channel mutations that cause inherited neuronal and muscle channelopathies increase resurgent sodium currents. *J Clin Invest*. 4 janv 2010;120(1):369-78.
- Jayam Trough A, Dabi A, Solieman N, Kurukumbi M, Kalyanam J. Myasthenia Gravis: A Review [Internet]. *Autoimmune Diseases*. 2012 [cité 6 sept 2019]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/ad/2012/874680/>
- Jen JC. Familial Hemiplegic Migraine. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., éditeurs. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 23 août 2019]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1388/>
- Jen JC, Graves TD, Hess EJ, Hanna MG, Griggs RC, Baloh RW. Primary episodic ataxias: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Brain*. 1 oct 2007;130(10):2484-93.
- Jongjaroenprasert W, Phusantisampan T, Mahasirimongkol S, Mushiroda T, Hirankarn N, Snaboon T, et al. A genome-wide association study identifies novel susceptibility genetic variation for thyrotoxic hypokalemic periodic paralysis. *J Hum Genet*. mai 2012;57(5):301-4.
- Jongman JK, Jepkes-Bruin N, Ramdat Misier AR, Beukema WP, Delnoy PPHM, Oude Luttikhuis H, et al. Electrical storms in Brugada syndrome successfully treated with isoproterenol infusion and quinidine orally. *Neth Heart J*. avr 2007;15(4):151-5.
- Kalla R, Teufel J, Feil K, Muth C, Strupp M. Update on the pharmacotherapy of cerebellar and central vestibular disorders. *J Neurol*. 2016;263:24-9.
- Key LL, Rodriguiz RM, Willi SM, Wright NM, Hatcher HC, Eyre DR, et al. Long-Term Treatment of Osteopetrosis with Recombinant Human Interferon Gamma. *New England Journal of Medicine*. 15 juin 1995;332(24):1594-9.

- Khogali S, Lucas B, Ammar T, Dejong D, Barbalinardo M, Hayward LJ, et al. Physiological basis for muscle stiffness and weakness in a knock-in M1592V mouse model of hyperkalemic periodic paralysis. *Physiological Reports*. 2015;3(12):e12656.
- Kleta R, Bockenhauer D. Salt-Losing Tubulopathies in Children: What's New, What's Controversial? *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(3):727-39.
- Kline J, Costantini O. Inherited Cardiac Arrhythmias and Channelopathies. *Medical Clinics of North America*. 1 sept 2019;103(5):809-20.
- Kömhoff M, Laghmani K. Pathophysiology of antenatal Bartter's syndrome. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2017;26(5):419-25.
- Kuramoto K, Matsushita S, Murakami M. Acute reversible myocardial infarction after blood transfusion in the aged. *Jpn Heart J*. mars 1977;18(2):191-201.
- Lampert A, Eberhardt M, Waxman SG. Altered Sodium Channel Gating as Molecular Basis for Pain: Contribution of Activation, Inactivation, and Resurgent Currents. In: Ruben PC, éditeur. *Voltage Gated Sodium Channels* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [cité 24 août 2019]. p. 91-110. (Handbook of Experimental Pharmacology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-642-41588-3_5
- Langton MJ, Robinson SW, Marques I, Félix V, Beer PD. Halogen bonding in water results in enhanced anion recognition in acyclic and rotaxane hosts. *Nat Chem*. déc 2014;6(12):1039-43.
- Lee Y-C, Durr A, Majczenko K, Huang Y-H, Liu Y-C, Lien C-C, et al. Mutations in KCND3 cause spinocerebellar ataxia type 22. *Annals of Neurology*. 2012;72(6):859-69.
- Leipold E, Hanson-Kahn A, Frick M, Gong P, Bernstein JA, Voigt M, et al. Cold-aggravated pain in humans caused by a hyperactive NaV1.9 channel mutant. *Nat Commun*. 8 déc 2015;6:10049.
- Leipold E, Liebmann L, Korenke GC, Heinrich T, Gießelmann S, Baets J, et al. A *de novo* gain-of-function mutation in *SCN11A* causes loss of pain perception. *Nature Genetics*. nov 2013;45(11):1399-404.
- Lim CX, Ricos MG, Dibbens LM, Heron SE. KCNT1 mutations in seizure disorders: the phenotypic spectrum and functional effects. *Journal of Medical Genetics*. 1 avr 2016;53(4):217-25.
- Luca AD, Pierno S, Liantonio A, Cetrone M, Camerino C, Frayssé B, et al. Enhanced Dystrophic Progression in mdx Mice by Exercise and Beneficial Effects of Taurine and Insulin-Like Growth Factor-1. *J Pharmacol Exp Ther*. 1 janv 2003;304(1):453-63.
- Mall MA, Galletta LJV. Targeting ion channels in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. sept 2015;14(5):561-70.
- Martin TW, Derewenda ZS. The name is bond — H bond. *Nature Structural Biology*. mai 1999;6(5):403.

- Martínez-Aguirre MA, Yatsimirsky AK. Brønsted versus Lewis Acid Type Anion Recognition by Arylboronic Acids. *J Org Chem.* 15 mai 2015;80(10):4985-93.
- Masood W, Sitammagari KK. Morvan Syndrome (Morvan Fibrillary Chorea, MFC). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [cité 9 sept 2019]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507887/>
- Matthews E, Fialho D, Tan SV, Venance SL, Cannon SC, Sternberg D, et al. The non-dystrophic myotonias: molecular pathogenesis, diagnosis and treatment. *Brain.* janv 2010;133(1):9-22.
- Matthews E, Hanna MG. Repurposing of sodium channel antagonists as potential new anti-myotonic drugs. *Exp Neurol.* nov 2014;261:812-5.
- McNALLY BA, LEEVY WM, SMITH BD. Recent Advances in Synthetic Membrane Transporters. *Supramol Chem.* janv 2007;19(1-2):29-37.
- McTaggart JS, Clark RH, Ashcroft FM. The role of the KATP channel in glucose homeostasis in health and disease: more than meets the islet. *J Physiol (Lond).* 1 sept 2010;588(Pt 17):3201-9.
- Miceli F, Soldovieri MV, Ambrosino P, De Maria M, Manocchio L, Medoro A, et al. Molecular pathophysiology and pharmacology of the voltage-sensing module of neuronal ion channels. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:259.
- Milanesi R, Bucchi A, Baruscotti M. The genetic basis for inherited forms of sinoatrial dysfunction and atrioventricular node dysfunction. *J Interv Card Electrophysiol.* 1 août 2015;43(2):121-34.
- Miller IO, Sotero de Menezes MA. SCN1A Seizure Disorders. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., éditeurs. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 22 août 2019]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1318/>
- Minassian NA, Lin M-CA, Papazian DM. Altered Kv3.3 channel gating in early-onset spinocerebellar ataxia type 13. *The Journal of Physiology.* 2012;590(7):1599-614.
- Moreau A, Gosselin-Badaroudine P, Chahine M. Biophysics, pathophysiology, and pharmacology of ion channel gating pores. *Front Pharmacol [Internet].* 2014 [cité 12 sept 2019];5. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2014.00053/full#h6>
- Mukhopadhyay M, Banerjee D, Koll A, Mandal A, Filarowski A, Fitzmaurice D, et al. Excited state intermolecular proton transfer and caging of salicylidine-3,4,7-methyl amine in cyclodextrins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* 31 oct 2005;175(2):94-9.
- Nakamura K, Yoshida K, Miyazaki D, Morita H, Ikeda S. Spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6): clinical pilot trial with gabapentin. *J Neurol Sci.* 15 mars 2009;278(1-2):107-11.
- Nguyen H-L, Pieper GH, Wilders R. Andersen–Tawil syndrome: Clinical and molecular aspects. *International Journal of Cardiology.* 5 déc 2013;170(1):1-16.

- Noomnarm U, Clegg RM. Fluorescence lifetimes: fundamentals and interpretations. *Photosynth Res.* 1 sept 2009;101(2):181-94.
- Orchard PJ, Fasth AL, Rademacher JL, He W, Boelens JJ, Horwitz EM, et al. Hematopoietic stem cell transplantation for infantile osteopetrosis. *Blood.* 1 janv 2015;blood-2015-01-625541.
- Orenstein DM, Winnie GB, Altman H. Cystic fibrosis: a 2002 update. *J Pediatr.* févr 2002;140(2):156-64.
- Orphanet IU--TD. Orphanet: Paralysie périodique thyrotoxique [Internet]. [cité 12 sept 2019]. Disponible sur: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=11144&Disease_Disease_Search_disease_Group=paralysie-periodique-hypokaliemique-thyrotoxique&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Paralysie-periodique-thyrotoxique&title=Paralysie%20périodique%20thyrotoxique&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=11144&Disease_Disease_Search_disease_Group=paralysie-periodique-hypokaliemique-thyrotoxique&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Paralysie-periodique-thyrotoxique&title=Paralysie%20périodique%20thyrotoxique&search=Disease_Search_Simple)
- Osteen JD, Sampson K, Iyer V, Julius D, Bosmans F. Pharmacology of the Nav1.1 domain IV voltage sensor reveals coupling between inactivation gating processes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 27 2017;114(26):6836-41.
- Ou M, Li C, Tang D, Xue W, Xu Y, Zhu P, et al. Genotyping, generation and proteomic profiling of the first human autosomal dominant osteopetrosis type II-specific induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 14 août 2019;10(1):251.
- de Pablos AL, García-Nieto V, López-Menchero JC, Ramos-Trujillo E, González-Acosta H, Claverie-Martín F. Severe manifestation of Bartter syndrome Type IV caused by a novel insertion mutation in the BSND gene. *Clin Nephrol.* mai 2014;81(5):363-8.
- Parize P, Gaultier J-B, Badet F, André-Obadia N, Dupond J-L, Rousset H, et al. Ganglionopathie autonome auto-immune : une série de six observations et revue de la littérature. *La Revue de Médecine Interne.* 1 juill 2010;31(7):476-80.
- Pata M, Vacher J. Ostm1 Bifunctional Roles in Osteoclast Maturation: Insights From a Mouse Model Mimicking a Human OSTM1 Mutation. *J Bone Miner Res.* 2018;33(5):888-98.
- Pauling L. The Shared-Electron Chemical Bond. *Proc Natl Acad Sci U S A.* avr 1928;14(4):359-62.
- Pedersen TH, Riisager A, de Paoli FV, Chen T-Y, Nielsen OB. Role of physiological ClC-1 Cl⁻ ion channel regulation for the excitability and function of working skeletal muscle. *J Gen Physiol.* avr 2016;147(4):291-308.
- Pérez-Riera AR, Barbosa-Barros R, Daminello Raimundo R, da Costa de Rezende Barbosa MP, Esposito Sorpreso IC, de Abreu LC. The congenital long QT syndrome Type 3: An update. *Indian Pacing Electrophysiol J.* 31 oct 2017;18(1):25-35.
- Piccolo A, Pusch M. Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins ClC-4 and ClC-5. *Nature.* juill 2005;436(7049):420-3.

- Pietrobon D. CaV2.1 channelopathies. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 1 juill 2010;460(2):375-93.
- Pietrobon D, Moskowitz MA. Pathophysiology of Migraine. *Annual Review of Physiology*. 2013;75(1):365-91.
- Plais R. Travaux de thèse. soutenance prévu en.
- Priori SG, Wilde AA, Horie M, Cho Y, Behr ER, Berul C, et al. Executive summary: HRS/EHRA/APHS expert consensus statement on the diagnosis and management of patients with inherited primary arrhythmia syndromes. *Europace*. 1 oct 2013;15(10):1389-406.
- Priori Silvia G., Napolitano Carlo, Memmi Mirella, Colombi Barbara, Drago Fabrizio, Gasparini Maurizio, et al. Clinical and Molecular Characterization of Patients With Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation*. 2 juill 2002;106(1):69-74.
- Probst Vincent, Gourraud Jean-Baptiste. Quinidine in Brugada Syndrome. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 1 déc 2015;8(6):1309-10.
- Quan JM, Tiddens HAWM, Sy JP, McKenzie SG, Montgomery MD, Robinson PJ, et al. A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities. *The Journal of Pediatrics*. 1 déc 2001;139(6):813-20.
- Rafeeq MM, Murad HAS. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *J Transl Med [Internet]*. 27 avr 2017 [cité 19 sept 2019];15. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5408469/>
- Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P, et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med*. 3 nov 2011;365(18):1663-72.
- Robinson M, Regnis JA, Bailey DL, King M, Bautovich GJ, Bye PT. Effect of hypertonic saline, amiloride, and cough on mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 mai 1996;153(5):1503-9.
- de la Roche J, Angsutararux P, Kempf H, Janan M, Bolesani E, Thiemann S, et al. Comparing human iPSC-cardiomyocytes versus HEK293T cells unveils disease-causing effects of Brugada mutation A735V of NaV1.5 sodium channels. *Sci Rep*. 1 août 2019;9(1):11173.
- Rolf S, Bruns H-J, Wichter T, Kirchhof P, Ribbing M, Wasmer K, et al. The ajmaline challenge in Brugada syndrome: diagnostic impact, safety, and recommended protocol. *Eur Heart J*. juin 2003;24(12):1104-12.
- Ruan Yanfei, Denegri Marco, Liu Nian, Bachetti Tiziana, Seregni Morena, Morotti Stefano, et al. Trafficking Defects and Gating Abnormalities of a Novel SCN5A Mutation Question Gene-Specific Therapy in Long QT Syndrome Type 3. *Circulation Research*. 30 avr 2010;106(8):1374-83.

- Russo R, Caroleo MC, Cione E, Perri M, Paparo MT, Russo A. Dual Effect of Ziconotide in Primary Erythromelgia [Internet]. *Case Reports in Medicine*. 2015 [cité 24 août 2019]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/crim/2015/592170/>
- Saint-Martin C, Gauvain G, Teodorescu G, Gourfinkel-An I, Fedirko E, Weber YG, et al. Two novel CLCN2 mutations accelerating chloride channel deactivation are associated with idiopathic generalized epilepsy. *Human Mutation*. 2009;30(3):397-405.
- Salvatore D, D'Andria M. Effects of salmeterol on arterial oxyhemoglobin saturations in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. juill 2002;34(1):11-5.
- Sansone VA, Burge J, McDermott MP, Smith PC, Herr B, Tawil R, et al. Randomized, placebo-controlled trials of dichlorphenamide in periodic paralysis. *Neurology*. 12 avr 2016;86(15):1408-16.
- Savastano M, Bazzicalupi C, Giorgi C, García-Gallarín C, López de la Torre MD, Pichierri F, et al. Anion Complexes with Tetrazine-Based Ligands: Formation of Strong Anion- π Interactions in Solution and in the Solid State. *Inorg Chem*. 15 août 2016;55(16):8013-24.
- Schoonjans A-S, Lagae L, Ceulemans B. Low-dose fenfluramine in the treatment of neurologic disorders: experience in Dravet syndrome. *Ther Adv Neurol Disord*. 1 nov 2015;8(6):328-38.
- Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev*. janv 1999;79(1 Suppl):S145-166.
- Semenov NA, Lonchakov AV, Pushkarevsky NA, Suturina EA, Korolev VV, Lork E, et al. Coordination of Halide and Chalcogenolate Anions to Heavier 1,2,5-Chalcogenadiazoles: Experiment and Theory. *Organometallics*. 25 août 2014;33(16):4302-14.
- Sheets PL, Jackson JO, Waxman SG, Dib-Hajj SD, Cummins TR. A Nav1.7 channel mutation associated with hereditary erythromelgia contributes to neuronal hyperexcitability and displays reduced lidocaine sensitivity. *The Journal of Physiology*. 2007;581(3):1019-31.
- Shin Y-W, Lee S-T, Park K-I, Jung K-H, Jung K-Y, Lee SK, et al. Treatment strategies for autoimmune encephalitis. *Ther Adv Neurol Disord* [Internet]. 16 août 2017 [cité 9 sept 2019];11. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5784571/>
- Shokri A, Wang X-B, Kass SR. Electron-Withdrawing Trifluoromethyl Groups in Combination with Hydrogen Bonds in Polyols: Brønsted Acids, Hydrogen-Bond Catalysts, and Anion Receptors. *J Am Chem Soc*. 26 juin 2013;135(25):9525-30.
- Skeie GO, Apostolski S, Evoli A, Gilhus NE, Illa I, Harms L, et al. Guidelines for treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders. *European Journal of Neurology*. 1 juill 2010;17(7):893-902.
- Smart SL, Lopantsev V, Zhang CL, Robbins CA, Wang H, Chiu SY, et al. Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice. *Neuron*. avr 1998;20(4):809-19.

- Sobacchi C, Schulz A, Coxon FP, Villa A, Helfrich MH. Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function. *Nature Reviews Endocrinology*. sept 2013;9:522-36.
- Somaraju UR, Solis-Moya A. Pancreatic enzyme replacement therapy for people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 23 2016;11:CD008227.
- Spears DA, Gollob MH. Genetics of inherited primary arrhythmia disorders. *Appl Clin Genet*. 18 sept 2015;8:215-33.
- Statland JM, Fontaine B, Hanna MG, Johnson NE, Kissel JT, Sansone VA, et al. Review of the Diagnosis and Treatment of Periodic Paralysis. *Muscle Nerve*. avr 2018;57(4):522-30.
- Steinke KV, Gorinski N, Wojciechowski D, Todorov V, Guseva D, Ponimaskin E, et al. Human CLC-K Channels Require Palmitoylation of Their Accessory Subunit Barttin to Be Functional. *J Biol Chem*. 7 oct 2015;290(28):17390-400.
- Tawil R, Ptacek LJ, Pavlakis SG, DeVivo DC, Penn AS, Özdemir C, et al. Andersen's syndrome: Potassium-sensitive periodic paralysis, ventricular ectopy, and dysmorphic features. *Annals of Neurology*. 1994;35(3):326-30.
- Thériault O, Poulin H, Sculptoreanu A, de Groat WC, O'Leary ME, Chahine M. Modulation of peripheral Na(+) channels and neuronal firing by n-butyl-p-aminobenzoate. *Eur J Pharmacol*. 15 mars 2014;727:158-66.
- Titulaer MJ, Lang B, Verschuuren JJ. Lambert–Eaton myasthenic syndrome: from clinical characteristics to therapeutic strategies. *The Lancet Neurology*. 1 déc 2011;10(12):1098-107.
- Tomimitsu H, Arimura K, Nagado T, Watanabe O, Otsuka R, Kurono A, et al. Mechanism of action of voltage-gated K⁺ channel antibodies in acquired neuromyotonia. *Annals of Neurology*. 2004;56(3):440-4.
- Unwin RJ, Capasso G. Bartter's and Gitelman's syndromes: their relationship to the actions of loop and thiazide diuretics. *Curr Opin Pharmacol*. avr 2006;6(2):208-13.
- Van Goor F, Hadida S, Grootenhuys PDJ, Burton B, Stack JH, Straley KS, et al. Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci USA*. 15 nov 2011;108(46):18843-8.
- Veerapandiyan A, Statland JM, Tawil R. Andersen-Tawil Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, Stephens K, et al., éditeurs. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 2004 [cité 12 sept 2019]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1264/>
- Walter JT, Alviña K, Womack MD, Chevez C, Khodakhah K. Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia. *Nat Neurosci*. mars 2006;9(3):389-97.

- Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, et al. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nat Genet.* janv 1996;12(1):17-23.
- Welling PA, Ho K. A comprehensive guide to the ROMK potassium channel: form and function in health and disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 20 mai 2009;297(4):F849-63.
- Wilkins LW&. Novel brain expression of ClC-1 chloride channels and enrichment of CLCN1 variants in epilepsy. *Neurology.* 19 mars 2013;80(12):1174-1174.
- Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol.* sept 2007;6(9):805-15.
- Wu F, Mi W, Cannon SC. Beneficial effects of bumetanide in a CaV1.1-R528H mouse model of hypokalaemic periodic paralysis. *Brain.* 1 déc 2013;136(12):3766-74.
- Würth C, Grabolle M, Pauli J, Spieles M, Resch-Genger U. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples. *Nature Protocols.* août 2013;8(8):1535-50.
- Wuttke TV, Jurkat-Rott K, Paulus W, Garncarek M, Lehmann-Horn F, Lerche H. Peripheral nerve hyperexcitability due to dominant-negative KCNQ2 mutations. *Neurology.* nov 2007;69(22):2045-53.
- Yang Y, Wang Y, Li S, Xu Z, Li H, Ma L, et al. Mutations in SCN9A, encoding a sodium channel alpha subunit, in patients with primary erythralgia. *Journal of Medical Genetics.* 1 mars 2004;41(3):171-4.
- COMMISSION DE LA TRANSPARENCE Avis 7 mars 2018 [Internet]. Haute Autorité de Santé. 2018 [cité 3 oct 2019]. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2835401/fr/prialt

Partie expérimentale :

Molecular Modeling and Calculations :

All calculations were carried out using Gaussian 09[®] program :

Gaussian 09, Revision D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.

Structures of compounds **1** and **2** were hand-drawn using ChemDraw[®] and then optimized with a MM2 forcefield using Chem3D[®]. Then, a series of optimization was performed first in AM1, then in B3LYP, then in B3LYP 6-31G + (d,p). Then, a frequencies calculation was performed using Gaussian 9[®] at the level B3LYP 6-31G + (d,p). Geometrical optimization results of those compounds were superimposed and RMSD was calculated using Chimera 1.13.1c[®].

NMR and Mass Spectrometry Analysis :

¹H NMR spectra were recorded with Bruker AV-I 300 MHz and advance 200MHz spectrometers at 298 K, referenced to TMS signal and were calibrated using residual CHCl₃ (δ = 7.26 ppm), Acetone (δ = 2.05 ppm) or MeOD (δ = 3.31 ppm). ¹⁹F NMR spectra were recorded with Bruker AV-I 300 MHz spectrometer at 298 K and were calibrated using CFCl₃ (δ = 0.00 ppm). ¹³C NMR spectra were recorded with a Bruker AV-I 300 MHz spectrometer at 75 MHz and 298 K and were calibrated using CDCl₃ (δ = 77.16 ppm), Acetone (δ = 29.84 ppm) or MeOD (δ = 49.00 ppm). ¹H NMR spectroscopic data are reported as follow: chemical shift δ [ppm] (multiplicity, coupling constant [Hz], integration). Multiplicities are reported as follow: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, quint = quintuplet, sext = sextuplet, hept = heptuplet, dd = doublet of doublet, td = triplet of doublet, tt = triplet of triplet, ddd = doublet of doublet of doublet, m = multiplet. ¹³C NMR spectroscopic data

are reported in terms of chemical shifts δ [ppm] and when it's necessary multiplicity and coupling constant [Hz].

High resolution mass spectra (HRMS) were obtained with a Waters Xevo QTOF instrument with an electrospray ionization source (ESI+), using Leucine Enkephaline solution as internal calibrant.

Method for the determination of K_a values by NMR :

NMR titrations were performed by addition of aliquots of a solution containing the anionic guest as the tetrabutylammonium (TBA) salt (0,05 M for TBAF and 0,02 M for TBACl) and the receptor (3,5 mM) in MeCN-d₃. The anion salt was solubilized into acetone and was recrystallized from precipitation into diethyl ether and dried to remove residual solvents. ¹H NMR spectra were recorded on a Bruker AV-I 300 spectrometer and calibrated to the residual proton solvent peak in MeCN-d₃ ($\delta = 1.94$ ppm) at 300K. Stack plots were made using MestReNova Version 6.0. Non-linear least-square curve fitting of the titration data to a 1:1 binding model were processed using Excel software.

Photophysical Analysis :

UV-Visible spectra were recorded at 25°C on a Cary 400 (Agilent) double-beam spectrometer using a 10 mm path quartz cell. Emission spectra were measured on a Fluoromax-3 (Horiba) or a Fluorolog-3 (Horiba) spectrofluorometer. An angle configuration of 90° was used. Optical density of the samples was checked to be less than 0.1 to avoid reabsorption artifacts. The relative fluorescence quantum yields Φ_F were determined using Rhodamine-6G ($\Phi_F = 0.91$ in ethanol) as a reference.

The fluorescence decay curves in the ns regime were obtained by the time-correlated single-photon counting (TCSPC) method with a femtosecond laser excitation composed of a Titanium Sapphire laser (Tsunami, Spectra-Physics) pumped by a double Nd:YVO₄ laser (Millennia Xs, Spectra Physics). Light pulses at 990 nm from the oscillator were selected by an acousto-optic crystal at a repetition rate of 4 MHz, and then tripled at 330 nm by non-linear crystals. Fluorescence photons were detected at 90° through a monochromator and a polarizer at magic angle by means of a Hamamatsu MCP R3809U photomultiplier, connected to a SPC-630 TCSPC module from Becker & Hickl. The instrumental response function was recorded before each decay measurement with a fwhm (full width at half-maximum) of ~25 ps. The fluorescence data were analyzed using the Globals software package developed at the Laboratory for Fluorescence Dynamics at the

University of Illinois at Urbana-Champaign, which includes reconvolution analysis and global non-linear least-squares minimization method.

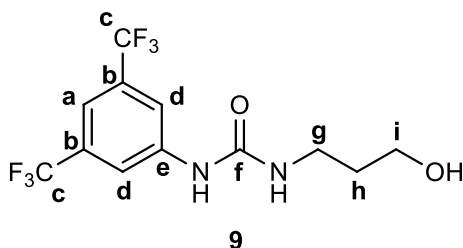
To a 1 cm quartz glass cuvette was added a solution of the receptor (2.5 mL, 200 μM). After background subtraction, the absorbance spectra were recorded from 200 to 700 nm. Aliquots of a solution containing the respective anion (20002 μM) and the receptor (200 μM) were then added to the sample cuvette.

Solutions at 10^{-5} mol.L⁻¹ were prepared and absorbance spectra were measured. From the absorbance spectra were determined the absorbance maxima that correspond to the excitation wavelength for the emission spectra. Measurement were made in acetonitrile.

Emission spectra were measured at the wavelength determined before. Emission spectra were also recorded at the maximum wavelength of the reference, Rhodamine-6G, in order to determine the quantum yield.

Synthesis :

Preparation of **9** : 1-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3-(3-hydroxypropyl)urea



Chemical Formula : C₁₂H₁₂F₆N₂O₂

Molecular Weight : 330,23 g.mol⁻¹

3-aminopropan-1-ol (103,4 mg, 1,38 mmol, 1,04 eq) was added to a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer and diluted with DMF (2 mL) under inert atmosphere. 1-isocyanato-3,5-bis(trifluoromethyl)benzene (336,7 mg, 1,32 mmol, 1 eq) was diluted into DMF (2 mL) then added dropwise to the flask. The mixture was stirred at room temperature for one hour and a half. 10 mL of EtOAc were added and the organic layer was washed with 10 mL of aqueous HCl 0,5M, 3 times. Organic layers were collected, dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was evaporated. The crude product was purified by precipitation in DCM.

Aspect White powder

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7,86 (s, 2H, **d**), 7,32 (s, 1 H, **a**), 3,52 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,3 Hz, **i**), 3,19 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, **g**), 1,63 (quint, 2H, ³J_{H-H} = 6,5 Hz, **h**).

¹³C NMR (300 MHz, MeOD) δ 157,7 (**f**), 143,6 (**e**), 133,9-132,5 (q, ²J_{C-F} = 32,9 Hz, **b**), 130,4-119,6 (q, ¹J_{C-F} = 271,7 Hz, **c**), 119,1 (**d**), 115,5 (**a**), 60,7 (**i**), 38,2 (**g**), 33,8 (**h**)

¹⁹F NMR (300 MHz, MeOD) δ -64,6 (**c**)

HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* [*M+H*]⁺ calcd for C₁₂H₁₃F₆N₂O₂: 331,09, not done yet

Melting Point 106-110°C

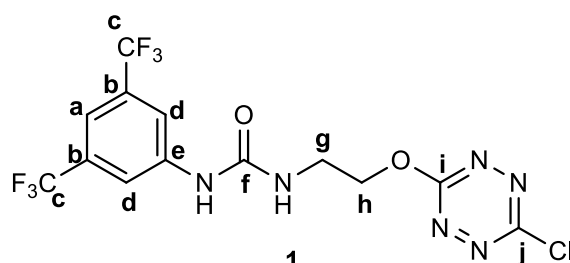
Yield 20%

General Procedure 1 for Monosubstituted Tetrazine :

Urea derivative (1 eq) was added to a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer and dissolved with dry DCM under inert atmosphere. 2,4,6-collidin (1,05 eq) was diluted with dry DCM and added dropwise to the flask. The dichlorotetrazine (1,1 eq) was dissolved in dry DCM and added dropwise to the flask. The mixture was stirred at room temperature or 40°C for the corresponding time. The mixture was extracted with aqueous HCl 1M twice, then the organic layer was extracted with water once. Organic layers were

collected, dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel eluting with the corresponding solvent mixture to give the product.

Preparation of 1 : 1-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3-(2-((6-chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)oxy)ethyl)urea



Chemical Formula : C₁₃H₉ClF₆N₆O₂

Molecular Weight : 430,69 g.mol⁻¹

General Procedure 1 was applied using 1-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3-(2-hydroxyethyl)urea (104 mg, 0,33 mmol) and dichlorotetrazine (49,8 mg, 0,33 mmol, 1eq). the mixture was stirred at room temperature for 2 hours. A gradient of solvent mixture was applied for purification from PE/EtOAc 90/10 to 70/30 leading to the product.

Aspect Pink powder

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 7,87 (s, 2H, **d**), 7,38 (s, 1 H, **a**), 4,63 (t, 2H, ³J_{H-H} = 5,1 Hz, **h**), 3,64 (t, 2H, ³J_{H-H} = 5,1 Hz, **g**)

¹³C NMR (300 MHz, MeOD) δ 168,4 (**i**), 165,5 (**j**), 157,4 (**f**), 143,3 (**e**), 133,8-132,5 (q, ²J_{C-F} = 31,1 Hz, **b**), 130,2-119,5 (q, ¹J_{C-F} = 269,5 Hz, **c**), 119,1 (**d**), 115,7 (**a**), 70,6 (**h**), 39,7 (**g**)

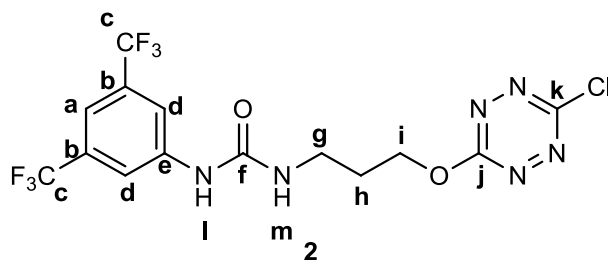
¹⁹F NMR (300 MHz, MeOD) δ -64,6 (**c**)

HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* [*M*+*Na*]⁺ calcd for C₁₃H₉ClF₆N₆NaO₂: 453,03, found 453,0277

Melting Point 180-184°C

Yield 58%

Preparation of 2 : 1-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3-(3-((6-chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)oxy)propyl)urea



Chemical Formula : C₁₄H₁₁ClF₆N₆O₂

Molecular Weight : 444,72 g.mol⁻¹

General Procedure 1 was applied using 1-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3-(3-hydroxypropyl)urea (200 mg, 0,60 mmol) and dichlorotetrazine (99,6 mg, 0,66 mmol). The mixture was stirred at 40°C for 18 hours with molecular sieves (4Å). A gradient of solvent mixture was applied for purification from PE/EtOAc 80/20 to 60/40 leading to the product.

Aspect Pink powder

¹H NMR (300 MHz, Acetone) δ 8,68 (br s, 2H, **l**), 8,12 (s, 2H, **d**), 7,52 (s, 1H, **a**), 6,31 (br t, 1H, ³J_{H-H} = 5,7 Hz, **m**), 4,63 (t, 2H, ³J_{H-H} = 6,5 Hz, **i**), 3,49 (td, 2H, ³J_{H-H} = 6,6 Hz ; ³J_{H-H} = 5,8 Hz, **g**), 2,19 (p, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, **h**)

¹³C NMR (300 MHz, Acetone) δ 168,1 (**j**), 164,7 (**k**), 155,9 (**f**), 143,7 (**e**), 133,1-131,7 (q, ²J_{C-F} = 31,7 Hz, **b**), 129,9-119,2 (q, ¹J_{C-F} = 268,9 Hz, **c**), 118,5 (**d**), 114,9 (**a**), 69,2 (**i**), 37,3 (**g**), 30,1 (**h**)

¹⁹F NMR (300 MHz, Acetone) δ -63,6 (**c**)

HRMS (ESI⁺-TOF) m/z [M]⁺ calcd for C₁₄H₁₁ClF₆N₆O₂: 445,05, found 445,0614

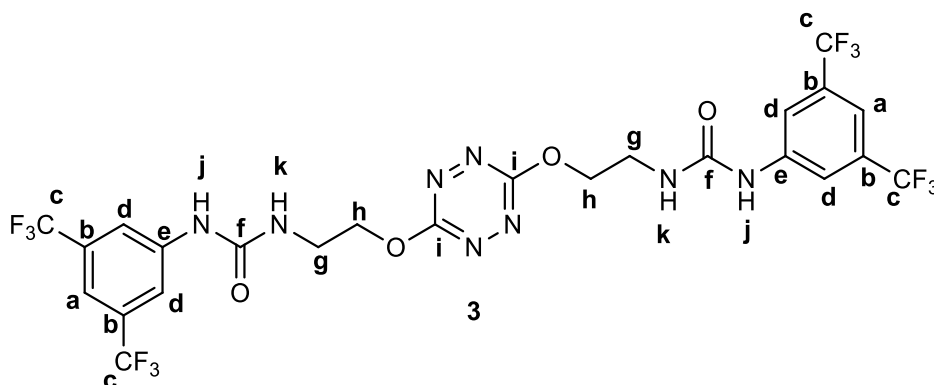
Melting Point 133-137°C

Yield 39%

General Procedure 2 for Disubstituted symmetrical Tetrazine :

Urea derivative (2 eq) was added to a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer and dissolved with dry DCM under inert atmosphere. 2,4,6-collidin (2,05 eq) was diluted with dry DCM and added dropwise to the flask. The dichlorotetrazine (1 eq) was dissolved in dry DCM and added dropwise to the flask. The mixture was stirred at 40°C for the corresponding time. DMAP (4,1 eq) was then added to the flask. The mixture was stirred at 40°C for the 18 hours. The mixture was washed with aqueous HCl 1M, 3 times. Organic layers were collected, dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel eluting with the corresponding solvent mixture to give products.

Preparation of 3 : 1,1'-(((1,2,4,5-tetrazine-3,6-diyl)bis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl))bis(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)urea)



Chemical Formula : $C_{24}H_{18}F_{12}N_8O_4$

Molecular Weight : $710,43 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

General Procedure 2 was applied using 1 1-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3-(2-hydroxyethyl)urea (200 mg, 0,63 mmol), dichlorotetrazine (48,3 mg, 0,32 mmol) and 2,4,6-collidin (79,4 mg, 0,66 mmol). The mixture was stirred at 40°C for 3 hours. Then, DMAP (160mg, 1,31 mmol) was added. A gradient of solvent mixture was applied for purification from PE/EtOAc 40/60 to 0/100, leading to the desired product.

Aspect : Pink Powder

^1H NMR (300 MHz, Acetone) δ 8,75 (br s, 2H, **j**), 8,14 (s, 4H, **d**), 7,53 (s, 2H, **a**), 6,52 (br t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 5,4 \text{ Hz}$, **k**), 4,67 (t, 4H, $^3J_{\text{H-H}} = 5,4 \text{ Hz}$, **h**), 3,77 (td, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 5,6 \text{ Hz}$; $^3J_{\text{H-H}} = 5,0 \text{ Hz}$, **g**).

^{13}C NMR (300 MHz, Acetone) δ 169,0 (**i**), 157,6 (**f**), 145,2 (**e**), 134,8-133,5 (**q**, $^2J_{\text{C-F}} = 30,8 \text{ Hz}$, **b**), 128,1-120,9 (**q**, $^1J_{\text{C-F}} = 271,0 \text{ Hz}$, **c**), 120,3 (**d**), 116,7 (**a**), 71,2 (**h**), 41,4 (**g**)

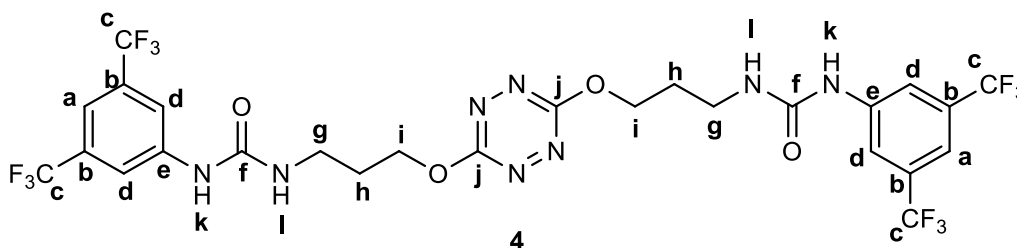
^{19}F NMR (300 MHz, Acetone) δ -62,4 (**c**)

HRMS (ESI⁺-TOF) m/z [M]⁺ calcd for $C_{24}H_{18}F_{12}N_8O_4$: 710,13, not done yet

Melting Point 206-210°C

Yield 2%

Preparation of 4 : 1,1'-(((1,2,4,5-tetrazine-3,6-diyl)bis(oxy))bis(propane-3,1-diyl))bis(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)urea)



Chemical Formula : $C_{26}H_{22}F_{12}N_8O_4$

Molecular Weight : $738,48 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

General Procedure 2 was applied using 1 1-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3-(2-hydroxyethyl)urea (200 mg, 0,63 mmol), dichlorotetrazine (48,3 mg, 0,32 mmol) and 2,4,6-collidin (79,4 mg, 0,66 mmol). The mixture was stirred at 40°C for 3 hours. Then DMAP (160mg, 1,31 mmol) was added. A gradient of solvent mixture was applied for purification from PE/EtOAc 40/60 to 0/100 leading to the product.

Aspect Pink powder

^1H NMR (300 MHz, Acetone) δ 8,65 (br s, 2H, k), 8,14 (s, 4H, d), 7,52 (s, 2H, a), 6,28 (br t, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 5,0 \text{ Hz}$, l), 4,64 (t, 4H, $^3J_{\text{H-H}} = 6,3 \text{ Hz}$, i), 3,49 (td, 2H, $^3J_{\text{H-H}} = 6,3 ; 5,4 \text{ Hz}$, g), 2,64 (p, 4H, $^3J_{\text{H-H}} = 6,4 \text{ Hz}$, h)

^{13}C NMR (300 MHz, Acetone) δ 167,5 (j), 156,1 (f), 143,8 (e), 133,1-131,7 (q, $^2J_{\text{C-F}} = 32,8 \text{ Hz}$, b), 129,9-119,5 (q, $^1J_{\text{C-F}} = 272,9 \text{ Hz}$, c), 118,5 (d), 114,9 (a), 68,2 (i), 37,5 (g), 30,2 (h)

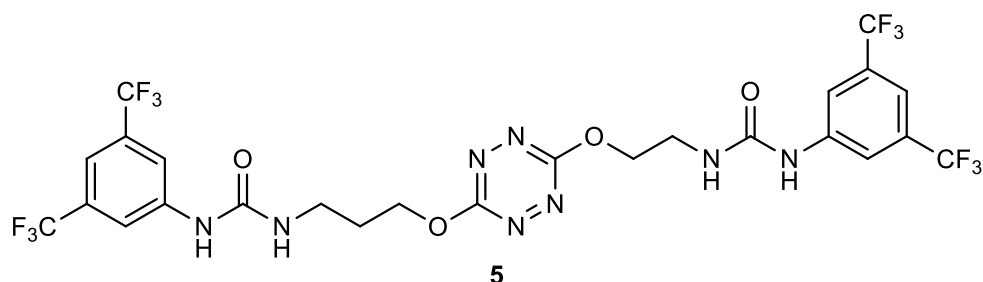
^{19}F NMR (300 MHz, Acetone) δ -62,4 (c)

HRMS (ESI⁺-TOF) m/z $[M+H]^+$ calcd for $C_{26}H_{23}F_{12}N_8O_4$: 739,16, found 739,1651

Melting Point 217-221 $^\circ\text{C}$

Yield 20%

Preparation of 5 : 1-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3-(2-((6-(3-(3-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)ureido)propoxy)-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)oxy)ethyl)urea



Chemical Formula : C₂₅H₂₀F₁₂N₈O₄

Molecular Weight : 724,46 g.mol⁻¹

1-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3-(3-((6-chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)oxy)propyl)urea (35,4 mg, 1,38 mmol, 1,04 eq) was added to a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer and dissolved with dry DMF (10 mL) under inert atmosphere. 1-(3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)-3-(2-hydroxyethyl)urea (25,1 mg, 0,08 mmol, 1 eq) was dissolved in dry DCM (2 mL) then added to the flask. DMAP (39,4mg, 0,32 mmol, 4,10eq) was added to the flask. The mixture was stirred at 40°C for 18 hours. 10mL of DCM were added, the organic layer was washed with 25 mL of aqueous HCl 1M, 2 times then with 25 mL of water. Organic layers were collected, dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel eluting with the solvent mixture PE/EtOAc 45/55 leading to the product. Complete Characterization underway.

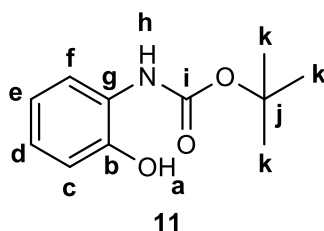
Aspect Pink powder

HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* [M+H]⁺ calcd for C₂₅H₂₁F₁₂N₈O₄: 725,14, found 739,1494

Melting Point 170-174°C

Yield 28%

Preparation of 11 : *tert*-butyl (2-hydroxyphenyl)carbamate



Chemical Formula : C₁₁H₁₅NO₃

Molecular Weight : 209,24 g.mol⁻¹

Ortho-aminophenol (200 mg, 1,8 mmol, 1 eq) was added to a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer and dissolved with ACN (18 mL) under inert atmosphere. Di-*tert*-butyl dicarbonate (628 mg, 3,5 mmol, 1,7 eq) was added to the flask. The mixture was stirred at room temperature for 5 hours and a half. The ACN was evaporated, leading to a yellow-brown powder. The powder was dissolved with 25 mL of EtOAc. The organic layer was washed with 25 mL of water twice. Organic layers were collected, dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel eluting with a gradient of solvent mixture from PE/EtOAc 90/10 to 80/20 leading to the product. The product was used as such for the next step.

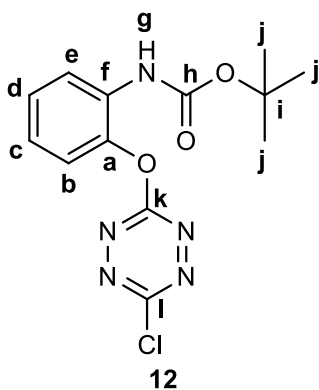
Aspect Yellow powder

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8,19 (br s, 1H, h), 7,12-6,83 (m, 4H, c, d, e, f), 6,71 (br s, 1H, a), 1,52 (s, 9H, k)

¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 155,2 (i), 147,6 (b), 125,8 (g), 121,5, 120,9, 118,9, 82,28 (j), 28,5 (k)

Yield 95%

Preparation of 12 : *tert*-butyl (2-((6-chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)oxy)phenyl)carbamate



Chemical Formula : C₁₃H₁₄ClN₅O₃

Molecular Weight : 323,73 g.mol⁻¹

Tert-butyl (2-hydroxyphenyl)carbamate (200 mg, 0,94 mmol, 1 eq) was added to a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer and dissolved with dry DCM (20 mL) under inert atmosphere. 2,4,6-collidin (120 mg, 1 mmol, 1,05 eq) was added dropwise to the flask. The dichlorotetrazine (156,8 mg, 1,04 mmol, 1,1 eq) was dissolved in dry DCM (4mL) and added dropwise to the flask. The mixture was stirred at room temperature for 48 hours. 8 mL of DCM were added to the mixture. The organic layer was washed with 20 mL of aqueous HCl 0,5M, then 20 mL of water, then 20 mL of aqueous NaHCO₃ 5% and finally 20 mL of water. Organic layers were collected, dried over MgSO₄ and filtered. The solvent was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel eluted by the solvent mixture PE/EtOAc 90/10 leading to the product. The product was used as such for the next step.

Aspect Red powder

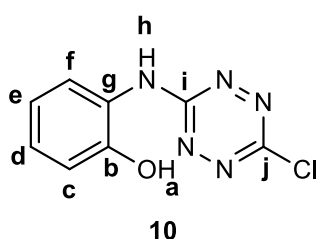
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8,14 (br d, 1H, ³J_{H-H} = 7,9 Hz), 7,87 (br s, 1H, **g**), 7,30-7,12 (m, 4H), 1,50 (s, 9H, **j**)

¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 161,9 (**k**), 160,6 (**l**), 150,8 (**h**), 141,5 (**a**), 128,4 (**f**), 126,5, 125,4, 122,3, 121,9, 85,1 (**i**), 27,7 (**j**)

HRMS (ESI⁺-TOF) *m/z* [*M*-55]⁺ calcd for C₉H₇ClN₅O₃: 268,02, found 268,0237, loss of *tert*-butyl group

Yield 53%

Preparation of **10** : 2-((6-chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)amino)phenol



Chemical Formula : C₈H₆ClN₅O

Molecular Weight : 223,62 g.mol⁻¹

Tert-butyl (2-((6-chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)oxy)phenyl)carbamate (189 mg, 0,58 mmol, 1eq) was added to a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer and dissolved with dry DCM (10 mL), cooled to 0°C under inert atmosphere. TFA (2 mL) was added dropwise. The mixture was stirred at 0°C for 30 minutes then at room temperature for another 30 minutes. The organic layer was washed with 10 mL of aqueous NaHCO₃ and organic layer was collected. Then the aqueous layer was extracted with 10 mL of DCM then 10 mL of AcOEt. Organic layers were collected, dried over MgSO₄ and filtered. The solvent

was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel (prepared with 1% of $N(CH_2CH_3)_3$) eluted by the solvent mixture PE/EtOAc 90/10 leading to a red powder. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel. A gradient of solvent mixture was applied for purification from PE/EtOAc 80/20 to 50/50 leading to the product.

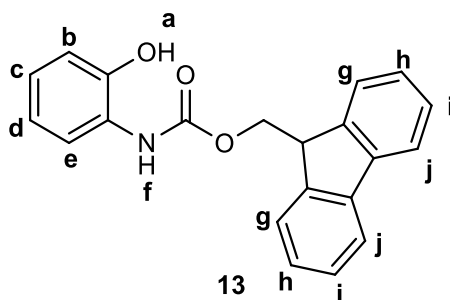
Aspect Red powder

1H NMR (300 MHz, ACN) δ 8,16 (br s, 1H, h), 7,57 (dd, 1H, $^3J_{H-H} = 8,0$ Hz ; $^4J_{H-H} = 1,4$ Hz CH aro), 6,95 (td, 1H, $^3J_{H-H} = 7,8$ Hz ; $^4J_{H-H} = 1,3$ Hz, CH aro), 6,80 (td, 2H, $^3J_{H-H} = 7,7$ Hz ; $^4J_{H-H} = 1,3$ Hz, CH aro), 6,72 (br s, 1H, a)

^{13}C NMR (300 MHz, ACN) δ 161,3 (i), 160,8 (j), 148,9 (b), 126,5, 124,3 (g), 123,3, 120,3, 115,7

Yield 78%

Preparation of 13 : (9H-fluoren-9-yl)methyl (2-hydroxyphenyl)carbamate



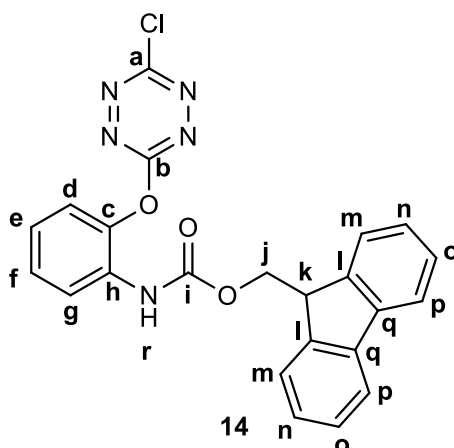
Chemical Formula : $C_{21}H_{17}NO_3$

Molecular Weight : $331,36 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Ortho-aminophenol (200 mg, 1,8 mmol, 1 eq) was added to a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer and dissolved with dry DCM (16 mL) under inert atmosphere. 9-Fluorenylmethyl N-succinimidyl carbonate (741 mg, 2,2 mmol, 1,2 eq) was added to the flask. The mixture was stirred at room temperature for 18 hours. The DCM was evaporated. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel eluting with PE/EtOAc 70/30. A second chromatography was performed eluting with PE/EtOAc 80/20. The product was not purified and was used directly for the next step.

Yield approx. 43%

Preparation of 14 : (9H-fluoren-9-yl)methyl (2-((6-chloro-1,2,4,5-tetrazin-3-yl)oxy)phenyl)carbamate



Chemical Formula : $C_{23}H_{16}ClN_5O_3$

Molecular Weight : $445,86 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

General Procedure 1 was applied using (9H-fluoren-9-yl)methyl (2-hydroxyphenyl)carbamate (79 mg, 0,24 mmol, 1 eq) and dichlorotetrazine (40 mg, 2,26 mmol, 1,1 eq). The mixture was stirred at room temperature for 3 hours and a half. The crude product was purified by flash chromatography (eluent : DCM/PE 90/10), leading to the expected product.

Aspect Red powder

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 8,10 (br d, 1H, $J = 7,9 \text{ Hz}$, **g**), 7,76 (br s, 1H, **r**), 7,71 (d, 2H, $J = 7,4 \text{ Hz}$, **p**), 7,53 (d, 2H, $J = 7,7 \text{ Hz}$, **m**), 7,28-7,22 (m, 4H, **m**, **n** et **f**), 7,17-7,12 (m, 2H, **e** et **d**), 4,53 (d, 2H, $J = 7,0 \text{ Hz}$, **j**), 4,25 (t, 1H, $J = 7,0 \text{ Hz}$, **k**)

$^{13}\text{C NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 162,2 (**b**), 160,6 (**a**), 152,7 (**i**), 142,8 (**l**), 141,6 (**c**), 141,5 (**q**), 128,4 (**h**), 128,2 (**o**), 127,3 (**n**), 126,9 (**f**), 125,6 (**d**), 125,0 (**m**), 122,2 (**e**), 122,1 (**f**), 120,3 (**p**), 71,1 (**j**), 46,7 (**k**)

Yield 65%

Serment de Galien

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



GOUARIN Guy

Développement et Caractérisation de Récepteurs d'Anions et leurs Applications Thérapeutiques dans les Canalopathies.

Th. D. Pharm., Rouen, 2019, 128 p.

RESUME

Les canalopathies représentent une famille de pathologies d'origines génétiques diverses touchant de nombreux organes. Il s'agit principalement de maladies d'origines génétiques dont les traitements sont uniquement symptomatiques. Pouvant toucher, le système nerveux, le système musculaire, le système respiratoire ou encore le système endocrinien, ces pathologies présentent des expressions phénotypiques variées rendant leur diagnostic complexe et pouvant entraîner des retards de prise en charge. De nombreuses approches thérapeutiques ont pu être développées pour subvenir au besoin des patients touchés par ces troubles, cependant de nombreux projets de recherches sont en cours pour mieux comprendre et traiter ces maladies. Nous nous proposons donc dans un premier temps de passer en revue les canalopathies, ainsi que leurs thérapeutiques actuelles et futures.

Parmi les nombreuses approches développées, celle du remplacement des canaux ioniques par de petites molécules pouvant assurer la fonction des protéines mutées est prometteuse. Cette stratégie thérapeutique présente des avantages importants mais également un certain nombre de défis à surmonter pour permettre le développement de thérapeutiques innovantes et sûres pour les patients. Il s'agit de l'approche que nous avons pu développer. Dans ce travail, nous présenterons également les travaux expérimentaux nous ayant permis de réaliser la synthèse de composés capable de piéger les anions et de démontrer les mécanismes de complexation des ions à ceux-ci.

MOTS CLES : Canalopathie – Chimie – Photophysique

JURY

Président : VERITE, Philippe, Professeur des Universités

Membres : GAUCHER, Anne, Maître de Conférences des Universités

DUBUS, Isabelle, Professeur des Universités

LAFONT, Olivier, Professeur Honoraire

DATE DE SOUTENANCE : 18 novembre 2019