



HAL
open science

Nouvelles méthodes électrochimiques pour le criblage d'inhibiteurs de transcétolases

Chloé Aymard

► **To cite this version:**

Chloé Aymard. Nouvelles méthodes électrochimiques pour le criblage d'inhibiteurs de transcétolases. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1212 . tel-02002371

HAL Id: tel-02002371

<https://theses.hal.science/tel-02002371>

Submitted on 31 Jan 2019

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.



N°d'ordre NNT :
2018LYSE1212

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N°ED 205 EDISS
École Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Biochimie

Soutenue publiquement le 09/11/2018, par :

Chloé AYMARD

Nouvelles méthodes électrochimiques pour le criblage d'inhibiteurs de transcétolases

Devant le jury composé de :

Dr. BACH Stéphane
Dr. LOJOU Elisabeth
Dr. CHARMANTRAY Franck
Pr. MIELE Adriana
Dr. DOUMECHÉ Bastien
Pr. BLUM Loïc

Ingénieur de Recherche, CNRS
Directeur de Recherche, CNRS
Chargé de recherche, CNRS
Professeur des Universités, UCBL
Maître de Conférences, UCBL
Professeur des Universités, UCBL

Rapporteur
Rapporteuse
Examineur
Examinatrice
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Bastien Doumèche, mon directeur de thèse, qui a été le premier à me faire confiance lors de mon stage de Master. C'est grâce à vous que j'ai appris à apprécier le travail en laboratoire et je peux dire aujourd'hui que de vous avoir eu en tant que directeur de thèse a été un honneur. J'ai appris énormément grâce à vous et ces 5 ans se sont écoulés à une vitesse incroyable. J'espère que nos chemins professionnels se recroiseront car le travail avec vous a vraiment été agréable.

Je remercie également le Pr. Loïc Blum, directeur du laboratoire GEMBAS, qui a également su me faire confiance et m'ouvrir les portes de son laboratoire. J'ai particulièrement apprécié de partager et discuter de mes travaux avec vous. Vos nombreux conseils et remarques me seront plus qu'utiles pour le reste de ma carrière professionnelle.

J'adresse mes sincères remerciements au Dr. Elisabeth Lojou et au Dr. Stéphane Bach, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs et au Pr. Adriana Miele et au Dr. Franck Charmantray d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, Christine Mousty et Abdelkarim Abouslham, qui ont pris le temps de faire évoluer cette thèse grâce à leurs nombreuses remarques et conseils.

Je remercie l'ensemble de l'équipe GEMBAS, je pense qu'il sera difficile de trouver une équipe équivalente en termes d'ambiance et d'entraide. Je remercie Frédérique Depierre, Béatrice Leca-Bouvier et Agnès Degiuli qui ont toujours été présentes dans les bons jours mais aussi dans les mauvais. Je me souviendrai toujours de votre « bureau des pleurs » à Curien et des conversations en langage des signes à travers les vitres des bureaux. Je remercie Agnès Girard Egrot et Ofélia Maniti qui offrent toujours de précieux conseils. Je remercie Marjorie Ochs avec qui j'ai beaucoup partagé et qui m'a énormément conseillé particulièrement sur l'enseignement à l'IUT. Merci à Guillaume Octobre qui a été de très bons conseils en Biologie Moléculaire sur le projet Glyphox. Une petite pensée également pour les anciennes doctorantes avec qui j'ai partagé de très bons

moments : Julie Carter qui a accepté de partager son bureau, Ophélie Berthuy et nos commérages à « Tracteur et Bigoudis » et Meriem Chadli qui a été très présente au moment de la rédaction. Merci aussi à Céline Mandon, que je considère un peu comme une grande sœur spirituelle et qui m'a beaucoup épaulée.

Merci à Léa, Yani et Pierre, autrement dit le noyau dur de la MDH team. Chaque moment, que ce soit les midis, les apéros, les escape-games, les soirées, fut du pur bonheur et était nécessaire à ma survie mentale. Tous les doctorants devraient, pour rester psychologiquement (in)stable, avoir à disposition des amis comme vous. Votre soutien a fait toute la différence et j'ai beaucoup appris à relativiser grâce à vous (#PLD).

Merci aussi à Laurent, le voyage à ASCOS restera à jamais gravé dans ma mémoire (en particulier, la montée des escaliers chargée de 70 kg supplémentaire...), à Chloé (#homonyme) pour les fous rires dans le bureau et ton accent à couper au couteau, à Julien pour ta lourdeur légendaire mais ton phrasé parfaitement étudié et Alizée pour tes cours de pole endiablés.

Je remercie également Franck Charmantray, Chargé de Recherche au sein de l'ICCF et porteur du projet ANR qui a financé cette thèse. Mes voyages et les réunions à Clermont Ferrand ont été très agréables et j'ai vraiment apprécié la simplicité de communication. Merci à Matilte Halma qui m'a beaucoup appris sur la production et purification de la TK, j'ai beaucoup apprécié partager la paillasse avec toi. Je remercie également Christine Mousty, Laurence Hecquet et Vanessa Prévot qui m'ont donné de nombreux conseils concernant la TK, les HDL et l'électrochimie.

Je remercie Arnaud Comte, responsable de la chimiothèque de l'ICBMS, qui a toujours été très disponible pour répondre aux questions et m'a apporté son soutien particulièrement au moment de la rédaction.

Je remercie tout particulièrement Anne Baudouin du CCRMN de l'Université Lyon 1 d'avoir réalisé les mesures en RMN et pour ses nombreux conseils pour l'exploitation des résultats.

Je remercie l'ensemble de l'équipe pédagogique du département de Génie Biologique de l'IUT Lyon 1 au sein duquel j'ai eu la chance de pouvoir intervenir en tant qu'ACE. Je remercie particulièrement Carole Bougault, Marjorie Ochs et Pascal Michalon avec qui j'ai partagé des heures de TP et TD et qui ont toujours été présents pour me donner des conseils. Je remercie également Agnès Girard Egrot avec qui j'ai passé d'agréables moments pour préparer la Fête de la Science. Je me souviendrai toujours de cette première expérience qui conforte mon envie de poursuivre dans l'enseignement.

Je remercie la team 3d.FAB, Christophe Marquette, Céline Mandon, Edwin Courtial, Célia Halimi, Emma Petiot, de m'avoir supportée (dieu sait que ce n'est facile) et d'avoir accepté les pièces rapportées à vos team building et autres BBQ villeurbannais.

Je remercie le Dr. Jean François Chateaux, maître de conférences au sein de l'INL, qui a permis la reproduction et l'amélioration du lecteur de plaques de criblage électrochimique. Un aspect plus électronique et d'autant plus intéressant du projet a pu être abordé avec lui.

Je remercie l'ensemble de l'équipe MEM² avec qui j'ai pu avoir de nombreuses interactions tout au long de cette thèse. Je remercie particulièrement David Magne, Alexandre Noiriel et Yani Arhab qui ont accepté de partager leurs locaux le temps de notre déménagement, Laurence Bessueille pour la magnifique démonstration de coulage de gels en gradient et Alaeddine El Jamal et Mathieu Borel pour m'accueillir toujours avec le sourire et la bonne humeur.

Je remercie le Dr. Lionel Ballut, maître de conférences au sein de l'IBCP, qui a pris du temps pour tenter de co-cristalliser la TK avec l'inhibiteur.

Je remercie enfin mes parents qui ont toujours été là, dans les bons comme les mauvais moments. Vous avez toujours cru en moi et votre soutien a été le plus important pour moi. Merci à ma mère qui a eu le courage de relire et corriger mes nombreuses fautes d'orthographe. Merci à Nico, Maud, Lenny et Lise que j'aime plus que tout. Je remercie également Raph qui a toujours été à l'écoute et est toujours intéressé pour parler des avancées scientifiques. Tu as su me mettre « le

coup de pied au cul » dont j'avais besoin et je ne t'en remercierai jamais assez. Le meilleur reste à venir...

SOMMAIRE

Abbréviations.....	5
Introduction générale	9
Chapitre I : Étude bibliographique	15
I. Recherche de nouveaux médicaments	17
I.1 Choix d'une cible thérapeutique.....	19
I.2. Recherche de « hits » moléculaires	21
I.3. Optimisation des « hits ».....	24
I.4. Jusqu'à la commercialisation du médicament.....	25
II. Criblage haut débit	26
II.1. Tests biologiques.....	27
II.1.1. Tests basés sur une cible isolée	28
II.1.2. Tests utilisant des cellules entières	29
II.2. Qualité d'un test haut débit	31
II.3. Criblage d'inhibiteurs d'enzymes	32
II.3.1. Inhibiteurs d'enzymes.....	33
II.3.2. Méthodes de criblages d'inhibiteurs d'enzymes	35
II.3.2.a. Test ELISA	35
II.3.2.b. Méthodes fluorimétriques	37
II.3.2.c. Méthodes basées sur la luminescence	39
II.3.2.d. Méthodes radiométriques	40
II.3.2.e. Méthodes couplées à des enzymes auxiliaires.....	41
II.3.2.f. Méthodes in silico.....	43
III. Une cible thérapeutique potentielle : la transcétolase.....	43
III.1. Mécanisme réactionnel de la TK	44
III.2. Structures tridimensionnelles des transcétolases	48
III.3. Rôle métabolique de la transcétolase	51
III.3.1. Voie des pentoses phosphates	51
III.3.2. Cycle de Calvin	53
III.3.3. Implication dans les maladies humaines	53
III.3.3.a. Cancer	53
III.3.3.b. Maladies neurodégénératives	55
III.3.3.c. Paludisme	56
III.3.3.d. Tuberculose	56
III.3.3.e. Diabète	57
III.4. Inhibiteurs des transcétolases	57
III.4.1. Analogues du cofacteur	57
III.4.2. Analogues des substrats.....	59
III.4.3. Inhibiteurs issus de criblages	60
III.5. Méthodes permettant la mesure d'activité transcétolases	62
III.5.1. Méthodes spectrophotométriques.....	63
III.5.2. Méthodes fluorimétriques	65
III.5.3. Chromatographie en phase liquide à haute performance et chromatographie en phase gazeuse	66

III.5.4. Méthodes ampérométriques	67
IV. Méthode de criblage électrochimique	72
IV.1. Biocapteurs électrochimiques	72
IV.2. Biocapteurs basés sur l'électrochimiluminescence	77
IV.3. Plaque de criblage électrochimique	80
IV.3.1. Principe	80
IV.3.2. Exemples d'application	82
V. Conclusions	83
Chapitre II : Matériel et méthodes	85
I. Expression et purification de la TK de <i>E. coli</i>	87
I.1. Produits	87
I.2. Expression	87
I.3. Purification	88
I.4. Dosage des protéines selon la méthode de Bradford	89
I.5. Électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	89
II. Méthodes spectrophotométriques	90
II.1. Produit et matériel	90
II.2. Mesure d'activité GAOx	91
II.3. Mesure d'activité TK	92
II.3.1. Mesure d'activité TK par oxydation par le ferricyanure	92
II.3.2. Mesure d'activité TK en présence d'alcool déshydrogénase	93
II.3.3. Mesure d'activité TK en présence de sel de tétrazolium	94
III. Préparation des plaques de criblages électrochimiques (PCE)	95
IV. Méthodes électrochimiques	96
IV.1. Caractérisation des électrodes	96
IV.1.1. Voltammétrie cyclique	96
IV.1.2. Analyse par les équations de Laviron	97
IV.2. Ampérométrie pulsée par intermittence	99
IV.2.1. Prétraitement des électrodes	100
IV.2.2. Détection d'activité oxydase par IPA	100
IV.2.2.a. Détection du peroxyde d'hydrogène par IPA	100
IV.2.2.b. Mesure de l'activité de la galactose oxydase de <i>Dactylium dendroides</i> (GAOx) par IPA	101
i) GAOx en solution	101
ii) Immobilisation de la GAOx	102
iii) Mesure de l'activité de la GAOx immobilisée	103
iv) Mesure de l'activité de la GAOx en présence d'un inhibiteur	104
IV.2.3. Mesure de l'activité TK par IPA	104
IV.2.3.a. Mesure de l'activité TK par le système bienzymatique	104
IV.2.3.b. Mesure de l'activité TK par oxydation de l'intermédiaire réactionnel	105
i) Optimisation de la mesure d'activité TK	106
ii) Mesure de la TK immobilisée dans les hydroxydes doubles lamellaires (HDL)	106
iii) Criblage de la chimiothèque de l'ICBMS	107
iv) Caractérisation de I38-49	107
V. Electrochimiluminescence	108
V.1. Produits et appareils	108

V.2. Prétraitement des électrodes	108
V.3. Mesure d'activité oxydase par ECL	108
V.3.1. Détection du peroxyde d'hydrogène par ECL	110
V.3.2. Mesure de l'activité de la galactose oxydase de <i>Dactylium dendroides</i> par ECL	111
V.4. Mesure d'activité TK	111
VI. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du proton.....	112
VI.1. Appareil.....	112
VI.2. Mesure d'activité TK	112
VII. Traitement du signal.....	113
VII.1. Traitement du signal spectrophotométrique.....	113
VII.2. Traitement du signal obtenu par ampérométrie pulsée par intermittence.....	115
VII.3. Traitement du signal par ECL	116
VII.4. Mesure d'inhibition	117
VII.5. Variabilité des mesures	118
VII.5.1. Variabilité de la détection du peroxyde d'hydrogène	118
VII.5.2. Variabilité de la mesure d'activité GAOx.....	119
VII.5.3. Variabilité de la détection du ferrocyanure	119
VII.5.4. Variabilité de la détection d'activité TK.....	120
Chapitre III : Mesures à haut débit d'activité oxydase par ampérométrie pulsée par intermittence et électrochimiluminescence	121
I. Introduction.....	123
II. Détection du peroxyde d'hydrogène	124
II.1. Détection du peroxyde d'hydrogène par IPA	124
II.1.1. Caractérisation des électrodes carbone dopées au Bleu de Prusse	124
II.1.2. Optimisation de la détection de l'H ₂ O ₂ par IPA.....	128
II.1.2.a. Influence du prétraitement des électrodes	128
II.1.2.b. Influence du tampon de mesure	130
II.1.2.c. Influence des paramètres électrochimiques en IPA	131
II.2. Détection du peroxyde d'hydrogène par ECL	131
II.2.1. Optimisation de la détection de l'H ₂ O ₂ par ECL.....	132
II.2.1.a. Influence du prétraitement des électrodes	132
II.2.1.b. Influence du tampon de mesure	133
II.2.1.c. Influence des paramètres électrochimiques.....	133
II.3. Comparaison IPA/ECL	134
II.3.1. Caractéristiques de la détection de l'H ₂ O ₂	134
II.3.2. Variabilité inter-électrodes.....	136
II.4. Comparaison avec des systèmes ou des méthodes déjà existantes	137
II.4.1. Autres systèmes électrochimiques ou basés sur l'ECL	137
II.4.2. Autres méthodes permettant la détection de l'H ₂ O ₂	140
III. Mesure de l'activité GAOx par IPA et ECL	142
III.1. Temps de réaction enzymatique	142
III.2. Optimisation de la quantité de GAOx.....	145
III.3. Immobilisation de la GAOx	147
III.4. Stabilité temporelle de la GAOx immobilisée.....	152
III.5. Désorption de la GAOx immobilisée	153
III.6. Variabilité de la mesure d'activité GAOx@laponite	154

III.7. Comparaison avec un autre système électrochimique	155
III.8. Comparaison avec une autre méthode : test colorimétrique.....	156
IV. Mesure de l'activité de la GAOx en présence d'un inhibiteur.....	158
V. Mesures d'activité TK par le système bi-enzymatique.....	160
V.1. Activité de la GAOx@laponite en présence des substrats de la TK.....	161
V.2. Mesure de l'activité TK-GAOx par IPA	162
V.3. Mesure de l'activité TK-GAOx par ECL	165
VI. Conclusion.....	165
Chapitre IV : Identification d'inhibiteurs de la TK par oxydation d'un intermédiaire réactionnel	167
I. Introduction.....	169
II. Détection du ferrocyanure par IPA	170
II.1. Caractérisation électrochimique.....	170
II.2. Optimisation des paramètres électrochimiques.....	172
II.3. Caractéristiques analytiques.....	175
II.4. Comparaison avec d'autres systèmes électrochimiques	176
III. Mesure d'activité TK par IPA	176
III.1. Temps de réaction enzymatique	177
III.2. Influence de la concentration en ferricyanure	178
III.3. Influence de la quantité d'enzyme	179
III.4. Influence du substrat donneur.....	180
III.5. Immobilisation de la TK dans HDL.....	182
III.6. Influence du diméthylsulfoxyde sur l'activité enzymatique	183
III.7. Mesure de l'activité TK à l'aide d'électrode de carbone dopées au Bleu de Prusse ..	184
III.10. Reproductibilité sur la mesure d'activité.....	186
III.11. Comparaison avec le système bienzymatique TK-GAOx.....	188
IV. Criblage d'inhibiteurs de la transcétolase d'E.Coli	190
IV.1. Validation de la preuve de concept avec des inhibiteurs connus de la TK	190
IV.2. Criblage d'une partie de la chimiothèque de l'ICBMS.....	192
IV.3. Caractérisation du hit I38-49	193
IV.3.1. Première idée sur l'efficacité de l'inhibiteur	193
IV.3.2. Détermination des paramètres cinétiques en présence de I38-49	194
IV.3.2.a. Détermination du mécanisme d'inhibition par IPA.....	195
IV.3.2.b. Détermination du mécanisme d'inhibition par spectrophotométrie	197
IV.3.2.c. Détermination du mécanisme d'inhibition par résonance magnétique nucléaire	201
IV.3.3. Molécules analogues à I38-49	204
V. Conclusions	206
Conclusions et perspectives	207
Références bibliographiques	215
Annexes	235

Abréviations

ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
ADH	Alcool déshydrogénase
Ag/AgCl	Argent/chlorure d'argent
BSA	Albumine de sérum bovin
BP	Bleu de Prusse
CCD	Dispositif à couplage de charge (<i>charge-coupled device</i>)
CI ₅₀	Concentration inhibitrice 50
C-term	Extrémité C-terminale
DHA	Dihydroxyacétone
DHETPP	α,β -dihydroxyéthylthiamine pyrophosphate
DMSO	Diméthylsulfoxyde
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Electrochimiluminescence
E4P	D-erythrose-4-phosphate
L-ery	L-erythrulose
FA	Formaldéhyde
F6P	D-fructose-6-phosphate
GA	Glycolaldéhyde
GAOx	Galactose oxydase
GAOx@matrice	Galactose oxydase immobilisée dans une matrice
G3P	D-glycéraldéhyde-3-phosphate
HDL	Hydroxyde double lamellaire
Hepes	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HPA	Hydroxypyruvate
HPP	Hydroxyphénylpyruvate
HRP	PEroxydase de Raifort (<i>HorseRadish Peroxidase</i>)
HTS	Criblage haut débit (<i>High Throughput Screening</i>)
I38-49	2-(4-ethoxyphenyl)-1-(pyrimidin-2-yl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine
IPA	Ampérométrie pulsée par intermittence (<i>Intermittent Pulse Amperometry</i>)
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Milieu Luria-Bertani (ou <i>Lysogeny Broth</i>)

MOPS	Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
NAD(P) ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) oxydée
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduite
N-term	Extrémité N-terminale
NTA	Acide nitrilotriacétique
PAGE	Electrophorèse sur gel d'acrylamide (<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PCB	Plaque de circuit imprimé (<i>Printed Circuit Board</i>)
PCE	Plaque de criblage électrochimique
pD	Potentiel deutéré
PPi	Pyrophosphate inorganique
PPO	Polyphénol oxydase
PW	Blanc de Prusse (<i>Prussian White</i>)
R5P	D-ribose-5-phosphate
RMN- ¹ H	Résonance magnétique nucléaire du proton
ROI	Région d'intérêt (<i>Region Of Interest</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	Déviations standard (<i>Standard Deviation</i>)
SDS	Dodécylsulfate de sodium
S7P	D-sédoheptulose-7-phosphate
TA	Transaldolase
TEA	Triéthanolamine
TEMED	N,N,N',N'-Tetraméthyléthylènediamine
TK	Transcétolase
TK@HDL	Transcétolase immobilisée dans des hydroxydes double lamellaire
<i>tk</i>	Gène codant pour la transcétolase humaine
<i>tkl1</i>	Gène codant pour la protéine TKTL1
<i>tkl2</i>	Gène codant pour la protéine TKTL
TPP	Thiamine pyrophosphate
UA	Unité arbitraire
UV	Ultraviolet
VC	Voltammétrie cyclique

VPP Voie des pentoses phosphates

X5P D-xylulose-5-phosphate

Introduction générale

Le processus de découverte d'un nouveau médicament est long et nécessite l'investissement de millions d'euros. Chaque étape de ce processus est optimisée pour que le temps d'étude et le coût des recherches soient réduits. Une des étapes cruciales de ce processus est le développement de méthodes de criblages dites haut débit : elles permettent de tester rapidement de nombreux candidats médicaments sur une cible thérapeutique préalablement identifiée. Ces méthodes nécessitent sensibilité, rapidité, faible coût et miniaturisation. Les cibles thérapeutiques visées par ces médicaments sont majoritairement des enzymes pour lesquelles il est nécessaire de trouver des inhibiteurs. Les tests haut débit développés pour cribler des inhibiteurs d'enzymes sont pour la plupart basés sur des méthodes spectrophotométriques ou fluorimétriques sujettes à des interférences optiques.

Les méthodes électrochimiques, basées sur le transfert d'électrons entre une électrode et une espèce redox, s'affranchissent de ces contraintes optiques. Cependant, la plupart d'entre elles ne sont pas adaptées au criblage en raison de leur faible débit et de l'absence de miniaturisation. Cette problématique initiale est à la genèse de ce projet de thèse.

L'objectif de ces travaux de thèse a donc été, d'une part, de développer une méthode électrochimique permettant de mesurer des activités enzymatiques à haut débit et d'autre part, d'utiliser ce système électrochimique afin de cribler des inhibiteurs d'enzymes. Afin d'appuyer cette preuve de concept, une enzyme cible a été sélectionnée pour son implication dans de nombreuses pathologies et dans la survie de parasites pathogènes : la transcétolase. Afin de mesurer l'activité de cette enzyme par électrochimie, deux méthodes ont été confrontées et la plus adaptée a été utilisée afin de cribler une banque de molécules pour identifier des inhibiteurs de la transcétolase.

Ce projet est le fruit d'une collaboration entre l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) et l'Institut de Chimie de Clermont Ferrand (ICCF) et s'inscrit dans le cadre d'un ANR (JCJC2013 SVSE5 « Transbioscreen »).

Afin de répondre à cette problématique et atteindre les objectifs exposés, quatre chapitres seront développés dans ce manuscrit. Le premier portera sur une étude bibliographique complète permettant de contextualiser ce projet de thèse. Cette étude introduira les différentes étapes dans la recherche de nouveaux médicaments et, en particulier, l'importance du développement de tests à haut débit. Elle décrira les différents tests permettant le criblage d'inhibiteurs d'enzymes et se

focalisera sur la transcétolase. Ce premier chapitre se conclura par un état de l'art des systèmes électrochimiques existants afin de souligner le besoin de systèmes électrochimiques à haut débit. Après un exposé des différentes méthodes utilisées au sein d'un deuxième chapitre, un premier système rapporteur de l'activité de la transcétolase sera développé dans le troisième chapitre. Ce système est basé sur l'utilisation d'une enzyme auxiliaire, la galactose oxydase, capable de convertir les produits issus de la réaction catalysée par la transcétolase, en molécules détectables par électrochimie.

Enfin, le dernier chapitre présentera une seconde méthode de mesure de l'activité de la transcétolase basée sur l'oxydation d'un intermédiaire réactionnel par un complexe ferreux très utilisé en électrochimie. À l'issue de ce développement, l'un des deux systèmes rapporteurs sera utilisé pour cribler la chimiothèque de l'ICBMS.

Un bilan des résultats obtenus au cours de cette thèse clôturera ce manuscrit et les perspectives offertes par ces travaux de recherche seront exposées

Chapitre I : Étude bibliographique

I. Recherche de nouveaux médicaments

Selon l'article L.5111-1 du Code de la Santé Publique, un médicament est une « substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies ». ¹ La recherche de nouveaux médicaments est donc initiée parce qu'une maladie ou une condition médicale nécessite un traitement adapté et efficace. Ces maladies sont recensées et codifiées dans la classification internationale des maladies publiée par l'organisation mondiale de la santé (OMS) ² (Tableau 1). La recherche de médicaments concerne donc toutes les maladies, touchant une grande partie de la population (maladies neurodégénératives, cancer, maladies infectieuses...) ou seulement une faible portion (maladies dites orphelines).

Une fois la maladie ciblée, le processus de découverte d'un nouveau médicament regroupe différentes étapes aboutissant à sa mise sur le marché (Figure 1). ³⁻⁵

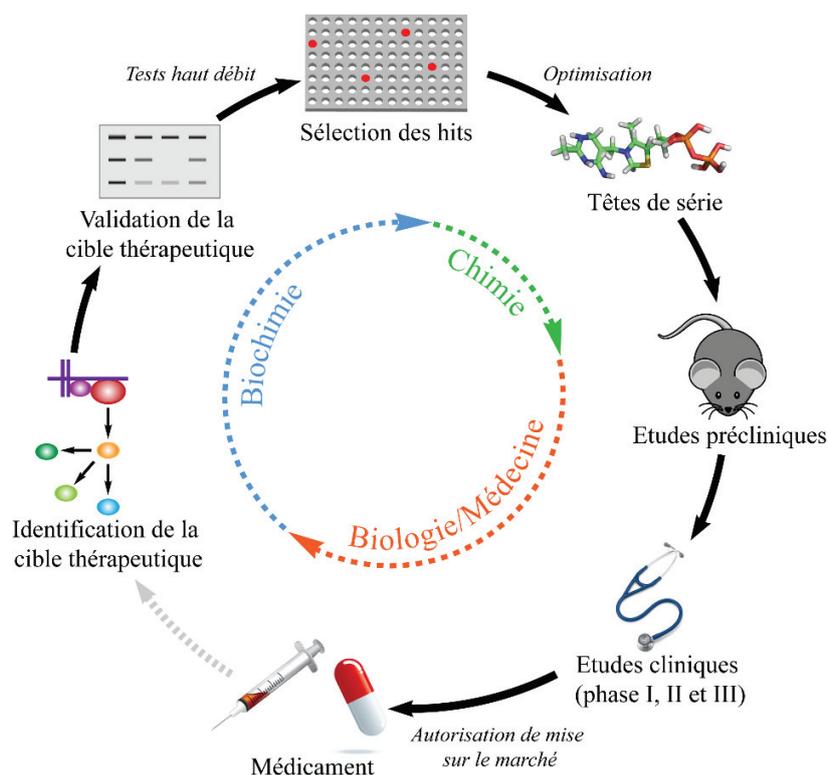


Figure 1. Processus de développement d'un médicament : de l'identification de la cible thérapeutique à la commercialisation du médicament. Modifié à partir de Hoelder et al. 2012. ⁵

Ce processus nécessite tout d'abord l'identification et la caractérisation d'une cible thérapeutique impliquée dans la pathologie. Des tests haut débit sont ensuite utilisés afin de trouver des molécules, appelées « hits » ayant un effet modulateur sur ces cibles thérapeutiques. Ces hits sont alors optimisés (en modifiant leur structure chimique) afin d'obtenir des molécules plus actives et spécifiques appelées « lead compounds » ou têtes de série.

Tableau 1. Classification internationale des maladies (CIM) d'après l'organisation mondiale de la santé.

Chapitre	Codes	Titre
I	A00-B99	Certaines maladies infectieuses et parasitaires
II	C00-D48	Tumeurs
III	D50-D89	Maladies du sang et des organes hématopoïétiques et certains troubles du système immunitaire
IV	E00-E90	Maladies endocriniennes, nutritionnelles et métaboliques
V	F00-F99	Troubles mentaux et du comportement
VI	G00-G99	Maladies du système nerveux
VII	H00-H59	Maladies de l'œil et de ses annexes
VIII	H60-H95	Maladies de l'oreille et de l'apophyse mastoïde
IX	I00-I99	Maladies de l'appareil circulatoire
X	J00-J99	Maladies de l'appareil respiratoire
XI	K00-K93	Maladies de l'appareil digestif
XII	L00-L99	Maladies de la peau et du tissu cellulaire sous-cutané
XIII	M00-M99	Maladies du système ostéo-articulaire, des muscles et du tissu conjonctif
XIV	N00-N99	Maladies de l'appareil génito-urinaire
XV	O00-O99	Grossesse, accouchement et puerpéralité
XVI	P00-P96	Certaines affections dont l'origine se situe dans la période périnatale
XVII	Q00-Q99	Malformations congénitales et anomalies chromosomiques
XVIII	R00-R99	Symptômes, signes et résultats anormaux d'examen cliniques et de laboratoire, non classés ailleurs
XIX	S00-T98	Lésions traumatiques, empoisonnements et certaines autres conséquences de causes externes
XX	V01-Y98	Causes externes de morbidité et de mortalité
XXI	Z00-Z99	Facteurs influant sur l'état de santé et motifs de recours aux services de santé
XXII	U00-U99	Codes d'utilisation particulière

Enfin, ces candidats médicaments sont utilisés dans des tests précliniques et cliniques afin de vérifier leur efficacité, leur pharmacocinétique et leur toxicologie sur des cultures de cellules,

des animaux puis sur l'homme. Ce processus est donc pluridisciplinaire puisqu'il nécessite une expertise biochimique, chimique, biologique et médicale. Le temps nécessaire pour atteindre la commercialisation d'un médicament peut prendre entre 12 et 15 ans et nécessite des millions d'euros d'investissement.⁴ Chaque étape est donc optimisée pour tenter d'en réduire le coût et le temps nécessaire.

I.1 Choix d'une cible thérapeutique

La première étape dans le développement d'un médicament est l'identification et la caractérisation d'une cible thérapeutique associée à une pathologie.⁶

Une molécule peut être considérée comme une cible si son activation ou son inhibition entraîne un effet thérapeutique curatif pour la pathologie concernée. En effet, une molécule cible peut être pathologiquement produite en quantité trop importante, ce qui est le cas dans certains cancers pour lesquels de nombreuses protéines sont surexprimées afin de permettre la survie des cellules cancéreuses.⁷⁻⁹ Dans ce cas, la stratégie thérapeutique repose sur l'inhibition de cette cible pour contrer cette surexpression. La molécule cible peut également être produite en trop faible quantité, ce qui est, par exemple, le cas des patients atteints d'alcoolisme chronique présentant un déficit en thiamine, encore appelé vitamine B1.^{10,11} Une activation des voies métaboliques impliquées dans la production de cette vitamine pourrait être une stratégie pour combattre ce type de carence. Enfin, la cible thérapeutique peut avoir, dans un cadre pathologique, une structure ou une conformation différente. Par exemple, la maladie de Creutzfeldt-Jakob est caractérisée par l'accumulation de la protéine prion, présentant une conformation différente par rapport à la protéine d'un patient sain, lui conférant sa résistance aux protéases.¹² L'élimination des protéines modifiées ou l'inhibition de cette modification sont alors les processus ciblés pour le traitement de cette pathologie.¹³

La nature des cibles thérapeutiques est extrêmement variée mais la plupart des médicaments actuels cible des protéines impliquées dans la pathologie plutôt que des lipides ou des sucres.^{14,15} Hopkins et Groom ont publié une répartition des cibles thérapeutiques en fonction de leur classe biochimique¹⁵ (*Figure 2*) : ce sont majoritairement des enzymes (kinases, oxydoréductases, protéases, phosphatases, phosphodiesterases), des récepteurs membranaires (tels que les récepteurs aux protéines G ou des récepteurs aux hormones) ou encore des canaux et transporteurs (tels que les canaux calciques). D'autres cibles telles que l'ADN, les ARNs ou encore des facteurs de

croissance sont également de plus en plus étudiées.^{16,17} La majorité des médicaments exerce ainsi leur action en se fixant sur la cible thérapeutique et en régulant son activité biologique.

L'ensemble des cibles thérapeutiques découvertes depuis les années 90 est réuni dans la « therapeutic target database ». ¹⁸ Le nombre de cibles thérapeutiques est passé de 500 dans les années 90 à plus de 3000 aujourd'hui. Cette augmentation est due aux nombreux progrès en génomique¹⁹, en résolution de structures protéiques²⁰, en protéomique²¹ ou encore en résolution des mécanismes moléculaires des maladies.^{22,23} D'une part, ces progrès ont permis de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques et d'approfondir les connaissances sur les cibles déjà connues. D'autre part, ils ont permis de comprendre le mécanisme d'action des médicaments et de pouvoir prédire le comportement d'un candidat-médicament.

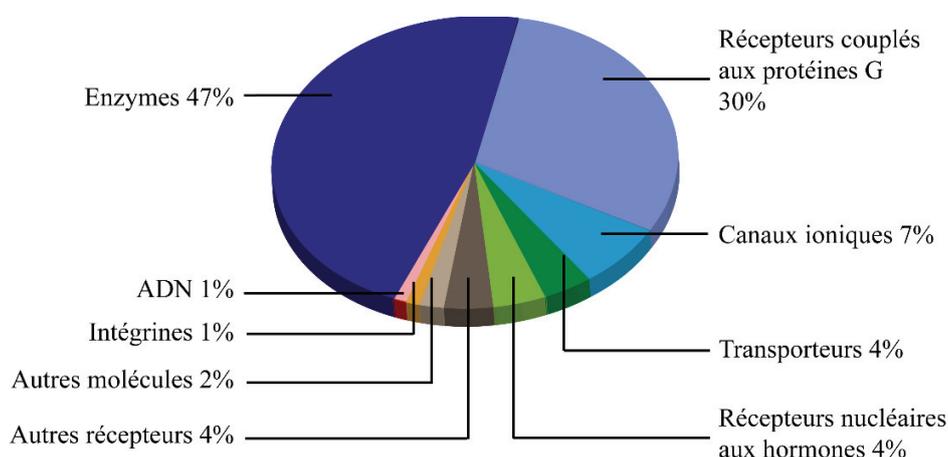


Figure 2. Distribution des cibles thérapeutiques en fonction de leur classe biochimique. Reproduit d'après Hopkins et Groom (2002).¹⁵

Trois principales approches sont utilisées de manière successive ou indépendante pour la recherche de cibles thérapeutiques. La première est la recherche bibliographique qui utilise des outils informatiques pour identifier les cibles thérapeutiques potentielles et prioriser les plus intéressantes.²⁴ Cette recherche nécessite de nombreuses ressources telles que les publications, les brevets, les bases de données génomiques et protéomiques. La deuxième approche est l'étude des niveaux d'expression des protéines ou de transcription des ARN messagers afin de vérifier leur présence dans un cas pathologique et si ces niveaux d'expression sont corrélés à l'évolution de la pathologie.⁴ Enfin, l'identification de cibles thérapeutiques peut être réalisée en cherchant des associations génétiques, c'est-à-dire, la recherche d'un lien entre le polymorphisme génétique et le

risque d'apparition de maladie. Par exemple, les patients atteints de la maladie d'Alzheimer peuvent présenter des mutations au niveau du gène codant pour la protéine précurseur de l'amyloïde, provoquant la production croissante et le dépôt dans le cerveau du peptide amyloïde- β , caractéristique de cette maladie.²⁵ Cette protéine constitue donc une cible thérapeutique intéressante pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Ces méthodes permettent d'identifier des biomolécules cibles devant réunir un critère important : le caractère « druggable ». Selon Hughes et *al.*, une cible est « druggable » si la fixation d'une petite molécule ou d'entités biologiques plus grosses entraîne une réponse biologique pouvant être mesurée *in vivo* et *in vitro*.^{4,15} Ce dernier critère est ainsi exploité au cours d'expériences de validation pour s'assurer que la modulation de la cible conduirait à l'effet thérapeutique souhaité. En effet, il est nécessaire d'une part de s'assurer de l'effet bénéfique de la modulation de l'activité de la cible sur la pathologie étudiée et d'autre part que les conséquences de ces altérations ne seront pas néfastes. Par exemple, dans le cas de certains cancers, deux points doivent être vérifiés : d'abord que la cible thérapeutique est bien suractivée ou fait partie d'une voie métabolique suractivée, et d'autre part, que l'inhibition de cette cible conduit aux effets désirés sur le patient (tels que la régression d'une tumeur ou l'augmentation de la survie cellulaire) sans pour autant provoquer des effets secondaires. Cette validation est basée sur une approche multifactorielle utilisant des outils *in vitro* et *in vivo*⁴ tels que l'utilisation d'animaux transgéniques, d'ARN interférents, de tissus « knockout » (dans lesquels un gène codant pour la cible thérapeutique n'est plus exprimé) ou d'anticorps monoclonaux.

I.2. Recherche de « hits » moléculaires

Une fois la cible thérapeutique identifiée, caractérisée et validée, il est nécessaire de trouver des molécules, appelées « hits », capables de se fixer sur ces cibles et de moduler leur fonction. Cette étape est réalisée à l'aide de méthodes de criblage permettant de tester de façon rapide et efficace des bibliothèques de molécules appelées chimiothèques en un temps réduit. Deux approches sont généralement utilisées pour trouver ces hits : le criblage basé sur les connaissances ou « knowledge-based screening » et le criblage au hasard ou « random screening ». La première approche nécessite des connaissances sur la cible thérapeutique (telles que sa structure ou ses ligands naturels) ou sur des médicaments déjà développés agissant sur cette cible. Ces informations permettront alors de sélectionner une partie des molécules à évaluer. En revanche, le criblage au

hasard ne demande aucune information sur la cible ni sur le type de molécules pouvant la moduler et nécessite un criblage plus large de collections de molécules. En réalité, la plupart des criblages sont réalisés avec un mélange de ces deux approches : un minimum de connaissances sur la cible thérapeutique est nécessaire mais aucune sélection des molécules à tester n'est pré-requis.

La recherche de « hits » peut être menée suivant différentes stratégies : le criblage haut débit, le criblage de fragments moléculaires ou le criblage virtuel.

Le criblage haut débit (« high throughput screening » ou HTS) est le premier type de criblage apparu dans les années 90 et actuellement le plus utilisé.²⁶ Il consiste à tester un grand nombre de molécules naturelles ou synthétiques contenues dans une chimiothèque focalisée, ou non, sur une famille de molécules (*Figure 3A*). Le principal avantage du HTS est qu'il est peu biaisé et qu'il permet l'identification de molécules (naturelles ou issues de synthèses déjà décrites), facilement accessibles. Cependant, ce sont généralement des molécules de haut poids moléculaire et peu biocompatibles (peu hydrosolubles) nécessitant, par la suite, de longues étapes d'optimisation pour changer ces propriétés.

Le criblage de fragments de molécules ou « fragment screening » consiste à étudier les interactions entre la cible thérapeutique et des petits composés chimiques (de taille inférieure à 300 Da).^{27,28} Ces fragments sont ensuite associés entre eux pour former une plus grosse molécule représentant le hit final (*Figure 3B*). L'avantage de cette méthode est qu'elle permet de synthétiser des ligands de plus forte affinité pour la cible thérapeutique, de plus petite taille et contenant moins de groupements stériquement encombrants. Cependant, ce type de criblage nécessite l'utilisation de méthodes biophysiques coûteuses et encombrantes telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN)²⁹, la résonance plasmonique de surface (SPR)³⁰ ou encore la cristallographie aux rayons X.³¹

La dernière stratégie de criblage est le criblage virtuel, réalisé *in silico* à l'aide d'outils informatiques, et comprend deux approches. La première sélectionne, à partir de bases de données, des molécules ayant une structure proche du ligand naturel de la cible thérapeutique.³² La deuxième approche appelé « docking » évalue de façon computationnelle la probabilité qu'une molécule se fixe sur la cible en calculant des énergies de liaison (*Figure 3C*). Le criblage virtuel est bien évidemment plus rapide et moins coûteux que les méthodes physiques et permet d'évaluer des molécules qui ne sont pas forcément à disposition de tous. Il est cependant très sélective et

seulement prédictive, il doit donc être associé à une méthode physique afin de vérifier les hits virtuellement trouvés.

Ces différentes stratégies peuvent être ainsi utilisées indépendamment les unes des autres mais leur combinaison augmente la probabilité de trouver un hit pouvant évoluer vers un médicament.⁵

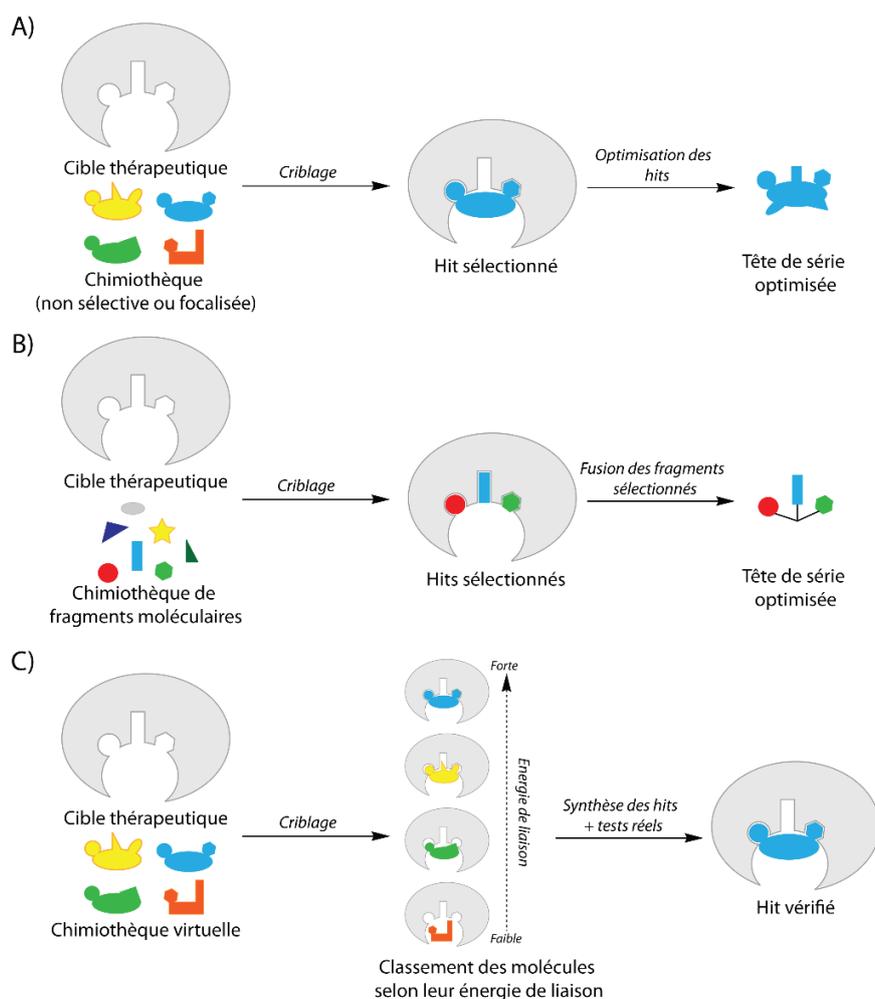


Figure 3. Schéma des différents types de criblages : A) Criblage haut débit d'une chimiothèque non sélective ou focalisée sur un type de molécules. B) Criblage de fragments moléculaires. C) Criblage virtuel basé sur le « docking » moléculaire.

Le type de chimiothèque utilisé va donc dépendre de l'approche choisie et de la stratégie de criblage sélectionnée. On distingue donc des chimiothèques dites « réelles » qui sont soit non sélectives soit focalisées sur un type de molécules. Par exemple, la Chimiothèque Nationale regroupe les collections de produits de synthèse, de composés naturels et d'extraits naturels existants dans les laboratoires français³³ tandis qu'une chimiothèque d'inhibiteurs de kinases

développée par Akritopoulou-Zanze et Hajduk est un exemple de banque focalisée.³⁴ On distingue également des chimiothèques virtuelles constituées de molécules générées *in silico* et qu'il faudra par la suite synthétiser pour les tester avec une méthode réelle.^{35,36}

I.3. Optimisation des « hits »

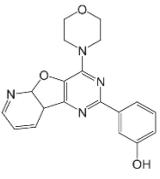
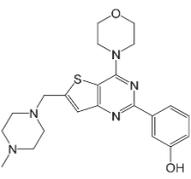
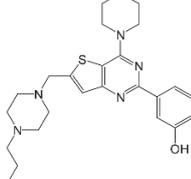
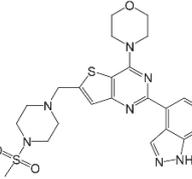
Les hits trouvés à partir des criblages haut débit vont ensuite être optimisés par des cycles de synthèse chimique, de modélisation et de tests biologiques pour obtenir de nouvelles molécules plus efficaces et spécifiques appelées « leads compounds » ou têtes de série (*Figure 1*). Le but de cette étape est de développer une ou plusieurs molécules avec des propriétés physicochimiques et biologiques propre à un médicament : en plus d'avoir une forte affinité pour la cible (de l'ordre du nanomolaire), les têtes de série ont besoin d'être sélectives, d'avoir une certaine perméabilité cellulaire (afin d'atteindre la cible au sein de la cellule) ou encore d'être biocompatible afin de générer un médicament sûr pour l'homme.^{37,38} Des études pharmacodynamiques sont également nécessaires afin de vérifier que le ou les composés agissent sur la cible thérapeutique et qu'ils n'entraînent pas d'effets secondaires sur la biologie de la cellule. Généralement, les premières étapes d'optimisation visent à modifier les substitutions du hit et très peu le cœur actif de la molécule.^{4,39}

Ce challenge multiparamétrique est souvent comparé à la résolution d'un Rubik's cube : il est plutôt simple de résoudre une ou deux faces du cube mais beaucoup plus compliqué de résoudre les six en même temps. Cependant, il est difficile de pouvoir prédire exactement l'effet d'une modification chimique sur le comportement de la molécule.⁵ Malgré ce verrou, la compréhension des facteurs influençant la pharmacocinétique et son association avec la biologie structurale³⁹ et les outils bioinformatiques⁴⁰ permettent aujourd'hui de connaître les propriétés qu'il faut moduler pour améliorer le futur médicament. Cette étape repose sur plusieurs stratégies telles que l'identification du principe actif (pharmacophore), l'étude de la relation structure activité, le remplacement bioisostérique ou encore l'optimisation de la nature et de la position des groupements fonctionnels.⁴¹

Le *Tableau 2* donne l'exemple d'une optimisation multifactorielle d'un inhibiteur de phosphoinositide-3-kinase^{42,43} : l'efficacité, la sélectivité par rapport à d'autres kinases (DNA-PK), la solubilité et la biocompatibilité orale (c'est-à-dire le pourcentage de médicament qui va rejoindre

la circulation sanguine après une prise orale) sont mesurées à chaque modification du hit de départ pour obtenir une tête de série actuellement en essai clinique phase II (GDC-0941).

Tableau 2 Illustration de l'optimisation multidimensionnelle conduisant à une tête de série (GDC-0941). Des mesures de solubilité, de sélectivité (vis-à-vis d'autres kinases) et de biocompatibilité orale ont été réalisées sur le hit de départ (PI-103) et après plusieurs étapes d'optimisation (les paramètres notés en rouge sont limitants pour le développement d'un médicament). Traduit depuis Hoelder et al.^{5,42,43}

Structure				
	PI-103	PI-540	PI-620	GDC-0941
Efficacité :				
CI₅₀ p110α (μM)	2	10	7	3
CI₅₀ cellulaire (nM)	15	13	10	13
CI₅₀ DNA-PK (μM)	23	526	147	1230
Solubilité (μM)	3,5	>100	>100	>100
Biocompatibilité orale (%)	-	13	10	77

I.4. Jusqu'à la commercialisation du médicament

Une fois l'étape d'optimisation validée générant des têtes de série, le procédé de développement d'un médicament continue par une série de tests précliniques réalisés sur des cellules et des animaux.³⁹ Cette étape permet dans un premier temps d'estimer les coûts de production du candidat médicament à grande échelle, facteur important pour le passage en phase clinique. Dans un second temps, des études de formulation sont réalisées afin de trouver le moyen le plus adapté d'administrer le médicament que ce soit à des animaux ou à des Hommes. Enfin, de nombreuses informations sur l'efficacité et la sureté de ce futur médicament sont collectées *in vivo* avant de pouvoir le tester sur l'Homme. Ainsi des études pharmacodynamiques (c'est-à-dire l'action du médicament dans le corps), pharmacocinétiques (c'est-à-dire le devenir du médicament dans le corps), toxicologiques et d'ADME (adsorption, distribution, métabolisme et excrétion) sont réalisées. Ces informations permettent de déterminer la dose de médicament nécessaire pour qu'il soit à la fois efficace et non toxique pour l'Homme. Une fois ces différentes études réalisées, le système français requière qu'elles soient étudiées par le comité de protection des personnes et

l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) qui vont autoriser ou non les tests sur l'Homme.⁴

Les essais cliniques constituent l'étape la plus longue et la plus coûteuse du développement d'un médicament. L'efficacité, la pharmacocinétique et la sécurité d'emploi du candidat médicament sont testées sur l'Homme. Ces essais cliniques sont divisés en quatre phases. Les trois premières sont réalisées sur un nombre croissant de patients afin d'étudier l'efficacité et les éventuels effets secondaires des candidats médicaments et de constituer le dossier de demande d'autorisation sur le marché.⁴⁴ La quatrième phase ou la phase de pharmacovigilance débute quand l'autorisation de mise sur le marché est obtenue et dure pendant toute la commercialisation du médicament. Elle est donc testée sur un très grand nombre de personnes en vue de mettre en évidence de nouveaux effets secondaires (positifs ou négatifs). Le nombre de candidats médicaments atteignant cette dernière phase est très faible par rapport au nombre de tête de série générées (*Figure 4*).⁴⁵

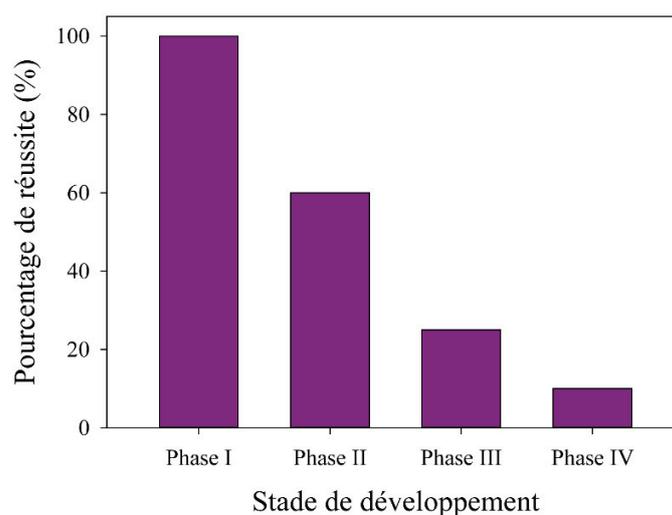


Figure 4. Taux de réussite des candidats médicaments à chaque étape des phases cliniques.

Traduit depuis Kola et Landis 2004.⁴⁵

II. Criblage haut débit

Une des étapes cruciales du processus de recherche d'un médicament est le criblage de molécules pour identifier les hits interagissant et modulant l'activité de la cible thérapeutique sélectionnée. La clé de la réussite des criblages à haut débit est le développement d'un test biologique pertinent, reproductible et fiable permettant d'une part de mesurer l'activité de la cible

et d'autre part de mettre en évidence l'action d'un hit sur cette cible. Ces tests doivent être sensibles, rapides, peu coûteux et reproductibles afin de cribler efficacement des bibliothèques de molécules. Ces chimiothèques sont testées à l'aide de plaques de 96 ou 384 puits mais la taille de ces banques augmentant de façon considérable, ce format a évolué pour désormais tester 1586 voire 3456 candidats sur une même plaque.⁴⁶ Les enzymes étant des cibles thérapeutiques intéressantes, ces plaques multi-puits sont couramment utilisées dans le développement de nombreux tests haut débit de criblage d'inhibiteurs d'enzymes, basés sur différentes méthodes de détection.

II.1. Tests biologiques

Deux approches peuvent être confrontées lors du développement de tests biologiques : la première approche appelée « target-based » est focalisée sur une protéine impliquée dans une pathologie (*Figure 5*). En effet, comme décrit dans le paragraphe précédent, il a été montré que la majorité des cibles thérapeutiques était des protéines.¹⁵

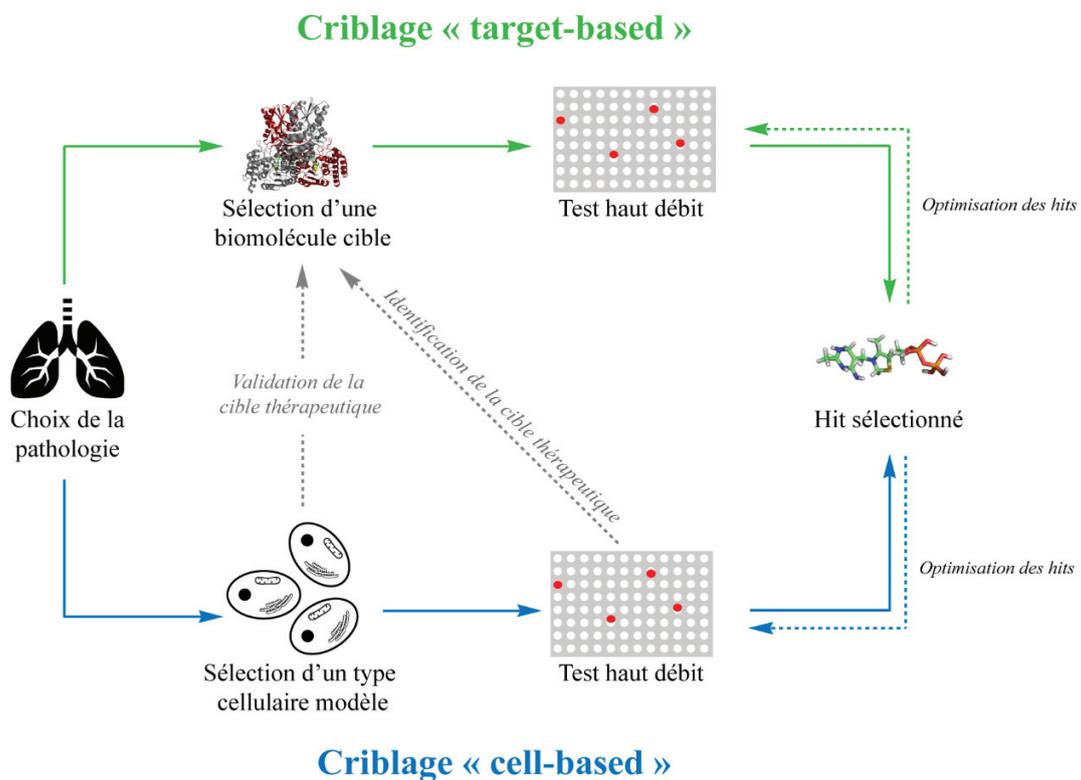


Figure 5. Schéma des deux approches généralement rencontrées dans le développement d'un test biologique haut débit dans le but de trouver des candidats médicaments.

Les tests biologiques ainsi développés utilisent la protéine cible purifiée. Cependant, l'action sur une seule cible ne suffit pas toujours à contrer une pathologie. De plus, certaines cibles nécessitent un environnement complexe pour fonctionner. L'approche cellulaire (ou « cell-based ») est donc de plus en plus utilisée en développant de tests biologiques avec des cellules entières⁴⁷ (*Figure 5*) : l'altération d'une fonction cellulaire particulière par un composé chimique est recherchée sans avoir d'indication préalable sur la nature moléculaire de sa (ou de ses) cible(s) biologique(s).

II.1.1. Tests basés sur une cible isolée

Depuis les années 90, les approches basées sur une cible isolée ont été les plus utilisées dans les tests biologiques développés dans le cadre de la découverte de médicaments. Les récepteurs membranaires (et en particulier les récepteurs aux protéines G), les canaux ioniques ou encore les enzymes sont les cibles thérapeutiques les plus étudiées¹⁵⁻¹⁷ et de nombreux tests biologiques impliquant ces protéines sont développés. Contrairement aux récepteurs et canaux ioniques nécessitant un environnement membranaire pour fonctionner, les tests basés sur la mesure de l'activité d'une enzyme en solution sont couramment utilisés.⁴⁸ En effet, une enzyme catalyse la transformation d'un substrat en un produit. Les tests enzymatiques quantifient donc la consommation du substrat ou la formation de produits. Ces tests diffèrent d'une part par leur spécificité : ils peuvent être spécifiques d'une enzyme particulière ou se généraliser à une classe d'enzyme (par exemple, les déshydrogénases à nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) où la consommation / production de NADH est suivie au cours du temps). D'autre part, ils diffèrent par la méthode de détection : optique (fluorescence, luminescence, absorbance), électrochimique (ampérométrie, potentiométrie), piézo-électrique, thermique... Néanmoins, la majorité des produits ou substrats enzymatiques ne possèdent pas de propriétés physicochimiques adaptées à une détection directe et requièrent l'utilisation d'une seconde étape réactionnelle chimique ou enzymatique.⁴⁹ Des enzymes auxiliaires telles que des déshydrogénases à NAD⁺⁵⁰ ou des oxydases sont très souvent utilisées dans les tests enzymatiques permettant ainsi la mesure d'activité par spectrophotométrie ou électrochimie.

Les tests utilisant les protéines cibles purifiées présentent des avantages et des inconvénients. Le principal avantage est la connaissance de la cible thérapeutique permettant d'abord de comprendre son implication dans la pathologie ciblée puis de comprendre plus aisément la relation structure-activité en présence du ou des hits sélectionnés. Ainsi, l'optimisation des têtes

de série est plus rapide et les tests toxicologiques engagés en phase précliniques sont plus facilement prédictibles. Cependant, ces tests sont simplifiés à une cible thérapeutique particulière qui n'est pas forcément dans son environnement biologique naturel. Il est donc très courant que le passage des tests *in vitro* aux tests *in vivo* engendre des résultats très différents et beaucoup plus complexes à interpréter. Pour cela, de plus en plus de criblages sont donc réalisés sur des cellules entières.

II.1.2. Tests utilisant des cellules entières

Les tests basés sur les cellules entières, encore appelés tests à haut contenu, sont plus représentatifs de la réalité biologique. Deux situations sont rencontrées avec ce type de tests : soit la cible thérapeutique est identifiée mais le contexte cellulaire est recherché (voire nécessaire), soit la cible n'est pas identifiée et le but est de trouver des molécules induisant un phénotype particulier (telle que l'inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses) ou inhibant une voie métabolique. Dans ce dernier cas, ce n'est qu'une fois le hit trouvé que la cible thérapeutique est identifiée afin d'optimiser le futur médicament. L'intérêt de ce criblage est donc double : trouver des molécules modulant une fonction cellulaire particulière et trouver de nouvelles cibles thérapeutiques associées à cette fonction pouvant être de différentes natures (récepteurs, enzymes, facteurs de transcription, ADN...). Ce type de criblage peut s'avérer très utile pour certaines maladies telles que les maladies neurodégénératives (Alzheimer ou Parkinson) pour lesquelles les cibles thérapeutiques sont difficiles à identifier. Il est également très utilisé lorsqu'une méthode biochimique ou physicochimique classique est difficile à mettre en place, notamment lorsque la protéine (telles que les protéines membranaires) ou les substrats ne sont pas stables ou aisément accessibles ou lorsque de nombreux réactifs sont nécessaires.

On peut distinguer trois types de tests impliquant ces cellules entières : les tests basés sur la détection d'un second messenger, les tests utilisant un gène rapporteur et les tests de croissance cellulaire. Le premier type de test utilise des seconds messagers (tels que l'AMP cyclique ou le calcium intracellulaire) permettant la transduction du signal de l'extérieur vers l'intérieur des cellules, dû à l'activation de récepteurs présents à la surface de ces cellules (*Figure 6A*). Ils sont par exemple utilisés pour étudier l'activité d'un canal ionique en mesurant les variations de la concentration en ions ou le potentiel membranaire grâce à des sondes fluorescentes.^{51,52} Un test haut débit permettant de mesurer l'activité d'un canal calcique dans différents types de cellules

humaines a été développé.⁵¹ Il utilise une sonde fluorescente spécifique du calcium intracellulaire (l'acide bis-(1,3-fibutylbarbiturique)triméthine oxonol) pouvant être détecté à l'aide d'un lecteur de plaques.⁵² Le deuxième type de tests cellulaires implique un gène rapporteur, sous le contrôle d'un promoteur cible, permettant de mesurer son niveau d'expression au sein d'une cellule (*Figure 6B*). Ces rapporteurs sont généralement des plasmides possédant un gène codant pour une protéine particulière. La quantification des produits de gènes est donc réalisée *via* des méthodes biochimiques permettant de mesurer l'activité de la protéine rapportrice. En guise d'exemple, la luciférase a longtemps été utilisée comme enzyme rapportrice permettant de quantifier les niveaux d'expression cellulaire par luminescence.⁵³ Elle a notamment été utilisée pour mettre en évidence l'activité de récepteurs aux protéines G⁵⁴ ou de récepteurs nucléaires.⁵⁵

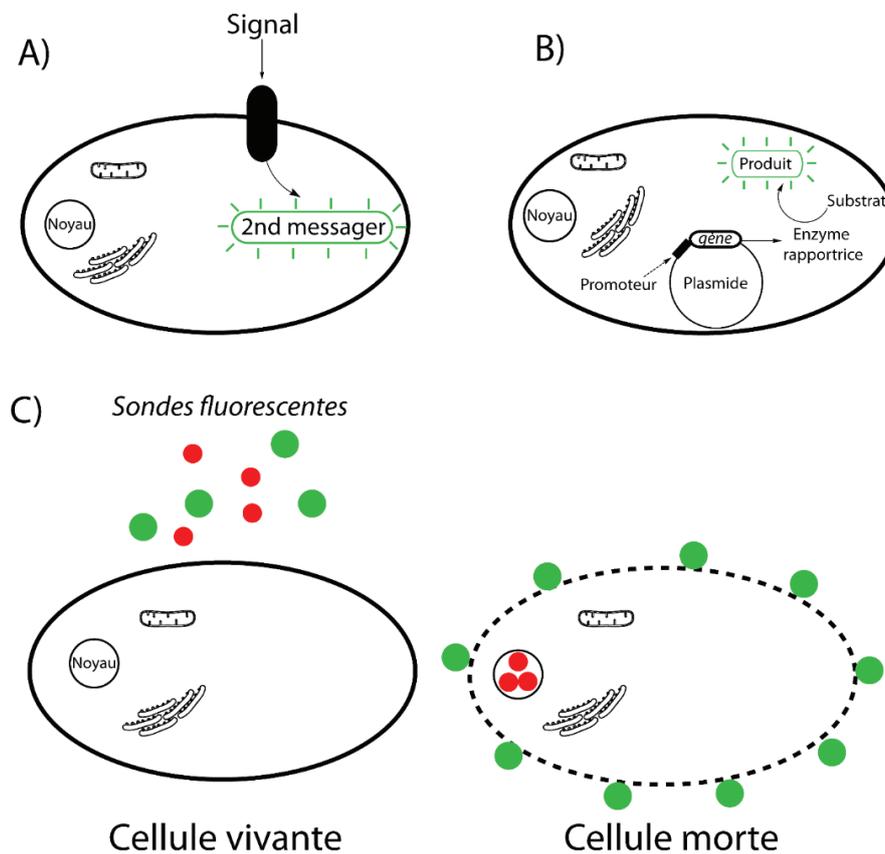


Figure 6. Schéma de principe des trois types de tests utilisant des cellules entières : A) basés sur la détection d'un second messenger, B) sur l'utilisation d'un gène rapporteur ou C) sur des tests de survie cellulaire.

Enfin, des tests de prolifération cellulaire permettent de mesurer la viabilité d'une cellule en réponse à un stimulus externe, tel que la présence d'un candidat médicament⁵⁶ (*Figure 6C*). Par

exemple, une micro-plateforme permettant la formation et l'analyse de sphéroïdes cellulaires (amas de cellules organisées en 3D) a été développée.⁵⁷ La croissance cellulaire est mesurée en présence de sphéroïdes de différentes tailles et leur comportement en présence de différentes concentrations en 5-fluorouracile, agent utilisé dans le traitement du cancer, a été étudié. Des systèmes multi-puits optimisés pour la culture de cellules hépatiques ou pulmonaires ont également été conçus dans le but de cribler une banque de petites molécules.⁵⁸⁻⁶¹ Ces approches utilisent principalement des méthodes spectrophotométriques ou de fluorescence pour déterminer si une cellule est morte ou vivante. Elles sont généralement couplées à des méthodes permettant d'étudier une voie métabolique, le taux d'expression d'une protéine ou un phénotype.

Le principal avantage des criblages sur cellules entières est que les hits identifiés sont d'emblée choisis pour leur capacité à traverser la membrane plasmique et pour leur stabilité dans un milieu cellulaire. Leur éventuelle toxicité est aussi étudiée au début de l'étude, ce qui permet de sélectionner des candidats médicaments plus intéressants pour les études précliniques et cliniques. De plus, ces criblages sondent toutes les cibles potentielles, connues ou inconnues du processus cellulaire étudié, pour aboutir à la sélection de la cible la plus pertinente. Cependant, ces méthodes offrent des sensibilités plus faibles qu'un criblage sur des protéines purifiées et sont soumises à des interférences dues à la fixation non spécifique des molécules testées.

II.2. Qualité d'un test haut débit

Que ce soit pour les tests focalisés sur une protéine ou les tests utilisant des cellules entières, ils doivent répondre à un certain nombre de critères analytiques tels que la fiabilité, la robustesse et la reproductibilité. En particulier, chaque test possède un degré de variabilité intrinsèque et d'erreur qui doit être pris en compte. Des mesures contrôles et des répliques sont donc réalisés afin d'avoir les cribles les plus fiables possibles.

La qualité d'un test haut débit peut être jugée grâce à différents paramètres tels que le rapport signal/bruit, la déviation standard ou encore la différence entre les contrôles positifs et négatifs. Ces différents paramètres sont tous pris en compte dans le calcul d'un paramètre unique, le facteur Z.⁶² Ce coefficient statistique reflète à la fois la gamme dynamique et la variabilité des données. Il est calculé à partir de la différence de la moyenne des contrôles positifs et de la moyenne des contrôles négatifs et de leur déviation standard (équation (1)).

$$Z = 1 - \frac{3 \times SD(C^+) + 3 \times SD(C^-)}{M(C^+) - M(C^-)} \quad (1)$$

Avec $SD(C^+)$ correspondant à la déviation standard du contrôle positif, $SD(C^-)$ à la déviation standard des contrôles négatifs, $M(C^+)$ la moyenne des signaux contrôles positifs et $M(C^-)$ la moyenne des contrôles négatifs.

Le facteur Z est compris entre 1 et moins l'infini et seules les valeurs positives sont pertinentes. Le *Tableau 3* donne la correspondance entre la valeur du facteur Z et la qualité du test. Le test idéal aura un facteur Z de 1, ce qui signifie qu'il n'y a pas de variabilité dans les signaux mesurés ($SD(C^+) = 0$ et $SD(C^-) = 0$ dans l'équation (1)). La plupart des cribles ont un facteur Z compris entre 0.5 et 1, montrant que la variabilité des signaux est négligeable devant la valeur des contrôles ($3SD(C^+) + 3SD(C^-) \ll M(C^+) - M(C^-)$ dans l'équation (1)). Si ce paramètre est compris entre 0 et 0,5, un contrôle interne présent dans chaque essai sera nécessaire afin de normaliser le signal. S'il est égal à 0 ($3SD(C^+) + 3SD(C^-) = M(C^+) - M(C^-)$ dans l'équation (1)), le criblage sera de type oui/non, c'est-à-dire qu'il n'y aura aucun aspect quantitatif (dans le cas d'une inhibition, le criblage montrera seulement que la molécule testée inhibe la cible mais sans information sur son efficacité). Enfin, tout facteur Z inférieur à zéro rend le teste inutilisable pour le criblage ($3SD(C^+) + 3SD(C^-) \gg M(C^+) - M(C^-)$ dans l'équation (1)).

Tableau 3. Correspondance entre la valeur du facteur Z et la qualité du test haut débit. Selon Zhang et al.⁶²

Valeur du facteur Z	Qualité du test haut débit
1	Test idéal
$1 > Z \geq 0,5$	Test excellent
$0,5 > Z > 0$	Test nécessitant un contrôle interne
0	Test de type oui/non
< 0	Criblage impossible

II.3. Criblage d'inhibiteurs d'enzymes

De nombreux travaux ont montré que les enzymes sont des cibles thérapeutiques de choix pour lesquelles il est nécessaire de trouver des inhibiteurs. Dans le cancer, certaines enzymes impliquées dans les voies métaboliques permettant la survie et la prolifération cellulaire sont

surexprimées. L'inhibition de ces enzymes est par conséquent une stratégie intéressante afin de limiter la prolifération de ces cellules cancéreuses. Des tests de criblages d'inhibiteurs ont été développés et utilisent principalement des méthodes optiques ou radiométriques.

II.3.1. Inhibiteurs d'enzymes

L'activité d'une enzyme dépend principalement de deux étapes : la formation d'un complexe (appelé ES) entre l'enzyme (E) et le substrat (S) gouvernée par une constante de Michaelis-Menten (K_M , exprimée en concentration de substrat) et la libération du produit de réaction (P) à partir de ce complexe avec une constante catalytique d'ordre 1 (k_{cat}) (*Figure 7A*). Un inhibiteur d'enzyme est une molécule capable de se lier à une enzyme et de diminuer voire supprimer son activité. Il existe différents types d'inhibiteurs en fonction de la réversibilité de la fixation, du site sur lequel ils se fixent et du mécanisme enzymatique associé. En premier lieu, il faut distinguer les inhibitions réversibles et irréversibles. L'inhibition irréversible a lieu lorsque l'inhibiteur se fixe covalamment à l'enzyme qui devient alors totalement inactive. Si la liaison de l'inhibiteur se fait par des liaisons de faible énergie, on parle alors d'inhibition réversible. Parmi ces inhibitions réversibles, on peut en distinguer différents types en fonction du site de fixation de l'inhibiteur.

Si l'inhibiteur interagit sur le site de fixation du substrat enzymatique, on parle d'inhibition compétitive (*Figure 7B*). L'inhibiteur se fixe sur l'enzyme libre pour former le complexe enzyme-inhibiteur (EI) avec une constante de dissociation appelée K_I (ou constante d'inhibition). Les inhibiteurs compétitifs sont généralement des analogues structuraux des substrats ou cofacteurs de l'enzyme. Si l'inhibiteur se fixe sur un autre site, l'inhibition sera soit non compétitive soit incompétitive. Dans le cas d'une inhibition incompétitive (*Figure 7C*), l'inhibiteur se fixe sur le complexe enzyme-substrat (ES) pour former le complexe ternaire enzyme-substrat-inhibiteur (ESI). Pour une inhibition non compétitive (*Figure 7D et 7E*), l'inhibiteur peut se fixer sur l'enzyme libre (E) pour former le complexe EI ou sur le complexe ES pour former le complexe ESI. Il n'empêche donc pas le substrat de se fixer sur l'enzyme. On distingue l'inhibition non compétitive pure (*Figure 7D*) dans laquelle les deux constantes d'inhibition sont égales et l'inhibition non compétitive mixte (*Figure 7E*) présentant des valeurs de K_I différentes (K_{I1} et K_{I2}). De plus, des mécanismes d'inhibition dits « partiels » ont également été décrits. Dans ces mécanismes, le complexe ESI est capable de former le produit (P) avec une constante catalytique

différente (et généralement plus faible) de la constante catalytique en absence d'inhibiteur. Ces inhibitions partielles sont possibles pour les inhibitions incompétitives (Figure 7F), non compétitives pures (Figure 7G) et mixtes (Figure 7H).

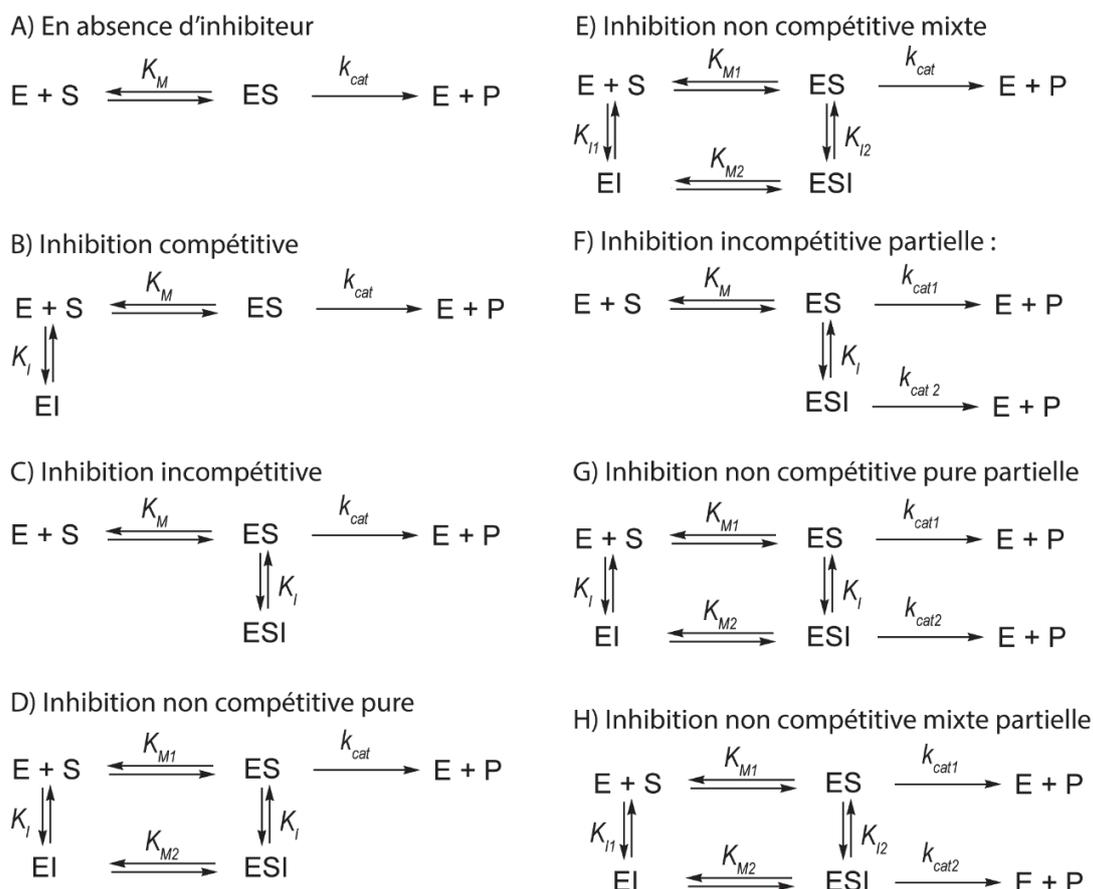


Figure 7. Schémas de mécanismes enzymatiques en absence (A) et en présence d'inhibiteur (B-H). E = enzyme ; S = substrat ; I = inhibiteur ; P = produit ; ES = complexe enzyme-substrat ; EI = complexe enzyme-inhibiteur ; ESI = complexe enzyme-substrat-inhibiteur ; K_{M1} et K_{M2} = constantes de Michaelis-Menten ; k_{cat1} et k_{cat2} = constantes catalytiques ; K_{I1} et K_{I2} = constantes d'inhibition

Lors du criblage d'inhibiteurs d'enzymes, différents paramètres permettant de caractériser l'inhibition peuvent être calculés. Certaines études calculent un pourcentage d'inhibition de l'activité enzymatique en présence d'une concentration fixée en inhibiteur mais plus généralement, la concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) est déterminée. Il s'agit de la concentration en inhibiteur conduisant à une diminution de l'activité enzymatique de 50% dans les conditions expérimentales choisies par l'expérimentateur. Cependant, ce paramètre n'est pas normé et dépend en particulier

de la concentration en substrat et enzyme utilisée et du mécanisme (*a priori* inconnu) d'inhibition.⁶³ La caractérisation la plus juste d'un inhibiteur consiste donc, d'une part, à déterminer le mécanisme d'inhibition approprié et, d'autre part, à calculer la ou les constantes d'inhibition associées. Ceci permet également de comparer l'efficacité de l'inhibiteur avec d'autres inhibiteurs déjà existants (souvent trouvés à l'aide d'une méthode différente).

II.3.2. Méthodes de criblages d'inhibiteurs d'enzymes

Les enzymes étant des cibles thérapeutiques intéressantes, de nombreux tests à haut débit permettant de cribler des inhibiteurs d'enzymes ont été développés. La plupart se base sur des méthodes optiques (fluorescence, luminescence ou absorbance) réunissant les critères incontournables du développement d'une méthode de criblage : la robustesse, la répétabilité, la sensibilité et la rapidité. Cependant, de plus en plus de cribles débutent par une sélection *in silico* d'inhibiteurs à l'aide d'outils computationnels avant de les tester par des méthodes réelles. Une liste non exhaustive de tests à haut débit développés pour le criblage d'inhibiteurs d'enzymes est présentée dans le *Tableau 4*.

II.3.2.a. Test ELISA

Un des tests haut débit les plus connus permettant la détection d'activité enzymatique est le test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) dans lequel les produits de réaction enzymatique sont détectés à l'aide d'anticorps spécifiques (*Figure 8*).

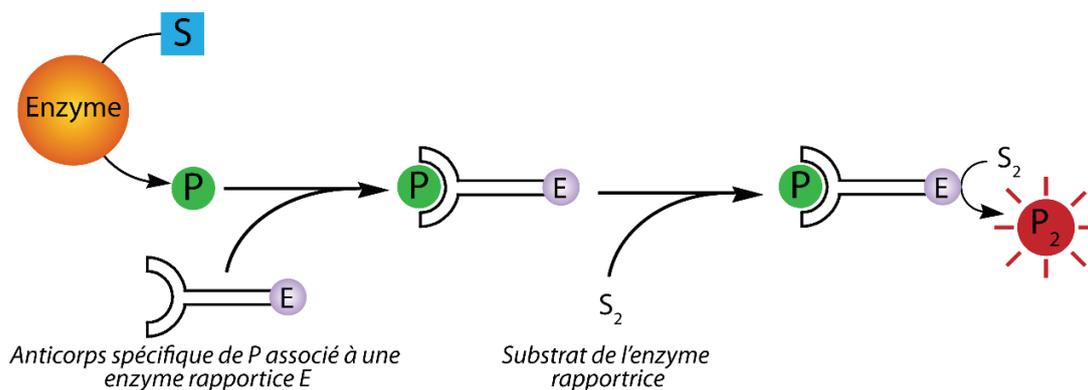


Figure 8. Schéma de principe du test ELISA adapté pour la mesure d'activité enzymatique. En présence d'un substrat (S), l'enzyme cible forme un produit P ciblé par un anticorps anti- P . Cet anticorps est associé à une enzyme auxiliaire (E) qui en présence d'un substrat S_2 va former un produit P_2 détectable par spectrophotométrie ou fluorimétrie.

Tableau 4. Principaux tests à haut débit développés pour le criblage d'inhibiteurs d'enzymes et leurs principales caractéristiques.

Type de test	Méthode	Enzymes cibles	Avantages	Inconvénients
Test ELISA	Fluorescence ou spectrophotométrie	Toutes les classes enzymatiques	- Sensible - Spécifique - Adaptable à toutes les enzymes	- Etapes de séparation des réactifs - Coûteux : production des anticorps - Long (15-16h)
Polarisation de fluorescence	Fluorescence	Protéases, kinases, phosphatases, DNase, RNase	- Sensible - Adaptable à de nombreuses enzymes	- Interférences - Marquage des substrats ou de l'enzyme par un fluorophore
Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET)	Fluorescence	Protéases, kinases, lipases, cellulases, phosphatases	- Sensible - Adaptable à de nombreuses enzymes	- Interférences - Marquage des substrats
Fluorescence homogène en temps résolu (HTRF)	Fluorescence	Protéases, kinases, hélicases	- Sensible - Peu cher - Peu d'interférences	- Marquage des substrats
AlphaScreen® ADP-Glo®	Luminescence	Kinases, phosphatases	- Sensible - Moins d'interférences qu'en fluorescence	- Etape de conversion de l'ADP en ATP limitante - Discontinues
Test de scintillation de proximité	Radioactivité	Protéases, lipases, kinases et transférases	- Sensible - Peu d'interférences	- Toxicité - Faible stabilité des réactifs - Coût - Modification des enzymes
Tests couplés (Déshydrogénases ou oxydases)	Fluorescence ou spectrophotométrie	La quasi-totalité des classes enzymatiques	- Sensible - Applicable à de nombreuses enzymes - Pas de marquage de enzyme/substrat	- Enzyme auxiliaire : interférences sur le criblage d'inhibiteurs - NADH coûteux
Criblage virtuel	Docking, QSAR, Design <i>de novo</i> , Recherche de similarité	Enzymes dont la structure est résolue	- Rapide - Peu coûteux - Sélectif	- Besoin de méthodes physiques pour vérifier l'inhibition - Synthèse de novo de nouvelles molécules

Ces anticorps sont couplés à des enzymes (généralement des peroxydases) qui en présence de leur substrat catalysent la formation d'un produit coloré ou fluorescent facilement détectable. Ces tests ont pour avantages d'être sensibles, très spécifiques et de s'adapter à nombreux types d'enzymes à condition que des anticorps spécifiques du produit soient accessibles. Cependant, la production de ces anticorps reste un processus long et coûteux. De plus, dans un test ELISA, les temps d'incubation avec les anticorps sont longs et nécessitent des étapes de lavages qui limitent le processus haut débit.

II.3.2.b. Méthodes fluorimétriques

Les méthodes fluorimétriques (polarisation de fluorescence, FRET, HTRF...) sont les plus utilisées pour le criblage d'inhibiteurs en raison de leur haute sensibilité.

La polarisation de fluorescence est une méthode optique utilisée depuis le milieu des années 90 pour le criblage haut débit. Elle repose sur le fait que le degré de polarisation d'un fluorophore dépend de ses mouvements rotatoires et donc de sa masse moléculaire. Une molécule de haut poids moléculaire aura un temps de relaxation de fluorescence beaucoup plus long qu'une molécule plus petite et donc une fluorescence plus intense. Ce principe est utilisé pour mesurer des activités enzymatiques. Par exemple, si un peptide substrat est marqué par un fluorophore (type fluorescéine), l'action d'une protéase va conduire à la libération d'un nouveau peptide de plus faible poids moléculaire qui aura un temps de relaxation plus court donc une émission de fluorescence plus faible⁶⁴ (Figure 9).

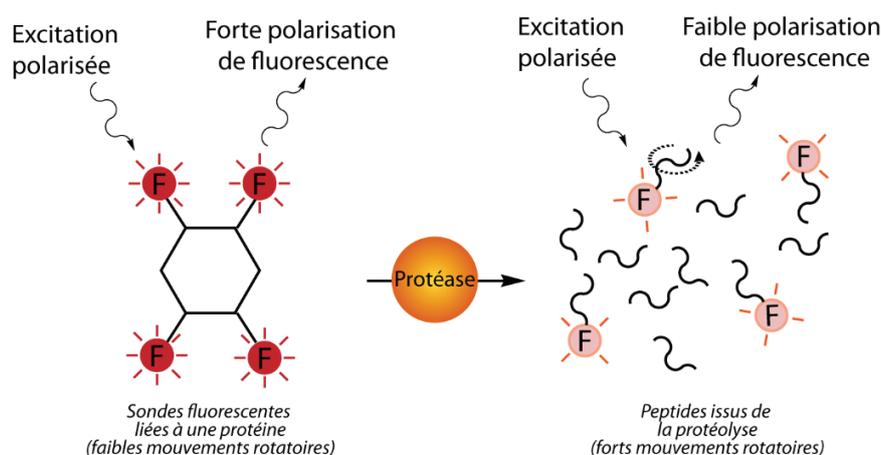


Figure 9. Schéma de principe de la polarisation de fluorescence adaptée à la mesure d'activité protéase et à l'identification d'inhibiteurs.⁶⁴

La polarisation de fluorescence a été utilisée pour développer plus de 800 tests haut débit différents impliquant des récepteurs, des canaux ioniques, des régulateurs épigénétiques, des facteurs de transcription, des kinases, des protéases et des phosphatases.^{65,66} Cette méthode est très sensible, simple d'utilisation (des kits commerciaux existent) et ne nécessite pas d'étape de lavage contrairement au test ELISA. Cependant, cette méthode est soumise à des interférences optiques dues à l'auto-fluorescence des réactifs et à la diffusion de la lumière.

Le transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (ou « Fluorescence Resonance Energy Transfer », FRET) est également une méthode très utilisée pour mesurer l'activité de nombreuses enzymes hydrolytiques (protéases⁶⁷, lipases⁶⁸, cellulases⁶⁹ et phosphatases⁷⁰) ou de transfert (kinases⁷⁰). Elle est basée sur le transfert d'énergie entre deux fluorophores (un donneur et un accepteur) lorsqu'ils sont à proximité dans l'espace. Ainsi, si deux molécules marquées par deux fluorophores différents interagissent, l'excitation du fluorophore donneur entraînera le transfert d'énergie au fluorophore accepteur qui émettra alors de la fluorescence à une longueur d'onde plus élevée. Pour la plupart des mesures d'activité enzymatique, les deux fluorophores sont fixés sur un même substrat et l'action de l'enzyme entraîne l'éloignement des deux fluorophores et donc la perte du phénomène de FRET. Un exemple de test haut débit permettant le criblage d'inhibiteurs de kinases et de phosphatases a été proposé par Rodems *et al.* (*Figure 10*).⁷⁰ Un peptide sur lequel est fixée la fluorescéine sur l'extrémité N-terminal et la coumarine à l'extrémité C-terminal est synthétisé. Due à la proximité des deux fluorophores dans l'espace, l'excitation de la coumarine va entraîner un transfert d'énergie à la fluorescéine qui va alors émettre de la fluorescence. Si ce peptide n'est pas phosphorylé, l'action ultérieure de la chymotrypsine conduit à deux peptides portant chacun un fluorophore, le phénomène de FRET n'a donc plus lieu. Si le peptide est phosphorylé par une kinase sur le résidu tyrosyl, la chymotrypsine n'agit plus et le phénomène de FRET est maintenu. Plus de 100 000 molécules ont ensuite été criblées avec cette méthode. Ces travaux ont permis d'identifier plus de 300 nouveaux inhibiteurs d'une protéine kinase. Le FRET est donc une méthode sensible et rapide mais qui, comme la plupart des méthodes fluorescentes, est soumise à des interférences optiques dues à la fluorescence du tampon ou des composés secondaires. De plus, une étape de synthèse des substrats est nécessaire afin de greffer les sondes fluorescentes.

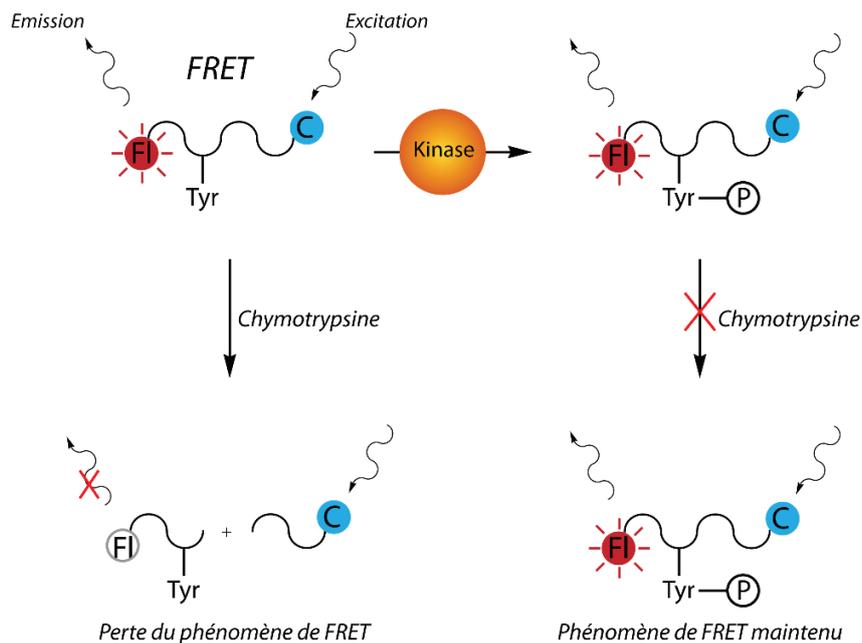


Figure 10. Schéma de principe du transfert d'énergie entre molécules fluorescente (FRET) adapté pour les mesures d'activités kinases et l'identification d'inhibiteurs. Le peptide substrat est étiqueté en N-terminal par une molécule de fluorescéine (FI) et en C-terminal par une molécule de coumarine (C) et est phosphorylé par une kinase sur un résidu tyrosyl (Tyr).⁷⁰

La fluorescence homogène en temps résolu (ou HTRF) est une technologie qui combine le FRET et les mesures en temps résolues. L'ajout d'un laps de temps (entre 50 et 150 μ s) entre l'excitation et l'émission permet de diminuer les interférences dues à la fluorescence non spécifique.⁷¹ Cette méthode a été utilisée pour cribler des activités kinases⁷² et protéases mais elle est essentiellement utilisée pour la détection d'interaction protéine-protéine.

II.3.2.c. Méthodes basées sur la luminescence

Les méthodes de luminescence peuvent également être utilisées pour le développement de tests haut débit. Des tests commerciaux tels que l'ADP-Glo® ou l'AlphaScreen® permettent de mesurer des activités kinases et phosphatases à haut débit par luminescence. Le test ADP-Glo® est utilisé pour mesurer l'activité d'enzymes ATP-dépendantes (telles que des kinases) *via* la détection de l'ADP produit⁷³ (Figure 11). La réaction est d'abord arrêtée et l'ATP qui n'a pas réagi est éliminé. L'ADP produit par la réaction enzymatique est ensuite converti en ATP par une ATP synthase. Cet ATP converti va être pris en charge par une luciférase qui, en présence d'oxygène, convertit la luciférine en oxyluciférine et conduit à un signal luminescent. Ce test a été utilisé pour

cribler des inhibiteurs de kinases comme le décrit Xiao et *al.*⁷⁴ ou encore Baki et *al.*⁷⁵ Ces méthodes sont très sensibles, simples à mettre en place grâce à des kits commerciaux et sont moins soumises aux interférences que les méthodes de fluorescence. En revanche, elles restent longues (presque 2h d'incubation cumulées) et sont discontinues puisque l'arrêt de la réaction et la conversion des produits sont nécessaires.

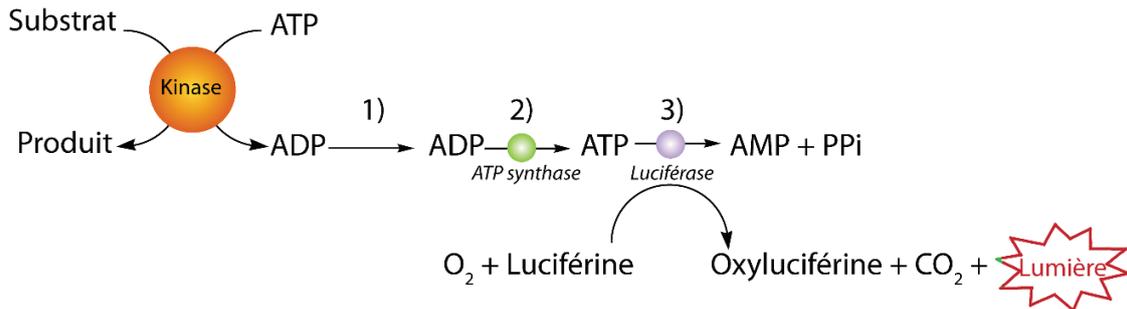


Figure 11. Principe du test ADP-Glo®. 1) Arrêt de la réaction et élimination de l'ATP qui n'a pas réagi. 2) Conversion de l'ADP produit en ATP par une ATP synthase. 3) Détection de l'ATP converti à l'aide d'une luciférase qui, en présence d'ATP et d'oxygène, va convertir la luciférine en oxyluciférine en produisant de la luminescence (PPi : pyrophosphate inorganique).

II.3.2.d. Méthodes radiométriques

Les méthodes radiométriques telles que la scintillation de proximité (ou SPA) sont utilisées pour leur haute sensibilité. Cette méthode est basée sur l'excitation d'un agent scintillant lorsqu'il est à proximité d'un radioisotope (généralement tritium ³H ou l'isotope 145 de l'iode ¹⁴⁵I) contenu par exemple dans un substrat⁷⁶. Lors de la décroissance radioactive du substrat marqué au radioisotope, l'énergie de l'isotope est transférée à l'agent scintillant incorporé dans des microbilles ou fixé sur des microplaques qui émet alors de la lumière. Cette méthode est adaptée aux enzymes hydrolytiques, aux polymérase, aux kinases et transférases *via* l'utilisation de substrats marqués par un radioisotope. Un test permettant de mesurer l'activité d'une protéase du cytomégalo virus humain en absence et en présence d'inhibiteurs a été développé en utilisant la SPA (Figure 12).⁷⁷ Le peptide substrat contenant un site de clivage à la protéase est greffé sur des billes contenant l'agent scintillant. Ce peptide est phosphorylé sur un résidu sérine (proche de son extrémité C-terminale) en utilisant de l'ATP radiomarqué. Initialement, la proximité du radioisotope (³³P) et de l'agent scintillant entraîne le transfert d'énergie de l'un à l'autre, provoquant la scintillation de la bille. L'action d'une protéase entraîne le clivage du peptide et la libération de l'isotope, la

scintillation n'a donc plus lieu. En présence d'un inhibiteur de protéase, la scintillation est maintenue. Malgré la sensibilité de cette méthode, elle est coûteuse (en particulier, en ce qui concerne l'agent scintillant et l'élimination des déchets expérimentaux) et l'utilisation de la radioactivité reste toxique. Enfin, elle nécessite des étapes de synthèse des molécules radiomarquées qui peut s'avérer longues et coûteuses si une banque entière de molécules doit être criblée.

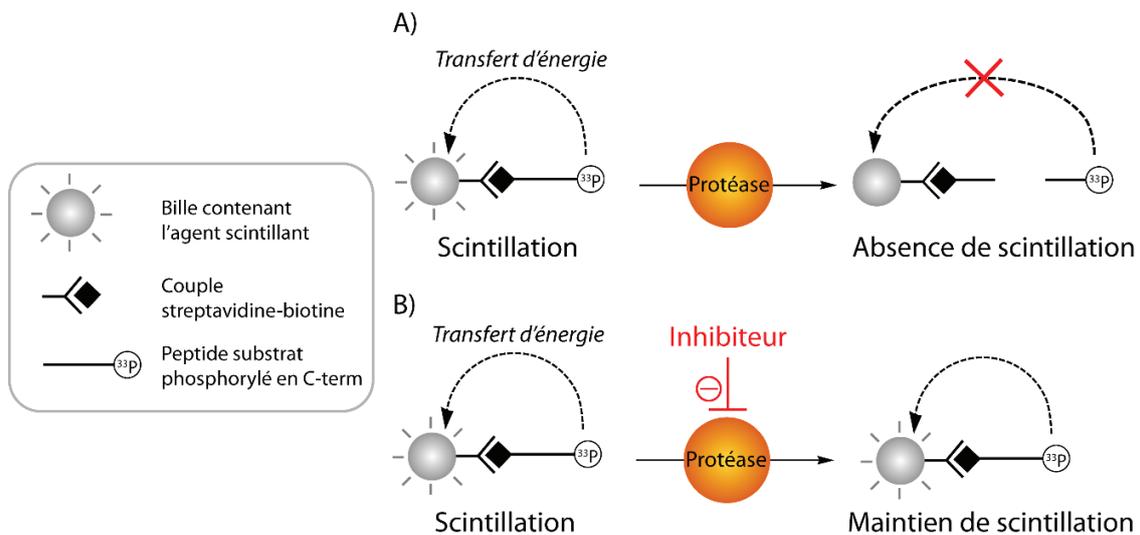


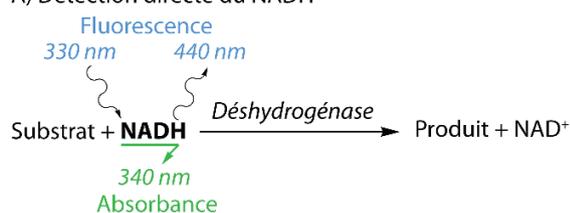
Figure 12. Schéma de principe de la scintillation de proximité adaptée à la mesure d'activité protéase en absence (A) et en présence d'un inhibiteur (B).

II.3.2.e. Méthodes couplées à des enzymes auxiliaires

La plupart des enzymes font intervenir des substrats ou des produits ne pouvant être détectés directement. Afin d'éviter le marquage des substrats ou de l'enzyme comme précédent décrit en fluorescence ou SPA, de nombreux tests couplés utilisant des enzymes auxiliaires ont été développés. Ces enzymes auxiliaires vont prendre en charge les produits de la réaction catalysée par l'enzyme d'intérêt et produire ou consommer un réactif détectable par des méthodes optiques (fluorescence ou absorbance). Les deux types d'enzymes auxiliaires les plus utilisées sont les déshydrogénases et les oxydases. L'activité des déshydrogénases peut être mesurée en suivant la formation ou la consommation de NADH par spectrophotométrie par mesure de l'absorbance intrinsèque du NADH à 340 nm (Figure 13A). Elle peut également être suivie en utilisant le couple phénazine éthosulfate (PES)/bleu de tétrazolium (NBT) dont le transfert d'électrons conduit à la

formation de formazan absorbant à 540 nm (*Figure 13B*). Le NADH peut également être détecté par fluorimétrie en l'excitant à 330 nm et en mesurant l'émission à 440 nm (*Figure 13A*). Les oxydases produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pouvant être détecté par spectrométrie à l'aide d'une peroxydase et d'un substrat chromogénique (tel que l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) ou ABTS) ou fluorogénique (tel que l'Amplex® red) (*Figure 13C et 13D*). Dans le cadre du développement de traitements anti-schizophréniques, le criblage d'inhibiteurs d'une oxydase d'acides aminés a été réalisé à l'aide d'un test impliquant la peroxydase de Raifort (HRP) et l'Amplex® Red.⁷⁸ Ce criblage a conduit à l'identification de 1966 potentiels inhibiteurs de cette oxydase. L'utilisation de tests couplés est donc intéressante car ils sont simples, sensibles et peuvent être appliqués à de nombreuses enzymes. Cependant dans le cadre d'un criblage d'inhibiteurs, la présence d'une enzyme auxiliaire peut conduire à des faux positifs dues à l'inhibition de l'enzyme auxiliaire au lieu de l'enzyme d'intérêt.

A) Détection directe du NADH



B) Détection NADH via le test PES/NBT

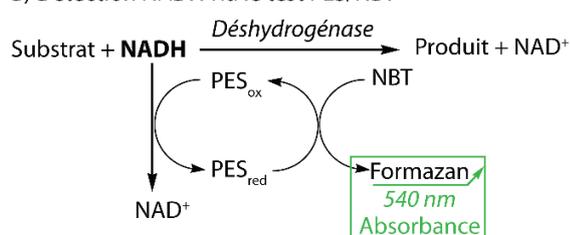
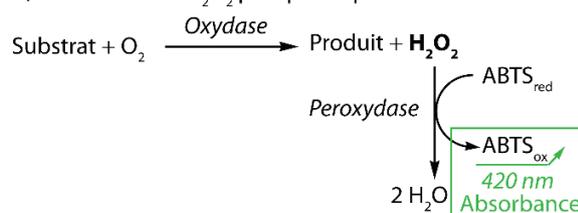
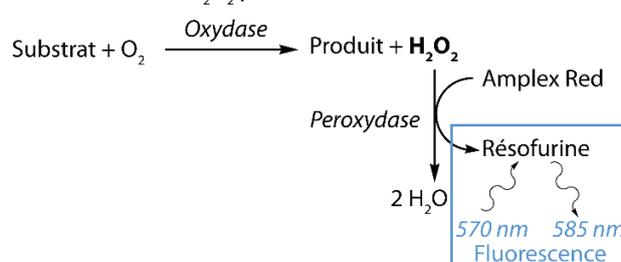

 C) Détection de l' H_2O_2 par spectrophotométrie

 D) Détection de l' H_2O_2 par fluorimétrie


Figure 13. Principe de détection des tests couplés utilisant une déshydrogénase (A et B) ou d'une oxydase (C et D) comme enzyme auxiliaire. Le NADH impliqué dans la réaction catalysée par une déshydrogénase peut être détecté directement par spectrophotométrie ou fluorimétrie (A) ou via l'utilisation du couple phénazine éthosulfate (PES)/bleu de tétrazolium (NBT) (B). L' H_2O_2 produit par une oxydase peut être détecté par spectrophotométrie en présence d'ABTS (C) ou par fluorimétrie en présence d'Amplex Red (D).

II.3.2.f. Méthodes *in silico*

Enfin, depuis une vingtaine d'années, un nouveau type de criblage d'inhibiteurs d'enzyme réalisé à l'aide d'outils informatiques vient s'ajouter à ces méthodes physiques : le criblage virtuel ou criblage *in silico*. Il existe différentes méthodes nécessitant des informations sur la structure de l'enzyme ou sur la structure des substrats, cofacteurs ou inhibiteurs déjà décrits. Par exemple, le « docking » calcule l'énergie de liaison entre l'enzyme et le substrat ou l'inhibiteur en fonction de leur capacité à établir des liaisons électrostatiques ou hydrogènes et en fonction de leur mobilité conformationnelle. De nombreux criblages d'inhibiteurs utilisant le « docking » ont été décrits tels que le criblage d'inhibiteurs d'une histone acétyltransférase, impliquée dans la régulation des gènes et l'acétylation des protéines.⁷⁹ Plus de 500 000 molécules commerciales ont ainsi été criblées en un temps réduit et 194 ont ensuite été sélectionnées pour des mesures physiques. Ces méthodes virtuelles sont donc économiques autant sur le plan financier que temporel. Cependant, elles ne prennent pas en compte la physicochimie du milieu et un score de docking peut difficilement être relié à une constante d'inhibition. Elles doivent donc être associées à des méthodes *in vitro* et/ou *in vivo* afin de vérifier les prédictions réalisées *in silico*.

Les tests à haut débit sont donc basés principalement sur des méthodes de fluorescence ou spectrophotométriques qui sont très sensibles mais qui sont soumises à des interférences optiques et qui nécessitent pour la plupart le marquage de l'enzyme ou de son substrat.

Dans le cadre de cette thèse, une enzyme particulière a été étudiée : la transcétolase. Étant impliquée dans de nombreuses pathologies, elle constitue une cible thérapeutique de choix pour laquelle il est nécessaire de trouver de nouveaux inhibiteurs.

III. Une cible thérapeutique potentielle : la transcétolase

Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre de l'ANR-13-JSV5-0002 « Transbioscreen » qui a pour but de développer un test électrochimique de transcétolase pour le criblage d'inhibiteurs en microplaques. Avant de présenter le système électrochimique utilisé, cette troisième partie de l'étude bibliographique portera sur la transcétolase (TK), enzyme de la voie des pentoses phosphates. Cette enzyme est au cœur des travaux de recherche de l'équipe BIOMETA (Biocatalyse et Métabolisme) de l'Institut de Chimie de Clermont Ferrand, qui est porteur de ce projet ANR. La transcétolase constitue une cible thérapeutique pertinente puisqu'elle impliquée

dans différentes pathologies telles que le cancer ou les maladies dégénératives, mais aussi dans la survie de certains parasites pathogènes. De nombreux travaux ont caractérisé, sur le plan moléculaire, les TKs issues d'organismes différents et ont montré leur implication dans ces pathologies. Le besoin de trouver des inhibiteurs de cette enzyme, notamment afin de développer des traitements anticancéreux, a donc été mis en évidence à plusieurs reprises. Différents tests enzymatiques permettant de mesurer son activité et de cribler des inhibiteurs seront présentés à la fin de cette partie.

III.1. Mécanisme réactionnel de la TK

La transcétolase (TK, EC 2.2.1.1.) est une transférase appartenant aux enzymes dépendant de la thiamine pyrophosphate. *In vivo*, elle catalyse le transfert réversible d'un groupement hydroxyacétyle d'un cétose phosphate donneur (D-xylulose-5-phosphate (X5P), D-fructose-6-phosphate (F6P) ou D-sédoheptulose-7-phosphate (S7P)) à un aldéhyde phosphate accepteur (D-érythrose-4-phosphate (E4P), D-ribose-5-phosphate (R5P) ou D-glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P)) (Figure 14). Cette réaction nécessite deux cofacteurs essentiels, la thiamine pyrophosphate (TPP) et un cation divalent (un ion magnésium (Mg^{2+}) ou calcium (Ca^{2+})).

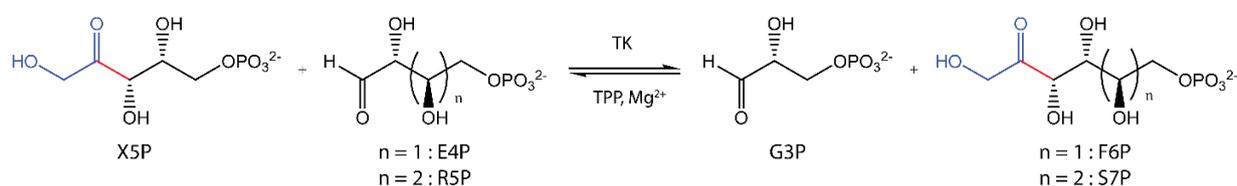


Figure 14. Réaction catalysée par la TK *in vivo* en présence de X5P comme substrat donneur et E4P ou R5P comme substrat accepteur.

La TPP, dérivée de la vitamine B1 (ou thiamine), présente trois groupements fonctionnels distincts (Figure 15) : un noyau 2-méthyl-4-aminopyrimidine (bleu), un noyau 4-méthyl-thiazolium (rouge) et un groupement pyrophosphate (orange).

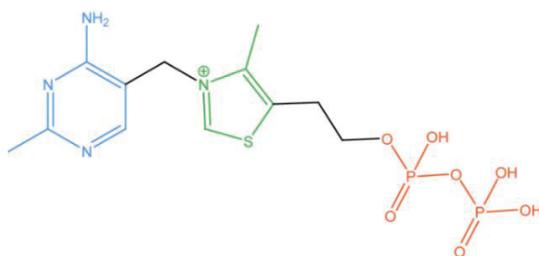


Figure 15. Structure de la TPP (le noyau 2-méthyl-4-aminopyrimidine apparaît en bleu, le noyau 4-méthyl-thiazolium en vert et le pyrophosphate en orange).

Le mécanisme réactionnel de la TK est similaire à celui des autres enzymes à TPP telles que les décarboxylases.⁸⁰ Il suit un mécanisme de type Bi-Bi ordonné encore appelé mécanisme substitué ou Ping Pong (Figure 16) : le substrat donneur va se fixer sur l'enzyme pour libérer un premier produit et former un intermédiaire réactionnel, l' α,β -dihydroxyéthylthiamine pyrophosphate (DHETPP). Le substrat accepteur se fixe ensuite sur l'enzyme pour libérer le second produit. Ce mécanisme est justifié, à l'échelle moléculaire, par la présence d'un canal étroit (voir le paragraphe III.2.) reliant la surface de l'enzyme au site actif et ne permettant l'accès que d'une molécule de substrat à la fois⁸¹ (Figure 22).

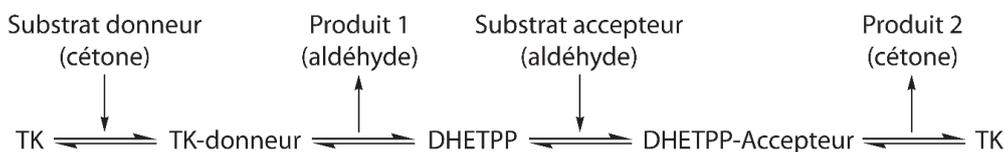


Figure 16. Schéma du mécanisme Bi-Bi ordonné / Ping Pong de la TK.

Ce mécanisme commence par l'activation de la TPP, c'est-à-dire la déprotonation du carbone en position 2 (C_2) de son noyau thiazolium (Figure 17, étape 1). La TPP adopte alors une conformation en V nécessaire pour la suite du mécanisme réactionnel. Le C_2 de la TPP ainsi activée attaque alors le carbonyle du substrat donneur (une cétone) pour former l'adduit covalent TK-donneur (Figure 17, étape 2). L'alcool en position 3' (C'_3) de cet adduit est ensuite déprotoné et la liaison $C_2-C'_3$ est clivée, conduisant à la libération du 1^{er} produit (un aldéhyde) et à la formation de l'intermédiaire réactionnel DHETPP (Figure 17, étape 3). Ce carbanion intermédiaire peut alors réagir avec le substrat accepteur (un aldéhyde) pour former l'adduit covalent DHETPP-accepteur (Figure 17, étape 4). La déprotonation de l'hydroxyle du substrat donneur et la rupture de la liaison

avec la TPP entraîne la libération du second produit (une cétone) (Figure 17, étape 5) et la régénération de la TPP activée et de la TK.

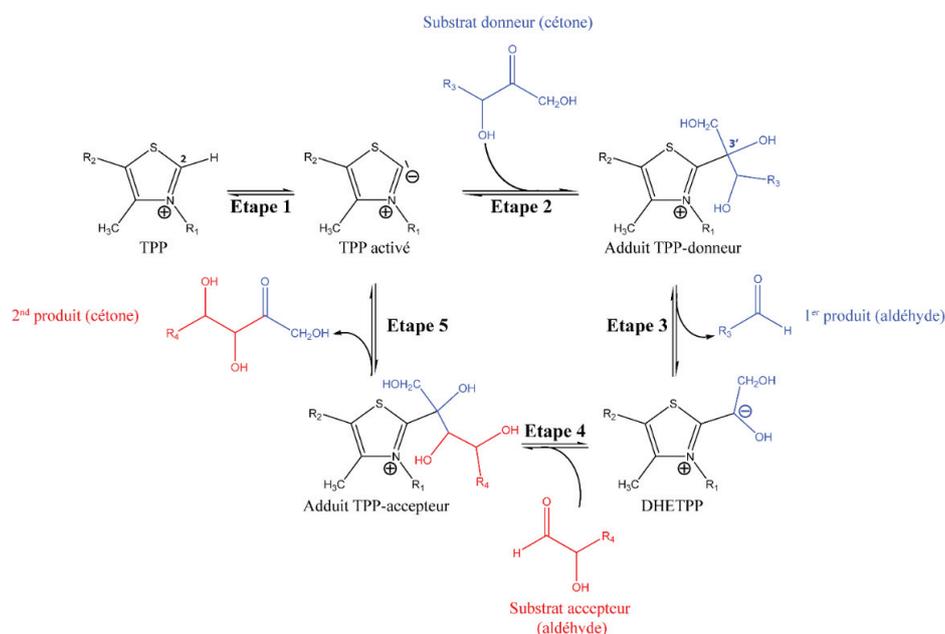


Figure 17. Mécanisme réactionnel détaillé de la TK en présence d'une cétone et d'un aldéhyde comme substrats donneur et accepteur respectivement.

Les substrats naturels de la TK sont des composés phosphorylés, cependant, de nombreux exemples d'utilisation de substrats non phosphorylés ont été publiés en présence de TK bactériennes ou de levure (*Escherichia coli*, *Saccaromyces cerevisiae*).⁸²⁻⁸⁵ Ces travaux ont notamment permis de mettre en évidence le potentiel de la TK pour la synthèse de polyols phosphorylés ou non. Au sein de ces études, l'hydroxypyruvate (HPA) est le substrat donneur le plus utilisé dans les réactions de synthèse, puisque sa décarboxylation enzymatique rend la réaction irréversible par la libération d'ions bicarbonates (Figure 18).⁸⁶

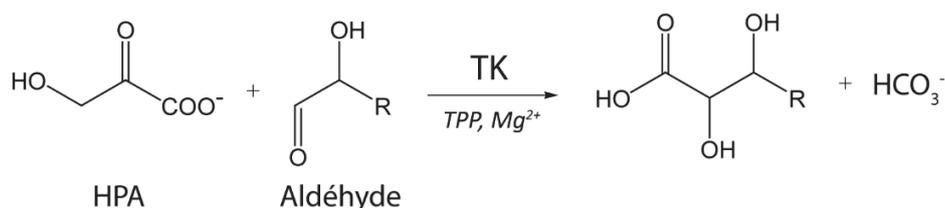


Figure 18. Réaction catalysée par la TK en présence d'HPA comme substrat donneur et d'un aldéhyde comme substrat accepteur.

D'un point de vue applicatif, l'utilisation de ce substrat a permis la synthèse de nombreux cétooses et analogues tels que le xylulose, l'exo-brevicomine (une phéromone), le 6-déoxy-L-sorbose (précurseur du furanéol, produit aromatique utilisé dans l'industrie pour sa saveur caramel), des alcools aminés tels que le 2-amino-1,3,4-butanetriol (représentant un synthon pour les synthèses pharmaceutiques) ou encore des dérivés de la jirimycine et de l'arabinitol qui sont des inhibiteurs de glycosidases (Figure 19).⁸⁷⁻⁹¹

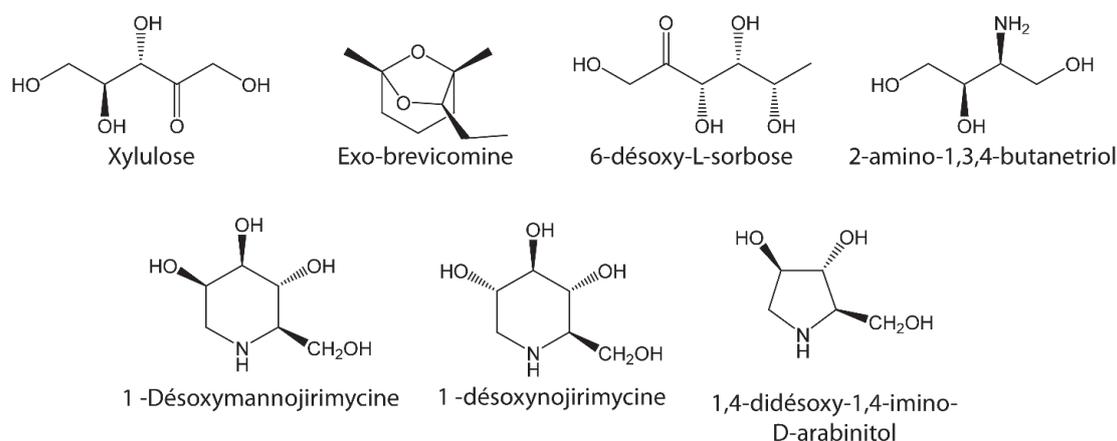


Figure 19. Structures de molécules pouvant être synthétisées en utilisant la TK comme catalyseur.

De plus, de nombreux substrats accepteurs ont été testés en présence d'HPA comme substrat donneur⁸⁶ et le glycolaldéhyde a été identifié comme étant le meilleur substrat accepteur pour les TK de *E. coli* et *S. cerevisiae* (Figure 20). Cette réaction conduit à la formation de L-erythrose et d'ions bicarbonates.

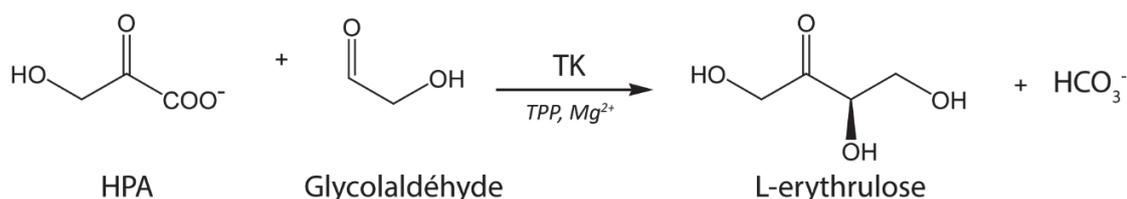


Figure 20. Réaction catalysée par la TK en présence d'hydroxyypyruvate (HPA) comme substrat donneur et glycolaldéhyde comme substrat accepteur.

Plus récemment, afin d'élargir le spectre de substrats pris en charge par la TK et donc le champ d'application de cette enzyme, des travaux de mutagenèse de la TK de *Geobacillus stearothermophilus* ont été réalisés afin d'inverser l'énantiosélectivité de cette enzyme. Le but est

de synthétiser des cétooses de type L-érythro (tels que le L-ribulose) recherchés dans le domaine pharmaceutique et nutritionnel.^{84,92,93}

III.2. Structures tridimensionnelles des transcétolases

La TK est présente chez la quasi-totalité des organismes et sa structure tridimensionnelle a été résolue chez grand nombre d'entre eux (*Escherichia coli*⁹⁴, *Saccharomyces cerevisiae*⁹⁵, *Mycobacterium tuberculosis*⁹⁶, *Plasmodium falciparum*⁹⁷...) et en particulier chez l'Homme.⁹⁸ Toutes les TKs actuellement caractérisées sont des homodimères constitués de deux sous unités de 70 à 75 kDa chacune (*Figure 21A*).⁹⁹ Chaque sous unité est composée d'un domaine N-terminal de fixation du pyrophosphate (PPi), d'un domaine de fixation du pyridinium (Pyr) et d'un domaine C-terminal dont la fonction biologique n'est pas encore définie (*Figure 21B*). Chaque sous unité possède un site actif équivalent contenant chacun une molécule de TPP et un ion métallique bivalent (Ca^{2+} ou Mg^{2+}). Chaque site actif est localisé à l'interface des deux sous unités entre le domaine PPi d'un monomère et le domaine Pyr de l'autre monomère. Un canal étroit et profond partant de la surface de l'enzyme jusqu'au site actif a été mis en évidence (*Figure 22*).⁸¹

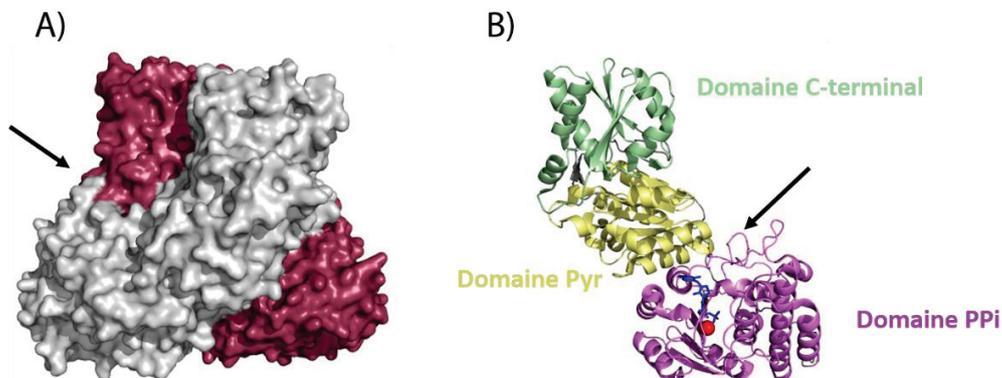


Figure 21. Structure tridimensionnelle de la TK humaine. A) Représentation en surface du dimère (l'un des monomères est représenté en rouge et l'autre en gris). B) Représentation des trois domaines présents dans un monomère de TK (l'orientation est la même que celle du monomère rouge dans A) : le domaine N-terminal PPi en violet, le domaine Pyr en jaune et le domaine C-terminal en vert cristallisés en présence de TPP en bleu et de calcium en rouge. (PDB : 3O0Y¹⁰⁰).

Les flèches représentent la localisation du canal d'entrée des substrats et de la TPP.

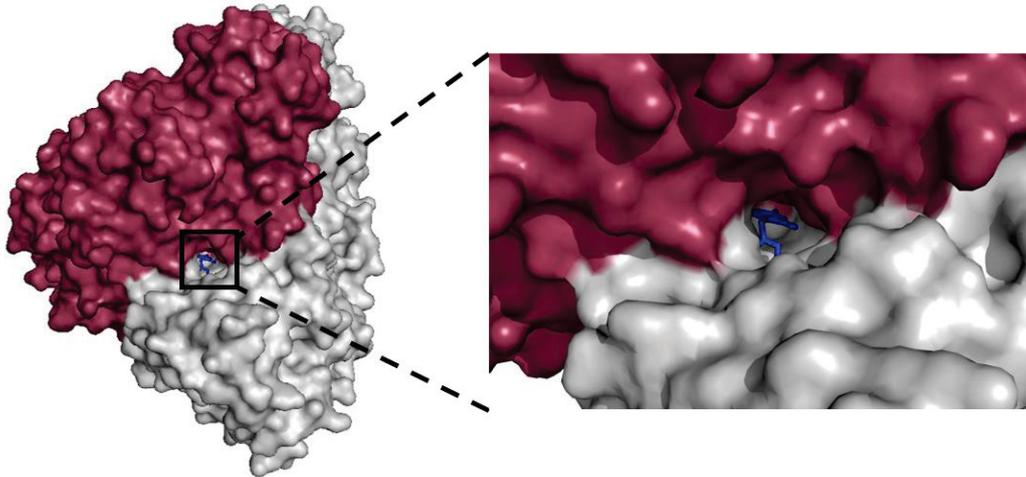


Figure 22. Représentation du dimère (l'un des monomères est représenté en rouge et l'autre en gris) vu de côté et agrandissement sur le canal d'entrée des substrats et de la TPP (représentée en bleu). (PDB : 3OOY¹⁰⁰)

Des études cristallographiques et de mutagenèse dirigée ont permis de mettre en évidence les résidus impliqués dans la fixation de coenzymes et substrats et dans la catalyse enzymatique. Dans cette thèse, la TK de *E. coli* a été utilisée comme enzyme modèle, ce paragraphe sera donc consacré uniquement à la comparaison des résidus de la TK humaine et de *E. coli*. La TK humaine possède 27% d'identité avec la TK de *E. coli* ce qui est relativement faible cependant, la superposition des sites actifs de ces deux TKs, publiée par Mitsche et *al.*, révèle que la plupart des résidus sont strictement conservés et occupent des positions quasi-identiques au sein de ces deux protéines (Figure 23).⁹⁸ Ces résidus sont recensés dans le *Tableau 5* en fonction de leur rôle dans la fixation de la TPP, de l'ion bivalent, du substrat donneur et du substrat accepteur.¹⁰¹ La TPP interagit, *via* son groupement pyrophosphate, avec l'ion bivalent qui lui-même établit des liaisons de coordination avec la TK. Pour la fixation des substrats, deux résidus arginyles (Arg474 et Arg318), un résidu sérine (Ser345) et un résidu histidyle (His461) sont impliqués dans la fixation de la partie phosphatée. De plus, un cluster d'histidines (His110 His37 et His258) associé à un résidu aspartyle (Asp424) est impliqué dans la liaison des groupements hydroxyles des substrats.

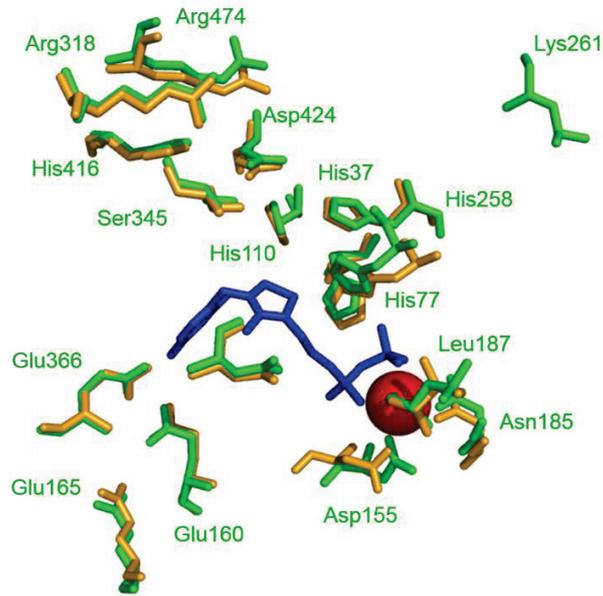


Figure 23. Superposition des sites actifs de la TK humaine (vert) et de *E. coli* (jaune) montrant les résidus impliqués dans la fixation de la TPP (en bleu) et du Ca^{2+} (sphère rouge). (Code PDB : 3OOY pour la TK humaine et 2R8O pour la TK de *E.Coli*).

Malgré les similitudes entre ces deux TK, la TK humaine possède des particularités structurales. En premier lieu, la fixation de la TPP dans le site actif de l'enzyme fait intervenir sept résidus dans la TK humaine contre seulement trois dans la TK de *E. coli*. Ceci peut expliquer la quasi-irréversibilité de la fixation de la TPP chez l'enzyme humaine (K_M pour la TPP de l'ordre du nM) contrairement aux TK bactériennes au sein desquelles cette fixation est réversible (K_M pour la TPP de l'ordre du μM).¹⁰² De plus, l'enzyme humaine contient un résidu lysine (Lys260) supplémentaire à l'entrée du site actif, probablement impliqué dans la fixation du substrat, mais absent chez les TK bactériennes.

Tableau 5. Résidus équivalents impliqués dans le mécanisme de la TK humaine et de la TK de *E. coli* (D'après Ranoux et al.¹⁰¹ et Mitsche et al.⁹⁸).

Étapes du mécanisme réactionnel	TK humaine	TK <i>E. coli</i>	
Fixation du cation divalent (calcium)	Leu187	Ile187	
	Asp155	Asp155	
	Asn185	Asn185	
Fixation de la TPP	Asp341	Asp381	
	Glu160	Glu160	
	Glu165	Glu165	
	Glu366	Glu411	
Fixation du substrat donneur	His77	His66	
	His110	His100	
Fixation du substrat accepteur	Arg474	Arg520	
	<i>Via le groupement phosphate</i>	Arg318	Arg358
	Ser345	Ser385	
	His416	His461	
	His110	His100	
	<i>Via le groupement hydroxyle</i>	His37	His26
	His258	His261	
Asp424	Asp469		

III.3. Rôle métabolique de la transcétolase

La TK est une enzyme ubiquitaire qui intervient dans le cycle de Calvin chez les plantes et dans la partie non oxydative de la voie des pentoses phosphates chez les organismes supérieurs et les microorganismes. Elle est ainsi impliquée dans de nombreuses pathologies liées à cette voie métabolique et constitue une cible thérapeutique de choix chez l'homme pour laquelle il est intéressant de trouver des inhibiteurs.

III.3.1. Voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates (VPP) est divisée en deux parties : une phase oxydative irréversible et une phase non oxydative réversible (*Figure 24*). La partie oxydative consiste en la conversion du glucose-6-phosphate provenant de la glycolyse en ribulose-5-phosphate par une série de trois réactions enzymatiques. Cette partie de la VPP produit du NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit), un cofacteur réduit nécessaire à la biosynthèse des acides

gras, des acides aminés, des nucléotides et à la réduction du glutathion qui lui-même permet de lutter contre le stress oxydatif (*via* les espèces réactives de l'oxygène).

La voie non-oxydative débute par l'isomérisation et l'épimérisation du ribulose-5-phosphate issu de la voie oxydative, respectivement en ribose-5-phosphate et xylulose-5-phosphate. Le ribose-5-phosphate est un précurseur de la synthèse des nucléotides et de coenzymes nicotiniques (NAD⁺ et NADP⁺) et flaviniques (FMN et FAD). Les deux pentoses phosphates issus de cette première étape rejoignent une cascade de réactions réversibles impliquant deux enzymes, la transcétolase (TK) et la transaldolase (TA). La TK catalyse la transformation du ribose-5-phosphate (R5P) et xylulose-5-phosphate (X5P) en glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et sédoheptulose-7-phosphate (S7P) ainsi que la transformation de l'érythrose-4-phosphate (E4P) et du X5P en fructose-6-phosphate (F6P) et G3P. La TA convertit le S7P et G3P en E4P et F6P. Au cours de la VPP, de nombreux composés phosphorylés sont produits et interviennent dans différentes voies métaboliques : le G3P et le F6P rejoignent la glycolyse et l'E4P est un précurseur de la synthèse des acides aminés aromatiques (*via* la voie du shikimate).

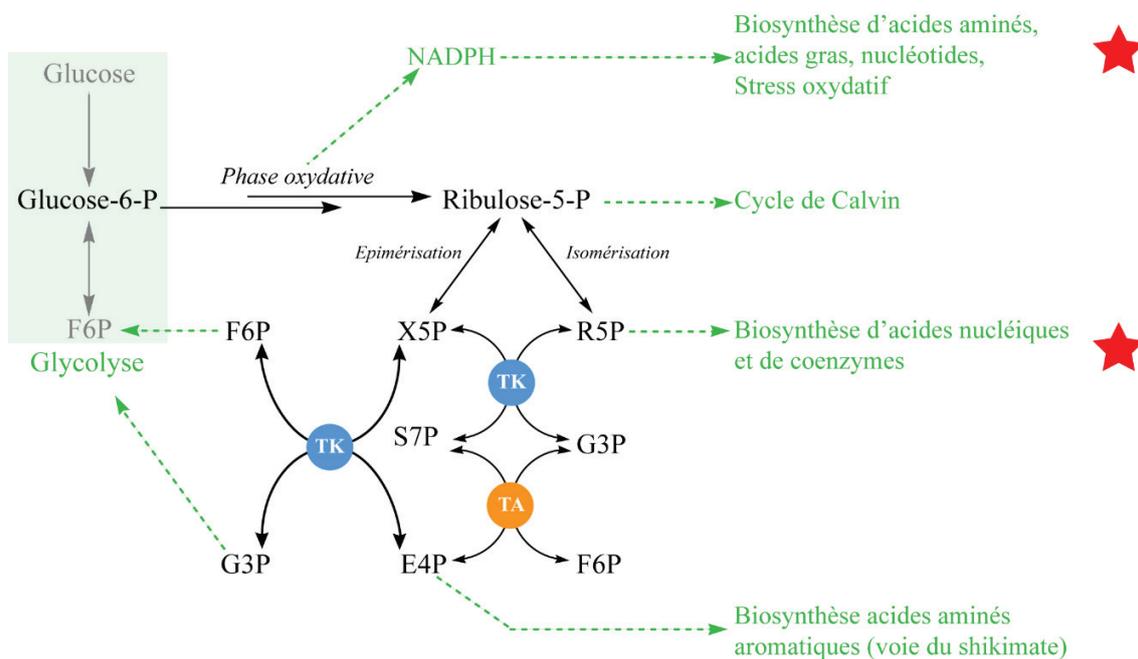


Figure 24. Schéma de la voie des pentoses phosphates et des connexions avec les autres voies métaboliques (en vert). Les étoiles rouges correspondent aux voies métaboliques qui sont suractivées dans le cadre de certains cancers. (TK : transcétolase, TA : transaldolase).

La TK et la TA catalysent des réactions réversibles, ce qui permet à la cellule de s'adapter à la demande métabolique. Par exemple, quand une cellule est soumise à un fort stress oxydatif, le F6P est réintroduit dans la glycolyse et la phase oxydative de la VPP est suractivée permettant une production accrue de NADPH et donc la lutte contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Quand la demande en nucléotides est élevée, notamment lors de la division cellulaire, la VPP est favorisée dans le sens de la formation du R5P (par la voie oxydative ou non oxydative).

III.3.2. Cycle de Calvin

Chez les plantes, la TK intervient dans la photosynthèse et plus particulièrement dans le cycle de Calvin. Cette voie métabolique a pour rôle de convertir le CO₂ capté par les organismes photosynthétiques en composés organiques à l'aide d'ATP et de NADPH. La TK intervient dans la phase de régénération du ribulose-1,5-bisphosphate, précurseur du cycle de Calvin. En effet, elle permet de former du R5P et du X5P qui seront respectivement pris en charge par une isomérase et une épimérase pour former du ribulose-5-phosphate qui sera ensuite phosphorylé pour former le précurseur (ribulose-1,5-bisphosphate) (*Figure 24*).

III.3.3. Implication dans les maladies humaines

La voie des pentoses phosphates, et en particulier la TK, ont un rôle essentiel dans le métabolisme cellulaire. De nombreux travaux ont montré l'implication de la VPP dans des pathologies telles que certains cancers ou certaines maladies neurodégénératives ou dans la survie de certains parasites pathogènes.

III.3.3.a. Cancer

Les cellules cancéreuses sont connues pour reprogrammer leur métabolisme afin de répondre à des demandes énergétiques élevées nécessaires à une croissance rapide et incontrôlée.¹⁰³ Elles ont, entre autres, un besoin accru en nucléotides pour la synthèse d'ADN et d'ARN. De nombreuses études ont montré que la VPP était suractivée dans cette situation pathologique.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ Cette suractivation permet une production accrue de ribose-5-phosphate permettant de générer *de novo* des ribonucléotides supplémentaires¹⁰⁵ (*Figure 24*). Des expériences de marquage au carbone 13 ont démontré que, dans les cellules tumorales, plus de 80% des ribonucléotides provenaient de

la VPP.¹⁰⁸ Les cellules cancéreuses peuvent ainsi activer leur VPP en augmentant le taux d'expression des enzymes impliquées, et en particulier l'expression de la TK.

Au sein du génome humain, un gène codant pour la TK (*tkt*) et deux gènes codant pour des protéines dites « TK-like » (*tktl1* et *tktl2*) ont été identifiés. Les gènes *tktl1* et *tktl2* présentent plus de 60% d'identité avec *tkt*. Cependant, ils présentent des délétions et substitutions de parties de gènes présentes dans le gène *tkt* et codant pour des résidus essentiels dans la fixation des substrats et la catalyse. Il a ainsi été supposé que la protéine Tktl1 avait un mécanisme enzymatique différent de la TK et que la Tktl2 ne possédait qu'une très faible activité TK.⁹⁸ De plus, plusieurs travaux ont démontré que les ARN messagers ainsi que les protéines issues du gène *tktl1* étaient surexprimés dans les cellules tumorales tandis que l'expression de *tkt* et *tktl2* n'était pas régulée.^{7,109} La prolifération des cellules cancéreuses peut ainsi être ralentie voire stoppée en inhibant les TK et/ou TK-like à l'aide d'inhibiteurs¹¹⁰⁻¹¹² ou d'ARN interférents (ARNi)¹¹³ ou en mutant les gènes associés (thérapie génique).¹¹⁴

En plus de générer des pentoses phosphates, la VPP produit un antioxydant majeur, le NADPH. Il est impliqué d'une part dans la biosynthèse des acides gras nécessaires à la formation des membranes et pour le stockage de molécules énergétiques (triglycérides). D'autre part, le NADPH favorise la survie des cellules subissant un stress oxydatif : les espèces radicalaires réactives de l'oxygène (ROS), produites en cas de stress oxydatif, sont réduites par une glutathion peroxydase (GSH peroxydase) qui catalyse en parallèle l'oxydation du glutathion (GSH) (*Figure 25*). Le NADPH permet alors la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en présence d'une glutathion réductase (GSH réductase), et donc de renouveler la machinerie de « détoxification » de la cellule. Dans le cadre de certains cancers, il a été montré que les cellules cancéreuses produisaient de grandes quantités de ROS notamment à cause d'une suractivation de la NADPH oxydase. Ces cellules ont donc besoin d'éliminer les ROS pour leur survie. Elles vont ainsi limiter leur glycolyse en déplaçant le flux de glucose-6-phosphate vers la VPP afin de produire plus de NADPH pour les défenses antioxydantes (*Figure 24*).^{104,115}

Enfin, la relation entre cancer et thiamine (précurseur de la TPP, le cofacteur de la TK) est très controversée. Certaines études montrent que la supplémentation en thiamine dans des cellules cancéreuses favoriserait la survie cellulaire, la prolifération et la chimiorésistance¹¹⁶ tandis que d'autres études montrent qu'une telle pratique a des effets anti-tumoraux.¹¹⁷

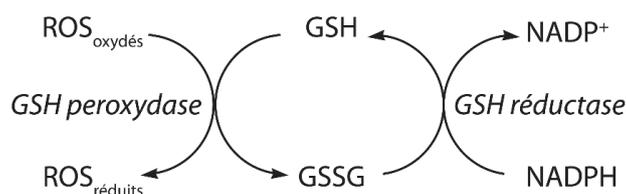


Figure 25. Schéma de la réduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS) en présence de glutathion peroxydase (GSH peroxydase), de glutathion réductase (GSH réductase). Le glutathion oxydé (GSSG) est réduit par une glutathion réductase (GSH réductase) en présence de NADPH.

III.3.3.b. Maladies neurodégénératives

L'encéphalopathie de Wernicke est un trouble neuropsychiatrique généralement rencontré chez les patients souffrant d'alcoolisme chronique, de malnutrition associée à une maladie gastro-intestinale ou du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Cette pathologie est causée par une déficience en thiamine, encore appelée vitamine B1, qui est le précurseur de la TPP. En effet, la TPP est synthétisée soit à partir du métabolisme des purines et de la glycolyse soit à partir de la vitamine B1, phosphorylée à l'aide d'une kinase.^{118,119} Une carence en thiamine provoquera donc une déficience en TPP causant une diminution de l'activité de la TK dans les tissus du cerveau (corps mamillaires, olive inférieure, thalamus et autres régions préventriculaires).¹²⁰ Cette pathologie est généralement associée au syndrome de Korsakoff qui est la conséquence chronique de la déficience en thiamine causant une altération importante de la mémoire. L'administration de thiamine est un des traitements envisagés pour cette maladie.^{11,121-123}

L'implication de la TK dans la maladie d'Alzheimer a également été démontrée. En effet, des études *post-mortem* sur des cerveaux de patients atteints de cette maladie ont montré une diminution de l'activité de la TK. De plus, des TK présentant une structure différente ont été détectées dans les fibroblastes de peau de patients atteints de cette maladie. Cette différence structurale est due au clivage protéolytique de la TK produisant des sous unités plus petites avec un résidu d'activité.¹²⁴ La détection de ces sous unités constitue un marqueur pour la maladie d'Alzheimer, en particulier pour les patients asymptomatiques. Cette modification est l'œuvre de cystéine-protéinases¹²⁵ et de nouveaux traitements à base d'inhibiteurs de ces protéases sont envisagés.¹²⁶

III.3.3.c. Paludisme

Le paludisme, encore appelé malaria, est une maladie infectieuse causant près de 500 000 décès par an, selon l’OMS.¹²⁷ Elle est causée par un parasite, *Plasmodium falciparum*, infectant entre 300 et 500 000 personnes par an. Le développement de résistances aux médicaments anti-malaria a fait naître le besoin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques au sein de ce parasite. La VPP, et en particulier la TK, a été identifiée comme essentielle à la survie de ce parasite notamment pour fournir du ribose-5-phosphate nécessaire à la synthèse nucléotidique. Des études basées sur l’incorporation de carbone radioactif ont montré que plus de 80% des acides nucléiques du parasites sont issus de la partie non oxydative de la VPP.^{128,129} De plus, des études structurales de la TK de *P. falciparum* ont montré des différences significatives avec la TK humaine⁹⁷, ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante. Il sera donc plus facile de cibler la TK de *P. falciparum* sans cibler la TK humaine en créant des inhibiteurs spécifiques de l’enzyme du parasite. Des criblages *in silico* de cette TK¹³⁰ et la synthèse d’inhibiteurs dérivés de quinolines ont déjà été réalisés.⁹⁰

III.3.3.d. Tuberculose

La tuberculose est une maladie infectieuse touchant près d’un tiers de la population mondiale (à l’état latent, c’est-à-dire qu’ils ont été infectés par la bactérie mais n’ont pas développé la maladie) et provoquant près de 2 millions de mort par an.¹³²⁻¹³⁴ Elle touche le plus souvent les poumons et est causée par une bactérie, *Mycobacterium tuberculosis*. Les traitements antituberculeux sont contraignants et des résistances aux médicaments sont de plus en plus observées. Le besoin de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques chez cette bactérie est urgent afin de développer de nouveaux agents chimio-thérapeutiques. L’analyse de la séquence génomique de *M. tuberculosis*¹³⁵ ainsi que des études protéomiques^{136,137} ont permis de mettre en évidence l’importance de la VPP et de la TK dans la survie de la bactérie. La TK de cette bactérie a été caractérisée au niveau structural et cinétique et des différences notables avec la TK humaine ont été démontrées. En particulier, deux inhibiteurs connus de la TK humaine (l’oxythiamine et le 5-benzyl-3-phenylpyrazolo[1,5- α]pyrimidin-7(4H)-one) n’ont aucun effet sur la TK de *M. tuberculosis*.⁹⁶ Tout comme la TK de *P. falciparum* dans le paludisme, ces différences structurales et d’inhibition sont exploitées lors de criblages *in silico* pour trouver des inhibiteurs ciblant spécifiquement la TK de *M. tuberculosis*.³⁵

III.3.3.e. Diabète

Les patients atteints de diabète présentent une concentration élevée en glucose dans le sang et de façon concomitante dans la rétine, dans les cellules endothéliales et dans les cellules neuronales. Cette concentration élevée va entraîner la glycosylation non enzymatique des protéines (*via* leurs groupements amines)¹³⁸ conduisant à la diminution de leur activité enzymatique et notamment celle de la TK. En effet, des mesures au sein de cellules endothéliales et de rétines de rats diabétiques ont montré une diminution de l'activité TK.¹³⁹ Cependant, l'ajout de benfothiamine, un dérivé de la thiamine, provoque une forte augmentation de l'activité TK dans ces cellules. Cette augmentation a pour conséquence le ralentissement de quatre voies métaboliques suractivées dans le cas d'une hyperglycémie et entraînant une inflammation chronique : la voie des hexosamines (conduisant l'addition de N-acétylglucosamine sur des protéines), la voie des produits de glycation (provoquant la perte de fonction ou la dégradation des protéines glyquées), la voie de la protéine kinase C (activée par le diacylglycérol synthétisé à partir des produits de glycolyse) et l'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NFκB (activant les gènes codant pour les protéines pro-inflammatoires). Ainsi, l'activation de la TK représente une solution intéressante pour la thérapie et la prévention des complications causées par le diabète.

III.4. Inhibiteurs des transcétolases

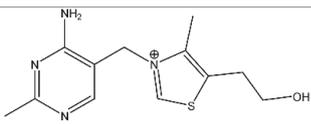
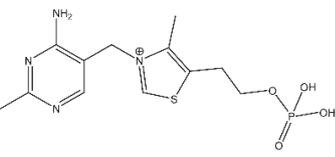
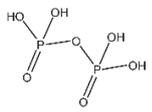
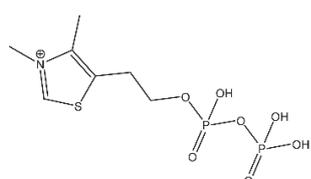
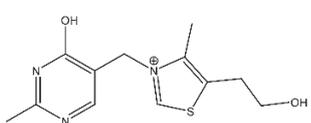
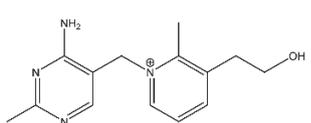
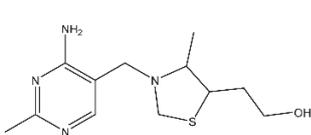
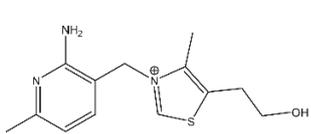
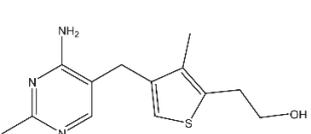
L'implication de la TK dans de nombreuses pathologies a fait naître le besoin de trouver des inhibiteurs spécifiques de cette enzyme. De nombreuses molécules décrites comme inhibitrices de la TK sont recensées dans la littérature. Les inhibiteurs sont caractérisés par des valeurs de concentrations inhibitrices 50 (CI₅₀) et/ou des constantes d'inhibition (K_i) *in vitro* et des valeurs de concentrations efficaces 50 (CE₅₀) *in vivo*, correspondant à la concentration en inhibiteur provoquant 50% de l'effet biologique désiré. Dans le cadre du cancer, des GI₅₀ (pour « Growth Inhibition 50 ») sont calculés, correspondant à la concentration en médicament nécessaire pour inhiber 50% de la prolifération cellulaire.

III.4.1. Analogues du cofacteur

Les premières recherches d'inhibiteurs de TK ont été réalisées sur l'enzyme de *S. cerevisiae* et se sont concentrées sur des analogues de la TPP (Tableau 6). La thiamine (**1**), la thiamine

monophosphate (2), le pyrophosphate (3) et le thiazole pyrophosphate (4) sont donc les premiers analogues décrits comme des inhibiteurs compétitifs de la TPP par Kochetov et *al.*¹⁴⁰

Tableau 6. Analogues de la TPP décrits comme inhibiteurs compétitifs de la TK de *S. cerevisiae*.

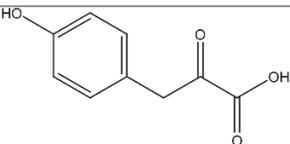
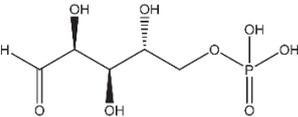
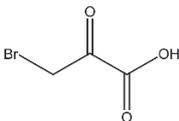
Inhibiteur	Structure	K_I (μM)	Ref
Thiamine	(1) 	34 000	140
Thiamine monophosphate	(2) 	2 000	140
Pyrophosphate	(3) 	280	140
Thiazole pyrophosphate	(4) 	5,4	140
Oxythiamine	(5) 	0,2	141
Pyriothiamine	(6) 	110	142
Tétrahydrothiamine	(7) 	0,4	142
N3'-pyridylthiamine	(8) 	0,01	143
3-déazathiamine	(9) 	1,2	144

D'autres équipes ont étudié l'influence de chacun des éléments structuraux de la TPP sur le potentiel inhibiteur de la molécule en calculant des constantes d'inhibition (K_I)¹⁴⁵. L'oxythiamine (**5**)¹⁴¹, la pyrithiamine (**6**)¹⁴², la tétrahydrothiamine (**7**)¹⁴², la N3'-pyridylthiamine (**8**)¹⁴³ et la 3-dézazathiamine (**9**)¹⁴⁴ apparaissent ainsi comme des inhibiteurs de la TK rentrant en compétition avec la TPP. Des études plus poussées visant à modifier chacune des substitutions des deux cycles de la TPP ont également été réalisées par Thomas et *al.* afin d'identifier des antagonistes à la TPP *in vitro* et *in vivo*.^{144,146,147} Certains analogues de la TPP apparaissent donc comme des inhibiteurs efficaces de la TK, cependant, chez l'homme, il existe plusieurs enzymes ayant la TPP comme cofacteur.¹⁴⁵ Ces analogues de la TPP sont donc peu spécifiques puisqu'ils pourront inhiber toutes les enzymes à TPP.

III.4.2. Analogues des substrats

La seconde stratégie afin d'inhiber la TK est de trouver des analogues des substrats donneurs ou accepteurs (*Tableau 7*). L'hydroxyphénylpyruvate (HPP) (**10**), précurseur de la synthèse de la tyrosine, a ainsi été décrit comme inhibiteur de la TK de *S. cerevisiae*.¹⁴⁸ Cet analogue de l'hydroxypyruvate (HPA), substrat donneur de la TK, présente une constante d'inhibition de 3 mM. Le D-arabinose-5-phosphate (**11**) est un exemple d'analogue du substrat accepteur qui inhibe compétitivement la TK de *E. coli* avec un K_I de 6 mM.⁸³

Tableau 7. Analogues des substrats donneurs ou accepteurs de la TK décrits comme inhibiteurs compétitifs

Inhibiteur	Structure	K_I (μM)	Ref
Hydroxyphénylpyruvate (10)		3 000	148
D-arabinose-5-phosphate (11)		6 000	83
Bromopyruvate (12)		$CI_{50} = 3\ 000$ μM	149

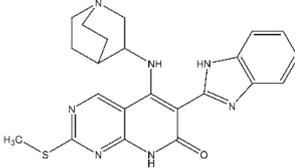
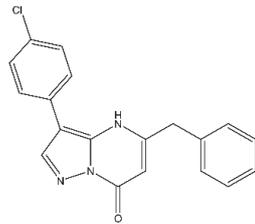
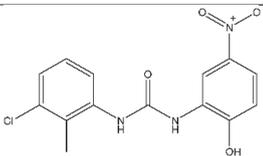
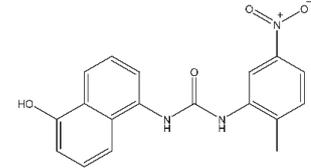
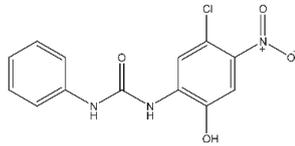
Enfin, le bromopyruvate (**12**), également analogue de l'HPA, n'a pas été décrit comme inhibiteur de la TK mais N. Touisni a étudié l'effet de cet analogue sur l'activité de la TK de *E. coli* et une CI_{50} de 3 mM a été déterminée.¹⁴⁹

III.4.3. Inhibiteurs issus de criblages

Des criblages d'inhibiteurs de TK ont déjà été réalisés avec différentes méthodes et selon différentes stratégies. Le premier exemple est un criblage d'une chimiothèque non sélective à l'aide d'une méthode spectroscopique de fluorescence afin de trouver de nouveaux inhibiteurs de la TK humaine.¹⁵⁰ Plus de 60 000 molécules ont été testées et 913 molécules ont montré une inhibition de la TK significative, 175 ont présentés une CI_{50} inférieure à 5 μ M et 54 une inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses ($GI_{50} < 10 \mu$ M). Deux molécules avec une forte sélectivité, des propriétés physicochimiques idéales et un faible poids moléculaire ont été sélectionnées pour l'étape d'optimisation (*Tableau 8*, **(13)** et **(14)**). Ces molécules provoquent une inhibition de l'activité TK et une suppression de la prolifération cellulaire dans 3 lignées de cellules cancéreuses.

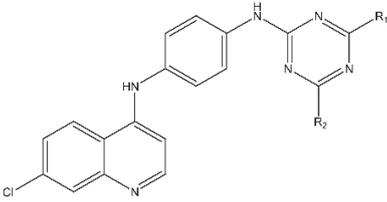
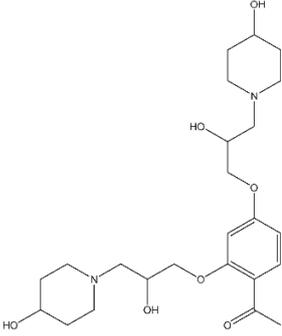
Un criblage virtuel de composés de type diphenyle urée a également été réalisé à l'aide d'un modèle de la TK humaine.¹⁵¹ La capacité inhibitrice de ces composés a ensuite été vérifiée *in vitro* en mesurant des CI_{50} à l'aide de méthodes spectrophotométriques et fluorimétriques et *in vivo* en mesurant des GI_{50} sur deux lignées de carcinomes du colon. Les hits les plus intéressants présentent des CI_{50} compris entre 100 et 200 μ M et des GI_{50} entre 6 et 17 μ M (*Tableau 8* **(15)**, **(16)** et **(17)**).

Tableau 8. Résultats de différents criblages de la TK humaine et critères d'inhibitions associés.

Type de criblage	Méthode de criblage	Structure des hits	CI ₅₀ (μM)	GI ₅₀ (μM)	Ref
Non sélectif	Spectrophotométrie fluorescence	(13) 	4,0	0,4-0,7	150
		(14) 	3,9	0,4-10,4	150
Basé sur des dérivés diphenyle urée	<i>In silico</i> puis spectrophotométrie UV-visible et fluorescence	(15) 	200	9-10	151
		(16) 	150	15-17	151
		(17) 	100	6-12	151

Des travaux ont également été effectués avec des TK provenant d'autres sources. En effet, dans le cadre de recherche de nouveaux médicaments anti-paludiques, des criblages *in silico* puis *in vitro* et *in vivo* d'inhibiteurs de la TK de *Plasmodium falciparum* ont été réalisés.^{131,152} Des dérivés de 4-anilinoquinoline triazines, dont la structure générale est présente dans le *Tableau 9 (18)*, ont ainsi été identifiés et présentent des CI₅₀ compris entre 75 et 85 μM.¹³¹ Un criblage virtuel utilisant les structures de substrats donneurs ou de la TPP a également permis d'identifier de nouvelles molécules inhibitrices dont la plus performante est présentée dans le *Tableau 9 (19)*.¹⁵²

Tableau 9. Résultats de différents criblages de la TK de *P. falciparum* et critères d'inhibitions associées.

Type de criblage	Méthode de criblage	Structure des hits	Inhibition	Ref
Basé sur des dérivés d'un médicament déjà décrit	<i>In silico</i> puis spectrophotométrie fluorescence	(18) 	CI ₅₀ = 75-85 μM	131
Non sélectif	<i>In silico</i> puis spectrophotométrie UV-visible	(19) 	41% d'inhibition à 200 μM	152

III.5. Méthodes permettant la mesure d'activité transcétolases

L'activité de la TK peut être mesurée par des méthodes spectrophotométriques, fluorométriques ou électrochimiques ainsi que par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et chromatographie en phase gazeuse (CPG). Ces méthodes sont basées sur la détection de la cétone formée (*Figure 26* en bleu), du second produit (pouvant être un aldéhyde ou non, *Figure 26* en vert) ou sur la détection de l'intermédiaire réactionnel DHETPP (*Figure 26* en orange).

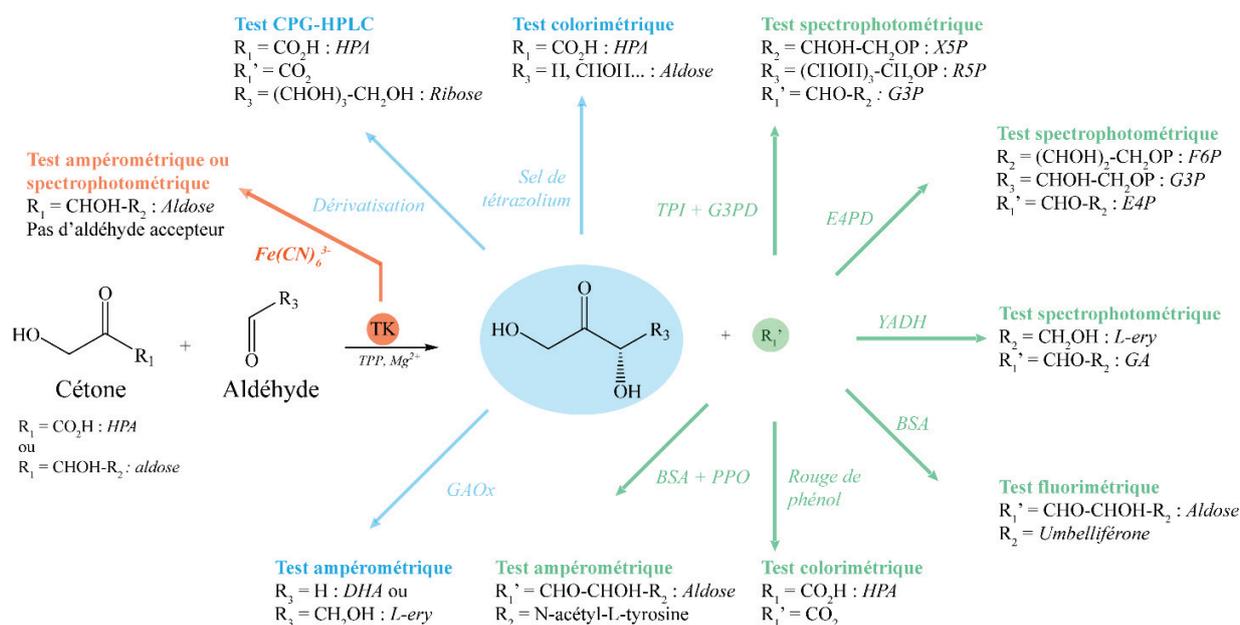


Figure 26. Tests d'activité de la TK basés sur la détection de la cétone formée (en bleu), du second produit (en vert) ou sur la détection de l'intermédiaire réactionnel (en orange). Les abréviations sont données dans le développement de chacune des méthodes. Schéma modifié à partir de la thèse de Julian Abdoul-Zabar.¹⁵³

III.5.1. Méthodes spectrophotométriques

Les principales méthodes spectrophotométriques permettant de mesurer l'activité TK nécessitent l'intervention d'une ou plusieurs enzymes auxiliaires, prenant en charge les produits de la réaction catalysée par la TK. Ce sont généralement des déshydrogénases nécessitant le NADH comme cofacteur, dont la consommation ou la production peut être suivie par spectrophotométrie. Initialement, l'activité TK était mesurée en présence xylulose-5-phosphate (X5P) et ribose-5-phosphate (R5P) comme substrats et d'une triose phosphate isomérase (TPI) et d'une glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (G3PD) comme enzymes auxiliaires.¹⁵⁴ Le NADH consommé par la déshydrogénase est donc détecté à 340 nm par spectrophotométrie. Une méthode simplifiée, nécessitant le fructose-6-phosphate (F6P) et le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) comme substrats, a également été développée avec une seule enzyme auxiliaire, la erythrose-4-phosphate déshydrogénase (E4PD).¹⁵⁵ Cependant, le besoin d'une méthode plus générale, permettant la mesure d'activité TK en présence d'un large spectre de substrats, l'indisponibilité commerciale de certains réactifs (X5P) ainsi que le coût élevé des substrats phosphorylés ont fait évoluer ces méthodes spectrophotométriques. Un test utilisant un substrat donneur plus économique, le L-erythrose (L-ery), et permettant de tester un grand nombre d'aldéhydes

accepteurs a été développé. L'alcool déshydrogénase de *S. cerevisiae* (ADH) est utilisée comme enzyme auxiliaire prenant en charge le glycolaldéhyde (GA) produit.¹⁵⁶ Cependant, ces méthodes spectrophotométriques nécessitent l'utilisation de NADH rendant ces tests coûteux notamment pour le criblage et sont soumises à des interférences optiques dues aux mesures dans le domaine d'ultra-violet. Une méthode développée par Kochetov et *al.* permet de s'affranchir de ces réactifs onéreux.¹⁵⁷ Elle est basée sur l'oxydation de l'intermédiaire réactionnel α,β -dihydroxyéthylthiamine pyrophosphate (DHETPP) formé après la fixation du substrat donneur et la libération du premier produit, par un oxydant, le ferricyanure ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$). Le ferrocyanure ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) produit peut être détecté par spectrophotométrie à 420 nm. Cette méthode n'utilise donc qu'un seul substrat de la TK et ne requière pas d'enzyme auxiliaire. Cependant, elle demande une grande quantité d'enzyme (environ 300 μg par essai) et est peu sensible car le coefficient d'extinction molaire du ferrocyanure est faible ($1000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Des tests colorimétriques ont également été développés pour mesurer l'activité de la TK. Une première méthode est basée sur la mesure de variation de pH à l'aide d'un indicateur coloré (le rouge de phénol).¹⁵⁸ Cette variation est due à la décarboxylation de l'hydroxypyruvate (HPA) en présence de la TK de *E. coli* produisant des ions bicarbonates entraînant une augmentation du pH. Cette méthode permet d'utiliser des substrats non phosphorylés et de tester une large gamme d'aldéhydes accepteurs. Cependant, elle nécessite l'utilisation d'un milieu faiblement tamponné afin de pouvoir mesurer ces variations de pH et est peu sensible.

Un second test colorimétrique repose sur l'oxydation de composés 2-hydroxycétone par un sel de tétrazolium (chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium) incolore qui, réduit en formazan (rouge) absorbe à 485 nm (*Figure 27*).¹⁵⁹ Cette méthode nécessite l'utilisation de l'HPA comme substrat donneur et est limitée à des aldéhydes non α -hydroxylés comme accepteurs. Malgré le fait que ce soit une méthode peu coûteuse et directe, applicable au criblage haut débit, elle est très dépendante du substrat car la réaction avec le sel de tétrazolium est peu spécifique.

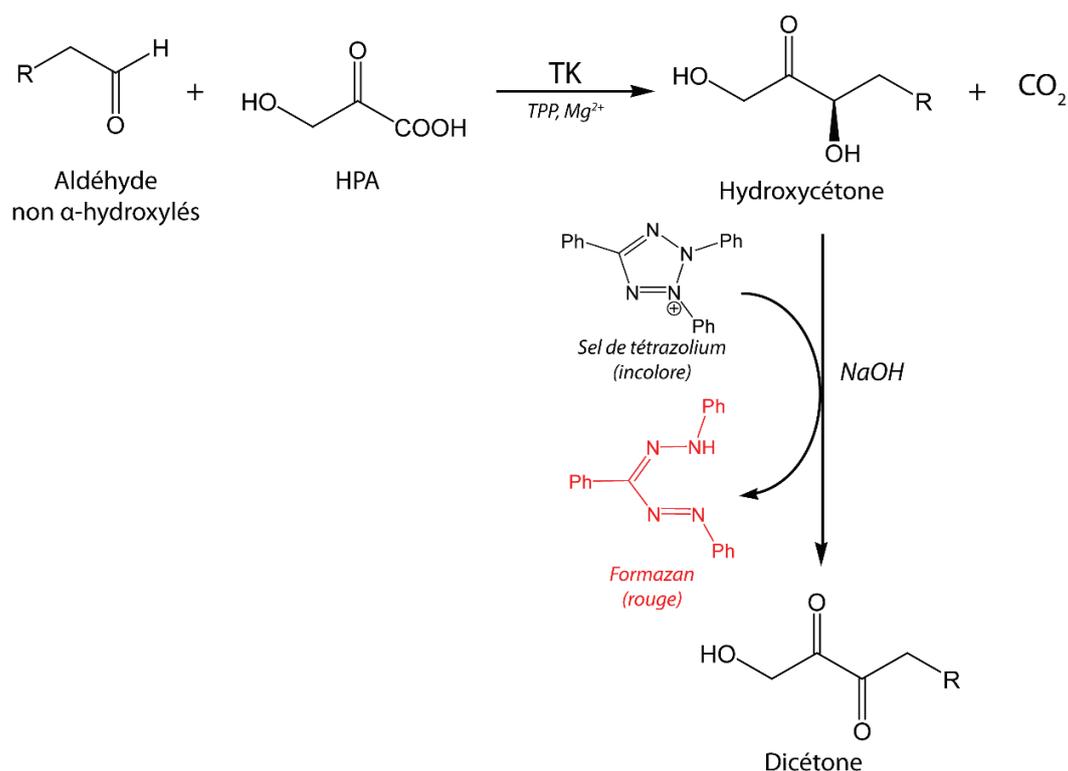


Figure 27. Test colorimétrique de détection d'activité TK en présence de rouge de tétrazolium conduisant à la formation d'un formazan absorbance à 485 nm..

III.5.2. Méthodes fluorimétriques

Deux types de tests permettant la mesure d'activité TK par fluorimétrie ont été développés. Les premiers sont basés sur la détection du NADH dont la longueur d'onde d'excitation est de 330 nm et la longueur d'onde d'émission à 450 nm. Les tests impliquant les déshydrogénases présentées dans le paragraphe III.6.1 peuvent donc utiliser la fluorescence comme méthode de détection. Un test impliquant la TPI et la G3PD et basé sur la détection fluorimétrique du NADH a ainsi été développé dans le but de cribler des inhibiteurs de la TK humaine *in vitro*.¹⁵⁰ De même que pour les tests spectrophotométriques, cette méthode sensible a pour limitations le coût des réactions et l'utilisation de deux enzymes auxiliaires.

Le second test fluorimétrique consiste à utiliser un substrat fluorogénique et plus précisément un substrat sur lequel est greffé un sonde fluorescente, l'umbelliférone.¹⁶⁰ Après réaction enzymatique, cette sonde est présente dans le produit formé et est ensuite libérée par β -élimination à l'aide d'albumine de sérum bovin (BSA). L'umbelliférone libérée peut ensuite être détectée en l'excitant à 390 nm et en mesurant l'émission à 452 nm. Cette méthode est limitée par la synthèse

des substrats et la vitesse de libération de la sonde. De plus, la TK a une faible affinité pour les substrats possédant un groupement umbelliférone.

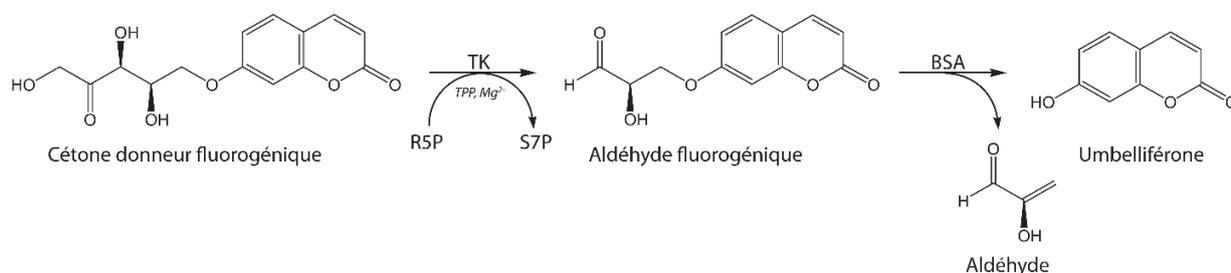


Figure 28. Test d'activité de la TK en présence d'un substrat modifié par un groupement umbelliférone. Cette sonde fluorescente est ensuite libérée par β -élimination catalysée par la BSA et détectée par fluorescence ($\lambda_{excitation} = 390 \text{ nm}$ et $\lambda_{émission} = 452 \text{ nm}$).

III.5.3. Chromatographie en phase liquide à haute performance et chromatographie en phase gazeuse

Un test d'activité TK utilisant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été proposé en 1996 par Mitra et *al.*¹⁶¹ Cette méthode permet de séparer les molécules en fonction de leur affinité pour la phase mobile ou la phase stationnaire. La formation du L-erythrulose (L-ery) produit par la réaction entre l'hydroxypyruvate (HPA) et le glycolaldéhyde (GA) catalysée par la TK est suivie, à l'aide de mesures d'indice de réfraction. Basé sur ce premier test, une méthode haut débit a, par la suite, été implémentée et adaptée à l'utilisation de microplaques.¹⁶² Dans ce cas, la détection est réalisée à l'aide de mesures spectrophotométriques à 210 nm permettant de mettre en évidence les groupements carbonyles des substrats et produits. L'utilisation de la chromatographie liquide à ultra haute résolution (UPLC) a réduit le temps d'analyse à 1,2 min permettant alors le criblage de 1200 molécules par jour. Cette méthode est sensible et adaptable à de nombreux substrats, cependant, ces techniques sont chères et sophistiquées et nécessitent de grandes quantités de solvants.

Des méthodes de chromatographie en phase gazeuse (CPG) ont également été développées pour les mesures d'activité TK.^{163,164} La CPG permet de séparer des molécules en fonction de leur volatilité et nécessite donc que les produits soient sous forme gazeuse. Si une molécule n'est pas volatile naturellement, des réactions de dérivatisation lui permettent de le devenir à des températures ne provoquant pas sa décomposition. Par exemple, l'ajout de groupements silylés sur

les produits de réaction de la TK permettent leur détection par CPG.¹⁶⁴ Cette méthode est très sensible et peut être adaptée à de nombreux substrats. Cependant, les substrats de la TK n'étant pas très volatiles (la plupart sont des polyols), plusieurs étapes permettant leur dérivation sont nécessaires (*Figure 29*). La CPG est donc difficile à mettre en place et demande beaucoup de temps notamment dans l'optimisation de l'étape de dérivation.

Le couplage de l'HPLC avec la CPG a alors été une solution afin d'adapter ces tests à haut débit. Ce couplage a été utilisé dans la cadre d'un criblage de mutants de la TK obtenus par évolution dirigée : une première sélection des TK actives a été réalisée par HPLC en présence d'HPA et de GA comme substrats et les mutants les plus actifs (en présence d'hydroxypyruvate et de ribose) ont été sélectionnés par CPG (*Figure 29*).¹⁶⁴

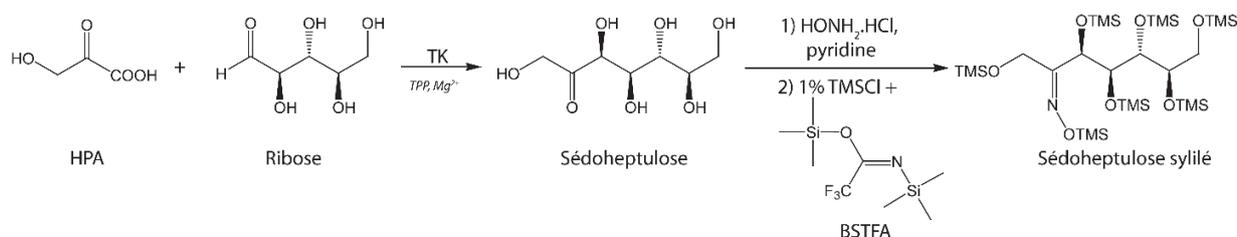


Figure 29. Dérivatisation du produit de réaction catalysée par la TK en présence d'HPA et de ribose comme substrats en vue d'une détection par chromatographie en phase gazeuse (BSTFA = N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, TMS = trimethylsilyl).

III.5.4. Méthodes ampérométriques

Trois tests électrochimiques permettant de mesurer l'activité TK ont été décrits. Le *Tableau 10* compare les performances (limites de détection, sensibilité, densité de courant maximale...) de chacun de ces systèmes électrochimiques.

Le premier test électrochimique utilise un substrat donneur sur lequel est conjugué l'ester éthylique de la N-acétyl-L-tyrosine (N-Ac-Tyr-OEt) et le ribose-5-phosphate comme substrat accepteur¹⁶⁵. La réaction catalysée par la TK conduit à la formation de l' α -hydroxyaldéhyde correspondant portant le groupement N-Ac-Tyr-OEt et du sédoheptulose-7-phosphate (*Figure 30*). L'action de l'albumine de sérum bovin (BSA) sur l'hydroxyaldéhyde produit conduit à la libération du N-Ac-Tyr-OEt par β -élimination. Cet ester éthylique est alors oxydé par une polyphénol oxydase (PPO) en orthoquinone pouvant être réduite en catéchol à l'aide d'une électrode de carbone sous l'application d'un potentiel de -0,2 V vs. Ag/AgCl.

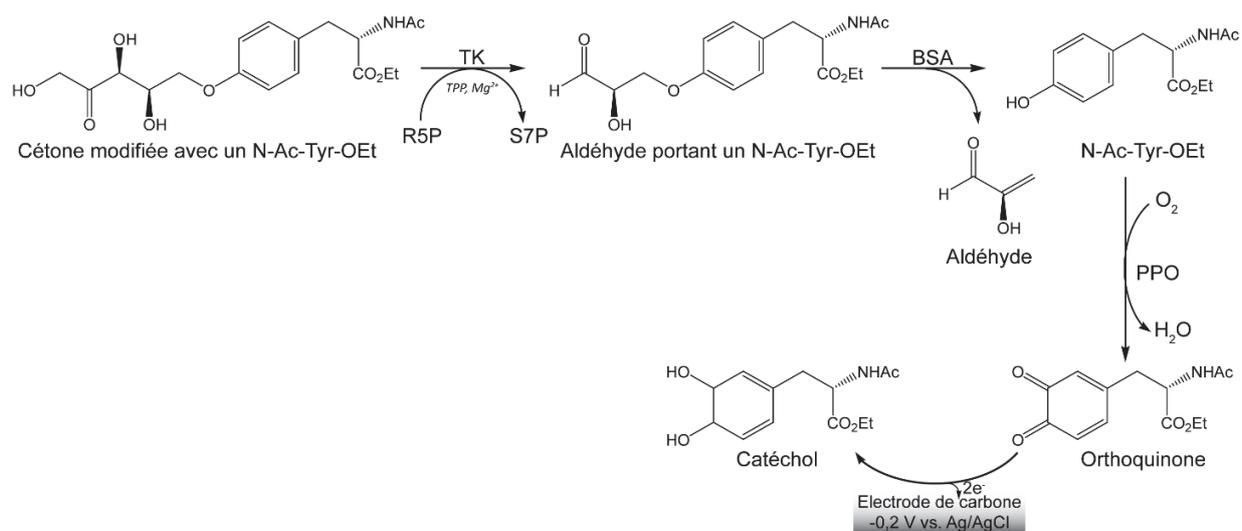


Figure 30. Détection de l'activité de la TK par électrochimie à l'aide d'une polyphénol oxydase (PPO) et d'un substrat modifié avec un ester éthylique de la N-acétyl-L-tyrosine (N-Ac-Tyr-OEt).

Cette méthode électrochimique est très sensible pour la détection de l'orthoquinone, cependant, elle requiert une étape de synthèse du substrat. De plus, la réaction est très lente et le substrat modifié a une faible affinité pour la TK à cause de son fort encombrement stérique. Enfin, l'étape de libération de la sonde électrochimique par la BSA est limitante. Pour ces raisons, aucun résultat n'a été publié sur la sensibilité de détection de la TPP (Tableau 10).

Un second test a donc été développé utilisant des substrats non modifiés¹⁶⁶ : le F6P comme substrat donneur et le glycolaldéhyde (GA) comme accepteur, décrit comme étant le meilleur substrat non phosphorylé de la TK. La réaction catalysée par la TK conduit à la formation de L-ery pouvant être oxydé par une galactose oxydase (GAOx) (Figure 31A). Cette réaction auxiliaire nécessite la présence d'oxygène dissout et produit du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pouvant être détecté à l'aide d'une électrode de platine en appliquant un potentiel de +0,6 V vs. Ag/AgCl.

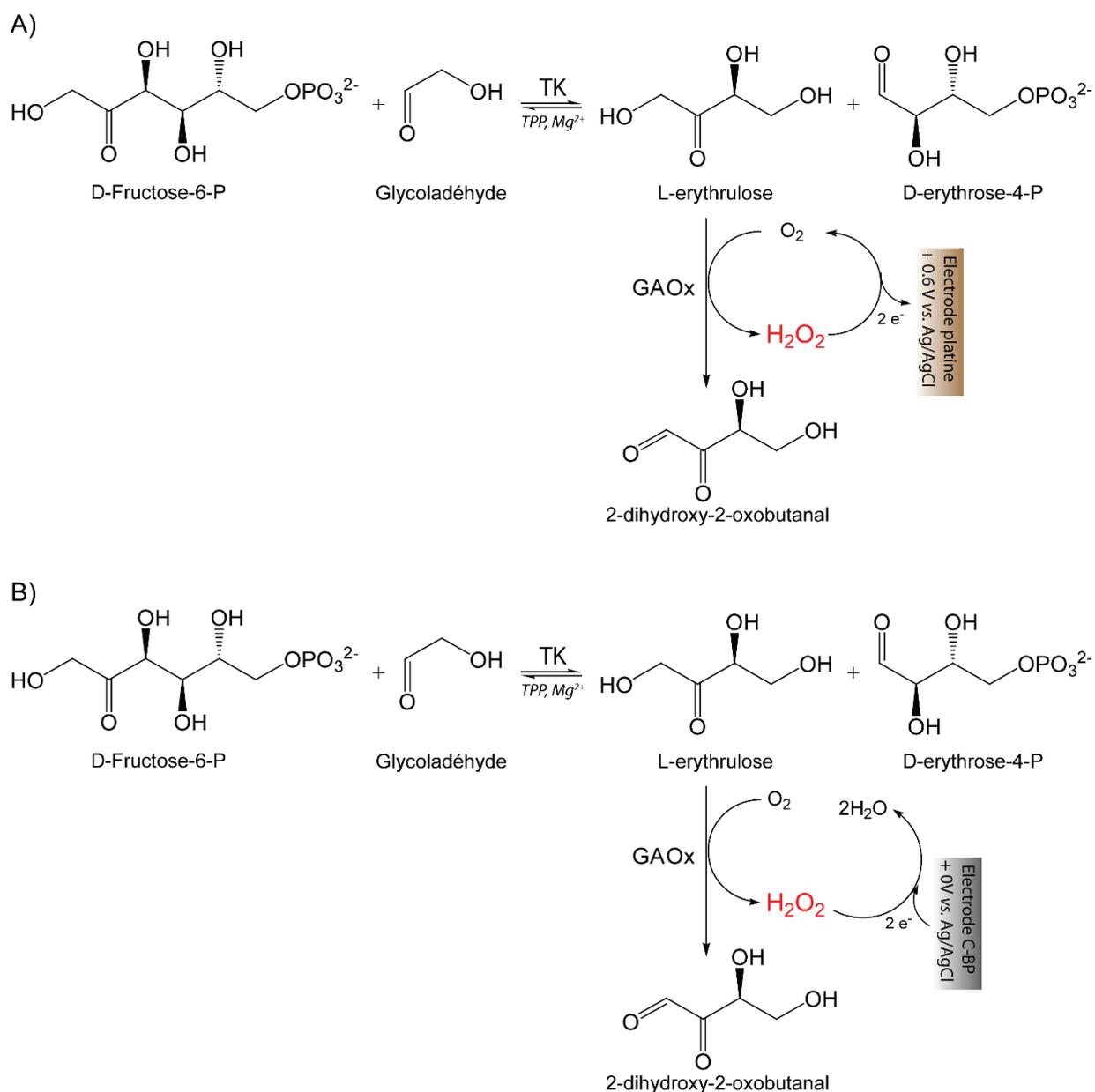


Figure 31. Détection de l'activité de la TK par électrochimie à l'aide d'une galactose oxydase (GAOx). Celle-ci va oxyder le L-erythrulose produit par la TK en présence d' O_2 et produire du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) détectable à l'aide A) d'une électrode de platine (+0,6 V vs. Ag/AgCl) ou B) d'une électrode de carbone dopée au bleu de Prusse (C-BP, +0 V vs. Ag/AgCl).

La particularité de ce test repose dans l'immobilisation de la TK dans des matériaux inorganiques, les hydroxydes doubles lamellaires (HDL). Ces argiles sont constituées de cations métalliques formant des feuillets hexagonaux chargés positivement, séparés entre eux par des anions afin d'assurer l'électroneutralité. Les HDL possèdent des propriétés de porosité, de biocompatibilité et

d'échange d'ions particulièrement intéressantes pour l'immobilisation d'enzymes.^{167,168} De plus, la présence de molécules d'eau dans ce système tridimensionnel permet de conférer un environnement hydraté aux enzymes. Leur structure globale est $[M^{II}_{1-x}M^{III}_x(OH)_2]^{x+}[X^{m-}_{x/m} nH_2O]$ avec M^{II} le cation divalent (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} ...), M^{III} le cation trivalent (Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} ...) et X l'anion intercalant (NO_3^- , Cl^- , CO_3^{2-} ...). La TK possédant un point isoélectrique d'environ 5 et donc étant chargée négativement à un pH neutre, ces argiles constituent une matrice intéressante pour la conception d'une structure biohybride alors appelés TK@HDL. La composition de ces HDL, la méthode d'immobilisation (co-précipitation ou absorption) ainsi que la proportion de la matrice par rapport à l'enzyme ont été optimisées au cours de la thèse de N. Touisni¹⁴⁹. L'HDL la plus adaptée est $Mg_2-Al-GlyGly$ et l'immobilisation est réalisée par coprécipitation avec un rapport TK:HDL de 1:2. Le point isoélectrique de la GAOx est de 7,75 ce qui compromet son immobilisation dans les HDL. C'est la raison pour laquelle une argile anionique, la laponite, est utilisée comme matrice d'immobilisation de cette enzyme.¹⁶⁹ La formule générale de cette argile est $(Mg_{5,5}Li_{0,5})Si_4O_{10}(OH)_2(Na^+_x, nH_2O)$. Elle adopte une structure en feuillets plus ou moins hydratés, chargés négativement et séparés par un cation compensateur (Na^+). Ce second test est plus sensible et plus rapide que le précédent. Les performances de ce système électrochimique pour la détection de la TPP sont données dans le *Tableau 10*. Cependant, l'application d'un potentiel élevé (+0,6 V vs. Ag/AgCl) entraîne des interférences dues à l'oxydation de molécules électroactives présentes dans le milieu. L'utilisation d'un médiateur électrochimique, le Bleu de Prusse ($Fe_4^{III}(Fe^{II}(CN)_6)_3$) a permis de contrecarrer ce problème (*Figure 31B*). Il permet la réduction spécifique du peroxyde d'hydrogène à un potentiel de -0,2 V vs. Ag/AgCl et donc de s'affranchir des interférences électrochimiques.¹⁷⁰ Malheureusement, aucune donnée concernant la performance de détection de la TPP n'a été publiée (*Tableau 10*). Enfin, très récemment, Halma et *al.* ont publié un nouveau test ampérométrique simplifié permettant de mesurer l'activité de la TK.¹⁷¹ Il est basé sur les travaux de Kochetov et *al.* qui utilisent le ferricyanure pour oxyder l'intermédiaire réactionnel DHETPP (voir paragraphe III.6.1).¹⁵⁷ Dans ce nouveau test électrochimique, le ferrocyanure produit est détecté par ampérométrie en appliquant un potentiel de +0,5 V vs. Ag/AgCl (*Figure 32*). L'immobilisation de la TK dans une suspension d'HDL (Mg_2Al-NO_3) est également une étape clé de ce biocapteur ampérométrique.

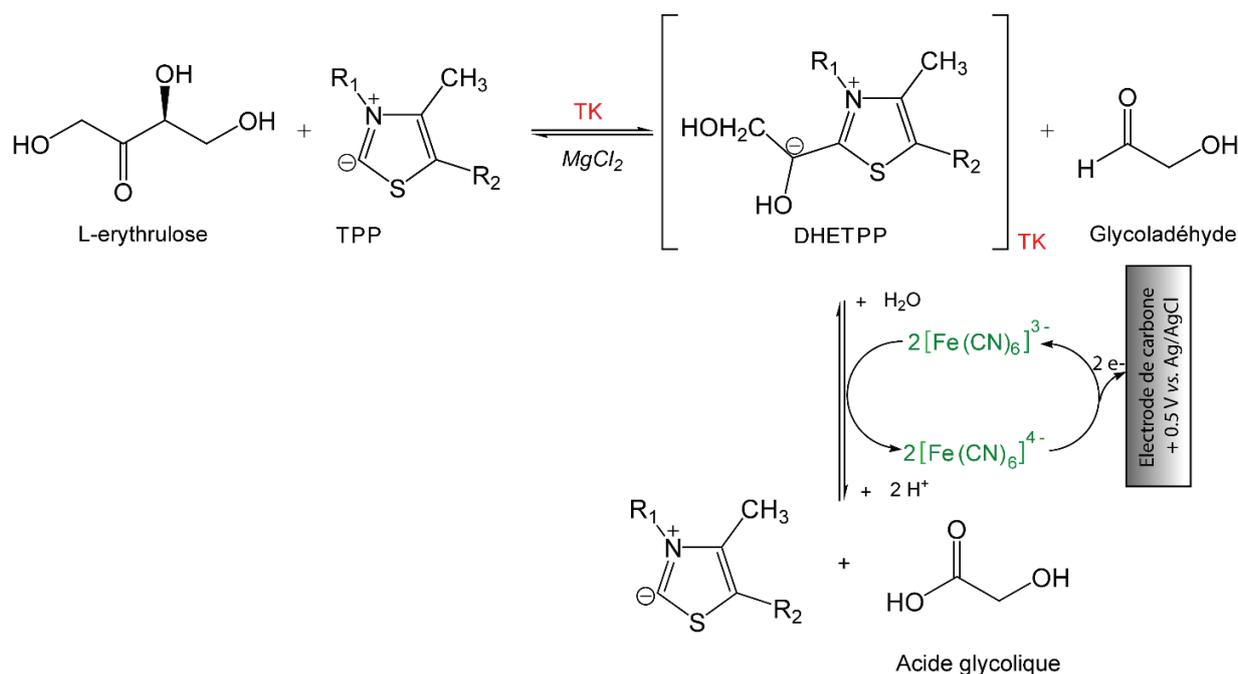


Figure 32. Détection de l'activité de la TK par électrochimie via l'oxydation de l'intermédiaire réactionnel (DHETPP) par le ferricyanure de potassium ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$). Le ferrocyanure ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) produit peut être oxydé à l'aide d'une électrode de carbone (+0,5 V vs. Ag/AgCl).

Tableau 10. Performances des systèmes électrochimiques développés pour la mesure d'activité TK (immobilisée dans des HDL) : la sensibilité, la limite de détection, la gamme linéaire et la densité de courant maximale sont données pour la détection de la TPP (ND = non déterminé).

Test électrochimique	Electrode	Potentiel (V vs. Ag/AgCl)	Sensibilité ($\text{mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$)	Gamme linéaire (μM)	Limite de détection (μM)	Densité de courant maximale
TK-PPO	Carbone	-0,2	ND	ND	ND	ND
	Platine	+0,6	77	0,5-10	0,5	$1,8 \mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$
TK-GAOx	Carbone-Bleu de Prusse	-0,2	ND	ND	ND	ND
TK- $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$	Carbone	+0,5	3831	0,02-0,4	0,02	$4,4 \mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$

La comparaison des performances de chacun de ces systèmes électrochimiques (Tableau 10) permet de constater que la méthode utilisant le ferricyanure est environ 50 fois plus sensible que la méthode couplée à la GAOx ($3831 \text{ mA.M.cm}^{-2}$ contre 77 mA.M.cm^{-2} pour le système TK-GAOx)

et permet de diminuer la limite de détection de la TPP de 25 fois (0,02 μM contre 0,5 μM pour le système TK-GAOx).

De nombreux tests *in vitro* basés sur des méthodes spectrophotométriques ou fluorimétriques ont donc été développés pour mesurer l'activité de la TK et identifier des inhibiteurs. Les méthodes ampérométriques en particulier sont adaptées pour mesurer l'activité de cette enzyme car elles offrent de nombreux avantages telles que le faible coût et la simplicité de mise en œuvre. Cependant, aucun test ampérométrique décrit n'allie toutes les qualités requises pour le criblage d'inhibiteurs : haut débit, rapidité, sensibilité, faible coût et miniaturisation.

IV. Méthode de criblage électrochimique

Le projet de cette thèse, associé à l'ANR Transbioscreen, repose sur le développement d'un outil électrochimique permettant le criblage d'inhibiteurs d'enzyme. Afin de mettre en évidence le besoin d'un tel outil, cette partie présentera des biocapteurs électrochimiques basés sur l'utilisation d'une enzyme ainsi que leur utilisation dans le domaine diagnostic et environnemental. Le système de criblage électrochimique au cœur de cette thèse sera ensuite présenté et des exemples d'application seront donnés.

IV.1. Biocapteurs électrochimiques

Selon la définition donnée par l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), un biocapteur est un dispositif intégré capable de fournir des informations spécifiques quantitatives ou semi quantitatives grâce à un élément de reconnaissance d'origine biologique en contact direct avec un élément de transduction. Il est ainsi constitué d'un élément biologique appelé bio-récepteur capable de reconnaître spécifiquement une molécule et d'un transducteur capable de convertir la reconnaissance moléculaire en un signal analytique.^{172,173} Les transducteurs électrochimiques sont, avec les transducteurs optiques, les plus répandus dans le domaine des biocapteurs. Ils sont généralement constitués de deux ou trois électrodes : une électrode de travail, une électrode de référence et une contre-électrode (permettant le passage du courant de l'électrode de travail à celle-ci et non à l'électrode de référence).

Le principe d'un biocapteur électrochimique repose alors sur la détection de changements électrochimiques lors de l'évènement de reconnaissance moléculaire : si un analyte est à proximité d'une électrode, l'application d'un potentiel entraîne une réaction d'oxydoréduction entre

l'électrode et l'analyte. En fonction de leur mode de détection, on peut distinguer différents types de biocapteurs électrochimiques (*Figure 33*) : les biocapteurs potentiométriques mesurant les variations de potentiels, les biocapteurs ampérométriques mesurant les variations de l'intensité de courant électrique produit lors de l'application d'un potentiel fixe, les biocapteurs conductimétriques mesurant la conductance électrique d'une solution d'électrolytes et les biocapteurs à impédance électrochimique mesurant les variations d'impédance (c'est-à-dire la résistance en courant alternatif). Les biocapteurs électrochimiques ont pour avantage d'être économiques, sensibles et simples d'utilisation. De plus, de nombreux progrès ont été réalisés ces dernières années afin de miniaturiser ces dispositifs et donc de réduire la quantité de biomolécules nécessaires à leur assemblage.

Ces biocapteurs électrochimiques peuvent également être classés en fonction de la nature du bio-récepteur (*Figure 33*). Ce dernier peut être un acide nucléique, un anticorps ou un antigène, une enzyme, un récepteur ou un ligand ou encore un microorganisme entier.

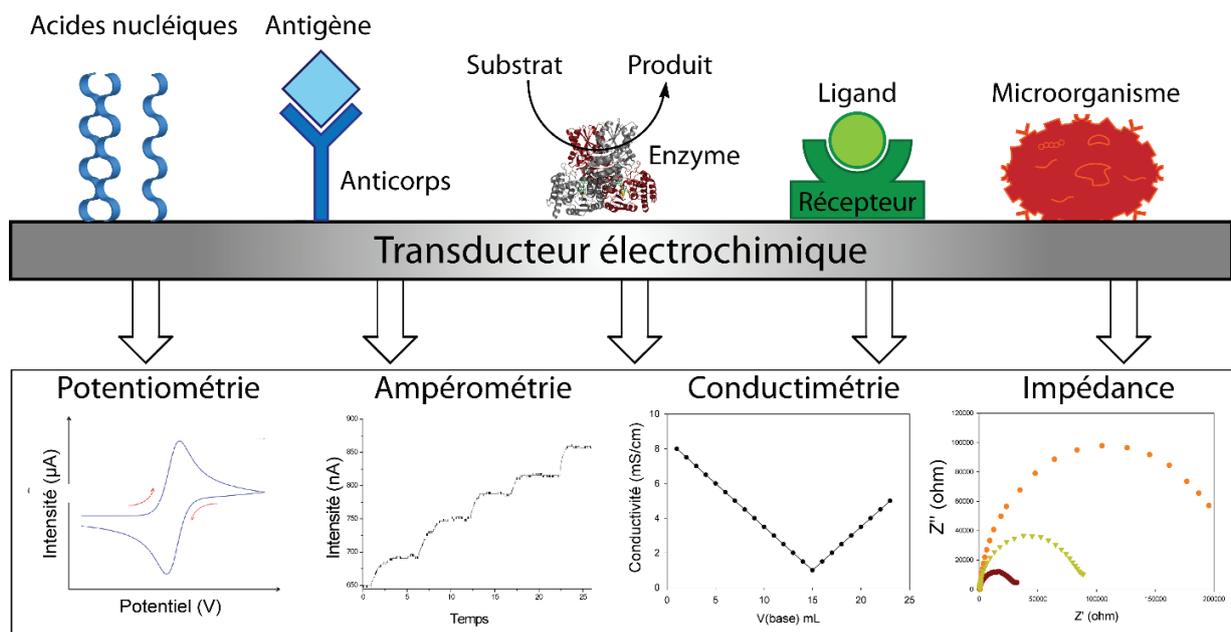


Figure 33. Représentation schématique des biocapteurs électrochimiques qui diffèrent en fonction de la nature du bio-récepteur (acide nucléique, anticorps/antigène, enzyme, récepteur/ligand, microorganisme) ou en fonction de leur mode de détection (potentiométrie, ampérométrie, conductimétrie, impédance). Reproduit et complété à partir de El Harrad et al.¹⁷⁴

Dans le cadre de cette thèse, nous nous focaliserons sur les biocapteurs électrochimiques utilisant des enzymes. Le principe consiste alors à mesurer l'activité de l'enzyme en présence de son ou ses

substrats. Trois générations de biocapteurs sont décrites (*Figure 34*). Les biocapteurs de première génération sont basés sur la détection directe des substrats ou produits de la réaction enzymatique (l'intensité du courant ou le potentiel est donc proportionnel à la concentration en substrat ou produit) (*Figure 34A*). C'est le cas des biocapteurs à oxydases pour lesquelles la consommation de l'oxygène peut être suivie par application d'un potentiel de réduction ou la production du peroxyde d'hydrogène peut être suivie par application d'un potentiel d'oxydation. Le premier biocapteur électrochimique décrit par Clark et Lyons utilise ce principe afin de détecter le glucose sanguin à l'aide d'une électrode à oxygène et d'une glucose oxydase.¹⁷⁵ Les biocapteurs électrochimiques de seconde génération utilisent des médiateurs comme transporteurs d'électrons entre l'enzyme et l'électrode (*Figure 34B*). Les médiateurs utilisés peuvent être des molécules organiques (phénazines, catéchols, hydroxybenzaldéhydes...), des ions inorganiques (tels que le couple ferricyanure/ferrocyanure) ou des complexes organométalliques (complexe d'osmium ou ferrocènes). C'est le cas de certains biocapteurs à déshydrogénases : le NADH produit ou consommé, est oxydé par des phénazines tels que le Bleu de Toluidine.^{176,177}

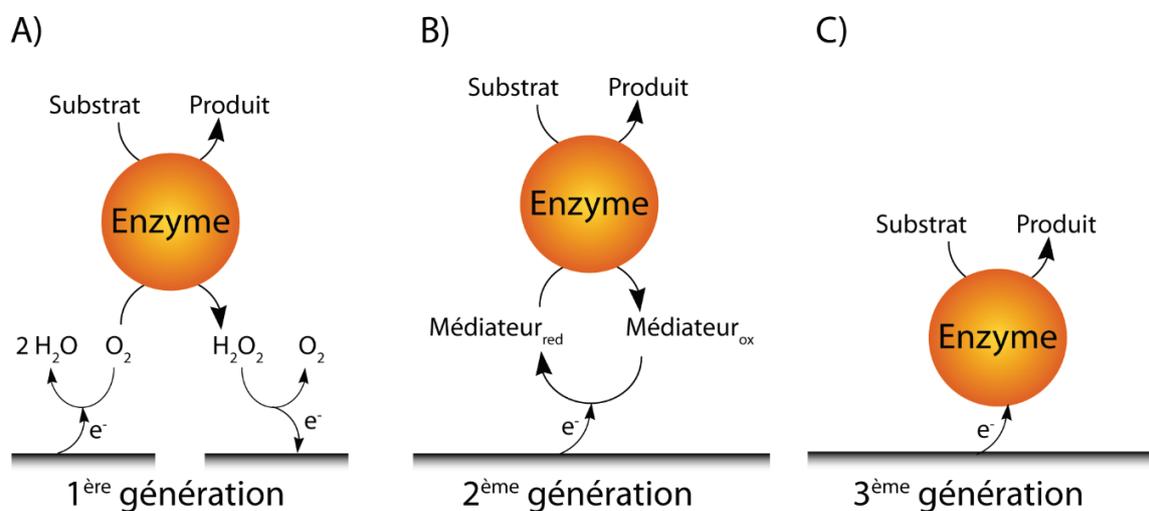


Figure 34. Trois générations de biocapteurs électrochimiques utilisant des enzymes : A) 1^{ère} génération : le substrat ou le produit de la réaction enzymatique est réduit ou oxydé par l'électrode ; B) 2^{ème} génération : intervention d'un médiateur qui sert de navette à électrons entre l'enzyme et l'électrode ; C) 3^{ème} génération : transfert direct d'électrons entre l'enzyme et l'électrode.

Enfin, les biocapteurs de troisième génération sont basés sur le transfert direct d'électrons entre l'enzyme et l'électrode (*Figure 34C*). Ceci est possible chez certaines hémoprotéines (telles que

les peroxydases, l'hémoglobine, la cellobiose déshydrogénase, le cytochrome c...) ou certaines protéines cuivriques (telles que la bilirubine oxydase ou les laccases).

Ces biocapteurs enzymatiques peuvent être utilisés afin de déterminer la concentration d'un analyte dans un milieu complexe, ce qui peut être extrêmement intéressant pour le diagnostic médical (par exemple, le dosage de métabolites dans un fluide biologique) ou le contrôle environnemental (telle que la détection de pesticides ou d'explosifs dans la terre, l'eau...). Les biocapteurs ampérométriques ont été utilisés pour doser le glucose sanguin en particulier chez les personnes atteintes de diabète. Depuis les années 90, de nombreuses entreprises telles que Roche (avec l'Accu-Chek®), Bayer (avec le BayerContour®) ou encore Abbott (avec le FreeStyle Lite®) (Figure 35) développent et commercialisent des systèmes électrochimiques permettant de mesurer la concentration en glucose à partir d'une goutte de sang.¹⁷⁸ Ces systèmes utilisent des bandelettes sur lesquelles sont sérigraphiées des électrodes et une enzyme est immobilisée (une glucose déshydrogénase ou une glucose oxydase) afin de mesurer la quantité de glucose présente dans le sang.

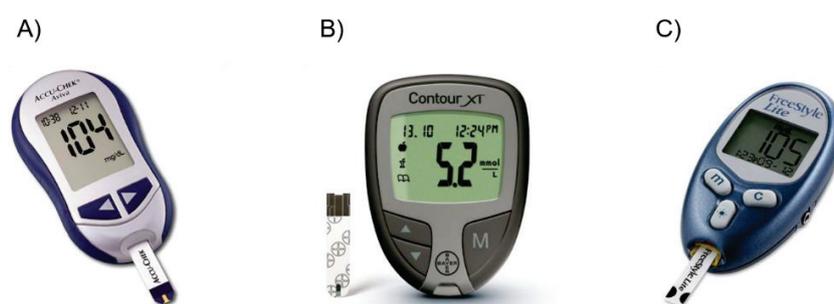


Figure 35. Photographies de trois systèmes électrochimiques commercialisés pour la détection du glucose sanguin : A) Accu-Chek® par Roche, B) BayerContour® par Bayer et C) FreeStyle Lite® par Abbott (Images issues des sites commerciaux des différentes marques).

De plus, nous avons vu précédemment que les enzymes étaient les cibles thérapeutiques particulièrement intéressantes et qu'une des stratégies thérapeutiques les plus utilisées dans le traitement et la prévention de maladies était basée sur l'inhibition de l'activité de ces enzymes. Les biocapteurs électrochimiques constituent donc des outils analytiques de choix afin de trouver de nouveaux inhibiteurs d'enzymes et de tester leur efficacité *in vitro* avant de procéder aux tests *in vivo*. Le Tableau 11 présente des exemples de biocapteurs enzymatiques développés pour identifier

et caractériser des inhibiteurs d'enzymes représentant des cibles thérapeutiques intéressantes telles que l'acétylcholinestérase, la monoamine oxydase, la xanthine oxydase ou encore la tyrosinase.

Tableau 11. Exemples de biocapteurs électrochimiques basés sur l'inhibition d'une enzyme cible : la pathologie associée, le ou les inhibiteurs étudiés, l'assemblage de l'électrode et la méthode électrochimique utilisée sont présentés pour chaque biocapteur.

Enzyme cible	Pathologie associée	Inhibiteur	Electrode	Méthode électrochimique	Ref
Acétylcholinestérase	Maladie d'Alzheimer	Codéine	Carbone sérigraphié + tétrathiafulvalène	Chronoampérométrie	179
		Galantamine et néostigmine	Carbone vitreux + gel de silice + nanoparticules d'or	Voltammétrie cyclique et ampérométrie	180
Monoamine oxydase	Maladie de Parkinson	Petylyl, pyrazidol, fluoxétine	Platine sérigraphié	Voltammétrie cyclique	181
Xanthine oxydase	Hyperuricémie, goutte, insuffisance rénale	Allopurinol	Electrode sérigraphié + Bleu de Prusse + Nafion	Ampérométrie	182
Tyrosinase	Hyperthyroïdie	Méthimazole	Electrode de carbone sérigraphiée + nanotubes de carbone	Ampérométrie	183

L'un des verrous les plus importants des systèmes électrochimiques utilisés pour les mesures d'activité enzymatique est le faible débit : ils ne permettent de réaliser qu'une seule mesure simultanée et nécessitent un volume réactionnel important (de l'ordre du millilitre). Le criblage d'inhibiteurs à partir de banques de molécules est donc long et fastidieux dans ces conditions. Dropsens® a commercialisé des systèmes comprenant 8 (*Figure 36A*) voire 96 électrodes (*Figure 36B*), cependant, elles sont reliées à un multipotentiostat permettant de réaliser des mesures sur au maximum 8 électrodes simultanément. Ce système a notamment été utilisé pour tester la composition de revêtements électroactifs afin d'empêcher l'adhérence de bactéries marines

et donc l'encrassement de structures immergées (telles que les bateaux ou les infrastructures).¹⁸⁴ Au même titre que les plaques 96 puits utilisées pour les criblages spectrophotométriques ou fluorimétriques, un système électrochimique au format 96 est donc réellement nécessaire, notamment pour des études de criblages d'inhibiteurs d'enzymes.

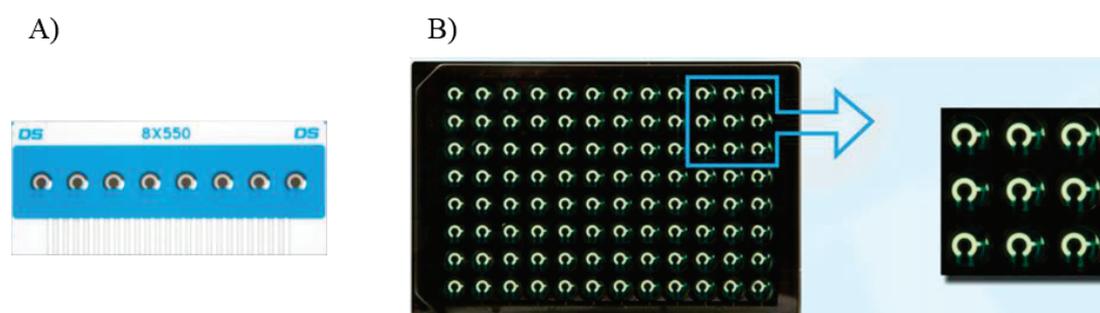


Figure 36. Photographies des systèmes multi-électrodes de platines sérigraphiées développés par Dropsens® : 8 électrodes (A) ou 96 électrodes (B).

IV.2. Biocapteurs basés sur l'électrochimiluminescence

Le potentiel électrique appliqué dans les biocapteurs électrochimiques peut également déclencher des réactions chimiques générant une émission de lumière, on parle alors d'électrochimiluminescence (ECL). Cette méthode nécessite l'intervention d'un luminophore organiques (tel que le luminol) ou inorganiques (tels que des complexes de ruthénium ou d'osmium). Une des réactions d'ECL les plus courantes fait intervenir le luminol comme luminophore et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) comme oxydant¹⁸⁵. Sous l'application d'un potentiel d'environ +0,5 V vs. Ag/AgCl, le luminol est oxydé en diazaquinone qui va alors réagir avec une molécule d' H_2O_2 pour aboutir à une molécule d'aminophtalate sous sa forme excitée (Figure 37). Ce produit va revenir à l'état fondamental en libérant des photons dont la longueur d'onde maximale d'émission est de 425 nm, aisément détectables à l'aide d'une caméra CCD ou d'un luminomètre.

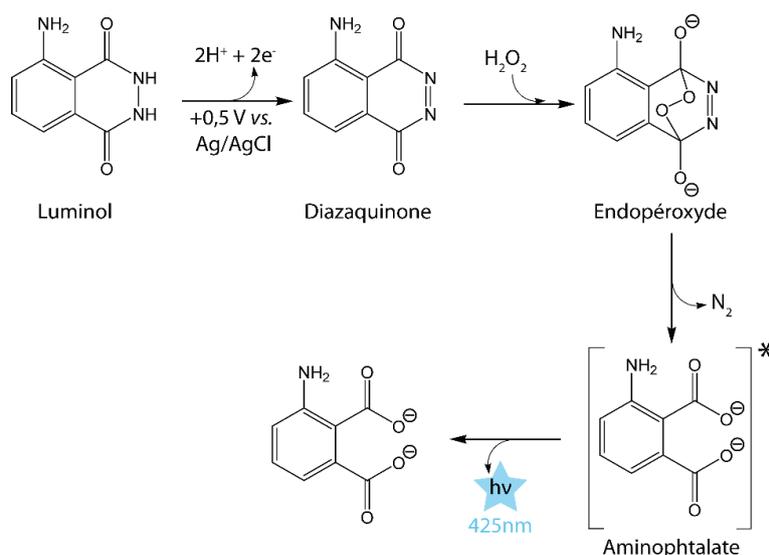


Figure 37. Réaction d'électrochimiluminescence du luminol sous l'application d'un potentiel et en présence d' H_2O_2 comme oxydant.¹⁸⁵

Les biocapteurs à ECL sont utilisés dans de nombreux domaines tels que le diagnostic médical, les tests environnementaux (sur l'eau ou la nourriture) ou encore la détection d'agents explosifs. Dans le domaine du diagnostic, l'ECL a particulièrement été utilisée pour le développement d'immunoessais en présence du complexe $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (tris(bipyridine)ruthénium(II)) comme luminophore et de tripropylamine comme co-réactif. Le luminophore est généralement fixé sur un anticorps secondaire permettant la détection d'un antigène spécifique.^{186,187} L'ECL est également utilisée comme méthode de détection dans les biopuces à ADN. Le couple $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /Tripropylamine est majoritairement utilisé, le luminophore pouvant être greffé à l'extrémité d'un brin d'ADN par exemple.¹⁸⁸ Enfin, l'ECL est une méthode courante dans le développement de biocapteurs enzymatiques. Ces biocapteurs sont généralement basés sur la réaction entre le luminol et l' H_2O_2 pouvant être produit par une oxydase (Figure 38A). De nombreux biocapteurs permettant la détection d'analytes tels que le glucose, le lactate, le cholestérol utilisent l'ECL comme méthode de détection (Tableau 12). Une biopuce à ECL développée par Marquette et *al.* permet la détection concomitante de six métabolites (choline, glucose, glutamate, lactate, lysine et urate) à l'aide de six oxydases spécifiques immobilisées.¹⁸⁹ Le $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ est également employé dans les biocapteurs impliquant des déshydrogénases à NAD^+ (Figure 38B). Le NADH peut être oxydé en radical $\text{NAD}^{\bullet+}$ sous l'application d'un potentiel d'environ 1 V vs. Ag/AgCl. Celui-ci réagit avec le $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ pour donner un signal lumineux

donc la longueur d'onde d'émission est de 620 nm. De même qu'avec le luminol, des biocapteurs permettant la détection de métabolites sanguins ont été développés en présence de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ comme luminophore (Tableau 12).

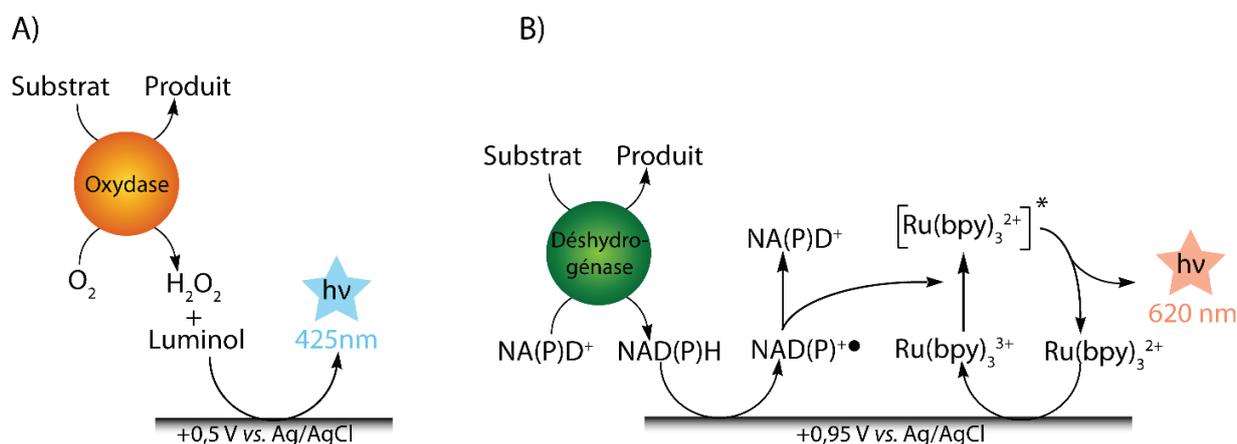


Figure 38. Principe de la détection d'activité oxydase en présence de luminol (A) ou déshydrogénase en présence de $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ (B) par ECL.

Tableau 12. Exemples de biocapteurs enzymatiques basés sur une détection par ECL.

Analyte	Enzyme	Luminophore	Ref
Glucose	Glucose oxydase	Luminol	190
	Glucose déshydrogénase	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$	191
Lactate	Lactate oxydase	Luminol	190
Choline	Choline oxydase	Luminol	192
Cholestérol	Cholestérol oxydase	Luminol	193
Ethanol	Alcool oxydase	Luminol	194
	Alcool déshydrogénase	$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$	195–197

L'ECL est extrêmement sensible et rapide, les luminophores sont stables et peuvent s'adapter à de nombreux analytes. Cette méthode a également pour avantage de s'affranchir des interférences électrochimiques pouvant être rencontrées dans les biocapteurs ampérométriques en présence de milieux physiologiques comme le sang. Le haut débit en ECL a été beaucoup plus développé que pour les biocapteurs électrochimiques, notamment pour les tests immunologiques. Origen a développé un système haut débit (Origen technology platform) utilisé, par exemple, pour la détection d'insuline dans des échantillons sérologiques à l'aide d'un essai en sandwich (les anticorps secondaires sont marqués par le $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$).¹⁹⁸ De même, Roche a développé un test

appelé ECLIA (pour ElectroChemiLuminescence ImmunoAssay), équivalent au test ELISA mais avec une détection par ECL. Ce test a été utilisé pour détecter les interleukines-6¹⁹⁹ ou encore le cortisol²⁰⁰ présents dans des échantillons sanguins. Cependant, ces systèmes haut débit ne possèdent qu'une seule cellule électrochimique et les échantillons sont conduit un par un jusqu'à l'électrode. De même que pour les méthodes électrochimiques, un système permettant d'acquérir simultanément 96 signaux luminescents est donc nécessaire que ce soit pour les tests immunologiques ou enzymatiques.

IV.3. Plaque de criblage électrochimique

IV.3.1. Principe

Un système de criblage électrochimique a été précédemment développé au laboratoire GEMBAS pendant la thèse de Sofiene Abellaoui.²⁰¹ Il est constitué d'un circuit imprimé (PCB pour « printed circuit board ») sur lequel 96 paires d'électrodes sont sérigraphiées (*Figure 39A*). Chaque paire est constituée d'une électrode de travail généralement en carbone et d'une électrode servant de référence et de contre électrode en argent/chlorure d'argent (Ag/AgCl). Pour délimiter chaque zone de mesure, un film plastique adhésif perforé de 96 trous est collé sur le PCB. Le système final, appelé plaque de criblage électrochimique (PCE) est donc constitué de 96 zones pouvant chacune être recouverte par une solution d'électrolyte dont le volume est compris entre 30 à 50 μl . Après utilisation, les encres sérigraphiées sont éliminées à l'acétone permettant ainsi une réutilisation des PCB.

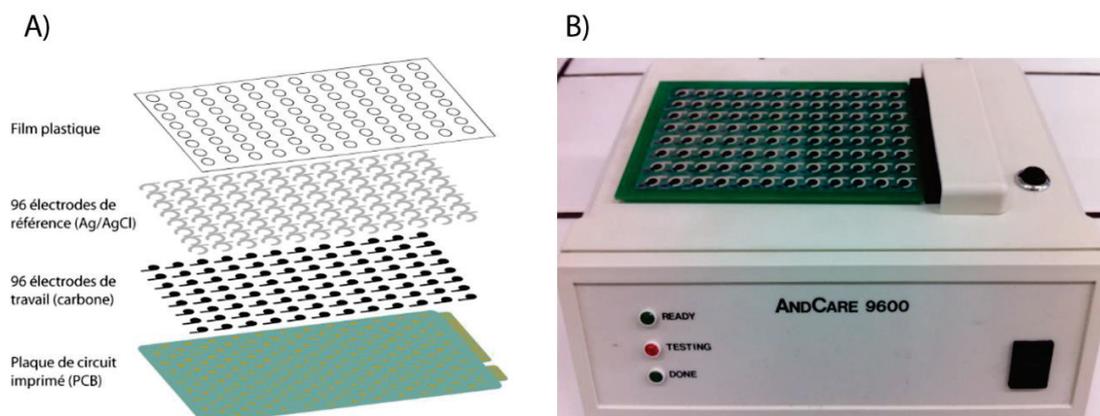


Figure 39. A) Schéma éclaté des plaques de criblage électrochimiques (PCE) B) Photographie d'une PCE connectée au lecteur de plaque AndCare 9600.

Des analyses de profilométrie ont permis de caractériser la topographie des électrodes sérigraphiées (Figure 40).²⁰¹ Une surface moyenne de 7,98 mm² a été déterminée pour l'électrode de travail (carbone) et, une fois le plastique ajouté, un puit de 2,25 mm³ a été calculé.

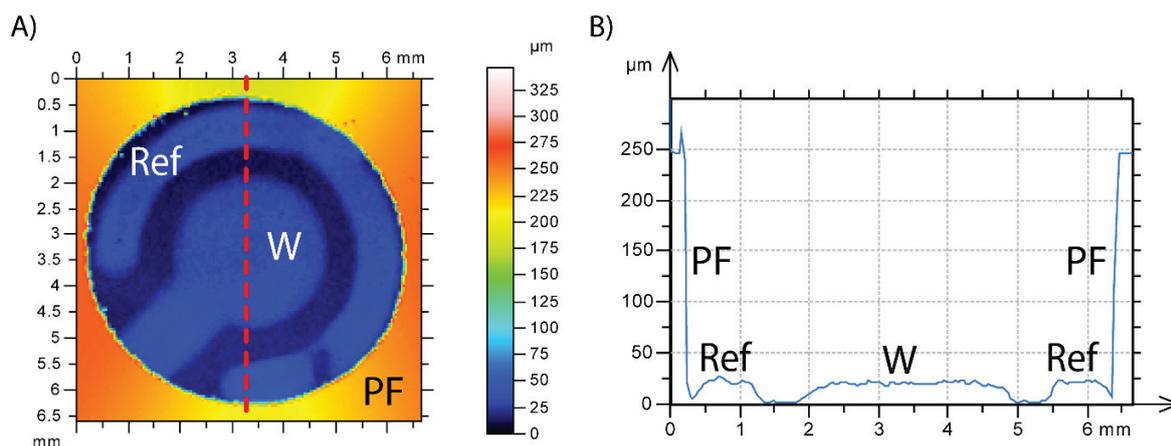


Figure 40. Analyses profilométriques réalisées sur une électrode sérigraphiée sur laquelle est déposée un film plastique. A) Image en deux dimensions obtenues à partir de ces analyses. B) Profil des hauteurs obtenu à partir d'une coupe transversale représentée sur l'image A par une ligne rouge en pointillés. L'électrode de travail est représentée par la lettre W, l'électrode de référence par Ref et le film plastique par PF.

Les mesures électrochimiques sont réalisées à l'aide d'un lecteur de plaque AndCare 9600 développé par la société Alderon Biosciences (Figure 39B). Cet appareil permet en moins d'une seconde et sur les 96 électrodes d'effectuer des mesures d'ampérométrie pulsée par intermittence (IPA : « intermittent pulse amperometry »). Cette méthode ampérométrique consiste à appliquer des impulsions de potentiel fixe de quelques millisecondes séparées par un laps de temps pendant lesquels le circuit est ouvert (Figure 41). Ce type de mesure est la principale différence avec la chronoampérométrie dans laquelle le potentiel est appliqué de manière continue ou l'ampérométrie à ondes carrées dans laquelle le potentiel de travail est alterné avec un potentiel plus faible (le circuit est donc constamment fermé) (Figure 41).

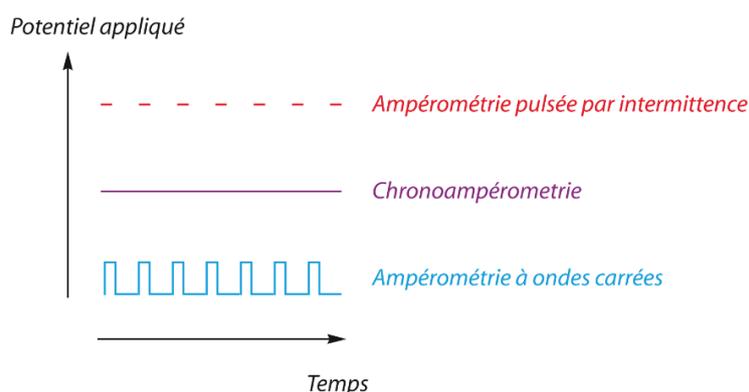


Figure 41. Schéma de comparaison de l'ampérométrie pulsée par intermittence, de la chronoampérométrie et de l'ampérométrie à ondes carrées : représentation du potentiel appliqué dans chacune des méthodes électrochimiques en fonction du temps.

IV.3.2. Exemples d'application

Initialement, les PCE ont été développées pour une utilisation dans les domaines du médical, de l'environnement et de la recherche. Elles ont notamment été utilisées pour la détection électrochimique d'acides nucléiques et plus particulièrement, la quantification d'ADN et d'ARN directement après une amplification par PCR (réaction en chaîne par polymérase) de séquences cibles²⁰². Des tests analytiques immunologiques ont également fait appel à ces PCE afin de détecter l'aflatoxine B1, un composé toxique considéré comme cancérigène, produit par des champignons et contaminant de nombreux aliments^{203,204}. Plus récemment, les PCE ont permis le développement d'une méthode de criblage d'activités oxydoréductases. Une banque de mutants de la formiate déshydrogénase a été criblée à l'aide d'un médiateur redox (le bleu de toluidine) immobilisé à la surface des électrodes et conduisant à l'oxydation du NADH impliqué dans la réaction enzymatique (Figure 42A).¹⁷⁷ De plus, des mesures d'activité laccases par transfert direct d'électrons ont permis des études d'évolution dirigée de la laccase de *Bacillus subtilis* (Figure 42B).^{201,205}

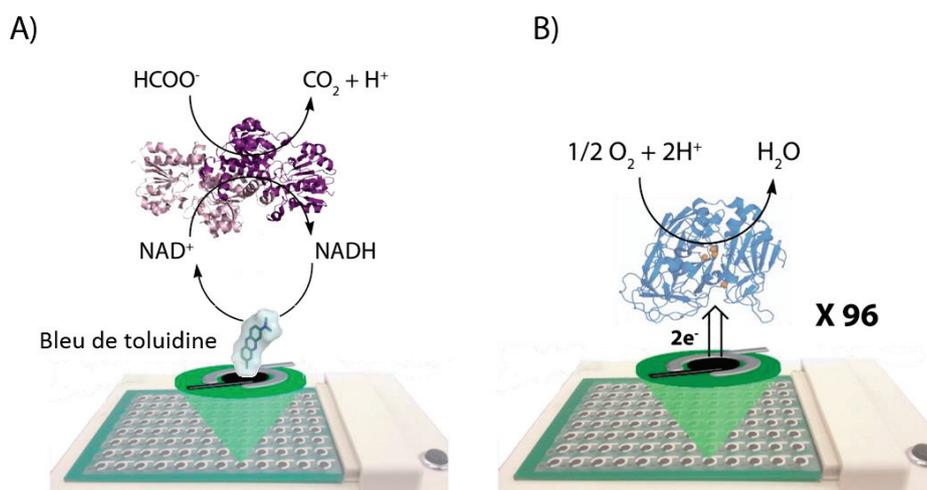


Figure 42. Schéma de principe des méthodes de criblage d'activité enzymatique développées par Abdellaoui et al.^{177,201,205} : A) Activité d'une formiate déshydrogénase en présence d'un médiateur électrochimique (le bleu de toluidine).¹⁷⁷ B) Activité de la laccase de *B. subtilis* par transfert direct d'électrons.²⁰⁵

Le format 96 puits de ces PCE adapté au criblage, associé aux avantages que présentent les méthodes électrochimiques (en particulier concernant les interférences), ainsi que la possibilité de mesurer des activités enzymatiques par IPA, sont donc particulièrement adaptés pour le développement d'un test de criblage électrochimique d'inhibiteurs.

V. Conclusions

Dans ce premier chapitre, les différentes étapes de découverte et de développement d'un nouveau médicament ont été détaillées. Ces médicaments ciblent majoritairement des enzymes, impliquées dans une pathologie donnée, en les inhibant. Une des étapes cruciales de ce processus de recherche de médicaments est le criblage de molécules pour trouver les inhibiteurs capables de ralentir voire stopper l'activité de l'enzyme cible. Pour cela, le développement de tests biologiques est primordial et nécessite fiabilité, sensibilité, faible coût et surtout haut débit. Un état de l'art des méthodes haut débit de criblage d'inhibiteurs d'enzyme déjà existantes a été fournie avec, pour chacune, ses avantages et ses inconvénients. En particulier, les méthodes électrochimiques se sont affirmées comme des méthodes intéressantes de par leur faible coût, leur rapidité de réponse et leur facilité d'utilisation. Le développement récent de plaques de criblages électrochimiques a permis d'allier ces avantages au haut débit nécessaire pour le criblage d'inhibiteurs. Afin de démontrer la

puissance de cette nouvelle stratégie, la transcétolase a été choisie comme enzyme modèle, de par son intérêt thérapeutique et la possibilité de mesurer son activité enzymatique par électrochimie.

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Expression et purification de la TK de *E. coli*

La transcétolase de *E. coli* (TK) a été obtenue dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut de Chimie de Clermont Ferrand (ICCF). Les protocoles d'expression et de purification de cette enzyme ont été optimisés au cours de la thèse de J. Abdoul-Zabar.¹⁵³ Ils ont été utilisés au cours de cette thèse et pour des raisons d'accessibilité du matériel, l'expression et la purification de la TK ont été réalisées au sein de l'ICCF.

I.1. Produits

L'acide acétique, la solution d'acrylamide/bis-acrylamide 30% (v:v), l'albumine de sérum bovin (BSA), l'ampicilline, le bleu de Coomassie R250, le dihydrogénophosphate de sodium, le dodécyle sulfate de sodium (SDS), la glycine, l'imidazole, l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), le milieu Luria-Bertani (LB), le β -mercaptoéthanol, le méthanol, le persulfate d'ammonium, le N,N,N',N'-Tetraméthyléthylènediamine (TEMED), la triéthanolamine et les membranes de dialyse d'un seuil de coupure de 14 kDa proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). L'acide chlorhydrique et le chlorure de sodium (NaCl) proviennent de Prolabo (Nantes, France). Le trishydroxyméthylaminométhane provient de Merck (Darmstadt, Allemagne). Le glycérol provient d'Acros Organics (Geel, Belgium). L'éthanol provient de Carlo Erba (Val De Reuil, France).

Tous les milieux de culture sont stérilisés par autoclave (20 minutes à 121°C) avant utilisation. Les solutions d'antibiotiques sont préparées dans l'eau distillée et stérilisées par filtration (porosité 0,22 μ m).

I.2. Expression

Le gène codant pour la TK de *E. coli* a été cloné dans le plasmide d'expression pET21 fourni à l'ICCF par des collaborateurs allemands (Pr. WD Fessner, Université de Darmstadt). Cette séquence a été clonée en aval d'un promoteur T7 (sous le contrôle de l'opéron lactose) nécessaire pour la surexpression de la protéine d'intérêt et en amont d'une séquence codant pour une étiquette polyhistidine (6 résidus histidyles) nécessaires pour la purification de la protéine. De plus, le vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline nécessaire pour la sélection des souches bactériennes ayant été transformées. Ces bactéries sont des souches d'*E. coli* BL21 (DE3)

possédant la séquence codante de l'ARN polymérase du phage T7 qui va permettre la traduction du vecteur d'expression. En présence d'IPTG, l'inhibition de l'opéron lactose présent dans le vecteur est levée (par fixation de l'IPTG sur le répresseur lacI), l'ARN polymérase T7 peut être exprimée et se lier au promoteur et permettre l'expression du gène d'intérêt.

La souche d'*E. coli* transformée par le vecteur pET21 est cultivée dans 1 litre de milieu LB en présence d'ampicilline ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) et de 100 ml de préculture. Lorsque les bactéries sont en phase exponentielle de croissance (c'est-à-dire que l'absorbance à 600 nm est proche de 0,8), l'induction par 0,5 mM d'IPTG est effectuée et la culture est agitée (à 200 rpm) toute la nuit à 30°C. Les bactéries sont recueillies après centrifugation à 8000 g pendant 15 minutes à 4°C et lavées par re-suspension et centrifugation dans un tampon de lyse (NaH_2PO_4 0,05 M et NaCl 0,3 M, pH 8,0). Le rendement de la culture est d'environ 5 g de cellules (poids humide) par litre de culture.

Le culot lavé est alors remis en suspension dans le même tampon de lyse (7 ml de tampon sont ajoutés par gramme de cellules). La lyse cellulaire est effectuée par des cycles de sonication à 4°C pendant 20 minutes avec des intervalles de 10 secondes de pulsations et de 15 secondes de repos (et une amplitude de 50%). Pour éliminer les débris cellulaires, le broyat est soumis à une centrifugation à 15000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant récolté constitue l'extrait cellulaire brut ou lysat.

I.3. Purification

La TK recombinante est fusionnée à une étiquette 6-His permettant sa purification par chromatographie d'affinité à l'aide d'une résine NTA (acide nitrilotriacétique) chargée en nickel provenant de Macherey-Nagel (Düren, Allemagne). Le lysat précédemment obtenu est ajouté à une suspension de résine préalablement équilibrée à l'aide du tampon phosphate 0,05 M pH 8,0 contenant 0,3 M de NaCl. Cette suspension est mélangée doucement afin de fixer la TK sur la résine. Cette suspension est incubée à 4°C pendant 1 heure et la fraction non retenue est éliminée. La résine est ensuite lavée avec du tampon de lyse jusqu'à l'absence de protéine en sortie de colonne vérifiée par le test de Bradford. La TK est alors éluée de la résine avec un tampon phosphate 0,05 M à pH 8,0 contenant 0,3 M de NaCl et 0,5 M d'imidazole, jusqu'à ce qu'aucune protéine ne soit détectée en sortie de colonne. Les fractions contenant la TK sont rassemblées. Deux dialyses sont alors réalisées afin d'éliminer l'imidazole pouvant provoquer la précipitation de la

TK. Pour la première, le sac de dialyse est placé dans un tampon triéthanolamine 2 mM pH 7,5 toute la nuit à 4°C. Une deuxième dialyse est réalisée dans l'eau distillée pendant 5 heures à 4°C afin d'éliminer toute trace d'imidazole et de tampon. La TK alors obtenue est lyophilisée.

I.4. Dosage des protéines selon la méthode de Bradford

La quantité de protéines est estimée par la méthode de Bradford. Le réactif de Bradford (Bio-Rad, Marne-La-Coquette, France) contient du bleu de Coomassie qui a la propriété, en milieu acide, de se lier aux résidus basiques et hydrophobes des protéines. Cette interaction aboutit à un déplacement du maximum d'absorption de 465 nm à 595 nm. Une gamme étalon est réalisée en présence de quantités connues d'albumine de sérum bovin (BSA) entre 0 et 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. 20 μl des échantillons sont incubés avec 1 ml du réactif de Bradford pendant 10 minutes à 25°C et l'absorbance à 595 nm est mesurée. La concentration en protéines dans les échantillons est exprimée en $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

I.5. Électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Afin de vérifier d'une part, que la souche bactérienne a effectivement produit la TK et d'autre part, la bonne purification de celle-ci, une électrophorèse sur gel d'acrylamide (PAGE), en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) a été réalisée. Le gel de concentration est préparé en mélangeant 3,075 ml d'eau distillée, 1,25 ml de Tris/HCl 0,5 M pH 6,8, 0,025 ml de SDS 20% (m/v), 0,67 ml d'acrylamide/bis-acrylamide (30% ; 0,8% m/v), 0,025 ml de persulfate d'ammonium 10% (m/v) et 0,01 ml de TEMED. Le gel de séparation est constitué de 3,6 ml d'eau distillée, 3,75 ml de Tris/HCl 0,5 M pH 6,8, 0,075 ml de SDS 20% (m/v), 7,5 ml d'acrylamide/bis-acrylamide (30% ; 0,8% m/v), 0,075 ml de persulfate d'ammonium 10% (m/v) et 0,02 ml de TEMED. Les échantillons à migrer (20 μl) sont mélangés à 5 μl de tampon Laemmli (0,5 M de Tris/HCl, pH 6,8, 10% (m/v) de SDS, 20% (v/v) de glycérol, 1,7% de β -mercaptoéthanol et 0,05% (m/v) de bleu de bromophéno) puis chauffés à 95°C pendant 5 minutes pour dénaturer les protéines. Les échantillons sont déposés sur le gel en même temps qu'un marqueur de masse moléculaire (BroadRange, BioRad, Marne-la-Coquette, France) et la migration s'effectue sous l'application d'un champ électrique de 90 V dans un tampon de migration Tris/HCl 0,025 M pH 8,5, Glycine 0,2 M et SDS 0,1% (m/v). Après migration, les protéines sont colorées pendant une nuit par une solution de bleu de Coomassie (20% d'éthanol, 7% d'acide acétique et de 0,1% de bleu de

Coomassie R250). Le gel est ensuite décoloré dans plusieurs bains d'une solution contenant 20 % de méthanol et 7 % d'acide acétique jusqu'à l'apparition des bandes. Une photographie d'un gel SDS PAGE permettant de contrôler la purification et la lyophilisation de la TK est fournie dans la *Figure 43* et la bande à 75 kDa correspond à la TK.

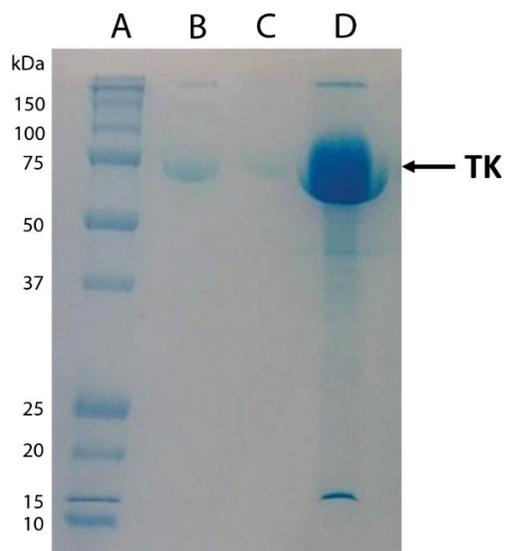


Figure 43. Contrôle de la purification et de la lyophilisation de la TK de E. coli sur gel de polyacrylamide 15% en conditions dénaturantes (SDS PAGE). Le marqueur de masse moléculaire est présent dans la piste A et les tailles des marqueurs sont à gauche du gel. La piste B correspond à l'extrait avant purification (40 µg de protéines), la piste C à la fraction non retenue (40 µg de protéines) et la piste D à la TK de E. coli après lyophilisation (10 µg de protéine).

II. Méthodes spectrophotométriques

II.1. Produit et matériel

L'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (Hepes), l'alcool déshydrogénase de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH, EC 1.1.1.1., 261 U.mg⁻¹), le chlorure de magnésium, la 1,3-dihydroxyacétone (DHA), le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'hydroxyde de sodium, le L-(+)-erythrose (L-ery), le ferrocyanure de potassium, le D-fructose-6-phosphate (F6P), le formaldéhyde (FA), le glycolaldéhyde (GA), la glycylglycine (Gly-Gly), le β-hydroxypyruvate de lithium (HPA), la nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite (NADH), la peroxydase de Raifort (HRP, EC 1.11.1.7., 250 U.mg⁻¹) le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le D-ribose-5-phosphate (R5P), la thiamine pyrophosphate (TPP) et le 2,3,5-

triphenyltetrazolium chloride proviennent de Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). L'ABTS (2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique acid)) provient de Interchim (Montluçon, France). L'azoture de sodium et le ferricyanure de potassium (K_3FeCN_6) proviennent de Prolabo (Nantes, France). Le chlorure de potassium provient de BDH (Poole, Angleterre). La galactose oxydase de *Dactylium dendroides* (GAOx, EC 1.1.3.9., 66,4 U.mg⁻¹) provient de Worthington (Lakewood, Etats Unis). L'inhibiteur I38-49 a été synthétisé par A. Comte au sein de l'ICBMS selon un protocole publié par Dimanche Boitrel et *al.*²⁰⁶

Les mesures spectrophotométriques ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de plaque Tecan Infinite M200 (Salzburg, Autriche). L'activité d'une enzyme est définie comme la concentration en produit formée par unité de temps (en $\mu M \cdot min^{-1}$).

II.2. Mesure d'activité GAOx

L'activité de la GAOx a été mesurée par spectrophotométrie en détectant le peroxyde d'hydrogène formé à l'aide d'un test couplé (Figure 44). La peroxydase de Raifort (HRP), utilisée comme enzyme auxiliaire, catalyse l'oxydation de l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique (ABTS) en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette réaction secondaire permet la formation d'un radical ($ABTS^{\bullet+}$) absorbant à 414 nm.

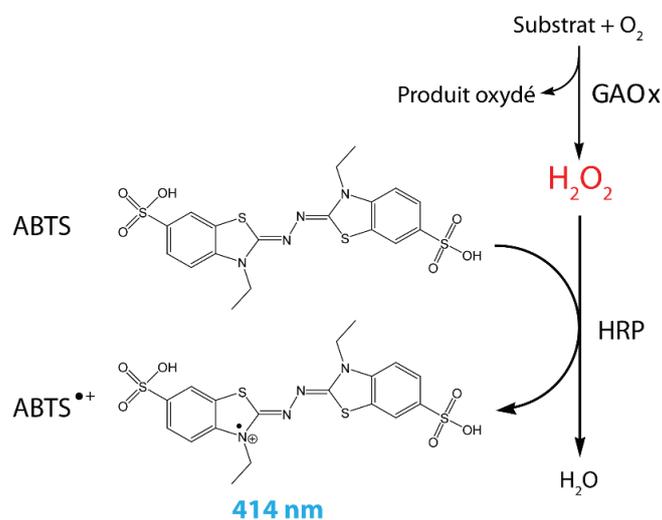


Figure 44. Principe de détection de l' H_2O_2 produit par la GAOx par un test colorimétrique : l'ABTS est oxydé en présence de l' H_2O_2 et de la peroxydase de Raifort (HRP) en $ABTS^{\bullet+}$ qui absorbe à 414 nm.

Le milieu réactionnel est composé de 60 μl de tampon Hepes 0,05 M pH 7,0 KCl 0,1 M, 10 μl de DHA ou L-ery (2 à 60 mM), 10 μl d'HRP 0,011 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (2,75 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$), 10 μl d'ABTS 30 mM et la réaction est déclenchée par l'ajout de 10 μl de GAOx 1,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (0,083 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour les mesures avec le DHA) ou 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (0,332 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ pour les mesures avec le L-ery). La formation de l'ABTS^{•+} est suivie par spectrophotométrie pendant 20 minutes. La vitesse de formation de ce produit correspond à la vitesse de formation de l'H₂O₂ par la GAOx. Le coefficient d'absorption molaire de l'ABTS^{•+} à 414 nm (ϵ_{ABTS}) est de 36000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Les mesures d'activité GAOx en présence d'azoture de sodium ont été réalisées à l'aide d'un milieu réactionnel composé de 50 μl de tampon Hepes 0,05 M pH 7,0 KCl 0,1 M, 10 μl de DHA 60 mM, 10 μl d'HRP 0,011 $\text{mg}\cdot\text{mm}^{-1}$ (2,75 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$), 10 μl d'ABTS 30 mM, 10 μl d'azoture 0 à 4 mM et la réaction est déclenchée par l'ajout de 10 μl de GAOx 1,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (0,083 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$).

II.3. Mesure d'activité TK

II.3.1. Mesure d'activité TK par oxydation par le ferricyanure

L'activité de la TK a été mesurée par une méthode spectrophotométrique basée sur l'oxydation de l'intermédiaire réactionnel α,β -dihydroxyethylthiamine diphosphate (DHETPP) par le ferricyanure (*Figure 45*). La disparition du ferricyanure est ainsi suivie par spectrophotométrie à 420 nm et son coefficient d'absorption molaire ($\epsilon_{\text{ferricyanure}}$) est de 1000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

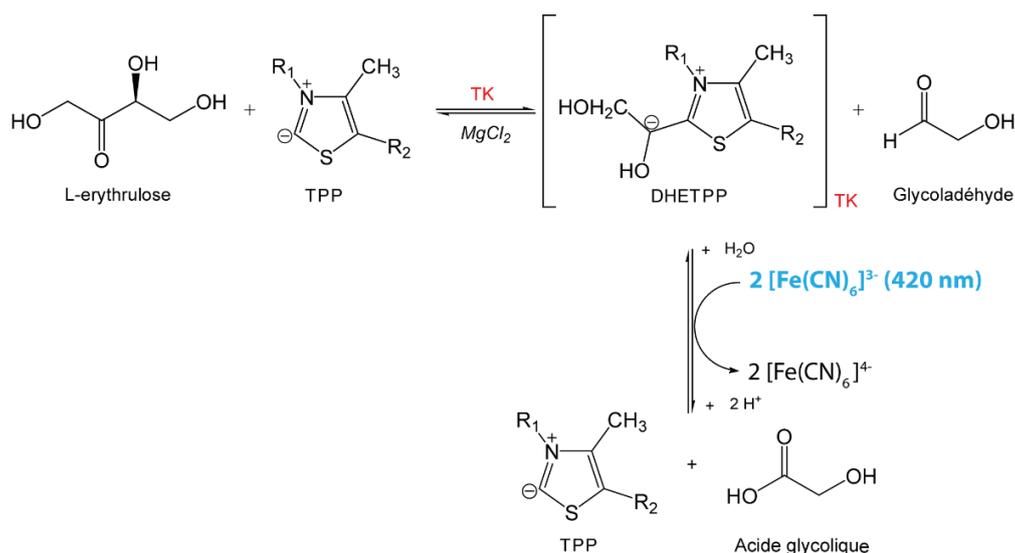


Figure 45. Schéma de principe de la détection spectrophotométrique de l'activité TK en présence de L-ery comme substrat donneur via l'oxydation de l'intermédiaire réactionnel (DHETPP) par le ferricyanure absorbant à 420 nm.

Le milieu réactionnel est composé de 60 μl de tampon Hepes 0,05 M pH 7,0, KCl 0,1 M, 100 μl de TK 3 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (31 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$), 10 μl de MgCl_2 40 mM, 10 μl de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mM, 10 μl de TPP 0 à 1,2 mM et la réaction est déclenchée par l'ajout de 10 μl de L-ery 100 mM. La disparition du ferricyanure est suivie par spectrophotométrie à 420 nm pendant 2 minutes.

L'étude de l'inhibition de la TK par I38-49 est réalisée avec le même milieu réactionnel supplémenté de 10 μl de 100 à 1000 μM de I38-49.

II.3.2. Mesure d'activité TK en présence d'alcool déshydrogénase

L'activité de la TK est mesurée par spectrophotométrie en présence d'une enzyme auxiliaire, l'alcool déshydrogénase de *S. cerevisiae* (ADH) (Figure 46). Celle-ci oxyde le glycolaldéhyde formé en présence de NADH pouvant être suivi par spectrophotométrie à 340 nm.

Cette méthode est utilisée pour mesurer l'activité de la TK suite à sa production et à sa purification. Des cuves de spectrophotomètre de 1 ml sont utilisées contenant 800 μl de tampon Gly-Gly 0,05 M pH 7,5, 20 μl de NADH 0,28 mM, 10 μl de MgCl_2 0,5 mM, 5 μl de TPP 0,1 mM, 100 μl de L-ery 85 mM, 5 μl d'ADH 2,7 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (700 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$) et 10 μl d'extrait contenant la TK. L'enzyme est incubée à 25°C pendant 5 minutes et la réaction est déclenchée par l'ajout de 50 μl de D-ribose-5-phosphate 8,9 mM. La disparition du NADH est mesurée à 340 nm pendant 10 minutes à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer, Lambda 25. La valeur du coefficient d'extinction molaire du NADH (ϵ_{NADH}) est 6220 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ et la longueur du trajet optique est de 1 cm.

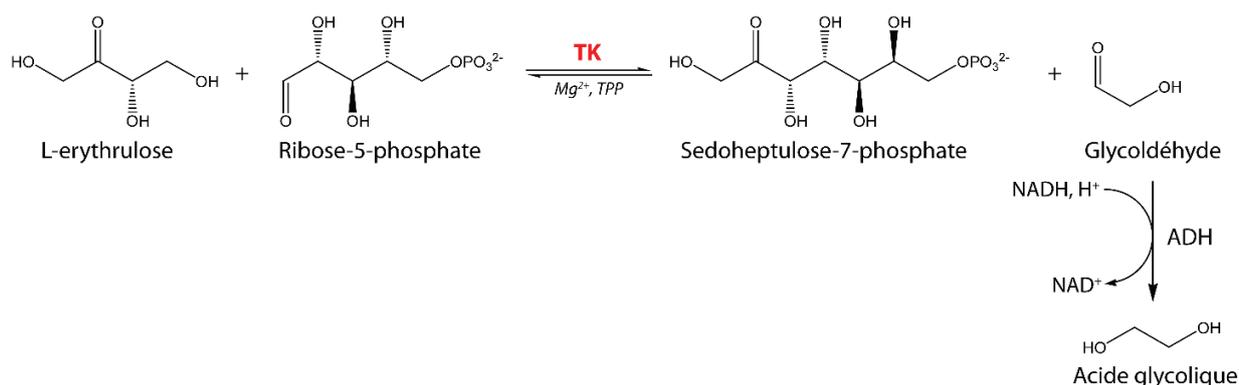


Figure 46. Mesure de l'activité de la transcétolase (TK) par spectrophotométrie à l'aide de l'alcool déshydrogénase de *S. cerevisiae* (ADH) en présence de L-erythrulose et ribose-5-phosphate comme substrats.

Cette méthode spectrophotométrique est également utilisée en microplaques pour déterminer les paramètres cinétiques de la TK. Le milieu réactionnel est constitué de 110 μl de tampon Hepes 0,05 M pH 7,0, KCl 0,1 M, 10 μl de TPP 4 mM, 10 μl de MgCl_2 20 mM, 10 μl d'alcool déshydrogénase de *S. cerevisiae* 1,36 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (666,4 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$), 20 μl de NADH 4 mM, 10 μl de TK 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (10,3 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$), 10 μl de 0 à 200 mM de L-ery. La réaction est déclenchée par ajout de 20 μl de D-ribose-5-phosphate 50 mM. La consommation du NADH est suivie en mesurant l'absorbance à 340 nm pendant 3 minutes. La longueur du trajet optique est de 0,6 cm.

II.3.3. Mesure d'activité TK en présence de sel de tétrazolium

L'activité de la TK a été mesurée à l'aide d'un test colorimétrique faisant intervenir un sel de tétrazolium (Figure 47). L'hydroxypyruvate (HPA) a été utilisé comme substrat donneur et le formaldéhyde ou glycolaldéhyde comme substrat accepteur de la TK. Cette réaction a conduit à la formation de dihydroxyacétone ou L-erythrose pouvant être oxydé, en conditions alcaline, par le triphényltétrazolium. Celui-ci est alors réduit en triphénylformazan, dont la longueur d'onde maximale d'absorption est de 585 nm.

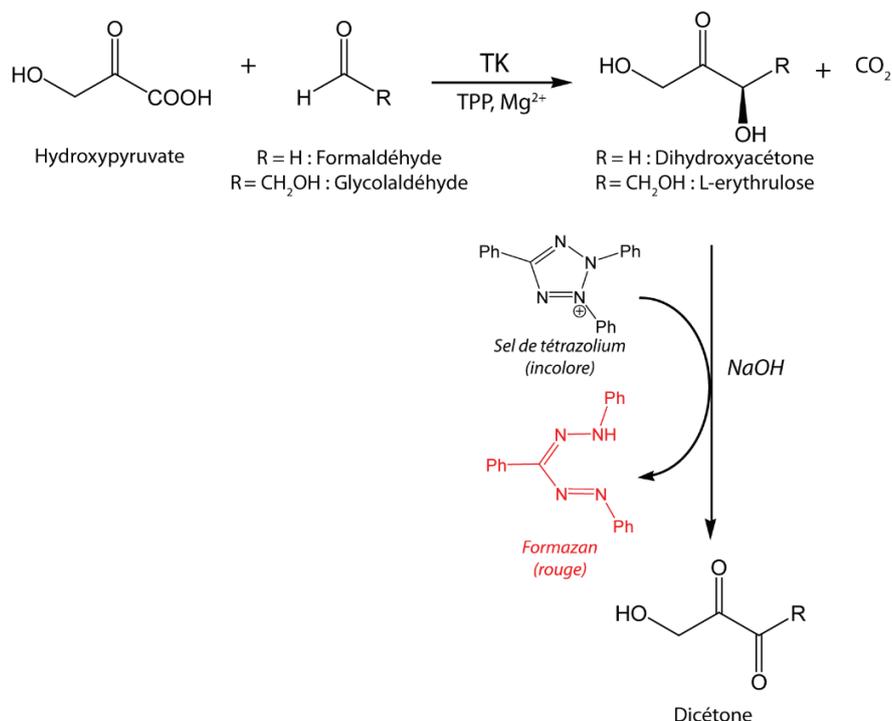


Figure 47. Test colorimétrique basé sur l'oxydation de la dihydroxyacétone ou le L-erythrose formé par la TK, par le sel de tétrazolium, conduisant à la formation du formazan absorbant à 585 nm.

Le milieu réactionnel est composé de 40 μl de tampon Hepes 0,05 M pH 7,0 KCl 0,1 M, 5 μl de TPP 0 à 1,2 mM, 5 μl de MgCl_2 20 mM, 20 μl d'hydroxypyruvate 10 mM, 20 μl de formaldéhyde ou glycolaldéhyde 10 mM et la réaction a été déclenchée par l'ajout de 10 μl de TK 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (10,3 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$). Après 5 minutes de réaction, 20 μl de 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride 0,2% (masse/volume) et 10 μl de NaOH 3 M sont ajoutés et après deux minutes d'incubation, l'absorbance à 585 nm a été mesurée.

III. Préparation des plaques de criblages électrochimiques (PCE)

Les plaques de criblage électrochimiques sont constituées d'un circuit imprimé (PCB) conçus au laboratoire GEMBAS et fabriquées par Cirly (Brignais, France) sur lequel 96 paires d'électrodes sont sérigraphiées et recouvertes par un film plastique adhésif perforé (3M, Cergy-Pontoise, France) permettant de délimiter les zones de mesure (*Figure 48A*). Chaque paire d'électrodes est constituée d'une électrode de référence et contre électrode en argent/chlorure d'argent (Ag/AgCl) et d'une électrode de travail en carbone dopé ou non au Bleu de Prusse en fonction de la méthode utilisée. Les encres de sérigraphie d'argent/chlorure d'argent (Ag/AgCl) (Electrodag® 6038SS) et de carbone (Electrodag® PF-407C) ont été fournies par Acheson (Scheemda, Pays Bas) et l'encre de carbone dopée par du Bleu de Prusse (lot n°C2070424P4) par Gwent Group (Pontypool, Royaume Uni). Les 96 paires d'électrodes sont sérigraphiées au laboratoire sur les PCB à l'aide d'une machine à sérigraphier DEK 248 (Weymouth, Royaume Uni) et d'un masque portant les motifs correspondant aux électrodes travail et de référence. Les encres d'Ag/AgCl et de carbone sont déposées en amont des motifs et une paire de patins étale l'encre avec une pression de 5 kg et une vitesse de passage de 35 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ (données de l'appareillage). Les encres sont séchées pendant 15 minutes à 120°C pour l'Ag/AgCl, à 80°C pour le carbone et à 60°C pour le carbone dopé au Bleu de Prusse. Le diamètre total de la zone de mesure est de 6 mm et l'électrode de carbone a un diamètre de 3 mm (*Figure 48B*). Le film plastique est perforé à l'aide d'une imprimante craft ROBO (Silhouette America, Inc., Orem, Ut, USA). Après utilisation, les plaques de criblage électrochimiques sont nettoyées à l'acétone afin d'éliminer les encres et de réutiliser les PCB.

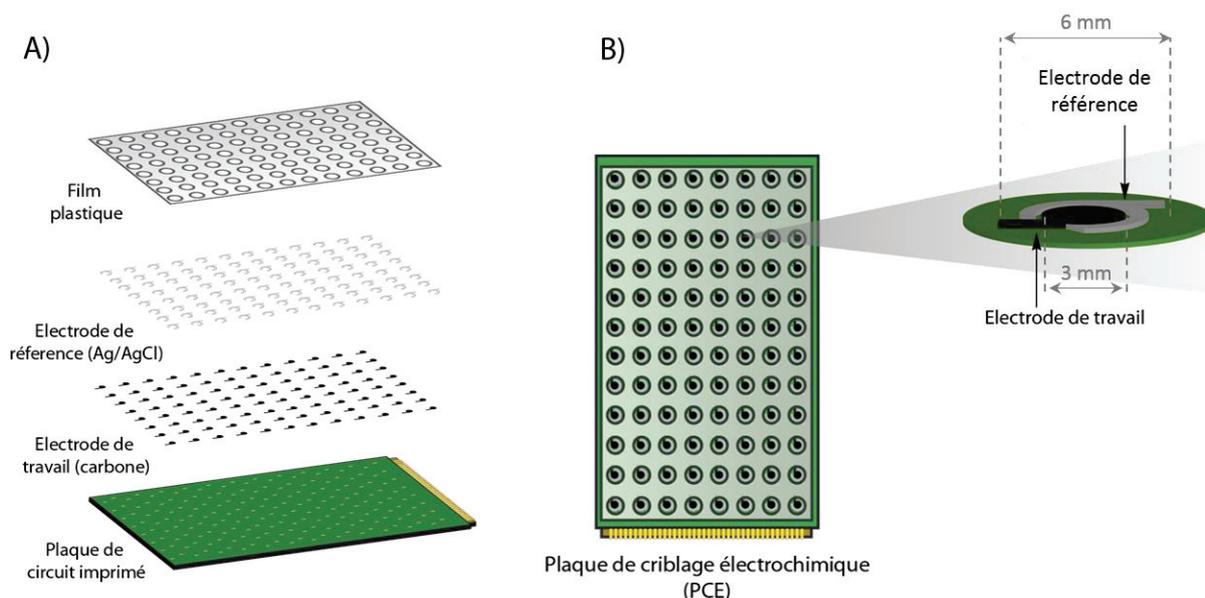


Figure 48. A) Schéma éclaté de la plaque 96 électrodes. B) PCE entièrement assemblées avec zoom sur une paire d'électrodes.

IV. Méthodes électrochimiques

IV.1. Caractérisation des électrodes

IV.1.1. Voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique (VC) est une technique électrochimique consistant à mesurer l'intensité du courant lors de l'application cyclique d'une gamme de potentiels sur une électrode (Figure 49). Elle permet de mettre en évidence les potentiels d'oxydation et de réduction de molécules ayant des propriétés d'oxydoréduction. De plus, la possibilité d'effectuer des balayages cycliques de potentiels permet de vérifier si l'oxydation et la réduction des molécules sont réversibles.

Les caractérisations par VC ont été réalisées à l'aide d'un Multi Potentiostat VMP3 (Bio-logic, Claix, France), l'appareil étant piloté par le logiciel EC-Lab v.9.46.

La caractérisation des électrodes de carbone dopées au Bleu de Prusse a été réalisée dans 30 μl de tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0, KCl 0,1 M. Quatre cycles de balayage de potentiels compris entre -0,6 et +0,6 V vs. Ag/AgCl ont été réalisés avec une vitesse de balayage de 20 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ afin de mettre en évidence les potentiels d'oxydation et de réduction du Bleu de Prusse.

La caractérisation des électrodes de carbone a été réalisée en présence d'un mélange équimolaire de ferricyanure/ferrocyanure de potassium ($K_3Fe(CN)_6$ / $K_4Fe(CN)_6$ 1 mM total) préparé dans le tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0, KCl 0,1 M. Trois cycles de balayage de potentiels compris entre -1 V et +1 V vs. Ag/AgCl ont été réalisés avec une vitesse de balayage de 20 mV.s^{-1} .

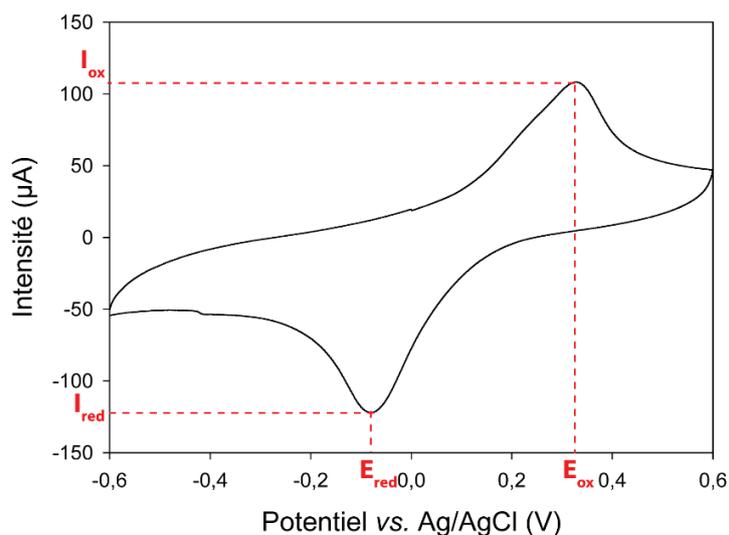


Figure 49. Exemple d'un voltammogramme obtenu avec des électrodes de carbone dopées au Bleu de Prusse (dans un tampon Hepes 0,05 M pH 7,0 KCl 0,1 M) contre une électrode d'Ag/AgCl. E_{ox} et E_{red} correspondent aux potentiels d'oxydation et de réduction et I_{ox} et I_{red} aux intensités d'oxydation et réduction.

IV.1.2. Analyse par les équations de Laviron

L'analyse par les équations de Laviron permet de déterminer les paramètres électrochimiques associés à la détection d'une espèce redox et de vérifier si son oxydation et sa réduction sont réversibles.²⁰⁷ Pour cela, des expériences de voltammétries cycliques sont réalisées avec différentes vitesses de balayage.

Dans un premier temps, les intensités des pics d'oxydation et de réduction sont analysées pour chaque vitesse de balayage. Deux situations sont possibles. Dans la première, ces intensités sont proportionnelles à la vitesse de balayage. Cette situation est retrouvée dans le cas de médiateurs confinés à la surface des électrodes. Le nombre d'espèces redox à la surface peut être déterminé à l'aide de l'équation des droites (équation (2) et (2')).

$$I_{ox} = \frac{n^2 F^2 \Gamma A}{4RT} \times v \quad (2)$$

$$I_{red} = - \frac{n^2 F^2 \Gamma A}{4RT} \times v \quad (2')$$

Avec I_{ox} et I_{red} l'intensité des pics d'oxydation et de réduction (en ampère), n le nombre d'électrons impliqués dans la réaction électrochimique, F la constante de Faraday (96500 C.mol⁻¹), Γ le recouvrement de la surface (en mol.cm⁻²), A l'aire de l'électrode (en cm²), R la constante des gaz parfait (8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹), T la température (en K) et v la vitesse de balayage (en V.s⁻¹).

Dans la seconde situation, les intensités des pics d'oxydation et de réduction sont proportionnelles à la racine carrée de la vitesse de balayage. Cette situation est rencontrée en présence d'espèces redox en solution et, dans ce cas, l'oxydation et la réduction sont contrôlées par la diffusion. Un coefficient de diffusion de l'espèce redox (ou des ions nécessaires à la réaction d'oxydoréduction) jusqu'à l'électrode peut alors être déterminé grâce à l'équation de Randles-Sevcik (équation (3) et (3')).

$$I_{ox} = 0,4463 nFAC \left(\frac{nFvD}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

$$I_{red} = -0,4463 nFAC \left(\frac{nFvD}{RT} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3')$$

Avec I_{ox} et I_{red} les intensités des pics d'oxydation et de réduction (en ampère), n le nombre d'électrons impliqué dans la réaction électrochimique, F la constante de Faraday (96500 C.mol⁻¹), A l'aire de l'électrode (en cm²), C la concentration de l'analyte détecté (mol.cm⁻³), v la vitesse de balayage (en V.s⁻¹), D le coefficient de diffusion (en cm².s⁻¹), R la constante des gaz parfaits (8,314 J.mol⁻¹.K⁻¹) et T la température (en K).

Dans un second temps, les potentiels d'oxydation et de réduction sont exprimés en fonction du logarithme népérien de la vitesse de balayage. Les équations de Laviron sont utilisables à des vitesses de balayage élevées, afin de déterminer la constante apparente de vitesse de transfert d'électrons k_h et le coefficient de transfert des électrons α (équations (4) et (4')).

$$E_{ox} = E'_0 + \frac{RT}{\alpha nF \ln \left(\frac{RTk_h}{\alpha nF} \right)} - \frac{RT}{\alpha nF \ln v} \quad (4)$$

$$E_{red} = E'_0 + \frac{RT}{(1 - \alpha)nF \ln \left(\frac{RTk_h}{(1 - \alpha)nF} \right)} - \frac{RT}{(1 - \alpha)nF \ln v} \quad (4')$$

Avec E_{ox} et E_{red} les potentiels d'oxydation et de réduction (en V), E'_0 le potentiel standard (en V), R la constante des gaz parfaits ($8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$), T la température (en K), α le coefficient de transfert d'électrons, n le nombre d'électrons impliqué dans la réaction électrochimique, F la constante de Faraday (96500 C.mol^{-1}), k_h la constante apparente de transfert d'électrons (en s^{-1}) et v la vitesse de balayage (en V.s^{-1}).

Les voltammogrammes des électrodes de carbone dopées au Bleu de Prusse ont été réalisés entre -0,6 et +0,6 V vs. Ag/AgCl dans 30 μl de tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0, KCl 0,1 M, avec des vitesses de balayages comprises entre 0,005 et 5 V.s^{-1} .

Les voltammogrammes des électrodes de carbone ont été réalisées avec un seul cycle de balayage entre -1 et +1 V vs. Ag/AgCl, en présence de 30 μl d'un mélange équimolaire de ferricyanure/ferrocyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1 mM total) dans le tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0, KCl 0,1 M. Les vitesses de balayages appliquées sont comprises entre 0,005 à 4 V.s^{-1} .

IV.2. Ampérométrie pulsée par intermittence

L'ampérométrie pulsée par intermittence (IPA) consiste à mesurer l'intensité d'un courant lors de l'application d'une série d'impulsions de potentiel fixe de quelques millisecondes sur une électrode. Ces impulsions sont séparées par des laps de temps pendant lesquels le circuit est ouvert. Les mesures IPA ont été réalisées à l'aide d'un lecteur AndCare 9600 fournie par Alderon Biosciences (Beaufort, Caroline du Nord, USA) associé au logiciel « 96 well reader ».

L'IPA a été utilisé, à la fois pour prétraiter les électrodes mais aussi pour la mesure d'activité transcétolase (TK) et galactose oxydase (GAOx). Pour chaque mesure d'activité et chaque condition testée, les mesures ont été réalisées en triplicat ou quadruplicat.

IV.2.1. Prétraitement des électrodes

Afin d'éliminer les résidus organiques présents dans les encres de sérigraphie et d'uniformiser l'état d'oxydation des particules de carbone ou de Bleu de Prusse, une étape de prétraitement des électrodes est réalisée avant chaque mesure. Cette étape consiste en une oxydation à potentiel fort (ou sur-oxydation) ou une réduction à potentiel faible (ou sur-réduction). Les électrodes carbone-BP sont prétraitées par sur-réduction, dans un tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0, KCl 0,1 M, en appliquant pendant 2 minutes, des impulsions de 82 ms à un potentiel de -0,4 V vs. Ag/AgCl avec une fréquence de 1 Hz.

Les électrodes de carbone sont prétraitées par une sur-oxydation. Elle est réalisée dans un tampon carbonate de sodium 1 M pH 8,3 en appliquant, pendant 10 minutes, des impulsions de 82 ms à un potentiel de +1,2 V vs. Ag/AgCl avec une fréquence de 1 Hz.²⁰⁸

Les électrodes prétraitées sont ensuite rincées à l'eau distillée et séchées sous flux d'air.

IV.2.2. Détection d'activité oxydase par IPA

Dans le cadre de mesure d'activité oxydase, l'électrode de travail est en carbone dopé au Bleu de Prusse (BP) afin de réduire électrochimiquement le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) formé par la réaction enzymatique.

IV.2.2.a. Détection du peroxyde d'hydrogène par IPA

Itaya *et al.* ont décrit pour la première fois, en 1984, l'activité catalytique du Bleu de Prusse envers l' H_2O_2 .²⁰⁹ C'est en réalité la forme réduite du Bleu de Prusse appelée Blanc de Prusse ($Fe^{II}[Fe^{II}(CN)_6]_3$) qui est capable de réduire l' H_2O_2 de façon sensible et spécifique (*Figure 50A*). Cette spécificité est notamment due à la structure de ce médiateur : c'est un cristal cubique présentant un canal de 3,2 Å permettant la diffusion de petites molécules telles que l' H_2O_2 en son sein (*Figure 50B*). Une fois à l'intérieur de ce cristal, l' H_2O_2 peut être réduit par les ions ferreux (Fe^{2+}) du Blanc de Prusse qui sont alors oxydés en ions ferriques (Fe^{3+}). Cette forme oxydée est appelée Bleu de Prusse (BP). Quatre électrons, sont ainsi nécessaires pour réduire les quatre ions ferriques du BP et réduire deux molécules d' H_2O_2 sous l'application un potentiel d'environ 0 V vs. Ag/AgCl.²¹⁰

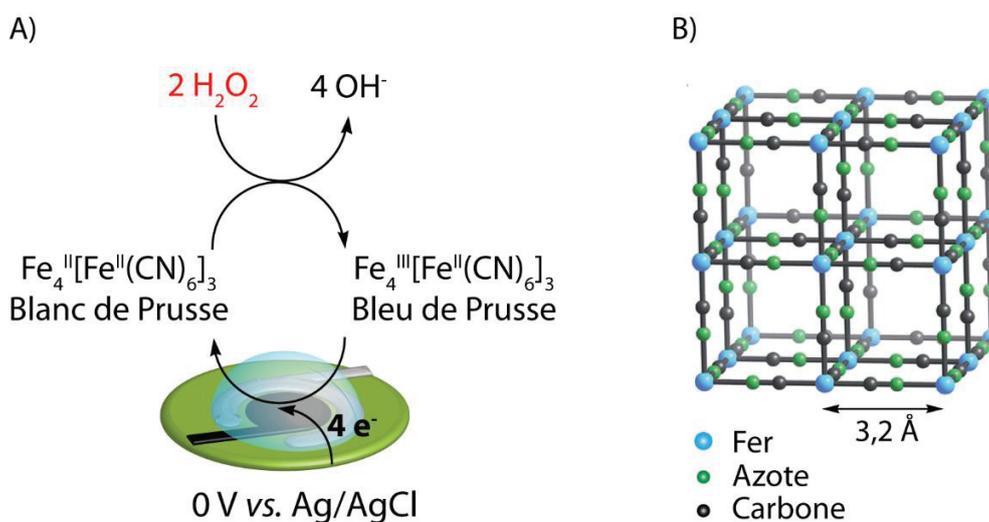


Figure 50. Rôle catalytique et structure du Bleu de Prusse. A) Principe de détection de l' H_2O_2 par réduction via le Bleu de Prusse. B) Structure cubique du Bleu de Prusse (extrait de Rungtaweeworanit et al.).²¹¹

Après le prétraitement des électrodes réalisé dans un tampon Hepes 0,05 M pH 7,0 KCl 0,1 M, une mesure initiale de l'intensité de réduction du BP, est réalisée sur ce même tampon en appliquant pendant 1 minute un potentiel de +0,04 V vs. Ag/AgCl avec des impulsions de 164 ms et une fréquence de 0,5 Hz. Après rinçage et séchage, 30 μl d' H_2O_2 de 0 à 1000 μM dans du tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0, KCl 0,1 M sont déposés sur les électrodes. Une mesure de l'intensité est réalisée en utilisant les mêmes paramètres électrochimiques que pour la mesure initiale.

Les conditions du prétraitement ont été optimisées en appliquant des potentiels de -0,8 à -0,2 V vs. Ag/AgCl avec des impulsions de 1 à 82 ms, des fréquences de 0,01 à 1 Hz et un temps total de prétraitement de 30 secondes à 3 minutes. Les conditions de détection de l' H_2O_2 ont été optimisées en établissant des gammes de concentrations d' H_2O_2 comprises entre 10 et 100 μM (tampon Hepes 0,05 M pH 7,0 KCl 0,1 M) en appliquant un potentiel de -0,3 à + 0,04 V vs. Ag/AgCl avec des impulsions de 41 à 164 ms et des fréquences comprises entre 0,5 et 1 Hz.

IV.2.2.b. Mesure de l'activité de la galactose oxydase de *Dactylium dendroides* (GAOx) par IPA

i) GAOx en solution

L'activité de la galactose oxydase de *Dactylium dendroides* (GAOx) a été mesurée en présence de deux substrats, la dihydroxyacétone (DHA) et le L-erythrose (L-ery). Dans un premier temps, 25 μl d'une solution de 0 à 7,2 mM de DHA ou 0 à 16,8 mM de L-ery (tampon

Hepes 0,05 M à pH 7,0, KCl 0,1 M) sont déposés sur les électrodes. L'intensité de réduction du BP avant réaction est mesurée pendant 1 minute à +0,04 V vs. Ag/AgCl avec des impulsions de 164 ms et une fréquence de 0,5 Hz. Dans un second temps, 5 μ l de GAOx à 0,015 mg.ml⁻¹ (correspondant à 1 U.ml⁻¹) pour le DHA et 0,05 mg.ml⁻¹ (correspondant à 3,3 U.ml⁻¹) pour le L-ery sont ajoutés. Après 9 minutes d'incubation, l'intensité du courant est mesurée en utilisant les mêmes paramètres électrochimiques.

ii) Immobilisation de la GAOx

La GAOx a été immobilisée dans différentes matrices soit commerciales (laponite, alginate) soit issues de synthèses chimiques, les hydroxydes double lamellaire et fournies par l'ICCF (MH1501, MH1502, MH1503, MH1504, MH1501-BP, MH1502-BP, MH1503-BP et MH1504-BP). Ces matrices synthétiques sont des hydroxydes doubles lamellaires (HDL) constituées de feuillets chargés positivement ou négativement et séparés par des cations ou anions compensateurs de charge. De même, la laponite est une argile colloïdale constituée de feuillets chargés négativement, séparés par des ions sodium. La formule, le potentiel zêta (représentant la charge électrique de l'argile, valeurs fournies par l'ICCF) et la nature de l'ion compensateur de charge de chacune des matrices sont présentes dans le *Tableau 13*. L'alginate est un polysaccharide constitué d'acides mannuroniques et guluroniques conférant à ce polymère une charge négative.

Chaque matrice est suspendue dans l'eau à une concentration de 1 mg.ml⁻¹ et placée sous agitation pendant une nuit. Une solution équimassique de laponite et d'alginate a été préparée afin d'obtenir une matrice mixte (1 mg.ml⁻¹). La suspension est ensuite mélangée avec un même volume de solution de GAOx (0,03 mg.ml⁻¹ préparé extemporanément) pour obtenir une suspension de GAOx@matrice. 2 μ l de cette suspension sont déposés sur les électrodes de travail. Une solution de GAOx seule (sans matrice) a également été adsorbée sur les électrodes. Les plaques sont placées pendant une nuit à 4°C pour permettre l'adsorption de GAOx@matrice sur les électrodes.

Tableau 13. Composition, nature de l'ion compensateur et potentiel zêta des argiles utilisées pour immobiliser la GAOx. Les matrices MH1501-BP à MH1504-BP ont la même composition que les matrices MH1501 à MH1504 mais ont été dopées au Bleu de Prusse. DDS = dodécylsulfonate.

Matrice	Formule de la matrice	Ion compensateur	Potentiel zêta (mV)
Laponite	$(Mg_{5,5}Li_{0,5})Si_4O_{10}(OH)_2$	Na^+	ND
MH1501	$Mg_2Al(OH)_6$	NO_3^-	+32
MH1502	$Mg_2Al(OH)_6DDS$	DDS	-8
MH1503	$Zn_2Al(OH)_6NO_3$	NO_3^-	+43
MH1504	$Zn_2Al(OH)_6DDS$	DDS	-45
MH1501-BP	$Mg_2Al(OH)_6NO_3$	NO_3^-	+27
MH1502-BP	$Mg_2Al(OH)_6DDS$	DDS	-15,6
MH1503-BP	$Zn_2Al(OH)_6NO_3$	NO_3^-	+36
MH1504-BP	$Zn_2Al(OH)_6DDS$	DDS	-0,8

iii) Mesure de l'activité de la GAOx immobilisée

Le tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0, KCl 0,1 M (25 μ l) est déposé sur les électrodes sur lesquelles a été adsorbée la GAOx@matrice précédemment préparée. Une sur-réduction par IPA de 2 min est réalisée en appliquant un potentiel de -0,4 V vs. Ag/AgCl avec des impulsions de 82 ms et une fréquence de 1 Hz. L'intensité avant réaction est mesurée, dans ce même tampon, en appliquant des impulsions de 164 ms à un potentiel de +0,04 V vs. Ag/AgCl avec une fréquence de 0,5 Hz, pendant 1 minute. La réaction est déclenchée par l'ajout de 5 μ l de 0 à 36 mM de DHA ou de 0 à 85 mM de L-ery. Après 9 minutes de réaction, l'intensité du courant est mesurée avec les mêmes paramètres électrochimiques.

Les études de stabilité du biohybride GAOx@matrice dans le temps ont été réalisées en conservant les électrodes sur lesquelles est adsorbée la GAOx, à 4°C pendant 1, 3, 5, 7 et 10 jours. L'activité de la GAOx est mesurée en présence de DHA 6 mM avec le même protocole.

Des études de désorption de la GAOx ont été réalisées en adsorbant 74 ng de GAOx à la surface des électrodes en absence ou en présence de laponite, d'alginate ou d'un mélange équimassique de ces deux matrices. Après adsorption des différentes suspensions (à 4°C pendant une nuit) 30 μ l de tampon Hepes 0,05 M pH 7,0 KCl 0,1 M sont déposés sur ces électrodes et 10 μ l de ce milieu réactionnel sont prélevés. L'activité de la GAOx dans le prélèvement est mesurée

par spectrophotométrie, à l'aide du test présenté dans le paragraphe II.2., en présence de 60 μl de tampon Hepes, 10 μl de DHA 60 mM, 10 μl d'HRP 0,011 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (2,75 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$) et 10 μl d'ABTS 30 mM. L'absorbance à 414 nm est mesurée pendant 20 minutes et l'activité de la GAOx qui a été désorbée est exprimée en pourcentage par rapport au signal en présence de 74 ng de GAOx en solution.

iv) Mesure de l'activité de la GAOx en présence d'un inhibiteur

Un volume de 24 μl de DHA 7,2 mM (pour l'enzyme en solution) ou 24 μl de tampon (pour l'enzyme immobilisée) ainsi que 1 μl de 0 à 12 mM d'azoture sont déposés sur les électrodes. L'intensité de réduction du BP avant réaction est mesurée en appliquant des impulsions de 164 ms à potentiel de +0,04 V vs. Ag/AgCl avec une fréquence de 0,5 Hz, pendant 1 minute. La réaction est déclenchée par l'ajout de 5 μl de GAOx (0,015 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ correspondant à 1 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$) ou 5 μl de DHA 36 mM et après 9 minutes d'incubation, l'intensité du courant est de nouveau mesurée.

IV.2.3. Mesure de l'activité TK par IPA

IV.2.3.a. Mesure de l'activité TK par le système bienzymatique

Les réactions catalysées par la TK ont été réalisées en présence de fructose-6-phosphate (*Figure 51A*) ou d'hydroxypyruvate (*Figure 51B*) comme substrats donneurs et le glycolaldéhyde ou le formaldéhyde comme substrats accepteurs. La DHA ou le L-ery formé par cette réaction sont oxydés par la galactose oxydase produisant de l' H_2O_2 détectable par IPA.

Ces réactions enzymatiques sont réalisées dans des plaques 96 puits initialement utilisées pour les mesures spectrophotométriques dans un volume total de 100 μl . Le milieu réactionnel est composé de 40 μl de tampon Hepes 0,05 M pH 7,0 KCl 0,1 M, 10 μl de D-fructose-6-phosphate 20 mM, 10 μl de glycolaldéhyde 20 mM, 10 μl de TK 1,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (15,5 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$), 10 μl de TPP 0 à 2 mM, 10 μl MgCl_2 10 mM, 10 μl de GAOx 0,05 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (3,3 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$). La réaction a lieu pendant 10 à 60 minutes au terme desquelles 30 μl de ce milieu réactionnel sont prélevés et déposés sur les électrodes de carbone-BP (préalablement prétraitées et dont l'intensité de courant dans le tampon Hepes a été mesurée). L'intensité de réduction du BP est mesurée à +0,04 V vs. Ag/AgCl pendant 1 minute à l'aide d'impulsions de 164 ms et une fréquence de 0,5 Hz.

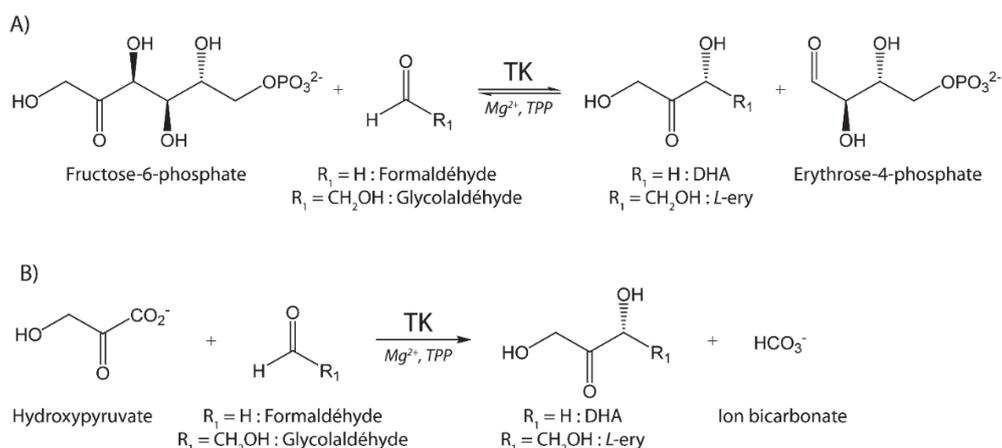


Figure 51. Réactions catalysées par la TK en présence de fructose-6-phosphate (A) ou d'hydroxypyruvate (B) comme substrat donneur et en présence d'un substrat accepteur non phosphorylé (formaldéhyde ou glycolaldéhyde) conduisant à la formation de DHA ou L-ery. La réaction a lieu en présence de magnésium (Mg^{2+}) et de thiamine pyrophosphate (TPP) comme cofacteurs.

IV.2.3.b. Mesure de l'activité TK par oxydation de l'intermédiaire réactionnel

Le deuxième système rapporteur de l'activité TK repose sur l'oxydation de l'intermédiaire réactionnel α,β -dihydroxyethylthiamine diphosphate (DHETPP) par le ferricyanure (Figure 52). Cet intermédiaire est formé suite à la fixation de la thiamine pyrophosphate (TPP) et du substrat donneur (une cétone) et à la libération du premier produit (un aldéhyde).

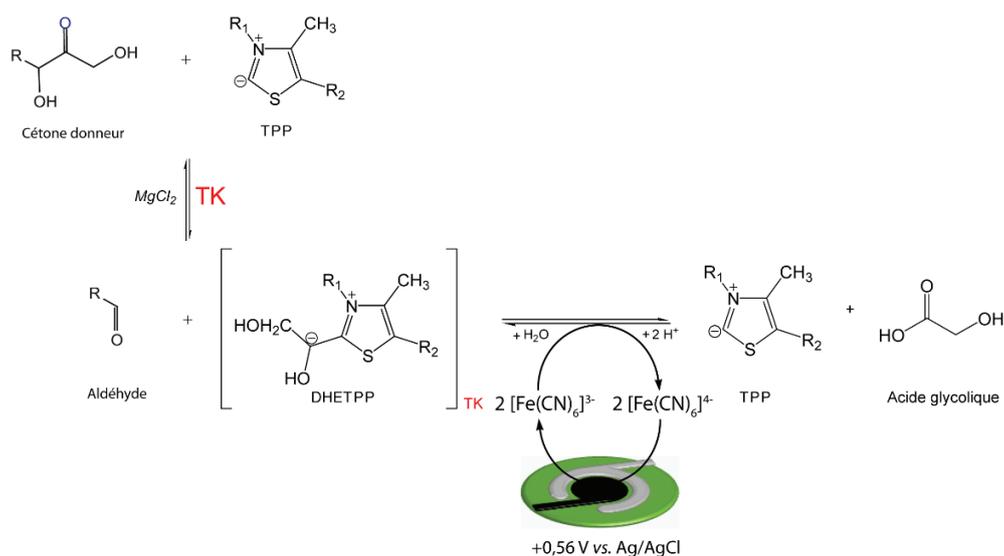


Figure 52. Schéma de principe de la mesure d'activité TK par IPA via l'oxydation de l'intermédiaire réactionnel (DHETPP) par le ferricyanure.

i) Optimisation de la mesure d'activité TK

L'optimisation du temps de réaction enzymatique a été réalisée en présence de 25 μl du milieu réactionnel composé de 13,9 μg de TK (0,15 U), 1 mM de MgCl_2 , de 0,1 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, et 0 à 200 μM de TPP. La réaction a été déclenchée par l'ajout de 5 μl de L-ery 6 mM. L'intensité à +0,56 V vs. Ag/AgCl (pendant 2 minutes avec une fréquence de 1 Hz et une largeur d'impulsions de 82 ms) est mesurée avant et après différents temps de réaction compris entre 1 et 10 minutes.

L'optimisation de la concentration en ferricyanure a été réalisée en présence de 25 μl du milieu réactionnel composé de 13,9 μg de TK (0,15 U), 1 mM de MgCl_2 , de 0 à 10 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, et 200 μM de TPP. La réaction a été déclenchée par l'ajout de 5 μl de L-ery 6 mM et l'intensité du courant à +0,56 V vs. Ag/AgCl est mesurée avant et après 5 minutes de réaction.

L'optimisation de la quantité d'enzyme a été réalisée en présence de 0 à 27,8 μg de TK (0 à 0,29 U), 1 mM de MgCl_2 , 0,1 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, et 200 μM de TPP. La réaction a été déclenchée par l'ajout de 5 μl de L-ery 6 mM et l'intensité du courant à +0,56 V vs. Ag/AgCl est mesurée avant et après 5 minutes de réaction.

L'optimisation du substrat donneur a été réalisé en présence de 25 μl du milieu réactionnel composé de 13,9 μg de TK (0,15 U), 1 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de TPP, de 0,1 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ et la réaction a été déclenchée par l'ajout de 5 μl de 0 à 4,8 mM de L-ery, de fructose-6-phosphate ou d'hydroxypyruvate. L'intensité du courant à +0,56 V vs. Ag/AgCl a été mesurée avant et après 5 minutes de réaction.

L'influence du diméthylsulfoxyde sur l'activité enzymatique a été vérifiée en présence de 30 μl de milieu réactionnel composé de 13,9 μg de TK (0,15 U), 1 mM de MgCl_2 , 0,01 mM de TPP, de 0,1 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ et 0 à 20% (volume/volume) de DMSO. La réaction a été déclenchée par l'ajout de 5 μl de L-ery 7,2 mM et l'intensité du courant à +0,56 V vs. Ag/AgCl est mesurée avant et après 5 minutes de réaction.

ii) Mesure de la TK immobilisée dans les hydroxydes doubles lamellaires (HDL)

La matrice d'immobilisation de la TK est un hydroxyde double lamellaire de formule $\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6$, synthétisé par l'ICCF. La taille des particules (214 nm de diamètre) et le potentiel Zêta de cette argile (+42 mV) ont été caractérisés à l'ICCF. Une suspension d'HDL (1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) est préparée dans l'eau et placée sous agitation pendant une nuit. Cette solution est ensuite mélangée avec 13,9 μg de TK pour obtenir une suspension de TK@HDL. Deux μl de cette suspension sont

déposés sur les électrodes de travail. Une solution de TK seule (sans matrice) a également été adsorbée sur les électrodes. Les électrodes sont alors placées pendant une nuit à 4°C pour permettre l'adsorption de la TK@HDL et de la TK.

L'activité de la TK est mesurée en déposant sur les électrodes 25 µl de milieu réactionnel constitué de 1 mM de MgCl₂, 0,1 mM de K₃Fe(CN)₆ et 0 à 200 µM de TPP. La réaction est déclenchée par l'ajout de 5 µl de L-ery 6 mM. L'intensité à +0,56 V vs. Ag/AgCl (fréquence 1 Hz et largeur des impulsions 82 ms) est mesurée pendant 2 minutes avant et après 5 minutes de réaction.

iii) Criblage de la chimiothèque de l'ICBMS

Le criblage d'une partie de la chimiothèque a été réalisé avec les plaques de criblage électrochimiques. Pour cela, l'intensité du courant est mesurée en présence de 13,9 µg de TK (0,15 U), 1 mM de MgCl₂, 0,1 mM de K₃Fe(CN)₆, 0,01 mM de TPP, de 1 mM de L-ery et de 0,1 mM de chacune des molécules de la chimiothèque. Pour chaque plaque, la première colonne est utilisée pour réaliser 4 contrôles positifs (en absence d'inhibiteur mais en présence de 10% (v/v) de DMSO) et 4 contrôles négatifs (en absence d'inhibiteurs et de TPP mais en présence de 10% (v/v) de DMSO). Le reste de la plaque, c'est-à-dire 88 électrodes, est utilisé pour tester les molécules de la chimiothèque et chaque molécule a été testée 4 fois.

iv) Caractérisation de I38-49

La concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) a été déterminée en mesurant l'intensité du courant en présence de 13,9 µg de TK (0,15 U), 1 mM de MgCl₂, 0,01 mM de TPP, 0,1 mM de K₃Fe(CN)₆, et de 0 à 300 µM de I38-49. La réaction est déclenchée par l'ajout de 1 mM de L-ery et l'intensité à +0,56 V vs. Ag/AgCl (fréquence 1 Hz et largeur des impulsions 82 ms) est mesurée pendant 2 minutes avant et après 5 minutes de réaction.

Les études cinétiques par IPA ont été réalisées en présence de 13,9 µg de TK (0,15 U), 1 mM de MgCl₂, 0,1 mM de K₃Fe(CN)₆, de 0 à 200 µM de TPP et 0 à 100 µM de I38-49. La réaction est déclenchée par l'ajout de 1 mM de L-ery et l'intensité à +0,56 V vs. Ag/AgCl (fréquence 1 Hz et largeur des impulsions 82 ms) est mesurée pendant 2 minutes avant et après 5 minutes de réaction.

V. Electrochimiluminescence

V.1. Produits et appareils

La diméthylmalonylurée sodique (Véronal) provient de Prolabo (Nantes, France). L'acide 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (luminol) provient de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

En électrochimiluminescence (ECL), les électrodes de travail sont en carbone (dépourvues de BP). Les images sont acquises à l'aide d'une caméra CCD Hamamatsu (Hersching am Ammersee, Allemagne) et analysées avec le logiciel Wasabi v.1.5, qui permet de quantifier la luminescence.

V.2. Prétraitement des électrodes

Afin d'éliminer d'éventuels résidus organiques présents dans les encres de sérigraphie et d'uniformiser l'état d'oxydation du carbone, une étape de prétraitement des électrodes est réalisée avant chaque mesure. Elle consiste en une sur-oxydation réalisée dans un tampon NaHCO_3 1 M pH 8,3 en appliquant, pendant 10 minutes, des impulsions de 82 ms à un potentiel de +1,2 V vs. Ag/AgCl avec une fréquence de 1 Hz.²⁰⁸ Les électrodes prétraitées sont ensuite rincées à l'eau distillée et séchées sous un flux d'air.

V.3. Mesure d'activité oxydase par ECL

L'électrochimiluminescence (ECL) est une méthode qui consiste à déclencher une réaction chimique produisant de la lumière sous l'action d'un potentiel électrochimique. Dans notre cas, la réaction d'ECL implique le luminol (acide amino-dihydro-phthalazinedione) qui, en présence d'un oxydant, tel que H_2O_2 , est converti en aminophthalate excité. Ce dernier va revenir à l'état fondamental en émettant de la lumière avec un maximum d'émission à 425 nm (*Figure 53*).²¹²

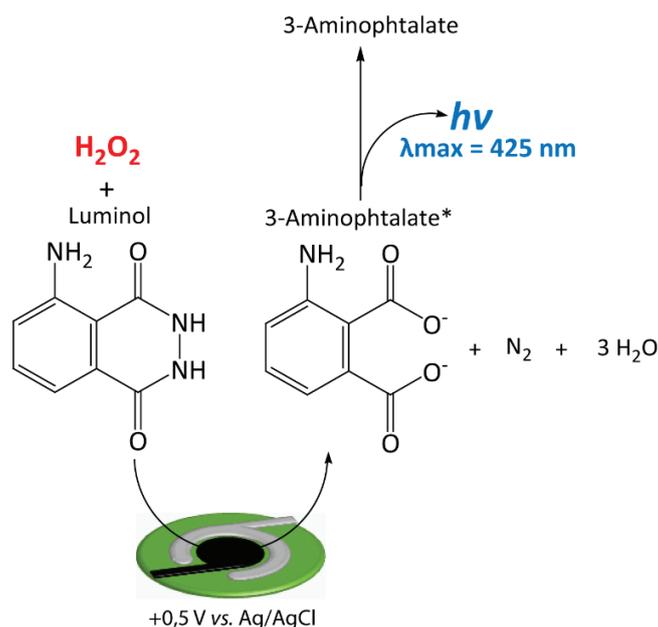
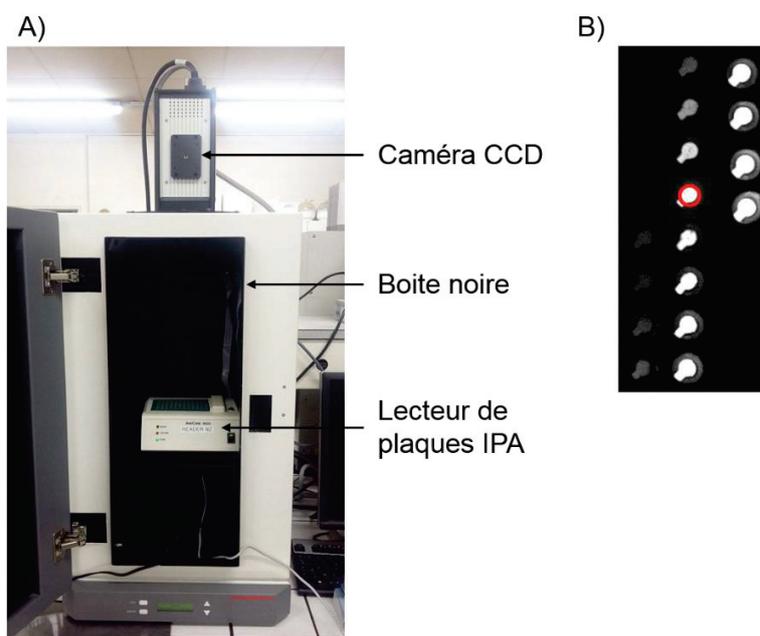


Figure 53. Principe de détection de l' H_2O_2 par ECL en présence de luminol.

$h\nu$ correspond à l'émission de lumière dont la longueur d'onde maximale d'émission est de 425 nm.

L'électrode de travail est en carbone et l'électrode de référence/contre électrode en argent/chlorure d'argent. Le potentiel nécessaire pour déclencher une telle réaction est d'environ $+0,5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Dans ces travaux de thèse, ce potentiel est appliqué par IPA. Le lecteur de plaques de criblage électrochimique est placé directement dans une boîte noire contenant une caméra CCD (« Charge Coupled Device » ou dispositif à transfert de charge) permettant de détecter la luminescence produite (Figure 54A). Les photons produits par cette réaction sont détectés par le capteur CCD et sont convertis en tension électrique permettant ainsi la reconstitution en deux dimensions de la répartition de la luminescence produite dans la zone de lecture. L'application du potentiel (réalisé par IPA) est déclenchée en même temps que l'acquisition de l'image par la caméra CCD. Un exemple d'image obtenue est donné Figure 54B. La luminescence est alors quantifiée dans les régions d'intérêt. Ces régions d'un diamètre moyen de 4,5 mm englobent la totalité de l'électrode de travail mais excluent les électrodes d'Ag/AgCl.



V.3.1. Détection du peroxyde d'hydrogène par ECL

La détection du peroxyde d'hydrogène par ECL est réalisée en déposant sur les électrodes 29 μl d' H_2O_2 de 0 à 1000 μM (préparés dans un tampon Véronal 0,03 M pH 8,5, KCl 0,03 M) et 1 μl de luminol à 5 mM (préparé dans le DMSO). Des impulsions de 1 ms à un potentiel de +0,6 V vs. Ag/AgCl sont appliquées pendant 1 minute avec une fréquence de 1 Hz. L'acquisition de l'image par la caméra CCD est réalisée pendant cette même minute. Une mesure est réalisée avant et après ajout de luminol.

Les conditions de détection de l' H_2O_2 par ECL ont été optimisées en établissant des gammes de concentrations d' H_2O_2 comprises entre 0 et 20 μM (tampon Véronal 0,03 M pH 8,5 KCl 0,03 M) et en appliquant un potentiel de +0,5 à +0,6 V vs. Ag/AgCl avec des impulsions de 1 à 164 ms et des fréquences comprises entre 0,5 et 1 Hz. Les conditions du prétraitement ont été optimisées en appliquant des potentiels de +1,2 V vs. Ag/AgCl avec des impulsions de 1 à 82 ms, des fréquences de 0,4 à 10 Hz et un temps total de prétraitement de 4 à 10 minutes.

V.3.2. Mesure de l'activité de la galactose oxydase de *Dactylium dendroides* par ECL

L'activité de la GAOx en solution est mesurée en déposant sur les électrodes 24 μl de 0 à 7,2 mM de DHA ou de L-ery (préparés dans un tampon Véronal 0,03 M pH 8,5 KCl 0,03 M) et 1 μl de luminol à 5 mM. Une première mesure de la luminescence est réalisée en appliquant, pendant une minute, un potentiel de +0,6 V vs. Ag/AgCl, avec une fréquence de 1 Hz et des impulsions de 1 ms. La réaction est déclenchée par l'ajout de 5 μl de GAOx à 2,4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (correspondant à 0,16 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) en présence de DHA ou 5 μl de GAOx à 0,05 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (correspondant à 3,3 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) en présence de L-ery. Après 9 minutes de réaction, l'intensité de luminescence est mesurée avec les mêmes paramètres.

L'immobilisation de la GAOx dans les différentes matrices suit le même protocole que celui décrit dans le paragraphe IV.2.2.2.2. L'activité de cette enzyme immobilisée est mesurée en déposant 24 μl de tampon Véronal 0,03 M pH 8,5, KCl 0,03 M et 1 μl de luminol à 5 mM. L'intensité de luminescence initiale est mesurée en appliquant, pendant une minute, un potentiel de +0,6 V vs. Ag/AgCl, avec une fréquence de 1 Hz et des impulsions de 1 ms. La réaction est déclenchée par ajout de 5 μl de 0 à 36 mM de DHA ou L-ery. Après 9 minutes de réaction, l'intensité de luminescence est de nouveau mesurée (I_{10}).

V.4. Mesure d'activité TK

La réaction catalysée par la TK est mesurée en présence de galactose oxydase comme enzyme auxiliaire. Cette réaction est réalisée dans des plaques 96 puits initialement utilisées pour les mesures spectrophotométriques dans un volume total de 100 μl . Le milieu réactionnel est composé de 40 μl de tampon Véronal 0,03 M pH 8,5 KCl 0,03 M, 10 μl de D-fructose-6-phosphate 20 mM, 10 μl de glycolaldéhyde 20 mM, 10 μl de TK 1,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (15,5 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$), 10 μl de 0 à 2 mM de TPP, 10 μl MgCl_2 10 mM, 10 μl de GAOx 0,05 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (3,3 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$). La réaction a lieu pendant 10 à 60 minutes au terme desquelles 29 μl de ce milieu réactionnel sont prélevés et déposés sur les électrodes de carbone (préalablement prétraitées) en présence de 1 μl de luminol à 5 mM. La réaction d'ECL est déclenchée en appliquant, pendant une minute, un potentiel de +0,6 V vs. Ag/AgCl, avec une fréquence de 1 Hz et des impulsions de 1 ms.

VI. Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du proton

VI.1. Appareil

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN-¹H) ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker Avance III (500 MHz) au sein du Centre Commun de RMN (CCRMN) de l'ICBMS. Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) et référencés sur le pic de l'oxyde de deutérium (D₂O, provenant de Sigma-Aldrich), dans lequel le spectre est réalisé (dont le déplacement chimique est d'environ 4,7 ppm). Le logiciel utilisé pour traiter les spectres est MestReNova version 6.0.2-5475.

VI.2. Mesure d'activité TK

Toutes les mesures d'activités ont été réalisées dans le tampon Hepes 0,05 M préparé dans le D₂O en présence de KCl 0,1 M et le pD a été ajusté à 7,0 à l'aide de deutéroxyde de sodium (NaOD) provenant de Sigma-Aldrich. La réaction catalysée par la TK fait intervenir l'hydroxypyruvate (HPA) comme substrat donneur et le glycolaldéhyde (GA) comme substrat accepteur permettant la formation de L-erythrose (L-ery) et de dioxyde de carbone. Ce dernier n'étant pas détectable par RMN-¹H, la consommation de l'HPA et du GA et la formation du L-ery ont été suivies par RMN-¹H.

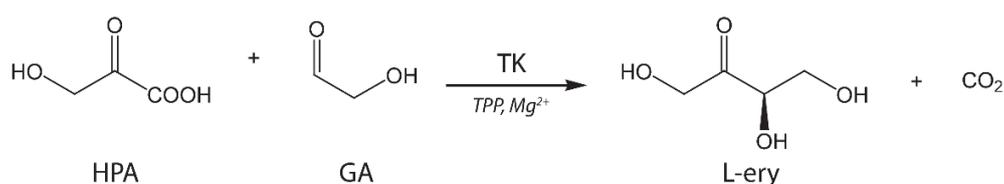


Figure 55. Réaction catalysée par la TK en présence d'hydroxypyruvate (HPA) et glycolaldéhyde (GA) comme substrats et permettant la formation de L-erythrose (L-ery) et dioxyde de carbone (CO₂).

Dans un premier temps, les spectres RMN-¹H de l'HPA, de la GA et du L-ery à une concentration de 1 g.l⁻¹ (correspondant à 8,3 mM de GA et de L-ery, 9,1 mM d'HPA) ont été réalisés afin d'identifier les pics caractéristiques. Chaque pic est déconvolué afin de mesurer l'aire sous le pic spécifique de l'espèce et d'éliminer les pics parasites.

Dans un second temps, l'activité de la TK a été mesurée en réalisant un spectre avant réaction : le milieu réactionnel est constitué de GA 50 mM, d'HPA 20 mM, de MgCl₂ 10 mM et de 0 à 200 μM de TPP. La réaction est ensuite déclenchée par l'ajout de 6 μg de TK (0,062 U) et un second spectre est réalisé après 1 heure de réaction. Avant et après la réaction enzymatique, les intégrales des pics des deux substrats et du produit sont normalisés en fonction du pic de l'Hepes (dont la concentration est de 50 mM) et converties en concentration. La concentration en GA a été déterminée à partir de l'aire du triplet à 4,96 ppm et selon l'équation (5). La concentration en HPA a été déterminée à partir de l'aire du singulet à 4,60 ppm et selon l'équation (6). La concentration en L-ery a été déterminée à partir de l'aire du doublet de doublet à 4,42 ppm et selon les équations (7) et (8).

$$[GA] = [GA]_0 \times \frac{\int GA/2}{\int GA/2 + \int Lery/2} \quad (5)$$

$$[HPA] = [HPA]_0 \times \frac{\int HPA}{\int HPA + \int Lery/2} \quad (6)$$

$$[Lery] = [GA]_0 \times \frac{\int Lery/2}{\int GA/2 + \int Lery/2} \quad (7) \quad [Lery] = [HPA]_0 \times \frac{\int Lery/2}{\int HPA + \int Lery/2} \quad (8)$$

Avec $[GA]_0$ et $[HPA]_0$ les concentrations initiales en GA et en HPA et $\int HPA$, $\int GA$ et $\int L-ery$ les intégrales des pics RMN-¹H de l'HPA, du GA et du L-ery.

La moyenne des concentrations en L-ery obtenues par les deux méthodes est divisée par le temps de réaction et exprimée en fonction de la concentration en TPP.

L'activité de la TK en présence de I38-49 a été mesurée par la même méthode. Le milieu réactionnel est constitué de GA 50 mM, HPA 20 mM, MgCl₂ 10 mM, TK 6 μg (0,062 U), 0 à 200 μM de TPP et 0 à 100 μM de I38-49. La même stratégie a été utilisée afin d'interpréter les spectres obtenus. Ces mesures n'ont été réalisées qu'une seule fois (n=1).

VII. Traitement du signal

VII.1. Traitement du signal spectrophotométrique

L'activité d'une enzyme est caractérisée par deux étapes : la première correspond à la fixation du substrat (S) sur l'enzyme (E) pour former le complexe enzyme-substrat (ES), gouvernée

par la constante de Michaelis-Menten (K_M). La seconde étape correspond à la libération du produit (P) à partir du complexe ES selon une constante catalytique (k_{cat}) (Figure 56).



Figure 56. Schéma de la réaction entre une enzyme (E) et son substrat (S) conduisant à la formation d'un produit (P).

La vitesse initiale de la réaction enzymatique correspond donc à la variation de la concentration en produit formé (ou de la concentration en substrat consommé) pendant des temps courts de réaction. Les mesures d'activité réalisées par spectrophotométrie fournissent des variations d'absorbance mesurées à une longueur d'onde donnée par unité de temps. Les pentes des tangentes à l'origine de ces courbes (notées $\Delta\text{Abs}/\Delta t$) sont converties en vitesse de réaction (c'est-à-dire en concentration par unité de temps) à l'aide de l'équation de Beer Lambert (équation (9)).

$$\text{Vitesse} = \frac{\Delta A}{\Delta t \times l \times \varepsilon_i} \times 10^6 \quad (9)$$

$\Delta A/\Delta t$ correspond à la pente à l'origine de la variation d'absorbance en fonction du temps (en min^{-1}), l la longueur du trajet optique (1 cm pour les macrocuvettes et 0,6 cm pour les microplaques) et ε_i le coefficient d'absorption molaire de la molécule absorbante (en $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Cette vitesse est multipliée par 10^6 pour avoir des résultats en μM par minute.

Si la concentration en substrat initiale varie, la vitesse initiale suit un comportement hyperbolique décrit par l'équation de Michaelis-Menten (équation (10)).

$$\text{Vitesse} = \frac{V_m \times [\text{substrat}]}{K_M + [\text{substrat}]} \quad (10)$$

Avec V_m la vitesse de réaction maximale (en $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$), $[\text{substrat}]$ la concentration en substrat initiale (en mM) et K_M la constante de Michaelis-Menten, correspondant à la concentration en substrat pour laquelle la vitesse est égale à la moitié de V_m (en mM).

Afin de vérifier le comportement hyperbolique des courbes et déterminer les paramètres cinétiques (V_m et K_M), la méthode de linéarisation de Hanes-Woolf a été utilisée en exprimant le rapport de la concentration en substrat sur la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat selon

l'équation (11). La pente et le coefficient directeur de cette droite permettent alors de déterminer les paramètres cinétiques.

$$\frac{[substrat]}{vitesse} = \frac{1}{V_m} \times [substrat] + \frac{K_M}{V_m} \quad (11)$$

VII.2. Traitement du signal obtenu par ampérométrie pulsée par intermittence

L'ampérométrie pulsée par intermittence (IPA) consiste à mesurer l'intensité du courant lors de l'application d'une série d'impulsions de potentiel fixe de quelques millisecondes sur une électrode. La *Figure 57* montre un exemple de graphe obtenu lors d'une mesure IPA : un point correspond à l'intensité mesurée sous l'application d'une impulsion de potentiel. Pour chaque mesure, l'intensité représentative de l'électrode correspond à la moyenne des 10 dernières mesures (*Figure 57, encadré rouge*).

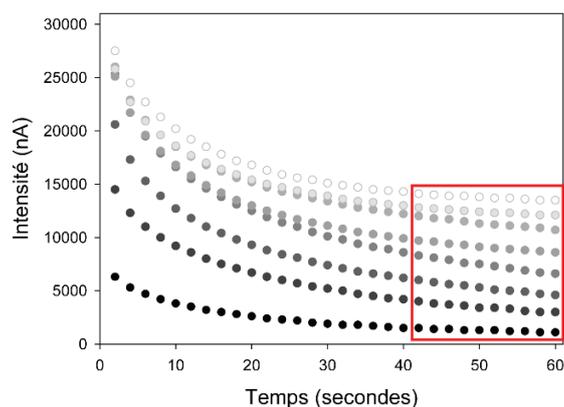


Figure 57. Exemple de signaux obtenus par IPA : mesure de l'intensité en appliquant pendant 1 minute un potentiel de +0,04 V vs. Ag/AgCl avec des impulsions de 164 ms avec une fréquence de 0,5 Hz. L'intensité du courant représentative correspond à la moyenne des dix derniers points, encadrés en rouge.

L'intensité mesurée en présence d'un analyte (I_{mes}) est soustraite par une valeur d'intensité mesurée en absence de l'analyte (I_0) et convertie en densité de courant (appelée J) selon l'équation (12).

$$J = \frac{I_{mes} - I_0}{\pi \times r^2 \times 1000} \quad (12)$$

Avec J la densité de courant (en $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$), I_{mes} et I_0 les intensités de courant mesurées en présence et en absence de l'analyte à détecter (en nA) et r le rayon de l'électrode de travail (0,15 cm).

Les mesures d'activité enzymatiques par IPA sont réalisées en faisant varier la concentration en substrat. L'intensité du courant est représentative de l'activité d'une enzyme mais ne permet pas de déterminer directement la concentration du substrat consommé ou du produit formé. Dans ce cas, l'équation de Michaelis-Menten n'est pas applicable mais une fonction hyperbolique (équation (13)) est utilisée pour ajuster ces courbes.

$$J = \frac{J_{max} \times [substrat]}{K_{0,5} + [substrat]} \quad (13)$$

Avec J_{max} la densité de courant maximale (en $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$), $[substrat]$ la concentration en substrat et $K_{0,5}$ la concentration en substrat nécessaire pour atteindre la moitié de J_{max} .

La sensibilité de détection des substrats (en $\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) correspond à la pente de la partie linéaire de l'hyperbole obtenue. La limite de détection correspond à la concentration en substrat pour laquelle le rapport des densités de courant en présence et en absence de substrat est supérieur à 3. De plus, l'optimisation des conditions de détection de la TK a nécessité le calcul de rapport de la densité de courant mesurée après réaction sur la densité de courant mesurée avant réaction (J_{reac}/J_0), correspondant à un rapport signal/bruit.

VII.3. Traitement du signal par électrochimiluminescence

En électrochimiluminescence, l'intensité de luminescence représentative (I_{corr}) correspond à la différence de l'intensité de luminescence mesurée en présence d'un analyte (I_{mes}) soustraite par une valeur d'intensité mesurée en absence de l'analyte (I_0).

Les mesures d'activité enzymatiques par ECL sont réalisées en faisant varier la concentration en substrat. De même qu'en IPA, l'équation de Michaelis-Menten n'est pas applicable mais une fonction hyperbolique (équation (14)) est utilisée pour ajuster ces courbes.

$$I_{corr} = \frac{I_{max} \times [substrat]}{K_{0,5} + [substrat]} \quad (14)$$

Avec I_{max} l'intensité de luminescence maximale (en UA), $[substrat]$ la concentration en substrat et $K_{0,5}$ la concentration en substrat nécessaire pour atteindre la moitié de I_{max} .

La sensibilité de détection des substrats (en UA.mM⁻¹) et la limite de détection sont également déterminées de façon analogue à l'IPA.

VII.4. Mesure d'inhibition

L'inhibition enzymatique a été caractérisée par IPA et spectrophotométrie en calculant la concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) à l'aide de l'équation (15).

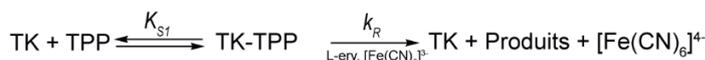
$$Signal = \frac{Signal_0 \times CI_{50}}{CI_{50} + [inhibiteur]} \quad (15)$$

Avec *signal* correspondant à la vitesse de réaction enzymatique (en μM.min⁻¹) ou à la densité de courant (en μA.cm⁻²), le *signal*₀ correspondant à la vitesse de réaction ou la densité de courant mesurée en absence d'inhibiteur, $[inhibiteur]$ la concentration en inhibiteur (en μM) et CI_{50} la concentration inhibitrice 50 (en μM).

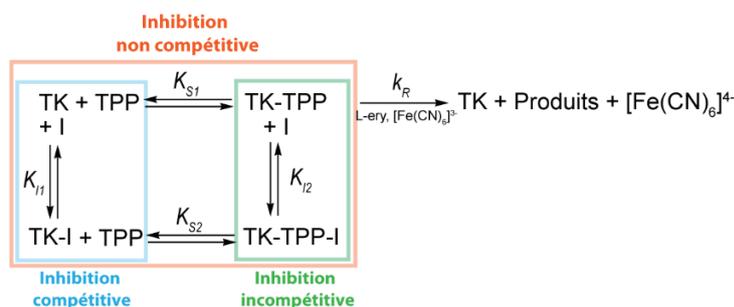
Les études cinétiques de la TK en présence de I38-49 ont été réalisées par spectrophotométrie, RMN et IPA en utilisant un modèle simplifié qui prend en compte uniquement la fixation de la TPP sur la TK (*Figure 58A*). Cette fixation est gouvernée par une constante de dissociation (appelée K_S) conduisant à la formation du complexe TK-TPP. Les différents produits de la réaction (glycolaldéhyde, acide glycolique et ferrocyanure) sont libérés selon une constante réactionnelle apparente (appelée k_R). Celle-ci inclue la constante de dissociation du L-ery (conduisant à la formation de l'intermédiaire réactionnel DHETPP), la constante catalytique de la réaction enzymatique et la constante chimique de l'oxydation de l'intermédiaire DHETPP par le ferricyanure. Les mécanismes d'inhibition classiques (*Figure 58B*) ou partiels (*Figure 58C*) associés à ce modèle simplifié sont ajustés aux données obtenues pour chaque méthode à l'aide du logiciel Dynafit®.²¹³ Ce dernier possède un mode de discrimination qui permet de déterminer le mécanisme d'inhibition le plus approprié. Cette discrimination est réalisée en calculant l'AIC (pour *Akaike Information Criteria*). Ce paramètre, compris entre 0 et 1, est une estimation de la qualité relative d'un modèle statistique pour un ensemble de données. Dynafit® permet de déterminer les constantes cinétiques associées au modèle d'inhibition sélectionné (ici K_S , k_R et K_I).

Les feuilles de commande du logiciel permettant d'accéder à ces résultats sont données en annexe (n°3).

A) Modèle simplifié



B) Mécanismes d'inhibition classiques



C) Mécanismes d'inhibition partielle

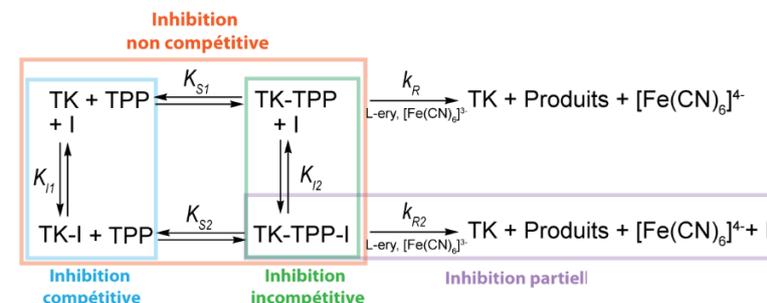


Figure 58. A) Mécanisme réactionnel de la réaction catalysée par la TK réduit à la fixation de la TPP sur l'enzyme. B) Mécanismes d'inhibition classiques et C) partiels associés à ce modèle enzymatique simplifié.

I = inhibiteur, TK = transcétolase, TPP = thiamine pyrophosphate.

VII.5. Variabilité des mesures

VII.5.1. Variabilité de la détection du peroxyde d'hydrogène

La variabilité de la détection d'H₂O₂ par IPA a été étudiée à partir de mesures réalisées sur 73 électrodes différentes en présence de 100 μM d'H₂O₂. L'intensité de réduction du BP est mesurée en appliquant un potentiel de +0,04 V vs. Ag/AgCl avec des impulsions de 164 ms et une fréquence de 0,5 Hz pendant 1 minute. La variabilité de la détection d'H₂O₂ par ECL a été étudiée à partir de mesures réalisées sur 82 électrodes différentes en présence de 50 μM d'H₂O₂ et 0,167

mM de luminol. L'intensité de luminescence est mesurée en appliquant un potentiel de +0,6 V vs. Ag/AgCl avec des impulsions de 1 ms et une fréquence de 1 Hz pendant 1 minute.

Le coefficient de variation a ensuite été calculé selon l'équation (16).

$$\text{Coefficient de variation} = \frac{\text{écart type}}{\text{moyenne}} \times 100 \quad (16)$$

VII.5.2. Variabilité de la mesure d'activité GAOx

La variabilité de la mesure d'activité GAOx a été mesurée en calculant le facteur Z. La GAOx a été immobilisée dans la laponite sur les 96 électrodes d'une plaque de criblage électrochimique (selon le protocole décrit dans le paragraphe IV.2.2.b). L'intensité de réduction du BP est mesurée dans du tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M (48 électrodes, contrôle négatif) ou en présence de DHA 6 mM (48 électrodes, contrôle positif) en appliquant potentiel de +0,04 V vs. Ag/AgCl avec des impulsions de 164 ms et une fréquence de 0,5 Hz, pendant 1 minute. Le facteur Z a ensuite été calculé selon l'équation (1).

$$Z = 1 - \frac{3 \times SD(C^+) + 3 \times SD(C^-)}{M(C^+) - M(C^-)} \quad (1)$$

Avec SD correspondant à la déviation standard du contrôle positif (C^+) ou à la déviation standard du contrôle négatif (C^-), $M(C^+)$ à la moyenne des contrôles positifs et $M(C^-)$ à la moyenne des contrôles négatifs.

VII.5.3. Variabilité de la détection du ferrocyanure

La variabilité de la détection du ferrocyanure par IPA a été étudiée à partir de mesures réalisées sur 40 électrodes différentes en présence de 0,1 mM de ferrocyanure. L'intensité du courant est mesurée en appliquant pendant 2 minutes un potentiel de +0,56 V vs. Ag/AgCl, avec des impulsions de 82 ms et une fréquence 1 Hz. Le coefficient de variation a ensuite été calculé à l'aide de l'équation (16).

Le facteur Z a également été calculé pour la détection du ferrocyanure. Des mesures ont été réalisées dans 30 μ l de tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M (40 électrodes, contrôle négatif)

ou dans 30 μ l de ferrocyanure 0,1 mM (40 électrodes, contrôle positif). L'intensité du courant est mesurée en appliquant pendant 2 minutes un potentiel de +0,56 V vs. Ag/AgCl, avec des impulsions de 82 ms et une fréquence 1 Hz. Le facteur Z est calculé à l'aide de l'équation (1).

VII.5.4. Variabilité de la détection d'activité TK

La variabilité de la mesure d'activité TK a été étudiée en calculant le facteur Z à partir de mesures réalisées dans un milieu réactionnel constitué de 13,9 μ g de TK (0,15 U), 1 mM de MgCl₂, 0,1 mM de K₃Fe(CN)₆, 0,01 ou 0,2 mM de TPP et 1 mM de L-ery (40 électrodes par concentration en TPP, contrôle positif). Le contrôle négatif a été mesuré en présence de ce milieu réactionnel dépourvu de TPP (40 électrodes, contrôle négatif). L'intensité du courant est mesurée en appliquant pendant 2 minutes un potentiel de +0,56 V vs. Ag/AgCl, avec des impulsions de 82 ms et une fréquence 1 Hz. Le facteur Z est calculé à l'aide de l'équation (1).

**Chapitre III : Mesures à haut débit d'activité
oxydase par ampérométrie pulsée par
intermittence et électrochimiluminescence**

I. Introduction

Comme nous avons pu le voir dans le premier chapitre, la transcétolase (TK) est une cible thérapeutique particulièrement intéressante pour laquelle il est important de trouver de nouveaux inhibiteurs. Cette enzyme a donc été choisie comme modèle d'étude dans le cadre du développement d'une nouvelle méthode électrochimique pour le criblage d'inhibiteurs d'enzymes. Cette méthode est basée sur l'utilisation de plaques électrochimiques (PCE) constituées de 96 paires d'électrodes sérigraphiées permettant d'assurer le haut débit nécessaire aux méthodes de criblage.

Le premier objectif dans la conception de ce nouveau système est de pouvoir mesurer l'activité de la TK. Au début de cette thèse, l'activité de la TK n'était pas mesurable directement, les substrats ou produits de la TK n'étant pas détectables par électrochimie. Il était donc crucial de pouvoir convertir l'activité de la TK en un signal électrochimique. Comme l'ont précédemment décrit Charmantray et *al.* cette conversion était possible à l'aide d'une enzyme auxiliaire, la galactose oxydase (GAOx).^{166,170} Cette enzyme secondaire catalyse l'oxydation d'alcools primaires en présence d'oxygène, pour former l'aldéhyde correspondant et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est détectable par électrochimie. Initialement, ce produit était oxydé en appliquant un potentiel d'environ +0,6 V *vs.* Ag/AgCl à l'aide d'une électrode de platine.^{166,169} Cependant, l'application d'un potentiel élevé entraîne des interférences électrochimiques. L'utilisation d'un médiateur électrochimique, le Bleu de Prusse, permet de diminuer ce potentiel de travail puisqu'il réduit spécifiquement le peroxyde d'hydrogène à des potentiels proches de 0 V *vs.* Ag/AgCl. Dans ce projet de thèse, l'H₂O₂ sera ainsi détecté à l'aide d'électrodes de carbone dopées au Bleu de Prusse et d'une méthode électrochimique particulière, l'ampérométrie pulsée par intermittence (IPA), caractérisée par l'application d'impulsions de potentiel fixe (*Figure 59*). De plus, afin d'exploiter au mieux les capacités de ce nouveau système haut débit, l'H₂O₂ sera également détecté par électrochimiluminescence (ECL) en mesurant la luminescence électro-générée du luminol.

Ce troisième chapitre portera donc sur l'optimisation de ce premier système rapporteur de l'activité TK, basé sur l'utilisation de réactions couplées (TK-GAOx) à l'aide du système à 96 électrodes, via la détection de l'H₂O₂ produit par ce système bienzymatique (*Figure 59*). La première partie des résultats portera sur l'optimisation des conditions de détection de l'H₂O₂ par IPA et ECL à l'aide de ce système à 96 électrodes. Les performances de ce système seront

comparées à celles d'autres systèmes électrochimiques ou d'électrochimiluminescence et à d'autres méthodes de détection de l' H_2O_2 . Des mesures d'activités de la GAOx en présence de deux substrats sélectionnés seront réalisées avec ces deux méthodes. L'immobilisation de cette enzyme dans différentes matrices sera également étudiée. Cette partie concernant la détection de l' H_2O_2 et la mesure d'activité oxydase a fait l'objet d'un premier article, publié dans le journal ChemElectroChem (présenté en Annexe). Enfin, ce premier système rapporteur sera utilisé pour mesurer l'activité de la TK en solution et immobilisée.

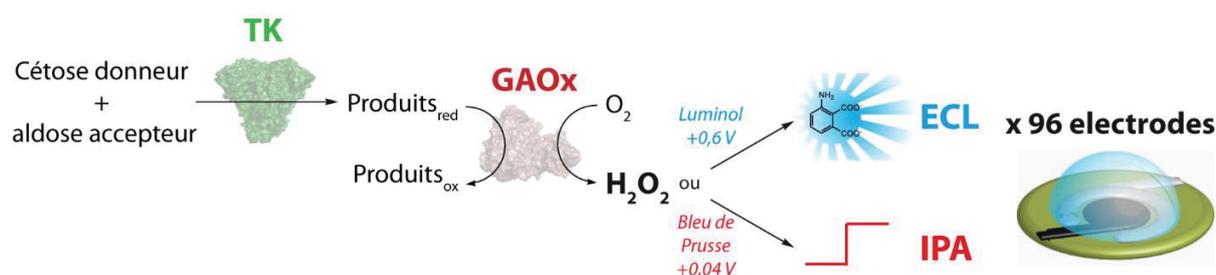


Figure 59. Schéma de principe de la détection d'activité transcétolase (TK) par le système bi-enzymatique TK-GAOx en détectant l' H_2O_2 produit par IPA ou ECL.

II. Détection du peroxyde d'hydrogène

Dans ce premier système rapporteur, les produits de la réaction catalysée par la TK sont oxydés par une enzyme auxiliaire, la galactose oxydase (GAOx).^{166,169,170} Cette réaction secondaire produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) pouvant facilement être détecté par électrochimie à l'aide d'un médiateur inorganique, le Bleu de Prusse (BP), contenu ici dans l'encre de carbone sérigraphiée sur les électrodes. L' H_2O_2 peut également être détecté par électrochimiluminescence (ECL) en présence de luminol. La caractérisation des électrodes sérigraphiées et l'optimisation des conditions de détection de l' H_2O_2 pour chacune de ces méthodes ont été le point de départ de ce projet de thèse.

II.1. Détection du peroxyde d'hydrogène par IPA

II.1.1. Caractérisation des électrodes carbone dopées au Bleu de Prusse

L' H_2O_2 a été détecté par IPA à l'aide d'un médiateur électrochimique, le Bleu de Prusse (BP). Ce complexe ferreux, et en particulier la forme réduite appelée Blanc de Prusse

($\text{Fe}^{\text{II}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$), est capable de réduire spécifiquement l' H_2O_2 (Figure 60). Les ions ferreux (Fe^{2+}) du Blanc de Prusse sont alors oxydés en ions ferriques (Fe^{3+}) pour former le BP. Quatre électrons, sont ainsi nécessaires pour réduire les quatre ions ferriques du BP et réduire deux molécules d' H_2O_2 avec un potentiel d'environ 0 V vs. Ag/AgCl.²¹⁰

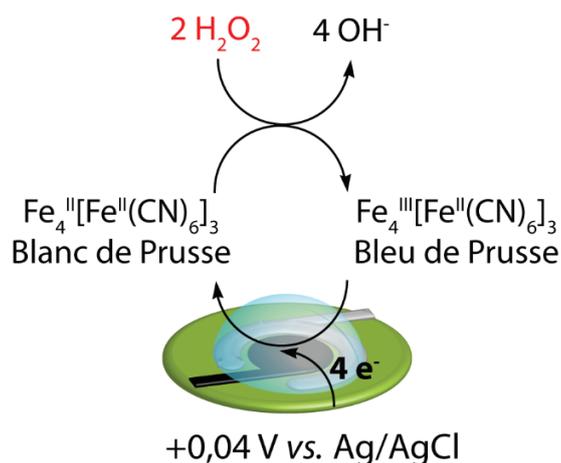


Figure 60. Schéma de principe de la détection de l' H_2O_2 par électrochimie en présence de Bleu de Prusse.

La caractérisation des électrodes carbone-Bleu de Prusse (C-BP) a été réalisée par voltammétrie cyclique dans un tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 (tampon sélectionné comme étant le plus adapté pour les mesures d'activité de la galactose oxydase par Charmantray et *al.*¹⁶⁹ et vérifié dans ce chapitre dans la partie II.1.2.b) supplémenté en KCl 0,1 M, afin d'assurer la conductivité des ions au sein du milieu réactionnel. Dans ces conditions, l'oxydation du Blanc de Prusse (Prussian White, PW) en Bleu de Prusse (BP) a lieu à un potentiel de +0,2 V vs. Ag/AgCl et la réduction du BP en PW à +0,04 V vs. Ag/AgCl (Figure 61A, trait plein). La réponse à l' H_2O_2 a également été vérifiée et une augmentation de l'intensité de réduction du BP a été mesurée en présence de 1 mM d' H_2O_2 (Figure 61A, trait rouge pointillé). La détection de l' H_2O_2 par IPA sera donc réalisée par mesure de la réduction du BP à un potentiel de +0,04 V vs. Ag/AgCl.

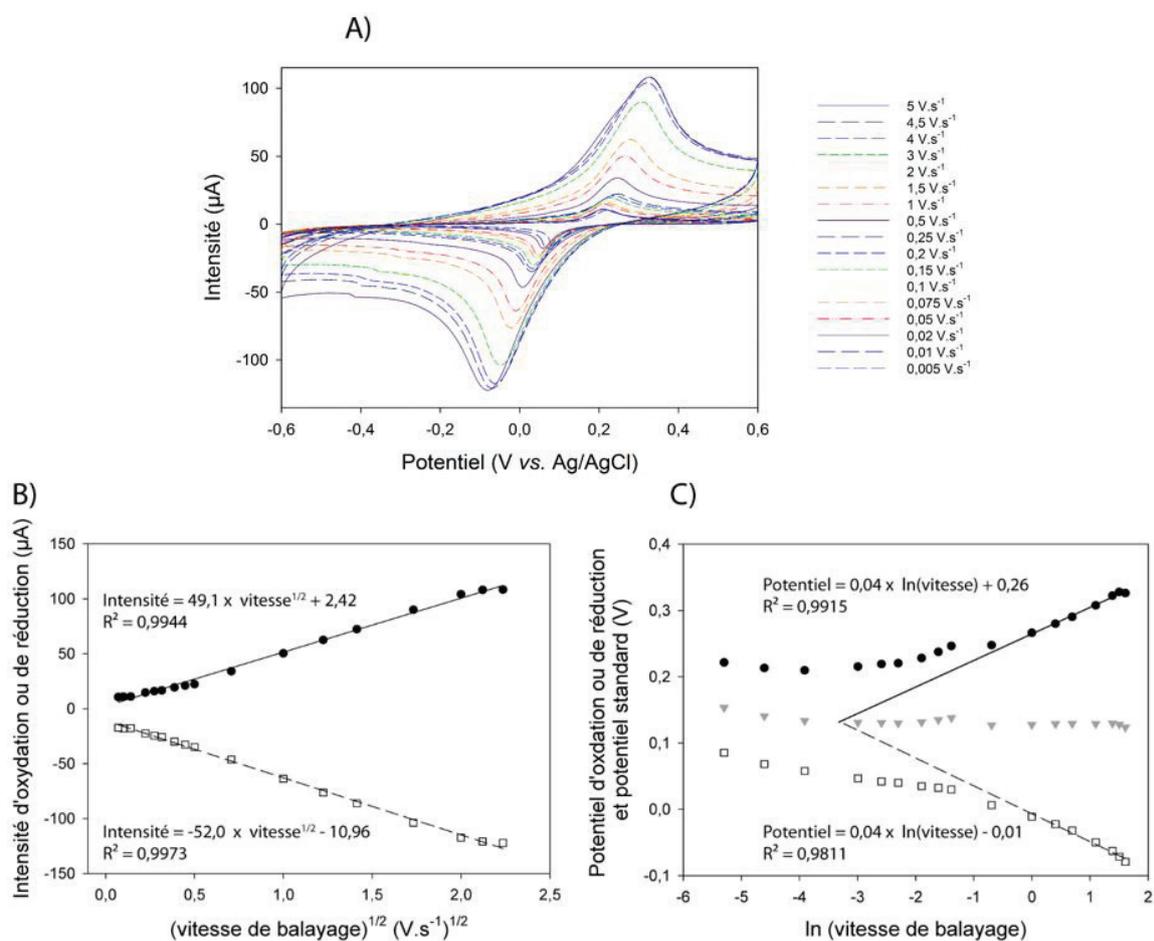


Figure 62. Caractérisation des électrodes C-BP. A) Voltammogrammes obtenus entre -0,6 et +0,6 V vs. Ag/AgCl dans un tampon Hepes 0,05 M (à pH 7,0, KCl 0,1 M) avec des vitesses de balayage comprises entre 0,005 et 5 V.s⁻¹. B) Intensités d'oxydation (ronds noirs) ou de réduction (carrés blancs) en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage. C) Potentiels d'oxydation (ronds noirs), de réduction (carrés blancs) et potentiels standards (triangles gris) en fonction du logarithme népérien de la vitesse de balayage. Les droites correspondent aux régressions linéaires obtenues avec les valeurs élevées de potentiels (1-5 V.s⁻¹).

Les potentiels d'oxydation et de réduction du BP ainsi que les potentiels standards ont été exprimés en fonctions du logarithme de la vitesse de balayage, selon la théorie de Laviron²⁰⁷ (Figure 62C). À faible vitesse de balayage, les potentiels d'oxydation (+0,2 vs. Ag/AgCl) et de réduction (+0,04 V vs. Ag/AgCl) sont indépendants de la vitesse de balayage. Mais à vitesses de balayages élevées ($> 1 \text{ V.s}^{-1}$), une relation linéaire apparaît. Le coefficient de transfert d'électron (α) de 0,5 et la constante de transfert d'électrons apparente (k_h) de 3,4 s⁻¹ ont alors pu être déterminés (déterminés à partir des équations (4) et (4') présentés dans le paragraphe IV.1.2. du chapitre Matériel et méthodes). Cette dernière valeur est environ dix fois plus faible que celle déterminée avec d'autres

systèmes électrochimiques impliquant des particules de BP (de l'ordre de 30 s^{-1} pour un système utilisant des nanoparticules de BP immobilisées sur une électrode de graphite par exemple²¹⁸). Ceci peut s'expliquer par le fait que nos électrodes sont sérigraphiées au laboratoire et que leur qualité est inférieure à celle d'électrodes sérigraphiées commerciales ou à celle d'électrodes de carbone vitreux. De plus, les particules de BP étant piégées dans l'encre de carbone, la vitesse de diffusion des ions potassiques jusqu'à ces particules peut être plus lente par rapport à un système dans lequel les particules sont immobilisées à la surface du carbone.

Cette étape de caractérisation et la détermination des paramètres électrochimiques caractéristiques des électrodes nous ont permis néanmoins de conclure que la qualité des électrodes et donc du processus de sérigraphie sont suffisants pour détecter de façon fiable l' H_2O_2 par IPA.

II.1.2. Optimisation de la détection de l' H_2O_2 par IPA

Les plaques de criblage électrochimiques (PCE), précédemment développées au laboratoire GEMBAS lors de la thèse de S. Abdellaoui²⁰¹, ont été utilisées afin de détecter rapidement (en moins d'une minute) et à haut débit (96 mesures simultanées) du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à l'aide d'électrodes de carbone dopées au Bleu de Prusse. Ces plaques utilisent une méthode électrochimique particulière, l'ampérométrie pulsée par intermittence (IPA) qui consiste à appliquer une série d'impulsions de potentiel fixe séparées par des temps de latence pendant lequel le circuit est ouvert. L'optimisation de la détection de l' H_2O_2 grâce à cette méthode électrochimique particulière était la première étape de ces travaux de thèse.

II.1.2.a. Influence du prétraitement des électrodes

La topologie des électrodes carbone-BP ou encore la quantité de particules de BP peut varier d'une électrode à l'autre ce qui peut entraîner des problèmes de reproductibilité. Cette variabilité peut être réduite à l'aide d'un prétraitement électrochimique réalisé par IPA. Cette étape permettrait d'une part d'éliminer les résidus organiques présents dans les encres de sérigraphie et, d'autre part, d'uniformiser l'état d'oxydation des particules de BP afin d'augmenter la sensibilité de détection de l' H_2O_2 . Ce prétraitement consiste en une oxydation à potentiel fort (appelée sur-oxydation) ou une réduction à potentiel faible (appelée sur-réduction). Afin d'optimiser rapidement cette étape, des gammes de détection d' H_2O_2 (de 0 à $100 \mu\text{M}$) ont été réalisées à la suite de prétraitements différents et les pentes de ces gammes correspondant à la sensibilité (en $\text{mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

²) ont été comparées (Tableau 14). Le type de prétraitement (sur-oxydation ou sur-réduction) a été testé et les paramètres électrochimiques (potentiel, fréquence et largeur des impulsions) ainsi que le temps de prétraitement ont été optimisés dans un tampon MOPS 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M.

Tableau 14. Effet des conditions de prétraitement des électrodes C-BP sur la détection de l' H_2O_2 par IPA. Les sensibilités ont été calculées à partir de gammes de concentration d' H_2O_2 (0-100 μM) mesurées dans les conditions suivantes : -0,2 V vs. Ag/AgCl, Fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 82 ms et temps de mesure 1 minute (tampon MOPS 0,05 M pH 7,0). Les conditions conduisant à la sensibilité la plus élevée sont présentées en vert.

Type de prétraitement	Potentiel (V vs. Ag/AgCl)	Fréquence (Hz)	Largeur des impulsions (ms)	Temps de prétraitement	Sensibilité de détection ($\text{mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$)	R^2
Absence de prétraitement					147	0,7683
Sur-oxydation	+0,4	1	82	1 min	157	0,9171
	-0,4	1	82	1 min	61	0,9801
Sur-réduction	-1	1	82	1 min	51	0,9599
	-0,4	1	82	2 min	76	0,9896
	-0,4	0,5	164	2 min	72	0,9823

Dans un premier temps, la comparaison des coefficients de détermination (R^2) nous montre que le prétraitement des électrodes permet de diminuer la variabilité des résultats (le R^2 passant de 0,76 à des valeurs supérieures à 0,9). Cette étape de prétraitement est donc primordiale pour détecter l' H_2O_2 de manière reproductible. De plus, une sur-oxydation des électrodes entraîne une sensibilité de détection élevée (157 $\text{mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$). Cependant, ce prétraitement conduit à un bruit de fond (correspondant à la valeur basale de l'intensité de réduction du BP) très élevé (de l'ordre de 5000 nA) et une variabilité des signaux plus importante que lors d'un prétraitement par sur-réduction (R^2 de 0,9171 contre 0,9801). Les conditions de cette sur-réduction ont été optimisées (potentiel, fréquence et temps total de prétraitement) et la sensibilité la plus élevée (76 $\text{mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) et la variabilité la plus faible ($\text{R}^2 = 0,9896$) ont été obtenues pour un prétraitement de 2 minutes à un potentiel de -0,4 V vs. Ag/AgCl, appliqué à l'aide d'impulsions de 82 ms et d'une fréquence de 1 Hz.

II.1.2.b. Influence du tampon de mesure

Après avoir prétraité les électrodes dans les conditions décrites dans le paragraphe précédent, différentes conditions de détection de l' H_2O_2 ont été évaluées afin d'augmenter la sensibilité. Plusieurs tampons à 0,05 M et pH 7,0 ont été utilisés en présence ou en absence d'un électrolyte complémentaire (KCl 0,1 M) : Hepes (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique), MOPS (acide 3-morpholino-1-propanesulfonique), phosphate de sodium et phosphate citrate. Le potentiel de réduction du BP dans chaque tampon a été déterminé au préalable par voltammétrie cyclique et des gammes de détection d' H_2O_2 (de 10 à 100 μM) ont été réalisées par IPA. La comparaison des sensibilités de détection de l' H_2O_2 (Tableau 15) permet de vérifier que la présence d'un sel supplémentaire dans le tampon permet de doubler la sensibilité, et ce quel que soit le tampon utilisé. Par ailleurs, l'équation de la Figure 61B montrait que la présence des ions potassiques est essentielle à la réaction d'oxydoréduction du BP.

Tableau 15. Effet de la nature du tampon sur la détection de l' H_2O_2 par IPA. Les sensibilités ont été calculées à partir de gammes de concentrations d' H_2O_2 (0-100 μM) mesurées par IPA (avec une fréquence de 1 Hz, une largeur de impulsions de 41 ms et un temps de mesure 1 minute). Les conditions conduisant à la sensibilité la plus élevée sont présentées en vert.

Tampon (50 mM pH 7,0)	Potentiel de réduction du BP (V vs. Ag/AgCl)	KCl 0,1 M	Sensibilité ($\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)
Hepes	+0,04	-	99
		+	258
MOPS	-0,2	-	76
		+	207
Phosphate	-0,2	-	69
		+	189
Phosphate citrate	-0,2	-	60
		+	184

De plus, le tampon entraînant la sensibilité la plus importante est le tampon Hepes. Ce résultat est en accord avec les travaux de Charmantray et *al.* qui, dans le cadre du développement d'un biocapteur à GAOx, ont déterminé que l'Hepes était le tampon le plus adapté.¹⁷⁰ Ainsi, le tampon Hepes 0,05 M pH 7,0 supplémenté avec 0,1 M de KCl sera utilisé pour la détection d' H_2O_2 et les mesures d'activité oxydases.

II.1.2.c. Influence des paramètres électrochimiques en IPA

Les paramètres électrochimiques appliqués en IPA ont également été optimisés afin d'améliorer la détection de l' H_2O_2 . L'IPA étant caractérisée par l'application d'impulsions de potentiel, la largeur des impulsions ainsi que la fréquence de leur application peuvent être modifiées. Dans un tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 supplémenté de 0,1 M de KCl, l'influence du potentiel de réduction de l' H_2O_2 , de la largeur des impulsions de potentiel et de leur fréquence d'application a été étudié. La sensibilité de détection d'une gamme de concentrations d' H_2O_2 comprise entre 0 et 100 μM a été déterminée dans chacune des conditions (Tableau 16). La sensibilité maximale ($330 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) a été obtenue en appliquant des impulsions de +0,04 V vs. Ag/AgCl de 164 ms avec une fréquence de 0,5 Hz pendant 1 minute.

Tableau 16. Effet des paramètres électrochimiques sur la détection de l' H_2O_2 par IPA. Les sensibilités ont été calculées à partir de gammes de concentrations d' H_2O_2 (10-100 μM) mesurées par IPA (Tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0, KCl 0,1 M). Les conditions conduisant à la sensibilité la plus élevée sont présentées en vert.

Potentiel de mesure (V vs. Ag/AgCl)	Fréquence (Hz)	Largeur des impulsions (ms)	Sensibilité de détection ($\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)
+0,04	1	41	258
+0,04	1	82	280
+0,04	0,5	82	305
+0,04	0,5	164	320
-0,3	1	82	156

II.2. Détection du peroxyde d'hydrogène par ECL

Afin d'exploiter au mieux nos plaques de criblage électrochimique et de pouvoir développer une autre méthode de mesure d'activité enzymatique à haut débit, la détection de l' H_2O_2 a également été réalisée par électrochimiluminescence (ou ECL) en présence de luminol. Ce dernier peut être oxydé en présence d' H_2O_2 et sous l'application d'un potentiel d'environ 0,5 V vs. Ag/AgCl et ainsi émettre des photons détectables à l'aide d'une caméra CCD. Dans ces travaux de thèse, le potentiel a été appliqué par IPA et il est nécessaire de souligner que l'IPA n'a jamais été utilisée comme méthode électrochimique dans le cadre de réactions d'électrochimiluminescence.

II.2.1. Optimisation de la détection de l'H₂O₂ par ECL

Afin de détecter le plus sensiblement possible l'H₂O₂ par ECL, différents paramètres ont été optimisés tels que le prétraitement des électrodes, le milieu de détection ou encore les paramètres électrochimiques associés.

II.2.1.a. Influence du prétraitement des électrodes

Le premier point critique de la détection de l'H₂O₂ par ECL est le prétraitement des électrodes. Les premières mesures d'ECL ont été réalisées sans prétraitement préalable et, dans ces conditions, la limite de détection de l'H₂O₂ est de 1 mM. De précédents travaux ont montré qu'une sur-oxydation des électrodes dans un tampon carbonate de sodium 1 M sous l'application d'un potentiel de +1,2 V vs. Ag/AgCl était nécessaire pour augmenter la sensibilité de détection de l'H₂O₂.²⁰⁸ Ce prétraitement a donc été réalisé par IPA. Le temps de prétraitement, la fréquence et le temps d'application des impulsions de potentiel ont ainsi été optimisés. En présence de 167 μM de luminol, des gammes de détection d'H₂O₂ (à des concentrations comprises entre 1 à 20 μM) ont été réalisées à la suite de ces prétraitements différents et les pentes de ces gammes correspondant à la sensibilité (en UA.μM⁻¹) ont été comparées (*Tableau 17*). La sensibilité la plus élevée (2039 UA.μM⁻¹) a été obtenue après un prétraitement des électrodes de 10 minutes sous l'application d'impulsions de potentiel de +1,2 V vs. Ag/AgCl de 82 ms avec une fréquence de 1 Hz.

Tableau 17. Effet du prétraitement des électrodes sur la détection de l'H₂O₂ par ECL. Les sensibilités ont été calculées à partir de gammes de concentrations d'H₂O₂ (0-20 μM, tampon Véronal 0,03 M à pH 8,5, KCl 0,03 M) mesurées par ECL en présence de luminol à 0,167 mM (+0,5 V vs. Ag/AgCl, Fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 82 ms, temps de mesure 1 minute). Les conditions conduisant à la sensibilité la plus élevée sont présentées en vert.

Potentiel de prétraitement (V vs. Ag/AgCl)	Fréquence (Hz)	Largeur des impulsions (ms)	Temps de mesure	Sensibilité de détection (UA.μM ⁻¹)	R ²
+1,2	0,4	82	10 min	1900	0,924
+1,2	1	82	4 min	1989	0,856
+1,2	1	1	10 min	1921	0,927
+1,2	1	82	10 min	2039	0,944
+1,2	10	1	4 min	1990	0,988
	Sans prétraitement			0	/

II.2.1.b. Influence du tampon de mesure

De précédentes études ont montré que les réactions d'ECL étaient plus efficaces à des pH basiques (entre 8,5 et 10) et que la nature du tampon pouvait modifier le signal.^{219,220} C'est pourquoi, les réactions d'ECL ont été réalisées dans différents tampons (Hepes, MOPS, Véronal (diéthylmalonylurée sodée), phosphate et phosphate citrate) à différents pH (7,0 et 8,5). Les sensibilités de détection de l' H_2O_2 entre 0 et 20 μM ont été déterminées dans chacun de ces tampons (*Tableau 18*) sous l'application d'un potentiel de +0,5 V vs. Ag/AgCl.

Tableau 18. Effet de la nature et du pH du tampon sur la détection de l' H_2O_2 par ECL. Les sensibilités ont été calculées à partir de gammes de concentrations d' H_2O_2 (0-20 μM), mesurées par ECL en présence de luminol à 0,167 mM (+0,5 V vs. Ag/AgCl, Fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 1 ms, temps 1 minute). Les conditions conduisant à la sensibilité la plus élevée sont présentées en vert. ND = non déterminé.

Tampon	pH	Sensibilité de détection (UA. μM^{-1})	R ²
Hepes 0,05 M, KCl 0,1 M	7,0	100	0,9661
	8,5	1546	0,9865
MOPS 0,05 M	7,0	ND	ND
Véronal 0,03 M, KCl 0,03 M	8,5	2600	0,9925
Phosphate 0,1 M	7,0	141	0,9949
Phosphate citrate 0,1 M	7,0	174	0,9995

Dans un premier temps, nous avons pu constater que le tampon MOPS entraînait l'oxydation du luminol, provoquant un signal luminescent en absence d' H_2O_2 , il n'est donc pas utilisable dans ces conditions. Dans un second temps, la sensibilité de détection dans les tampons à pH 7,0 est plus faible (100 UA. μM^{-1} pour le tampon Hepes, 141 UA. μM^{-1} pour le tampon phosphate et 174 UA. μM^{-1} pour le tampon phosphate citrate) que celles obtenues dans les tampons à pH 8,5 (1546 UA. μM^{-1} pour l'Hepes et 2600 UA. μM^{-1} pour le tampon Véronal). Les mesures d' H_2O_2 par ECL seront donc réalisées dans un tampon Véronal 0,03 M pH 8,5 KCl 0,03 M. Ce tampon a déjà été utilisé pour le développement de biocapteurs à oxydases utilisant l'ECL.^{208,219,221}

II.2.1.c. Influence des paramètres électrochimiques

Les paramètres électrochimiques tels que le potentiel d'oxydation, la fréquence et le temps des impulsions utilisés pour déclencher la réaction d'ECL ont également été optimisés (*Tableau*

19). Tout d'abord, nous pouvons constater que des impulsions courtes (1 ms avec une fréquence de 1 Hz) sont préférables en ECL (2463 UA. μM^{-1} contre 1957 UA. μM^{-1} pour des impulsions de 164 ms). De plus, l'augmentation du potentiel d'oxydation à +0,6 V vs. Ag/AgCl a permis de diminuer le bruit de fond et d'augmenter la sensibilité de détection (à 2600 UA. μM^{-1}). Les conditions sélectionnées pour détecter l' H_2O_2 sont donc l'application pendant 1 minute d'un potentiel de +0,6 V vs. Ag/AgCl avec des impulsions de 1 ms et une fréquence de 1 Hz.

Tableau 19. Effet des paramètres électrochimiques sur la détection de l' H_2O_2 par ECL. Les sensibilités ont été calculées à partir de gammes de concentrations d' H_2O_2 (1-10 μM , tampon Véronal 0,03 M à pH 8,5 KCl 0,03 M), mesurées par ECL en présence de luminol à 0,167 mM. Les conditions conduisant à la sensibilité la plus élevée sont présentées en vert.

Potentiel de mesure (V vs. Ag/AgCl)	Fréquence (Hz)	Largeur des impulsions (ms)	Temps de mesure	Sensibilité de détection (UA. μM^{-1})	R ²
+0,5	0,5	164	1 min	1957	0,9740
+0,5	1	82	1 min	2039	0,9879
+0,5	1	1	1 min	2463	0,9925
+0,6	1	1	1 min	2600	0,9932

Que ce soit pour l'IPA ou l'ECL, ces étapes d'optimisation sont cruciales pour le développement d'une nouvelle méthode de mesure d'activité oxydases. Cependant, elles sont longues et fastidieuses puisque de nombreux paramètres doivent être optimisés. Le format 96 de ces plaques de criblage électrochimique permet de cribler de nombreuses conditions différentes en un temps réduit : en effet, douze conditions de prétraitement ou de mesure peuvent être testées en seulement 1 minute. Pour chaque méthode, l'optimisation a nécessité l'utilisation d'environ 2 plaques d'électrodes et pourrait être réalisée en seulement une demi-journée, ce qui était impossible avec un autre appareil.

II.3. Comparaison IPA/ECL

II.3.1. Caractéristiques de la détection de l' H_2O_2

La détection de l' H_2O_2 par IPA et ECL étant optimisée, des courbes de calibration ont été réalisées avec chaque méthode en présence d'une large gamme de concentrations d' H_2O_2 (1-5000 μM en IPA et 0-1000 μM en ECL) (Figure 63A et Figure 63B). Ces courbes nous permettent de déterminer la limite de détection (correspondant à la concentration en H_2O_2 pour laquelle le rapport

du signal en présence sur le signal en absence d' H_2O_2 est supérieur à 3), la gamme linéaire et la sensibilité de détection de l' H_2O_2 pour chaque méthode (Tableau 20).

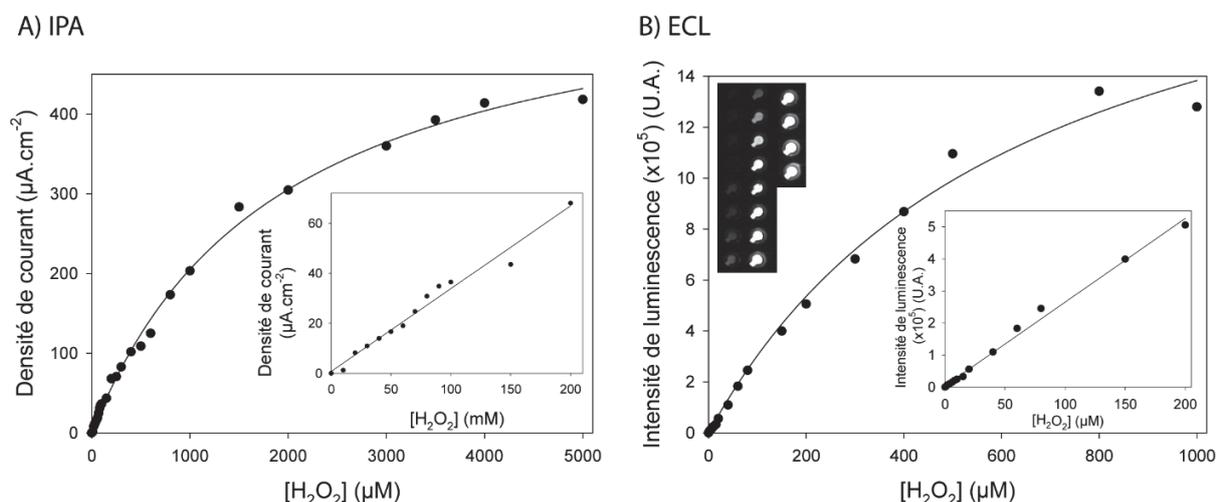


Figure 63. Caractéristiques de la détection de l' H_2O_2 par IPA et ECL à l'aide des PCE. A) Mesure de la densité de courant à +0,04 V vs. Ag/AgCl (fréquence 0,5 Hz, largeur des impulsions 164 ms, temps de mesure 1 minute) en fonction de la concentration en H_2O_2 (0-5000 μM , tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0, KCl 0,1 M). Un agrandissement de la partie linéaire de la courbe est fourni. B) Mesure de l'intensité de luminescence sous l'application d'un potentiel de +0,6 V vs. Ag/AgCl (fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 1 ms, temps de mesure 1 minute, acquisition de l'image 1 min) en fonction de la concentration en H_2O_2 (0-1000 μM , tampon Véronal 0,03 M à pH 8,5 KCl 0,03 M). Un agrandissement de la partie linéaire de la courbe est fourni à droite et le cliché de la gamme d' H_2O_2 obtenue par la caméra CCD à gauche.

Tableau 20. Performances du système 96 électrodes pour la détection d' H_2O_2 par IPA ou ECL

Méthode	Potentiel (V vs. Ag/AgCl)	Limite de détection	Sensibilité	Gamme linéaire
IPA	+0,04	10 μM	330 $\text{mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$	5 – 200 μM
ECL	+0,6	1 μM	2600 $\text{UA}.\mu\text{M}^{-1}$	1 – 200 μM

Globalement, les caractéristiques de détection de l' H_2O_2 par IPA et ECL sont proches, les limites de détection étant respectivement de 10 et 1 μM et les gammes linéaires de 5 à 200 μM et 1 à 200 μM . Dans le cadre de la mesure d'activité oxydase *via* la détection de l' H_2O_2 , l'utilisation d'une méthode plutôt qu'une autre va reposer d'une part sur le pH optimal de l'enzyme. En ECL, un pH minimal de 8,5 est nécessaire pour avoir une sensibilité de détection élevée. Des mesures d'activités d'une enzyme ayant un pH optimal acide seront impossibles. D'autre part, le choix de la méthode dépendra de l'électro-sensibilité des différents substrats ou produits à l'oxydation ou à la réduction

(à +0,6 V vs. Ag/AgCl en ECL et +0,04 V vs. Ag/AgCl en IPA) afin d'éviter un bruit de fond important.

II.3.2. Variabilité inter-électrodes

Chaque test haut débit présente une variabilité du signal mesuré entre chaque puit qu'il est important de prendre en compte. Dans le cas des PCE, cette variabilité peut provenir d'une différence d'épaisseur de l'électrode lors du processus de sérigraphie, d'une différence de quantité de particules de Bleu de Prusse présente dans l'encre (pour la détection d' H_2O_2 par IPA) ou encore d'erreurs commises par l'expérimentateur. Afin de prendre en compte tous ces paramètres et ainsi de s'assurer de la robustesse de ce nouveau test haut débit, un coefficient de variation a été calculé à partir de mesures réalisées sur 73 électrodes différentes en présence de $100\ \mu\text{M}$ d' H_2O_2 en IPA et sur 82 électrodes en présence de $50\ \mu\text{M}$ d' H_2O_2 par ECL (Figure 64). Le coefficient de variation est de 19% pour la détection d' H_2O_2 par IPA et seulement 1% par ECL.

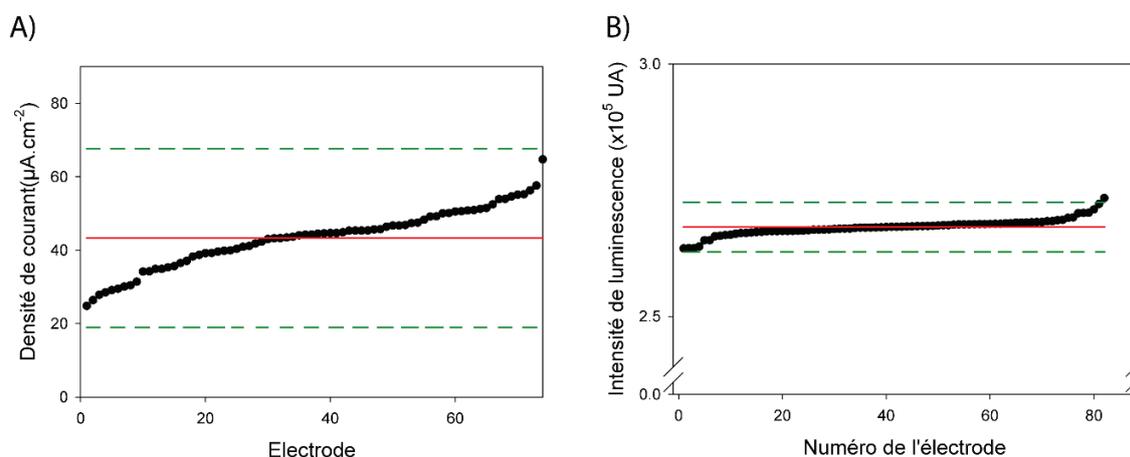


Figure 64. Mesure de la variabilité de détection de l' H_2O_2 par IPA (A) ou ECL (B). A) La densité de courant a été mesurée sur 73 électrodes en présence d' H_2O_2 à $100\ \mu\text{M}$ (tampon Hepes $0,05\ \text{M}$ à pH 7,0 KCl $0,1\ \text{M}$) et sous l'application d'un potentiel de +0,04 V vs. Ag/AgCl (Fréquence $0,05\ \text{Hz}$, largeur des impulsions $164\ \text{ms}$, temps de mesure 1 minute). B) L'intensité de luminescence a été mesurée sur 82 électrodes, en présence d' H_2O_2 à $50\ \mu\text{M}$ (tampon Véronal $0,03\ \text{M}$ à pH 8,5 KCl $0,03\ \text{M}$) et de luminol à $0,167\ \text{mM}$ et sous l'application d'un potentiel de +0,6 V vs. Ag/AgCl (Fréquence $1\ \text{Hz}$, largeur de impulsions $1\ \text{ms}$, temps de mesure 1 min, temps d'acquisition de l'image 1 min). Une rupture d'échelle entre 0 et $2,5 \cdot 10^5\ \text{UA}$ a été réalisée afin de visualiser plus clairement le graphe. Les lignes rouges correspondent à la moyenne des signaux et les lignes vertes en pointillés à 3 fois l'écart type (voir paragraphe III.6.)

En IPA, l'hypothèse la plus probable concernant cette variabilité provient de la différence de quantité de particules de bleu de Prusse entre les différentes électrodes ainsi que de leur état d'oxydation. Si la quantité de particules est plus faible dans une électrode, la quantité de H_2O_2 réduite par ces particules sera plus faible également et l'intensité de courant mesurée lors de la réduction du BP le sera aussi. Il faudra donc plus de cycles de réduction du BP pour détecter la même quantité de H_2O_2 . Concernant le degré d'oxydation, si les particules sont sous la forme oxydée, elles ne peuvent pas réduire l' H_2O_2 , d'où l'intérêt de réaliser une sur-réduction au préalable afin d'essayer d'uniformiser l'état d'oxydation des particules de BP. En ECL, ce coefficient est beaucoup plus faible (1%). Ceci peut s'expliquer par le fait que le paramètre mesuré n'est plus un potentiel mais une intensité de luminescence et, dans ce cas, le rapport signal/bruit est beaucoup plus faible qu'avec la méthode électrochimique.

L'ECL est donc une méthode moins variable et plus sensible que l'IPA pour la détection de l' H_2O_2 . Cependant, elle nécessite l'utilisation de tampon particulier (Véronal) à des pH basiques (minimum 8,5) pour fonctionner. Dans le cadre de mesures d'activités enzymatiques, la nature et le pH de ce tampon ne sont pas forcément adaptés à toutes les enzymes. C'est pourquoi les avantages et inconvénients de chacune des méthodes doivent être pris en compte afin de choisir celle qui sera la plus adaptée pour mesurer l'activité de l'enzyme souhaitée.

II.4. Comparaison avec des systèmes ou des méthodes déjà existantes

II.4.1. Autres systèmes électrochimiques ou basés sur l'ECL

Afin de montrer l'intérêt de notre nouveau système électrochimique, il est important de pouvoir comparer ses performances avec celles d'autres systèmes déjà décrits. Le *Tableau 21* compare les caractéristiques de détection de l' H_2O_2 (sensibilité, limite de détection, gamme linéaire) des PCE avec d'autres systèmes électrochimiques et le *Tableau 22* avec d'autres systèmes basés sur l'ECL.

En électrochimie, l'utilisation des PCE permet d'atteindre une sensibilité ($330 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) comparable aux autres systèmes électrochimiques (dont les sensibilités sont comprises entre 60 et $15300 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) et une gamme linéaire relativement large (5-200 μM). Cependant, la limite de détection est jusqu'à 500 fois plus élevée que certains systèmes (10 μM contre 0,02 μM pour un système utilisant des nanotubes de carbone²²²). Cette limite de détection élevée peut s'expliquer par le fait que le système électrochimique utilisé n'est pas agité, le milieu réactionnel étant en

goutte et nécessitant la diffusion de l'analyte à détecter jusqu'à l'électrode. De plus, dans ces systèmes électrochimiques, la conductivité intrinsèque du carbone est supérieure à celle du carbone sérigraphié, en particulier lors de l'utilisation de graphène.

Tableau 21. Caractéristiques électrochimiques de différents systèmes pour la détection d' H_2O_2 à l'aide de BP. Le système développé dans cette thèse apparaît en bleu.

Electrode et configuration	Potentiel (V vs. Ag/AgCl)	Gamme linéaire (μ M)	Limite de détection (μ M)	Sensibilité ($mA.M^{-1}.cm^{-2}$)	Réf
Carbone vitreux + graphène/chitosan/BP	+0,05	10-400	0,213	816	223
Carbone vitreux + graphène/BP électrodéposé	0	10-1400	3	530	224
Carbone sérigraphié + particules de BP	0	1-100	0,4	137	225
Carbone vitreux + oxyde de graphène/film de BP	+0,055	5-1200	0,122	409	226
Carbone sérigraphié + nanotubes de carbone + BP	+0,148	0,5-30	0,0194	15300	222
Carbone vitreux + BP électrodéposé	+0,05	0,01-100000	0,1	60	227
Carbone sérigraphié + BP électrodéposé + film de poly-(O-phénylènediamine)	-0,2	0,006-0,16	1,5	127	170
Carbone sérigraphié + particules de BP	+0,04	5-200	10	330	228

De plus, en prenant en compte le temps nécessaire pour réaliser 96 mesures pour chacun des systèmes, l'intérêt de notre système apparaît très clairement : en effet, les principaux systèmes permettant la détection de l' H_2O_2 à l'aide du BP n'utilisent qu'une seule électrode et les mesures sont réalisées par chronoampérométrie. L'intensité du courant est donc mesurée après des ajouts simultanés d' H_2O_2 . Il faut en moyenne 25 à 50 secondes par ajout pour avoir un signal stable et les mesures ne pouvant être réalisées qu'individuellement, 96 mesures électrochimiques prendraient en moyenne 40 à 80 minutes. Avec notre système électrochimique, seulement 1 minute est nécessaire pour détecter l' H_2O_2 sur les 96 électrodes, ce qui réduit considérablement le temps d'analyse. Les PCE possèdent donc des performances de détection de l' H_2O_2 comparables aux systèmes déjà existants et permettent surtout de mesurer rapidement un grand nombre d'échantillons

simultanément. Cet avantage est important aussi bien pour les étapes d'optimisation que pour le criblage d'inhibiteurs, l'objectif de ces travaux.

En ce qui concerne l'ECL, la quantification de la luminescence est différente d'un système à l'autre, les sensibilités de détection sont donc difficilement comparables. Les limites de détection et les gammes linéaires pour la détection de l' H_2O_2 du système PCE ont été comparées avec d'autres systèmes ECL utilisant le luminol comme luminophore (*Tableau 22*).

Tableau 22. Caractéristiques de différents systèmes associées à la détection d' H_2O_2 par ECL. Le système développé dans cette thèse apparait en bleu

Electrode	Gamme linéaire (μM)	Limite de détection (μM)	Concentration en luminol (μM)	Réf
Carbone vitreux	5 – 300	1,67	300	229
Carbone vitreux	10 – 500	4,3	50	230
Carbone vitreux	1 – 1000	1	50	193
Carbone sérigraphié	0,025 – 150	0,025	44	219
Carbone sérigraphié	1-200	1	167	228

Les performances des PCE sont proches de celles décrites dans d'autres systèmes et la limite de détection ($1 \mu\text{M}$) est plus que convenable (comprise entre $0,025$ et $4,3 \mu\text{M}$ pour les autres systèmes). Tout comme l'IPA, ce système présente l'avantage de pouvoir réaliser simultanément 96 mesures d'ECL afin d'obtenir un cliché comme décrit dans la *Figure 65*.

Ce type de résultat était jusqu'à présent inaccessible puisque les systèmes ECL à haut débit décrits dans la littérature réalisaient, dans un premier temps, la réaction dans une plaque 96 puits. Dans un second temps, un système de type fluïdique venait aspirer le contenu du puit pour le mener vers la cellule électrochimique et le système de détection de la luminescence. La mesure d'ECL était donc réalisée sur un puit à la fois. Ce nouveau système haut débit est donc particulièrement intéressant, notamment dans le cadre de criblage d'inhibiteurs.

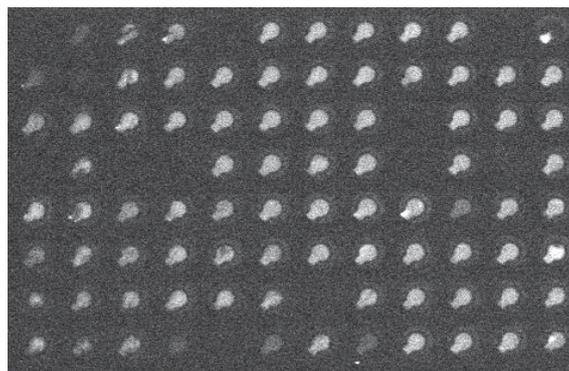


Figure 65. Photographie réalisée à l'aide d'une caméra CCD représentant la luminescence électro-générée sur une plaque entière d'électrode en présence d' H_2O_2 50 μM et de luminol à 0,167 mM (tampon Véronal 0,03 M à pH 8,5 KCl 0,03 M, potentiel +0,6 V vs. Ag/AgCl, fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 1 ms, temps de mesure 1 min et temps d'acquisition de l'image 1 min).

II.4.2. Autres méthodes permettant la détection de l' H_2O_2

Les méthodes permettant la détection de l' H_2O_2 peuvent être ampérométriques ou d'électrochimiluminescence comme nous venons de le voir mais elles peuvent être également spectroscopiques (dans l'UV-visible ou de fluorescence) ou encore de chimiluminescence. Le *Tableau 23* compare les caractéristiques (limite de détection et gamme linéaire) associés à la détection de l' H_2O_2 des PCE par IPA et ECL avec d'autres méthodes décrites dans la littérature. Les tests spectrophotométriques ou fluorimétriques permettant la détection de l' H_2O_2 font principalement intervenir une peroxydase (telle que la peroxydase de Raifort (HRP) ou la peroxydase de courgette) comme enzyme auxiliaire avec un substrat fluorescent (tel que l'Amplex Red®) ou chromogénique (tel que l'ABTS ou le guaiacol). L'oxydation de ce substrat par la peroxydase conduit à la formation d'un produit colorimétrique ou fluorescent. De nombreux kits commerciaux sont basés sur ces méthodes de détection afin de détecter l' H_2O_2 à haut débit dans le cadre de mesure d'activité enzymatique ou encore de tests en présence de cellules entières nécessitant la détection d'espèces réactives de l'oxygène (tel que l' H_2O_2). Ces méthodes sont globalement très sensibles car elles permettent la détection de quelques dizaines de nM d' H_2O_2 mais peuvent prendre du temps notamment lors de l'utilisation de kits commerciaux pour lesquels un temps d'incubation d'une trentaine de minute est nécessaire.

Tableau 23. Comparaison des caractéristiques de détection de l'H₂O₂ par IPA ou ECL à l'aide des PCE (apparaissant en bleu) avec d'autres méthodes. Les données obtenues de fiches techniques de kits commerciaux sont notés * dans la colonne référence. HRP = peroxydase de Raifort.

Méthode	Réactif	Limite de détection (μM)	Gamme linéaire (μM)	Réf
Spectrophotométrie	HRP + ABTS	0,06	0,06-2	231
	Peroxydase de courgette + guaiacol	2,10	16-660	232
	HRP + substrat chromogénique (kit Enzo® Life Science)	1,50	3,1-100	*
Fluorimétrie	HRP + Amplex Red (Kit Invitrogen)	0,05	0,05-5	*
	Réactif fluorescent à groupement phosphine	37	37-1470	233
Chimiluminescence	HRP + luminol + nanoparticules d'or	100	100-1000000	234
	Luminol + 1,3-dichloro-5,5-diméthylhydantoin	5	5-100	235
	Hémoglobine + substrat chimiluminescent (kit Enzo® Life Science)	0,07	0,072-74	*
IPA	Carbone + particules de Bleu de Prusse	10	5-200	228
ECL	Carbone + luminol	1	1-200	228

Les méthodes de chimiluminescence utilisant luminol comme luminophore et des particules métalliques ou des complexes ferreux comme catalyseurs ont également été massivement utilisées pour la détection de l'H₂O₂.²³⁶ Elles sont également sensibles et certaines permettent de détecter une gamme très large de concentration d'H₂O₂ à l'image d'un système développé par Zhang et *al.* dont la gamme linéaire est comprise entre 100 μM et 100 mM d'H₂O₂.²³⁴ En plus d'avoir des performances largement comparables avec les autres méthodes existantes, le principal avantage du système développé dans cette thèse repose sur le fait qu'aucune enzyme auxiliaire n'est nécessaire, ce qui réduit la possibilité d'interférences ou de faux positifs dans le cadre de criblage d'inhibiteurs, et élimine un éventuel temps d'incubation nécessaire.

De plus, dans les méthodes spectrophotométriques et de fluorescence, malgré le format 96, un seul détecteur est présent dans l'appareillage et doit parcourir l'intégralité de la plaque, ce qui augmente le temps de mesure. Ici, seulement 1 minute est nécessaire pour mesurer l'intensité de réduction du BP ou la luminescence du luminol sur les 96 puits. Le balayage de potentiel sur la plaque est donc un avantage considérable qui a permis une optimisation rapide des conditions de détection de l'H₂O₂ par deux méthodes différentes.

III. Mesure de l'activité GAOx par IPA et ECL

Une fois la détection de l' H_2O_2 par IPA et ECL optimisée et comparée à des systèmes existants, ces méthodes ont été utilisées pour mesurer l'activité de la galactose oxydase de *Dactylium dendroides* (GAOx), enzyme auxiliaire dans le cadre de la mesure d'activité transcétolase. La GAOx (EC 1.1.3.9) est une oxydoréductase constituée d'une unité protéique de 68 kDa avec 639 acides aminés structurés en trois domaines. Elle comporte un site actif contenant un atome de Cu(II) qui catalyse une réaction de transfert à deux électrons. Cette enzyme catalyse l'oxydation du galactose et d'un grand nombre d'alcools primaires en aldéhydes correspondants. Cette réaction est couplée à la réduction de l'oxygène en H_2O_2 qui sera, dans notre cas, détecté en mesurant l'intensité de réduction du BP par IPA ou la luminescence du luminol par ECL. L'activité de la GAOx a été étudiée en présence de deux substrats, le L-erythrose (L-ery) qui est un produit naturel de la TK et la dihydroxyacétone (DHA), produit non naturel mais décrit comme étant le meilleur substrat de la GAOx.²³⁷⁻²³⁹ Ces substrats sont oxydés par la GAOx en aldéhyde et en présence d'oxygène permettant la formation d' H_2O_2 (Figure 66A et Figure 66B).

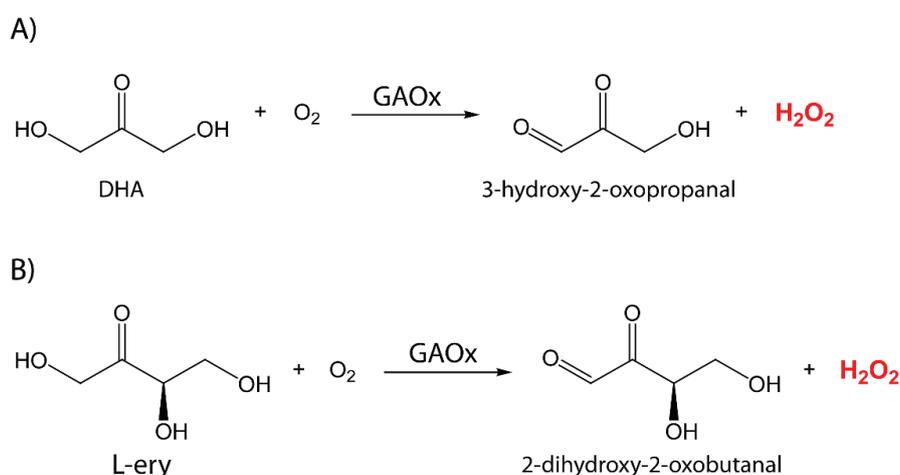


Figure 66. Réactions catalysées par la GAOx en présence de A) dihydroxyacétone (DHA) ou B) L-erythrose (L-ery) comme substrat.

III.1. Temps de réaction enzymatique

Afin d'obtenir un signal exploitable et représentatif de l'activité de la GAOx, il est nécessaire de laisser le temps à l'enzyme de réagir avec ses substrats afin d'accumuler une quantité suffisante d' H_2O_2 , et pouvoir le détecter par chacune des méthodes. Pour cela, la densité de courant

ou la luminescence du luminol ont été mesurés en présence de 0 à 6 mM de DHA ou 0 à 14 mM de L-ery après différents temps de réaction. Les signaux obtenus ont été exprimés en fonction de la concentration en substrat (*Figure 67A*). Ces courbes ont une allure hyperbolique, rappelant les courbes de Michaelis-Menten, et un modèle mathématique hyperbolique a été utilisé pour les ajuster. Ce modèle permet de déterminer certains paramètres tels que le signal maximal (en densité de courant ou intensité de luminescence) pouvant être apparenté à la vitesse maximale d'un système michaelien ou encore la valeur de $K_{0,5}$, correspondant à la concentration en substrat nécessaire pour atteindre la moitié du signal maximal, pouvant être apparenté à la constante de Michaelis-Menten (K_M).

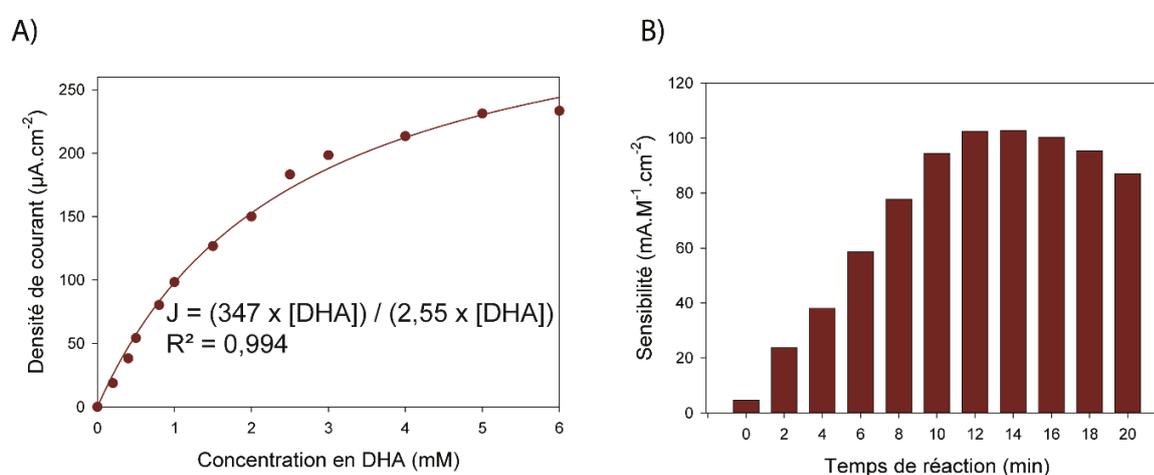


Figure 67. Détermination du temps de réaction optimale par IPA. A) Mesure de la densité de courant en fonction de la concentration en DHA (0-6 mM) en présence de 100 ng de GAOx et après 10 minutes de réaction (Tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M, +0,04 V vs. Ag/AgCl, fréquence 0,5 Hz, largeur des impulsions 164 ms et temps de mesure 1 min). La courbe en trait plein correspond à la courbe obtenue après ajustement avec un modèle hyperbolique (l'équation est sur la courbe). B) Sensibilité de détection de la DHA issue du graphe A) en fonction du temps de réaction enzymatique.

Afin de déterminer le temps de réaction optimal, la sensibilité de détection des substrats a été calculée et comparée pour chaque temps de réaction enzymatique (compris entre 2 et 20 minutes) (*Figure 67B*). La sensibilité augmente avec le temps de réaction jusqu'à une dizaine de minutes pour atteindre environ $100 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$. La réaction entre la GAOx et ses substrats aura donc lieu pendant 10 minutes, c'est-à-dire 9 minutes de réaction et 1 minute de mesure. La même expérience a été réalisée par ECL en présence de chacun des substrats et le même temps de réaction (10 minutes) est nécessaire pour atteindre une sensibilité de détection maximale.

Pour chacune des méthodes, la concentration en H₂O₂ produite après 10 minutes de réaction a été déterminée en utilisant les courbes de calibration précédemment réalisées, et le pourcentage de conversion du substrat en H₂O₂ a été calculé. Pour les deux méthodes et les deux substrats, ce taux de conversion est compris entre 15 et 20%. Si on souhaite être en vitesse initiale, il est nécessaire que ce taux soit inférieur à 10%. Cependant, les signaux électrochimiques ou de luminescence obtenus dans ces conditions de vitesse initiale sont faibles. Un compromis entre un signal significatif et un taux de conversion acceptable a donc été choisi en sélectionnant ce temps de réaction enzymatique. Dans ces conditions, les sensibilités, les signaux maximaux et les valeurs de K_{0,5} ont été déterminés pour chaque substrat et chaque méthode (*Tableau 24*).

Tableau 24. Performances de détection de la DHA et du L-ery en présence de GAOx par IPA et ECL après 10 minutes de réaction.

Méthode	Substrat	Sensibilité	Signal maximal	K _{0,5} (mM)
IPA	DHA	99 mA.M ⁻¹ .cm ⁻²	347 μA.cm ⁻²	2,54
	L-ery	29 mA.M ⁻¹ .cm ⁻²	305 μA.cm ⁻²	5,91
ECL	DHA	2,44.10 ⁵ UA.mM ⁻¹	5,22.10 ⁵ UA	1,22
	L-ery	0,11.10 ⁵ UA.mM ⁻¹	1,63.10 ⁵ UA	9,76

Ces premiers résultats montrent, que ce soit en IPA ou en ECL, que les sensibilités de détection de la DHA (99 mA.M⁻¹.cm⁻² par IPA et 2,44.10⁵ UA.mM⁻¹ par ECL) sont plus élevées que celles du L-ery (29 mA.M⁻¹.cm⁻² par IPA et 0,11.10⁵ UA.mM⁻¹ par ECL). De plus, les valeurs de K_{0,5} déterminés en présence de DHA (2,54 mM par IPA et 1,22 mM par ECL) sont plus faibles que celles déterminées en présence de L-ery (5,91 mM par IPA et 9,76 mM par ECL). Une plus faible concentration en DHA est donc nécessaire pour atteindre la moitié du signal maximal. Ceci montre que la DHA est un meilleur substrat de la GAOx que le L-ery et confirme les résultats trouvés dans la littérature²³⁷⁻²³⁹ : selon Schumacher et *al.*, l'activité de la GAOx est multipliée par 40 si la DHA est utilisée comme substrat (par rapport à une mesure d'activité en présence de galactose).²³⁷ Les valeurs de K_{0,5} déterminés par IPA et ECL en présence de L-ery sont assez différentes et celle déterminée par ECL est plus élevée : ceci peut s'expliquer par le fait que le L-ery accroît de manière significative la viscosité du milieu et perturbe la diffusion des espèces en solution et donc l'homogénéité de l'émission de lumière (*Figure 68*). Le signal étant moins homogène, l'intensité de luminescence est plus faible et la valeur de K_{0,5} est ainsi plus élevée.

Les travaux réalisés en aval de ces expériences ont cherché à améliorer cette sensibilité en optimisant la quantité d'enzyme utilisée ou en immobilisant la GAOx à la surface des électrodes.

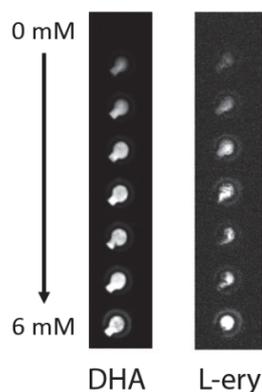


Figure 68. Différence d'homogénéité de signal observée en ECL en utilisant la DHA ou le L-ery. Photographie obtenue par une caméra CCD après une réaction d'ECL en présence de GAOx en solution (245 ng), luminol à 0,167 mM et 0 à 6 mM de DHA ou L-ery comme substrat (Tampon Véronal 0,03 M à pH 8,5 KCl 0,03 M).

III.2. Optimisation de la quantité de GAOx

Afin de déterminer la quantité de GAOx optimale pour chaque méthode, l'intensité de réduction du BP ou l'intensité de luminescence ont été mesurées en présence d'une concentration saturante en substrat (DHA 6 mM et L-ery 15 mM) et de 0 à 3700 ng de GAOx (Figure 69A et Figure 69B).

Tout d'abord, pour les deux méthodes, nous constatons une augmentation du signal électrochimique ou luminescent jusqu'à un maximum ($400 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour l'IPA et $7\cdot 10^5$ AU pour l'ECL) puis une diminution du signal lorsqu'une trop quantité de GAOx trop importante est utilisée (> 600 ng). Ceci peut être dû à l'agrégation des protéines à la surface de l'électrode, ce qui peut d'une part altérer leur réactivité et d'autre part limiter l'accessibilité des produits à l'électrode. De plus, nous avons vu dans le paragraphe II.3.1., que la densité de courant était proportionnelle à la concentration en H_2O_2 jusqu'à environ $300 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ et que l'intensité de luminescence était proportionnelle à la concentration en H_2O_2 jusqu'à environ $5\cdot 10^{-5}$ UA. Il est donc nécessaire de prendre en compte ces domaines de proportionnalité afin de sélectionner la quantité optimale de GAOx pour chaque méthode et chaque substrat (DHA et L-ery) (Tableau 25).

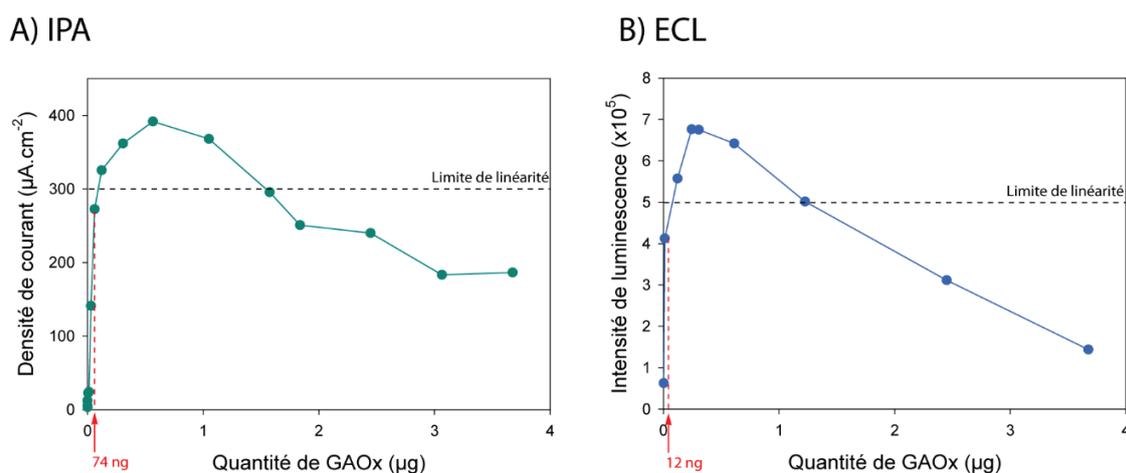


Figure 69. Détermination de la quantité optimale de GAOx par IPA et ECL. Densité de courant à +0,04 V vs. Ag/AgCl (A) et intensité de luminescence en présence de 0,167 mM de luminol (B) mesurées en présence de DHA 6 mM et différentes quantités de GAOx (0,6-3700 ng). La limite de linéarité de chaque méthode apparaît en pointillés noirs et la quantité optimale en pointillés rouges.

Tableau 25. Quantité optimale de GAOx utilisée pour chaque méthode (IPA et ECL) et en présence de chaque substrat (DHA et L-ery).

Méthode	Substrat	Quantité de GAOx optimale (ng)
IPA	DHA	74
	L-ery	245
ECL	DHA	12
	L-ery	245

Ces résultats permettent de constater que la quantité de GAOx nécessaire pour la détection de la DHA par ECL (12 ng) est plus faible que celle requise pour l'IPA (74 ng). L'ECL étant plus sensible que l'IPA pour la détection d'H₂O₂, la quantité d'enzyme nécessaire est donc moindre. Cependant, en présence de L-ery, la même quantité d'enzyme (245 ng) est requise pour les deux méthodes. Comme expliqué dans le paragraphe III.1., les problèmes de viscosité et donc d'homogénéité de signal rencontrés en ECL en présence de L-ery peuvent expliquer ce résultats (Figure 68).

De précédents travaux visant à développer un biocapteur ampérométrique à GAOx à l'aide d'une électrode de carbone vitreux réutilisable, nécessitaient l'immobilisation de 50 µg d'enzyme.¹⁷⁰ Malgré l'utilisation unique de nos électrodes, nous avons pu diminuer la quantité de protéines par électrode d'un facteur compris entre 200 et 700.

III.3. Immobilisation de la GAOx

La GAOx et la TK ne fonctionnant pas dans les mêmes conditions environnementales, une partie du projet reposait sur l'immobilisation de ces deux enzymes dans des matrices particulières, les hydroxydes doubles lamellaires (HDL). Ces matrices ont pour rôle de conférer des environnements différents à chacune des enzymes afin qu'elles fonctionnent dans des conditions optimales. Les HDL sont constituées de cations métalliques formant des feuillets hexagonaux chargés positivement séparés entre eux par des anions. Elles sont donc particulièrement adaptées pour l'immobilisation d'enzyme chargées négativement.^{167,240} Cependant, la GAOx a un point isoélectrique de 7,75, ce qui la rend légèrement positive à pH 7, son pH optimal. C'est pourquoi, une argile échangeuse de cations, la laponite, a été utilisée pour immobiliser cette enzyme.^{169,170} La formule générale de cette argile est $(Mg_{5,5}Li_{0,5})Si_4O_{10}(OH)_2 (Na^+_x, nH_2O)$ et elle adopte une structure en feuillets plus ou moins hydratés, chargés négativement et séparés par un cation compensateur de charge.²⁴¹ L'immobilisation de la GAOx dans cette argile est réalisée par co-adsorption de l'argile et de l'enzyme à la surface des électrodes afin d'obtenir une structure biohybride appelée GAOx@laponite.^{169,170} Cette immobilisation a également pour but d'augmenter la sensibilité de détection des substrats de la GAOx, l'adsorption de l'enzyme à la surface des électrodes permettant son rapprochement physique vers le détecteur. L' H_2O_2 produit peut donc être détecté plus rapidement et n'est pas soumis à la diffusion au sein de la goutte et jusqu'à l'électrode (Figure 70).

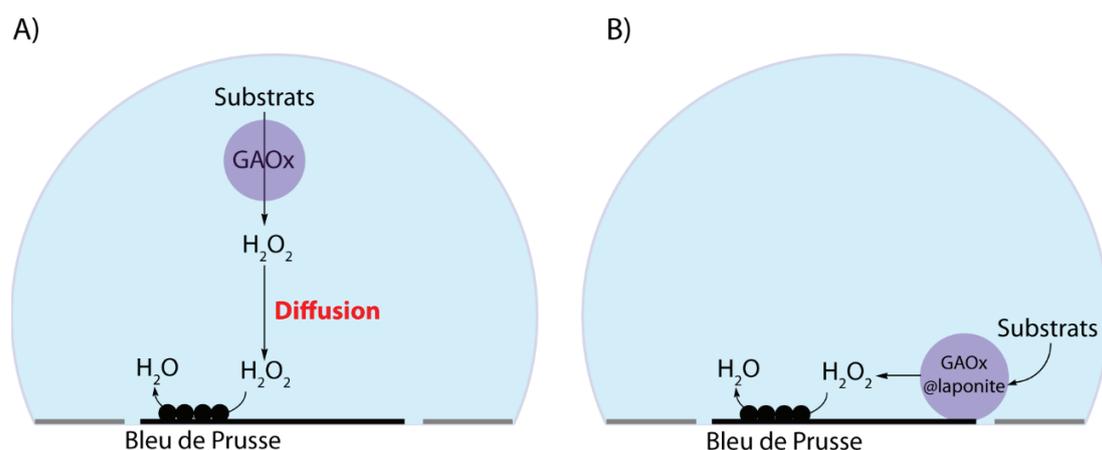


Figure 70. Schéma illustrant la position de la GAOx en solution (A) ou lorsqu'elle est adsorbée à la surface des électrodes (B) et la diffusion de l' H_2O_2 produit dans ces deux conditions.

Afin de comparer les résultats obtenus avec la laponite, l'enzyme a également été immobilisée dans une autre matrice chargée négativement, l'alginate, afin d'obtenir le biohybride GAOx@alginate. L'activité de la GAOx en solution, adsorbée seule à la surface des électrodes, ou co-adsorbée en présence de laponite, d'alginate ou d'un mélange équimassique de ces deux matrices, a été mesurée en présence de chacun des substrats (DHA ou L-ery) par IPA (Figure 71) et par ECL (Figure 72). Les sensibilités de détection, les limites de détection, les gammes linéaires ainsi que les valeurs maximales des signaux mesurés ont été déterminés dans chacune de ces conditions (Tableau 26 et Tableau 27).

En IPA, l'immobilisation de la GAOx a permis d'augmenter jusqu'à 4,5 fois la sensibilité de détection de la DHA (augmentant de $108 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ en présence de l'enzyme en solution à $487 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ en présence de la GAOx@alginate) (Figure 71A) et jusqu'à 3 fois pour le L-ery en utilisant la laponite ou l'alginate comme matrice (passant de $34 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ pour l'enzyme en solution à $105 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ pour GAOx@laponite et $104 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ pour GAOx@alginate) (Figure 71B). De plus, les valeurs de $K_{0,5}$ diminuent lorsque l'enzyme est immobilisée (diminuant de 2,55 mM avec la GAOx en solution à moins de 1 mM avec la GAOx immobilisée en présence de DHA comme substrat). L'hypothèse du rapprochement physique de l'enzyme vers l'électrode afin de limiter la diffusion de l' H_2O_2 pourrait expliquer ces résultats.

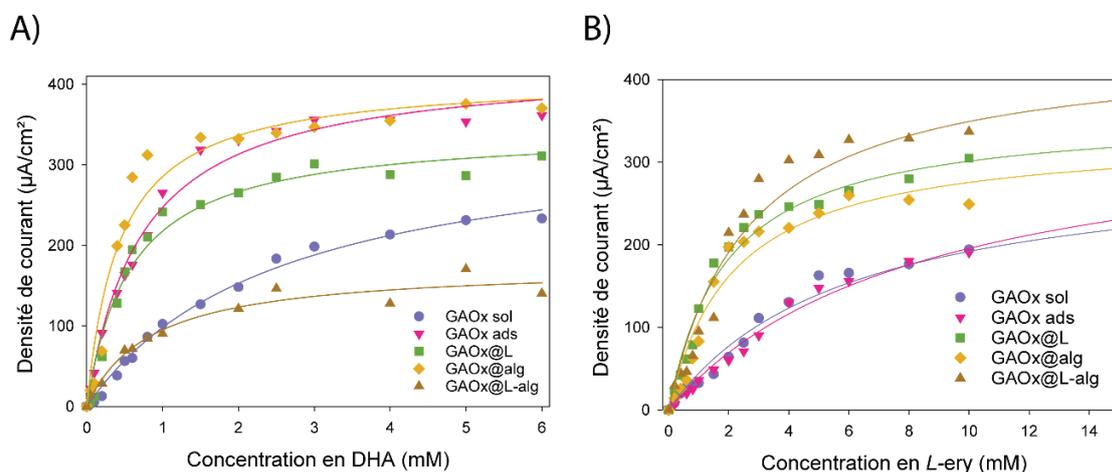


Figure 71. Mesure par IPA de l'activité de la GAOx en solution (GAOx sol) ou immobilisée (GAOx ads, adsorbée seule ; GAOx@L, immobilisée dans la laponite ; GAOx@alg, immobilisée dans l'alginate ; GAOx@L-alg, immobilisée dans un mélange équimassique de laponite et d'alginate) en présence de DHA (A) ou de L-ery (B) comme substrat après 10 minutes de réaction (Tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M, potentiel +0,04 V vs. Ag/AgCl, fréquence 0,5 Hz, largeur des impulsions 164 ms, temps de mesure 1 minute).

Tableau 26 Sensibilité, limite de détection, gamme linéaire, densité de courant maximale (J_{max}) et valeurs de $K_{0,5}$ déterminés à partir des mesures d'activités GAOx par IPA (Figure 13).

Substrat	Etat de la GAOx	Sensibilité (mA.M ⁻¹ .cm ⁻²)	Limite de détection (mM)	Gamme linéaire (mM)	J_{max} (μA.cm ⁻²)	$K_{0,5}$ (mM)
DHA	En solution	108	0,05	0,05 – 1	348	2,55
	Adsorbée seule	297	0,05	0,05 – 0,6	427	0,73
	GAOx@laponite	345	0,05	0,05 – 0,6	344	0,58
	GAOx@alginate	487	0,05	0,05 – 0,6	409	0,44
	GAOx@laponite-alginate	137	0,05	0,05 – 0,5	175	0,84
L-ery	En solution	34	0,2	0,2 – 3	336	5,91
	Adsorbée seule	30	0,2	0,2 – 5	312	8,37
	GAOx@laponite	105	0,2	0,2 – 2	344	1,93
	GAOx@alginate	104	0,2	0,2 – 2	315	2,14
	GAOx@laponite-alginate	95	0,2	0,2 – 3	233	2,61

Les limites de détection, correspondant à la plus faible concentration en substrat utilisée, ont été inchangées en présence des matrices (0,05 mM pour la DHA et 0,2 mM pour le L-ery). La seule condition pour laquelle l'immobilisation n'entraîne pas l'amélioration des performances du système est lorsque l'alginate et la laponite sont mélangées. Ceci peut s'expliquer par le fait que la matrice formée par l'association de l'argile et du polysaccharide peut être trop dense, ce qui limiterait la diffusion des substrats jusqu'à l'enzyme et des produits jusqu'à l'électrode.

En ECL, cependant, la présence de matrice d'immobilisation diminue l'intensité de luminescence obtenue avec la DHA, excepté pour l'hybride GAOx@alginate pour lequel la sensibilité est aussi élevée ($2,8 \cdot 10^5$ UA.mM⁻¹) que celle mesurée en présence de GAOx en solution ($2,9 \cdot 10^5$ UA.mM⁻¹) (Figure 72A). Cette diminution de la luminescence peut être attribuée à une absorption de la lumière électro-générée par la matrice d'immobilisation. La faible diffusion du luminol au sein de la matrice pourrait également limiter la réaction d'ECL. Enfin, une augmentation inattendue de la sensibilité a été observée en présence de L-ery avec la GAOx immobilisée dans la matrice laponite-alginate, cependant, ce phénomène n'a pas encore d'explications (Figure 72B). L'utilisation d'une matrice en ECL compromet donc les phénomènes de luminescence.

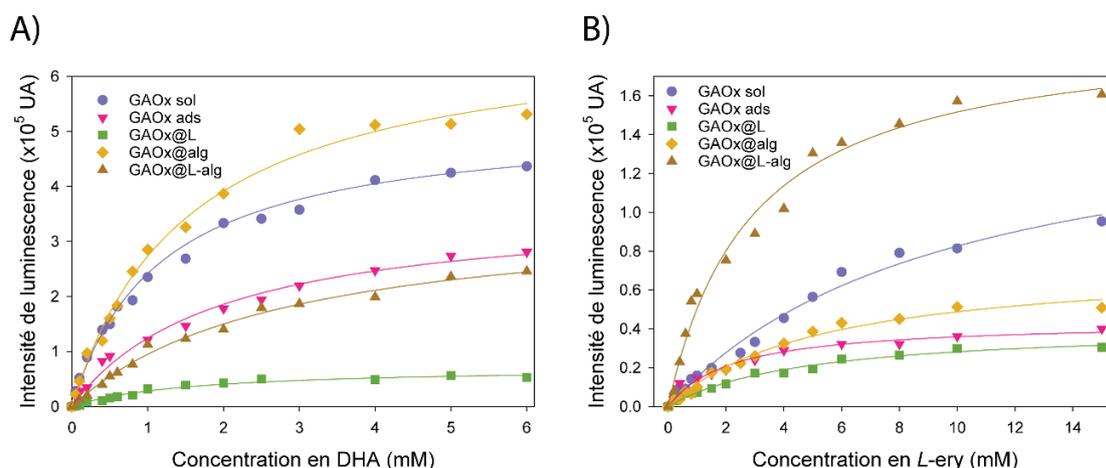


Figure 72. Mesure par ECL de l'activité de la GAOx en solution (GAOx sol) ou immobilisée (GAOx ads, adsorbée seule ; GAOx@L, immobilisée dans la laponite ; GAOx@alg, immobilisée dans l'alginate ; GAOx@L-alg, immobilisée dans un mélange équimassique de laponite et d'alginate) en présence de DHA (A) ou de L-ery (B) comme substrat après 10 minutes de réaction (Tampon Véronal 0,03 M à pH 8,5 KCl 0,03 M, potentiel +0,6 V vs. Ag/AgCl, fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 1 ms, temps de mesure 1 minute, temps d'acquisition de l'image 1 minute).

Tableau 27. Sensibilité, limite de détection, gamme linéaire et valeurs de $K_{0,5}$ déterminées à partir des mesures d'activités GAOx par ECL (Figure 14).

Substrat	Etat de la GAOx	Sensibilité ($\times 10^5$ UA.mM ⁻¹)	Limite de détection (mM)	Gamme linéaire (mM)	$K_{0,5}$ (mM)
DHA	En solution	2,9	0,05	0,05 – 0,6	1,22
	Adsorbée seule	1,8	0,1	0,05 – 0,5	1,95
	GAOx@laponite	0,3	0,5	0,05 – 1	1,56
	GAOx@alginate	2,8	0,05	0,05 – 1	1,53
	GAOx@laponite-alginate	1,1	0,2	0,05 – 1	2,77
L-ery	En solution	0,11	0,2	0,2 – 6	9,76
	Adsorbée seule	0,06	0,2	0,2 – 4	2,23
	GAOx@laponite	0,05	0,2	0,2 – 3	4,78
	GAOx@alginate	0,08	0,2	0,2 – 5	5,30
	GAOx@laponite-alginate	0,63	0,2	0,2 – 1	2,86

Cette série d'expériences a nécessité, pour chaque méthode, l'utilisation de 4 plaques de 96 électrodes et seulement 40 minutes de réaction ont été nécessaires (9 minute de réaction et 1 minute de mesure par plaque) afin de réaliser 384 mesures d'activité oxydases. Ces chiffres montrent une fois de plus la possibilité de tester des dizaines de conditions différentes en un temps très réduit.

Ainsi, dans le cadre de notre collaboration avec l'Institut de Chimie de Clermont Ferrand incluant également des spécialistes dans la synthèse d'argiles minérales, d'autres argiles se différenciant par la nature des ions métalliques constituant les feuillettes et donc par la charge globale de la matrice, ont été testées afin d'immobiliser la GAOx (MH1501 à MH1504) (*Tableau 28*).

Tableau 28. Sensibilité de détection de la DHA déterminée par IPA en présence de GAOx immobilisée dans des argiles de nature et donc de charge différentes (caractérisée par le potentiel Zêta, données fournies par l'ICCF), dopée ou non par des particules de BP.

Etat de l'enzyme	Structure de la matrice	Potentiel Zêta (mV)	Sensibilité (mA.M ⁻¹ .cm ⁻²)
GAOx en solution	/	/	108 ± 20
GAOx@MH1501	Mg ₂ Al(OH) ₆ NO ₃	+32	99 ± 35
GAOx@MH1502	Mg ₂ Al(OH) ₆ DDS	-8	240 ± 60
GAOx@MH1503	Zn ₂ Al(OH) ₆ NO ₃	+43	0
GAOx@MH1504	Zn ₂ Al(OH) ₆ DDS	-45	160 ± 48
GAOx@MH1501-BP	Mg ₂ Al(OH) ₆ NO ₃	+27	540 ± 190
GAOx@MH1502-BP	Mg ₂ Al(OH) ₆ DDS	-15,6	1210 ± 303
GAOx@MH1503-BP	Zn ₂ Al(OH) ₆ NO ₃	+36	180 ± 80
GAOx@MH1504-BP	Zn ₂ Al(OH) ₆ DDS	-0,8	820 ± 246

Afin d'augmenter la sensibilité de détection des substrats, les quatre nouvelles matrices testées ont été supplémentées de particules de Bleu de Prusse (MH1501-BP à MH1504-BP). Ces argiles avaient été développées afin d'améliorer le transfert d'électrons permettant la détection électrochimique de l'H₂O₂ dans de précédents travaux.^{242,243} Dans ce cas, la réduction de l'H₂O₂ serait réalisée par les particules de BP contenues dans les matrices qui transfèreraient alors leurs électrons au BP contenu dans l'encre de carbone. La présence de matrices n'étant pas favorable aux réactions d'ECL, l'activité de la GAOx immobilisée dans ces 8 nouvelles matrices a donc été mesurée uniquement par IPA et les sensibilités de détection de la DHA ont été déterminées (*Tableau 28*). L'immobilisation de la GAOx dans des matrices chargées positivement entraîne une diminution de la sensibilité de détection (99 mA.M⁻¹.cm⁻² pour GAOx@MH1501), voire une perte

du signal en présence de GAOx@MH1503. Une répulsion électrostatique de l'enzyme et de la matrice peut avoir lieu défavorisant l'immobilisation de la GAOx. En revanche, lorsque l'enzyme qui est chargée positivement est immobilisée dans une matrice chargée négativement, la sensibilité augmente ($240 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ pour MH1502 et $160 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ pour MH1504). De plus, l'ajout de BP dans les matrices d'immobilisation permet de multiplier la sensibilité de détection jusqu'à 10 fois ($1210 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ en présence de la matrice MH1502-BP). Cependant, l'utilisation des matrices dopées au BP entraîne une variabilité de signal beaucoup plus importante, à l'image des coefficients de variation compris entre 35% et 45%. Cette variabilité provient de la suspension d'argile qui est peu homogène. Le prélèvement de cette suspension est donc difficile et les dépôts sur électrodes sont très hétérogènes. De plus, ces argiles étant dopées au BP, la quantité de ce médiateur présente sur chaque électrode est différente.

Ces matrices synthétiques permettent ainsi d'augmenter la sensibilité de détection des substrats de la GAOx mais engendrent une importante variabilité. La laponite ou l'alginate restent donc des matrices plus appropriées pour l'immobilisation de la GAOx.

III.4. Stabilité temporelle de la GAOx immobilisée

Les études précédentes ont permis de constater que l'immobilisation de la GAOx augmentait la sensibilité de détection de ses substrats. Un second intérêt à l'immobilisation est la conservation des électrodes modifiées avec la GAOx. Jusqu'à présent l'enzyme et la matrice étaient co-adsorbées sur la nuit à 4°C (correspondant à 1 jour de conservation) et les mesures d'activités étaient réalisées par la suite. Pour cette expérience, les plaques d'électrodes sur lesquelles ont été adsorbées les différents biohydrides ont été conservées à 4°C pendant 3, 5, 7 et 10 jours. L'activité de la GAOx a ensuite été mesurée par IPA en présence d'une concentration saturante en DHA (6 mM) et exprimée en fonction de l'activité mesurée au lendemain de l'adsorption (*Tableau 29*).

Pour chaque jour et chaque matrice, l'activité a été mesurée sur 8 électrodes indépendantes. Après 7 jours, 70 à 80% de l'activité est maintenue qu'il y ait une matrice ou non. En revanche, pour le biohybride GAOx@laponite-alginate, plus de 60% de l'activité est perdue après 10 jours de conservation. La GAOx semble plus stable en absence de matrice d'immobilisation. Le carbone sérigraphié est une surface rugueuse, chargée négativement, permettant facilement l'immobilisation de l'enzyme et lui conférant une stabilité. Dans ce cas, l'utilisation de matrice ne représente pas un avantage.

Tableau 29. Stabilité temporelle de la GAOx immobilisée: pourcentage d'activité GAOx (adsorbée seule, GAOx@laponite, GAOx@alginate, GAOx@laponite-alginate) en présence de DHA 6 mM après 1, 3, 5, 7 ou 10 jours de conservation à 4°C (les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au signal obtenu après 1 jour de conservation).

Temps de conservation	État de l'enzyme			
	GAOx adsorbée	GAOx@laponite	GAOx@alginate	GAOx@laponite-alginate
1 jour	100%	100%	100%	100%
3 jours	97%	100%	97%	98%
5 jours	86%	90%	80%	69%
7 jours	85%	87%	71%	68%
9 jours	85%	79%	71%	37%

III.5. Désorption de la GAOx immobilisée

La présence de matrices permettant d'augmenter la sensibilité mais pas nécessairement la stabilité des biohybrides, il était important de vérifier que l'enzyme était bien immobilisée une fois le milieu réactionnel ajouté. Après l'immobilisation de la GAOx à la surface des électrodes, 30 μ l de tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 supplémenté en KCl 0,1 M ont été ajoutés sur les électrodes. La solution a été ensuite prélevée et l'activité de la GAOx a été mesurée par spectrophotométrie, en présence de DHA 6 mM, de la peroxydase de Raifort (HRP) et de l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique (ABTS) comme substrat chromogénique (*Figure 73*).

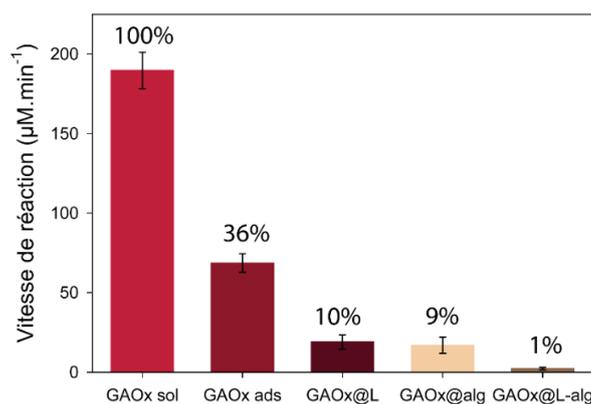


Figure 73. Désorption de la GAOx immobilisée. Mesure de l'activité GAOx (12ng) par spectrophotométrie à 414 nm en présence de DHA 6 mM, HRP 0,3 U et ABTS 3 mM (n=8). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la vitesse mesurée avec la même quantité de GAOx en solution.

En absence de matrice d'immobilisation (GAOx adsorbée, GAOx ads), 36% de la GAOx sont désorbées tandis que seulement 9 à 10% sont désorbées lorsqu'elle est immobilisée dans la laponite ou l'alginate. Si ces deux matrices sont combinées (GAOx@laponite-alginate), la désorption est quasi inexistante (1% de l'activité de mesurée dans la goutte). Cependant, nous avons pu voir précédemment que l'utilisation de cette association de matrices entraînait des limitations quant à la diffusion des substrats ou des produits et à la conservation des électrodes modifiées.

III.6. Variabilité de la mesure d'activité GAOx@laponite

Chaque test à haut débit possède un degré de variabilité et d'erreur qu'il est important de prendre en compte. La qualité d'un test haut débit et en particulier la variabilité entre les puits peut être jugée en calculant un paramètre, le facteur Z. Il est calculé à partir de la moyenne et des déviations standards mesurées sur un grand nombre d'échantillons (équation (1), chapitre 1 II.2). Dans le cas de la détection de la mesure d'activité GAOx, la variabilité sur une plaque de criblage électrochimique entière a été étudiée. Pour cela, la GAOx a été immobilisée dans la laponite sur les 96 électrodes (GAOx@laponite), la moitié de la plaque (48 électrodes) a été utilisée comme contrôle positif (en présence DHA 6 mM) et l'autre moitié comme contrôle négatif (en absence de substrat) (Figure 74).

Le contrôle négatif a un signal moyen de $4,3 \pm 2,5 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ et le contrôle positif un signal moyen de $86,4 \pm 11,8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Un facteur Z de 0,48 a ainsi été calculé. Selon Zhang et *al.*, cette valeur est associée à un test haut débit nécessitant un contrôle interne, c'est-à-dire par exemple, en utilisant une seconde molécule redox de concentration connue dans chacun des puits nous permettant de normaliser le signal.⁶² Cette valeur peut être améliorée en diminuant la variabilité des signaux, l'écart type représentant près de 14% du signal. Cette variabilité est issue d'une part du processus de sérigraphie au terme duquel l'épaisseur des électrodes et la quantité de BP dans chaque électrode peut être différente. D'autre part, elle provient de l'immobilisation de l'enzyme : en effet, la laponite est une suspension colloïdale et une mauvaise homogénéisation de la matrice peut entraîner des variabilités quant au ratio enzyme:matrice adsorbé à la surface des électrodes.

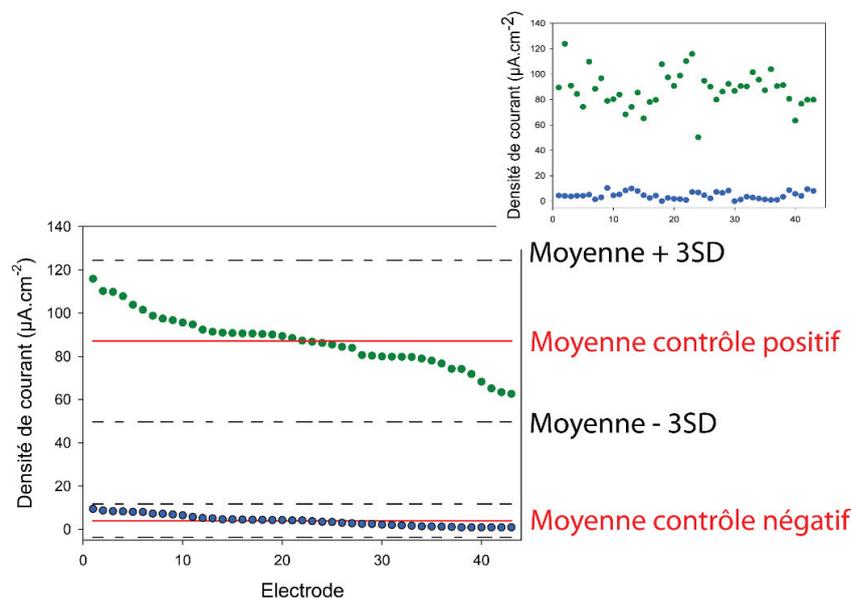


Figure 74. Variabilité de la mesure d'activité GAOx@laponite par IPA. Mesure de la densité de courant en présence de GAOx@laponite et de DHA 6 mM (48 électrodes, points verts) ou de tampon (48 électrodes, points bleus) (Tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M, potentiel de +0,04 V vs. Ag/AgCl, fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 164 ms, temps de mesure 1 min). Les signaux ont été triés par ordre décroissant. Les mêmes données non triées sont fournies dans le graphe en haut à droite..

III.7. Comparaison avec un autre système électrochimique

Dans le cadre du développement d'un biocapteur à thiamine pyrophosphate utilisant la transcétolase, une équipe de l'Institut de Chimie de Clermont Ferrand (ICCF) avait détecté l'activité GAOx avec un autre système électrochimique. Celui-ci est constitué d'une électrode de carbone sérigraphié sur laquelle sont électrodéposées les particules de Bleu de Prusse protégées par un film de poly-(*O*-phénylènediamine) (PPD). Cette électrode est plongée dans un milieu réactionnel sous agitation et nécessite donc l'immobilisation de la GAOx dans la laponite (GAOx@laponite). Les performances obtenues avec les PCE ont donc été comparées à celles obtenues avec cet autre système électrochimique (Tableau 30). Les sensibilités de détection des deux substrats sont entre 6 et 8 fois plus élevées avec les PCE ($345 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ contre $55 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ pour la DHA et $105 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ contre $13 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ pour le L-ery). Cependant, les limites de détection sont 15 fois plus élevées ($50 \text{ }\mu\text{M}$ pour la DHA et $500 \text{ }\mu\text{M}$ pour le L-ery) que le système développé par l'ICCF. Cette différence peut provenir d'une part, de la présence du film de PPD protégeant les particules de BP, permettant ainsi de détection de plus faibles concentrations

en substrat. D'autre part, l'agitation du milieu réactionnel améliore la diffusion des substrats et produits. En ce qui concerne la variabilité du signal, le système à une électrode possède également une variabilité élevée (11%) proche de celle mesurée avec les PCE (14%). Dans ce système à électrode unique, les nombreuses étapes d'électrodéposition du BP, de dépôt du film de PPD ou encore de l'immobilisation de la GAOx peuvent être à l'origine de cette variabilité.

Le système 96 électrodes est donc plus sensible que le précédent système développé par l'ICCF, mais possède des limites de détection plus élevées. Il est important de préciser qu'une courbe de calibration en triplicat pour chaque substrat peut être réalisée en 1 minute à l'aide des PCE, tandis qu'après chaque ajout de substrat, une vingtaine de secondes est nécessaire pour avoir un signal stable avec l'électrode plongeante. Le temps nécessaire pour mesurer le courant après 16 ajouts de substrats, en triplicat, et pour deux substrats différents est alors d'environ 30 minutes.

Tableau 30. Comparaison des performances des systèmes électrochimiques développés par l'ICCF et dans cette thèse pour la détection d'activité GAOx@laponite utilisant la DHA ou le L-ery comme substrat.

		ICCF	Système développé dans cette thèse
DHA	Sensibilité ($\text{mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$)	55	345
	Gamme linéaire (mM)	0,03 – 0,9	0,05 – 0,6
	Limite de détection (μM)	3,3	50
	J_{max} ($\mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$)	69	344
	Variabilité	11%	14%
L-ery	Sensibilité ($\text{mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$)	13	105
	Gamme linéaire (mM)	0,28 – 3,2	0,2 – 2
	Limite de détection (μM)	13	200
	J_{max} ($\mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$)	56	344

III.8. Comparaison avec une autre méthode : test colorimétrique

Les performances des PCE pour la détection d'activité GAOx viennent d'être comparées avec un autre système électrochimique. Cependant, il est également nécessaire de pouvoir les comparer avec une autre méthode de détection. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe II.4., il existe de nombreuses méthodes permettant la détection de l' H_2O_2 , produit par une oxydase. Un test spectrophotométrique impliquant une peroxydase et un substrat colorimétrique a été choisi en comparaison du système à 96 électrodes. Ce test fait intervenir la peroxydase de Raifort (HRP) qui,

en présence d'H₂O₂, va oxyder un substrat, l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS) formant ainsi un produit chromogénique absorbant à 414 nm.

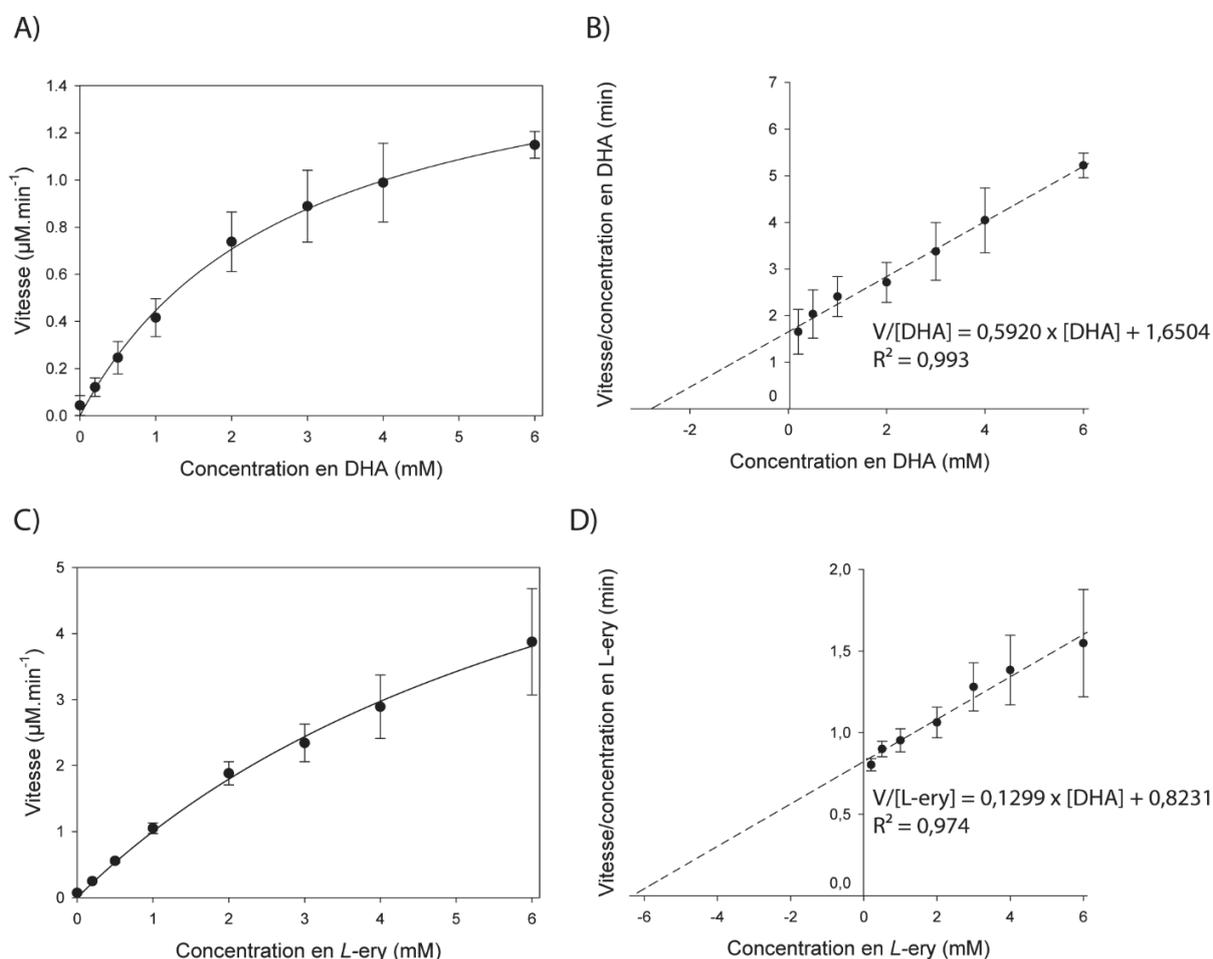


Figure 75. Mesure d'activité GAOx (12,5 µg pour A 50 µg pour C) par spectrophotométrie (à 414 nm) en présence de 0 à 6 mM de DHA (A) ou L-ery (C) (Tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M). Les courbes de Michaelis-Menten ont été linéarisées par la méthode de Hanes-Woolf (B et D), les droites de régression et leur équation sont présentes sur le graphe.

L'activité de la GAOx en solution en présence de DHA (Figure 75A) et L-ery (Figure 75C) comme substrat a donc été mesurée et les caractéristiques de ces mesures d'activités ont été comparées à celles obtenues par IPA et ECL à l'aide des PCE (Tableau 31). Ces courbes représentant la vitesse de réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat, suivent le modèle de Michaelis-Menten. Afin de déterminer les valeurs de K_M et V_m , la méthode de linéarisation de Hanes-Woolf a été utilisée (Figure 75B et D).

Tableau 31. Limites de détection, gammes linéaires et K_M (ou $K_{0,5}$) déterminés en présence de la GAOx en solution et de chaque substrat par IPA, ECL ou spectrophotométrie.

Méthode	Substrat	Limite de détection (mM)	Gamme linéaire (mM)	$K_{0,5}$ ou K_M (mM)
IPA	DHA	0,05	0,05 – 1	$2,55 \pm 0,49$
	L-ery	0,2	0,2 – 3	$5,05 \pm 0,96$
ECL	DHA	0,05	0,05 – 0,6	$1,16 \pm 0,02$
	L-ery	0,2	0,2 – 6	$9,76 \pm 1,20$
Spectrophotométrie	DHA	0,1	0,1 – 1	$2,79 \pm 0,30$
	L-ery	0,2	0,2 – 2	$7,70 \pm 0,31$

Les valeurs de K_M ont été comparées aux valeurs de $K_{0,5}$, correspondant à la concentration en substrat nécessaire pour atteindre la moitié du signal maximal obtenu par IPA ou ECL (Tableau 31). Dans un premier temps, la valeur du K_M pour la DHA (2,79 mM) est plus faible que celle pour le L-ery (7,70 mM), ce qui est en accord avec les résultats obtenus par IPA et ECL. De plus, la valeur de $K_{0,5}$ déterminée par IPA en présence de DHA (2,55 mM) et la valeur du K_M déterminée par spectrophotométrie (2,79 mM) sont proches. Les valeurs obtenues par ECL sont plus éloignées de celles obtenues par spectrophotométrie, en particulier pour le L-ery. Les problèmes de viscosité évoqués dans le paragraphe III.1. peuvent être à l'origine de ces différences. Les limites de détection obtenues par IPA, ECL et spectrophotométrie sont quasi-identiques (0,05 mM pour la DHA et 0,2 mM pour le L-ery), ce qui montre que le système 96 électrodes est aussi sensible qu'une méthode spectrophotométrique pour la mesure d'activité GAOx.

Dans un second temps, afin d'avoir un signal spectrophotométrique mesurable en 3 minutes, les quantités d'enzymes nécessaires pour réaliser ces tests sont de 12,5 μ g en présence de DHA et de 50 μ g en présence de L-ery, ce qui représente 1000 fois plus d'enzyme que pour les mesures par IPA et ECL. Ceci constitue un autre avantage à l'utilisation des PCE afin de mesurer des activités oxydases.

IV. Mesure de l'activité de la GAOx en présence d'un inhibiteur

En plus d'une optimisation rapide des conditions de détection, l'intérêt de ce système 96 électrodes est de pouvoir cribler des inhibiteurs d'enzymes provenant, par exemple, de chimiothèques. Des mesures d'activité GAOx ont donc été réalisées en présence de 0 à 400 μ M

d'un inhibiteur connu, l'azoture de sodium (NaN_3) (Figure 76). Ce dernier est un inhibiteur compétitif de l'oxygène, le second substrat de la GAOx, et représente un inhibiteur commun à toutes les oxydases. Ne cherchant pas à déterminer le mécanisme d'inhibition ni à caractériser cet inhibiteur et réalisant des mesures à une concentration en oxygène constante, seules des concentrations inhibitrices 50 (ou CI_{50}), correspondant à la concentration en inhibiteur nécessaire pour diminuer le signal mesuré de moitié, ont été étudiées. Ces CI_{50} ont été déterminées par IPA en présence d'une concentration saturante en DHA (6 mM) et de l'enzyme en solution, de l'enzyme adsorbée seule à la surface des électrodes ou de l'enzyme immobilisée dans la laponite, l'alginate ou les deux matrices mélangées (Tableau 32).

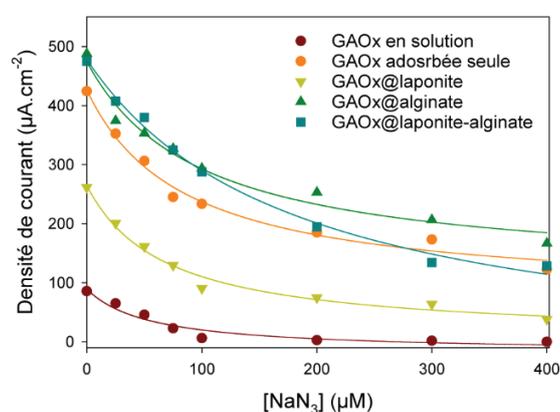


Figure 76. Inhibition de la GAOx par l'azoture de sodium : mesure de la densité de courant en présence de 12 ng de GAOx en solution ou immobilisée, de DHA 6 mM et de 0 à 400 μM en NaN_3 (Tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M, potentiel +0,04 V vs. Ag/AgCl, fréquence 0,5 Hz, largeur des impulsions 164 ms et temps de mesure 1 min).

Tableau 32. Valeurs des CI_{50} de la GAOx en solution ou immobilisée par l'azoture déterminée par IPA.

Etat de l'enzyme	IC_{50} (μM)
GAOx en solution	104
GAOx adsorbée	84
GAOx@laponite	167
GAOx@alginate	97
GAOx@laponite-alginate	145

Les valeurs de CI_{50} obtenues en présence de la GAOx@laponite et de la GAOx@laponite-alginate sont plus élevées (respectivement 167 μM et 145 μM) que celle obtenue en présence de GAOx en solution (107 μM). Dans ces conditions, la présence d'une matrice d'immobilisation défavoriserait

l'accès de l'inhibiteur à l'enzyme et une concentration plus élevée en azoture serait nécessaire pour observer une perte de 50% du signal. En revanche, lorsque l'enzyme est immobilisée dans l'alginate ou simplement adsorbée à la surface des électrodes, la CI_{50} est similaire (97 μM pour GAOx@alginate, 84 μM pour la GAOx adsorbée sans matrice). Dans ce cas, l'accès de l'inhibiteur à l'enzyme n'est pas perturbé par l'adsorption de l'enzyme ou la présence d'alginate.

Afin de comparer ces résultats, l'activité de la GAOx a également été mesurée en présence d'inhibiteur par spectrophotométrie *via* le test impliquant la HRP et l'ABTS, utilisé dans le paragraphe précédent. Cependant, la CI_{50} de la GAOx n'a pu être déterminée à l'aide de cette méthode. En effet, l'azoture inhibe également la peroxydase de Raifort avec une CI_{50} de 297 μM . Dans le cadre de criblage d'inhibiteur, la méthode électrochimique offre donc un avantage significatif puisqu'aucune enzyme auxiliaire, pouvant être ciblée par un inhibiteur, n'est nécessaire.

Ce test électrochimique permet donc de mettre en évidence l'inhibition d'une enzyme et de calculer très rapidement des CI_{50} . Il est cependant important de noter que la CI_{50} ne permet pas de juger et de comparer l'efficacité d'un inhibiteur par rapport à un autre. Cette mesure est réalisée en présence d'une concentration en substrat constante et ne prend pas en compte le mécanisme d'inhibition associé. Des mesures réalisées en présence de différentes concentrations en substrat et de différentes concentrations en inhibiteur permettraient alors de déterminer une constante d'inhibition associée à un mécanisme d'inhibition approprié. Cette série de mesures pourra être réalisée en seulement 1 minute à l'aide du système à 96 électrodes.

V. Mesures d'activité TK par le système bi-enzymatique

La détection d'activité GAOx par IPA et ECL à l'aide des PCE venant d'être optimisée, cette enzyme va maintenant être utilisée comme rapporteur pour la mesure d'activité de la TK d'*E. coli*. La TK humaine étant difficile à produire, à purifier et étant peu stable, l'optimisation de cette méthode de mesure a été réalisée en utilisant de la TK bactérienne. Au sein de ce système bi-enzymatique, la GAOx va oxyder les produits de la réaction catalysée par la TK pour produire de l' H_2O_2 détectable par IPA ou ECL (*Figure 77*).

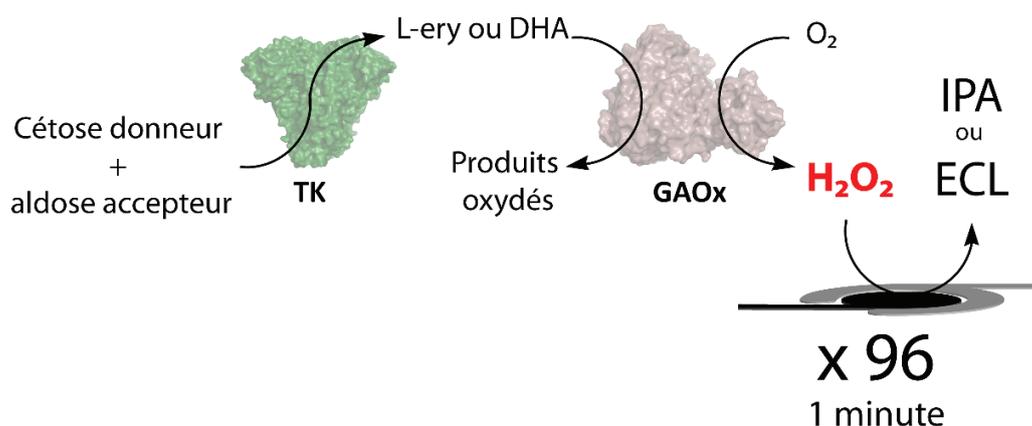


Figure 77. Schéma de principe de la mesure d'activité transcétolase (TK) à l'aide par le système bi-enzymatique impliquant la galactose oxydase (GAOx).

V.1. Activité de la GAOx@laponite en présence des substrats de la TK

Avant de mesurer l'activité de la TK à l'aide du système bi-enzymatique, il est nécessaire de vérifier que les substrats de la TK ne réagissent pas avec la GAOx. Pour que la TK puisse former de la DHA ou du L-ery, il est nécessaire de substituer l'aldose accepteur par un substrat non phosphorylé, le glycolaldéhyde (GA) ou le formaldéhyde (FA). En présence de fructose-6-phosphate (F6P) comme cétose donneur, le second produit formé est le D-érythrose-4-phosphate (Figure 78A) et en présence d'hydroxypyruvate (HPA), du bicarbonate est formé (Figure 78B). L'activité de la GAOx@laponite a donc été mesurée par IPA et ECL en présence de 6 mM de fructose-6-phosphate (F6P), d'hydroxypyruvate (HPA), de formaldéhyde (FA) et de glycolaldéhyde (GA) et les signaux obtenus ont été exprimés en pourcentage du signal de la DHA (Figure 79). Des signaux compris entre 0,2 et 5 % du signal de la DHA sont obtenus avec les substrats de la TK. Aucune interférence due à l'oxydation de ces substrats par la GAOx ne devrait avoir lieu lors de la mesure d'activité TK.

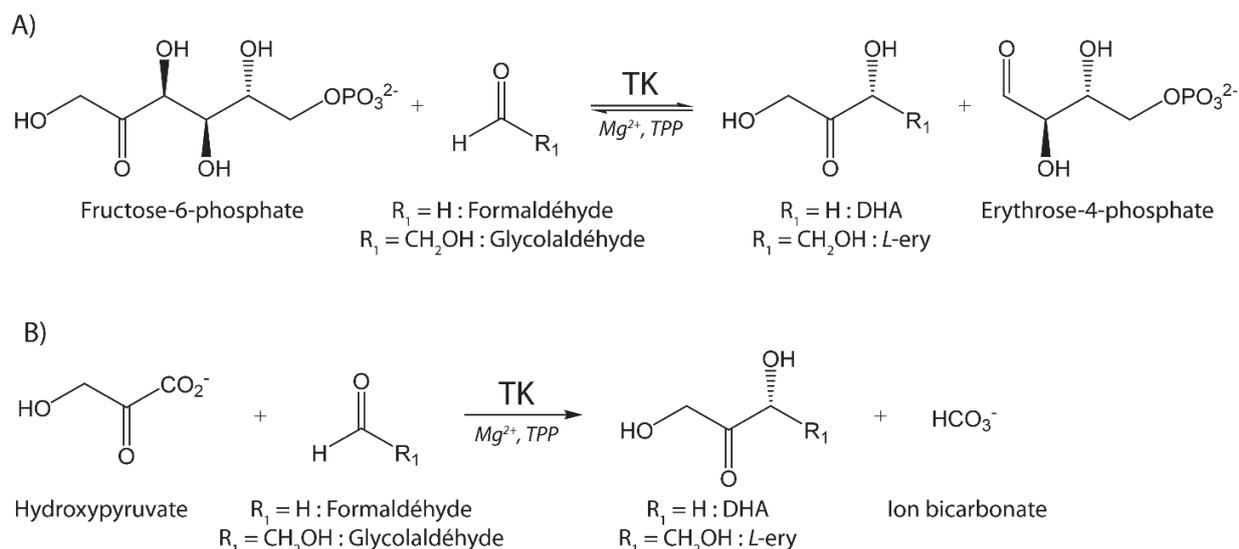


Figure 78. Réactions catalysées par la TK en présence de fructose-6-phosphate (A) ou d'hydroxypyruvate (B) comme substrat donneur et en présence d'un substrat accepteur non phosphorylé (formaldéhyde ou glycolaldéhyde) conduisant à la formation de DHA ou L-ery. La réaction a lieu en présence de magnésium (Mg^{2+}) et de thiamine pyrophosphate (TPP) comme cofacteur.

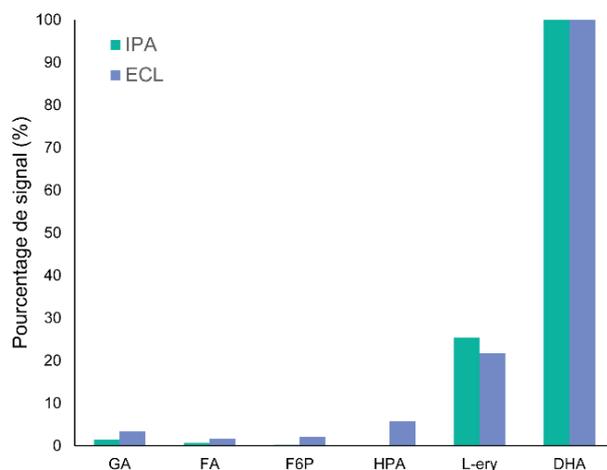


Figure 79. Mesure de l'activité GAOx@laponite en présence des substrats de la TK par IPA (en vert) ou ECL (en bleu). Les intensités de réduction du BP ou de luminescence ont été mesurées en présence de 12 ou 74 ng de GAOx@laponite et de 6 mM de glycolaldéhyde (GA), formaldéhyde (FA), de fructose-6-phosphate (F6P), de L-erythrulose (L-ery) et de dihydroxyacétone (DHA). Les signaux ont été exprimés en pourcentage en fonction du signal de la DHA.

V.2. Mesure de l'activité TK-GAOx par IPA

L'activité de la TK a été mesurée après adsorption de la GAOx@laponite sur les électrodes et en présence des différents couples de substrats donneurs (fructose-6-phosphate ou

hydroxypyruvate) et accepteurs (formaldéhyde ou glycolaldéhyde) présentés dans le paragraphe précédent. Le L-erythrose (L-ery) ou la dihydroxyacétone (DHA) formés par la TK pourront être oxydés par la GAOx@laponite qui va produire de l' H_2O_2 détectable par IPA.

Afin de conférer des microenvironnements pour chaque enzyme, la TK a également été immobilisée dans des hydroxydes doubles lamellaires (HDL) de formule Mg_2Al-NO_3 pour former la structure biohybride TK@HDL.¹⁷¹ Les premiers travaux utilisant ce système bienzymatique avaient pour but de développer un biocapteur à thiamine pyrophosphate (TPP), le cofacteur de la TK, et dérivé de la vitamine B1. L'activité de la TK@HDL a donc été mesurée en faisant varier la concentration en TPP de 0 à 0,4 mM et en utilisant une concentration élevée de substrat donneur et accepteur (2 mM) pour avoir une réponse dépendante de la TPP. Cependant, aucun signal de réduction du BP n'a été mesuré quel que soit le substrat et quelle que soit la concentration en TPP utilisée. De plus, ces mesures ont entraîné une très grande variabilité du bruit de fond (allant de -5000 à +5000 nA) certainement dûe à l'immobilisation successive de la GAO@laponite et de la TK@HDL.

Afin de diminuer cette variabilité et ainsi pouvoir détecter un signal même faible, l'activité de la TK en solution a été mesurée (toujours en présence de GAOx@laponite), cependant aucune activité n'a pu être détectée. Plusieurs explications sont possibles : la première est que les concentrations en substrats utilisées (2 mM) ne sont pas assez élevées. De précédents tests ont montré que le K_M de la TK pour le fructose-6-phosphate était de 1,1 mM, de 5,3 mM pour l'hydroxypyruvate, de 31 mM pour le formaldéhyde et de 14 mM pour le glycolaldéhyde.⁸³ Des mesures en présence d'une concentration supérieure à 10 fois la valeur du K_M (afin d'être en conditions saturantes) permettraient donc d'augmenter le signal. La deuxième raison peut être une quantité d'enzyme trop faible ou une proportion de l'enzyme rapportrice par rapport à l'enzyme d'intérêt trop faible (0,0664 U de GAOx pour 0,155 U de TK). Cependant, l'augmentation de la concentration en enzyme peut entraîner leur agrégation comme expliqué précédemment dans le paragraphe III.2. Enfin, la présence des deux structures biohybrides (GAOx@laponite et TK@HDL) sur l'électrode peut également ralentir la diffusion des substrats et produits à travers les matrices d'immobilisation dans un milieu non agité. Le temps de réaction est dans ce cas trop faible et c'est sur ce dernier point qu'a été concentrée la suite des travaux. En effet, l'augmentation du temps de réaction permettrait de laisser plus de temps aux substrats de diffuser jusqu'à l'enzyme et permettrait aussi d'accumuler une quantité plus élevée d' H_2O_2 dans le milieu (pouvant alors être détecté par IPA).

Le problème rencontré ici est, qu'en présence de 30 μl de milieu réactionnel sur les électrodes, l'augmentation du temps de réaction au-delà des 10 minutes déjà requises, entraîne une évaporation du milieu réactionnel. Les réactions enzymatiques ont donc été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment, en microplaques. Après différents temps d'incubation (entre 10 et 60 minutes) des enzymes en solution et des substrats (le F6P et le GA), une partie de ce milieu réactionnel a été déposé sur les électrodes afin de détecter l' H_2O_2 potentiellement formé (Figure 80).

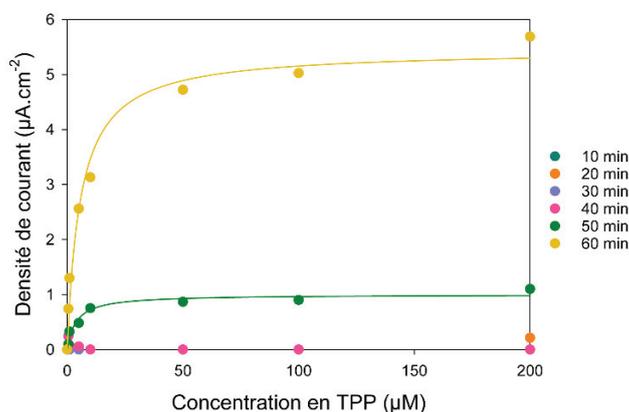


Figure 80. Mesure de l'activité de la TK en solution après différents temps de réaction (10-60 minutes) : l'incubation de 15 μg de TK, 1 μg de GAOx, 1 mM de MgCl_2 , 2 mM de glycolaldéhyde, 2 mM de fructose-6-phosphate et 0 à 200 μM en TPP a été réalisée dans une microplaque (tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M) suivie d'un prélèvement de 30 μl du milieu réactionnel déposé sur une PCE. La densité de courant à +0,04 V vs. Ag/AgCl a été mesurée (fréquence 0,5 Hz, largeur des impulsions 164 ms, temps de mesure 1 minute).

Un signal dépendant de la concentration en TPP est mesuré à partir de 50 minutes de réaction et augmente lorsque la réaction a lieu pendant 60 minutes. Une sensibilité de détection de la TPP de 24 $\text{mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ a été déterminée, dans ce dernier cas. Cette valeur est trois fois plus faible que la sensibilité de détection déterminée avec le système électrochimique développé par l'ICCF (constitué d'une électrode de carbone sur laquelle sont immobilisées successivement GAOx@laponite et TK@HDL) évoquée dans le paragraphe III.7. dont la sensibilité est de 77 $\text{mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$. Ce temps de réaction (60 minutes) est trop important pour que la réaction ait lieu en goutte de 30 μl et le fait d'utiliser les plaques 96 puits spectrophotométriques fait perdre l'intérêt de notre système.

V.3. Mesure de l'activité TK-GAOx par ECL

L'ECL étant plus sensible que l'IPA pour la détection de l' H_2O_2 , l'activité de la TK a également été mesurée *via* le système bi-enzymatique à l'aide de cette méthode. De manière analogue à l'IPA, les différents acteurs du système bienzymatique (TK, GAOx, substrats donneur et accepteur, TPP et Mg^{2+}) ont été incubés pendant 10 à 60 minutes au terme desquelles, 30 μl du milieu réactionnel ont été déposés sur les électrodes et la luminescence électro-générée du luminol a été suivie à l'aide d'une caméra CCD. Aucun signal n'a pu être mesuré y compris pour les temps d'incubation élevés et quels que soient les substrats utilisés. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les mesures ont été réalisées dans un tampon Véronal 0,03 M à pH 8,5 supplémenté de KCl 0,03 M, sélectionné comme le tampon le plus adapté à la détection de l' H_2O_2 . La nature et surtout le pH de ce tampon n'est peut-être pas adapté pour la mesure d'activité TK, dont le pH optimal est de 7,0 pour l'enzyme d'*E. coli*. La quantité d' H_2O_2 produite est donc trop faible pour pouvoir être détectée par cette méthode.

L'approche consistant à mesurer l'activité TK à l'aide d'une oxydase en utilisant le format 96 puits nécessitant beaucoup plus d'optimisation et apparaissant comme laborieux, une autre approche simplifiée sera abordée dans le chapitre suivant.

VI. Conclusion

Dans cette première partie de résultats, un système électrochimique permettant la détection à haut débit de peroxyde d'hydrogène a été présenté. Cet analyte a été détecté à l'aide de deux méthodes différentes, l'ampérométrie pulsée par intermittence (IPA) en présence d'un médiateur électrochimique (le Bleu de Prusse) et l'électrochimiluminescence (ECL) en présence de luminol. Les performances de ce système sont comparables à celles des autres systèmes de détection de l' H_2O_2 mais permettent d'accéder à un plus grand nombre de résultats, puisque pour la première fois, 96 mesures peuvent être réalisées en seulement 1 minute et ce, pour les deux méthodes.

Ce système a par la suite été utilisé pour mesurer à haut débit des activités oxydases. Dans le contexte du développement d'un système rapporteur de l'activité transcétolase, l'activité d'une galactose oxydase (GAOx) a été mesurée par IPA et ECL. Une optimisation rapide des conditions de détection de cette activité GAOx a pu être réalisée à l'aide du format 96. De plus, différentes matrices d'immobilisation de la GAOx ont pu être testées et ont permis d'augmenter la sensibilité

de détection de chacun des substrats en utilisant l'IPA. Ce nouveau système haut débit de mesure d'activité oxydase offre des performances comparables au précédent biocapteur développé pour la mesure d'activité GAOx mais se démarque par la rapidité de mesure et l'absence d'enzyme rapportrice contrairement aux tests spectrophotométriques ou fluorimétriques.

Enfin, le système 96 électrodes a été utilisé pour tenter de détecter des activités transcétolases (TK) à l'aide de la GAOx comme enzyme rapportrice. Malheureusement, ce premier système rapporteur ne présente pas de fortes sensibilités, ce qui conduit à un signal faible pour la détection d'activité TK par IPA et à l'absence de signal par ECL. Les travaux avec ce système bienzymatique auraient pu être approfondis et optimisés, notamment en faisant varier la quantité d'enzyme ou la concentration des substrats. Cependant, une autre méthode électrochimique permettant de s'affranchir de l'utilisation d'une enzyme auxiliaire et ne nécessitant l'intervention que d'un seul substrat a été publiée par Halma et *al.*¹⁷¹ Ce test simplifié a donc été utilisé comme second système rapporteur de l'activité de la TK et sera développé dans le chapitre IV.

Chapitre IV : Identification d'inhibiteurs de la TK par oxydation d'un intermédiaire réactionnel

I. Introduction

Au cours de ces travaux de thèse, une autre méthode électrochimique permettant la mesure d'activité TK est venue concurrencer la méthode bi-enzymatique précédemment développée. Cette nouvelle méthode, publiée en 2017 par Halma et *al.*, est basée sur l'oxydation de l'intermédiaire réactionnel α,β -dihydroxyethylthiamine diphosphate (DHETPP) formé suite à la fixation du substrat donneur (une cétone) sur la TPP activée au sein du site actif de la TK et à la libération du premier produit (un aldéhyde) (Figure 81).¹⁷¹ En absence d'un substrat accepteur, le carbanion intermédiaire peut être oxydé par un médiateur électrochimique, tel que la porphyrindine, le ferrocyclochrome ou la phénazine méthosulfate comme l'ont décrit Healy et *al.*²⁴⁴ Cependant, le ferricyanure ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) apparaît comme l'oxydant le plus économique et est disponible commercialement. Kochetov et *al.* avaient utilisé cet oxydant en 1982 afin de mesurer l'activité de la TK en suivant la consommation du ferricyanure par spectrophotométrie à 420 nm.¹⁵⁷ Dans cette nouvelle méthode électrochimique, le ferrocyanure ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) formé lors de l'oxydation de l'intermédiaire peut être réoxydé à l'aide d'une électrode de carbone et sous l'application d'un potentiel d'environ +0,5 V vs. Ag/AgCl (Figure 81).

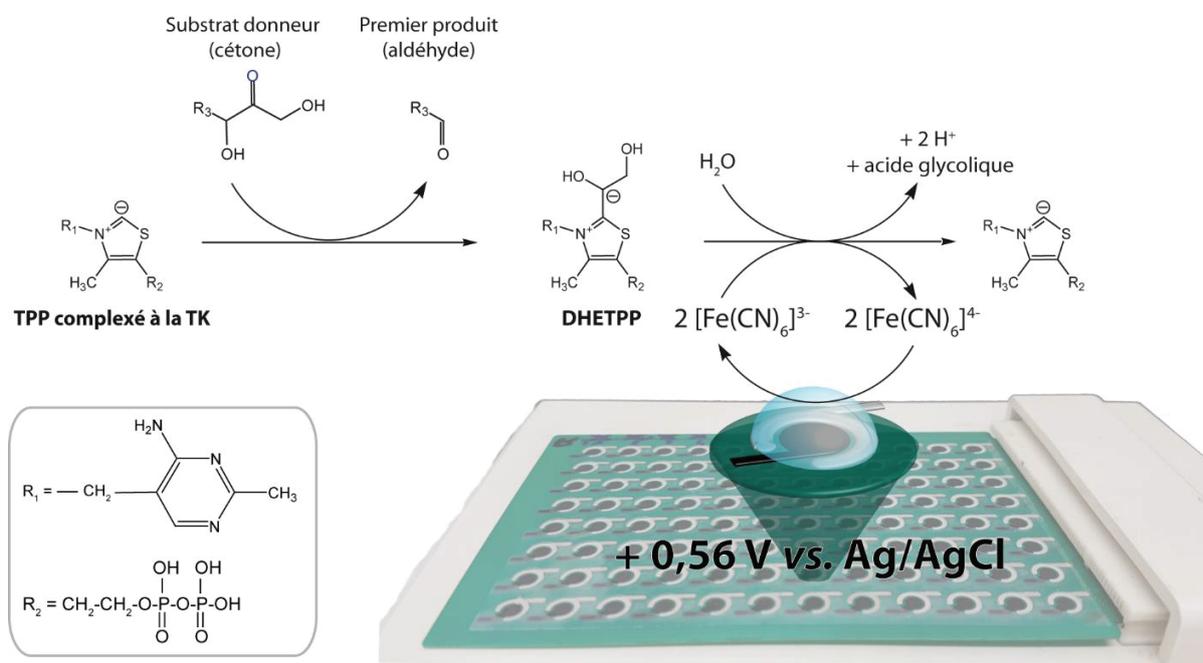


Figure 81. Schéma de principe de la détection électrochimique d'activité TK à haut débit en présence de ferricyanure ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) et à l'aide des plaques de criblage électrochimique.

Le principal avantage de cette nouvelle méthode est de pouvoir s'affranchir d'une enzyme auxiliaire, qui peut être, dans le cadre d'un criblage d'inhibiteurs, ciblée par l'inhibiteur, conduisant à des faux positifs. Ce quatrième chapitre portera sur l'optimisation de la détection de l'activité TK avec cette nouvelle méthode et à l'aide des plaques de criblage électrochimique (PCE). Les performances de détection seront alors comparées au premier système rapporteur développé dans le Chapitre III. Enfin, la méthode la plus adaptée sera utilisée afin de cribler la chimiothèque de l'ICBMS dans le but, d'une part, d'identifier de nouveaux inhibiteurs de la TK et, d'autre part, de mettre en avant les capacités de ce système électrochimique à haut débit. Ces travaux ont fait l'œuvre d'un second article publié dans le journal « Analytical Chemistry » en juin 2018 (présenté en Annexe).

II. Détection du ferrocyanure par IPA

La détection de l'activité TK repose sur l'oxydation du ferrocyanure obtenu après oxydation de l'intermédiaire réactionnel DHETPP. L'optimisation de la détection du ferrocyanure sur les électrodes de carbone sérigraphiée a donc été réalisée avant les mesures d'activité.

II.1. Caractérisation électrochimique

De la même manière que pour les électrodes de carbone dopées au Bleu de Prusse, une caractérisation de la détection du ferrocyanure ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) à l'aide des électrodes de carbone a été réalisée. La voltammétrie cyclique du carbone sérigraphié, entre -1 et +1 V vs. Ag/AgCl, en présence d'un mélange équimolaire de ferricyanure/ferrocyanure à 1 mM permet de déterminer le potentiel d'oxydation du ferrocyanure (*Figure 82*). Celle-ci a lieu à un potentiel de +0,56 V vs. Ag/AgCl. La réduction du ferricyanure ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) est obtenue à un potentiel de -0,59 V vs. Ag/AgCl. D'autres voltammogrammes ont été réalisés en faisant varier la vitesse de balayage (de 0,005 à 4 V.s⁻¹) afin d'accéder aux paramètres électrochimiques associés à la détection du ferrocyanure par les électrodes de carbone sérigraphiées (*Tableau 33*). Ces paramètres ont été comparés avec un autre système électrochimique, décrit par Zaïb et *al.*, utilisant une pâte de carbone afin de détecter du ferrocyanure.²⁴⁵

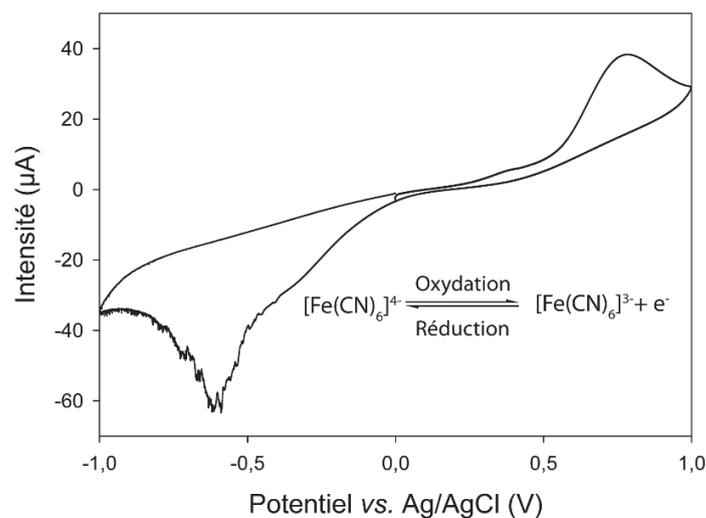


Figure 82. Voltammogramme des électrodes de carbone (entre -1 et +1 V vs. Ag/AgCl) obtenus en présence d'un mélange équimolaire de ferricyanure/ferrocyanure 1 mM (tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M). Vitesse de balayage = $20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Dans un premier temps, la relation linéaire entre l'intensité d'oxydation et de réduction et la racine carrée de la vitesse de balayage indique que l'oxydation du ferrocyanure et la réduction du ferricyanure sont contrôlées par la diffusion de cet analyte jusqu'à l'électrode (Figure 83A). Un coefficient de diffusion de ces molécules redox de $6,1 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ a également été calculé. La comparaison de cette valeur avec celle du système décrit par Zaïb et *al.* ($7,6 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) permet de conclure que la diffusion du couple redox dans le système en goutte est similaire à celle obtenue avec un autre système électrochimique (Tableau 33).

Tableau 33. Paramètres électrochimiques associés à la détection de ferrocyanure par les électrodes de carbone sérigraphiées et comparés aux paramètres d'un autre système électrochimique.

Paramètre	Électrodes de carbone sérigraphiées	Électrodes à base de pâte de carbone ²⁴⁵
Coefficient de diffusion du couple ferricyanure/ferrocyanure ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$6,1 \cdot 10^{-6}$	$7,6 \cdot 10^{-6}$
Coefficient de transfert d'électrons	0,4	0,5
Constante de transfert d'électrons (s^{-1})	12,9	22,5
Taille de l'électrode (cm^2)	0,071	0,125

Dans un second temps, une relation linéaire entre les potentiels d'oxydation (+0.56 vs. Ag/AgCl) et de réduction (-0,59 V vs. Ag/AgCl) et la vitesse de balayage est observée (Figure 83B). En utilisant la théorie de Laviron²⁰⁷, un coefficient de transfert d'électron (α) de 0,4 et une constante de transfert d'électrons apparente (k_h) de 12,9 s⁻¹ ont pu être déterminés (à partir des équations (4) et (4')) présentés dans le paragraphe IV.1.2. du chapitre Matériel et méthodes). Cette dernière valeur est proche de celle obtenue par le système de Zaïb et al. (22,5 s⁻¹) (Tableau 33). Cette caractérisation permet de constater que la détection du ferrocyanure à l'aide des électrodes de carbone des plaques de criblage électrochimique a des performances comparables à d'autres systèmes électrochimiques malgré le fait que les milieux réactionnels soient en gouttes.

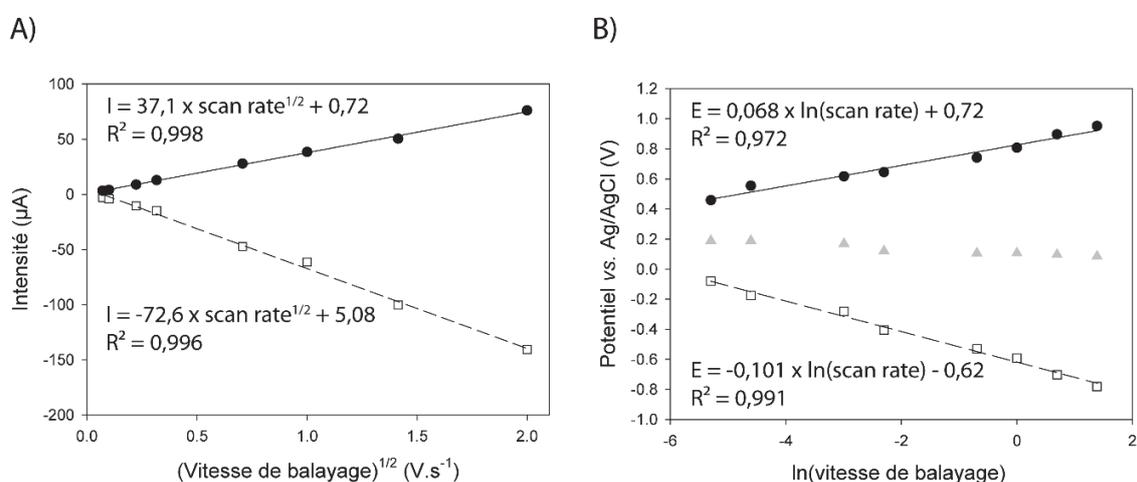


Figure 83. Caractérisation des électrodes de carbone en présence d'un mélange équimolaire de ferricyanure/ferrocyanure de potassium 1 mM (Tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M). A) Intensités d'oxydation (ronds noirs) ou de réduction (carrés blancs) en fonction de la racine carrée de la vitesse de balayage. B) Potentiels d'oxydation (ronds noirs), de réduction (carrés blancs) et potentiels standards (triangles gris) en fonction du logarithme népérien de la vitesse de balayage. Les droites de régression et leur équation sont présentes sur le graphe.

II.2. Optimisation des paramètres électrochimiques

Dans le premier chapitre, il a été décrit que plusieurs paramètres, tels que le prétraitement des électrodes ou encore la durée des impulsions de potentiel, pouvaient influencer la détection d'un analyte. Une optimisation du prétraitement et des paramètres électrochimiques permettant la détection du ferrocyanure a donc été réalisée par IPA.

Tout d'abord, la variabilité des électrodes sérigraphiées exposée dans le Chapitre III est valable pour les électrodes de carbone (sans Bleu de Prusse). Malgré l'absence de médiateur

électrochimique, des résidus organiques peuvent être présents dans les encres de sérigraphie et l'état d'oxydation du carbone graphite peut être différent d'une électrode à l'autre. C'est pourquoi un prétraitement électrochimique peut améliorer la sensibilité de détection du ferrocyanure. Pour les mesures d'électrochimiluminescence précédemment réalisées, pour lesquelles les électrodes de carbone (sans médiateur) étaient utilisées, une sur-oxydation à +1,2 V vs. Ag/AgCl dans un tampon carbonate entraînait les meilleures sensibilités de détection. Nous avons donc choisi de prétraiter les électrodes dans différents tampons et sous l'application de ce potentiel pendant 2 minutes. Des gammes de détection de ferrocyanure (de 0 à 8 μM) ont été obtenues à la suite de ces différents prétraitements et les sensibilités (en $\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) ont été comparées (Tableau 34).

Tableau 34. Effet des solutions de prétraitement des électrodes de carbone sur la détection du ferrocyanure par IPA. Les prétraitements ont été réalisés en appliquant un potentiel de +1,2 V vs. Ag/AgCl avec une fréquence de 1 Hz et des impulsions de 82 ms, pendant 2 minutes. Les sensibilités ont été calculées à partir de gammes de concentrations de ferrocyanure (0-8 μM) mesurées dans les conditions suivantes : +0,56 V vs. Ag/AgCl, fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 82 ms et temps de mesure 1 minute (tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M). Les conditions conduisant à la sensibilité la plus élevée apparaissent en vert.

Solution de prétraitement	Sensibilité ($\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Gamme linéaire (mM)	R ²
Sans prétraitement	84,3	1-6	0,925
Carbonate 1 M pH 8,2	153,5	0,1-6	0,992
Phosphate 0,1 M KCl 0,1 M pH 7,0	148,1	0,5-6	0,988
Hepes 0,05 M KCl 0,1 M	135,1	0,5-6	0,960

Tout comme pour la détection de l' H_2O_2 par IPA et ECL, le prétraitement des électrodes augmente de façon non négligeable la sensibilité de détection du ferrocyanure (augmentant de 84,3 $\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ à plus de 130 $\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$). De plus, la solution de prétraitement entraînant la sensibilité la plus importante est le tampon carbonate de sodium 1 M décrit par Sassolas et *al.* comme le plus adapté pour prétraiter des électrodes de carbone avant des mesures d'ECL.²⁰⁸

Dans ce tampon carbonate, le temps de prétraitement a ensuite été optimisé afin d'améliorer la détection du ferrocyanure (Tableau 35). Un prétraitement de 10 minutes conduit à une augmentation de la sensibilité de détection à 175 $\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Tableau 35. Effet du temps de prétraitement des électrodes de carbone sur la détection du ferrocyanure par IPA. Les prétraitements ont été réalisés dans un tampon carbonate 1 M à pH 8,2 en appliquant un potentiel de +1,2 V vs. Ag/AgCl avec une fréquence de 1 Hz et des impulsions de 82 ms. Les sensibilités ont été calculées à partir de gammes de concentrations de ferrocyanure (0 - 8 μ M) mesurées dans les conditions suivantes : +0,56 V vs. Ag/AgCl, fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 82 ms et temps de mesure 1 minute (Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M). Les conditions conduisant à la sensibilité la plus élevée apparaissent en vert.

Temps de prétraitement (min)	Sensibilité (mA.M ⁻¹ .cm ⁻²)	Gamme linéaire (mM)	R ²
0	84,3	1-6	0,925
2	153,5	0,1-6	0,992
5	153,2	0,1-6	0,978
10	175,1	0,1-6	0,993

Enfin, les paramètres électrochimiques appliqués par IPA pour la détection du ferrocyanure ont également été optimisés afin d'améliorer la sensibilité (Tableau 36). L'influence de la largeur des impulsions de potentiel, de leur fréquence d'application ainsi que de la durée totale d'application du courant a été étudiée.

Tableau 36. Effet des paramètres électrochimiques appliqués par IPA sur la détection du ferrocyanure. Les sensibilités ont été calculées à partir de gammes de concentrations de ferrocyanure (0-8 μ M) mesurées dans les conditions suivantes : +0,56 V vs. Ag/AgCl, fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 82 ms et temps de mesure 1 minute (tampon Hepes 0,05 M pH 7,0 KCl 0,1 M). Les conditions conduisant à la sensibilité la plus élevée apparaissent en vert.

Fréquence (Hz)	Paramètres électrochimiques		Sensibilité (mA.M ⁻¹ .cm ⁻²)	Gamme linéaire (mM)	R ²
	Largeur des impulsions (ms)	Temps de mesure (min)			
1	82	2	212,1	0,1-6	0,993
1	82	1	175,1	0,1-6	0,993
0,5	164	1	178,9	0,5-4	0,995
1	1	1	141,7	0,5-6	0,989
2	41	1	155,0	4-8	0,878
0,05	1639	1	135,9	0,5-8	0,982

L'application de courtes impulsions de potentiels (1 ms) entraîne une diminution de la sensibilité, pouvant s'expliquer par un signal accumulé trop court. A l'inverse, l'application d'impulsions très longues (1639 ms) mais avec une fréquence plus courte, ne permet pas d'augmenter la sensibilité.

De plus, l'augmentation de la durée totale des impulsions à 2 minutes permet d'obtenir la sensibilité maximale ($212,1 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$). Ainsi, la détection du ferrocyanure sera réalisée en appliquant des impulsions de $+0,56 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ de 82 ms avec une fréquence de 1 Hz et pendant 2 minutes.

II.3. Caractéristiques analytiques

Une fois le prétraitement des électrodes et les paramètres de mesure optimisés, une courbe de calibration a été réalisée en présence d'une large gamme de concentrations de ferrocyanure (0-10 mM) (Figure 84A). La limite de détection (correspondant à la concentration en ferrocyanure pour laquelle le rapport signal sur bruit (J_{mes}/J_0) est supérieur à 3) de 0,05 mM, la gamme linéaire de 0,1 à 6 mM et la sensibilité de détection de $212,1 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ ont été déterminées dans ces conditions.

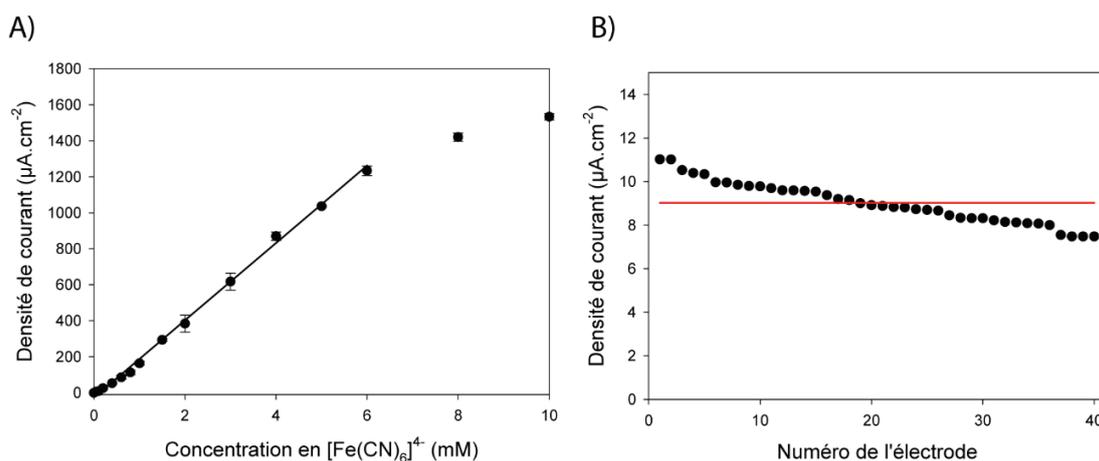


Figure 84. A) Courbe de calibration pour la détection du ferrocyanure par IPA : mesure de la densité de courant à $+0,56 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ (fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 82 ms, temps de mesure 2 minutes) en fonction de la concentration en ferrocyanure ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) (0-10000 μM , tampon Hepes 0,05 M pH 7,0 KCl 0,1 M, $n=4$). La courbe en trait plein symbolise à la partie linéaire de la courbe. B) Variabilité de la détection de ferrocyanure : mesure de la densité de courant en présence de 0,1 mM de ferrocyanure sur 40 électrodes différentes (tampon Hepes 0,05 M pH 7,0 KCl 0,1 M, mêmes paramètres électrochimiques que dans A). Les signaux ont été triés par ordre décroissant et la ligne rouge correspond au signal moyen.

Afin de juger de la variabilité inter-électrode pour la détection du ferrocyanure, la densité de courant a été mesurée en présence de 0,1 mM de ferrocyanure sur 40 électrodes différentes (Figure 84B). Un signal moyen de $9,02 \pm 0,95 \mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$ est obtenu et le coefficient de variation est de 10%, pouvant être justifié par le processus de sérigraphie conduisant à des électrodes de

topologie différente. De plus, ce coefficient de variabilité est plus faible que pour la détection de l' H_2O_2 à l'aide des électrodes de carbone dopées au Bleu de Prusse (19%) obtenu dans le Chapitre III. Cette différence de variabilité est due à l'absence de particules de BP dans l'encre de carbone utilisée pour la détection du ferrocyanure (dont la quantité et l'état d'oxydation pouvait varier d'une électrode à l'autre).

II.4. Comparaison avec d'autres systèmes électrochimiques

Afin de mettre en évidence l'intérêt de cette nouvelle méthode, il est important de pouvoir comparer les performances du système à 96 électrodes pour la détection du ferrocyanure avec d'autres systèmes électrochimiques (*Tableau 37*). La plupart des publications décrivant la détection électrochimique du ferrocyanure utilisent des électrodes modifiées (par du dodécylsulfate de sodium²⁴⁶, du 1-butyl 4-méthylpyridinium tétrafluoroborate²⁴⁷ ou encore des nanotubes de carbone²⁴⁸). Leur sensibilité de détection est généralement plus élevée que celle du système à 96 électrodes grâce à une meilleure conductivité électronique, en particulier en présence de nanotubes de carbone, mais ils possèdent des gammes linéaires plus restreintes. La détection du ferricyanure à l'aide des plaques de criblage électrochimique offre donc des performances comparables à ces autres systèmes électrochimiques.

Tableau 37. Comparaison des performances de détection du ferrocyanure du système 96 électrodes avec d'autres systèmes électrochimiques.

Électrode	Gamme linéaire (mM)	Sensibilité ($\text{mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$)	Référence
Pâte de carbone + dodécyl sulfate de sodium	1 – 3	460	²⁴⁶
Pâte de carbone + 1-butyl 4-méthylpyridinium tétrafluoroborate	0,5 – 3	198	²⁴⁷
Carbone vitreux + film de nanotubes de carbone et d'oxyde de titane	0,01 – 0,2	1100	²⁴⁸
Carbone sérigraphié	0,1 – 6	212	²⁴⁹

III. Mesure d'activité TK par IPA

Le ferrocyanure étant détectable par IPA à l'aide des électrodes de carbone sérigraphié, cette méthode a été utilisée pour détecter l'activité de la TK. L'intermédiaire réactionnel (DHETPP), formé lors de la réaction entre la TK, la thiamine pyrophosphate (TPP) et un substrat donneur, est oxydé par le ferricyanure alors réduit en ferrocyanure, détecté par IPA sous

l'application d'un potentiel de +0,56 V vs. Ag/AgCl. Comme pour les mesures d'activité oxydases, plusieurs paramètres ont été optimisés afin d'avoir une sensibilité de détection maximale.

III.1. Temps de réaction enzymatique

Afin d'accumuler une quantité de ferrocyanure (issue de l'oxydation de l'intermédiaire réactionnel par le ferricyanure) suffisante pour avoir un signal mesurable, le temps de réaction a été optimisé. Pour cela, la densité de courant a été mesurée pendant 2 minutes en présence de l'enzyme, d'une concentration saturante de substrat donneur (le L-ery) et de concentrations variables de TPP (son cofacteur) pour différents temps de réaction enzymatique. De manière analogue aux mesures d'activité GAOx, les courbes obtenues ont une allure hyperbolique, témoignant d'une étape limitante (la réaction enzymatique ou l'oxydation chimique) à partir d'une certaine concentration en substrat (*Figure 85A*).

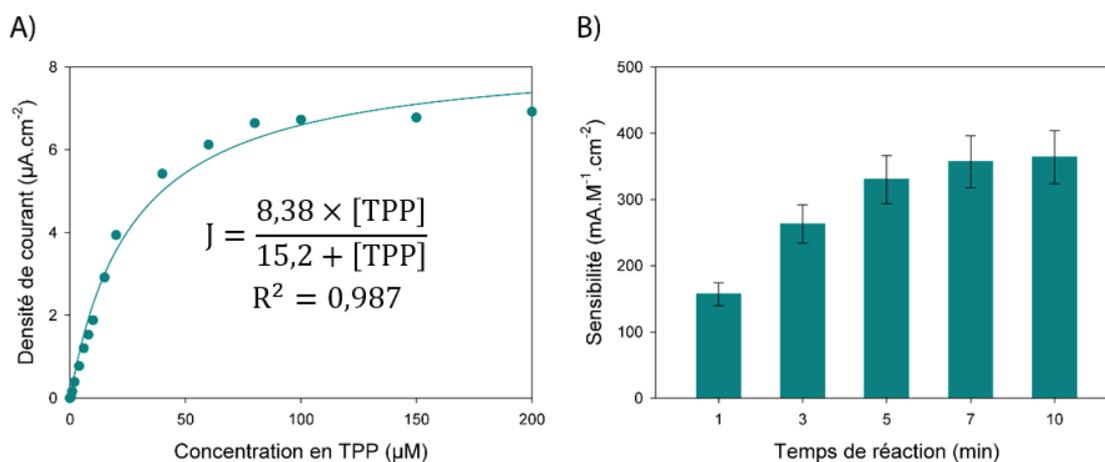


Figure 85. Optimisation du temps de réaction enzymatique. A) Mesure de la densité de courant (+0,56 V vs. Ag/AgCl, fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 82 ms, temps de mesure 2 minutes) en présence de TK 13,9 µg, 0,1 mM de $K_3Fe(CN)_6$, 1 mM de $MgCl_2$, 1 mM de L-ery et 0 à 200 µM de TPP après 5 minutes de réaction (tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M). La courbe en trait plein a été obtenue par ajustement des données avec un modèle hyperbolique dont l'équation est présente sur la courbe. B) Sensibilité de détection de la TPP en fonction du temps de réaction enzymatique ($n=3$).

Une fonction hyperbolique est utilisée pour ajuster les données obtenues et ainsi déterminer la densité de courant maximale (J_{max}) et la valeur de $K_{0,5}$, correspondant à la concentration en TPP nécessaire pour atteindre la moitié du signal maximal.

Ces premières mesures d'activité permettent de constater, dans un premier temps, que la densité de courant à +0,56 V vs. Ag/AgCl augmente après réaction enzymatique, ce qui montre que l'intermédiaire réactionnel DHETPP est formé et oxydé par le ferricyanure présent dans le milieu réactionnel (*Figure 85A*). Dans un second temps, les sensibilités de détection de la TPP ont été calculées pour différents temps de réaction compris entre 1 et 10 minutes (*Figure 85B*). Cette sensibilité augmente jusqu'à 5 minutes de réaction pour atteindre une valeur maximale de 330 mA.M⁻¹.cm⁻². La réaction aura donc lieu pendant 5 minutes au terme desquelles le ferrocyanure formé sera oxydé pendant 2 minutes. Dans ces conditions, la densité maximale de courant est de 8,38 µA.cm⁻² et la valeur de K_{0,5} de 15,2 µM. Le K_{0,5} étant la concentration nécessaire pour atteindre la moitié de J_{max}, elle peut s'apparenter à la constante de Michaelis-Menten (K_M) dans une étude enzymologique classique. Le K_M de la TK d'*E. coli* pour la TPP n'a pas été décrit cependant, cette valeur oscille entre 0,2 et 7 µM pour les TK d'autres organismes. La valeur de K_{0,5} est donc plus élevée. Cette différence peut s'expliquer par la méthode utilisée : le signal mesuré dépend d'une part, de la constante de vitesse enzymatique (k_{cat}) et, d'autre part, de la constante de vitesse de l'oxydation de l'intermédiaire DHETPP par le ferricyanure. Ainsi, les paramètres mesurés ne sont pas seulement représentatifs de l'activité TK mais aussi de la réaction chimique. Il serait nécessaire de pouvoir caractériser cette réaction chimique et déterminer les constantes associées afin d'accéder aux paramètres enzymatiques réels. De plus, les paramètres cinétiques décrits dans la littérature sont déterminés en présence des deux substrats (donneur et accepteur). Dans cette méthode, seul le substrat donneur est utilisé, les paramètres mesurés ne sont donc pas totalement comparables. Cependant, cette méthode fournit des signaux représentant l'activité de la TK et permettant de caractériser la saturation de l'enzyme par la TPP en déterminant des constantes apparentes (K_{0,5}).

III.2. Influence de la concentration en ferricyanure

Un des paramètres les plus importants au cours de ces mesures d'activité est la concentration en ferricyanure permettant l'oxydation de l'intermédiaire réactionnel. Elle doit être suffisamment élevée pour que l'étape chimique d'oxydation de l'intermédiaire ne soit pas limitante et pour que les variations de courant mesurées soient représentatives de l'activité de la TK. La densité de courant a donc été mesurée en présence de TK, de concentrations saturantes en magnésium (1 mM), TPP (0,2 mM) et L-ery (1 mM) et de 0 à 10 mM de ferrocyanure après 5

minutes de réaction (*Figure 86A*). La densité de courant mesurée après réaction enzymatique (appelé J_{reac}) augmente avec la concentration en ferrocyanure jusqu'à $19 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$. Cependant, la densité de courant mesurée avant l'ajout de L-ery (appelé J_0), c'est à dire, le bruit de fond, augmente également (jusqu'à $9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$). Afin de sélectionner les meilleures conditions, les rapports J_{reac}/J_0 (correspondant au rapport signal/bruit) ont été calculés et le rapport le plus élevé a été obtenu pour une concentration en ferrocyanure de 0,1 mM (*Figure 86B*). A cette concentration, 36% de ferricyanure présent initialement sont réduits en ferrocyanure *via* l'oxydation de l'intermédiaire réactionnel. Dans ces conditions saturantes en substrats, la quantité d'oxydant n'est pas limitante, mais la vitesse électrochimique peut l'être. Malgré le faible signal maximal pouvant être mesuré dans ces conditions ($9 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$), la concentration optimale de ferricyanure est donc de 0,1 mM.

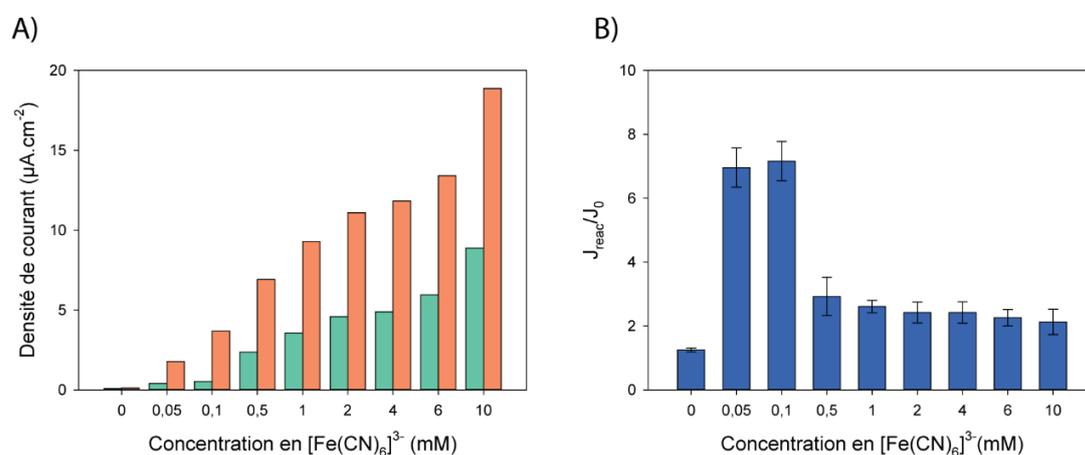


Figure 86. Détermination de la concentration optimale en ferricyanure. A) Densité de courant mesurée en présence de 1 mM de MgCl_2 , 13,9 μg de TK, 0,2 mM de TPP, de 0 à 10 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ avant (en vert) et après 5 minutes de réaction (en orange) déclenchée par l'ajout de 1 mM de L-ery (Tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 mM, potentiel +0,56 V vs. Ag/AgCl, fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 82 ms et temps de mesure 2 min, $n=3$). B) Rapports J_{reac}/J_0 calculés à partir du graphe A) en fonction de la concentration en ferricyanure.

III.3. Influence de la quantité d'enzyme

La quantité d'enzyme doit également être optimisée. En présence de 0,1 mM de ferricyanure, l'activité de 0 à 30 μg de TK a été mesurée en présence de concentrations saturantes en TPP (0,2 mM) et L-ery (1 mM) (*Figure 87*). La densité de courant augmente jusqu'à une valeur limite de $14,8 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ obtenue avec 13,9 μg de TK. Cette quantité d'enzyme sera ainsi utilisée pour les mesures d'activité.

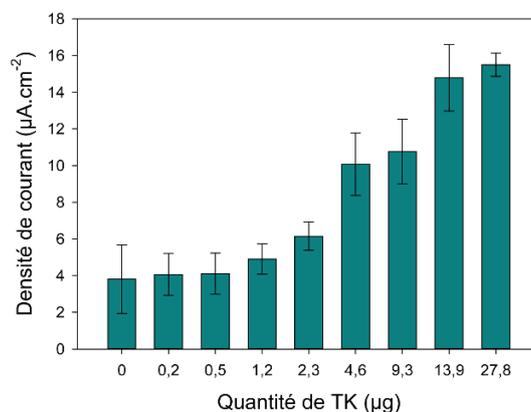


Figure 87. Détermination de la quantité optimale de TK. La densité de courant a été mesurée en présence de 1 mM de $MgCl_2$, 0,1 mM de $K_3Fe(CN)_6$, 1 mM de L-ery, 0,2 mM de TPP et 0 à 27,8 µg de TK (Tampon Hepes 0,05 M pH 7,0 KCl 0,1 mM, potentiel 0,56 V vs. Ag/AgCl, fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 82 ms, temps de réaction 5 min et temps de mesure 2 min ; n=3).

En 1982, Kochetov et *al.* étaient les premiers à mesurer l'activité de la TK *via* l'oxydation de l'intermédiaire DHETPP par le ferricyanure. La consommation de ce dernier était suivie par spectrophotométrie en mesurant la diminution de l'absorbance à 420 nm. En raison d'un faible coefficient d'absorption molaire du ferrocyanure ($1000 M^{-1}.cm^{-1}$), une quantité élevée de TK était utilisée dans ce test (environ 300 µg) afin d'obtenir des variations d'absorbance mesurables. Par la suite, Halma et *al.* se sont basés sur ce principe pour développer le test électrochimique utilisé dans ces travaux de thèse. Dans ce système, 150 µg de TK sont immobilisés sur une électrode de carbone vitreux, plongée dans le milieu réactionnel. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont donc permis de diviser par 20 la quantité d'enzyme nécessaire dans ce test, cependant contrairement au système électrochimique précédent, les électrodes ne sont pas réutilisables et la TK n'est pas immobilisée.

III.4. Influence du substrat donneur

Le chapitre I portant sur l'étude bibliographique a indiqué que la TK possédait un large spectre de substrats. Cette méthode directe de mesure d'activité TK nécessite uniquement l'intervention du substrat donneur. La validité de cette méthode en présence d'autres substrats donneurs a été

vérifiée en mesurant l'activité de la TK en présence de fructose-6-phosphate (F6P), de L-erythrose (L-ery) ou d'hydroxypyruvate (HPA) (Figure 88).

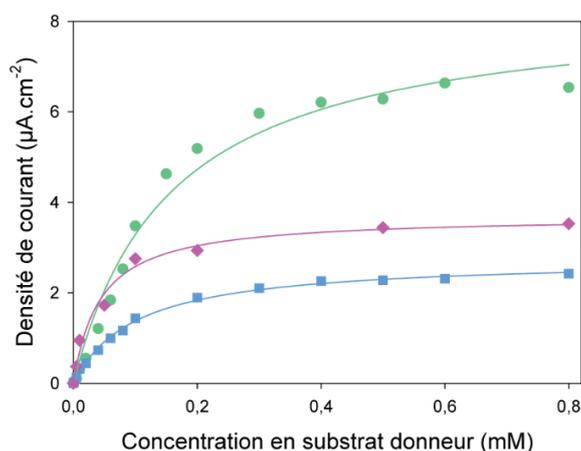


Figure 88. Mesure de l'activité TK en présence de 0,1 mM de ferrocyanure, 1 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de TPP et de 0 à 0,8 mM de L-erythrose (ronds verts), hydroxypyruvate (losanges violets) ou fructose-6-phosphate (carrés bleus) (Tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 mM, potentiel 0,56 V vs. Ag/AgCl, fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 82 ms, temps de réaction 5 min et temps de mesure 2 min).

La sensibilité de détection, la limite de détection, la densité de courant maximale et les valeurs de $K_{0,5}$ ont été déterminées pour chaque substrat (Tableau 38). En utilisant le L-ery comme substrat, la valeur de $K_{0,5}$ (156 μM), la sensibilité (32 $mA \cdot M^{-1} \cdot cm^{-2}$) et la densité de courant maximale (8,4 $\mu A \cdot cm^{-2}$) sont plus élevées que pour les deux autres substrats. Le L-ery constitue donc un meilleur substrat donneur de la TK par rapport au F6P ou à l'HPA. De plus, ces performances de détection ont été comparées avec celles obtenues avec le système décrit par Halma et *al.*¹⁷¹ Avec ce système constitué d'une électrode de carbone plongée dans un milieu réactionnel sous agitation, le L-ery apparaît également comme le meilleur substrat donneur mais les sensibilités mesurées sont 3 à 4 fois plus élevées que pour le système à 96 électrodes. Ceci peut être dû à une qualité supérieure du carbone utilisé ou encore à l'agitation du milieu réactionnel pouvant favoriser la diffusion des substrats à l'enzyme immobilisée à la surface de l'électrode. Cependant, les gammes linéaires sont plus restreintes et les densités de courant maximales sont plus faibles avec ce système à une électrode.

La détection de l'activité TK à l'aide des plaques de criblage électrochimique a donc des performances comparables au système à une électrode développé par Halma et *al.* Cependant, dans

le cadre du criblage d'inhibiteurs de la TK, le système haut débit a un grand intérêt puisque 96 mesures d'activité TK peuvent être réalisées en 7 minutes (5 minutes de réaction et 2 minutes de mesures), ce qui n'était pas réalisable avec le système précédent.

Tableau 38. Comparaison des performances de détection (densité de courant maximale (J_{max}), gamme linéaire, sensibilité et valeur de $K_{0,5}$) de chacun des substrats de la TK et comparaison avec le système développé par Halma et al.¹⁷¹ ND = non déterminé.

Substrat donneur	Plaque de criblage électrochimique				Système développé par Halma et al.			
	J_{max} ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Gamme linéaire (μM)	Sensibilité ($\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$K_{0,5}$ (μM)	J_{max} ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Gamme linéaire (μM)	Sensibilité ($\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$K_{0,5}$ (μM)
L-ery	$8,4 \pm 0,1$	1 – 150	32 ± 1	156 ± 2	4,2	1 – 19	90	ND
HPA	$3,7 \pm 0,7$	5 – 100	25 ± 4	43 ± 9	ND	ND	ND	ND
F6P	$2,8 \pm 0,2$	1 – 10	14 ± 2	100 ± 7	4,6	1 – 37	55	ND

III.5. Immobilisation de la TK dans HDL

Le rapprochement de l'enzyme vers l'électrode *via* son immobilisation avait permis d'augmenter la sensibilité de détection lors de mesures d'activité oxydase. De manière analogue, la TK a été immobilisée dans une matrice particulière, les hydroxydes double lamellaires (HDL), présentés dans le Chapitre III. L'argile minérale utilisée pour immobiliser la TK, de formule $\text{Mg}_2\text{-Al-NO}_3$, a été synthétisée par l'ICCF et a été décrite comme l'argile de composition optimale pour l'immobilisation de cette enzyme.^{171,250} La TK a donc été adsorbée à la surface des électrodes en absence (TK adsorbée) ou en présence de cet HDL (TK@HDL) et son activité enzymatique a été mesurée en présence de 0 à 200 μM TPP. Les performances de détection de la TPP ont été comparées pour l'enzyme en solution, adsorbée seule ou co-adsorbée en présence de l'HDL (Tableau 39).

Les sensibilités de détection de la TPP sont plus faibles en présence de l'enzyme adsorbée ($129 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) ou de la TK@HDL ($69 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$) qu'en présence de l'enzyme en solution ($166 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$). Le rapprochement de l'enzyme vers l'électrode ne permet donc pas d'améliorer la détection électrochimique. De plus, la valeur de $K_{0,5}$ est plus élevée lorsque l'enzyme est immobilisée (33 μM pour la TK adsorbée et 37 μM pour la TK@HDL). Un problème de diffusion du ferricyanure au sein de la matrice d'immobilisation peut être une raison de ces différences avec l'enzyme immobilisée. Malgré des densités de courant maximales et des gammes

linéaires quasi-inchangées, l'immobilisation de la TK ne permet pas d'augmenter les performances de détection de la TPP.

Tableau 39. Comparaison des performances de détection de la TPP utilisant la TK en solution, adsorbée seule ou co-adsorbée à la surface des électrodes (TK@HDL). La densité de courant maximale (J_{max}), la gamme linéaire, la sensibilité de détection de la TPP et la valeur de $K_{0,5}$ sont comparées pour le système de criblage électrochimique et le système développé par Halma et al.¹⁷¹ ND = non déterminé.

Etat de l'enzyme	Plaque de criblage électrochimique				Système développé par Halma et al.		
	J_{max} ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Gamme linéaire (μM)	Sensibilité ($\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	$K_{0,5}$ (μM)	J_{max} ($\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Gamme linéaire (μM)	Sensibilité ($\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)
TK en solution	$8,4 \pm 0,1$	0,5 – 20	166 ± 12	15 ± 1	ND	ND	ND
TK adsorbée	$8,0 \pm 0,6$	1 – 10	129 ± 17	33 ± 3	ND	ND	ND
TK@HDL	$8,3 \pm 0,4$	1 – 20	69 ± 18	37 ± 2	6,0	1 – 19	3831

Les résultats obtenus en présence de TK@HDL ont été comparés à ceux obtenus avec le système décrit par Halma et al.¹⁷¹ Malgré une densité de courant maximale plus élevée avec les PCE ($8,3 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ contre $6,0 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$), l'électrode plongeante, utilisée par Halma et al., permet d'avoir une sensibilité 55 fois plus importante ($3831 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ contre $69 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour les PCE) et une limite de détection beaucoup plus faible ($0,02 \mu\text{M}$ contre $1 \mu\text{M}$ pour les PCE). L'immobilisation de la TK sur les électrodes sérigraphiées des PCE n'est donc pas avantageuse dans le cas du système haut débit. C'est pourquoi, la suite des travaux a été réalisée en utilisant de l'enzyme en solution.

III.6. Influence du diméthylsulfoxyde sur l'activité enzymatique

Le but de ce projet de thèse est de montrer que le criblage d'inhibiteurs d'enzyme est réalisable à l'aide des plaques de criblage électrochimique. La TK d'*E. coli* servant d'enzyme modèle, une banque de molécules (ou chimiothèque) va être criblée afin d'identifier d'éventuels inhibiteurs de cette enzyme. La plupart des chimiothèques conservent les molécules dans un solvant permettant la dissolution du plus grand nombre d'entre elles, le diméthylsulfoxyde (ou DMSO). Avant de réaliser le criblage de la banque de molécules, il est nécessaire de vérifier l'influence du DMSO sur l'activité de l'enzyme. L'activité de la TK a donc été mesurée en présence de $0,01 \text{ mM}$ de TPP (concentration proche de la valeur du $K_{0,5}$) et de 0 à 20% (volume/volume) de DMSO et le

rapport du signal mesuré après réaction sur le signal mesuré avant réaction (J_{reac}/J_0) a été déterminé dans chacune des conditions (Figure 89).

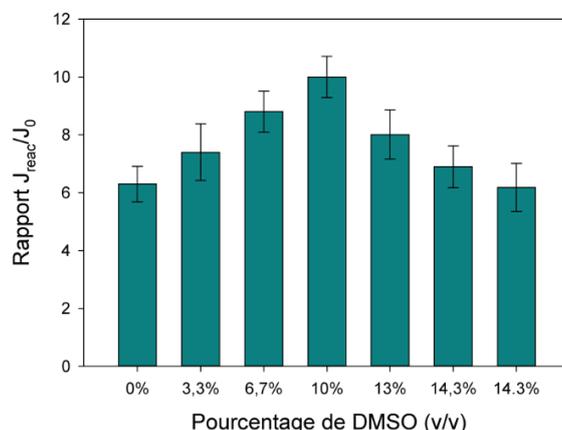


Figure 89. Influence du DMSO sur l'activité enzymatique : mesure de l'activité de la TK en solution (13,9 μg) en présence de 1 mM de MgCl_2 , 0,1 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0,01 mM de TPP, 1 mM de L-ery et de 0 à 20% (v/v) de DMSO (tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M, potentiel +0,56 V vs. Ag/AgCl, fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 82 ms, temps de réaction 5 minutes et temps de mesure 2 minutes ; $n=3$). Les résultats sont présentés sous la forme de rapports du signal mesuré après réaction sur le signal mesuré avant réaction (J_{reac}/J_0).

En présence de faible quantité de DMSO (jusqu'à 10% v/v), le rapport J_{reac}/J_0 augmente jusqu'à une valeur de 10. Les raisons de cette augmentation sont complexes mais une meilleure diffusion des substrats jusqu'à l'enzyme et des produits d'oxydation jusqu'à l'électrode peut en être à l'origine. Cependant, au-delà de 10% (v/v) de DMSO, la sensibilité diminue. A cette concentration le DMSO devient délétère pour l'enzyme qui peut se retrouver dénaturée par ce solvant. Cette valeur limite de DMSO a été par la suite respectée pour le criblage d'inhibiteurs.

III.7. Mesure de l'activité TK à l'aide d'électrode de carbone dopées au Bleu de Prusse

Les électrodes de carbone dopée au Bleu de Prusse ont été utilisées pour le développement du premier système rapporteur de l'activité TK, basé sur la détection de l' H_2O_2 produit par une oxydase rapportrice. Le Bleu de Prusse, de formule $\text{Fe}_4^{\text{III}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$ étant constitué de ferrocyanure, les électrodes de carbone-Bleu de Prusse (C-BP) ont été utilisées pour détecter l'activité TK par le second système rapporteur. L'oxydation de l'intermédiaire DHETPP par le

ferricyanure en solution entraîne la production de ferrocyanure. Celui-ci peut ensuite être ré-oxydé par le BP présent dans l'encre de carbone et l'application d'un potentiel oxydant permettra la ré-oxydation de ce BP réduit (*Figure 90*).

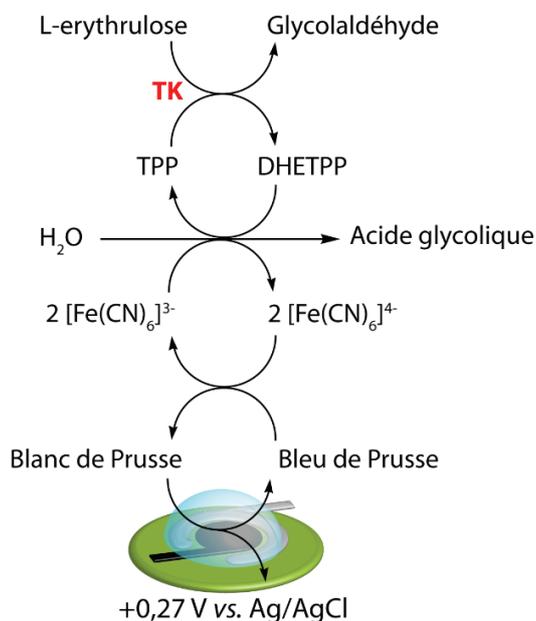


Figure 90. Schéma de principe de l'oxydation de ferrocyanure en solution (obtenu par oxydation de l'intermédiaire réactionnel DHETPP) par les électrodes de carbone dopées au Bleu de Prusse.

L'intérêt d'utiliser ces électrodes est que le potentiel d'oxydation du ferrocyanure est plus faible que pour les électrodes de carbone simple (+0,27 V vs. Ag/AgCl contre +0,56 V vs. Ag/AgCl), ce qui pourrait réduire les interférences électrochimiques associées à l'utilisation d'un potentiel élevé. Après avoir réalisé une courbe de calibration du ferrocyanure à l'aide des électrodes carbone-BP, ces dernières ont été utilisées pour mesurer l'activité de la TK. De même que dans le paragraphe III.2.1., 0 à 10 mM de ferricyanure ont été utilisées et la densité de courant a été mesurée avant (J_0) et après (J_{reac}) la réaction enzymatique (*Figure 91A*). La densité de courant après réaction augmente avec la concentration en ferricyanure pour atteindre un maximum de $52 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 2 mM. Cependant, la densité de courant avant réaction, représentant le bruit de fond, augmente également de manière non négligeable et devient même supérieur au signal après réaction en présence de 10 mM de ferricyanure. Les rapports J_{reac}/J_0 ont été calculés afin de sélectionner la meilleure condition et de comparer les résultats avec les électrodes de carbone (*Figure 91B*). Le rapport le plus élevé est de 5,8 en présence de 0,1 mM de ferricyanure, cependant, en utilisant les

électrodes de carbone, ce rapport était de 16. Le bruit de fond étant plus élevé avec les électrodes de carbone-BP, les rapports J_{reac}/J_0 sont donc plus faibles. L'introduction de particules de BP dans l'encre n'apporte pas d'amélioration de la détection de l'activité TK. Ce sont donc les électrodes de carbone qui ont été utilisées pour le criblage d'inhibiteurs de la TK.

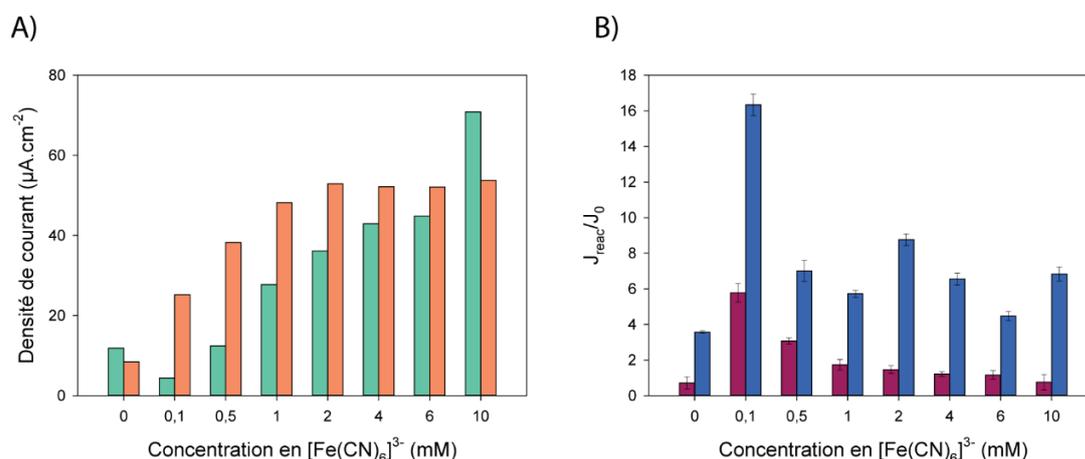


Figure 91. A) Mesure de l'activité de la TK (13,9 µg) en présence de MgCl_2 1 mM, TPP 0,2 mM et 0 à 10 mM en ferricyanure avant (en vert) et après réaction enzymatique (en orange) déclenchée par l'ajout de L-ery 1 mM (Tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M, potentiel +0,27 V vs. Ag/AgCl, fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 82 ms, temps de réaction 5 minutes, temps de mesure 2 minutes). B) Rapports J_{reac}/J_0 en fonction de la concentration en ferricyanure déterminés à partir des mesures réalisées sur les électrodes carbone (en bleu) ou les électrodes carbone-BP (en violet) ($n=3$).

III.10. Reproductibilité sur la mesure d'activité

Avant de réaliser le criblage d'inhibiteurs, il est important de pouvoir juger de la qualité et de la robustesse de ce nouveau système haut débit de mesure d'activité TK. Le facteur Z, décrit dans le Chapitre I, a été déterminé pour la détection directe de ferrocyanure afin de juger de la variabilité inter-électrodes, et pour la détection d'activité TK. Pour la détection de ferrocyanure, 40 électrodes ont été utilisées comme contrôle négatif en présence de tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M et 40 autres électrodes comme contrôle positif en présence de 0,1 mM de ferrocyanure (Figure 92A). Ces mesures ont permis d'obtenir un facteur Z de 0,64 (Tableau 40), ce qui, comme l'ont décrit Zhang et al., correspond à un crible d'excellente qualité et montre que les électrodes sont de qualité suffisante pour détecter de façon sensible et reproductible le ferrocyanure.⁶²

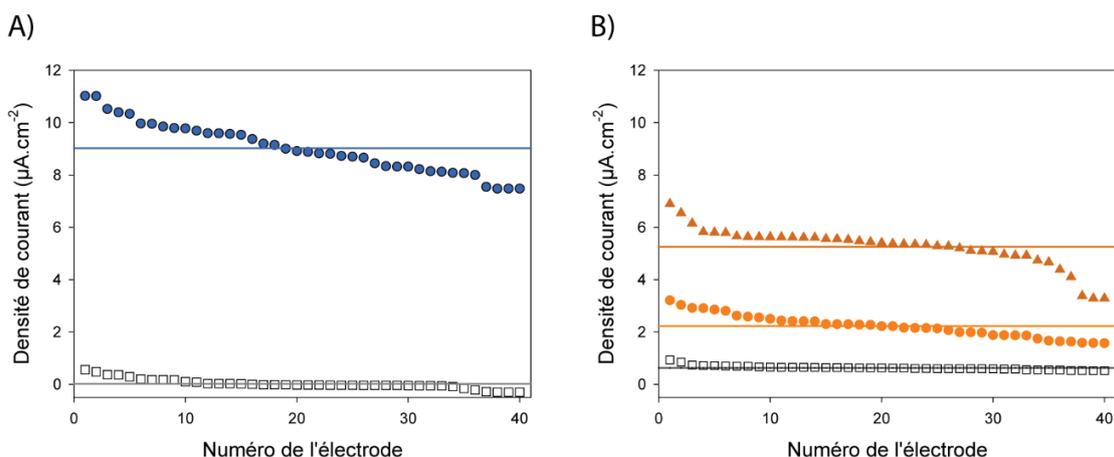


Figure 92. Variabilité de A) la détection de ferrocyanure et B) de la mesure d'activité TK par IPA. A) Mesure de la densité de courant dans un tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M (40 électrodes, carrés blancs) ou de ferrocyanure 0,1 mM (40 électrodes, ronds bleus). B) Mesure de la densité de courant en présence de 13,9 µg de TK, 0,1 mM de ferricyanure, 1 mM de MgCl₂, 1 mM de L-ery et 0,2 mM (40 électrodes, triangles oranges) ou 0,01 mM de TPP (40 électrodes, ronds oranges). Les carrés blancs ont été mesurés en absence de TPP (Potentiel +0,56 V vs. Ag/AgCl, fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 82 ms, temps de mesure 2 min). Les signaux ont été triés par ordre décroissant.

Tableau 40. Valeurs des facteurs Z déterminées pour la détection de ferrocyanure et pour la mesure d'activité (avec une concentration en TPP saturante ou proche de la valeur du K_{0,5} et à l'aide des électrodes carbone ou carbone-BP.

	Facteur Z	
	Carbone	Carbone-BP
Détection de ferrocyanure	0,64	0,51
Mesure d'activité TK (TPP saturant)	0,50	0,31
Mesure d'activité TK (TPP proche du K _{0,5})	0	<0

Pour cette étude, l'activité TK a été mesurée en présence d'une concentration saturante en TPP (0,2 mM) et en présence d'une concentration en TPP proche de la valeur du K_{0,5} (0,01 mM) (Figure 92B). Le contrôle négatif a été réalisé à l'aide de 40 électrodes dans le milieu réactionnel déterminé précédemment (constitué du ferricyanure, de la TK, du magnésium et du L-ery) en absence de TPP. Un facteur Z de 0,5 a été déterminé en présence d'une concentration saturante en TPP (Tableau 40). Dans ce cas, la qualité du test haut débit permet de réaliser un criblage de façon robuste permettant de mettre en évidence des inhibiteurs dont la fixation n'entre pas en compétition avec la TPP (inhibiteurs non compétitifs). En revanche, en présence de 0,01 mM de TPP, un facteur Z proche de 0 a été obtenu. En plus d'une variabilité non négligeable (représentée par coefficient de variation de 19%), ce faible facteur Z est dû à un signal mesuré qui est très faible par rapport au contrôle (5,3 µA.cm⁻² de moyenne contre 2,2 µA.cm⁻² pour le contrôle). Dans ce cas, un contrôle interne, correspondant au signal fourni par une molécule redox de concentration connue,

n'interférant pas dans la mesure d'activité, devrait être utilisée afin de normaliser les signaux de chaque électrode. Malgré cette faible valeur de facteur Z, un criblage de molécules dans ces conditions permettrait de mettre en évidence des inhibiteurs entrant en compétition avec la fixation de la TPP (inhibiteurs compétitifs de la TPP).

De plus, cette série de mesure nous permet de déterminer le pourcentage de ferrocyanure produit par l'oxydation de l'intermédiaire réactionnel et qui est détecté pendant les deux minutes de mesure. En présence d'une concentration saturante en TPP, 50% du ferricyanure (représentant 0,05 mM) présent initialement dans le milieu réactionnel sont convertis et détectés par IPA. En présence de 10 μ M de TPP, 18% de ferricyanure oxydent l'intermédiaire réactionnel. Ceci confirme que la totalité du ferricyanure n'a pas été consommé dans les deux conditions et que la réaction enzymatique n'est pas limitée par la quantité d'oxydant présente. Cependant, plus de 10% du ferricyanure sont convertis, nous ne sommes donc plus en vitesse initiale dans ces conditions.

Enfin, parallèlement, la même expérience a été réalisée avec les électrodes de carbone-BP présentées dans le paragraphe précédent. Pour la détection du ferricyanure, un facteur Z de 0,51 a été obtenu et pour la mesure d'activité en présence d'une concentration saturante en TPP, ce facteur Z est de 0,31 (*Tableau 40*). Ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues avec les électrodes de carbone. Ceci s'explique par le fait que la variabilité mesurée avec les électrodes de carbone-BP est beaucoup plus importante (représentée par un coefficient de variation de 34% pour le contrôle et 15% pour la mesure d'activité) et est probablement due à une variabilité inter-électrode de la quantité de particules de BP présente dans l'encre. Ceci entraîne une augmentation du bruit de fond et de la variabilité lors de la mesure d'activité, ce type d'électrode n'a donc pas été retenu pour le criblage d'inhibiteurs de la TK.

III.11. Comparaison avec le système bienzymatique TK-GAOx

Durant de ces travaux de thèse, deux systèmes rapporteurs de l'activité TK ont été étudiés : un système impliquant une enzyme auxiliaire, la galactose oxydase (étudié dans la Chapitre III) et un système basé sur le piégeage d'un intermédiaire réactionnel faisant intervenir un oxydant. Avant d'utiliser l'un de ces systèmes rapporteurs pour cribler des inhibiteurs de la TK, il est nécessaire de sélectionner le plus adapté aux conditions de criblage. Le *Tableau 41* compare ces deux systèmes rapporteurs sur différents points.

Tableau 41. Comparaison de la méthode bienzymatique (TK-GAOx) et de la méthode directe (oxydation par le ferricyanure) de mesure d'activité TK développées dans cette thèse.

Paramètre	Méthode bienzymatique TK-GAOx	Piégeage oxydatif de l'intermédiaire réactionnel
Bruit de fond	5000 nA	100 nA
Temps de mesure	60 minutes	7 minutes
Enzyme auxiliaire	Oui (GAOx)	Non
Immobilisation d'enzyme	Nécessaire pour la GAOx	Non
Variabilité		
Coefficient de variabilité	19% (détection d'H ₂ O ₂)	10% (détection du ferrocyanure)
Facteur Z	0,48 (GAOx)	0,50 (TK)

Tout d'abord, la présence d'une enzyme auxiliaire est un inconvénient puisque dans le cadre d'un criblage d'inhibiteurs, cette seconde enzyme peut être ciblée par l'inhibiteur, créant des faux positifs. De plus, la GAOx ne fonctionnant pas au même pH que la TK, son immobilisation dans une matrice particulière est nécessaire afin de lui conférer un microenvironnement adapté, et ainsi augmenter les performances de détection.

La présence de particules de Bleu de Prusse dans les électrodes utilisées pour détecter l'H₂O₂ formé par le système bi-enzymatique, entraîne un bruit de fond (correspondant à l'intensité de courant mesurée avant la réaction enzymatique) élevé (de l'ordre de 5000 nA). Ce problème n'est pas rencontré avec la méthode directe puisque des électrodes dépourvues de Bleu de Prusse sont utilisées. De plus, la concentration en ferricyanure utilisée pour oxyder l'intermédiaire réactionnel a été optimisée pour avoir un bruit de fond minimal.

Le deuxième point de comparaison est le temps de réaction enzymatique nécessaire pour avoir un signal d'activité TK significatif. Il est de 60 minutes pour la méthode bi-enzymatique, ce qui nécessite un volume réactionnel plus élevé (minimum 100 µl) afin de limiter des effets dus à l'évaporation pendant ce long temps de réaction. Cette réaction ne peut donc avoir lieu sur les électrodes puisqu'elles peuvent accueillir des volumes de 30 à 50 µl. En revanche, pour la méthode directe, le temps de réaction est seulement de 7 minutes, ce qui permet d'incuber le milieu réactionnel directement sur les électrodes.

Enfin, la variabilité du test est un point crucial pour une méthode de criblage. La détection d'H₂O₂ engendre une variabilité plus élevée (19% de coefficient de variabilité) que la détection du ferrocyanure (10%). Cette différence est majoritairement due à la présence des particules de BP

nécessaires à la détection de l' H_2O_2 , dont la quantité et l'état d'oxydation sont difficilement contrôlables. De plus, la mesure des facteurs Z permet également de comparer les deux méthodes : il est de 0,5 pour la méthode directe en présence de concentrations saturantes en substrat. Pour la méthode bi-enzymatique, le facteur Z associé à la mesure d'activité TK n'a pas été déterminé mais il est seulement de 0,48 pour la mesure d'activité GAOx. Nous pouvons supposer que ce facteur va encore diminuer lorsque l'activité TK sera mesurée à l'aide de la GAOx.

Au vu des nombreux avantages qu'apporte la méthode directe, celle-ci a été utilisée pour cribler un grand nombre de molécules afin d'identifier de nouveaux inhibiteurs de la TK.

IV. Criblage d'inhibiteurs de la transcétolase d'*E.Coli*

Les conditions de mesure de l'activité TK par la méthode directe étant optimisées, cette méthode a été utilisée à haut débit pour cribler une partie de la chimiothèque de l'ICBMS. Cette étape permet de mettre en évidence le potentiel du système électrochimique à haut débit pour le criblage d'inhibiteurs d'enzymes.

IV.1. Validation de la preuve de concept avec des inhibiteurs connus de la TK

Avant de procéder au criblage de la chimiothèque, il est nécessaire de vérifier qu'une inhibition de la TK peut être mesurée avec ce test électrochimique. Des inhibiteurs connus de la TK de *S. cerevisiae* ont ainsi été testés : la thiamine¹⁴⁰, l'oxythiamine¹⁴¹, le pyrophosphate¹⁴⁰ qui sont des analogues à la TPP et l'hydrophénylpyruvate qui est un analogue au substrat donneur¹⁴⁸ (Figure 93).

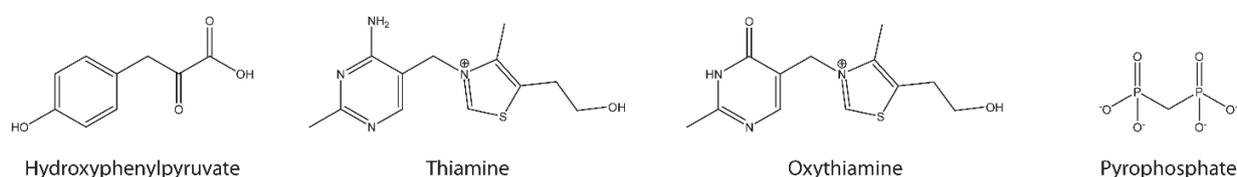


Figure 93. Structure des inhibiteurs de la TK de *S. cerevisiae* : analogue du substrat donneur (hydroxyphénylpyruvate) et de la TPP (thiamine, oxythiamine et pyrophosphate).

Ainsi, l'activité de la TK a ainsi été mesurée en présence de 0,01 mM de TPP et de 1 mM de chacun de ces inhibiteurs (*Figure 94A*). L'oxythiamine apparaît comme l'inhibiteur le plus efficace avec 85% d'inhibition mesurée. Une inhibition est aussi observée en présence de thiamine (34%) et de pyrophosphate (74%).

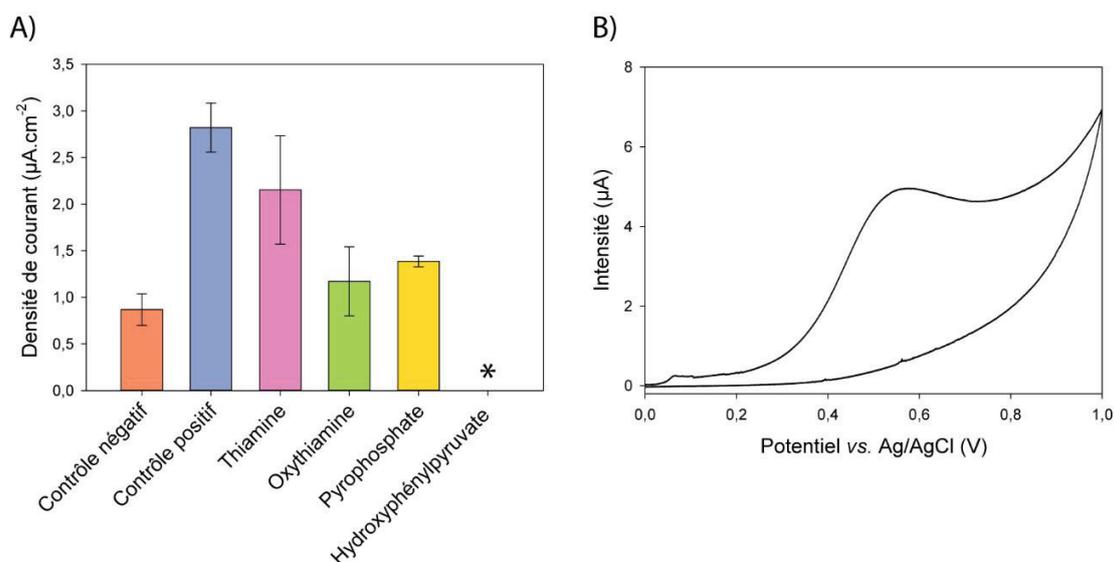


Figure 94. Preuve de concept de l'inhibition de la TK par des inhibiteurs connus. A) Mesure de l'activité de la TK (13,9 µg) en présence de 0,01 mM de TPP, 0,1 mM de K₃Fe(CN)₆, 1 mM de MgCl₂, 1 mM de L-ery et 1 mM d'inhibiteur (thiamine, oxythiamine, pyrophosphate et hydroxyphénylpyruvate). Les contrôles positifs et négatifs ont été mesurés en absence d'inhibiteurs mais en présence de 10% (v/v) de DMSO. Le contrôle négatif correspond au signal en absence de TPP. L'étoile fait référence à un signal non représentatif de l'activité de la TK (voir explication dans le texte). B) Voltammétrie cyclique du carbone (entre 0 et +1 V vs. Ag/AgCl) réalisée en présence de 1 mM d'hydroxyphénylpyruvate (tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M, vitesse de balayage = 20 mV.s⁻¹).

En revanche, en présence d'hydroxyphénylpyruvate, aucune inhibition n'a pu être mise en évidence car, dans ce cas, la densité de courant mesurée n'est pas représentative de l'activité de la TK : en effet, l'hydroxyphénylpyruvate est oxydé par l'électrode de carbone au potentiel de travail conduisant à un bruit de fond élevé (de l'ordre de 5000 nA). Cette oxydation a été vérifiée par voltammétrie cyclique (*Figure 94B*) et un pic d'oxydation à +0,57 V vs. Ag/AgCl (potentiel proche du potentiel d'oxydation du ferrocyanure), provenant de l'oxydation du noyau phénol, a été mis en évidence.

Lors du criblage de molécules issues de la chimiothèque, une attention particulière sera portée sur le bruit de fond (mesuré avant la réaction enzymatique) afin de mettre en évidence les « faux

positifs » représentés par les molécules électrosensibles au potentiel de travail. Ces molécules seront alors exclues des résultats du criblage.

IV.2. Criblage d'une partie de la chimiothèque de l'ICBMS

Le test électrochimique permettant la mesure d'activité à haut débit a été utilisé afin de cribler une partie des molécules composant la chimiothèque de l'ICBMS dans le but de trouver de nouveaux inhibiteurs de la TK d'*E. coli*. Créée en 2001, cette banque de molécules est actuellement constituée de plus de 3000 composés organiques, issus majoritairement de processus de synthèse. Ces composés sont stockés dans des plaques 96 puits et sont solubilisés dans le DMSO. L'activité de la TK a été mesurée en présence 0,1 mM de chacune des molécules de la chimiothèque, de 1 mM de L-ery (concentration saturante) et de 0,01 mM de TPP (concentration proche de la valeur du $K_{0,5}$) afin de mettre éventuellement en évidence des inhibiteurs compétitifs de la TPP. Pour chaque plaque, la première colonne est utilisée pour réaliser les contrôles positifs (en absence d'inhibiteurs mais en présence de 10% (v/v) de DMSO) et les contrôles négatifs (en absence d'inhibiteurs et de TPP mais en présence de 10% (v/v) de DMSO). Le reste de la plaque, c'est-à-dire 88 électrodes, est utilisé pour tester les molécules de la chimiothèque. Seulement 7 minutes (5 minutes de réaction et 2 minutes de mesure) sont nécessaires pour mesurer l'activité de la TK sur les 96 électrodes. Une partie de la chimiothèque de l'ICBMS (1360 molécules) a été criblée de cette façon et chaque molécule a été testée 4 fois. Les résultats ont été corrigés par la valeur du contrôle négatif (obtenu en absence de TPP) et exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport au contrôle positif. Une molécule est considérée comme un « hit » si elle engendre une inhibition de plus de 50% dans ces conditions. Ce criblage a été réalisé en aveugle, sans connaître au préalable la structure des molécules testées et aucun tri des molécules n'a été réalisé auparavant.

Sur un total de 1360 molécules, 65 ont été exclues en raison de leur électro-sensibilité, c'est-à-dire qu'elles étaient oxydées au potentiel de travail utilisé (*Figure 95*). Cette électro-sensibilité a été vérifiée pour chacune des molécules par voltammétrie cyclique. De plus, 110 molécules présentaient un pourcentage d'inhibition supérieur à 50%. Ces candidats ont ensuite été testés une nouvelle fois dans les mêmes conditions que précédemment et seule une molécule, nommée I38-49, a été confirmée comme étant un inhibiteur de la TK, avec un pourcentage d'inhibition de plus de 80% à 100 μ M (*Figure 95*).

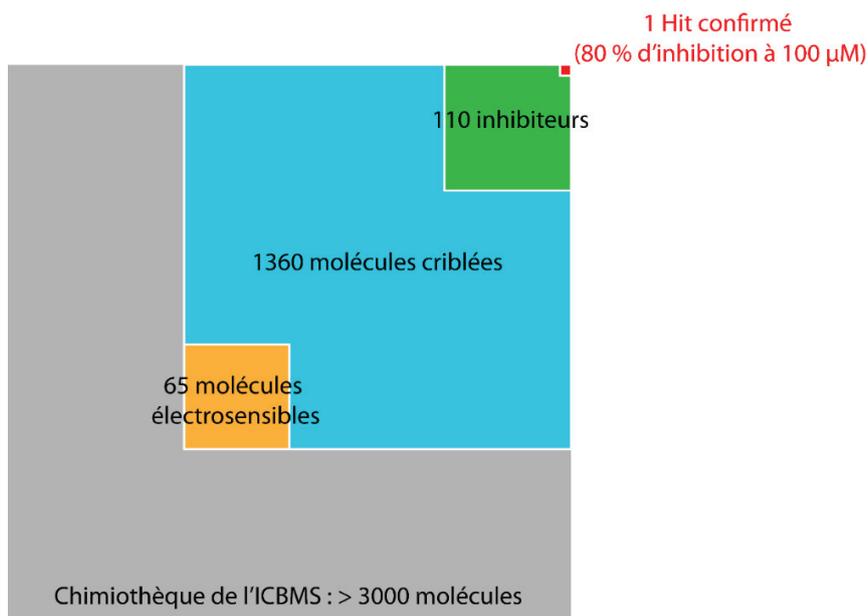


Figure 95. Schéma représentant les résultats du criblage d'une partie de la chimiothèque de l'ICBMS.

IV.3. Caractérisation du hit I38-49

IV.3.1. Première idée sur l'efficacité de l'inhibiteur

Le criblage d'une partie de la chimiothèque de l'ICBMS a permis d'identifier une molécule ayant une activité inhibitrice sur la TK d'*E. coli*. Cette molécule, appelée I38-49 dans cette thèse, est la 2-(4-ethoxyphenyl)-1-(pyrimidin-2-yl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine (Figure 96).

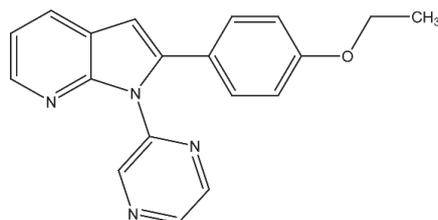


Figure 96. Structure de la 2-(4-ethoxyphenyl)-1-(pyrimidin-2-yl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine ou I38-49.

I38-49 a précédemment été synthétisé par Dimanche-Boitrel et *al.*, dans le cadre d'un brevet visant à identifier des inhibiteurs d'une sérine-thréonine kinase (RIPK1) impliquée dans la nécroptose cellulaire.²⁰⁶

Avant de s'intéresser aux paramètres cinétiques associés à cette inhibition, l'électrosensibilité de I38-49 a été vérifiée par voltammétrie cyclique (Figure 97A). Un pic

d'oxydation est observée à +0,8 V vs. Ag/AgCl, c'est-à-dire à un potentiel plus élevé que le potentiel de travail (+0,56 V vs. Ag/AgCl). De plus, afin d'estimer l'efficacité de cet inhibiteur, la concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) a été déterminée en mesurant l'activité de la TK en présence de TPP 0,01 mM (concentration proche de la valeur du K_{0,5}), d'une concentration saturante en L-ery (1 mM) et de 0 à 300 μM de I38-49 (Figure 97B).

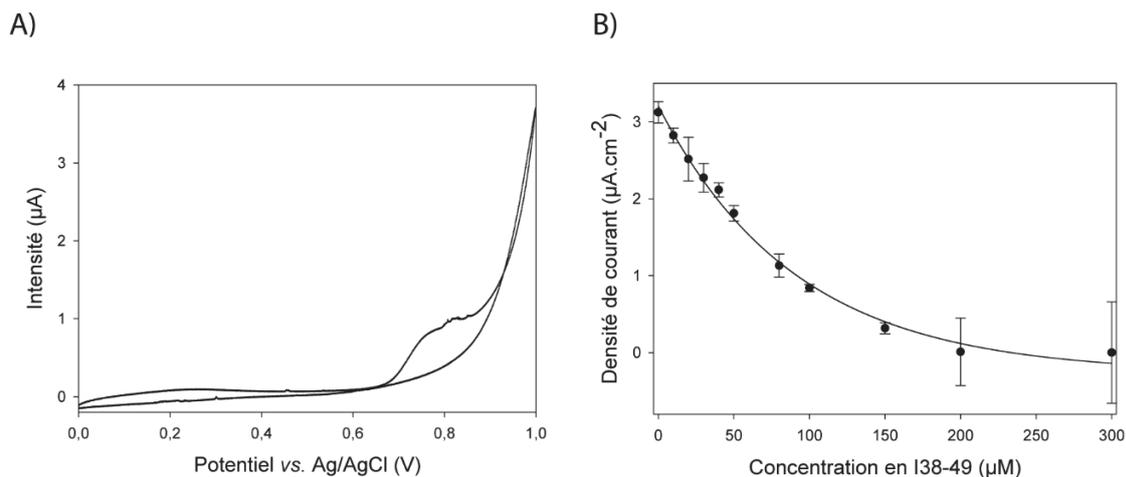


Figure 97. Caractérisation de I38-49. A) Voltammétrie cyclique (entre 0 et +1 V vs. Ag/AgCl) du carbone en présence de 0,1 mM de I38-49 (Tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M ; vitesse de balayage = 20 mV.s⁻¹). B) Mesure de l'activité de la TK (13,9 μg) en présence de TPP 0,01 mM, MgCl₂ 1 mM, K₃Fe(CN)₆ 0,1 mM, L-ery 1 mM et 0 à 300 μM de I38-49 (Tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M, potentiel +0,56 V vs. Ag/AgCl, fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 82 ms, temps de réaction 5 minutes, temps de mesure 2 minutes).

Une CI₅₀ de 63 μM a été déterminée dans ces conditions. Même s'il est difficile de comparer des CI₅₀ déterminés dans des conditions différentes et avec des méthodes différentes, cette valeur permet d'avoir une première idée de l'efficacité de l'inhibiteur : cette valeur est plus faible que celle déterminée avec le pyrophosphate (280 μM)¹⁴⁰, l'oxythiamine (1400 μM)²⁵¹, la thiamine (34000 μM)¹⁴⁰ ou encore l'hydroxyphénylpyruvate (3000 μM).¹⁴⁸ Cet inhibiteur est intéressant car il semble plus efficace que ceux décrits dans la littérature. Une étude détaillée du mécanisme d'inhibition est nécessaire afin de déterminer les paramètres cinétiques associés.

IV.3.2. Détermination des paramètres cinétiques en présence de I38-49

Holdgate et *al.* ont très récemment publié une étude expliquant que la détermination d'une concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) n'était pas suffisante pour caractériser un inhibiteur, identifié dans le cadre de la découverte de nouveaux médicaments.⁶³ Ce paramètre dépend de la méthode

utilisée, des conditions expérimentales (notamment la concentration en substrat et de la quantité d'enzyme) et de la nature de l'inhibiteur étudié. Des études cinétiques sont donc nécessaires afin de déterminer la constante d'inhibition associée à un mécanisme d'inhibition approprié.

IV.3.2.a. Détermination du mécanisme d'inhibition par IPA

L'IPA a d'abord été utilisée pour identifier le mécanisme d'inhibition de I38-49 : l'activité de la TK a donc été mesurée en présence de 0 à 200 μM de TPP et 0 à 100 μM d'inhibiteur (*Figure 98A*).

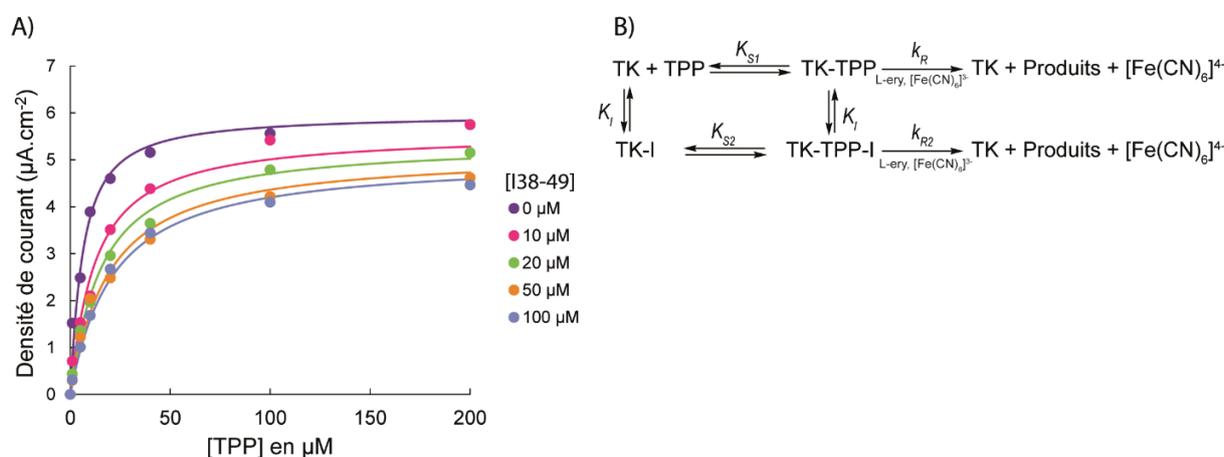


Figure 98. A) Mesure de l'activité de la TK (13,9 μg) par IPA en présence de 0,1 mM de $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$, 1 mM de MgCl_2 , 0 à 200 μM de TPP et 0 à 100 μM de I38-49 (Tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0 KCl 0,1 M, potentiel +0,56 V vs. Ag/AgCl, fréquence 1 Hz, largeur des impulsions 82 ms, temps de réaction 5 minutes et temps de mesure 2 minutes, $n=3$). Les courbes en trait plein représentent les courbes ajustées obtenues avec un modèle d'inhibition non compétitive pure partielle. B) Schéma de l'inhibition non compétitive pure partielle, constituant le modèle le plus approprié aux mesures d'activité mesurées dans A).

Ces données ont été ajustées avec différents modèles d'inhibition (compétitive, incompétitive, non compétitive pure, non compétitive mixte, incompétitive partielle et non compétitive pure partielle) à l'aide du logiciel Dynafit® (*Figure 99*). Afin de simplifier cette étude cinétique, les modèles proposés ne prennent en compte que la fixation de la TPP sur la TK, puisque la concentration en L-ery ne varie pas. Cette fixation est gouvernée par une constante de fixation (appelée K_S) conduisant à la formation du complexe TK-TPP. La vitesse de libération des différents produits de la réaction suit une constante réactionnelle (appelée k_R), incluant la constante de fixation du L-ery (conduisant à la formation de l'intermédiaire réactionnel DHETPP), la constante

catalytique de la réaction enzymatique et la constante chimique de l'oxydation de l'intermédiaire DHETPP.

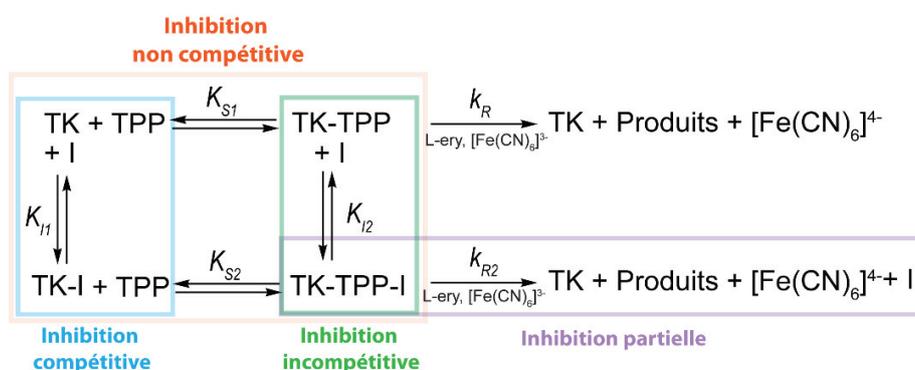


Figure 99. Mécanisme réactionnel de la réaction catalysée par la TK réduite à la fixation de la TPP sur l'enzyme et les mécanismes d'inhibition classiques et partiels associés à ce modèle enzymatique simplifié.

I = inhibiteur, TK = transcétolase, TPP = thiamine pyrophosphate.

Le logiciel Dynafit® possède un mode de discrimination qui a été utilisé pour sélectionner le mécanisme d'inhibition le plus approprié grâce à un paramètre appelé l'AIC (Akaike Information Criteria).²¹³ Ce paramètre, compris entre 0 et 1, est une estimation de la qualité relative d'un modèle statistique pour un ensemble de données. Dans cette étude, il permet d'identifier le mécanisme d'inhibition en adéquation avec les données obtenues. Avec cette méthode, il apparaît que I38-49 inhibe la TK selon une inhibition non compétitive pure partielle avec un AIC de 0,99 (Figure 98B). Les constantes cinétiques associées à ce modèle sont données dans le Tableau 42. Dans ce mécanisme, la forme libre de la TK et la forme liée au TPP (TK-TPP) peuvent fixer l'inhibiteur avec une constante d'inhibition identique ($K_I = 3,4 \pm 0,9 \mu M$). Ceci suggère que la fixation de la TPP n'influence pas la fixation de l'inhibiteur. De plus, la constante de fixation de la TPP sur le complexe TK-inhibiteur ($K_{S2} = 22 \pm 3 \mu M$) est 4 fois plus élevée que la constante de fixation de la TPP sur l'enzyme libre ($K_S = 4,8 \pm 0,7 \mu M$). La fixation de l'inhibiteur empêche donc la fixation de la TPP sur l'enzyme. Cependant, les complexes TK-TPP et TK-TPP-I conduisent à la formation des produits avec des constantes réactionnelles similaires ($k_{R1} = 0,022 \text{ min}^{-1}$ et $k_{R2} = 0,018 \text{ min}^{-1}$). La TK n'a pas été décrite comme une enzyme allostérique mais, Meshalkina et *al.* ont montré qu'au sein de la TK, pouvaient se distinguer un site de faible affinité et un site de forte affinité pour la TPP.²⁵² Si l'inhibiteur se fixe sur le site de forte affinité, la constante de fixation de la TPP va augmenter, cependant, s'il se fixe sur le site de faible affinité, cette constante ne devrait

pas varier. Enfin, une constante d'inhibition de $3,4 \mu\text{M}$ a été obtenue avec ce modèle d'inhibition. Cette valeur est remarquablement faible par rapport à celles décrites pour les inhibiteurs connus de la TK. Le criblage de la chimiothèque de l'ICBMS a donc permis d'identifier un nouvel inhibiteur de la TK de *E. coli*.

Tableau 42. Constantes cinétiques associées à un modèle d'inhibition non compétitive pure partielle déterminées à l'aide du logiciel Dynafit® à partir des données obtenues par IPA et spectrophotométrie.

Constante cinétique	IPA	Spectrophotométrie
K_{S1}	$4,8 \pm 0,7 \mu\text{M}$	$11,9 \pm 2,1 \mu\text{M}$
K_{S2}	$22 \pm 3 \mu\text{M}$	$7,2 \pm 1,3 \mu\text{M}$
K_I	$3,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$	$4,9 \pm 3,2 \mu\text{M}$
k_R	$0,02214 \pm 0,00059 \text{ min}^{-1}$	$0,0157 \pm 0,0009 \text{ min}^{-1}$
k_{R2}	$0,01813 \pm 0,00071 \text{ min}^{-1}$	$0,00962 \pm 0,00066 \text{ min}^{-1}$

Cette même expérience a été réalisée en présence de 0 à 1 mM de L-ery afin de déterminer si une compétition avec le substrat donneur pouvait être observée en présence de I38-49. Une constante de fixation du L-ery sur la TK de $16 \mu\text{M}$ a été déterminée en absence d'inhibiteur mais aucun modèle d'inhibition n'est correctement ajusté sur les résultats.

Il est donc nécessaire de pouvoir étudier cette inhibition avec une autre méthode afin de vérifier le mécanisme non compétitif partiel déterminé précédemment.

IV.3.2.b. Détermination du mécanisme d'inhibition par spectrophotométrie

Les mesures d'activités réalisées par IPA permettant seulement d'accéder à des constantes cinétiques apparentes, il est nécessaire de pouvoir vérifier si le mécanisme d'inhibition de I38-49 déterminé dans le paragraphe précédent est correct. Pour cela, le ferricyanure présentant une longueur d'onde maximale d'absorption à 420 nm, sa consommation lors de l'oxydation de l'intermédiaire réactionnel est détectée par spectrophotométrie (*Figure 100A*). Cette méthode, publiée par Kochetov en 1982, a nécessité $300 \mu\text{g}$ de TK par essai, c'est-à-dire 20 fois plus d'enzyme que pour le test électrochimique.¹⁵⁷

L'activité de la TK a donc été mesurée par spectrophotométrie en présence de 0 à $60 \mu\text{M}$ de TPP et 0 à $100 \mu\text{M}$ d'inhibiteur (*Figure 100B*). Ces courbes ont été ajustées avec les mêmes modèles d'inhibition que pour les mesures électrochimiques (*Figure 99*) à l'aide du logiciel Dynafit®.

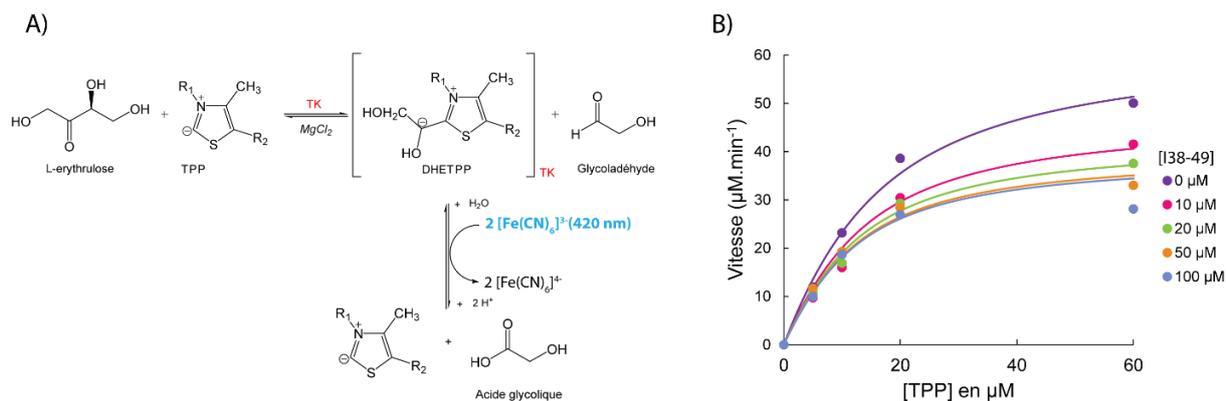


Figure 100. Mesure de l'activité TK par spectrophotométrie. A) Test spectrophotométrique permettant la détection d'activité TK en suivant la consommation de ferricyanure ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) à 420 nm lors de l'oxydation de l'intermédiaire réactionnel DHETPP issu de la réaction entre la TK, la TPP et un substrat donneur (L-erythrulose). B) Mesure par spectrophotométrie de la vitesse de réaction de la TK (300 μg) en présence de 1 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1 mM de MgCl_2 , 1 mM de L-ery et 0 à 60 μM de TPP et 0 à 100 μM de I38-48.

Avec cette méthode spectrophotométrique, le même mécanisme d'inhibition (l'inhibition non compétitive pure partielle) apparaît comme le plus approprié aux données obtenues (avec un AIC de 1). Les constantes cinétiques associées à ce modèle sont données dans le *Tableau 42* et comparées avec celles obtenues en IPA. La constante d'inhibition ($4,9 \pm 3,2 \mu\text{M}$) est proche de celle déterminée en IPA ($3,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$), confirmant les données obtenues avec la méthode électrochimique. Cependant, la tendance des constantes de fixation de la TPP sont inversées : la constante de fixation de la TPP sur l'enzyme seule ($K_{S1} = 11,9 \mu\text{M}$) est plus élevée que celle de la fixation de la TPP sur le complexe TK-TPP ($K_{S2} = 7,2 \mu\text{M}$), ce qui signifierait que la présence de l'inhibiteur favoriserait la fixation de la TPP. De plus, les constantes de réaction sont plus faibles que celles déterminées par IPA.

Ces différences peuvent s'expliquer par la quantité d'enzyme utilisée (300 μg correspondant à 20 μM) dans ce test spectrophotométrique : en présence de faibles concentrations en TPP ($< 20 \mu\text{M}$), la concentration en enzyme est supérieure à la concentration en substrat. Dans les conditions Michaeliennes, la concentration en substrat totale (S_0 , correspondant la somme de la concentration en substrat libre et de la concentration en substrat lié à l'enzyme appelé ES) doit être largement supérieure à la concentration en enzyme totale (E_0) afin de pouvoir exprimer l'équation de vitesse en fonction de la concentration en substrat totale (équation (18)). En présence d'un excès d'enzyme, l'équation de vitesse ne dépend plus de S_0 mais de la concentration en substrat libre (S) (équation

(19)). Il est nécessaire dans ce cas de pouvoir déterminer la concentration en substrat libre afin de déterminer des paramètres catalytiques corrects.

$$Vitesse = \frac{V_M \times [S_0]}{K_M + [S_0]} \quad (18) \text{ avec } [S_0] = [S] + [ES]$$

$$Vitesse = \frac{V_M \times [S]}{K_M + [S]} \quad (19)$$

La particularité de cette méthode de mesure d'activité enzymatique est qu'elle ne nécessite qu'un seul des deux substrats de la TK et que l'intermédiaire est oxydé selon une constante chimique qu'il est difficile de déterminer. Il est nécessaire de tester l'inhibition de la TK avec d'autres méthodes afin de pouvoir faire intervenir les deux substrats de cette enzyme et vérifier les résultats obtenus précédemment. La méthode spectrophotométrique la plus couramment utilisée nécessite l'utilisation du L-erythulose comme substrat de la TK et fait appel à une enzyme auxiliaire, l'alcool déshydrogénase (ADH).¹⁵⁶ Celle-ci va réduire le glycolaldéhyde produit par la TK en présence de NADH, détectable en mesurant l'absorbance à 340 nm (*Figure 101*).

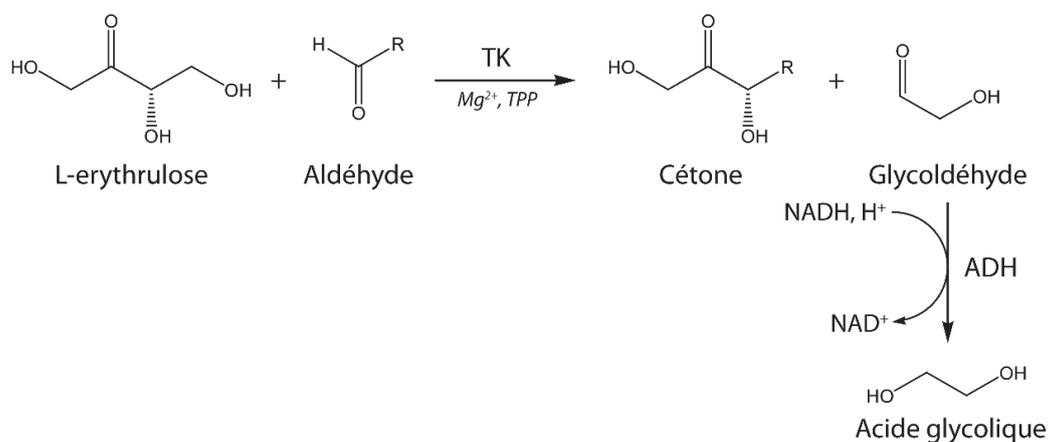


Figure 101. Test couplé permettant la mesure d'activité TK par spectrophotométrie : l'alcool déshydrogénase (ADH) réduit le glycolaldéhyde formé par la TK en présence de NADH comme cofacteur.

Dans cette expérience, l'aldéhyde utilisé est le ribose-5-phosphate, conduisant à la formation de sedoheptulose-7-phosphate en plus du glycolaldéhyde. Après avoir caractérisé cette réaction enzymatique en absence d'inhibiteur, ce test a été utilisé pour mesurer l'activité de la TK en présence de I38-49 et d'une concentration saturante en TPP. Cependant, une inhibition de l'ADH

a été mise en évidence avec une perte totale de l'activité de l'ADH obtenue en présence de 50 μM de I38-49. La détermination du mécanisme d'inhibition de la TK par I38-49 et des constantes associées est donc impossible avec cette méthode.

Un autre test spectrophotométrique, faisant intervenir la galactose oxydase décrite dans le troisième chapitre et la peroxydase de Raifort (HRP) comme enzymes auxiliaires, a été utilisé (*Figure 102*). Cependant, une inhibition de la HRP par I38-49 a également été mise en évidence : en présence de 100 μM de I38-49, la HRP ne conserve que 30% de son activité enzymatique. Ces résultats montrent que l'inhibiteur identifié au sein de la chimiothèque manque de sélectivité pour la TK. Ceci devra être prioritairement amélioré lors du développement d'inhibiteurs à partir de I38-49.

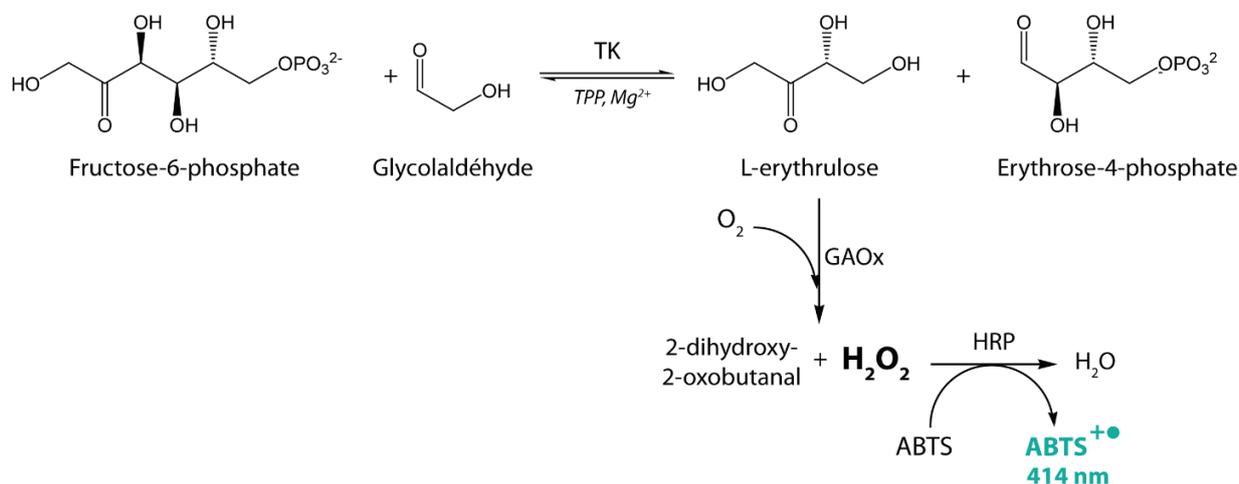


Figure 102. Test couplé permettant la mesure d'activité TK par spectrophotométrie : la galactose oxydase (GAOx) oxyde la dihydroxyacétone formée par la TK et produit l'aldéhyde correspondant et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ce dernier est réduit en eau en présence de la peroxydase de Raifort (HRP) et d'un substrat chromogénique (l'ABTS) pour former un radical coloré absorbant à 414 nm.

Enfin, un test colorimétrique basé sur l'oxydation de composés 2-hydroxycétone en présence d'un sel de tétrazolium (chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium) a été utilisé pour mesurer l'activité de la TK (*Figure 47*).¹⁵⁹ Cette réaction permet la formation de formazan absorbant à 485 nm pouvant être suivie par spectrophotométrie. L'activité de la TK a été mesurée en présence de fructose-6-phosphate ou hydroxypyruvate comme substrat donneur et formaldéhyde ou glycolaldéhyde comme substrat accepteur. Le L-erythrulose ou la dihydroxycétone formés lors de la réaction catalysée par la TK peuvent être oxydés par le sel de tétrazolium pour former un

formazan. Cependant, cette méthode étant peu spécifique, les différents substrats sont oxydés par le sel de tétrazolium entraînant la formation de formazan et conduisant à un bruit de fond élevé. Ces méthodes spectrophotométriques n'ont pu être utilisées pour caractériser l'inhibition de la TK par I38-49. La méthode faisant intervenir le ferricyanure ne rencontrant pas ces difficultés, elle reste la plus intéressante, en particulier pour le criblage d'inhibiteurs d'enzymes.

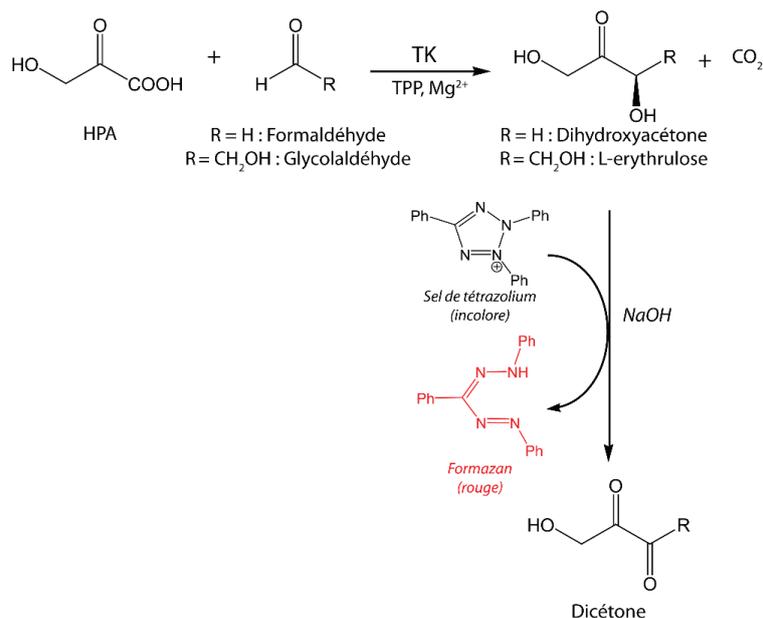


Figure 103. Test colorimétrique basé sur la détection de composés 2-hydroxycétone, formé par la TK en présence d'hydroxypyruvate (HPA) comme substrat, à l'aide de sel de tétrazolium formant une molécule de formazan, absorbant à 485 nm.

IV.3.2.c. Détermination du mécanisme d'inhibition par résonance magnétique nucléaire

Les méthodes spectrophotométriques décrites ne permettant pas de caractériser l'inhibition de la TK par I38-49, l'activité de cette enzyme a été mesurée par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN-¹H) au sein du centre commun de RMN de l'Université Claude Bernard Lyon 1. Cette méthode peut être utilisée si le profil RMN des protons composant un substrat ou un produit peut être suivi au cours de la réaction enzymatique. Afin de simplifier les spectres obtenus lors de la réaction catalysée par la TK, l'hydroxypyruvate (HPA) et le glycolaldéhyde (GA) ont été utilisés comme substrats afin de former du dioxyde de carbone et du L-erythrulose. Le CO₂ ne conduisant à aucun signal en RMN-¹H, les spectres de l'HPA, de la GA et du L-ery ont été réalisés en premier afin d'identifier les signaux obtenus (Figure 104).

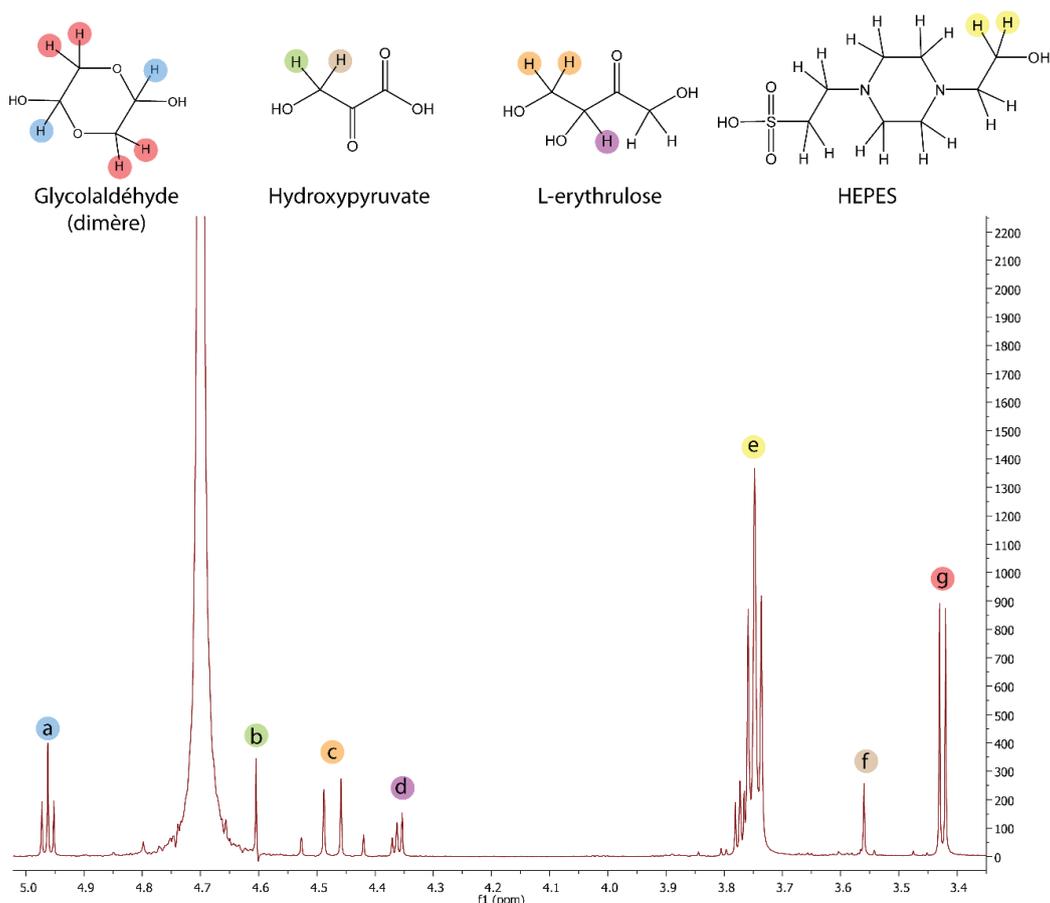


Figure 104. Spectre RMN du proton d'un mélange d'hydroxypyruvate, de glycolaldéhyde et de L-erythrulose 1 g.L⁻¹ (tampon Hepes 0,05 M pD 7,0 KCl 0,1 M dans D₂O).

Chaque pic a été associé à un ou plusieurs protons des substrats ou produits de la réaction en fonction de leur multiplicité (singulet, doublet, triplet...), de leur déplacement chimique et de leur constante de couplage. Ainsi, le triplet **a** et le doublet **g** ont été attribué au GA (présent sous forme dimérique, la forme commerciale), les singulets **b** et **f** à l'HPA (les protons n'étant pas considérés comme équivalents, ils conduisent à deux signaux différents en RMN) et le doublet de doublets **c** au L-ery. Le triplet **d** correspond au proton du L-ery, superposé avec un singulet de la forme monomérique du GA, il ne pourra donc être utilisé pour la mesure d'activité. Enfin, le triplet **e** correspond à 2 protons de l'Hepes, le tampon utilisé dans ces conditions. Ce signal a servi de référence puisque la concentration en Hepes est connue et ne varie pas au cours de la réaction. Ainsi, les intégrales des différents pics **a**, **b**, **c** et **g** ont été exprimées en fonction du pic de l'Hepes

(e) afin de connaître la concentration des substrats (GA et HPA) et du produit (L-ery) au cours de la réaction.

Un spectre RMN a été réalisé avant et après 1 heure de réaction entre les substrats et la TK (0,062 U) en utilisant 0 à 200 μM de TPP et 0 à 100 μM de I38-49 (*Figure 105*). La vitesse de réaction enzymatique correspond alors à la concentration en L-ery formé après 1 heure de réaction.

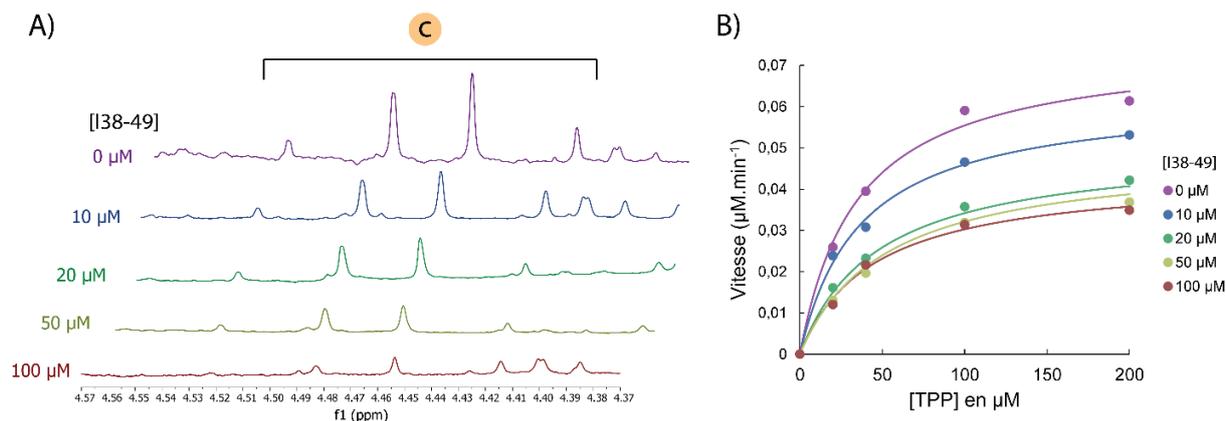


Figure 105. Mesure par RMN du proton de l'inhibition de la TK par I38-49. A) Empilement de spectres RMN du proton centré sur le doublet de doublet du L-ery obtenus avec 6 μg de TK, 50 mM de GA, 20 mM d'HPA, 10 mM de MgCl_2 , 40 μM de TPP et 0 à 100 μM de I38-49 après 1 heure de réaction (tampon Hepes 0,05 M à pH 7,0, KCl 0,1 M). B) Courbes de la vitesse de formation du L-ery en fonction de la concentration en TPP en présence de 0 à 100 μM de I38-49 obtenues à partir de mesures réalisées par RMN ($n=1$).

Le pourcentage de conversion des substrats est inférieur à 10% dans ces conditions afin de rester en vitesse initiale et de ne considérer que la réaction de formation du L-ery. En absence d'inhibiteur, le doublet de doublet du L-erythrose (pic c dans la *Figure 104*) augmente au cours de la réaction, ce qui montre qu'il est produit par la TK. De plus, les pics a, b et g diminuent également, prouvant la consommation des substrats (le GA et l'HPA) lors de cette réaction. Dans un second temps, en présence de I38-49 et après 1 heure de réaction, le doublet de doublet du L-ery diminue en présence d'une concentration croissante en inhibiteur (*Figure 105A*) : le L-ery est produit en plus faible quantité, témoin de l'inhibition de l'enzyme. La vitesse de formation du L-ery a ensuite été exprimée en fonction de la concentration en TPP pour des concentrations en inhibiteur comprises entre 0 et 100 μM (*Figure 105B*). Ces données ont été ajustées avec différents modèles d'inhibition présentés dans le paragraphe IV.3.2.a., et le logiciel Dynafit® a été utilisé pour sélectionner le modèle le plus adapté.

Malheureusement, aucun mécanisme d'inhibition n'a pu clairement être ajusté à ces résultats : l'AIC le plus élevé (0,385) a été obtenu pour une inhibition non compétitive pure mais l'ajustement est approximatif et les constantes cinétiques associées possèdent des déviations standards élevées ($K_I = 97 \pm 20 \mu\text{M}$).

Malgré la difficulté à trouver une méthode de mesure d'activité TK compatible avec l'utilisation d'un inhibiteur peu spécifique, l'étude du mécanisme d'inhibition de la TK par I38-49 a été initiée et une faible constante d'inhibition (de l'ordre de quelques μM) a été déterminée.

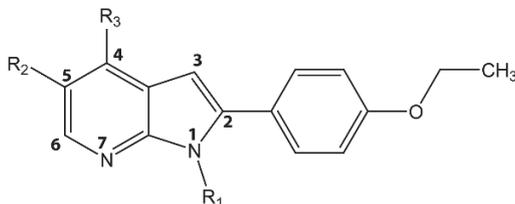
IV.3.3. Molécules analogues à I38-49

Afin d'évaluer l'importance de la nature et de la position des substitutions de I38-49 pour l'inhibition de l'activité TK, le pourcentage d'inhibition de la TK par des molécules analogues de l'inhibiteur (à une concentration de 100 μM), a été analysé à l'aide des résultats du criblage réalisé avec le test électrochimique dans le paragraphe IV.2. (*Tableau 43*). Ces molécules, présentes dans la chimiothèque de l'ICBMS, ont également été publiées par Dimanche-Boitrel et *al.*²⁰⁶ Elles possèdent toutes un cycle azaindole mais possèdent des substitutions de nature et à des positions différentes.

Dans un premier temps, la nature de la substitution en position 1 (R_1) a été étudiée. La présence d'une pyrazine à cette position (molécule I38-49) engendre une inhibition de 80% (*Tableau 43*). Cependant, en absence de substitution (molécule **(1)**), une inhibition de 9% a été mesurée. Une substitution à cette position est donc nécessaire pour l'inhibition de la TK. De plus, la taille de cette substitution a son importance. En effet, la présence d'un groupement plus encombrant tel que la 4-(4-pyrimidinyl) morpholine (molécule **(2)**) n'engendre aucune inhibition. En revanche, la présence d'un cycle à 5 carbones, tels qu'un thiadiazole (molécule **(3)**), ou à 6 carbones, tel qu'une pyridine (molécule **(3)**) ou un phényle (molécule **(4)**) à cette position conduit à une inhibition comprise entre 11 et 23%. La présence et la position des atomes d'azote sur ce cycle semblent également avoir leur importance. L'absence d'azote (molécule **(5)**) conduit une inhibition de 23% et sa présence en position *ortho* du cycle (molécule **(4)**), à une inhibition de 11%. La présence de cet atome électronégatif en position *méta* de la molécule I38-49 est nécessaire pour que l'inhibition de la TK soit efficace.

Chapitre IV : Second système rapporteur de l'activité TK

Tableau 43. Pourcentage d'inhibition de la TK par des analogues de I38-49. La nature des groupements chimiques en position R_1 , R_2 et R_3 de la structure de base (2-(4-éthoxyphényl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine) est décrite pour chaque analogue. L'astérisque correspond au point de liaison sur la structure de base.



Nom de la molécule	R_1	R_2	R_3	Pourcentage d'inhibition à 100 μM
I38-49		H	H	82%
(1)	H	H	H	9%
(2)		H	H	0%
(3)		H	H	23%
(4)		H	H	11%
(5)		H	H	23%
(6)		H	H	0%
(7)	H		H	2%
(8)	H	H		0%

Dans un deuxième temps, l'importance de la position de la substitution a été mise en évidence, en étudiant des molécules avec des substitutions en position 5 (R₂) ou 4 (R₃) de l'azaindole. La présence d'une pyrimidine en position 5 (molécule (7)) ou d'un thiophène en position 4 (molécule (8)) ne conduit pas à une inhibition de la TK. La présence d'une substitution en position 1 est donc préférable pour obtenir un inhibiteur de la TK.

Ces résultats permettent de conclure que la substitution en position 1 du groupement azaindole par un hétérocycle à 5 ou 6 liaisons est nécessaire pour que la molécule puisse inhiber la TK.

V. Conclusions

Dans ce quatrième chapitre, un second système rapporteur de l'activité TK a été adapté pour le criblage électrochimique. Cette méthode, basée sur le piégeage oxydatif de l'intermédiaire réactionnel DHETPP à l'aide du ferricyanure, a été optimisée afin d'utiliser une quantité raisonnable de TK. Elle offre une sensibilité suffisante pour un criblage d'inhibiteurs, un temps de mesure de seulement 7 minutes pour 96 mesures et une variabilité plus faible que pour le premier système rapporteur. Ces performances haut débit ont ainsi été mises à profit en criblant une partie de la chimiothèque de l'ICBMS afin d'identifier de nouveaux inhibiteurs de la TK de *E. coli*, en guise de preuve de concept. Sur les 1360 candidats testés, une seule molécule représente un candidat intéressant, présentant une CI₅₀ faible (63 µM). Cette molécule a ensuite été caractérisée par IPA à l'aide de ces mêmes plaques de criblage électrochimique afin de déterminer son mécanisme d'inhibition et la constante d'inhibition associée ($K_I = 3,4 \mu\text{M}$). Ces résultats ont pu être confirmés à l'aide d'une autre méthode de détection et malgré une spécificité relativement faible, cet inhibiteur constitue une structure de départ intéressante qu'il faudra par la suite optimiser afin d'augmenter son efficacité et surtout sa sélectivité. Ce système haut débit a donc permis à la fois de tester un grand nombre de molécules mais aussi de juger de l'efficacité de l'inhibiteur sélectionné, à travers la détermination de ses paramètres cinétiques apparents, et ce en un temps réduit. Ces résultats sont inédits dans le domaine de l'électrochimie et promettent au système de criblage électrochimique un large éventail d'applications.

Conclusions et perspectives

La découverte de nouveaux médicaments nécessite des méthodes fiables et robustes permettant de tester un grand nombre de candidats sur une cible, associée à une pathologie. Les enzymes sont des cibles thérapeutiques particulièrement intéressantes et inhiber leur activité dans ce contexte pathologique, est une des stratégies les plus usitées. Les méthodes usuelles permettant d'identifier des inhibiteurs d'enzymes sont pour la plupart des méthodes spectrophotométriques ou fluorimétriques, soumises à des interférences optiques. Les méthodes électrochimiques, quant à elles, ont pour avantage de s'affranchir de ces interférences, cependant, leur faible débit limitait leur utilisation pour le criblage d'inhibiteurs d'enzymes.

Un système de criblage électrochimique d'activité enzymatique a ainsi été développé au cours de cette thèse. Pour cela, des plaques de criblage électrochimique (PCE) constituées de 96 électrodes sérigraphiées ont été utilisées. Afin de mettre en application ce système haut débit, une enzyme cible, la transcétolase (TK), a été sélectionnée pour son implication dans de nombreuses pathologies et dans la survie de certains parasites pathogènes. Ce contexte pathologique créant un besoin d'identifier des inhibiteurs de la TK, deux cribles permettant de mesurer l'activité de cette enzyme par électrochimie ont été développées.

Le premier système rapporteur de l'activité de la TK nécessite l'utilisation d'une enzyme rapportrice, la galactose oxydase (GAOx). L'optimisation de l'activité de cette enzyme auxiliaire a été le point de départ de ces travaux. Afin d'exploiter au maximum les performances de ces PCE, deux méthodes ont été utilisées pour mesurer l'activité de la GAOx, l'ampérométrie pulsée par intermittence (IPA) et l'électrochimiluminescence (ECL). Ces méthodes permettent de détecter des concentrations en H_2O_2 de respectivement 10 et 1 μM avec des sensibilités comparables aux systèmes électrochimiques ou ECL existants. De plus, le haut débit du système de criblage électrochimique permet de réaliser 96 mesures d'activités oxydases en seulement 10 minutes par IPA ou par ECL, ce qui n'était pas le cas des systèmes existants. Le format 96 a permis d'optimiser, dans un temps réduit, les conditions de détection de l'activité GAOx par chacune des deux méthodes, et de tester différentes matrices d'immobilisation de l'enzyme, point important dans le développement du système bienzymatique. Ces mesures d'activité étant basées sur la détection de l' H_2O_2 , elles peuvent être adaptées à des nombreuses oxydases dont l'optimisation des conditions réactionnelles peut être réalisée en peu de temps.

Cette méthode de mesure d'activité oxydase est actuellement utilisée dans le développement d'un projet qui a pour but de cribler des oxydoréductases capables d'oxyder l'isosorbide, un diol

obtenu par traitement de l'amidon, afin d'obtenir des synthons intéressants pour la synthèse de polymères alternatifs à la chimie du pétrole (Figure 106). Les plaques de criblage électrochimique seront donc idéales pour rapidement sélectionner les oxydases fonctionnelles sur l'isosorbide à l'aide de mesures réalisées par IPA ou ECL.

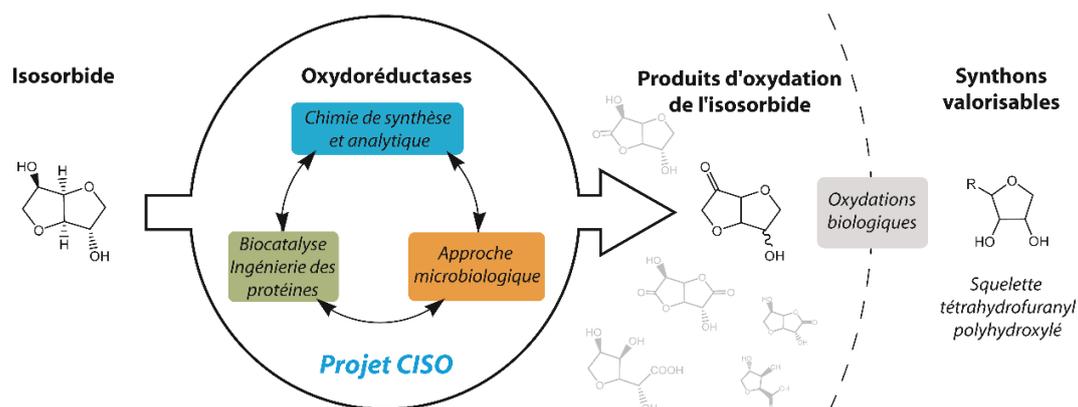


Figure 106. Schéma de principe du projet CISO (Conversion de l'Isosorbide par Oxydation enzymatique).

Dans le cadre du projet de thèse, la galactose oxydase a ensuite été utilisée comme rapporteur de l'activité TK en oxydant ses produits de réaction et produisant de l' H_2O_2 . Malheureusement, les vitesses de réaction étant lentes, une incubation d'une heure du milieu réactionnel est nécessaire afin d'accumuler une quantité suffisante d' H_2O_2 pour sa détection par IPA. De plus, les enzymes fonctionnant dans des conditions expérimentales différentes, une immobilisation de l'enzyme rapportrice est nécessaire afin de lui conférer un microenvironnement, ajoutant de la variabilité à la détection de l'activité TK. Ces différentes contraintes sont limitantes dans le développement d'un système de criblage d'inhibiteurs d'enzyme.

Le premier système rapporteur n'offrant pas de résultats satisfaisants, un second système permettant la mesure d'activité TK a été utilisé dans cette thèse. Celui-ci ne nécessite pas d'enzyme auxiliaire et requiert seulement la présence du substrat donneur. L'intermédiaire réactionnel (DHETPP), formé suite à la fixation de son cofacteur (la thiamine pyrophosphate, TPP) et du substrat donneur et à la libération du premier produit, peut être oxydé par une espèce redox, le ferricyanure, dont la forme réduite est aisément détectable par électrochimie. Le format 96 des plaques de criblage électrochimique a permis de rapidement optimiser les conditions réactionnelles et les paramètres électrochimiques. Dans ce cas, seulement 5 minutes de réaction et 2 minutes de

mesure sont nécessaires pour réaliser 96 mesures d'activité TK. Les intensités de courant sont ainsi représentatives de l'activité TK, cependant, elles ne permettent pas d'accéder aux paramètres cinétiques associés puisque la vitesse d'oxydation de l'intermédiaire et la vitesse d'oxydation du ferrocyanure doivent être prises en compte. L'étude cinétique de l'étape d'oxydation de DHETPP par le ferricyanure serait particulièrement intéressante afin de caractériser les vitesses de réaction mesurées. Pour cela, la synthèse de l'intermédiaire réactionnel devra être envisagée. Un article publié par Paul et Guin, décrit la synthèse du 2-isopropyl-4,5-diméthylthiazole, à partir du 4,5-diméthylthiazole et de l'isobutaraldéhyde (*Figure 107*)²⁵³. Cette molécule est analogue de l'intermédiaire réactionnelle et des études cinétiques de son oxydation par le ferricyanure permettraient de caractériser cette étape chimique.

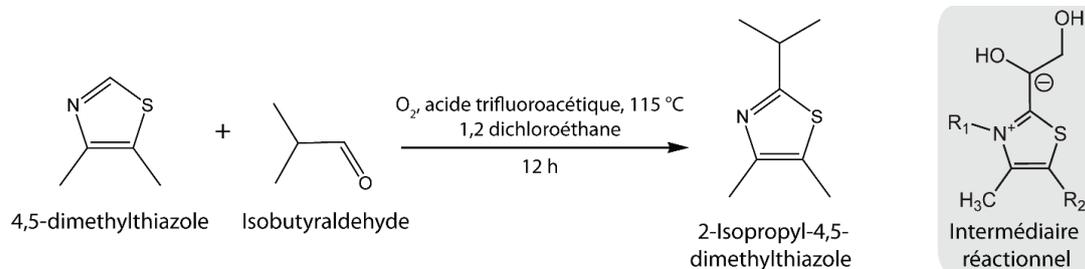


Figure 107. Synthèse d'un analogue de l'intermédiaire réactionnel (DHETPP), le 2, isopropyl-4,5-diméthylthiazole.

D'après Paul et Guin.²⁵³

De plus, cette méthode étant dépendante de la concentration en TPP, elle pourrait être adaptée pour la conception d'un biocapteur à TPP, comme l'ont décrit Halma et *al.*¹⁷¹ Cette dernière étant la forme biologiquement active de la thiamine (encore appelée vitamine B1), le dosage de cette vitamine dans les échantillons biologiques, alimentaires ou pharmaceutiques présente un grand intérêt. De même, cette méthode de mesure d'activité TK pourrait être adaptée à d'autres enzymes à TPP, telles que des pyruvate décarboxylases ou encore des décarboxylases d'acides α -cétoniques puisqu'elles présentent, pour la plupart, également un mécanisme Ping-Pong, nécessaire à cette détection électrochimique.

Contrairement au premier système rapporteur, cette seconde méthode dispose d'un faible temps de réaction et une plus faible variabilité dans la mesure d'activité TK. Ces conditions sont donc idéales pour réaliser un criblage d'inhibiteurs de la TK. Une partie de la chimiothèque de l'ICBMS a ainsi été criblée et la découverte d'une molécule inhibant la TK avec une CI₅₀ de 63

μM a conduit à des études cinétiques en présence de cet inhibiteur. Réalisées par IPA, ces études ont permis de déterminer le mécanisme d'inhibition et la constante d'inhibition associée d'une valeur de $3,4 \mu\text{M}$. Cet inhibiteur étant un candidat intéressant, des travaux pourront être poursuivis. En premier lieu, l'effet de cette molécule sur le TK humaine et sa sélectivité envers des TK d'autres organismes seront étudiées. Une optimisation de sa structure pourra être envisagée par synthèse chimique afin d'augmenter son efficacité et sa sélectivité pour l'enzyme humaine. Les têtes de séries alors obtenues pourront alors être étudiées lors de tests utilisant des cellules entières afin d'étudier l'effet de cet inhibiteur sur la survie d'une culture de cellules saines ou cancéreuses par exemple.

L'adaptabilité de cette nouvelle méthode de mesure d'activité à toutes les TK sera mise à profit au cours du projet CEITOP (pour Criblage Électrochimique d'Inhibiteurs de Transcétolases d'Organismes Pathogènes). Ce projet a pour but de découvrir de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique en identifiant des inhibiteurs spécifiques des TK de bactéries (telles que *Mycobacterium tuberculosis* ou *Streptococcus pneumoniae*) ou de parasites (tels que *Trypanosoma gambiense* ou *Plasmodium falciparum*), mais qui ne cibleraient pas la TK humaine. Un criblage en deux dimensions sera donc réalisé : l'activité de TK de différents organismes sera mesurée en présence de différentes molécules présentes dans la chimiothèque de l'ICBMS.

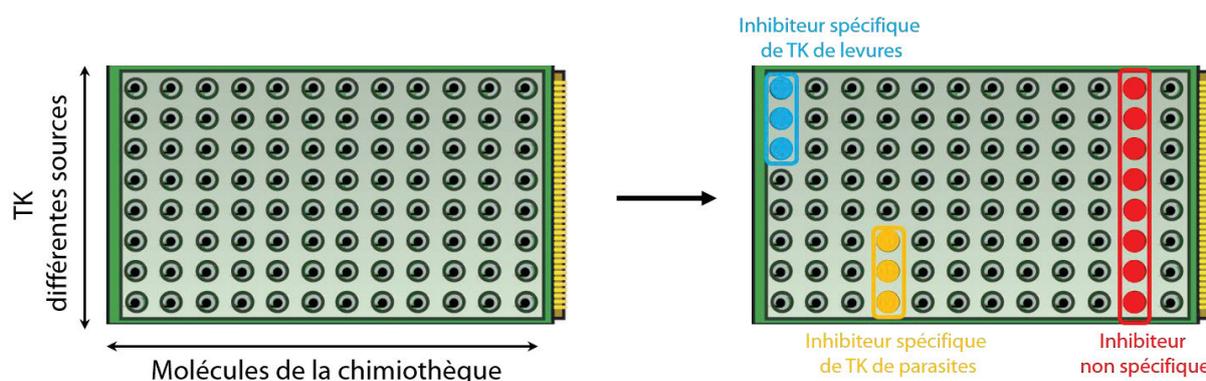


Figure 108. Schéma de principe du projet CEITOP (Criblage Électrochimique d'Inhibiteurs de Transcétolases d'Organismes Pathogènes).

Enfin, ce projet de recherche a donné lieu à des travaux de reproduction et d'amélioration du lecteur de plaques de criblage électrochimique réalisés au cours de stages encadrés par Jean-François Chateaux au sein de l'équipe « Laboratoire d'Electronique, Nanotechnologie et Capteurs »

de l'Université Claude Bernard Lyon 1. De nouvelles fonctionnalités telles qu'un contrôle de température, l'indépendance de toutes les électrodes ou encore la possibilité d'appliquer différents potentiels sur une même électrode ont été ajoutés à cette nouvelle version. La photographie du prototype quasi-final est présentée dans la *Figure 109*.



Figure 109. Photographie de la nouvelle version du lecteur de plaques de criblage électrochimique conçu au sein du laboratoire « Laboratoire d'Electronique, Nanotechnologie et Capteurs ».

Ces travaux de thèse ont permis de développer un nouveau système électrochimique permettant la mesure à haut débit d'activités d'enzymes non redox. Ce système est innovant dans le domaine de l'électrochimie et est promis à de nombreuses applications, que ce soit pour la recherche de nouveaux médicaments ou à dans le développement de biocapteurs électrochimiques.

Références bibliographiques

1. Article L. 5111-1 du Code la Santé Publique. Available at: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006689867>.
2. Classification internationale des maladies (CIM 10) - Organisation mondiale de la santé. (2015). Available at: <http://www.who.int/classifications/icd/en/>.
3. Collins, I. & Workman, P. New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nat. Chem. Biol.* **2(12)**, 689–700 (2006).
4. Hughes, J. P., Rees, S. S., Kalindjian, S. B. & Philpott, K. L. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* **162(6)**, 1239–1249 (2011).
5. Hoelder, S., Clarke, P. A. & Workman, P. Discovery of small molecule cancer drugs: Successes, challenges and opportunities. *Mol. Oncol.* **6(2)**, 155–176 (2012).
6. Bunnage, M. E. Getting pharmaceutical R&D back on target. *Nat. Chem. Biol.* **7(6)**, 335–339 (2011).
7. Chen, H., Yue, J. X., Yang, S. H., Ding, H., Zhao, R. W. & Zhang, S. Overexpression of transketolase-like gene 1 is associated with cell proliferation in uterine cervix cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **28**, 43 (2009).
8. Li, S., Huang, S. & Peng, S.-B. Overexpression of G protein-coupled receptors in cancer cells: involvement in tumor progression. *Int. J. Oncol.* **27**, 1329–1339 (2005).
9. Oh, J. M. C., Brichory, F., Puravs, E., Kuick, R., Wood, C., Rouillard, J. M., Tra, J., Kardia, S., Beer, D. & Hanash, S. A database of protein expression in lung cancer. *Proteomics* **1(10)**, 1303–1319 (2001).
10. Butterworth, R. F. Thiamin deficiency and brain disorders. *Nutr. Res. Rev.* **16(2)**, 277 (2003).
11. Thomson, A. D., Cook, C. C. H., Touquet, R. & Henry, J. a. The Royal College of Physicians report on alcohol: guidelines for managing Wernicke's encephalopathy in the accident and Emergency Department. *Alcohol Alcohol.* **37(6)**, 513–521 (2002).
12. Ironside, J. W. Review: Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Pathol.* **6(4)**, 379–388 (1996).
13. Beringue, V., Deslys, J., Adjou, K. T. & Dormont, D. Central & Peripheral Nervous Systems Creutzfeldt-Jakob disease : therapeutic strategies Congo red. *Expert Opin. Investig. Drugs* **6(4)**, 345–348 (1997).
14. Xu, H., Xu, H. Y., Lin, M. Z., Wang, W., Li, Z. M., Huang, J. J., Chen, Y. Z. & Chen, X. Learning the drug target-likeness of a protein. *Proteomics* **7(23)**, 4255–4263 (2007).
15. Hopkins, A. L. & Groom, C. R. The Druggable Genome. *Nat. Rev.* **1**, 727–730 (2002).
16. Imming, P., Sinning, C. & Meyer, A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5(10)**, 821–834 (2006).
17. Rask-Andersen, M., Almén, M. S. & Schiöth, H. B. Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10(8)**, 579–590 (2011).

18. Li, Y. H. *et al.* Therapeutic target database update 2018: enriched resource for facilitating bench-to-clinic research of targeted therapeutics. *Nucleic Acids Res.* **46**, 1121–1127 (2018).
19. Debouck, C. & Metcalf, B. The impact of genomics on drug discovery. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 193–208 (2000).
20. Šali, A. 100,000 Protein Structures for the Biologist. *Nat. Struct. Biol.* **5(12)**, 1029–1032 (1998).
21. Dove, A. Proteomics : translating genomics into products ? By cataloging the entire protein content of a cell , proteomics should not only. *Nat. Biotechnol.* **17**, 233–236 (1999).
22. Spritz, R. A. & Forget, B. G. The thalassemias: molecular mechanisms of Human Genetic Disease. *Am. J. Hum. Genet.* **35**, 333–361 (1983).
23. Rahimov, F. & Kunkel, L. M. Cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* **201(4)**, 499–510 (2013).
24. Yang, Y., Adelstein, S. J. & Kassis, A. I. Target discovery from data mining approaches. *Drug Discov. Today* **14(3–4)**, 147–154 (2009).
25. Bertram, L. & Tanzi, R. E. Thirty years of Alzheimer’s disease genetics: The implications of systematic meta-analyses. *Nat. Rev. Neurosci.* **9(10)**, 768–778 (2008).
26. Cronk, D. High-throughput screening. in *Drug Discovery and Development: Technology in Transition* 95–117 (2013). doi:10.1016/B978-0-7020-4299-7.00008-1
27. Wilde, F. & Link, A. Advances in the design of a multipurpose fragment screening library. *Expert Opin. Drug Discov.* **8(5)**, 597–606 (2013).
28. Edfeldt, F. N. B., Folmer, R. H. A. & Breeze, A. L. Fragment screening to predict druggability (ligandability) and lead discovery success. *Drug Discov. Today* **16(7–8)**, 284–287 (2011).
29. Campos-Olivas, R. NMR screening and hit validation in fragment based drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* **11(1)**, 43–67 (2011).
30. Chavanieu, A. & Pugnère, M. Developments in SPR Fragment Screening. *Expert Opin. Drug Discov.* **11(5)**, 489–499 (2016).
31. Chilingaryan, Z., Yin, Z. & Oakley, A. J. Fragment-based screening by protein crystallography: Successes and pitfalls. *Int. J. Mol. Sci.* **13(10)**, 12857–12879 (2012).
32. Schneider, G. Virtual screening: An endless staircase? *Nat. Rev. Drug Discov.* **9(4)**, 273–276 (2010).
33. Hibert, M. F. French/European academic compound library initiative. *Drug Discov. Today* **14(15–16)**, 723–725 (2009).
34. Akritopoulou-Zanze, I. & Hajduk, P. J. Kinase-targeted libraries: The design and synthesis of novel, potent, and selective kinase inhibitors. *Drug Discov. Today* **14(5–6)**, 291–297 (2009).
35. Anderson, A. & Wright, D. The Design and Docking of Virtual Compound Libraries to

- Structures of Drug Targets. *Curr. Comput. Aided-Drug Des.* **1(1)**, 103–127 (2005).
36. Cramer, R. D., Patterson, D. E., Clark, R. D., Soltanshahi, F. & Lawless, M. S. Virtual compound libraries: A new approach to decision making in molecular discovery research. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **38(6)**, 1010–1023 (1998).
 37. Ekins, S., Honeycutt, J. D. & Metz, J. T. Evolving molecules using multi-objective optimization: Applying to ADME/Tox. *Drug Discov. Today* **15(11–12)**, 451–460 (2010).
 38. van de Waterbeemd, H., Smith, D. A., Beaumont, K. & Walker, D. K. Property-based design: optimization of drug absorption and pharmacokinetics. *J. Med. Chem.* **44(9)**, 1313–1333 (2001).
 39. Hubbard, R. E. 3D structure and the drug-discovery process. *Mol. Biosyst.* **1**, 391–406 (2005).
 40. Peltason, L. & Bajorath, J. Systematic computational analysis of structure activity relationships: concepts, challenges and recent advances. *Future Med. Chem.* **1(3)**, 451–466 (2009).
 41. Patidar, A. K., Selvam, G., Jeyakandan, M., Mubiya, A. K., Bagherwal, A., Sanadya, G. & Mehta, R. Lead Discovery and Lead Optimization: A Useful Strategy in Molecular Modification of Lead Compound in Analog Design. *Int. J. Drug Des. Discov.* **2(2)**, 458–463 (2011).
 42. Folkes, A. J. *et al.* The Identification of 2-(1 *H* -Indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-thieno[3,2-*d*]pyrimidine (GDC-0941) as a Potent, Selective, Orally Bioavailable Inhibitor of Class I PI3 Kinase for the Treatment of Can. *J. Med. Chem.* **51(18)**, 5522–5532 (2008).
 43. Raynaud, F. I. *et al.* Biological properties of potent inhibitors of class I phosphatidylinositide 3-kinases: from PI-103 through PI-540, PI-620 to the oral agent GDC-0941. *Mol. Cancer Ther.* **8(7)**, 1725–38 (2009).
 44. Wang, D. & Bakhai, A. *Clinical Trials: A Practical Guide to Design, Analysis, and Reporting.* Remedica Medical Education and Publishing ed. (2006). doi:10.1177/1740774513484392
 45. Kola, I. & Landis, J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 1–5 (2004).
 46. Mayr, L. M. & Fuerst, P. The future of high-throughput screening. *J. Biomol. Screen.* **13(6)**, 443–448 (2008).
 47. Moffat, J. G., Rudolph, J. & Bailey, D. Phenotypic screening in cancer drug discovery — past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13(8)**, 588–602 (2014).
 48. Bisswanger, H. Enzyme assays. *Perspect. Sci.* **1(1–6)**, 41–55 (2014).
 49. McClure, W. R. A Kinetic Analysis of Coupled Enzyme Assays. *Biochemistry* **8(7)**, 2782–2786 (1969).
 50. Storer, A. C. & Cornish-Bowden, A. The kinetics of coupled enzyme reactions. Applications

- to the assay of glucokinase, with glucose 6-phosphate dehydrogenase as coupling enzyme. *Biochem. J.* **141(1)**, 205–209 (1974).
51. Schroeder, K. S. & Neagle, B. D. FLIPR: A new instrument for accurate, High throughput optical screening. *J. Biomol. Screen.* **1(2)**, 75–80 (1996).
 52. González, J. E., Oades, K., Leychkis, Y., Harootunian, A. & Negulescu, P. A. Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets. *Drug Discov. Today* **4(9)**, 431–439 (1999).
 53. Fan, F. & Wood, K. V. Bioluminescent Assays for High-Throughput Screening. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **5(1)**, 127–136 (2007).
 54. Jayawickreme, C. K. & Kost, T. A. Gene expression systems in the development of high-throughput screens. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8(5)**, 629–634 (1997).
 55. Hua, J., Sima, C., Cypert, M., Gooden, G. C., Shack, S., Alla, L., Smith, E. A., Trent, J. M., Dougherty, E. R. & Bittner, M. L. Tracking transcriptional activities with high-content epifluorescent imaging. *J. Biomed. Opt.* **17(4)**, 1–15 (2012).
 56. Seo, J., Shin, J. Y., Leijten, J., Jeon, O., Camci-Unal, G., Dikina, A. D., Brinegar, K., Ghaemmaghami, A. M., Alsberg, E. & Khademhosseini, A. High-throughput approaches for screening and analysis of cell behaviors. *Biomaterials* **153** 85–101 (2018).
 57. Frey, O., Misun, P. M., Fluri, D. A., Hengstler, J. G. & Hierlemann, A. Reconfigurable microfluidic hanging drop network for multi-tissue interaction and analysis. *Nat. Commun.* **5(May)**, 1–11 (2014).
 58. Khetani, S. R. & Bhatia, S. N. Microscale culture of human liver cells for drug development. *Nat. Biotechnol.* **26(1)**, 120–126 (2008).
 59. Lee, M.-Y., Kumar, R. A., Sukumaran, S. M., Hogg, M. G., Clark, D. S. & Dordick, J. S. Three-dimensional cellular microarray for high-throughput toxicology assays. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105(1)**, 59–63 (2008).
 60. Lee, M., Park, C. B., Dordick, J. S. & Clark, D. S. Metabolizing enzyme toxicology assay chip (MetaChip) for high-throughput microscale toxicity analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102(4)**, 983–987 (2005).
 61. Bailey, S. N., Sabatini, D. M. & Stockwell, B. R. From The Cover: Microarrays of small molecules embedded in biodegradable polymers for use in mammalian cell-based screens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101(46)**, 16144–16149 (2004).
 62. Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y. & Oldenburf, K. R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **4(2)**, 67–73 (1999).
 63. Holdgate, G. A., Meek, T. D. & Grimley, R. L. Mechanistic enzymology in drug discovery: A fresh perspective. *Nat. Rev. Drug Discov.* **17(2)**, 115–132 (2018).
 64. Maeda, H. Assay of proteolytic enzymes by the fluorescence polarization technique. *Anal. Biochem.* **92(1)**, 222–227 (1979).

65. Hall, M. D., Yasgar, A., Peryea, T., Braisted, J. C., Jadhav, A. & Coussens, N. P. Fluorescence polarization assays in high-throughput screening and drug discovery: a review. *Methods Appl. Fluoresc.* **4(2)**, 1–41 (2017).
66. Lea, W. A. & Simeonov, A. Fluorescence Polarization Assay. *Expert Opin. Drug Discov.* **6(1)**, 17–32 (2012).
67. Meldal, M., Svendsen, I., Breddam, K. & Auzanneau, F. I. Portion-mixing peptide libraries of quenched fluorogenic substrates for complete subsite mapping of endoprotease specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91(8)**, 3314–3318 (1994).
68. Zandonella, G., Haalck, L., Spener, F., Faber, K., Paltauf, F. & Hermetter, a. Enantiomeric perylene-glycerolipids as fluorogenic substrates for a dual wavelength assay of lipase activity and stereoselectivity. *Chirality* **8(7)**, 481–89 (1996).
69. Boyer, V., Fort, S., Frandsen, T. P., Schülein, M., Cottaz, S. & Driguez, H. Chemoenzymatic synthesis of a bifunctionalized cellobioside as a specific substrate for the sensitive assay of cellulase by fluorescence quenching. *Chem. Eur. J.* **8(6)**, 1389–1394 (2002).
70. Rodems, S. M., Hamman, B. D., Lin, C., Zhao, J., Shah, S., Heidary, D., Makings, L., Stack, J. H. & Pollok, B. A. A FRET-based assay platform for ultra-high density drug screening of protein kinases and phosphatases. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **1(1)**, 9–19 (2002).
71. Degorce, F. HTRF: A Technology Tailored for Drug Discovery - A Review of Theoretical Aspects and Recent Applications. *Curr. Chem. Genomics* **3(1)**, 22–32 (2009).
72. Drexler, C. HTRF KinEASE: A new solution for screening serine-threonine kinases. *Nat. Methods* **3(6)**, 1–2 (2006).
73. Zegzouti, H., Zdanovskaia, M., Hsiao, K. & Goueli, S. A. ADP-Glo: A Bioluminescent and Homogeneous ADP Monitoring Assay for Kinases. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **7(6)**, 560–572 (2009).
74. Xiao, T., Liu, R., Proud, C. G. & Wang, M. W. A high-throughput screening assay for eukaryotic elongation factor 2 kinase inhibitors. *Acta Pharm. Sin. B* **6(6)**, 557–563 (2016).
75. Baki, A., Bielik, A., Molnár, L., Szendrei, G. & Keserü, G. M. A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibitors. *ASSAY Drug Dev. Technol.* **5(1)**, 75–84 (2007).
76. Wu, S. & Lie, B. Application of SPA Assay in Drug Discovery. *Biodrugs* **19(6)**, 383–392 (2005).
77. Baum, E. Z., Johnston, S. H., Bebernitz, G. A. & Gluzman, Y. Development of a scintillation proximity assay for human cytomegalovirus protease using ^{33}P phosphorous. *Anal. Biochem.* **237(1)**, 129–134 (1996).
78. Brandish, P. E., Chiu, C. S., Schneeweis, J., Brandon, N. J., Leech, C. L., Kornienko, O., Scolnick, E. M., Strulovici, B. & Zheng, W. A cell-based ultra-high-throughput screening assay for identifying inhibitors of D-amino acid oxidase. *J. Biomol. Screen.* **11(5)**, 481–487 (2006).
79. Bowers, E. M. *et al.* Virtual ligand screening of the p300/CBP histone acetyltransferase:

- Identification of a selective small molecule inhibitor. *Chem. Biol.* **17(5)**, 471–482 (2010).
80. Muller, Y. A., Lindqvist, Y., Furey, W., Schulz, G. E., Jordan, F. & Schneider, G. A thiamin diphosphate binding fold revealed by comparison of the crystal structures of transketolase, pyruvate oxidase and pyruvate decarboxylase. *Structure* **1(2)**, 95–103 (1993).
81. Kremer, A. B., Egan, R. M. & Sable, H. Z. The active site of transketolase. two arginine residues are essential for activity. *Mol. Biol.* **255(6)**, 2405–2410 (1980).
82. Morris, K. G., Smith, M. E. B., Turner, N. J., Lilly, M. D., Mitra, R. K. & Woodley, J. M. Transketolase from *Escherichia coli*: A practical procedure for using the biocatalyst for asymmetric carbon-carbon bond synthesis. *Tetrahedron Asymmetry* **7(8)**, 2185–2188 (1996).
83. Sprenger, G. A., Ulrich, S., Gerda, S. & Hermann, S. Transketolase of *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **230(2)**, 525–532 (1995).
84. Abdoul-Zabar, J., Sorel, I., Hélaine, V., Charmantray, F., Devamani, T., Yi, D., de Berardinis, V., Louis, D., Marlière, P., Fessner, W.-D. & Hecquet, L. Thermostable Transketolase from *Geobacillus stearothermophilus*: Characterization and Catalytic Properties. *Adv. Synth. Catal.* **355(1)**, 116–128 (2013).
85. Demuyneck, C., Bolte, J., Hecquet, L. & Dalmas, V. Enzyme-catalyzed synthesis of carbohydrates: synthetic potential of transketolase. *Tetrahedron Lett.* **32(38)**, 5085–5088 (1991).
86. Sprenger, G. A. & Pohl, M. Synthetic potential of thiamin diphosphate-dependent enzymes. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **6(3)**, 145–159 (1999).
87. Ziegler, B. T., Siraub, A. & Effenberger, F. Enzyme-Catalyzed Synthesis of 1-Deoxymannojirimycin, 1-Deoxynojirimycin, and 1,4-Dideoxy-1,4-Imino-D-Arabinitol. *Angew. Chem. Int. Ed.* **27(5)**, 716–717 (1988).
88. Myles, D. C., Andrulis, P. J. & Whitesides, G. M. A transketolase-based synthesis of (+)-exo-brevicomin. *Tetrahedron Lett.* **32(37)**, 4835–4838 (1991).
89. Demuyneck, C., Bolte, J., Hecquet, L. & Samaki, H. Enzymes as reagents in organic chemistry: transketolase-catalysed synthesis of d-[1,2-¹³C₂]xylulose. *Carbohydr. Res.* **206(1)**, 79–85 (1990).
90. Hecquet, L., Bolte, J. & Demuyneck, C. Enzymatic synthesis of ‘natural-labeled’ 6-deoxy-L-sorbose precursor of an important food flavor. *Tetrahedron* **52(24)**, 8223–8232 (1996).
91. Ingram, C. U., Bommer, M., Smith, M. E. B., Dalby, P. A., Ward, J. M., Hailes, H. C. & Lye, G. J. One-Pot Synthesis of Amino-Alcohols Using a De-Novo Transketolase and b-Alanine:Pyruvate Transaminase Pathway in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **96**, 559–569 (2007).
92. Lorillière, M., De Sousa, M., Bruna, F., Heuson, E., Gefflaut, T., de Berardinis, V., Saravanan, T., Yi, D., Fessner, W.-D., Charmantray, F. & Hecquet, L. One-pot, two-step cascade synthesis of naturally rare L-erythro (3S,4S) ketoses by coupling a thermostable transaminase and transketolase. *Green Chem.* **19(2)**, 425–435 (2017).

93. Zhou, C., Saravanan, T., Lorillière, M., Wei, D., Charmantray, F., Hecquet, L., Fessner, W. D. & Yi, D. Second-Generation Engineering of a Thermostable Transketolase (TKGst) for Aliphatic Aldehyde Acceptors with Either Improved or Reversed Stereoselectivity. *ChemBioChem* **18(5)**, 455–459 (2017).
94. Littlechild, J., Turner, N., Hobbs, G., Lilly, M., Rawas, A. & Watson, H. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic data with *Escherichia coli* transketolase. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **51(6)**, 1074–1076 (1995).
95. Nikkola, M., Lindqvist, Y. & Schneider, G. Refined Structure of Transketolase from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.0 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* **238(3)**, 387–404 (1994).
96. Fullam, E., Pojer, F., Bergfors, T., Jones, T. A. & Cole, S. T. Structure and function of the transketolase from *Mycobacterium tuberculosis* and comparison with the human enzyme. *Open Biol.* **2(1)**, 1–12 (2012).
97. Joshi, S., Singh, A. R., Kumar, A., Misra, P. C., Siddiqi, M. I. & Saxena, J. K. Molecular cloning and characterization of *Plasmodium falciparum* transketolase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **160(1)**, 32–41 (2008).
98. Mitschke, L., Parthier, C., Schröder-Tittmann, K., Coy, J., Lüdtke, S. & Tittmann, K. The crystal structure of human transketolase and new insights into its mode of action. *J. Biol. Chem.* **285(41)**, 31559–31570 (2010).
99. Schneider, G. & Lindqvist, Y. Crystallography and mutagenesis of transketolase: Mechanistic implications for enzymatic thiamin catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1385(2)**, 387–398 (1998).
100. RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB - 3OOY Structure summary. doi:10.2210/pdb3OOY/pdb
101. Ranoux, A. & Hanefeld, U. Improving Transketolase. *Top. Catal.* **56** 750–764 (2013).
102. Schenk, G., Duggleby, R. G. & Nixon, P. F. Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30(12)**, 1297–1318 (1998).
103. Warburg, O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* **123(3191)**, 309–314 (1956).
104. Jiang, P., Du, W. & Wu, M. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein Cell* **5(8)**, 592–602 (2014).
105. Patra, K. C. & Hay, N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem. Sci.* **39(8)**, 347–354 (2014).
106. Ricciardelli, C., Lokman, N. A., Cheruvu, S., Tan, I. A., Ween, M. P., Pyragius, C. E., Ruzskiewicz, A., Hoffmann, P. & Oehler, M. K. Transketolase is upregulated in metastatic peritoneal implants and promotes ovarian cancer cell proliferation. *Clin. Exp. Metastasis* **32(5)**, 441–455 (2015).
107. Boros, L. G., Lee, P. W. N., Brandes, J. L., Cascante, M., Muscarella, P., Schirmer, W. J., Melvin, W. S. & Ellison, E. C. Nonoxidative pentose phosphate pathways and their direct

- role in ribose synthesis in tumors: Is cancer a disease of cellular glucose metabolism? *Med. Hypotheses* **50(1)**, 55–59 (1998).
108. Boros, L. G., Puigjaner, J., Cascante, M., Lee, W.-N. P., Brandes, J. L., Bassilian, S., Yusuf, F. I., Williams, R. D., Muscarella, P., Melvin, W. S. & Schirmer, W. J. Oxythiamine and Dehydroepiandrosterone Inhibit the Nonoxidative Synthesis of Ribose and Tumor Cell Proliferation. *Cancer Res.* **57**, 4242–4248 (1997).
109. Langbein, S., Zerilli, M., Zur Hausen, A., Staiger, W., Rensch-Boschert, K., Lukan, N., Popa, J., Ternullo, M. P., Steidler, A., Weiss, C., Grobholz, R., Willeke, F., Alken, P., Stassi, G., Schubert, P. & Coy, J. F. Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *Br. J. Cancer* **94(4)**, 578–585 (2006).
110. Raïs, B., Comin, B., Puigjaner, J., Brandes, J. L., Creppy, E., Saboureau, D., Ennamany, R., Paul Lee, W. N., Boros, L. G. & Cascante, M. Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G 1 phase cycle arrest in Ehrlich ' s tumor cells through inhibition of the pentose cycle. *FEBS Lett.* **456(1)**, 113–118 (1999).
111. Boros, L. G., Bassilian, S., Lim, S. & Lee, W. N. P. Genistein inhibits nonoxidative ribose synthesis in MIA pancreatic adenocarcinoma cells: A new mechanism of controlling tumor growth. *Pancreas* **22(1)**, 1–7 (2001).
112. Boros, L. G., Brandes, J. L., Yusuf, F. I., Cascante, M., Williams, R. D. & Schirmer, W. J. Inhibition of the oxidative and nonoxidative pentose phosphate pathways by somatostatin: A possible mechanism of antitumor action. *Med. Hypotheses* **50(6)**, 501–506 (1998).
113. Zhang, S., Yang, J. H., Guo, C. K. & Cai, P. C. Gene silencing of TKTL1 by RNAi inhibits cell proliferation in human hepatoma cells. *Cancer Lett.* **253(1)**, 108–114 (2007).
114. Coy, J. F., Dressler, D., Wilde, J. & Schubert, P. Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: Clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer. *Clin. Lab.* **51(5–6)**, 257–273 (2005).
115. Xu, I. M., Lai, R. K., Lin, S., Tse, A. P., Chiu, D. K. & Koh, H. Transketolase counteracts oxidative stress to drive cancer development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113(6)**, E725–E734 (2016).
116. Brinkman, M. T., Karagas, M. R., Zens, M. S., Schned, A., Reulen, R. C. & Zeegers, M. P. Minerals and vitamins and the risk of bladder cancer: results from the New Hampshire Study. *Cancer Causes Control* **21(4)**, 609–619 (2010).
117. Kaaks, R., Tuyns, A. J., Haelterman, M. & Riboli, E. Nutrient intake patterns and gastric cancer risk: a case-control study in Belgium. *Int. J. Cancer* **78(4)**, 415–420 (1998).
118. Sanemori, H., Egi, Y. & Kawasaki, T. Pathway of thiamine pyrophosphate synthesis in *Micrococcus denitrificans*. *J. Bacteriol.* **126(3)**, 1030–1036 (1976).
119. Hayashi, M. & Nosaka, K. Characterization of Thiamin Phosphate Kinase in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrobaculum calidifontis*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*. **61**, 369–374 (2015).

120. Blass, J. P. & Gibson, G. E. Abnormality of a thiamine-requiring enzyme in patients with Wernicke-Korsakoff syndrome. *N. Engl. J. Med.* **297(25)**, 1367–1370 (1977).
121. Isenberg-Grzeda, E., Kutner, H. E. & Nicolson, S. E. Wernicke-Korsakoff-Syndrome: Under-Recognized and Under-Treated. *Psychosomatics* **53(6)**, 507–516 (2012).
122. Donnino, M. W., Vega, J., Miller, J. & Walsh, M. Myths and Misconceptions of Wernicke's Encephalopathy: What Every Emergency Physician Should Know. *Ann. Emerg. Med.* **50(6)**, 715–721 (2007).
123. Cook, C. C. H., Hallwood, P. M. & Thomson, A. D. B Vitamin Deficiency and Neuropsychiatric Syndromes in Alcohol Misuse. *Alcohol Alcohol.* **33(4)**, 317–336 (1998).
124. Paoletti, F., Mocali, A., Marchi, M., Sorbi, S. & Piacentini, S. Occurrence of Transketolase abnormalities in extracts of foreskin fibroblasts from patient with Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172(2)**, 396–401 (1990).
125. Paoletti, F. & Mocali, A. Enhanced proteolytic activities in cultured fibroblasts of Alzheimer patients are revealed by peculiar transketolase alterations. *J. Neurol. Sci.* **105(2)**, 211–216 (1991).
126. Paoletti, F., Mocali, A. & Tombaccini, D. Cysteine proteinases are responsible for characteristic transketolase alterations in Alzheimer fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **172(1)**, 63–68 (1997).
127. Paludisme - Organisation mondiale de la santé. (2017). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/fr/>.
128. Roth, E. F., Ruprecht, R. M., Schulman, S., Vanderberg, J. & Olson, J. A. Ribose metabolism and nucleic acid synthesis in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient human erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *J. Clin. Invest.* **77(4)**, 1129–1135 (1986).
129. Atamna, H., Pascarmona, G. & Ginsburg, H. Hexose-monophosphate shunt activity in intact *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and in free parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **67(1)**, 79–89 (1994).
130. Hasan, A. M., Mazumder, H. M. H., Chowdhury, S. A., Datta, A. & Khan, A. M. Molecular-docking study of malaria drug target enzyme transketolase in *Plasmodium falciparum* 3D7 portends the novel approach to its treatment. *Source Code Biol. Med.* **10(1)**, 1–14 (2015).
131. Sharma, M., Chauhan, K., Chauhan, S. S., Kumar, A., Singh, S. V., Saxena, J. K., Agarwal, P., Srivastava, K., Raja Kumar, S., Puri, S. K., Shah, P., Siddiqi, M. I. & Chauhan, P. M. S. Synthesis of hybrid 4-anilinoquinoline triazines as potent antimalarial agents, their in silico modeling and bioevaluation as *Plasmodium falciparum* transketolase and β -hematin inhibitors. *Med. Chem. Commun.* **3(1)**, 71–79 (2012).
132. Tuberculose - Organisation mondiale de la santé. (2017). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/>.
133. Dye, C. Global Epidemiology of Tuberculosis. *Lancet* **367**, 938–940 (2006).
134. Glaziou, P., Falzon, D., Floyd, K. & Raviglione, M. Global epidemiology of tuberculosis.

- Semin. Respir. Crit. Care Med.* **34(1)**, 3–16 (2013).
135. Cole, S. T. *et al.* Deciphering the biology of mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537–544 (1998).
 136. Higgs, H. N. & Peterson, K. J. Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. *Mol. Biol. Cell* **16(1)**, 1–13 (2005).
 137. Rosenkrands, I., King, A., Weldingh, K., Moniatte, M., Moertz, E. & Andersen, P. Towards the proteome of Mycobacterium tuberculosis. *Electrophoresis* **21(17)**, 3740–3756 (2000).
 138. Brownlee, M., Vlassara, H. & Cerami, A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann. Intern. Med.* **101(4)**, 527–537 (1984).
 139. Hammes, H.-P., Du, X., Edelstein, D., Taguchi, T., Matsumura, T., Ju, Q., Lin, J., Bierhaus, A., Nawroth, P., Hannak, D., Neumaier, M., Bergfeld, R., Giadino, I. & Brownlee, M. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat. Med.* **9(3)**, 294–299 (2003).
 140. Kochetov, G. A., Izotova, A. E. & Meshalkina, L. E. Inhibition of transketolase by analogues of the coenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43(5)**, 1198–1203 (1971).
 141. Datta, A. & Racker, E. Mechanism of action of transketolase. *J. Biol. Chem.* **236(3)**, 617–623 (1961).
 142. Heinrich, P. C., Steffen, H., Janser, P. & Wiss, O. Studies on the Reconstitution of Apotransketolase with Thiamine Pyrophosphate and Analogs of the Coenzyme. *Eur. J. Biochem.* **30(3)**, 533–541 (1972).
 143. Golbik, R., Neef, H., Hübner, G., König, S., Seliger, B., Meshalkina, L., Kochetov, G. A. & Schellenberger, A. Function of the aminopyrimidine part in thiamine pyrophosphate enzymes. *Bioorg. Chem.* **19(1)**, 10–17 (1991).
 144. Thomas, A. A. *et al.* Non-charged thiamine analogs as inhibitors of enzyme transketolase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18(2)**, 509–512 (2008).
 145. Bunik, V. I., Tylicki, A. & Lukashev, N. V. Thiamin diphosphate-dependent enzymes: From enzymology to metabolic regulation, drug design and disease models. *FEBS J.* **280(24)**, 6412–6442 (2013).
 146. Thomas, A. A. *et al.* Synthesis, in vitro and in vivo activity of thiamine antagonist transketolase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18(6)**, 2206–2210 (2008).
 147. Huerou, Y. Le *et al.* Prodrug thiamine analogs as inhibitors of the enzyme transketolase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 505–508 (2008).
 148. Solovjeva, O. N. & Kochetov, G. A. Inhibition of transketolase by p-hydroxyphenylpyruvate. *FEBS Lett.* **462**, 246–248 (1999).
 149. Touisni, N. Développement de biocapteurs ampérométriques pour la détermination de l'activité de la transcétolase et pour la détection d'inhibiteurs de cette enzyme. (2013).
 150. Du, M. X., Sim, J., Fang, L., Yin, Z., Koh, S., Stratton, J., Pons, J., Wang, J. J. & Carte, B.

- Identification of novel small-molecule inhibitors for human transketolase by high-throughput screening with fluorescent intensity (FLINT) assay. *J. Biomol. Screen.* **9(5)**, 427–433 (2004).
151. Obiol-Pardo, C., Alcarraz-Vizan, G., Cascante, M. & Rubio-Martinez, J. Diphenyl urea derivatives as inhibitors of transketolase: A structure-based virtual screening. *PLoS One* **7(3)**, 1–7 (2012).
152. Joshi, S. Identification of potential *P. falciparum* transketolase inhibitors: pharmacophore design, in silico screening and docking studies. *J. Biophys. Chem.* **1(2)**, 96–104 (2010).
153. Abdoul-Zabar, J. Etude de la transcétolase de *Geobacillus stearothermophilus* et modification de son énantiométrie par ingénierie enzymatique. (2014).
154. de la Haba, G., Leder, I. G. & Racker, E. Crystalline transketolase from bakers' yeast: isolation and properties. *J. Biol. Chem.* **214(1)**, 409–426 (1955).
155. Naula, C., Alibu, V. P., Brock, J. M., Veitch, N. J., Burchmore, R. J. S. & Barrett, M. P. A new erythrose 4-phosphate dehydrogenase coupled assay for transketolase. *J. Biochem. Biophys. Methods* **70(6)**, 1185–1187 (2008).
156. Hecquet, L., Bolte, J. & Demuynck, C. New Assays for Transketolase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57(12)**, 2174–2176 (1993).
157. Kochetov, G. A. Determination of Transketolase activity via Ferricyanide Reduction. *Methods Enzymol.* **89**, 43–44 (1982).
158. Yi, D., Devamani, T., Abdoul-Zabar, J., Charmantray, F., Helaine, V., Hecquet, L. & Fessner, W. D. A pH-based high-throughput assay for transketolase: fingerprinting of substrate tolerance and quantitative kinetics. *ChemBioChem* **13(15)**, 2290–2300 (2012).
159. Smith, M. E. B., Kaulmann, U., Ward, J. M. & Hailes, H. C. A colorimetric assay for screening transketolase activity. *Bioorg. Med. Chem.* **14(20)**, 7062–7065 (2006).
160. Sevestre, A., Hélaine, V., Guyot, G., Martin, C. & Hecquet, L. A fluorogenic assay for transketolase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Tetrahedron Lett.* **44(4)**, 827–830 (2003).
161. Mitra, R. K. & Woodley, J. M. A useful assay for transketolase in asymmetric syntheses. *Biotechnol. Tech.* **10(3)**, 167–172 (1996).
162. Miller, O. J., Hibbert, E. G., Ingram, C. U., Lye, G. J. & Dalby, P. A. Optimisation and evaluation of a generic microplate-based HPLC screen for transketolase activity. *Biotechnol. Lett.* **29(11)**, 1759–1770 (2007).
163. Smith, M. E. B., Hibbert, E. G., Jones, A. B., Dalby, P. A. & Hailes, H. C. Enhancing and Reversing the Stereoselectivity of *Escherichia coli* Transketolase via Single-Point Mutations. *Adv. Synth. Catal.* **350**, 2631–2638 (2008).
164. Ranoux, A., Arends, I. W. C. E. & Hanefeld, U. Development of screening methods for transketolase activity and substrate scope. *Tetrahedron Lett.* **53(7)**, 790–793 (2012).
165. Sanchez-Paniagua Lopez, M., Charmantray, F., Helaine, V., Hecquet, L. & Mousty, C. Electrochemical detection of transketolase activity using a tyrosinase biosensor. *Biosens.*

- Bioelectron.* **26(1)**, 139–143 (2010).
166. Touisni, N., Charmantray, F., Hélaïne, V., Hecquet, L. & Mousty, C. An efficient amperometric transketolase assay: Towards inhibitor screening. *Biosens. Bioelectron.* **62**, 90–96 (2014).
167. Mousty, C. Biosensing applications of clay-modified electrodes: A review. *Anal. Bioanal. Chem.* **396(1)**, 315–325 (2010).
168. Mousty, C. & Prevot, V. Hybrid and biohybrid layered double hydroxides for electrochemical analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **405(11)**, 3513–3523 (2013).
169. Charmantray, F., Touisni, N., Hecquet, L. & Mousty, C. Amperometric Biosensor Based on Galactose Oxidase Immobilized in Clay Matrix. *Electroanalysis* **25(3)**, 630–635 (2013).
170. Charmantray, F., Touisni, N., Hecquet, L., Noguier, T. & Mousty, C. Galactose Oxidase/Prussian Blue Based Biosensors. *Electroanalysis* **27(6)**, 1341–1344 (2015).
171. Halma, M., Doumèche, B., Hecquet, L., Prévot, V., Mousty, C. & Charmantray, F. Thiamine biosensor based on oxidative trapping of enzyme-substrate intermediate. *Biosens. Bioelectron.* **87**, 850–857 (2017).
172. Minh, C. T. *Les biocapteurs : principes, construction et applications.* (1991).
173. Blum, L. & Coulet, P. Biosensor principles and applications. *Bioprocess Technol.* **15**, 1–344 (1991).
174. El Harrad, L., Bourais, I., Mohammadi, H. & Amine, A. Recent Advances in Electrochemical Biosensors Based on Enzyme Inhibition for Clinical and Pharmaceutical Applications. *Sensors* **18(1)**, 164 (2018).
175. Harper, A. & Anderson, M. R. Electrochemical glucose sensors-developments using electrostatic assembly and carbon nanotubes for biosensor construction. *Sensors* **10(9)**, 8248–8274 (2010).
176. Karyakin, A. A., Karyakina, E. E., Schuhmann, W. & Schmidt, H. L. Electropolymerized azines: Part II. In a search of the best electrocatalyst of NADH oxidation. *Electroanalysis* **11(8)**, 553–557 (1999).
177. Abdellaoui, S., Bekhouche, M., Noiriel, A., Henkens, R., Bonaventura, C., Blum, L. J. & Doumèche, B. Rapid electrochemical screening of NAD-dependent dehydrogenases in a 96-well format. *Chem. Commun.* **49(51)**, 5781–3 (2013).
178. Freckmann, G., Schmid, C., Ruhland, K., Baumstark, A. & Haug, C. Integrated self-monitoring of blood glucose system: Handling step analysis. *J. Diabetes Sci. Technol.* **6(4)**, 938–946 (2012).
179. Asturias-Arribas, L., Asunción Alonso-Lomillo, M., Domínguez-Renedo, O. & Julia Arcos-Martínez, M. Screen-printed biosensor based on the inhibition of the acetylcholinesterase activity for the determination of codeine. *Talanta* **111**, 8–12 (2013).
180. Du, D., Chen, S., Cai, J. & Song, D. Comparison of drug sensitivity using acetylcholinesterase biosensor based on nanoparticles-chitosan sol-gel composite. *J.*

- Electroanal. Chem.* **611**, 60–66 (2007).
181. Medyantseva, E. P., Varlamova, R. M., Gimalletdinova, D. A., Fattakhova, A. N. & Budnikov, G. K. An amperometric monoamine oxidase biosensor for determining some antidepressants. *J. Anal. Chem.* **63(3)**, 275–279 (2008).
182. El Harrad, L. & Amine, A. Amperometric biosensor based on prussian blue and nafion modified screen-printed electrode for screening of potential xanthine oxidase inhibitors from medicinal plants. *Enzyme Microb. Technol.* **85**, 57–63 (2016).
183. Martinez, N. A., Messina, G. A., Bertolino, F. A., Salinas, E. & Raba, J. Screen-printed enzymatic biosensor modified with carbon nanotube for the methimazole determination in pharmaceuticals formulations. *Sens. Actuators, B* **133(1)**, 256–262 (2008).
184. Brisset, H., Briand, J.-F., Barry-Martinet, R., Duong, T. H., Frère, P., Gohier, F., Leriche, P. & Bressy, C. 96X Screen-Printed Gold Electrode Platform to Evaluate Electroactive Polymers as Marine Antifouling Coatings. *Anal. Chem.* **90(8)**, 4978–4981 (2018).
185. Sakura, S. Electrochemiluminescence of hydrogen peroxide-luminol at a carbon electrode. *Anal. Chim. Acta* **262(1)**, 49–57 (1992).
186. Miao, W. & Bard, A. J. Electrogenerated chemiluminescence. 80. C-reactive protein determination at high amplification with [Ru(bpy)₃]²⁺-containing microspheres. *Anal. Chem.* **76(23)**, 7109–7113 (2005).
187. Zhan, W. & Bard, A. J. Electrogenerated chemiluminescence. 83. Immunoassay of human C-reactive protein by using Ru(bpy)₃²⁺-encapsulated liposomes as labels. *Anal. Chem.* **79(2)**, 459–463 (2007).
188. Zhang, J., Qi, H., Li, Y., Yang, J., Gao, Q. & Zhang, C. Electrogenerated chemiluminescence DNA biosensor based on hairpin DNA probe labeled with ruthenium complex. *Anal. Chem.* **80(8)**, 2888–2894 (2008).
189. Marquette, C. A., Degiuli, A. & Blum, L. J. Electrochemiluminescent biosensors array for the concomitant detection of choline, glucose, glutamate, lactate, lysine and urate. *Biosens. Bioelectron.* **19(5)**, 433–439 (2003).
190. Marquette, C. A. & Blum, L. J. Luminol electrochemiluminescence-based fibre optic biosensors for flow injection analysis of glucose and lactate in natural samples. *Anal. Chim. Acta* **381(1)**, 1–10 (1999).
191. Martin, A. F. & Nieman, T. A. Chemiluminescence biosensors using tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) and dehydrogenases immobilized in cation exchange polymers. *Biosens. Bioelectron.* **12(6)**, 479–489 (1997).
192. Tsafack, V. C., Marquette, C. A., Leca, B. & Blum, L. J. An electrochemiluminescence-based fibre optic biosensor for choline flow injection analysis. *Analyst* **125(1)**, 151–155 (2000).
193. Marquette, C. A., Ravaud, S. & Blum, L. J. Luminol Electrochemiluminescence-Based Biosensor for Total Cholesterol Determination in Natural Samples. *Anal. Lett.* **33(9)**, 1779–1796 (2000).

194. Atwater, J. E., Akse, J. R., Dehart, J., Wheeler, R. R., Box, P. O. & Creek, M. Enzymatic determination of ethanol using 'reagentless' electrocatalyzed luminol chemiluminescence. *Anal. Lett.* **30(8)**, 1445–1453 (1997).
195. Xu, Z., Guo, Z. & Dong, S. Electrogenerated chemiluminescence biosensor with alcohol dehydrogenase and tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium (II) immobilized in sol-gel hybrid material. *Biosens. Bioelectron.* **21(3)**, 455–461 (2005).
196. Zhang, L., Xu, Z. & Dong, S. Electrogenerated chemiluminescence biosensor based on Ru(bpy)₃²⁺ and dehydrogenase immobilized in sol-gel/chitosan/poly(sodium 4-styrene sulfonate) composite material. *Anal. Chim. Acta* **575(1)**, 52–56 (2006).
197. Yokoyama, K., Sasaki, S., Ikebukuro, K., Takeuchi, T., Karube, I., Tokitsu, Y. & Masuda, Y. Biosensing based on NADH detection coupled to electrogenerated chemiluminescence from ruthenium tris(2,2'-bipyridine). *Talanta* **41(6)**, 1035–1040 (1994).
198. Golla, R. & Seethala, R. A sensitive, robust high-throughput electrochemiluminescence assay for rat insulin. *J. Biomol. Screen.* **9(1)**, 62–70 (2004).
199. Prieto, B., Miguel, D., Costa, M., Coto, D. & Alvarez, F. V. New quantitative electrochemiluminescence method (ECLIA) for interleukin-6 (IL-6) measurement. *Clin. Chem. Lab. Med.* **48(6)**, 835–838 (2010).
200. Manguso, F., Bennato, R., Lombardi, G., Viola, A., Riccio, E. & Cipolletta, L. Electrochemiluminescence immunoassay method underestimates cortisol suppression in ulcerative colitis patients treated with oral prednisone. *World J. Gastroenterol.* **20(31)**, 10895–10899 (2014).
201. Abdellaoui, S. Déshydrogénase et laccase sur des surfaces redox : vers des applications en bioélectroniques. (2013).
202. Wojciechowski, M., Sundseth, R., Moreno, M. & Henkens, R. Multichannel Electrochemical Detection System for Quantitative Monitoring of PCR Amplification. *Clin. Chem.* **45(9)**, 1690–1693 (1999).
203. Piermarini, S., Micheli, L., Ammida, N. H. S., Palleschi, G. & Moscone, D. Electrochemical immunosensor array using a 96-well screen-printed microplate for aflatoxin B1 detection. *Biosens. Bioelectron.* **22(7)**, 1434–1440 (2007).
204. Neagu, D., Perrino, S., Micheli, L., Palleschi, G. & Moscone, D. Aflatoxin M1 determination and stability study in milk samples using a screen-printed 96-well electrochemical microplate. *Int. Dairy J.* **19(12)**, 753–758 (2009).
205. Abdellaoui, S., Noiriél, A., Henkens, R., Bonaventura, C., Blum, L. J. & Doumèche, B. A 96-well electrochemical method for the screening of enzymatic activities. *Anal. Chem.* **85(7)**, 3690–3697 (2013).
206. Dimanche-Boitrel, M.-T., Bach, S., Delehouze, C., Goekjian, P. & Comte, A. N1- and N7-substituted sibiriline derivatives and their use as inhibitor of cellular necroptosis. *PCT Int. Appl., WO2017/064216 A1* (2017).
207. Laviron, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of

- diffusionless electrochemical systems. *J. Electroanal. Chem.* **101**, 19–28 (1979).
208. Sassolas, A., Blum, L. J. & Leca-Bouvier, B. D. New electrochemiluminescent biosensors combining poly(luminol) and an enzymatic matrix. *Anal. Bioanal. Chem.* **394(4)**, 971–980 (2009).
209. Itaya, K., Shoji, N. & Uchida, I. Catalysis of the reduction of molecular oxygen to water at prussian blue modified electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 3423–3429 (1984).
210. Ricci, F. & Palleschi, G. Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **21(3)**, 389–407 (2005).
211. Rungtaweevoranit, B., Diercks, C. S., Kalmutzki, M. J. & Yaghi, O. M. Spiers Memorial Lecture: Progress and prospects of reticular chemistry. *Faraday Discuss.* **201**, 9–45 (2017).
212. Haapakka, K. E. & Kankare, J. J. Application of the electrochemiluminescence of luminol to the determination of copper. *Anal. Chim. Acta* **118**, 333–340 (1980).
213. Kuzmič, P. Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: Application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* **237(2)**, 260–273 (1996).
214. Doumèche, B. & Blum, L. J. NADH oxidation on screen-printed electrode modified with a new phenothiazine diazonium salt. *Electrochem. commun.* **12(10)**, 1398–1402 (2010).
215. Zakharchuk, N. F., Meyer, B., Hennig, H., Scholz, F., Jaworksi, A. & Stojek, Z. A comparative study of Prussian-Blue-modified graphite paste electrodes and solid graphite electrodes with mechanically immobilized Prussian Blue. *J. Electroanal. Chem.* **398**, 23–35 (1995).
216. Moscone, D., D'Ottavi, D., Compagnone, D. & Palleschi, G. Construction and Analytical Characterization of Prussian Blue-Based Carbon Paste Electrodes and Their Assembly as Oxidase Enzyme Sensors. *Anal. Chem.* **73**, 2529–2535 (2001).
217. Friedman, A. M. & Kennedy, J. W. The Self-diffusion Coefficients of Potassium, Cesium, Iodide and Chloride Ions in Aqueous Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **77(17)**, 4499–4501 (1955).
218. Haghighi, B., Hamidi, H. & Gorton, L. Electrochemical behavior and application of Prussian blue nanoparticle modified graphite electrode. *Sens. Actuators, B* **147(1)**, 270–276 (2010).
219. Leca, B. & Blum, L. J. Luminol electrochemiluminescence with screen-printed electrodes for low-cost disposable oxidase-based optical sensors. *Analyst* **125(5)**, 789–791 (2000).
220. Preston, J. P. & Nieman, T. A. An electrogenerated chemiluminescence probe and its application utilizing tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) and luminol chemiluminescence without a flowing stream. *Anal. Chem.* **68(6)**, 966–970 (1996).
221. Leca-Bouvier, B. D., Sassolas, A. & Blum, L. J. Poly(luminol)/hydrogel composites as new electrochemiluminescent-active sensing layers. *Anal. Bioanal. Chem.* **406(23)**, 5657–5667 (2014).
222. Nossol, E. & Zarbin, A. J. G. A Simple and Innovative Route to Prepare a Novel Carbon Nanotube/Prussian Blue Electrode and its Utilization as a Highly Sensitive

- H₂O₂ Amperometric Sensor. *Adv. Funct. Mater.* **19(24)**, 3980–3986 (2009).
223. Yang, J.-H., Myoung, N. & Hong, H.-G. Facile and controllable synthesis of Prussian blue on chitosan-functionalized graphene nanosheets for the electrochemical detection of hydrogen peroxide. *Electrochim. Acta* **81**, 37–43 (2012).
224. Jiang, Y., Zhang, X., Shan, C., Hua, S., Zhang, Q., Bai, X., Dan, L. & Niu, L. Functionalization of graphene with electrodeposited Prussian blue towards amperometric sensing application. *Talanta* **85(1)**, 76–81 (2011).
225. O'Halloran, M. P., Pravda, M. & Guilbault, G. G. Prussian Blue bulk modified screen-printed electrodes for H₂O₂ detection and for biosensors. *Talanta* **55**, 605–611 (2001).
226. Zhang, Y., Sun, X., Zhu, L., Shen, H. & Jia, N. Electrochemical sensing based on graphene oxide/Prussian blue hybrid film modified electrode. *Electrochim. Acta* **56(3)**, 1239–1245 (2011).
227. Karyakin, A. A., Puganova, E. A., Budashov, I. A., Kurochkin, I. N., Karyakina, E. E., Levchenko, V. A., Matveyenko, V. N. & Varfolomeyev, S. D. Prussian Blue Based Nanoelectrode Arrays for H₂O₂ Detection. *Anal. Chem.* **76**, 474–478 (2004).
228. Aymard, C., Bonaventura, C., Henkens, R., Mousty, C., Hecquet, L., Charmantray, F., Blum, L. J. & Doumèche, B. High-Throughput Electrochemical Screening Assay for Free and Immobilized Oxidases: Electrochemiluminescence and Intermittent Pulse Amperometry. *ChemElectroChem* **4(4)**, 957–966 (2017).
229. Yuan, F., Qi, L., Fereja, T. H., Snizhko, D. V., Liu, Z., Zhang, W. & Xu, G. Regenerable bipolar electrochemiluminescence device using glassy carbon bipolar electrode, stainless steel driving electrode and cold patch. *Electrochim. Acta* **262**, 182–186 (2018).
230. Fernández Laespada, E., Pérez Pavón, J. L. & Moreno Cordero, B. Electroluminescent detection of enzymatically generated hydrogen peroxide. *Anal. Chim. Acta* **327(3)**, 253–260 (1996).
231. Cheng, X., Challier, L., Etcheberry, A., Noël, V. & Perez, H. The ABTS-HRP system as an alternative method to RRDE for the determination of the selectivity of the oxygen reduction reaction. *Int. J. Electrochem. Sci.* **7(7)**, 6247–6264 (2012).
232. Vieira, I. da C. & Fatibello-Filho, O. Flow injection spectrophotometric determination of hydrogen peroxide using a crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*) as a source of peroxidase. *Analyst* **123(9)**, 1809–1812 (1998).
233. Onoda, M., Uchiyama, T., Mawatari, K., Kaneko, K. & Nakagomi, K. Simple and Rapid Determination of Hydrogen Peroxide Using Phosphine-based Fluorescent Reagents with Sodium Tungstate Dihydrate. *Anal. Sci.* **22(6)**, 815–817 (2006).
234. Zhang, Z. F., Cui, H., Lai, C. Z. & Liu, L. J. Gold nanoparticle-catalyzed luminol chemiluminescence and its analytical applications. *Anal. Chem.* **77(10)**, 3324–3329 (2005).
235. Marquette, C. A. & Blum, L. J. 1,3-Dichloro-5,5-dimethylhydantoin as triggering reagent for chemiluminescent biochip based on the luminol-H₂O₂ reaction. *Anal. Lett.* **36(9)**, 1697–1706 (2003).

236. Dodeigne, C., Thunus, L. & Lejeune, R. Chemiluminescence as a diagnostic tool. A review. *Talanta* **51(3)**, 415–439 (2000).
237. Schumacher, D., Vogel, J. & Lerche, U. Construction and applications of an enzyme electrode for determination of galactose and galactose-containing saccharides. *Biosens. Bioelectron.* **9**, 85–90 (1994).
238. Tkáč, J., Navrátil, M., Šturdík, E. & Gemeiner, P. Monitoring of dihydroxyacetone production during oxidation of glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with an enzyme biosensor. *Enzyme Microb. Technol.* **28**, 383–388 (2001).
239. Szabó, E. E., Adányi, N. & Váradi, M. Application of biosensor for monitoring galactose content. *Biosens. Bioelectron.* **11(10)**, 1051–1058 (1996).
240. Mousty, C. Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes - New trends. *Appl. Clay Sci.* **27**, 159–177 (2004).
241. Ruzicka, B. & Zaccarelli, E. A fresh look at the Laponite phase diagram. *Soft Matter* **7(4)**, 1268 (2011).
242. Zen, J. M., Kumar, A. S. & Chen, H. W. Electrochemical formation of Prussian blue in natural iron-intercalated clay and cinder matrixes. *Electroanalysis* **12(7)**, 542–545 (2000).
243. Jin, R., Li, L., Lian, Y., Xu, X. & Zhao, F. Layered double hydroxide supported Prussian blue nanocomposites for electrocatalytic reduction of H₂O₂. *Anal. Methods* **4(9)**, 2704 (2012).
244. Healy, M. J. & Christen, P. Mechanistic Probes for Enzymatic Reactions. Oxidation-Reduction Indicators as Oxidants of Intermediary Carbanions (Studies with Aldolase, Aspartate Aminotransferase, Pyruvate Decarboxylase, and 6-Phosphogluconate Dehydrogenase). *Biochemistry* **12(1)**, 35–41 (1973).
245. Zaib, M. & Athar, M. M. Electrochemical evaluation of *Phanerocheaete chrysosporium* based carbon paste electrode with potassium ferricyanide redox system. *Int. J. Electrochem. Sci.* **10(8)**, 6690–6702 (2015).
246. Niranjana, E., Kumara Swamy, B. E., Raghavendra Naik, R., Sherigara, B. S. & Jayadevappa, H. Electrochemical investigations of potassium ferricyanide and dopamine by sodium dodecyl sulphate modified carbon paste electrode: A cyclic voltammetric study. *J. Electroanal. Chem.* **631(1–2)**, 1–9 (2009).
247. Pandurangachar, M., Kumara Swamy, B. E., Chandrashekar, B. N., Gilbert, O., Reddy, S. & Sherigara, B. S. Electrochemical investigations of potassium ferricyanide and dopamine by 1-butyl-4-methylpyridinium tetrafluoro borate modified carbon paste electrode: A cyclic voltammetric study. *Int. J. Electrochem. Sci.* **5(8)**, 1187–1202 (2010).
248. Perenlei, G., Tee, T. W., Yusof, N. A. & Kheng, G. J. Voltammetric detection of potassium ferricyanide mediated by multi-walled carbon nanotube/titanium dioxide composite modified glassy carbon electrode. *Int. J. Electrochem. Sci.* **6(2)**, 520–531 (2011).
249. Aymard, C. M. G., Halma, M., Comte, A., Mousty, C., Prevot, V., Hecquet, L., Charmantray, F., Blum, L. J. & Doumèche, B. Innovative electrochemical screening allows

- to identify new transketolase inhibitors. *Anal. Chem.* acs.analchem.8b01752 (2018). doi:10.1021/acs.analchem.8b01752
250. Touisni, N., Charmantray, F., Helaine, V., Forano, C., Hecquet, L. & Mousty, C. Optimized immobilization of transketolase from *E. coli* in MgAl-layered double hydroxides. *Colloids Surf. B* **112**, 452–459 (2013).
251. Wood, T. & Fletcher, S. The affinity chromatography of Transketolase. *Biochim. Biophys. Acta* **527**, 249–255 (1978).
252. Meshalkina, L. E. & Kochetov, G. A. The functional identity of the active centers of transketolase. *Biochim. Biophys. Acta* **571**, 218–223 (1979).
253. Paul, S. & Guin, J. Dioxygen-Mediated Decarbonylative C-H Alkylation of Heteroaromatic Bases with Aldehydes. *Chem. Eur. J.* **21(49)**, 17618–17622 (2015).

Annexes

Annexe 1 : 1ère page de la publication « High-Throughput Electrochemical Screening Assay for Free and Immobilized Oxidases: Electrochemiluminescence and Intermittent Pulse Amperometry » publiée dans ChemElectroChem en 2017.

Annexe 2 : 1ère page de la publication « Innovative electrochemical screening allows transketolase inhibitors to be identified » publiée dans Analytical Chemistry en 2018.

Annexe 3 : Feuille de commande du logiciel Dynafit pour l'ajustement des mesures d'activité sur un modèle simplifié à la fixation de la TPP sur la TK



High-Throughput Electrochemical Screening Assay for Free and Immobilized Oxidases : Electrochemiluminescence and Intermittent Pulse Amperometry

Chloé Aymard,^[a] Celia Bonaventura,^[c] Robert Henkens,^[c] Christine Mousty,^[b] Laurence Hecquet,^[b] Franck Charmantray,^[b] Loïc J. Blum,^[a] and Bastien Doumèche^{*,[a]}

Analysis of a large number of samples by electrochemical methods for rapid optimization of amperometric biosensors or screening applications is still a challenge. To overcome this limitation, a system with 96 screen-printed electrodes was developed to assay H₂O₂ produced by free and immobilized galactose oxidase as a model for oxidases. Detection was based on two electrochemical methods: intermittent pulse amperometry (IPA) and electrochemiluminescence (ECL). This 96-well electrochemical device allowed rapid optimization of the parameters

in half a day, regardless of the method used (i.e., IPA or ECL). We demonstrate that ECL is more sensitive for the detection of H₂O₂ (limit of detection of 1 nM for ECL vs. 10 nM for IPA) with lower interelectrode variability (1 vs. 19%). Rapid determination of sensitivities, linear ranges, and limits of detection of galactose oxidase substrates (e.g., dihydroxyacetone and l-erythrulose) by using free or immobilized enzyme was conducted in only 50 min by the mean of 5 different sets of 96 screen-printed electrodes.

1. Introduction

According to IUPAC, a biosensor is “a device that uses specific biochemical reactions mediated by isolated enzymes, immunosystems, tissues, organelles or whole cells to detect chemical compounds usually by electrical, thermal or optical signals”. This signal has to be transduced in a fast, specific, and sensitive way for the quantification of analytes of interest.

There are actually thousands of biosensors described in the literature, mostly classified according to the detection system (optical, electrochemical, etc.) or to the application (environmental, health diagnostics, etc.), and they are regularly reviewed.^[1–3]

Among electrochemical biosensors, amperometric ones are mostly developed for their low cost and easy fabrication.^[4–7] In

these systems, an electrical potential is applied at the surface of an electrode, which allows the oxidation (or reduction) of a redox-active species generated as a result of biomolecular recognition. The current intensity is related to the analyte concentration. Moreover, the applied potential can also initiate a chemical reaction, which generates light emission, so-called electrogenerated chemiluminescence or electrochemiluminescence (ECL).^[8,9] The signal can be recorded as a current or as light intensity for amperometric biosensors or ECL-based biosensors, respectively.

Galactose oxidase (GAOx, E.C. 1.1.3.9) is a copper-dependent oxidase that catalyzes the oxidation of the hydroxyl group at the C6 position of galactose into the corresponding aldehyde along with the reduction of molecular oxygen into hydrogen peroxide (H₂O₂). It also oxidizes various primary alcohols.^[10] GAOx has been used since the 1990s in electrochemical biosensors for the detection of galactose,^[11,12] lactose (together with a β-galactosidase),^[13] dihydroxyacetone (DHA),^[14–16] and, to a lesser extent, superoxide radicals and histidine (in the presence of ascorbic acid).^[17,18] More recently, it was used for the detection of transketolase (TK) activity, an enzyme involved in different pathologies.^[19,20] transketolase reaction products can be specifically oxidized by GAOx; this leads to the coproduction of H₂O₂, which is detected by amperometry.

Most of these biosensors are based on the electrochemical oxidation of H₂O₂ at the electrode surface or on the reduction of an electrochemical mediator such as ferrocene^[21] or Prussian blue.^[20] To our knowledge, no GAOx-based biosensor using (electro)chemiluminescence as a detection system has ever been described.

[a] C. Aymard, Prof. L. J. Blum, Dr. B. Doumèche
GEMBAS, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires
ICBMS UMR 5246
Université Lyon 1, CNRS, INSA Lyon, CPE Lyon
43 bd du 11 Novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex (France)
E-mail: doumeche@univ-lyon1.fr

[b] Dr. C. Mousty, Prof. L. Hecquet, Dr. F. Charmantray
Clermont Université
Université Blaise Pascal
Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, ICCF UMR-CNRS 6296
63000 Clermont-Ferrand (France)

[c] C. Bonaventura, R. Henkens
Alderon Biosciences Inc.
120 Turner Street
Beaufort, 28516 NC (USA)

Supporting Information for this article can be found under:
<http://dx.doi.org/10.1002/celec.201600647>.



An invited contribution to a Special Issue on Electrochemical Biosensing

Innovative Electrochemical Screening Allows Transketolase Inhibitors to Be Identified

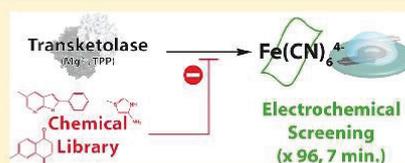
Chloé M. G. Aymard,[†] Matilde Halma,[‡] Arnaud Comte,[†] Christine Mousty,[‡] Vanessa Prévot,[‡] Laurence Hecquet,[‡] Franck Charmantray,^{*,‡} Loïc J. Blum,[†] and Bastien Doumèche^{*,†,‡}

[†]Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, ICBMS UMR 5246 CNRS, Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, INSA Lyon, CPE Lyon, 43 bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France

[‡]Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, ICCF UMR 6296 CNRS-UCA-Sigma, F-63000 Clermont-Ferrand, France

Supporting Information

ABSTRACT: Transketolases (TKs) are ubiquitous thiamine pyrophosphate (TPP)-dependent enzymes of the nonoxidative branch of the pentose phosphate pathway. They are considered as interesting therapeutic targets in numerous diseases and infections (e.g., cancer, tuberculosis, malaria), for which it is important to find specific and efficient inhibitors. Current TK assays require important amounts of enzyme, are time-consuming, and are not specific. Here, we report a new high throughput electrochemical assay based on the oxidative trapping of the TK-TPP intermediate. After electrode characterization, the enzyme loading, electrochemical protocol, and substrate concentration were optimized. Finally, 96 electrochemical assays could be performed in parallel in only 7 min, which allows a rapid screening of TK inhibitors. Then, 1360 molecules of an in-house chemical library were screened and one early lead compound was identified to inhibit TK from *E. coli* with an IC_{50} of 63 μ M and an inhibition constant (K_i) of 3.4 μ M. The electrochemical assay was also used to propose an inhibition mechanism.



Transketolase (TK, EC 2.2.1.1) is a key enzyme of the nonoxidative branch of the pentose phosphate pathway (PPP). TK catalyzes the transfer of a two-carbon unit from a ketose phosphate (donor substrate) to an aldose phosphate (acceptor substrate), in the presence of thiamine pyrophosphate (TPP) and magnesium as cofactors.¹ This enzyme follows a Bi Bi Ping Pong mechanism (Scheme 1, way a): after TPP deprotonation (leading to the active form of TPP), this latter attacks the donor substrate, leading to the release of the aldehyde product along with the formation of the carbanion intermediate, α,β -dihydroxyethylthiamine diphosphate (DHETPP).^{2,3} This reactive intermediate transfers the two-carbon unit to the aldehyde acceptor substrate through C–C bond formation. The ketone product is then released, and the TPP is regenerated. TK is a ubiquitous enzyme implicated in the production of D-ribose-5-phosphate required for the synthesis of nucleic acid⁴ and in the production of D-erythrose-4-phosphate necessary for the biosynthesis of aromatic amino acids (shikimate pathway in plants and microorganisms).⁵ PPP is also the major biochemical pathway that generates antioxidant NADPH.⁶ Previous works have shown that the PPP can be overactivated in the context of abnormal proliferation of cancer cells and TK is overexpressed in this pathological situation.^{7–9} This up-regulation allows one to meet the increased demand of D-ribose-5-phosphate for nucleotide synthesis⁷ and the demand of NADPH to counteract the production of reactive oxygen species enabling cancer cells to survive.⁶

Moreover, this enzyme may be deficient in the context of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease,^{10,11} beriberi, and Wernicke–Korsakoff syndrome.^{12–14}

Furthermore, recent studies have described the importance of TK on the survival of *Mycobacterium tuberculosis*, the etiologic agent of tuberculosis.¹⁵ Finally, TK from *Plasmodium falciparum* also appears to be a drug target for the treatment of malaria.¹⁶ In this context, TK appears to be an interesting therapeutic target for which it is important to find specific and efficient inhibitors, relevant to the disease.

Several molecules have been reported to inhibit TK from different sources with different inhibition constants (K_i). Oxythiamine ($K_i = 1.4$ mM),¹⁷ thiamine ($K_i = 34$ mM),¹⁸ pyrophosphate ($K_i = 0.28$ mM),¹⁸ analogues of the cofactor TPP, and hydroxyphenylpyruvate ($K_i = 3$ mM),¹⁹ an analogue of the donor substrate, inhibit TK from *Saccharomyces cerevisiae*. D-Arabinose-5-phosphate inhibits TK from *Escherichia coli* with a K_i of 6 mM.²⁰ More recently, an *in silico* screening of human TK inhibitors based on diphenyl urea derivatives was performed and the best candidates led to IC_{50} comprised between 0.1 and 0.2 mM.²¹ Finally, a docking study was performed with the TK from *Plasmodium falciparum* leading to the synthesis of 4-anilinoquinoline triazine derivatives with IC_{50} comprised between 0.072 and 0.085

Received: April 19, 2018

Accepted: June 28, 2018

Published: June 28, 2018

Annexe 3 : Feuille de commande du logiciel Dynafit

```
[task]
task = fit
data = rates
approximation = rapid-equilibrium
model = competitif ?

[mechanism]
E + I <====> EI : KI dissoc
E + TPP <====> ETPP : Ktpd dissoc
ETPP + ox ----> E + TPP + red : k1

[constants]
Ktpd = 4.13 ?
k1 = 0.02139 ?
KI = 1 ?

[concentrations]
E = 2.7
ox = 100

[responses]
red = 1

[data]
variable TPP
directory
C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition
sheet TKinhibition4IPA.csv
columns 2 | concentration I = 0 | label I = 0 uM
columns 3 | concentration I = 10 | label I = 10 uM
columns 4 | concentration I = 20 | label I = 20 uM
columns 5 | concentration I = 50 | label I = 50 uM
columns 6 | concentration I = 100 | label I = 100 uM

[output]
directory
C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition

[settings]
{Output}
XAxisLabel = [TPP], uM
YAxisLabel = vitesse, uM/min

[task]
task = fit
data = rates
approximation = rapid-equilibrium
model = non competitif ?

[mechanism]
E + I <====> EI : KI dissoc
E + TPP <====> ETPP : Ktpd dissoc
EI + TPP <====> EITPP : Ktpd dissoc
ETPP + I <====> EITPP : KI dissoc
ETPP + ox ----> E + TPP + red : k1

[constants]
Ktpd = 4.13 ?
k1 = 0.02139 ?
KI = 1 ?

[concentrations]
E = 2.7
ox = 100

[responses]
red = 1
```

```
red = 1

[data]
variable TPP
directory
C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition
sheet TKinhibition4IPA.csv
columns 2 | concentration I = 0 | label I = 0 uM
columns 3 | concentration I = 10 | label I = 10 uM
columns 4 | concentration I = 20 | label I = 20 uM
columns 5 | concentration I = 50 | label I = 50 uM
columns 6 | concentration I = 100 | label I = 100 uM

[output]
directory
C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition

[settings]
{Output}
XAxisLabel = [TPP], uM
YAxisLabel = vitesse, uM/min
```

```
[task]
task = fit
data = rates
approximation = rapid-equilibrium
model = incompetitif ?

[mechanism]
E + TPP <====> ETPP : Ktpd dissoc
ETPP + I <====> EITPP : KI dissoc
ETPP + ox ----> E + TPP + red : k1

[constants]
Ktpd = 4.13 ?
k1 = 0.02139 ?
KI = 1 ?

[concentrations]
E = 2.7
ox = 100

[responses]
red = 1

[data]
variable TPP
directory
C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition
sheet TKinhibition4IPA.csv
columns 2 | concentration I = 0 | label I = 0 uM
columns 3 | concentration I = 10 | label I = 10 uM
columns 4 | concentration I = 20 | label I = 20 uM
columns 5 | concentration I = 50 | label I = 50 uM
columns 6 | concentration I = 100 | label I = 100 uM

[output]
directory
C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition

[settings]
{Output}
XAxisLabel = [TPP], uM
YAxisLabel = vitesse, uM/min
```

```
[task]
```

Annexe 3 : Feuille de commande du logiciel Dynafit

```

task = fit
data = rates
approximation = rapid-equilibrium
model = non compétitif mixte ?
[mechanism]
E + I <====> EI : KI dissoc
E + TPP <====> ETPP : Ktp dissoc
EI + TPP <====> EITPP : Ktp dissoc
ETPP + I <====> EITPP : KI' dissoc
ETPP + ox ----> E + TPP + red : k1
[constants]
Ktp = 4.13 ?
k1 = 0.02139 ?
KI = 1 ?
KI' = 1 ?
[concentrations]
E = 2.7
ox = 100
[responses]
red = 1
[data]
variable TPP
directory
C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition
sheet TKinhibition4IPA.csv
columns 2 | concentration I = 0 | label I = 0 uM
columns 3 | concentration I = 10 | label I = 10 uM
columns 4 | concentration I = 20 | label I = 20 uM
columns 5 | concentration I = 50 | label I = 50 uM
columns 6 | concentration I = 100 | label I = 100 uM
[output]
directory
C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition
[settings]
{Output}
XAxisLabel = [TPP], uM
YAxisLabel = vitesse, uM/min

[task]
task = fit
data = rates
approximation = rapid-equilibrium
model = incompetitif partiel ?
[mechanism]
E + TPP <====> ETPP : Ktp dissoc
ETPP + ox ----> E + TPP + red : k1
E + I <====> EI : KI dissoc
EI + TPP <====> EITPP : Ktp2 dissoc
ETPP + I <====> EITPP : KI dissoc
EITPP + ox ----> EI + TPP + red : k2
[constants]
Ktp = 4.13 ?
k1 = 0.02139 ?
KI = 1 ?
Ktp2 = 1 ?
k2 = 1 ?
[concentrations]
E = 2.7
ox = 100
[responses]
red = 1
[data]
variable TPP
directory
C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition
sheet TKinhibition4IPA.csv
columns 2 | concentration I = 0 | label I = 0 uM
columns 3 | concentration I = 10 | label I = 10 uM
columns 4 | concentration I = 20 | label I = 20 uM
columns 5 | concentration I = 50 | label I = 50 uM
columns 6 | concentration I = 100 | label I = 100 uM
[output]
directory
C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition

```

```

[responses]
red = 1
[data]
variable TPP
directory
C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition
sheet TKinhibition4IPA.csv
columns 2 | concentration I = 0 | label I = 0 uM
columns 3 | concentration I = 10 | label I = 10 uM
columns 4 | concentration I = 20 | label I = 20 uM
columns 5 | concentration I = 50 | label I = 50 uM
columns 6 | concentration I = 100 | label I = 100 uM
[output]
directory
C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition
[settings]
{Output}
XAxisLabel = [TPP], uM
YAxisLabel = vitesse, uM/min

[task]
task = fit
data = rates
approximation = rapid-equilibrium
model = non compétitif partiel ?
[mechanism]
E + TPP <====> ETPP : Ktp dissoc
ETPP + ox ----> E + TPP + red : k1
E + I <====> EI : KI dissoc
EI + TPP <====> EITPP : Ktp2 dissoc
ETPP + I <====> EITPP : KI dissoc
EITPP + ox ----> EI + TPP + red : k2
[constants]
Ktp = 4.13 ?
k1 = 0.02139 ?
KI = 1 ?
Ktp2 = 1 ?
k2 = 1 ?
[concentrations]
E = 2.7
ox = 100
[responses]
red = 1
[data]
variable TPP
directory
C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition
sheet TKinhibition4IPA.csv
columns 2 | concentration I = 0 | label I = 0 uM
columns 3 | concentration I = 10 | label I = 10 uM
columns 4 | concentration I = 20 | label I = 20 uM
columns 5 | concentration I = 50 | label I = 50 uM
columns 6 | concentration I = 100 | label I = 100 uM
[output]
directory
C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition

```

```

[settings]
{Output}
  XAxisLabel = [TPP], uM
  YAxisLabel = vitesse, uM/min

[task]
  task = fit
  data = rates
  approximation = rapid-equilibrium
  model = non compétitif mixte partiel ?

[mechanism]
  E + TPP <====> ETPP : Ktpdissoc
  ETPP + ox ----> E + TPP + red : k1
  E + I <====> EI : KI dissoc
  EI + TPP <====> EITPP : Ktpd2 dissoc
  EITPP + I <====> EITPP : KI2 dissoc
  EITPP + ox ----> EI + TPP + red : k2

[constants]
  Ktpd = 4.13 ?
  k1 = 0.02139 ?
  KI = 1 ?
  Ktpd2 = 1 ?
  k2 = 1 ?
  KI2 = 1 ?

[concentrations]
  E = 2.7
  ox = 100

[responses]
  red = 1

[data]
  variable TPP
  directory
  C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition
  sheet TKinhibition4IPA.csv
  columns 2 | concentration I = 0 | label I = 0 uM
  columns 3 | concentration I = 10 | label I = 10 uM
  columns 4 | concentration I = 20 | label I = 20 uM
  columns 5 | concentration I = 50 | label I = 50 uM
  columns 6 | concentration I = 100 | label I = 100 uM

[output]
  directory
  C:\Users\Christophe\Desktop\Dynafit\InhibitionTK+IPA\Inhibition

[settings]
{Output}
  XAxisLabel = [TPP], uM
  YAxisLabel = vitesse, uM/min

[end]

```


Résumé

Nouvelles méthodes électrochimiques pour le criblage d'inhibiteurs de transcétolases

Cette thèse a pour objectif de développer une méthode électrochimique permettant de cribler à haut débit des inhibiteurs d'enzymes. Pour cela, une enzyme cible a été sélectionnée pour son intérêt thérapeutique, la transcétolase (TK) : elle est impliquée dans de nombreuses pathologies (cancer, maladies neurodégénératives, diabète...) et dans la survie de certains parasites pathogènes. Afin de mesurer l'activité de la TK, deux systèmes rapporteurs ont été développés, à l'aide de plaques de criblage électrochimique (PCE) constituées de 96 électrodes indépendantes.

Le premier système rapporteur repose sur un système bienzymatique nécessitant l'intervention d'une enzyme auxiliaire, la galactose oxydase (GAOx) sous forme libre ou immobilisée dans la laponite. Cette enzyme est capable d'oxyder les produits de réaction de la TK et de produire du peroxyde d'hydrogène. Le format 96 des PCE a permis d'optimiser rapidement la détection électrochimique par ampérométrie pulsée par intermittence (IPA) d'activité oxydase et seulement 10 minutes sont nécessaires pour réaliser 96 mesures simultanées. Parallèlement, afin d'exploiter au maximum le système à 96 électrodes, cette détection d'activité oxydase a également été réalisée, en 10 minutes par électrochimiluminescence. Cette méthode offre l'avantage d'être plus sensible et moins variable que par IPA, mais limite l'utilisation de matrice d'immobilisation d'enzymes. La GAOx a ensuite été utilisée pour mesurer l'activité TK, cependant, les conditions réactionnelles n'étant pas optimales en présence du système bienzymatique (TK-GAOx), des temps d'incubation longs sont nécessaires et sont peu adaptées au criblage d'inhibiteurs de la TK.

Un second système rapporteur ne nécessitant plus d'enzyme auxiliaire et faisant intervenir uniquement un seul substrat de la TK a été optimisé. Ce système repose sur l'oxydation de l'intermédiaire réactionnel formé par la fixation du cofacteur (la thiamine pyrophosphate) et du substrat sur l'enzyme par le ferricyanure. Cette méthode permet de mesurer 96 activités TK en seulement 7 minutes et a aisément été utilisée pour cribler une bibliothèque de molécules. Le criblage de 1360 molécules a permis d'identifier un nouvel inhibiteur de cet enzyme, présentant une IC_{50} de 63 μ M. Le système électrochimique a également été utilisé pour déterminer le mécanisme d'inhibition (non compétitive pure partielle) et la constante d'inhibition associée (3,4 μ M). Ces résultats sont inédits dans le domaine de l'électrochimie et offrent un large éventail d'applications que ce soit pour le criblage d'activité enzymatiques ou d'inhibiteurs d'enzymes.

Abstract

New electrochemical methods for the screening of transketolases inhibitors

This thesis focuses on the development of a new electrochemical method allowing the high throughput screening of enzyme inhibitors. For this purpose, a target enzyme has been selected for its therapeutic interest, transketolase (TK): this enzyme is involved in many diseases (cancer, neurodegenerative diseases, diabetes ...) and in the survival of pathogenic parasites. To measure TK activity, two reporter systems have been developed by using electrochemical plates, composed of 96 independent electrodes.

The first one is based on a bienzymatic system, requiring the use of an auxiliary enzyme, galactose oxidase (GAOx), in its soluble form or immobilized in laponite. This enzyme is able to oxidize TK products and produce hydrogen peroxide. The 96-well format allowed to quickly optimize the electrochemical detection of oxidase activity by intermittent pulse amperometry (IPA) of oxidase activity and only 10 minutes are required to perform 96 simultaneous measurements. In parallel, in order to harness the 96-well electrochemical system, this detection of oxidase activity was also carried out in 10 minutes using electrochemiluminescence. This method is more sensitive and less variable than IPA but is limited to the use of soluble enzymes. However, the reaction conditions are not optimal for the bienzymatic system (TK-GAOx): long incubation times are required and are poorly adapted for the screening of TK inhibitors.

A second reporter system no longer requiring an auxiliary enzyme and involving only one TK substrate has been optimized. This system relies on the oxidation by ferricyanide of the reactional intermediate resulted of the binding of the cofactor (thiamine pyrophosphate) and the substrate. This method allows to measure 96 TK activities in only 7 minutes and was easily used to screen an in-house chemical library. The screening of 1360 molecules lead to the identification of a new TK inhibitor with an IC_{50} of 63 μ M. This electrochemical system was also used to determine the mechanism of inhibition (partial non-competitive mechanism) and the associated inhibition constant (3.4 μ M). These results are innovative in the field of electrochemistry and offer a wide range of applications for enzymatic activity screening or the screening of enzymes inhibitors.

Discipline

Biochimie

Mots clés

Électrochimie, Haut débit, Activité enzymatique, Transcétolases, Inhibiteurs

Laboratoire

Génie Enzymatique Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires (GEMBAS)
Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS)
UMR 5246 – Université de Lyon – Université Claude Bernard Lyon 1 – CNRS
Bâtiment Lederer – 1 rue Victor Grignard – 69622 Villeurbanne Cedex