

NNT : 2016SACLS029

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY, préparée à l'Université Paris-Sud

École Doctorale n°571
Sciences Chimiques : Molécules, Matériaux,
Instrumentation et Biosystèmes (2MIB)

SPÉCIALITÉ CHIMIE

par
Mme Marion DEVILLERS



ÉQUIPE DE CHIMIE
BIOORGANIQUE ET
BIOINORGANIQUE

**Conception, évaluation et modélisation de biocapteurs
pour la détection électrochimique du facteur de motilité autocrine :
biomarqueur potentiel de cancers métastatiques**

Thèse présentée et soutenue à Orsay le **18/02/2016**

Composition du jury :

M. VAUZEILLES Boris	Directeur de Recherches CNRS ICSN, Gif-sur-Yvette	Président
M. PIQUEMAL Jean-Philip	Professeur Université Pierre et Marie Curie, Paris	Rapporteur
M. PIRO Benoît	Professeur Université Paris Diderot, Paris	Rapporteur
M. GRESH Nohad	Directeur de Recherches CNRS Université Pierre et Marie Curie, Paris	Examineur
M. SALMON Laurent	Professeur Université Paris-Sud, Orsay	Directeur de thèse
Mme KORRI-YOUSSOUFI Hafsa	Directeur de Recherches CNRS Université Paris-Sud, Orsay	Co-directeur de thèse



Avant-propos

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans l'Équipe de Chimie Bioorganique et Bioinorganique (ECBB) de l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO), sous la direction scientifique du Professeur Laurent Salmon et du Docteur Hafsa Korri-Youssoufi.

Depuis une vingtaine d'années, l'équipe du Professeur Salmon travaille sur la thématique « Inhibiteurs d'enzymes du métabolisme des sucres ». Ainsi, un grand intérêt est porté aux aldose-cétose isomérases, et plus particulièrement sur la phosphoglucose isomérase (PGI). Étant donné le rôle essentiel de cette enzyme dans le métabolisme de l'homme et dans la survie de certains organismes pathogènes, il existe un fort intérêt à développer des inhibiteurs pour, d'une part, mieux connaître sa structure et son mécanisme d'action et, d'autre part, proposer de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique. Cette enzyme est d'autant plus passionnante qu'elle est multifonctionnelle, c'est-à-dire qu'en plus de son rôle intracellulaire, elle possède de nombreuses activités extracellulaires. L'une d'entre elles, plus récemment découverte et sur laquelle nous nous sommes attardés, est son implication dans le développement de métastases. Elle est alors appelée facteur de motilité autocrine (AMF).

Une seconde thématique du laboratoire est la « Conception de bio-puces pour le diagnostic médical et la détection des polluants », dirigée par le Docteur Hafsa Korri-Youssoufi. Cette équipe a en effet choisi de concentrer ses efforts pour trouver des moyens efficaces de diagnostiquer différentes pathologies. À l'heure actuelle, les objectifs de recherche et de développement dans le domaine du diagnostic médical sont orientés vers une lecture en temps réel de la détection, avec une sensibilité et une spécificité élevées et à des coûts moindres, d'où le choix de développer des biocapteurs. Ces systèmes sont basés sur la reconnaissance moléculaire entre une sonde biologique et l'agent pathogène spécifique ou cible.

Ainsi, alliant ces différentes compétences du laboratoire, mon sujet de thèse est né : « conception, évaluation et modélisation de biocapteurs pour la détection électrochimique du facteur de motilité autocrine : biomarqueur potentiel de cancers métastatiques ». Mon objectif était de réussir à détecter l'AMF/PGI *via* un biocapteur électrochimique que j'avais à élaborer et à évaluer. Le travail principal de cette thèse a été d'établir une preuve de concept sur la détection de l'enzyme par un biocapteur électrochimique (**partie A**). Une étude par modélisation moléculaire *via* le logiciel SIBFA (en collaboration avec le docteur Nohad Gresh) a ensuite été réalisée sur le système de manière à évaluer les interactions mises en jeu lors de la reconnaissance du biocapteur par la protéine (**partie B**).

Le but ultime de cette nouvelle thématique développée à l'ECBB est la mise au point d'un dispositif miniaturisé permettant une détection rapide, sensible, spécifique et systématique du biomarqueur cancéreux AMF/PGI à l'aide d'un biocapteur électrochimique de nouvelle génération pour le diagnostic et le suivi de l'évolution des métastases.

Remerciements

Ces travaux de recherche ont été réalisés au sein de l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay (ICMMO, CNRS, UMR 8182, Université Paris-Sud), dirigé initialement par le Professeur **Jean-Pierre MAHY**, puis par le Professeur **David AITKEN**. Je tiens à leur exprimer toute ma reconnaissance et mes remerciements pour leur accueil au sein de l'Institut.

Je remercie également :

Le Professeur **Laurent SALMON**, mon directeur de thèse à l'origine de ce projet de recherche, qui tout au long de ces trois années (et demi) de thèse, m'a fait confiance et m'a permis de profiter d'une grande autonomie. Je tiens à le remercier profondément de son soutien permanent, à la fois scientifique et humain durant ces années de recherche. Je le remercie également de m'avoir permis de me rendre à plusieurs reprises dans des congrès qui ont contribué à mon ouverture d'esprit dans des domaines variés.

Le Docteur **Hafsa KORRI-YOUSSOUFI**, ma co-directrice de thèse, qui a grandement participé à ce projet de recherche, me permettant d'acquérir, par ses conseils et son expertise, des connaissances scientifiques approfondies dans les domaines pour moi initialement inconnus de la chimie des matériaux et de l'électrochimie.

Le Docteur **Nohad GRESH**, qui a étroitement collaboré au projet, et qui m'a permis d'acquérir de nouvelles compétences en modélisation moléculaire avec le logiciel SIBFA. Je tiens à lui exprimer toute mon amitié et mes remerciements pour son soutien, sa disponibilité et les discussions scientifiques que nous avons pu partager devant une tasse de thé.

L'ensemble des membres du jury, **Jean-Philip PIQUEMAL**, **Benoît PIRO** et **Boris VAUZEILLES**, qui me font le grand honneur d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Tous les membres de l'ECBB, pour tous les bons moments passés et plus particulièrement : **Lama AHMAD**, **Stéphanie COURTIOL-LEGOURD**, **Hélène DORIZON**, **Virginie DUBOSCLARD**, **Élodie JAGU**, **Raphaël LABRUÈRE**, **Stéphanie LATIMIER**, **Anna MIODEK**, **Stéphanie PÈTHE**, **Florence RAMIANDRASOA**, **Michel THÉRISOD** et **Bacem ZRIBI** pour leur gentillesse, leur soutien, leur bonne humeur et pour les étroites collaborations scientifiques que nous avons pu partager.

Mes collègues du Laboratoire de Chimie Théorique, **Sehr NASEEM-KHAN** et **Christophe NARTH**, pour leur accueil ainsi que pour les discussions scientifiques et les conseils apportés dans la partie modélisation de ce travail de thèse.

Mes collègues de l'ICMMO et de l'ICSN et en particulier **Pauline ADLER**, **Jean-Pierre BALTAZE**, **Sophie BEDEL**, **François BRISSET**, **Natasha DÉNIZOT**, **Pierre-Alexandre DEYRIS**, **Philippe DURAND**, **Antoine FADEL**, **Filipe GOMEZ**, **Didier GORI**, **Claire GRISON**, **Vincent HUC**, **Florian HERNVANN**, **Sandra MAZERAT**, **Rémy LAUNEZ**, **Wenqing LIU**, **Bastien MICHELET**, **Nicolas RABASSO**, **Lu TANG** et **Terry TOMAKINIAN** pour nos discussions scientifiques ou personnelles qui ont chacune contribué à la réussite de ce travail.

Enfin je voudrai remercier tous mes amis et ma famille pour leur soutien de tous les instants, et plus particulièrement mon conjoint **Franck** et ma fille **Abby** qui partagent ma vie.

Table des matières

Introduction

Cancers et facteur de motilité autocrine : bibliographie et présentation du projet	7
1. Généralités sur les cancers	11
2. Présentation de l'AMF/PGI	19
3. Objectifs et présentation de la thèse	38
Références de l'introduction	41
Annexes de l'introduction	45

Partie A

Conception et évaluation d'un biocapteur électrochimique pour la détection de l'AMF/PGI	49
1. Introduction sur les biocapteurs électrochimiques	53
2. Détermination des composants du biocapteur	73
3. Élaboration et évaluation des performances du biocapteur	95
4. Perspective d'un nouveau transducteur	115
Références de la partie A	125
Partie expérimentale de la partie A	127
Annexes de la partie A	133

Partie B

Études des interactions AMF/PGI–biocapteur par mécanique moléculaire polarisable	141
1. Introduction sur les champs de forces	145
2. Mise en place du modèle d'AMF/PGI pour SIBFA	153
3. Construction d'un mime de biocapteur par SIBFA	164
4. Docking dans la protéine modélisée	174
5. Perspectives	186
Références de la partie B	189
Annexes de la partie B	191

Conclusion générale et perspectives	197
--	------------

INTRODUCTION

**Cancers et facteur de motilité autocrine :
bibliographie et présentation du projet**

SOMMAIRE DÉTAILLÉ

Chapitre 1. Généralités sur les cancers	11
1.1. Qu'est-ce qu'un cancer ?	11
1.1.1. Apparition d'un cancer	11
1.1.2. Caractéristiques d'une cellule cancéreuse	12
1.2. Quelques chiffres clés	13
1.2.1. Incidence	13
1.2.2. Mortalité	13
1.3. Diagnostic précoce pour mieux soigner	14
1.3.1. Dépistage	14
1.3.2. Détection précoce	14
1.4. Traitements	15
1.4.1. Chirurgie et radiothérapie	15
1.4.2. Chimiothérapie	15
1.5. Méthodes de diagnostic et de suivi de traitement	16
1.5.1. Examens d'imagerie médicale	16
1.5.2. Marqueurs tumoraux	17
Chapitre 2. Présentation de l'AMF/PGI	19
2.1. Historique	19
2.1.1. Découverte de la PGI	19
2.1.2. Découverte de l'AMF puis de son homologie avec la PGI	19
2.2. Aspects génétiques et structuraux	21
2.2.1. Conservation de la séquence	21
2.2.2. Aspects structuraux	22
2.3. Activité glycolytique de l'AMF/PGI	25
2.3.1. Mécanisme d'action	25
2.3.2. Implication dans le métabolisme	28
2.4. Activité cytokine de l'AMF/PGI	30
2.4.1. Biomarqueur métastatique validé	30
2.4.2. Existence d'un récepteur de l'AMF/PGI	30
2.4.3. Interaction de l'AMF/PGI avec son récepteur gp78/AMFR	31
2.4.4. Sécrétion de l'AMF/PGI	32
2.4.5. Implication de l'AMF/PGI dans la tumorigénèse	32
2.5. Inhibition de l'activité de l'AMF/PGI	34
2.5.1. Généralités sur les inhibiteurs	34
2.5.2. Inhibiteurs de l'activité glycolytique de l'AMF/PGI	34
2.5.3. Inhibiteurs de l'activité cytokine de l'AMF/PGI	36
Chapitre 3. Objectifs et présentation de la thèse	38
3.1. Objectifs du projet et avancées scientifiques attendues	38
3.2. Présentation de la thèse	40

Chapitre 1. Généralités sur les cancers

La plupart des informations données dans ce chapitre proviennent de l'Institut National du Cancer (INCa) qui est l'agence d'expertise sanitaire et scientifique en cancérologie chargée de coordonner la lutte contre les cancers en France.

1.1. Qu'est-ce qu'un cancer ?

1.1.1. Apparition d'un cancer

L'être humain est constitué de milliards de cellules qui se développent, remplissent une fonction puis meurent de façon programmée. Un cancer survient à partir d'une seule cellule normale altérée par un certain nombre d'anomalies – des mutations – qui ne sont pas réparées par les processus habituels. La cellule normale devient une lésion précancéreuse et, si elle n'est pas détruite, une tumeur maligne dont les cellules prolifèrent rapidement et de façon incontrôlée (Schéma I).

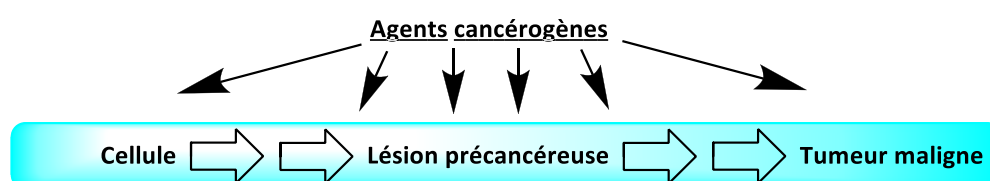


Schéma I : Séquence d'apparition d'un cancer.

1.1.1.1. Types de mutations et gènes mutés

Ces mutations peuvent parfois être dues au hasard mais sont généralement la conséquence de l'exposition à un facteur de risque. On dit qu'elles sont acquises. L'erreur qui se produit au niveau de l'ADN peut prendre différentes formes et conduire à différents types de mutations comme une mutation ponctuelle, une délétion ou un remaniement chromosomique.

Il a été identifié trois catégories de gènes qui, une fois altérés par des mutations, peuvent participer à l'apparition du processus de cancérisation. Il s'agit des *proto-oncogènes*, des *gènes suppresseurs de tumeurs* et des *gènes de stabilité (ou gardiens)*.

Les **proto-oncogènes** ont pour rôle de favoriser la prolifération normale des cellules. Une fois mutés, ils deviennent des « oncogènes » qui, une fois activés, peuvent entraîner une stimulation anormale de la prolifération cellulaire.

Les **gènes suppresseurs de tumeur** ont pour rôle de freiner la prolifération normale des cellules. Une mutation sur ces gènes peut entraîner une inactivation ou une diminution de leur fonctionnement, ce qui aboutit aussi à une stimulation anormale de la prolifération cellulaire.

Les **gènes de stabilité (ou gardiens)** permettent à la cellule de réparer son ADN lorsqu'il est endommagé : la déficience de ces gènes joue un rôle-clé dans l'apparition des cancers.

1.1.1.2. Facteurs de risque

Un cancer n'est jamais le résultat d'une cause unique. Il faut un ensemble de facteurs pour que la maladie se développe. Un certain nombre de ces facteurs, *externes* et *internes*, ont été identifiés.

Les facteurs externes peuvent être classés en trois catégories :

- ▶ les **cancérogènes physiques**, comme les rayonnements (d'origine nucléaire ou solaire) ;
- ▶ les **cancérogènes chimiques**, comme l'amiante, les composants de la fumée du tabac, l'aflatoxine (contaminant des denrées alimentaires) ou l'arsenic (polluant de l'eau de consommation) ;
- ▶ les **cancérogènes biologiques**, comme des infections dues à certains virus (virus du papillome humain pour le cancer du col de l'utérus et virus de l'hépatite B pour le cancer du foie) ou bactéries (*Helicobacter pylori* pour le cancer de l'estomac).

Quant aux facteurs internes, nous pouvons citer l'**âge** et l'**hérédité**.

1.1.2. Caractéristiques d'une cellule cancéreuse

La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse est un processus long, qui peut durer des dizaines d'années. Au terme de cette transformation, une cellule cancéreuse se distingue d'une cellule saine par différentes caractéristiques telles qu'une auto-suffisance en signaux de croissance, une résistance aux signaux anti-croissance, un potentiel de division illimité et une résistance au processus de mort cellulaire programmée (apoptose).

Ultérieurement, dotées de ces caractéristiques, les cellules cancéreuses parviennent à provoquer la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui irrigueront la tumeur et l'alimenteront en oxygène et en nutriments. C'est ce qu'on appelle l'**angiogenèse**. Ce point est capital car, sans irrigation sanguine, la tumeur ne pourrait pas grossir au-delà d'un dixième de millimètre. Par ailleurs, les cellules cancéreuses deviennent capables de s'insinuer dans les tissus sains voisins et de migrer dans l'organisme pour donner des **métastases**.

1.2. Quelques chiffres clés

Au cours de la période 2005-2009, les cancers sont la première cause de décès en France chez l'homme (33 % de l'ensemble des décès masculins) et la deuxième cause chez la femme (24 % de l'ensemble des décès féminins).¹

1.2.1. Incidence

Le **nombre de nouveaux cas de cancer (incidence)** en France métropolitaine est estimé à 355000 en 2012 : 200.000 chez les hommes et 155.000 chez les femmes (Figure I).¹

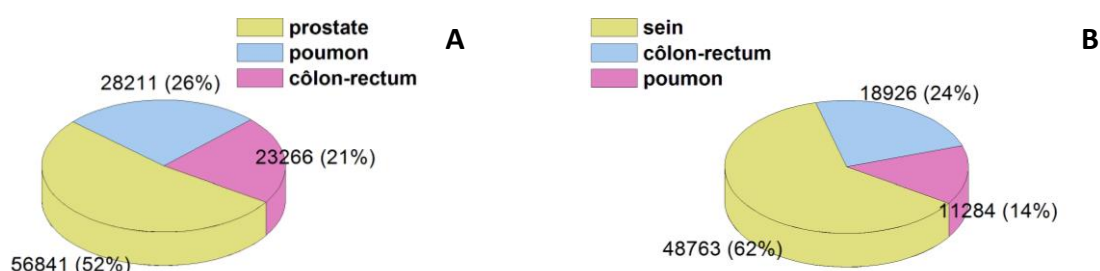


Figure I : Cancers les plus fréquents chez (A) les hommes et (B) les femmes.¹

Chez les hommes, les trois cancers les plus fréquents sont ceux de la prostate, du poumon et du côlon-rectum. Chez les femmes, ce sont les cancers du sein, du côlon-rectum et, désormais, du poumon. Ce dernier cancer connaît une progression constante chez les femmes : le nombre de nouveaux cas a été multiplié par 7 ces 30 dernières années. Le facteur de risque majeur de ce cancer est le tabagisme.¹

1.2.2. Mortalité

Le **nombre de décès par cancer (mortalité)** en 2012 est estimé à 148000 décès dont 85000 chez l'homme et 63000 chez la femme (Figure II).¹

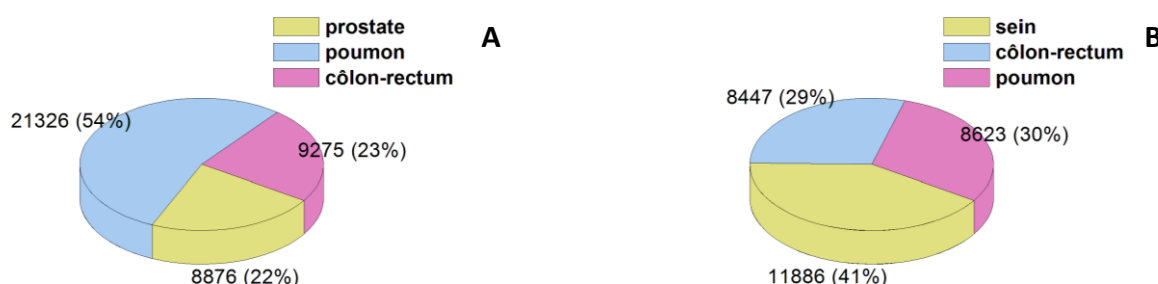


Figure II : Cancers les plus meurtriers chez (A) les hommes et (B) les femmes.¹

Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer chez l'homme, devant le cancer colorectal et le cancer de la prostate. Chez la femme, le cancer du sein se situe au premier rang, devant le cancer du poumon, qui arrive désormais en deuxième position, et le cancer colorectal.

1.3. Diagnostic précoce pour mieux soigner

Pour beaucoup de cancers, plus le diagnostic est fait tôt, moins les traitements sont lourds et meilleures sont les chances de guérison. L'intérêt du diagnostic précoce est ainsi de mieux soigner, mais aussi de limiter les séquelles liées à certains traitements. Les deux moyens d'agir pour permettre un diagnostic précoce sont le *dépistage* et la *détection précoce*.

1.3.1. Dépistage

Le **dépistage** d'un cancer, lorsqu'il est possible, consiste à réaliser des examens de détection ou de surveillance alors que l'on se sent en bonne santé, c'est donc **avant l'apparition de tout signe clinique**. Il est généralement réalisé chez une personne ou un groupe de personnes ayant été soumis à un facteur de risque (les facteurs de risque externes et internes ont été présentés au paragraphe 1.1.1.2).

L'objectif du dépistage est donc de pouvoir diagnostiquer un cancer à un stade précoce, même s'il ne produit pas encore de symptômes, pour favoriser les chances de guérison. Par exemple, pour le dépistage du cancer du sein, la mammographie permet de découvrir des anomalies qui ne sont ni visibles, ni palpables.²

Dans certains cas, le dépistage peut permettre de détecter une lésion précancéreuse, et d'agir préventivement pour éviter l'évolution vers un cancer. On peut ainsi détecter des lésions précancéreuses pour le cancer du col de l'utérus (en faisant un frottis cervico-utérin)³ et le cancer colorectal (en faisant un test immunologique qui vise à déceler la présence de sang humain dans les selles).⁴

Cependant, **nous ne savons pas encore dépister tous les types de cancer**. Pour proposer un dépistage, la maladie doit être fréquente et entraîner une mortalité importante, mais aussi être détectable à un stade auquel elle peut être soignée et enfin qu'il existe des traitements efficaces contre ce type de cancer.

1.3.2. Détection précoce

La **détection précoce** consiste à reconnaître la présence d'un cancer en **identifiant les premiers signes cliniques** dès leur apparition.

Ainsi, les cancers de la peau ne peuvent pas être « dépistés » au sens strict puisqu'on ne peut pas les identifier avant l'apparition de symptômes. Il est cependant possible de les détecter précocement grâce à un examen régulier de l'ensemble de la peau, généralement fait par un dermatologue. Un grain de beauté suspect est un exemple de signe d'alerte.⁵

1.4. Traitements

Le choix du traitement dépend des caractéristiques du cancer : sa localisation, son type et son stade (c'est-à-dire son degré d'extension), déterminées grâce aux examens du bilan diagnostique (qui seront présentés au paragraphe 1.5.1). Le choix du traitement prend également en compte les données personnelles du patient (âge, antécédents médicaux et chirurgicaux, état de santé global) ainsi que son avis et ses préférences. Traiter un cancer consiste à éliminer la tumeur et à supprimer les cellules cancéreuses. Il existe différents types de traitements qui peuvent être utilisés seuls ou associés entre eux : la *chirurgie*, la *radiothérapie* et la *chimiothérapie* (englobant l'hormonothérapie et l'immunothérapie).

1.4.1. Chirurgie et radiothérapie

La chirurgie et la radiothérapie sont des traitements locaux du cancer, c'est-à-dire qu'ils **agissent localement** sur les cellules cancéreuses de l'organe atteint.

La **chirurgie** permet d'enlever la tumeur, les ganglions lymphatiques correspondants et les éventuelles métastases, grâce à une opération. L'objectif est alors de guérir le cancer par ce seul geste, quand l'ablation totale de la tumeur est possible et que ses caractéristiques (taille, stade, grade...) établies par les examens du bilan diagnostique permettent d'établir qu'elle ne s'est propagée ni localement, ni ailleurs dans le corps.⁶

La **radiothérapie** consiste à utiliser des rayonnements pour détruire les cellules cancéreuses en bloquant leur capacité à se multiplier. L'irradiation a pour but de détruire les cellules cancéreuses tout en préservant le mieux possible les tissus sains et les organes avoisinants.⁷

1.4.2. Chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement qui consiste à injecter des médicaments contre les cellules cancéreuses. Elle **agit sur les cellules cancéreuses de l'ensemble du corps**, même sur celles qui n'ont pas été détectées lors des examens d'imagerie.⁸ Les objectifs de la chimiothérapie antitumorale sont d'enrayer la prolifération cellulaire anormale, d'éviter la dissémination tumorale (métastases) et de détruire les cellules anormales (c'est-à-dire rétablir le programme apoptotique de la cellule).⁹

Les agents chimiothérapiques actuels sont répartis en trois catégories. Il existe les **agents cytotoxiques**, les **agents non cytotoxiques** tels que les anti-œstrogènes (hormonothérapie), les différenciateurs cellulaires ou les inhibiteurs de protéines tyrosine kinases et les **agents modificateurs de la réponse immunitaire** tels que les interférons (immunothérapie).⁹ Les agents cytotoxiques sont présentés sur l'[annexe 1](#).

1.5. Méthodes de diagnostic et de suivi de traitement

Il existe à ce jour différentes approches pour établir un bilan diagnostique et suivre l'évolution du cancer au cours du traitement : (1) clinique, (2) par imagerie, (3) biologique et (4) pathologique (Schéma II).

► Le **clinicien** ne peut détecter par palpation que des tumeurs superficielles qui ont environ la taille d'une noisette et contiennent déjà **un milliard de cellules tumorales**.

► Les techniques d'**imagerie médicale** permettent de détecter au mieux une tumeur de la taille d'une tête d'épingle qui contient déjà **dix millions de cellules tumorales**.

► En mesurant la quantité d'un **marqueur tumoral** ou de plusieurs marqueurs tumoraux présents dans le sang ou l'urine, il est possible d'estimer le nombre de cellules cancéreuses présentes dans l'organisme. Les marqueurs tumoraux les plus sensibles permettent de détecter des tumeurs contenant environ **dix mille cellules cancéreuses**. Ainsi, **le dosage des marqueurs tumoraux est une des techniques les plus sensibles** pour détecter la présence de petites tumeurs ou suivre leur évolution au cours du traitement avant qu'elles n'acquière la capacité de former des métastases. On considère que pour se propager à distance et former des métastases, une tumeur doit contenir environ un million de cellules tumorales.

► Seul le **pathologiste** peut détecter **une seule cellule tumorale** qui sera visible sous son microscope.

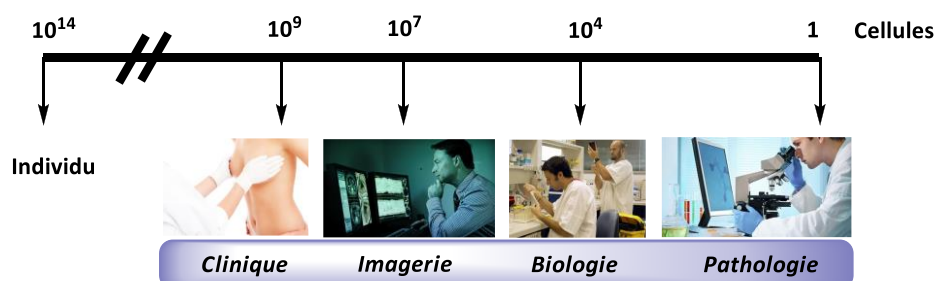


Schéma II : Comparaison de la sensibilité des différentes méthodes pour détecter la présence de cellules cancéreuses.

1.5.1. Examens d'imagerie médicale

Deux méthodes d'imagerie médicale sont principalement utilisées pour créer des images d'une partie du corps et détecter une tumeur dans un organe : il s'agit du *scanner* et de l'*imagerie par résonance magnétique*. Ces deux méthodes permettent de contrôler l'efficacité de certains traitements et de surveiller l'évolution du cancer.

Un **scanner** (également appelé scanner X, tomodensitométrie ou TDM) est une technique réalisée à l'aide d'un appareil qui utilise des rayons X à faible dose orientés vers la partie du corps à examiner.¹⁰

Un **examen d'Imagerie par Résonance Magnétique (ou IRM)** est une technique basée sur le phénomène physique de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN). Il s'agit d'observer la réponse des noyaux des atomes d'hydrogène de l'eau contenus dans l'organisme soumis à un champ magnétique extérieur et à une excitation électromagnétique.¹¹

Un troisième examen peut être utilisé pour rechercher d'éventuelles métastases invisibles sur les images obtenues par les deux autres techniques d'imagerie ou plus souvent pour vérifier s'il n'y a pas de récurrence après les traitements. Il s'agit de la **Tomographie par Emission de Positons** (TEP ou en anglais PET ou PET Scan).¹²

C'est un examen d'imagerie qui repose sur l'injection dans le sang d'un traceur faiblement radioactif (du glucose marqué) qui se fixe sur différents organes et permet d'en analyser le fonctionnement. Comme les cellules tumorales sont plus actives que les cellules normales, elles consomment et fixent davantage le glucose. La TEP permet ainsi d'obtenir des images précises de la répartition du glucose radioactif dans l'organisme et donc des cellules cancéreuses. Un ordinateur reconstitue une image en 3 dimensions et en couleurs de l'organe observé.

1.5.2. Marqueurs tumoraux

Les marqueurs tumoraux sont des substances qui sont sécrétées **principalement** par les cellules d'une tumeur cancéreuse ou par les tissus sains en réponse à la présence d'une tumeur.¹³ Ils peuvent être détectés dans des échantillons matriciels tels que le **sérum**, le **plasma**, le **sang total**, l'**urine** et les **tissus**.¹⁴ Le dosage des marqueurs tumoraux donne des indications sur l'évolution de la maladie. Toutefois, si les marqueurs tumoraux sont produits principalement par les cellules cancéreuses, ils sont parfois retrouvés en très faible quantité chez certaines cellules normales. De ce fait, de nombreux marqueurs sont détectables dans le sang en l'absence de tout cancer. La cause la plus fréquente d'une élévation d'un marqueur tumoral en l'absence de cancer est d'origine infectieuse ou inflammatoire. Un exemple est présenté ci-après.

Le cas du cancer de la prostate est pris en exemple. C'est le cancer masculin le plus fréquent en France et dans les pays occidentaux en général, nettement devant les cancers du poumon et du côlon-rectum. La prostate est une glande qui fabrique une protéine appelée antigène prostatique spécifique (*PSA : Prostate Specific Antigen*). Tous les hommes ont dans leur sang du PSA fabriqué par la prostate : c'est un marqueur qui indique qu'elle fonctionne correctement.

Le diagnostic de cancer de la prostate est habituellement suspecté dans trois cas : lors d'une augmentation de la valeur du PSA, lorsqu'une anomalie a été détectée au toucher rectal ou si des symptômes urinaires ou généraux (fatigue, perte d'appétit, perte de poids) sont présents. La quantité de PSA dans le sang est dosée par une prise de sang. Sa présence en quantité plus grande que la normale peut signaler que l'homme est atteint d'un cancer mais ce n'est pas obligatoire. C'est la raison pour laquelle ce n'est pas le seul examen utilisé pour diagnostiquer un cancer de la prostate.

Un homme qui n'a pas de cancer peut avoir une valeur temporairement élevée du PSA (résultat dit « faux positif ») en raison d'une inflammation de la prostate (prostatite) ou si une échographie endorectale a été réalisée.¹² Au contraire, un homme atteint d'un cancer peut avoir une valeur du PSA normale (résultat dit « faux négatif ») s'il prend des médicaments employés pour le traitement d'affections bénignes de la prostate (ces médicaments réduisent de moitié la valeur du PSA).¹⁵

1.5.2.1. Les marqueurs tumoraux utilisés en clinique

Les marqueurs tumoraux actuels peuvent être classés en plusieurs catégories : les **protéines**, les **antigènes oncofœtaux**, les **hormones**, les **récepteurs**, les **marqueurs géniques** et l'**ARN**.¹⁴ Le Tableau I présente sept exemples de marqueurs tumoraux actuellement utilisés en clinique et approuvés par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (F. D. A. : Food and Drug Administration).¹⁴

Tableau I : Marqueurs tumoraux actuellement utilisés en clinique et approuvés par la F. D. A. (* année d'approbation).

Marqueur	Type de molécule	Type de cancer	Milieu de dosage	Méthode de dosage	F. D. A.*
Antigène carcinoembryonnaire ou A. C. E.	Antigène oncofœtal	Cancers du côlon, du rectum	Sérum, plasma	Immunologique	1985
Alpha-fœto-protéine ou A. F. P.	Antigène oncofœtal	Cancer du testicule	Sérum, plasma, fluide amniotique	Immunologique	1992
Thyréoglobuline	Hormone	Cancer de la glande thyroïde	Sérum, plasma	Immunologique	1997
Antigène spécifique prostatique ou P. S. A.	Protéine antigénique	Cancer de la prostate	Sérum	Immunologique	1986
CA 15-3	Protéine antigénique	Cancer du sein	Sérum, plasma	Immunologique	1997
CA 19-9	Protéine antigénique	Cancers du pancréas et de l'estomac	Sérum, plasma	Immunologique	2002
CA 125	Protéine antigénique	Cancer de l'ovaire	Sérum, plasma	Immunologique	1997

1.5.2.2. Un marqueur tumoral potentiel

La phosphoglucose isomérase (PGI) est une enzyme glycolytique qui possède, entre autres, une deuxième fonction en tant que cytokine extracellulaire sous le nom de facteur de motilité autocrine (AMF). Ainsi nous appellerons cette enzyme AMF/PGI tout au long de ce manuscrit.

Depuis le milieu des années 80, de nombreux groupes ont fait le rapprochement entre d'une part l'expression de l'AMF/PGI et de son récepteur et, d'autre part, le développement de métastases et la diminution du pronostic vital des patients atteints de cancer. De nombreuses études ont été réalisées et montrent que **l'AMF/PGI est un biomarqueur potentiel de cancers métastatiques**.

Chapitre 2. Présentation de l'AMF/PGI

L'AMF/PGI est une enzyme de la **classe des aldose-cétose isomérases** (E.C. 5.3.1.X). Les aldose-cétose isomérases catalysent l'isomérisation réversible entre un aldose et un cétose par transfert d'hydrogène, d'une part entre les deux carbones C1 et C2 et d'autre part, entre les deux oxygènes O1 et O2 (Schéma III).

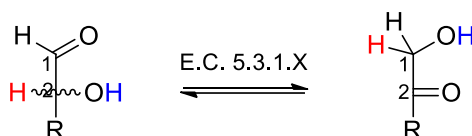


Schéma III : Réaction catalysée par les aldose-cétose isomérases.

À ce jour, cette classe d'enzymes comprend vingt-cinq membres dont les plus connus sont la D-xylose isomérase (XI, E.C. 5.3.1.5), une des enzymes les plus utilisées au niveau industriel,¹⁶ et la triosephosphate isomérase (TIM, E.C. 5.3.1.1), l'enzyme "parfaite".¹⁷ Cette dernière a en effet une vitesse de réaction uniquement limitée par la vitesse de diffusion des molécules en solution.

2.1. Historique

2.1.1. Découverte de la PGI

La **phosphoglucose isomérase** (6-phosphate-D-glucose isomérase, **PGI**, E.C. 5.3.1.9), aussi appelée phosphohexose isomérase (PHI) et glucose-6-phosphate isomérase (GPI), a longtemps été appelée « isomérase de Lohmann ». Elle a été **identifiée en 1933** pour son rôle dans le métabolisme du glucose où cette **enzyme intracellulaire** catalyse l'interconversion réversible du 6-phosphate-D-glucose (G6P) en 6-phosphate-D-fructose (F6P).¹⁸

Ce n'est que tardivement, dans le milieu des années cinquante, que ses propriétés moléculaires furent étudiées sur la protéine purifiée, notamment chez le lapin (muscle) et chez le parasite *Schistosoma mansoni*.¹⁹ Aujourd'hui, il existe dans la littérature de nombreuses études portant sur des PGI de sources très variées. Elles proviennent de végétaux,²⁰ de levure, du lapin,^{21,22} du porc,²³⁻²⁶ de parasites,^{19,27-29} et de l'Homme.³⁰

2.1.2. Découverte de l'AMF puis de son homologie avec la PGI

Depuis, plusieurs **autres activités extracellulaires** ont été identifiées. On parle donc d'une **protéine multifonctionnelle**,³¹ c'est-à-dire qu'elle joue différents rôles à la fois à l'intérieur (enzyme glycolytique cytosolique) et à l'extérieur de la cellule (cytokine extracellulaire).

Les autres noms les plus connus de la PGI sont **la neuroleukine (NLK)**,³² **le médiateur de maturation et de différenciation (DMM)**,³³ **le facteur de motilité autocrine (AMF)**,³⁴ **l'inhibiteur de protéases**,³⁵ et **l'antigène SA-36**.³⁶ Les activités extracellulaires correspondantes sont présentées dans le Tableau II.

2.2. Aspects génétiques et structuraux

L'AMF/PGI se trouve dans la plupart des organismes : environ 50 sources sont connues. Elles sont toutes **structurellement proches**, aussi bien du point de vue de la masse moléculaire que de la séquence en acides aminés ou de la structure tridimensionnelle de la protéine lorsque celle-ci est connue.

2.2.1. Conservation de la séquence

La séquence nucléotidique de l'AMF/PGI est connue pour de nombreuses espèces (plus de 50). Pour toutes les séquences répertoriées, un haut degré de similarité existe variant de 21 à 93 % (Tableau III).⁴⁰

Tableau III : Homologies de séquences (exprimées en %) entre l'AMF/PGI de différentes sources d'après Linda Fothergill-Gilmore et Paul Michels.⁴⁰

	Porc	Souris	Levure	<i>K. lactis.</i>	<i>P. falc.</i>	<i>T. brucei</i>	<i>Clarkia</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. stearo. A</i>	<i>B. stearo. B</i>
Homme	93	89	58	57	38	57	63	64	23	21
Porc		89	59	59	39	58	64	65	23	22
Souris			58	57	37	57	64	63	23	21
Levure				86	39	53	59	59	24	21
<i>Kluyveromyces lactis</i>					41	52	60	59	25	22
<i>Plasmodium falciparum</i>						40	41	40	24	23
<i>Trypanosoma brucei</i>							58	57	23	22
<i>Clarkia</i>								88	25	23
<i>Escherichia coli</i>									24	22
<i>Bacillus stearothermophilus A</i>										70

Cette **homologie remarquable** signifie que cette enzyme est restée très conservée tout au long de l'évolution. Plusieurs alignements de séquences ont été publiés dans la littérature.^{34,40-42} L'un de ces alignements est représenté sur la Figure IV.

Sur cet alignement, on observe une cinquantaine de résidus strictement conservés, même dans le cas d'organismes éloignés du point de vue évolutif comme les bacilles et les mammifères. Les zones de fortes similitudes concernent les résidus du site actif (ou proches du site actif) intervenant de manière directe ou indirecte dans l'activité de l'enzyme.



2.2.2. Aspects structuraux

Les AMF/PGI sont des protéines de type **dimère** et leur **masse moléculaire** est estimée à **110 kDa**. La structure cristalline de *Trypanosoma brucei*⁴⁴ est donnée en exemple (Figure V).

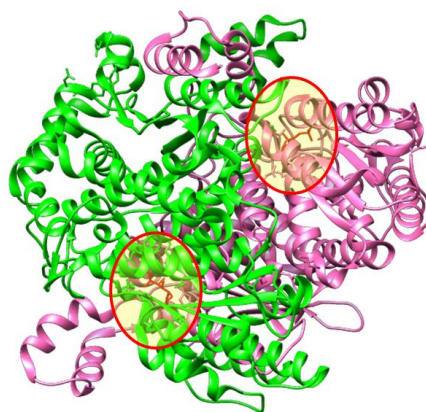


Figure V : PGI de *Trypanosoma brucei* (PDB : 202C).⁴⁴ L'enzyme est dimérique : chaîne A en rose, chaîne B en vert et les trois substrats G6P entourés en rouge.

La PGI humaine n'est active que sous sa forme dimérique et si l'on compare les séquences des chaînes A et B de l'enzyme (Figure VIII),⁴⁵ nous pouvons remarquer qu'il y a 100 % d'homologie. Il s'agit donc d'un **homodimère**.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
Chaîne:A	MAALTRDPQFOKLOQWYREHRSSELNLRRLFDANKDRFNHFSLTNTNHHGHLVDYSKNLVTEDVMRMLVDLAKSRGVEAA								
Chaîne:B	MAALTRDPQFOKLOQWYREHRSSELNLRRLFDANKDRFNHFSLTNTNHHGHLVDYSKNLVTEDVMRMLVDLAKSRGVEAA								
	90	100	110	120	130	140	150	160	
Chaîne:A	RERMFNGEKINYTEGRAVLHVALNRNSNTPILVDGKDVMPVNVKVLDKMKSFCQVRVSGDWKGYTGKTITDVINIGIGGS								
Chaîne:B	RERMFNGEKINYTEGRAVLHVALNRNSNTPILVDGKDVMPVNVKVLDKMKSFCQVRVSGDWKGYTGKTITDVINIGIGGS								
	170	180	190	200	210	220	230	240	
Chaîne:A	DLGPLMVTEALKPYSSGGPRVWVYSNIDGTHIAKTLAQLNPESSLFIIASKTFTTQETITNAETAKEWFLQAAKDPSAVA								
Chaîne:B	DLGPLMVTEALKPYSSGGPRVWVYSNIDGTHIAKTLAQLNPESSLFIIASKTFTTQETITNAETAKEWFLQAAKDPSAVA								
	250	260	270	280	290	300	310	320	
Chaîne:A	KHFVALSTNTTKVKEFGIDPQNMPEFWDWVGGRYSLWSAIGLSIALHVGFDFNFQQLSGAHWMDQHFRTPPLEKNAPVLL								
Chaîne:B	KHFVALSTNTTKVKEFGIDPQNMPEFWDWVGGRYSLWSAIGLSIALHVGFDFNFQQLSGAHWMDQHFRTPPLEKNAPVLL								
	330	340	350	360	370	380	390	400	
Chaîne:A	ALLGIWYINCFGCETHAMLPYDQYLHRFAAYFQQGDMSNGKYITKSGTRVDHQTGPVWGEFPGTNGQHAFYQLIHQGT								
Chaîne:B	ALLGIWYINCFGCETHAMLPYDQYLHRFAAYFQQGDMSNGKYITKSGTRVDHQTGPVWGEFPGTNGQHAFYQLIHQGT								
	410	420	430	440	450	460	470	480	
Chaîne:A	MIPCDFLIPVQTHPIRKGLHHKILLANFLAQTEALMRGKSTEARKELOAAGKSPEDLERLLPKVFEKNRPTNSIVFT								
Chaîne:B	MIPCDFLIPVQTHPIRKGLHHKILLANFLAQTEALMRGKSTEARKELOAAGKSPEDLERLLPKVFEKNRPTNSIVFT								
	490	500	510	520	530	540	550		
Chaîne:A	KLTPFMLGALVAMYEHKIFVQGIWDINSFDQWGVELGKQLAKKIEPELDGSAQVTSHDASTNGLINFIKQQRERARVO								
Chaîne:B	KLTPFMLGALVAMYEHKIFVQGIWDINSFDQWGVELGKQLAKKIEPELDGSAQVTSHDASTNGLINFIKQQRERARVO								

Figure VIII : Alignement de séquence des chaînes A et B de l'AMF/PGI humaine (PDB : 1JLH).⁴⁵ Le surlignage rouge indique que les acides aminés sont conservés dans chacune des séquences.

La structure tridimensionnelle du dimère (Figure IX) montre que **les deux chaînes s'imbriquent l'une dans l'autre**. De ce fait, la chaîne B est impliquée dans le site actif A, et la chaîne A dans le site actif B.

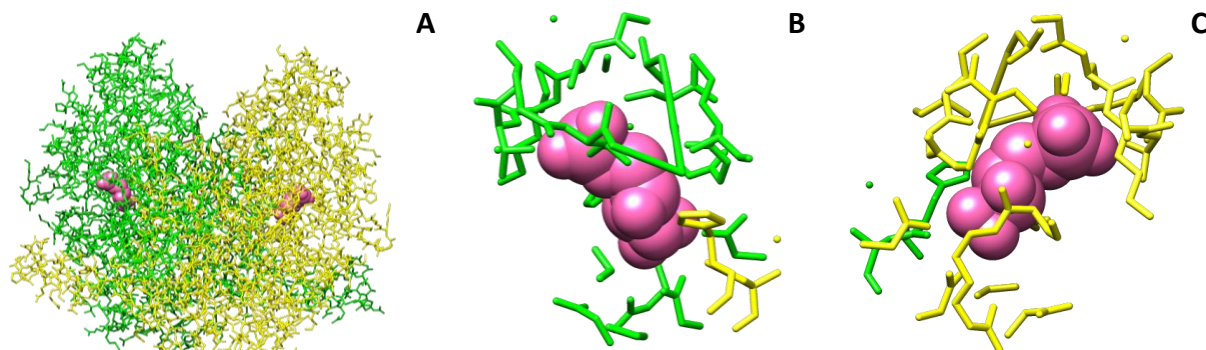


Figure IX : Visualisation par Chimera des deux monomères A (en vert) et B (en jaune) de l'AMF/PGI humaine (PDB : 1IRI).³⁸ (A) Dimère entier. (B) et (C) 4-phosphate-D-érythrose en rose et les acides aminés au voisinage (jusqu'à une distance de 5 Å) au niveau du monomère A et du monomère B respectivement.

2.3. Activité glycolytique de l'AMF/PGI

La PGI catalyse l'interconversion réversible entre le 6-phosphate-D-glucose (G6P) et le 6-phosphate-D-fructose (F6P) (Schéma IV A). Il a été montré qu'elle possède une sélectivité pour les anomères α du G6P et β du F6P.^{46,47}

D'autres réactions sont possibles. Par exemple, la PGI de muscle de lapin catalyse également la mutarotation du G6P, du F6P mais aussi du 6-phosphate-D-mannose (M6P).⁴⁸ Elle réalise également l'épimérisation du G6P et du F6P en M6P (mais avec une activité bien plus faible : environ 1000 fois inférieure) (Schéma IV B).²²

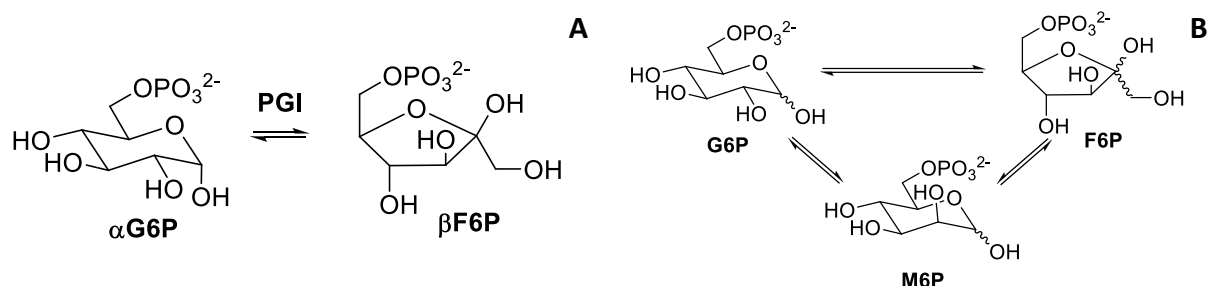


Schéma IV : (A) Réaction catalysée par la PGI. (B) Autres réactions catalysées par la PGI de muscle de lapin.

À titre d'exemple, la PGI extraite de muscle lapin possède une affinité pour le G6P (K_M) de **310 μ M** et pour le F6P de **174 μ M**. Sa constante catalytique (k_{cat}) est de **135 000 min^{-1}** dans le sens F6P vers G6P ; son pH d'activité optimum est de **8,5**. Ces valeurs sont proches pour toutes les PGI extraites et étudiées.

2.3.1. Mécanisme d'action

La PGI est une enzyme qui ne nécessite **pas de cofacteur** (métallique ou non) dans son site actif pour catalyser la réaction. Le mécanisme proposé peut être décrit en **sept étapes** (Schéma VII).

Le mécanisme de l'étape de l'ouverture cyclique du F6P a été proposé par le Pr. Jeffery suite à une étude structurale du complexe RmPGI-F6P (PDB 1HOX) montrant clairement une interaction du résidu His388 avec l'oxygène cyclique du F6P et le Glu216, ce qui suggère une His388 sous forme protonnée.⁴⁹ De même, cette structure montre l'interaction indirecte de la Lys518 avec l'hydroxyle anomérique du substrat par l'intermédiaire d'une molécule d'eau.

Il en a été déduit le mécanisme d'ouverture cyclique rapporté sur le Schéma VII (Etape 1), où la molécule d'eau est en interaction avec les résidus Thr214 et Lys518, et le groupe OH en C2 du F6P. Cette molécule d'eau rendue acide par son interaction avec la Lys518, pourrait également être déprotonnée par la Thr214, elle-même déprotonnée par le phosphate du substrat.

Une fois le F6P sous forme ouverte, la molécule d'eau formée (protonnée ou non) "sortirait" du site actif, ce qui aurait pour conséquence un changement conformationnel de la structure du site actif (notamment de la Lys518) et du F6P avec rotation de la liaison C3-C4 de 140° (Schéma VII, Etape 2), positionnant ainsi le C1 correctement vis-à-vis des résidus impliqués Glu357 et Arg272 pour l'étape d'isomérisation proprement dite (Schéma VII, Etapes 3, 4 et 5).

Le mécanisme d'isomérisation catalysé par la PGL implique un **intermédiaire de haute énergie (IHE) de type 1,2-*cis*-enediolate** (Schéma V).

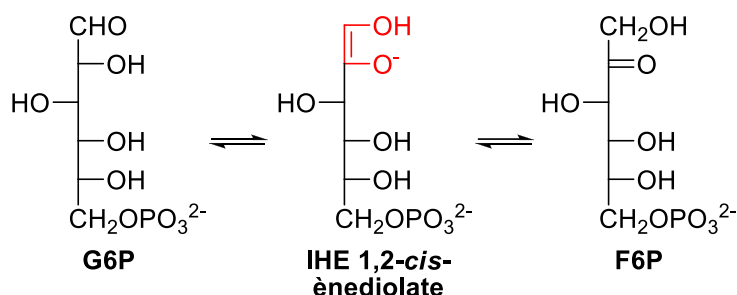


Schéma V : Passage par un intermédiaire de haute énergie.

La PGL utilise un résidu glutamate comme base catalytique pour transférer un proton entre les deux carbones C1 et C2 du F6P (Schéma VII, Etape 3). Il peut être remarqué que le mécanisme d'isomérisation ne s'effectue pas de la même manière chez toutes les aldose-cétoses isomérases : dans le cas de la xylose isomérase, l'étape d'isomérisation implique un transfert d'hydrure intramoléculaire.

Bien qu'un mécanisme de transfert intramoléculaire ne peut être exclu (Schéma VI, voie A), une molécule d'eau pourrait, par son couple $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$, catalyser le transfert du proton entre les deux oxygènes en C1 et C2 des IHE (Schéma VI, voie B), soit directement, soit par l'intermédiaire d'autres molécules d'eau environnantes.

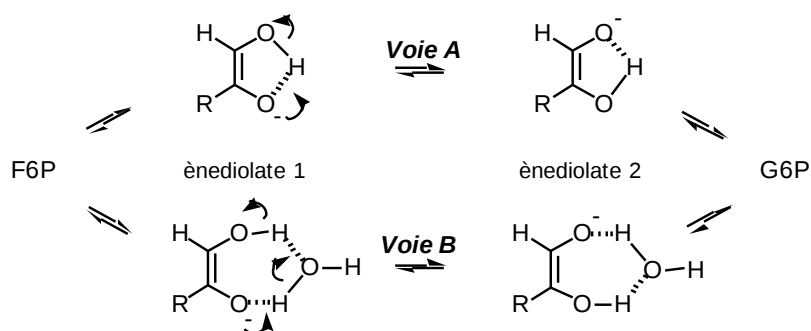


Schéma VI : Proposition de mécanismes de transfert du proton entre les oxygènes des carbones C1 et C2 des substrats F6P et G6P dans la réaction d'isomérisation catalysée par les PGL.

Lors des deux dernières étapes du mécanisme proposé de la PGL on assiste à la rotation de la liaison C3-C4 puis à la fermeture cyclique du G6P (Schéma VII, Etapes 6 et 7).



2.3.2. Implication dans le métabolisme

La PGI se trouve à un véritable **carrefour métabolique** (Schéma VIII) : elle est impliquée dans de nombreuses voies comme la *glycolyse*, la *néoglucogénèse*, la *voie des pentoses phosphate*, la *biosynthèse des oligosaccharides*, soit directement, soit par l'intermédiaire d'un de ses substrats.

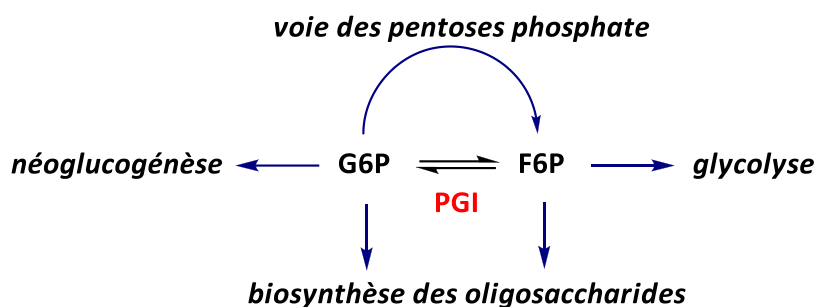


Schéma VIII : Une enzyme au carrefour de plusieurs voies métaboliques vitales

2.3.2.1. Glycolyse

La voie la plus connue dans laquelle est impliquée la PGI est la voie de dégradation du glucose, la *glycolyse*.

La glycolyse est une voie métabolique essentielle qui fournit une quantité non négligeable d'énergie aux cellules, sous forme d'**adénosine triphosphate (ATP)**. Son importance historique est fondamentale puisque c'est la première voie métabolique qui a été complètement analysée au niveau des réactions enzymatiques qu'elle met en jeu. Comme elle est commune à presque tous les organismes, elle a fondé la notion d'unité biochimique profonde du monde vivant.

Dans certains organes (cellules sanguines, cerveau) et chez certains organismes, notamment parasites, la glycolyse est la voie privilégiée pour la production d'énergie dans les cellules. Cela souligne l'importance de l'étude des enzymes impliquées dans cette voie métabolique.

Dans la glycolyse, **une molécule de glucose** à six atomes de carbone **est transformée en deux molécules de pyruvate**, possédant chacune trois atomes de carbones. Cette conversion requiert une séquence de **dix réactions enzymatiques** qui impliquent une série d'intermédiaires phosphorylés. Le *bilan énergétique net* de la glycolyse jusqu'à la production de pyruvate est donc **la formation de deux molécules d'ATP par molécule de glucose**.

La PGI est la deuxième enzyme de la glycolyse, juste après l'étape de phosphorylation du D-glucose. On considère généralement que la PGI fonctionne à l'équilibre, c'est-à-dire que **le rapport [G6P]/[F6P] est constant et vaut environ 3**.

Un schéma détaillé de chaque étape mise en jeu dans ce processus métabolique est présenté sur l'[annexe 2](#).

2.3.2.2. Néoglucogénèse

Le glucose est la source d'énergie unique pour les cellules de certains organes tels le cerveau et les globules rouges chez les mammifères. Cependant, les réserves de glucose sous forme polymérique (le glycogène) ne sont pas inépuisables. Il existe donc une voie métabolique permettant la « nouvelle synthèse du glucose » appelée la *néoglucogénèse*.

Cette **voie inverse** est particulièrement **indispensable** au cours de périodes d'exercices violents, quand le glucose nécessaire à la contraction musculaire est produit par les cellules du foie ainsi que dans les périodes de disette, quand la survie requiert une synthèse du glucose à partir des acides gras et des acides aminés.

Un schéma détaillé de chaque étape mise en jeu dans ce processus métabolique est présenté sur l'[annexe 3](#).

2.3.2.3. Voie des pentoses phosphate

La voie des Pentoses Phosphate (PP) est une cascade de réactions allant du G6P au F6P et permettant l'obtention de **différents composés très importants pour toutes les cellules** : le *nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite* (NADPH), le *5-phosphate-D-ribose* (R5P), le *4-phosphate-D-érythrose* (E4P) et le *7-phosphate-sedoheptulose* (S7P).

2.3.2.4. Biosynthèse des oligosaccharides

Les oligosaccharides interviennent dans tous les **processus de reconnaissance des cellules** : embryogénèse, formation des métastases, infections virales et microbiennes, défense immunitaire par les globules blancs... Or, le G6P et le F6P sont des **sucres précurseurs importants dans la biosynthèse des glycoprotéines** : la PGI est donc une enzyme cruciale de cette voie métabolique.

2.4. Activité cytokine de l'AMF/PGI

Nous avons vu au paragraphe 2.2 que le site actif de l'AMF/PGI est hautement conservé à la fois chez les bactéries et chez les eucaryotes.⁵⁰ Cependant, l'activité cytokine de l'AMF/PGI mise en jeu dans la tumorigénèse (c'est-à-dire la capacité des cellules à dégénérer en tumeurs) est spécifique aux mammifères.⁵¹

2.4.1. Biomarqueur métastatique validé

L'AMF/PGI, sécrétée par les cellules tumorales à des niveaux importants, se retrouve à la fois dans le sérum et dans les urines et peut ainsi être utilisée comme marqueur de diagnostic pour suivre la progression des cancers vers des métastases.^{52–56}

Des tests *in vitro* ont été réalisés et la motilité des cellules cancéreuses a été observée **dès 1 pM**.⁵³ Pour ce qui est des tests *in vivo*, le taux d'AMF/PGI dans le sang et les urines de patients présentant des métastases a été évalué à des concentrations allant **de 10 nM à 1 µM** pour les stades les plus avancés. Plus les concentrations en AMF/PGI sont élevées et plus les métastases sont à un stade avancé.⁵³ Les études ont été réalisées sur différents type de cancers⁵⁷ tels que : le cancer du sein,^{52,53,58,59} du rein,⁵³ gastrointestinal,^{60–62} colorectal,^{54,63,64} pancréatique,⁶⁵ de la vessie,⁵⁵ de la prostate,⁵⁶ des os,⁶⁶ du foie^{67,68} et du poumon.^{69–71}

L'AMF/PGI en tant qu'enzyme cytosolique est observée dans toutes les cellules de manière ubiquitaire, tandis que la protéine sécrétée n'a jamais été retrouvée à partir de cellules normales à ce jour mais seulement à partir de cellules tumorales, de cellules embryonnaires ou de cellules T-activées.⁷² Par contre, la protéine a été détectée dans la circulation sanguine et les fluides synoviaux de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde.^{73–76}

2.4.2. Existence d'un récepteur de l'AMF/PGI

Le récepteur du facteur de motilité autocrine a été, à l'origine, appelé gp78 car il s'agit d'une **glycoprotéine de 78 kDa**. Elle a été purifiée à partir de cellules de mélanome métastatiques B16-F1.^{77,78} Puis, une fois cette glycoprotéine identifiée comme étant le récepteur de l'AMF, elle a été appelée AMFR.^{79,80} Les deux dénominations gp78 et AMFR sont utilisés dans la littérature : nous utiliserons donc la notation gp78/AMFR tout au long du manuscrit.

La structure de cette glycoprotéine gp78/AMFR reste encore aujourd'hui très mal définie. Il s'agit néanmoins d'une protéine possédant sept domaines transmembranaires et différents motifs (par exemple des motifs « RING finger » et « CUE » responsables de l'activité ubiquitine ligase) sur sa partie C-terminale cytosolique.⁸¹ De plus, un site de N-glycosylation est également supposé au niveau de l'acide aminé 595 (position C-terminale).⁸¹

La fonction exacte de la glycosylation de gp78/AMFR reste encore à éclaircir. Cependant, la chaîne sucre supposée N-glycosylée sur gp78/AMFR a été proposée comme étant essentielle à la fixation de l'AMF/PGL.⁸² En effet, lors d'une expérience de réticulation, il a été montré que la mutation du site de N-glycosylation de gp78/AMFR empêche l'interaction de l'AMF/PGL. Dans le même sens, le gp78/AMFR purifié et traité avec une N-glycosidase ne permet plus la motilité des cellules stimulée par l'AMF.⁸²

2.4.3. Interaction de l'AMF/PGL avec son récepteur gp78/AMFR

Un anticorps monoclonal (mAB), appelé 3F3A, a été utilisé pour étudier la distribution de gp78/AMFR et son rôle dans la motilité des cellules.⁷⁹ La liaison de l'anticorps monoclonal 3F3A à gp78/AMFR rentre en compétition avec la liaison de l'AMF/PGL et stimule la motilité des cellules de façon similaire à l'AMF/PGL.^{79,83} Ces résultats suggèrent que l'anticorps monoclonal 3F3A et l'AMF/PGL se lient et activent gp78/AMFR sur le même domaine extracellulaire.⁸⁴

Il existe pour le moment peu d'informations au sujet de la structure de base de l'interaction entre l'AMF/PGL et gp78/AMFR. Cependant, il a été prouvé que la cytokine AMF purifiée possède l'activité PGL et que la PGL commerciale de cœur de lapin est capable d'induire le déplacement des cellules tumorales (activité AMF).⁸⁵ De même, des monosaccharides phosphorylés inhibiteurs de l'activité PGL tels que le 4-phosphate-D-érythrose (E4P), le 5-phosphate-D-arabinose (A5P) et le 6-phospho-D-gluconate (6PGA), inhibent également la motilité des cellules stimulée par l'AMF.⁸⁵ Il est donc probable que l'interaction de l'AMF/PGL avec son récepteur gp78/AMFR se produise en partie par la liaison de la chaîne glycosylée du récepteur au niveau du site de fixation du substrat G6P ou F6P (Schéma IX).⁸⁵

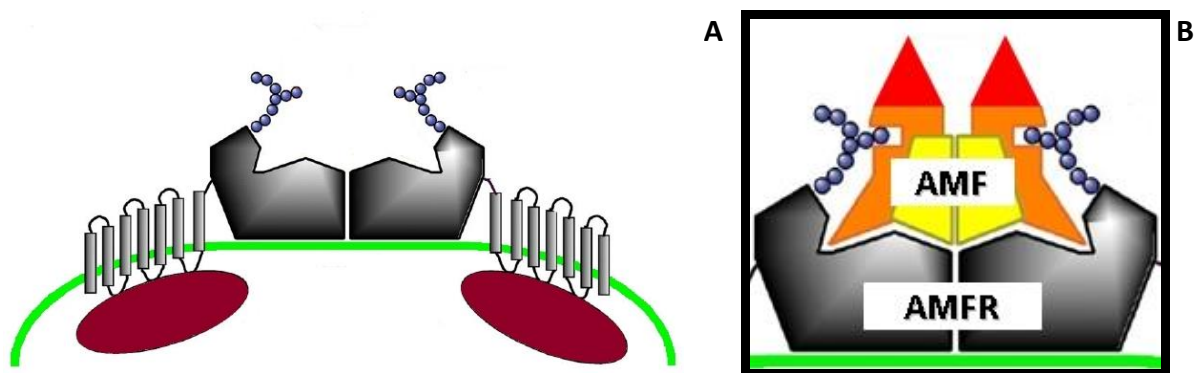


Schéma IX : Représentation du récepteur AMFR/gp78 (en violet sont représentées des protéines G) (A) et de l'interaction AMF-AMFR via les chaînes glycosylées du récepteur (B) proposée par Haga et coll.⁸⁵

L'équipe de Haga émet l'hypothèse que la chaîne sucre de l'AMFR/gp78 contient un sucre phosphorylé ou sulfaté reconnu par l'AMF, et que ce mécanisme de reconnaissance du substrat de l'activité PGL est le facteur primaire de l'interaction AMF-AMFR.⁸⁵ En conclusion, et contrairement à ce qui avait été avancé initialement,⁸⁶ l'activité enzymatique de la PGL semble nécessaire à son activité cytokine (AMF).

2.4.4. Sécrétion de l'AMF/PGI

Pour pouvoir interagir avec son récepteur, l'AMF/PGI est tout d'abord sécrétée par la cellule. L'AMF/PGI est une protéine qui ne possède pas de peptide signal pour sa sécrétion et qui est donc sécrétée *via* un chemin non-classique dont les mécanismes restent encore à définir clairement.⁸⁷ Il a été déterminé qu'une quantité inférieure à 1 % d'AMF/PGI totale cellulaire est excrétée par les cellules, suggérant que ce n'est pas un processus efficace.⁸⁸ Il a été proposé que la phosphorylation de l'AMF/PGI est un régulateur potentiel de son excrétion.^{89,90}

2.4.5. Implication de l'AMF/PGI dans la tumorigénèse

Comme nous venons de le voir, le processus de sécrétion de l'AMF/PGI reste encore aujourd'hui très mal défini. Néanmoins, il est clairement établi que la surexpression de l'AMF/PGI et celle de son récepteur AMFR/gp78 sont associées avec différents types de cancer et sont corrélées avec la progression et la malignité des tumeurs (paragraphe 2.4.1).⁵⁰

L'AMF/PGI joue plusieurs rôles contribuant à la tumorigénèse de différents types de cancers. En effet, l'AMF/PGI est sécrétée par les cellules tumorales et stimule leur potentiel de prolifération,⁹¹ de migration,⁸⁰ d'angiogénèse^{92,93} et de résistance à l'apoptose.^{94–96} Ces deux dernières caractéristiques sont détaillées ci-dessous.

2.4.5.1. L'AMF/PGI entraîne une meilleure capacité de survie

Des **rôles anti-apoptotiques** ont été démontrés pour l'AMF/PGI. En effet, sa surexpression constante dans les cellules NIH-3T3 (lignée modèle de souris de cellules normales) induit une transformation cellulaire et une résistance à l'apoptose. Or ces deux phénomènes sont dépendants du chemin de signalisation de la phosphatidylinositol-3-kinase avec un récepteur à activité tyrosine kinase (PI3K-Akt). Ceci suggère donc que l'interaction entre l'AMF/PGI et gp78/AMFR provoque un dérèglement de cette voie de signalisation.⁹⁴

De plus, il a été montré que les cellules de fibrosarcome humain HT-180 sécrétant de hauts niveaux d'AMF/PGI sont résistants à l'apoptose induite par médicament *via* la sous-régulation de deux protéines pro-apoptotiques essentielles, nommées Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) et caspase-9.^{95,96}

2.4.5.2. L'AMF/PGI impliquée dans l'angiogénèse

L'activation AMF/PGI-gp78/AMFR a été aussi impliquée dans l'angiogénèse.^{92,93} L'AMF/PGI stimule la motilité des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine menant à une sur-régulation de l'expression de gp78/AMFR à la surface des cellules. Elle agit aussi comme un facteur angiogénique qui induit la formation de structure comme des tubes dans des gels de collagène en trois dimensions.⁹²

L'équipe de Funasaka a également fait des dosages *in vivo* montrant que les cellules tumorales qui surexpriment de manière stable l'AMF/PGI développent un nombre significativement élevé de nouveaux vaisseaux sanguins.⁹² De plus, ils ont démontré que ce processus angiogénique peut être inhibé par le 4-phosphate-D-érythrose (E4P), un inhibiteur phosphorylé de l'AMF/PGI.⁹²

2.4.5.3. L'AMF/PGI entraîne une capacité d'envahissement des tissus voisins

L'AMF/PGI joue un rôle majeur dans la capacité des cellules tumorales à envahir les tissus voisins. La reconnaissance AMF/PGI—gp78/AMFR provoque une cascade de réactions à l'intérieur du cytoplasme *via* l'activation d'une protéine G,⁹⁷ puis la production d'un messenger intracellulaire classique : l'inositol triphosphate (IP3).⁹⁸ Ceci induira l'activation de l'arachidonate 12-lipoxigénase (12-LOX), permettant la production d'acide hydroxyeicosatétraénoïque (12-(S)-HETE). Le 12-(S)-HETE active une protéine kinase C qui provoque d'une part la formation aléatoire de pseudopodes⁹⁹ et d'autre part la translocation des intégrines vers la surface.¹⁰⁰

Les pseudopodes proviennent d'une déformation de la membrane plasmique et permettent aux cellules de se déplacer. Ils vont donc permettre la motilité des cellules cancéreuses. Les intégrines, quant à elles, sont des protéines de surface qui vont participer à l'adhésion et à la dispersion des cellules tumorales.

2.5. Inhibition de l'activité de l'AMF/PGI

2.5.1. Généralités sur les inhibiteurs

Une enzyme peut être bloquée de deux manières : (1) par un *inhibiteur irréversible* (*marqueurs d'affinité ou inhibiteurs suicides/mécanistiques ou encore inhibiteurs de type « slow/tight binding »*), (2) par un *inhibiteur réversible* (*compétitif, incompétitif ou non-compétitif*). Concernant la PGI, de nombreux inhibiteurs, de synthèse ou non, ont été caractérisés. On en retrouve principalement de deux types : irréversibles ou compétitifs.

2.5.1.1. Inhibiteurs irréversibles

Les **inhibiteurs irréversibles** interagissant au site actif forment généralement avec un résidu une **liaison covalente stable**, ce qui **inactive l'enzyme** de façon permanente. Ils sont utilisés pour le marquage d'affinité de la protéine et permettent de déterminer la nature des résidus impliqués dans la catalyse.

L'utilisation de différents marqueurs d'affinité a permis de montrer que les acides aminés *histidine*, *glutamate*, *arginine* et *lysine* jouent les premiers rôles dans la réaction d'isomérisation catalysée par la PGI.

2.5.1.2. Inhibiteurs compétitifs

Les **inhibiteurs compétitifs** interagissent également pour la plupart au site actif de la protéine en entrant en **compétition avec le substrat** et sans former de liaison covalente stable avec un résidu du site actif. Pour évaluer le pouvoir inhibiteur d'une substance, on détermine la **constante de dissociation du complexe** qu'elle forme avec sa cible. Cette valeur, le **K_i** , est représentative de sa stabilité et donc de la "force" avec laquelle elle est liée à l'enzyme. Plus le K_i est petit, plus l'interaction sera forte.

Les différents inhibiteurs ciblant le site actif peuvent être soit **analogues de substrat**, soit **analogues de l'intermédiaire de haute énergie (IHE)**.

2.5.2. Inhibiteurs de l'activité glycolytique de l'AMF/PGI

2.5.2.1. Inhibiteurs analogues de substrat

Les inhibiteurs analogues de substrat ont des **structures proches de celle du substrat à l'état fondamental**. Ils sont les plus courants et les plus faciles à concevoir mais généralement peu efficaces ($K_m / K_i < 10$).

Pour les concevoir, la fonction réactive du substrat peut par exemple être supprimée ou bien remplacée par un groupe qui ne pourra pas être transformé par l'enzyme. Une fonction « non réactive » du substrat peut également être remplacée pour donner un inhibiteur analogue de substrat (qui sera transformé ou non). Une sélection des meilleurs inhibiteurs analogues de substrat connus de l'enzyme est représentée sur le Schéma X.

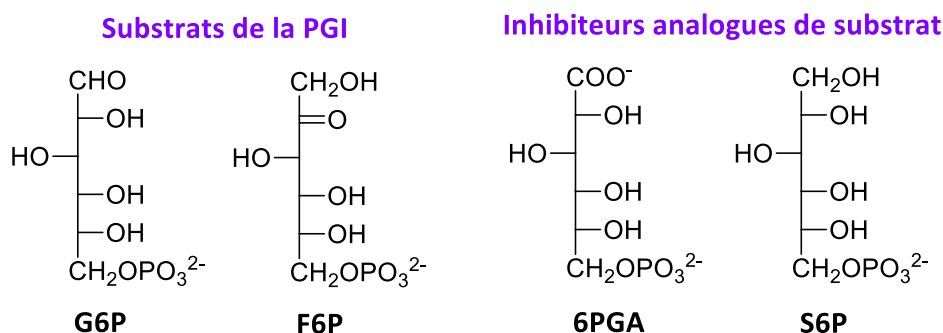


Schéma X : Structures des deux meilleurs inhibiteurs analogues de substrat connus de la PGI.

Depuis 1956, le **6-phospho-D-gluconate (6PGA)** est l'inhibiteur classique de la PGI : c'est un des intermédiaires du cycle des pentoses phosphate. C'est l'inhibiteur de la PGI le plus étudié et qui a l'avantage d'être commercial. La fonction aldéhyde du G6P a été remplacée par une fonction carboxylate. Le **6-phospho-D-sorbitol (S6P)** est un inhibiteur analogue du F6P où la fonction cétone en position C2 a été remplacée par une fonction alcool. Les constantes d'inhibition de ces deux inhibiteurs testés sur la PGI de *Saccharomyces cerevisiae* (YPGI) sont de l'ordre de la centaine de micromolaire, nettement moins efficaces que les inhibiteurs analogues de l'intermédiaire de haute énergie.¹⁰¹

2.5.2.2. Inhibiteurs analogues de l'intermédiaire de haute énergie

Les inhibiteurs analogues de l'intermédiaire de haute énergie ont des structures et surtout des propriétés électroniques proches de cet IHE. Ils sont en général très efficaces (K_m / K_i très grand). Une sélection des meilleurs inhibiteurs analogues de l'IHE connus de l'enzyme est représentée sur le Schéma XI.

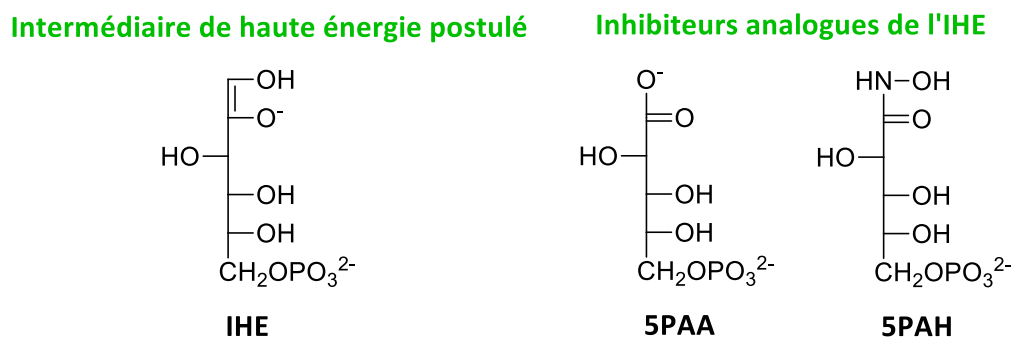


Schéma XI : Structures des deux meilleurs inhibiteurs analogues de l'IHE connus de la PGI.

Le **5-phospho-D-arabinonate (5PAA)** est le premier inhibiteur analogue de l'IHE qui a été synthétisé et qui se trouve être bien plus efficace que les analogues de substrat vus précédemment.¹⁰² Il est resté le seul aussi efficace jusqu'en 1998 puis,¹⁰³ par analogie avec l'intermédiaire de haute énergie 1,2-*cis*-ènediolate postulé, de nouveaux inhibiteurs ont été conçus. À ce jour, l'**acide 5-phospho-D-arabinonohydroxamique (5PAH)** est le meilleur inhibiteur connu des PGI.¹⁰¹ Le Tableau IV montre les constantes d'inhibition de ces deux inhibiteurs testés sur la PGI de *Saccharomyces cerevisiae* (YPGI) qui possède 58 % d'homologie avec l'enzyme humaine.

Tableau IV : Constantes d'inhibition de deux inhibiteurs testés sur la PGI de levure.

K _m (μM)		K _i (μM)	
G6P	F6P	5PAA	5PAH
84 ¹⁰¹	167 ²⁹	2,2 ¹⁰⁴	0,23 ¹⁰¹

2.5.3. Inhibiteurs de l'activité cytokine de l'AMF/PGI

Nous avons vu précédemment que des monosaccharides phosphorylés inhibiteurs de l'activité glycolytique de l'AMF/PGI tels que le 4-phosphate-D-érythrose (E4P), le 5-phosphate-D-arabinose (A5P) et le 6-phospho-D-gluconate (6PGA), inhibent également la motilité des cellules stimulée par l'AMF *in vitro*.⁸⁵ L'inhibition de la prolifération des cellules tumorales *in vivo* est abordée dans le paragraphe suivant.

2.5.3.1. Vectorisation du paclitaxel par l'AMF/PGI

L'objectif de l'étude mise en place par le Professeur Ivan Robert Nabi et le Docteur Sam M. Wiseman (Université British Columbia, Vancouver) est de développer une façon plus ciblée d'administrer la chimiothérapie pour le cancer du sein. Ce traitement est nommé AMF/PGI-paclitaxel.

Le paclitaxel est un anticancéreux connu cliniquement utilisé pour traiter le cancer du sein. D'autre part, nous savons que lorsque l'AMF/PGI se lie à son récepteur gp78/AMFR, il est efficacement et sélectivement pris en charge par les cellules cancéreuses. Ainsi, en vectorisant le paclitaxel par l'AMF/PGI, l'équipe du Professeur Nabi espère livrer ce médicament chimiothérapeutique plus sélectivement aux cellules du cancer du sein et non aux cellules normales du reste du corps. Ceci pourrait augmenter l'efficacité et réduire les effets toxiques des traitements au paclitaxel chez les patients atteints du cancer du sein.

Pour le moment, des études sur des tumeurs de mélanomes de souris ont été réalisées. Les résultats sont concluants et montrent que le paclitaxel conjugué à l'AMF/PGI, une fois injecté dans la tumeur, est capable d'inhiber la prolifération des cellules tumorales et d'induire la régression de la tumeur.¹⁰⁵ Des études sur des tumeurs mammaires humaines devront être réalisées et si les résultats sont concluants, l'AMF/PGI-paclitaxel pourra être développé pour une utilisation clinique comme médicament contre le cancer du sein.

2.5.3.2. Mises au point d'agents chimiothérapeutiques à visée anti-métastatique

Bien qu'annexe au travail de thèse présenté dans ce rapport, l'inhibition de l'AMF/PGI est une thématique de recherche sous-jacente à cette étude offrant des perspectives originales pour la mise au point d'agents chimiothérapeutiques à visée antimétastatique. De puissants inhibiteurs de l'AMF/PGI (par exemple le SPAH) sont potentiellement des agents anticancéreux de nouvelle génération. Le développement récent d'une collaboration avec le Professeur Fabrice André (Institut de cancérologie Gustave Roussy à Villejuif) va dans ce sens.

Chapitre 3. Objectifs et présentation de la thèse

3.1. Objectifs du projet et avancées scientifiques attendues

L'inhibition de l'interaction AMF–AMFR est un projet prometteur pour le développement d'une thérapie anti-métastatique, pour le diagnostic de l'évolution des métastases, pour le suivi et la meilleure efficacité des traitements chimiothérapiques et donc pour l'amélioration du pronostic des personnes atteintes de cancers.

Les méthodes de détermination de l'activité AMF/PGI dans les fluides humains rapportées dans la littérature sont difficilement adaptables pour une analyse rapide de routine.

Une première méthode enzymatique mesure la vitesse de formation du F6P à partir de G6P et d'une deuxième enzyme, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), en présence du cofacteur nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé (NADP^+). La réaction est suivie grâce aux propriétés spectrales particulières du coenzyme sous forme réduite (NADPH , H^+) qui absorbe spécifiquement à 340 nm. (Schéma XII).³⁰

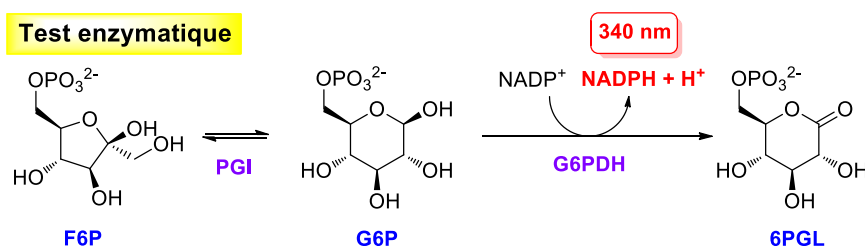


Schéma XII : Méthode de dosage enzymatique de la PGI.

Une deuxième méthode colorimétrique mesure cette activité à partir de G6P : le F6P formé est déshydraté et déphosphorylé dans l'acide chlorhydrique concentré (30 %) après chauffage à 80°C , puis le produit est dosé par réaction avec le résorcinol (Schéma XIII). La réaction de Séliwanoff permet la caractérisation des cétooses seulement. Ainsi, seul le 6-phosphate-D-fructose (F6P) va réagir et former un composé rouge.¹⁰⁶

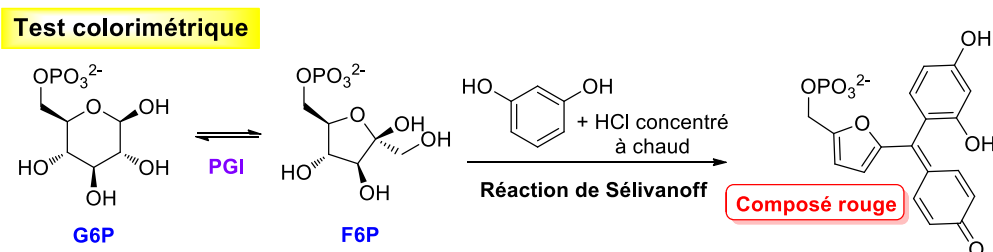


Schéma XIII : Méthode de dosage colorimétrique de la PGI.

La troisième méthode plus récente est de type immunohistochimique par l'utilisation d'un anticorps spécifique anti-AMF/PGI puis d'un anticorps anti-AcPGI couplé d'une sonde fluorescente. (Schéma XIV).^{66,75,76}

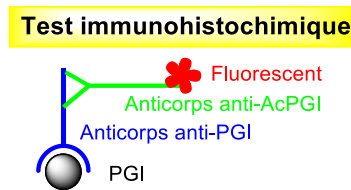


Schéma XIV : Méthode de dosage immunohistochimique de la PGI.

Développer un outil simple, rapide et efficace de détection de l'activité AMF/PGI dans le sang et les urines pour le diagnostic et le suivi de l'évolution des métastases après traitements chimiothérapiques est un projet d'actualité ambitieux.

À notre connaissance, un tel outil n'existe pas actuellement pour une analyse médicale systématique, sanguine ou urinaire. La mise au point et la généralisation d'un tel système analytique sont les objectifs premiers de ce projet de recherche et constitueraient une avancée scientifique majeure.

3.2. Présentation de la thèse

La méthode que nous proposons de développer est basée sur la **détection de l'AMF/PGI par l'utilisation d'un biocapteur d'affinité** dans lequel l'élément de reconnaissance spécifique est un substrat ou un inhibiteur de la cytokine. L'interaction entre la protéine et le substrat ou l'inhibiteur sera suivie par mesure électrochimique dans un tampon phosphate et dans du plasma humain.

La **première partie** de ce manuscrit (*Partie A – Conception et évaluation d'un biocapteur électrochimique pour la détection de l'AMF/PGI*) a été consacrée à la réalisation d'une preuve de concept nous assurant la faisabilité du projet. Cette partie débute par une présentation des biocapteurs électrochimiques, suivie de la stratégie qui a été utilisée et des mises au point nécessaires pour la construction du biocapteur. Elle se poursuit ensuite par une présentation des différentes étapes d'élaboration du biocapteur, puis ses performances en sensibilité et sélectivité sont évaluées. Pour finir, des études en cours sur l'élaboration d'un deuxième transducteur sont réalisées dans le but d'améliorer par la suite la sensibilité du biocapteur.

La **deuxième partie** de ce manuscrit (*Partie B – Études des interactions AMF/PGI–biocapteur par mécanique moléculaire polarisable*) porte sur l'étude de l'enzyme AMF/PGI par modélisation moléculaire *via* la méthode SIBFA. Cette méthode a fait ses preuves et permet d'obtenir des résultats aussi précis qu'avec la mécanique quantique. L'objectif est de reconstituer l'AMF/PGI de manière à pouvoir étudier la zone de reconnaissance avec le biocapteur élaboré. L'interaction protéine–biorécepteur pourra ainsi être mieux comprise et de nouveaux biorécepteurs pourront par la suite être envisagés, ainsi que de nouveaux inhibiteurs pour l'enzyme.

Enfin, le manuscrit sera terminé par une **conclusion générale** ainsi qu'une présentation des **perspectives** possibles à ce projet.

RÉFÉRENCES DE L'INTRODUCTION

- (1) INCa. *Cancers En Fr.* **2014**, *Les Données*.
- (2) HAS-INCa. *Guide ALD 2010, Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique* (Cancer du sein).
- (3) HAS-INCa. *Guide ALD 2010, Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique* (Cancer invasif du col utérin).
- (4) HAS-INCa. *Guide ALD 2008, Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique* (Cancer colorectal).
- (5) HAS-INCa. *Guide ALD 2008, Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique* (Mélanome cutané).
- (6) Société canadienne du cancer. 2008.
- (7) INCa. « *Situation de la radiothérapie en 2007* » **2008**, *chiffres clés issus des données de l'Observatoire de la radiothérapie 2006-2007*.
- (8) INCa. *Fiche SOR Savoir Patient 2008, "Comprendre la chimiothérapie"*.
- (9) Cours de cancérologie, Brion, J.-D. **2010**.
- (10) INCa. *Fiche SOR Savoir Patient 2006, "Comprendre le scanner"*.
- (11) INCa. *Fiche SOR Savoir Patient 2006, "Comprendre l'IRM"*.
- (12) HAS-INCa. September 2008.
- (13) Biomarkers Definitions Working Group. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2001**, 69 (3), 89–95.
- (14) Füzéry, A. K.; Levin, J.; Chan, M. M.; Chan, D. W. *Clin. Proteomics* **2013**, 10 (1), 13.
- (15) HAS-INCa. *Guide ALD 2008, Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique* (Cancer de la prostate).
- (16) Zeikus, J. G.; Savchenko, A.; Sriprapundh, D.; Vieille, C. *Recent Adv. Carbohydr. Bioeng.* **1999**, 246, 253–262.
- (17) Alberly, W. J.; Knowles, J. R. *Biochemistry* **1976**, 15 (25), 5631–5640.
- (18) Lohmann, K. *Biochem. Z.* **1933**, 262, 137–151.
- (19) Bueding, E.; MacKinnon, J. A. *J. Biol. Chem.* **1955**, 215, 507–513.
- (20) Hizukuri, S.; Takeda, Y.; Nikuni, Z. In *Methods in Enzymology*; W.A. Wood, Ed.; Carbohydrate Metabolism, Part B; Academic Press, 1975; Vol. Volume 41, pp 388–392.
- (21) Liemans, V.; Malaisse-Lagae, F.; Willem, R.; Malaisse, W. J. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1989**, 998 (2), 111–117.
- (22) Seeholzer, S. H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, 90 (4), 1237–1241.
- (23) Muirhead, H.; Shaw, P. J. *J. Mol. Biol.* **1974**, 89 (1), 195–203.
- (24) Shaw, P. J.; Muirhead, H. *FEBS Lett.* **1976**, 65 (1), 50–55.
- (25) Shaw, P. J.; Muirhead, H. *J. Mol. Biol.* **1977**, 109 (3), 475–485.
- (26) Achari, A.; Marshall, S. E.; Muirhead, H.; Palmieri, R. H.; Noltmann, E. A. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **1981**, 293 (1063), 145–157.
- (27) Srivastava, I. K.; Schmidt, M.; Grall, M.; Certa, U.; Garcia, A. M.; Perrin, L. H. *Mol. Biochem. Parasitol.* **1992**, 54 (2), 153–164.
- (28) Widmer, G.; Dvorak, J. A.; Miles, M. A. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1986**, 873 (1), 119–126.
- (29) Marchand, M.; Koostra, U.; Wierenga, R. K.; Lambeir, A.-M.; Van BEEUMEN, J.; Opperdoes, F. R.; Michels, P. A. M. *Eur. J. Biochem.* **1989**, 184 (2), 455–464.
- (30) Gracy, R. W.; Tilley, B. E. In *Methods in Enzymology*; W.A. Wood, Ed.; Carbohydrate Metabolism, Part B; Academic Press, 1975; Vol. Volume 41, pp 392–400.
- (31) Jeffery, C. J. *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24 (1), 8–11.
- (32) Gurney, M. E.; Heinrich, S. P.; Lee, M. R.; Yin, H. S. *Science* **1986**, 234 (4776), 566–574.
- (33) Xu, W.; Chiao, J. W. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **1996**, 26 (1), 21–30.
- (34) Watanabe, H.; Takehana, K.; Date, M.; Shinozaki, T.; Raz, A. *Cancer Res.* **1996**, 56 (13), 2960–2963.
- (35) Cao, M.-J.; Osatomi, K.; Matsuda, R.; Ohkubo, M.; Hara, K.; Ishihara, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 272 (2), 485–489.
- (36) Yakirevich, E.; Naot, Y. *Biol. Reprod.* **2000**, 62 (4), 1016–1023.
- (37) Liotta, L. A.; Mandler, R.; Murano, G.; Katz, D. A.; Gordon, R. K.; Chiang, P. K.; Schiffmann, E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**, 83 (10), 3302–3306.
- (38) Tanaka, N.; Haga, A.; Uemura, H.; Akiyama, H.; Funasaka, T.; Nagase, H.; Raz, A.; Nakamura, K. T. *J. Mol. Biol.* **2002**, 318 (4), 985–997.
- (39) Read, J.; Pearce, J.; Li, X.; Muirhead, H.; Chirgwin, J.; Davies, C. J. *Mol. Biol.* **2001**, 309 (2), 447–463.
- (40) Fothergill-Gilmore, L. A.; Michels, P. A. M. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1993**, 59 (2), 105–235.
- (41) Jeffery, C. J.; Bahnson, B. J.; Chien, W.; Ringe, D.; Petsko, G. A. *Biochemistry* **2000**, 39 (5), 955–964.
- (42) Sun, Y.-J.; Chou, C.-C.; Chen, W.-S.; Wu, R.-T.; Meng, M.; Hsiao, C.-D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, 96 (10), 5412–5417.
- (43) Concepcion, J. L.; Chataing, B.; Dubourdieu, M. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **1999**, 122 (2), 211–222.

- (44) Arsenieva, D.; Appavu, B. L.; Mazock, G. H.; Jeffery, C. J. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2009**, *74* (1), 72–80.
- (45) Cordeiro, A. T.; Godoi, P. H. C.; Silva, C. H. T. P.; Garratt, R. C.; Oliva, G.; Thiemann, O. H. *Biochim. Biochim.* **2003**, *1645*, 117–122.
- (46) Salas, M.; Vinuela, E.; Sols, A. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240* (2), 561–568.
- (47) Willem, R.; Biesemans, M.; Hallenga, K.; Lippens, G.; Malaisse-Lagae, F.; Malaisse, W. J. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (1), 210–217.
- (48) Rose, I. A.; O'Connell, E. L.; Schray, K. J. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248* (6), 2232–2234.
- (49) Lee, J. H.; Chang, K. Z.; Patel, V.; Jeffery, C. J. *Biochemistry* **2001**, *40* (26), 7799–7805.
- (50) Kim, J.; Dang, C. V. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30* (3), 142–150.
- (51) Amraei, M.; Nabi, I. R. *FEBS Lett.* **2002**, *525* (1–3), 151–155.
- (52) Bodansky, O. *Cancer* **7**, 1200–1226.
- (53) Baumann, M.; Kappl, A.; Lang, T.; Brand, K.; Siegfried, W.; Paterok, E. *Cancer Invest.* **1990**, *8* (3–4), 351–356.
- (54) Filella, X.; Molina, R.; Jo, J.; Mas, E.; Ballesta, A. M. *Tumor Biol.* **1991**, *12* (6), 360–367.
- (55) Guirguis, R.; Schiffmann, E.; Liu, B.; Birkbeck, D.; Engel, J.; Liotta, L. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1988**, *80* (15), 1203–1211.
- (56) Schwartz, M. K.; Greenberg, E.; Bodansky, O. *Cancer* **1963**, *16* (5), 583–594.
- (57) Chiu, C. G.; St-Pierre, P.; Nabi, I. R.; Wiseman, S. M. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2008**, *8* (2), 207–217.
- (58) Talukder, A. H.; Adam, L.; Raz, A.; Kumar, R. *Cancer Res.* **2000**, *60* (2), 474–480.
- (59) Jiang, W. G.; Raz, A.; Douglas-Jones, A.; Mansel, R. E. *J. Histochem. Cytochem.* **2006**, *54* (2), 231–241.
- (60) Baumann, M.; Brand, K. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 7018–7021.
- (61) Gong, W. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11* (16), 5778–5783.
- (62) Huang, Z.; Zhang, N.; Zha, L.; Mao, H.-C.; Chen, X.; Xiang, J.-F.; Zhang, H.; Wang, Z.-W. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15* (2), 989–997.
- (63) Paschos, K. A.; Canovas, D.; Bird, N. C. *Hippokratia* **2009**, *13* (1), 23–31.
- (64) Tsutsumi, S. *Int. J. Oncol.* **2009**, *35* (05).
- (65) Tsutsumi, S. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10* (22), 7775–7784.
- (66) Dobashi, Y.; Watanabe, H.; Matsubara, M.; Yanagawa, T.; Raz, A.; Shimamiya, T.; Ooi, A. *J. Pathol.* **2006**, *208* (1), 44–53.
- (67) Torimura, T. *Hepatology* **2001**, *34* (1), 62–71.
- (68) Bayo, J.; Fiore, E.; Aquino, J. B.; Malvicini, M.; Rizzo, M.; Peixoto, E.; Andriani, O.; Alaniz, L.; Piccioni, F.; Bolontrade, M.; Podhajcer, O.; Garcia, M. G.; Mazzolini, G. *PloS One* **2014**, *9* (4), e95171.
- (69) Patel, P. S.; Raval, G. N.; Rawal, R. M.; Patel, G. H.; Balar, D. B.; Shah, P. M.; Patel, D. D. *Neoplasma* **1995**, *42* (5), 271–274.
- (70) Takanami, I.; Takeuchi, K.; Naruke, M.; Kodaira, S.; Tanaka, F.; Watanabe, H.; Raz, A. *Tumor Biol.* **1998**, *19* (5), 384–389.
- (71) Funasaka, T.; Hu, H.; Yanagawa, T.; Hogan, V.; Raz, A. *Cancer Res.* **2007**, *67* (9), 4236–4243.
- (72) Niinaka, Y.; Paku, S.; Haga, A.; Watanabe, H.; Raz, A. *Cancer Res.* **1998**, *58* (12), 2667–2674.
- (73) Takeuchi, K.; Watanabe, H.; Takagishi, K. *J. Rheumatol.* **1998**, *25* (1), 9–15.
- (74) Suzuki, T.; Muraki, Y.; Yasukochi, T.; Zhang, H.; Kori, Y.; Wakamatsu, E.; Hayashi, T.; Goto, D.; Ito, S.; Tsutsumi, A.; Sumichika, H.; Sumida, T.; Matsumoto, I. *Autoimmun. Rev.* **2005**, *4* (7), 475–478.
- (75) Dai, L.; Zhu, L.-J.; Zheng, D.-H.; Mo, Y.-Q.; Wei, X.-N.; Su, J.-H.; Pessler, F.; Zhang, B.-Y. *J. Rheumatol.* **2010**, *37* (12), 2452–2461.
- (76) Fan, L. Y.; Zong, M.; Wang, Q.; Yang, L.; Sun, L. S.; Ye, Q.; Ding, Y. Y.; Ma, J. W. *Clin. Chim. Acta* **2010**, *411* (23–24), 2049–2053.
- (77) Nabi, I. R.; Raz, A. *Int. J. Cancer* **1987**, *40* (3), 396–402.
- (78) Nabi, I. R.; Raz, A. *Cancer Res.* **1988**, *48* (5), 1258–1264.
- (79) Nabi, I. R.; Watanabe, H.; Raz, A. *Cancer Res.* **1990**, *50* (2), 409–414.
- (80) Silletti, S.; Watanabe, H.; Hogan, V.; Nabi, I. R.; Raz, A. *Cancer Res.* **1991**, *51* (13), 3507–3511.
- (81) Shimizu, K.; Tani, M.; Watanabe, H.; Nagamachi, Y.; Niinaka, Y.; Shiroishi, T.; Ohwada, S.; Raz, A.; Yokota, J. *FEBS Lett.* **1999**, *456* (2), 295–300.
- (82) Haga, A.; Komazaki, S.; Funasaka, T.; Hashimoto, K.; Yokoyama, Y.; Watanabe, H.; Raz, A.; Nagase, H. *Leuk. Lymphoma* **2006**, *47* (10), 2234–2243.
- (83) Kojic, L. D.; Joshi, B.; Lajoie, P.; Le, P. U.; Cox, M. E.; Turbin, D. A.; Wiseman, S. M.; Nabi, I. R. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (40), 29305–29313.
- (84) Fairbank, M.; St-Pierre, P.; Nabi, I. R. *Mol. Biosyst.* **2009**, *5* (8), 793.
- (85) Haga, A.; Tanaka, N.; Funasaka, T.; Hashimoto, K.; Nakamura, K. T.; Watanabe, H.; Raz, A.; Nagase, H. *J. Mol. Biol.* **2006**, *358* (3), 741–753.
- (86) Tsutsumi, S.; Gupta, S. K.; Hogan, V.; Tanaka, N.; Nakamura, K. T.; Nabi, I. R.; Raz, A. *FEBS Lett.* **2003**, *534* (1–3), 49–53.
- (87) Rubartelli, A.; Cozzolino, F.; Talio, M.; Sitia, R. *EMBO J.* **1990**, *9* (5), 1503–1510.
- (88) Lagana, A.; Duchaine, T.; Raz, A.; DesGroseillers, L.; Nabi, I. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *273* (1), 213–218.

-
- (89) Haga, A.; Niinaka, Y.; Raz, A. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2000**, *1480* (1–2), 235–244.
- (90) Yanagawa, T.; Funasaka, T.; Tsutsumi, S.; Raz, T.; Tanaka, N.; Raz, A. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (11), 10419–10426.
- (91) Tsutsumi, S.; Yanagawa, T.; Shimura, T.; Fukumori, T.; Hogan, V.; Kuwano, H.; Raz, A. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (34), 32165–32172.
- (92) Funasaka, T.; Haga, A.; Raz, A.; Nagase, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285* (1), 118–128.
- (93) Funasaka, T.; Haga, A.; Raz, A.; Nagase, H. *Int. J. Cancer* **2002**, *101* (3), 217–223.
- (94) Tsutsumi, S.; Hogan, V.; Nabi, I. R.; Raz, A. *Cancer Res.* **2003**, *63* (1), 242–249.
- (95) Haga, A.; Funasaka, T.; Niinaka, Y.; Raz, A.; Nagase, H. *Int. J. Cancer* **2003**, *107* (5), 707–714.
- (96) Yanagawa, T. *Endocr. Relat. Cancer* **2004**, *11* (4), 749–759.
- (97) Stracke, M. L.; Guirguis, R.; Liotta, L. A.; Schiffmann, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *146* (1), 339–345.
- (98) Kohn, E. C.; Liotta, L. A.; Schiffmann, E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *166* (2), 757–764.
- (99) Guirguis, R.; Margulies, I.; Taraboletti, G.; Schiffmann, E.; Liotta, L. *Nature* **1987**, *329* (6136), 261–263.
- (100) Trikha, M.; Timar, J.; Lundy, S. K.; Szekeres, K.; Tang, K.; Grignon, D.; Porter, A. T.; Honn, K. V. *Cancer Res.* **1996**, *56* (21), 5071–5078.
- (101) Desvergnés, S.; Courtiol-Legourd, S.; Daher, R.; Dabrowski, M.; Salmon, L.; Therisod, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (4), 1511–1520.
- (102) Chirgwin, J. M.; Noltmann, E. A. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250* (18), 7272–7276.
- (103) Hardré, R.; Bonnette, C.; Salmon, L.; Gaudemer, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8* (23), 3435–3438.
- (104) Milewski, S.; Janiak, A.; Wojciechowski, M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2006**, *450* (1), 39–49.
- (105) Kojic, L. D.; Wiseman, S. M.; Ghaidi, F.; Joshi, B.; Nedev, H.; Saragovi, H. U.; Nabi, I. R. *PLoS ONE* **2008**, *3* (10), e3597.
- (106) Bodansky, O. *Cancer*. 1954, pp 1200–1226.

—

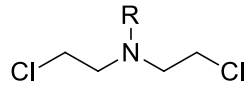
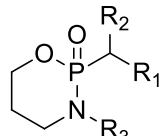
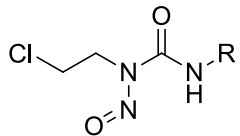
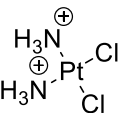
Annexes de l'introduction

Annexe 1 : Les agents cytotoxiques utilisés en chimiothérapie antitumorale.

Les agents cytotoxiques peuvent être regroupés en quatre familles : les *alkylants*, les *antimétabolites*, les *intercalants et inhibiteurs de Topoisomérases I et II* et les *antimitotiques*.

Alkylants

Les alkylants sont des inducteurs de liaisons covalentes de l'ADN. Ils vont donc perturber le fonctionnement de la cellule cancéreuse par interaction avec l'ADN tumoral. Ce sont des molécules de synthèse. Le tableau ci-dessous présente l'exemple de quatre pharmacophores alkylants largement utilisés par le passé en chimiothérapie antitumorale.

Moutardes à l'azote	Oxazaphosphorines	Nitrosourées	Complexes du platine
			

Antimétabolites

Les antimétabolites interfèrent avec la synthèse des acides nucléiques. Ce sont des molécules de synthèse qui agissent :

- ❖ soit par **inhibition de la biosynthèse des nucléotides** (provoquant le blocage de la synthèse de l'ADN qui entraîne la mort cellulaire) ;
- ❖ soit par **incorporation dans les acides nucléiques d'analogues de bases puriques ou pyrimidiques** (incorporation → cytotoxicité → mort cellulaire).

Ils sont divisés en quatre groupes : les antipurines, les antipyrimidines, les antifoliques, et les inhibiteurs de la ribonucléotide réductase.

Intercalants et inhibiteurs de Topoisomérases I et II

Les intercalants et inhibiteurs de Topoisomérases I et II sont des inducteurs ou stabilisateurs de coupures de l'ADN. Ils vont perturber le fonctionnement de la cellule cancéreuse en interférant avec les systèmes enzymatiques impliqués dans la réplication et la transcription. Ce sont des molécules naturelles et d'hémisynthèse. Il existe deux classes d'inhibiteurs :

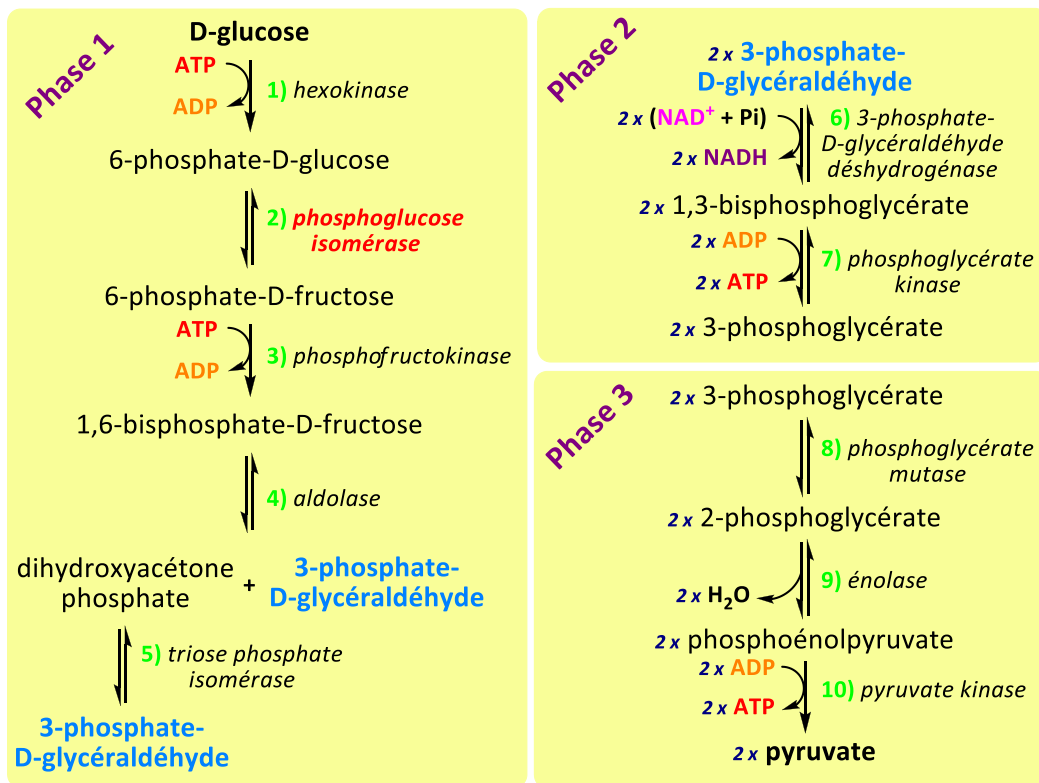
- ❖ **les inhibiteurs de Topoisomérase I (enzyme coupant un seul brin d'ADN)** avec les analogues de la camptothécine : l'irinotécan et le topotécan ;
- ❖ **les inhibiteurs de Topoisomérase II (enzyme coupant les deux brins d'ADN)** avec les intercalants (les anthracyclines avec par exemple la doxorubicine) et les non intercalants (par exemple l'étoposide).

Antimitotiques

Les poisons du fuseau (appelés aussi antimitotiques) interfèrent avec la tubuline et les microtubules. Ils vont donc également perturber le fonctionnement de la cellule cancéreuse en interférant avec les systèmes enzymatiques impliqués dans la réplication et la transcription. Ce sont des molécules naturelles et d'hémisynthèse. Deux modes d'action existent :

- ❖ inhibition de la polymérisation de tubuline en microtubules avec les alcaloïdes bis-indoliques (vinblastine, vincristine, et deux analogues non naturels) ;
- ❖ exaltation de la polymérisation et inhibition de la dépolymérisation des microtubules en tubuline avec les taxoïdes (paclitaxel –chef de file– et docétaxel –analogue non naturel–).

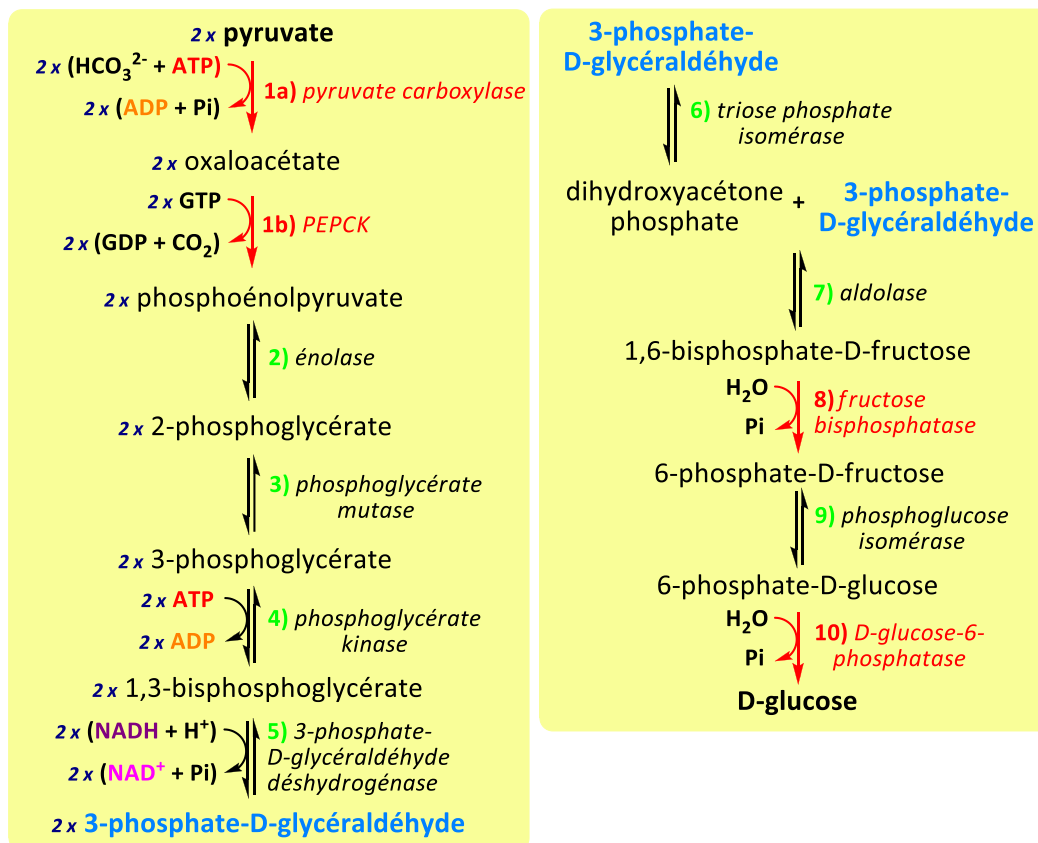
Annexe 2 : La glycolyse.



La séquence peut être logiquement divisée en trois phases :

- **(1)** dans les réactions **1** à **5**, le D-glucose est transformé en aldéhyde à trois carbones, le 3-phosphate-D-glycéraldéhyde (G3P) – conversion qui nécessite un investissement en énergie sous forme d'ATP ;
- **(2)** dans les réactions **6** et **7**, le groupement aldéhyde du G3P est oxydé en un groupement carboxyle et l'énergie libérée par cette réaction est couplée à la création d'une nouvelle liaison phosphate riche en énergie ;
- **(3)** dans les réactions **8**, **9** et **10**, l'investissement en ATP effectué dans les quatre premières réactions est remboursé.

Annexe 3 : La néoglucogénèse.



Pour faire du glucose à partir du pyruvate, **trois étapes différent de la glycolyse** (signalées en rouge sur le schéma) **et peuvent exister grâce à un apport d'énergie chimique** :

- la transformation du pyruvate en oxaloacétate par la **pyruvate carboxylase** (étape **1a**) puis la décarboxylation de celui-ci par la **phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK)** (étape **1b**) pour former le phosphoénol pyruvate ;
- la déphosphorylation du 1,6-bisphosphate-D-fructose par la **fructose bisphosphatase** et non la phosphofructokinase (étape **8**) ;
- la déphosphorylation du G6P par la **D-glucose-6-phosphatase** et non l'hexokinase pour aboutir au d-glucose (étape **10**).

Ces trois réactions doivent être étroitement contrôlées de sorte que le glucose ne soit dégradé qu'en cas de besoin en énergie, et synthétisé seulement quand la cellule est en manque d'un point de vue nutritionnel.

PARTIE A

Conception et évaluation d'un biocapteur électrochimique pour la détection de l'AMF/PGI

La partie A est divisée en quatre chapitres. Le premier chapitre est une introduction présentant les biocapteurs électrochimiques, leurs différents composants ainsi que les techniques existant pour leurs élaborations. Sera également présenté un aperçu du principe des techniques électrochimiques utilisées au cours de ce travail de thèse avec la méthode d'interprétation des résultats obtenus pour chacune d'entre elles. Le deuxième chapitre décrit le choix des différents éléments composant le biocapteur pour la détection de l'AMF/PGI, leurs rôles et la stratégie de construction employée. Le troisième chapitre présente l'élaboration du biocapteur, où chaque étape de construction est analysée, ainsi que l'évaluation de ses performances, comme la limite de détection et la spécificité. Les performances du biocapteur sont évaluées dans un tampon phosphate et dans du plasma humain. Dans le quatrième chapitre, la perspective d'élaborer un biocapteur plus sensible est abordée. Pour cela un deuxième transducteur avec des propriétés architecturales différentes a été construit et étudié.

SOMMAIRE DÉTAILLÉ

Chapitre 1. Introduction sur les biocapteurs électrochimiques	53
1.1. Généralités	53
1.1.1. Historique	53
1.1.2. Définition	54
1.2. Transducteurs	55
1.2.1. Polymères organiques conducteurs	55
1.2.2. Graphène et nanotubes de carbone	55
1.2.3. Nanoparticules métalliques	56
1.2.4. Monocouches auto-assemblées	57
1.3. Techniques d'immobilisation du biorécepteur	57
1.3.1. Adsorption	58
1.3.2. Inclusion	58
1.3.3. Réticulation	58
1.3.4. Couplage covalent	58
1.4. Performances d'un biocapteur	59
1.4.1. Limite de détection et sensibilité	59
1.4.2. Sélectivité	60
1.4.3. Reproductibilité	60
1.5. Biorécepteurs	60
1.5.1. Présentation générale des biorécepteurs	60
1.5.2. Biocapteurs d'ADN	61
1.5.3. Biocapteurs à base d'aptamères	62
1.5.4. Immunocapteurs	64
1.5.5. Biocapteur à base de sucres	66
1.6. Sondes redox	67
1.6.1. Sonde redox associée au transducteur	67
1.6.2. Sonde redox libre	67
1.7. Méthodes électrochimiques utilisées	68
1.7.1. Voltampérométrie cyclique et à vague carrée	68
1.7.2. Spectroscopie d'impédance	69
 Chapitre 2. Détermination des composants du biocapteur	 73
2.1. Élaboration du transducteur	73
2.1.1. Nettoyage de la surface d'or (étape 0)	73
2.1.2. Fonctionnalisation de la surface d'or (étape 1)	76
2.1.3. Conclusion	81
2.2. Élaboration de la zone de reconnaissance	82
2.2.1. Choix du biorécepteur	82
2.2.2. Choix du mode de liaison du biorécepteur	84
2.2.3. Mise en place de l'espaceur oxyamine	87
2.3. Bilan : stratégie choisie pour la construction	89
2.3.1. Schéma général de construction du biocapteur	89
2.3.2. Mise en évidence de l'intérêt du polyéthylène glycol de l'étape 3	90
2.3.3. Optimisation de l'étape 4 de déprotection	91
2.3.4. Choix des molécules de blocage des étapes 6 et 7	92

Chapitre 3. Élaboration et évaluation des performances du biocapteur	95
3.1. Élaboration du biocapteur pour la détection de l'AMF/PGI	95
3.1.1. Construction étape par étape.....	95
3.1.2. Confirmation des modifications de surface.....	98
3.1.3. Études des stabilités de surface	102
3.2. Performances du biocapteur élaboré	104
3.2.1. Limite de détection et sensibilité	104
3.2.2. Sélectivité	107
3.2.3. Analyses dans le plasma humain	109
3.3. Bilan : preuve de concept validée	113
 Chapitre 4. Perspective d'un nouveau transducteur	 115
4.1. Association des NTC sur la surface de l'électrode d'or	115
4.1.1. Stratégies pour la dispersion	116
4.1.2. Synthèse et caractérisation des NTC-COOH	116
4.1.3. Préparation et caractérisation de la surface Au + NTC-COOH.....	117
4.2. Présentation du viologène	118
4.2.1. Synthèse du viologène diCOOH diPF ₆	118
4.2.2. Études électrochimiques en solution	119
4.3. Construction du transducteur	120
4.3.1. Schéma général de construction du transducteur	120
4.3.2. Analyses de surface	121
4.3.3. Expérience de contrôle	123
4.3.4. Comportement redox du transducteur élaboré	124
4.4. Bilan : nouveau transducteur prêt à l'emploi	124

Chapitre 1. Introduction sur les biocapteurs électrochimiques

Les besoins en détection de molécules très diverses, d'origine biologique ou non, sont voués à croître considérablement dans les années à venir, sous la double impulsion de la réglementation et du marketing. Actuellement, seuls les laboratoires d'analyse peuvent répondre à cette demande mais les méthodes d'analyses classiques utilisées ont recours à des instruments complexes, coûteux, volumineux et requérant un savoir-faire pointu. De plus, les phases de préparation des échantillons, d'incubation et d'exploitation des résultats augmentent la durée totale d'analyse.

1.1. Généralités

Depuis une trentaine d'années, on assiste à l'avènement des capteurs biochimiques appelés plus couramment biocapteurs (Figure I). Il s'agit de dispositifs souvent simples et compacts transformant le signal (bio)chimique en un signal facilement exploitable. Les biocapteurs ont de **nombreuses applications** potentielles dans des domaines divers et variés tels que la *biologie*, la *biochimie*, la *médecine* (diagnostic médical),¹ l'*agroalimentaire* (évaluation de la qualité des produits alimentaires)^{2,3} et l'*environnement* (contrôle de la qualité de l'air et détection de polluants organiques dans l'eau).^{4,5} L'intérêt considérable suscité par les biocapteurs auprès des chercheurs a permis d'arriver aujourd'hui à des **dispositifs simples, miniaturisés et interfaçables** à l'électronique moderne permettant des **analyses fiables, rapides et peu coûteuses**.

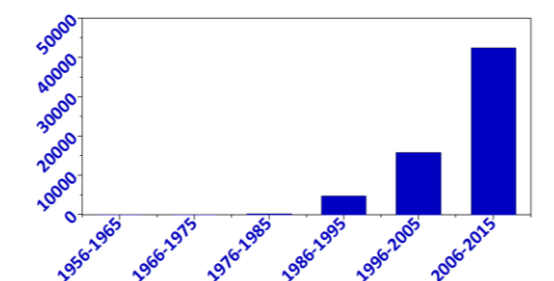


Figure I : Nombre de travaux concernant les biocapteurs à partir de 1956.

1.1.1. Historique

Le premier dispositif reconnu aujourd'hui comme biocapteur a été l'œuvre de Leland Clark en 1956 dans le but de mesurer la concentration en oxygène dissous dans le sang.⁶ En 1962, ce même biocapteur est adapté afin de quantifier le taux de glucose dans le sang.⁷ Il était constitué de l'enzyme glucose oxydase (GOx) piégée à la surface d'une électrode de platine par une membrane à dialyse en polyéthylène permettant la diffusion des substrats et des produits de la couche enzymatique. Le premier biocapteur potentiométrique pour la détection de l'urée est décrit en 1969 par Guilbault et Montalvo.⁸

1.1.2. Définition

Un biocapteur est un outil analytique qui convertit une réponse biologique en un signal mesurable, traitable et quantifiable.⁹ Le Schéma I présente les différents constituants d'un biocapteur.

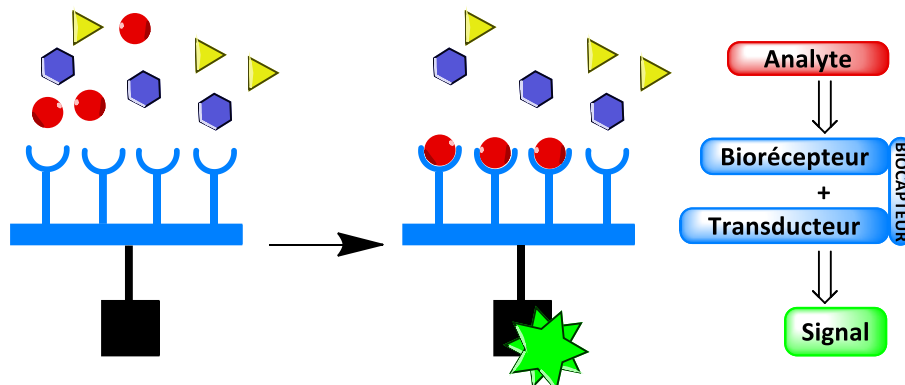


Schéma I : Présentation schématique d'un biocapteur.

Le **biorécepteur**, élément biologique qui peut être par exemple un *anticorps*, un *aptamère*, de l'*ADN*, une *enzyme*, un *récepteur* ou une *cellule*, se lie sélectivement à la molécule cible à détecter (l'**analyte**). Celle-ci se trouve dans un échantillon sous forme pure ou dans un milieu plus complexe (culture cellulaire, sang, urines, aliments...).

Cette réaction de reconnaissance se produit au niveau d'une architecture interfaciale (*électrode seule* ou *électrode + polymères*, *électrode + nanotubes de carbone*, *électrode + nanoparticules métalliques...*) appelée un **transducteur**, sur lequel le biorécepteur est lié *via* l'utilisation d'une ou plusieurs autres molécules qualifiée(s) d'espaceur.

Ce transducteur génère un **signal** qui est amplifié et converti en un signal de sortie interprétable. La modification du signal du système avant et après la reconnaissance biologique est directement dépendante de la concentration détectée d'analyte en solution. Typiquement ce signal peut être *électrochimique*,¹⁰ *optique*,¹¹ *piézoélectrique*,¹² *spectrophotométrique*¹³ ou encore *calorimétrique*¹⁴ (Tableau I).

Tableau I : Principaux modes de détection appliqués dans l'élaboration de biocapteurs.

Biocapteurs	Sensibles aux variations :
Electrochimique	de courant (ampérométrie), de potentiel (potentiométrie), de conductivité (conductimétrie), d'impédance
Optique	d'absorbance, de chimiluminescence, de fluorescence, de la résonance plasmonique de surface, de l'onde évanescente
Piézoélectrique	de masse
Calorimétrique	de température

Dans ce manuscrit, en relation avec le travail de thèse présenté, nous nous focaliserons sur les biocapteurs électrochimiques.

1.2. Transducteurs

Le matériel de base permettant le transfert de charges est l'électrode (par exemple d'or ou de carbone vitreux). À l'électrode peut venir s'ajouter des matériaux qui améliorent le transfert de charges et/ou conférant des propriétés particulières à la surface (augmentation de la surface active par une structuration tridimensionnelle...). Les matériaux communément rapportés dans la littérature pour les processus de transduction sont : les *polymères organiques conducteurs* (POC),¹⁵⁻¹⁸ les *nanotubes de carbone* (NTC),^{19,20} le *graphène*,^{21,22} les *nanoparticules métalliques* (nanoparticules d'or)²³ et les *monocouches auto-assemblées*.²⁴

1.2.1. Polymères organiques conducteurs

Les polymères conducteurs, également connus sous le nom de polymères électroactifs, possèdent une conductivité électrique significative, ce qui a suscité de nombreux travaux de recherche ces dernières années, visant à développer de nouveaux matériaux polymériques. Les polymères conducteurs les plus décrits dans la littérature sont le *polypyrrole*,^{15,16} le *polythiophène*¹⁷ et la *polyaniline*.¹⁸ Leurs structures sont présentées sur le Schéma II.

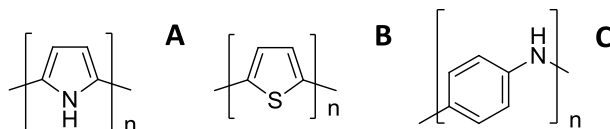


Schéma II : Structures des polymères conducteurs les plus courants : (A) polypyrrole, (B) polythiophène et (C) polyaniline.

1.2.2. Graphène et nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone (NTC) sont des feuillets de graphène constitués uniquement de carbone enroulés autour d'un cylindre, chaque extrémité étant fermée par une demi-sphère. Ces tubes sont de l'ordre du nanomètre. Ils sont cent fois plus résistants et six fois moins denses que l'acier. Leur diamètre est compris entre 1 et 60 nm. Il existe deux types de nanotubes : les nanotubes monofeuillets (SWCNT pour *single-walled carbon nanotubes*) et les nanotubes multifeuillets (MWCNT pour *multi-walled carbon nanotubes*) (Figure II).

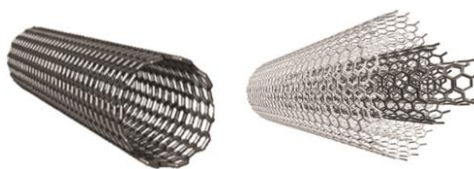


Figure II : Structure de nanotubes de carbone monofeuillet à gauche et multifeuillet à droite.

Les nanotubes de carbone ont des propriétés mécaniques intéressantes car ils sont à la fois extrêmement rigides et légers. Ils ont un comportement électrique conducteur ou semi-conducteur qui dépend du paramètre d'hélicité. La distance inter-parois des NTC multifeuillets est comprise entre 0,34 et 0,5 nm environ. Ces derniers temps, les transducteurs à base de graphène^{21,22} deviennent de plus en plus populaires, ainsi que les transducteurs à base de nanotubes de carbone.^{19,20}

1.2.3. Nanoparticules métalliques

Parmi les nanomatériaux, les nanoparticules d'or sont historiquement celles qui ont initié l'essor des nanotechnologies. La réactivité des nanoparticules d'or et leurs propriétés d'adsorption de molécules sont directement liées à la surface des nanoparticules et en particulier aux différentes configurations possibles des atomes de surface d'une nanoparticule.

L'intérêt pour les nanoparticules d'or reste encore vif aujourd'hui et suscite une grande partie des travaux notamment pour des applications biologiques. Leurs possibilités d'applications sont non seulement liées aux propriétés intrinsèques de leur cœur métallique mais aussi et surtout à leurs énormes capacités de fonctionnalisation en surface par greffage de molécules soufrées.^{25,26} Elles sont également biocompatibles et non cytotoxiques. Les nanoparticules d'or sont utilisées pour l'imagerie (Figure III) et pour le diagnostic.²⁷

Grâce à la facilité relative avec laquelle elles peuvent être préparées et manipulées, leur réactivité généralement élevée, leur surface développée et la nature de leurs propriétés optiques, électroniques, magnétiques,²⁸ les nanoparticules d'or sont actuellement employées dans les domaines de l'électronique, de la biomédecine, de la pharmacie, des produits de beauté, de l'analyse environnementale, de la catalyse et de la science des matériaux, et d'une manière intensive dans le domaine des biocapteurs.

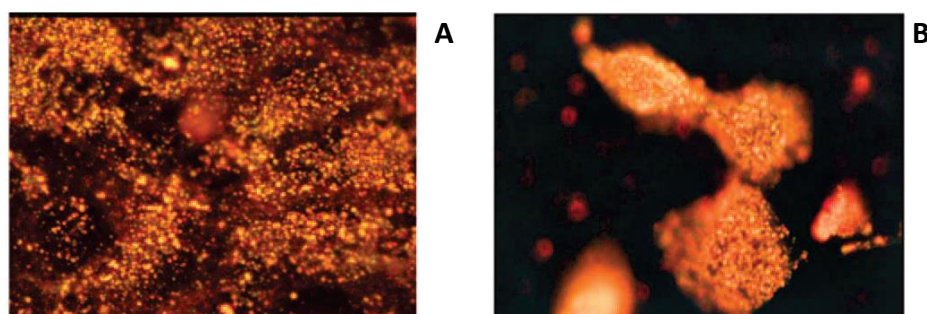


Figure III : Images de microscopie de nanoparticules d'or conjuguées à un anti-EGFR.²⁷ Le récepteur à l'EGF (EGFR) est une protéine transmembranaire surexprimée par les cellules cancéreuses. (A) dans des cellules saines, les nanoparticules d'or sont dispersées au hasard sans liaison spécifique. (B) dans des cellules cancéreuses, les nanoparticules d'or sont liées spécifiquement à leur surface.

1.2.4. Monocouches auto-assemblées

Par définition une monocouche auto-assemblée (SAM : *Self-Assembled Monolayer*) correspond à un édifice moléculaire formé à partir d'entités organiques greffées sur une surface. Elle est qualifiée d'auto-assemblée car le dérivé organique s'adsorbe et s'organise spontanément sur le substrat. Pour cela, les précurseurs de SAM doivent posséder différents groupements ; chacun assurant un rôle au sein de la monocouche (Schéma III).

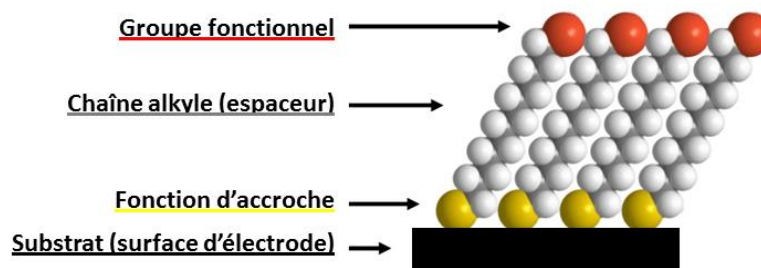


Schéma III : Schéma d'une monocouche auto-assemblée.

- **La fonction d'accroche** : c'est la fonction chimique permettant l'adsorption de la molécule organique sur l'électrode (thiol, disulfure, dialkylsulfure, dithiol, acide thioctique,...).
- **L'espaceur** : il est généralement constitué d'une chaîne alkyle d'une dizaine de carbones permettant l'organisation par des interactions de Van der Waals.
- **Le groupement fonctionnel** : c'est l'entité qui détermine les propriétés physico-chimiques de la couche. La stratégie de synthèse des précurseurs de la monocouche permet une grande variabilité des groupements fonctionnels modulant les propriétés physiques et chimiques de la surface.

1.3. Techniques d'immobilisation du biorécepteur

Différentes méthodes sont décrites dans la littérature pour attacher les biomolécules à la surface du transducteur. Les quatre méthodes principalement utilisées sont l'*adsorption*, l'*inclusion*, la *réticulation* et le *couplage covalent*. Elles sont présentées sur la Figure IV.

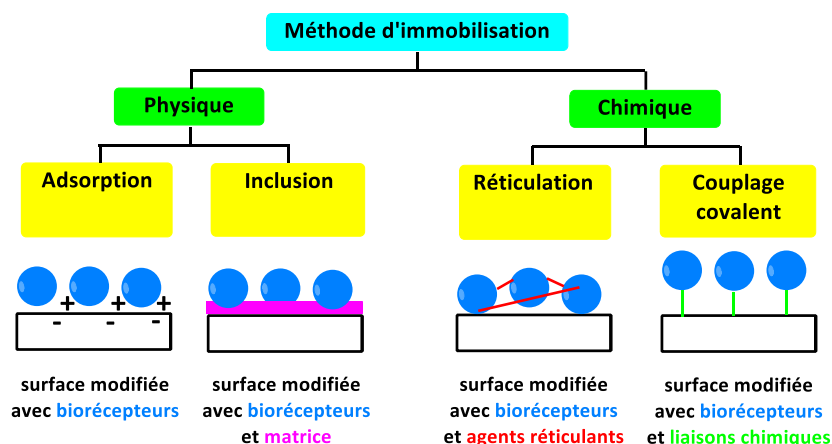


Figure IV : Représentation schématique des différentes méthodes d'immobilisation du biorécepteur.

1.3.1. Adsorption

L'adsorption repose sur la capacité de certains corps minéraux ou organiques à fixer une molécule donnée à leur surface. L'immobilisation est alors due à des interactions faibles de type Van der Waals, liaisons hydrogène, liaisons ioniques ou encore interactions homophiles (hydrophobes et/ou hydrophiles). C'est une méthode **simple**, **réversible** et **économique** mais qui présente le fort inconvénient d'être **peu stable**.

1.3.2. Inclusion

La méthode d'inclusion consiste à incorporer le biorécepteur dans un gel insoluble. Ce gel peut être constitué d'une matrice organique (polymères) ou inorganique (gels de silice). La matrice doit permettre la diffusion uniquement des petites molécules afin que les biorécepteurs ne puissent pas s'en échapper. Les avantages de cette technique sont qu'elle est **facile** à mettre en œuvre et **économique**, mais elle est **difficilement applicable** avec un certains nombres de biorécepteurs.

1.3.3. Réticulation

La réticulation repose sur l'utilisation d'agents dits réticulants qui vont permettre de lier les biorécepteurs entre eux par des liaisons chimiques, soit de manière directe, soit avec l'aide d'une protéine inerte qui facilite la réticulation, on parle alors de co-réticulation. Cette méthode d'immobilisation présente l'avantage d'être assez **simple** à mettre en œuvre et offre une **bonne stabilité** au système de par les liaisons chimiques.

1.3.4. Couplage covalent

Le couplage covalent de molécules biologiques sur un transducteur nécessite la présence d'un groupement fonctionnel à la fois sur la biomolécule et sur la surface du transducteur, ce qui demande une fonctionnalisation préalable. En général, les groupements fonctionnels présents à la surface sont des fonctions carboxyliques, des thiols, des alcools ou encore des amines. Ces groupements sont très peu réactifs et doivent de ce fait être activés afin de pouvoir réagir avec le biorécepteur. La liaison du biorécepteur à la surface par une fonction chimique n'intervenant pas dans la reconnaissance moléculaire avec l'analyte que l'on souhaite doser est un paramètre important à prendre en compte. Cette ligation doit par ailleurs se dérouler dans des conditions dites douces afin de ne pas dénaturer la biomolécule. Cette méthode d'immobilisation présente principalement comme avantage de fixer le biorécepteur de façon permanente et **augmente la stabilité** du système.

1.4. Performances d'un biocapteur

Les propriétés les plus importantes d'un biocapteur sont : 1) qu'il détecte la plus faible concentration possible en analyte, 2) qu'il soit spécifique de l'analyte et 3) qu'il soit reproductible.

1.4.1. Limite de détection et sensibilité

Les qualités essentielles conditionnant la performance d'un capteur sont : la gamme dynamique de détection, la limite de détection ainsi que la sensibilité (Schéma IV).

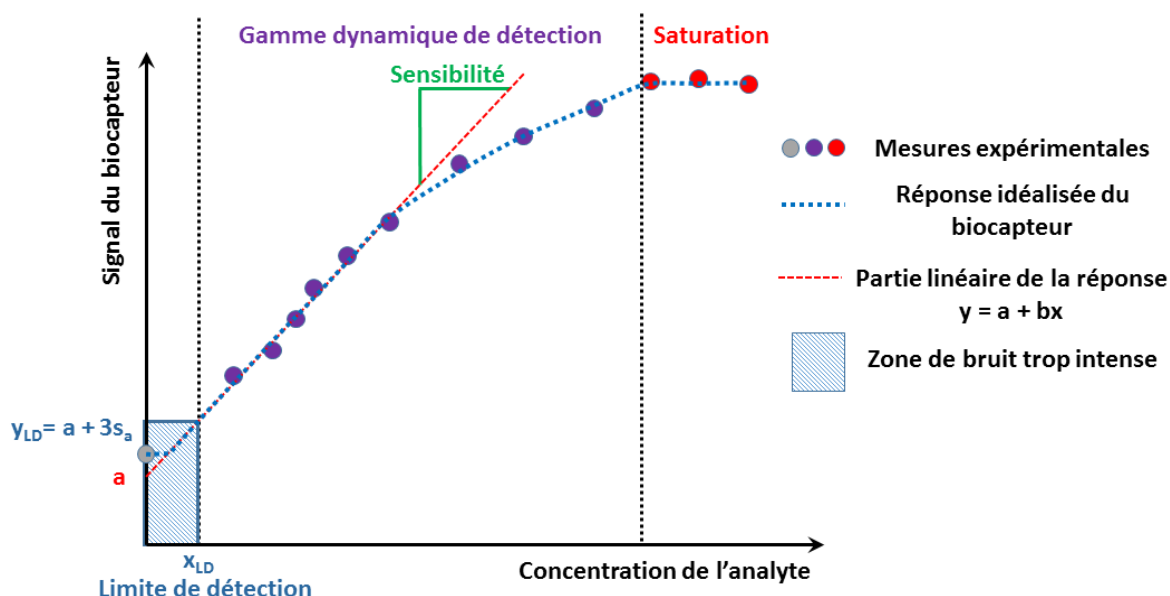


Schéma IV : Courbe de calibration type présentant les paramètres principaux qui caractérisent un biocapteur.

La **gamme dynamique** représente l'ensemble des concentrations d'analyte où une variation du signal électrochimique est observée. Ce domaine est aussi caractérisé par une partie linéaire. La pente de la courbe au niveau de la partie linéaire correspond à la **sensibilité** du biocapteur.

La **limite de détection (LD)** est la plus petite concentration ou teneur de l'analyte pouvant être détectée (donc que l'on peut distinguer du blanc), avec une incertitude acceptable, mais non quantifiée dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. Cette limite peut être calculée selon différentes méthodes décrites en technique analytique.²⁹ La plus courante utilise la droite d'étalonnage $y = a + bx$. Dans ce cas, la limite de détection x_{LD} est donnée par l'équation ci-dessous où s_a est l'écart-type du blanc. Cet écart-type prend en compte plusieurs mesures effectuées sur le biocapteur seul (avant de commencer la détection).

$$y_{LD} = a + 3s_a \quad x_{LD} = \frac{a + 3s_a}{b}$$

1.4.2. Sélectivité

La sélectivité du biocapteur correspond à la capacité de celui-ci à ne mesurer qu'une seule espèce dans le milieu où il est utilisé ou, en d'autres termes, d'être le plus insensible aux autres grandeurs d'influence, grandeurs qui ne font pas l'objet de la mesure.

1.4.3. Reproductibilité

Ce paramètre est probablement le plus important, pour tous les capteurs, physiques, chimiques et biologiques. C'est l'aptitude d'un capteur à donner, dans des conditions définies, des réponses très voisines en présence d'une même concentration d'analyte.

1.5. Biorécepteurs

1.5.1. Présentation générale des biorécepteurs

L'utilisation d'un composé biologique en tant que biorécepteur permet d'apporter au biocapteur une grande spécificité. Les biomolécules les plus souvent employées sont les enzymes et les anticorps. Mais les cellules entières, les organites cellulaires, les acides nucléiques, les antigènes peuvent aussi être utilisés. **Il est en fait possible d'utiliser toute molécule biologique permettant l'analyse spécifique de l'analyte recherché.**

Les composés biologiques fixés peuvent être séparés en deux catégories (Schéma V) : ceux ayant une *activité catalytique* et ceux fixant l'analyte par *interaction affine*.

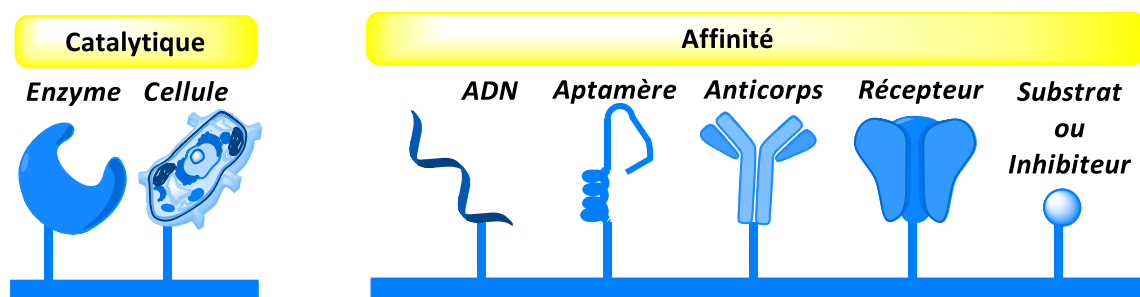


Schéma V : Représentation schématique de quelques biorécepteurs.

L'étape de reconnaissance peut donc révéler soit un événement dynamique, soit un événement statique. La reconnaissance dynamique est principalement employée pour les biocapteurs enzymatiques, où une réaction va avoir lieu en plus de l'étape de reconnaissance. La reconnaissance statique est surtout utilisée pour les biocapteurs étudiant la réaction d'hybridation de l'ADN et la formation d'un complexe antigène–anticorps.

Dans le domaine de la détection électrochimique de biomarqueurs de cancers, les biocapteurs sont majoritairement élaborés à partir de biorécepteurs qui interagissent par affinité avec le biomarqueur à doser. En effet, des exemples de *biocapteurs d'ADN*, *d'aptamères*, *d'immunocapteurs* et de *biocapteurs à base de sucres* ont été développés dans la littérature. Certains seront détaillés par la suite.

Par contre, à ma connaissance, aucun biocapteur à base de *récepteurs membranaires* (qui lient de manière spécifique des substances telles que les neurotransmetteurs ou les hormones) n'a été décrit dans cet objectif.

1.5.2. Biocapteurs d'ADN

1.5.2.1. Principe

Le principe des biocapteurs basés sur l'hybridation de l'ADN repose généralement sur la reconnaissance par hybridation entre des oligonucléotides (ODN) sondes à simple brin immobilisés sur des surfaces, et des séquences complémentaires cibles en solution. La formation du double brin entre la sonde immobilisée à la surface et son brin complémentaire cible est traduite par un signal mesurable.

L'hybridation de l'ADN est basée sur la reconnaissance de la paire de bases dite « Watson-Crick ». Les deux molécules d'ADN interagissent ensemble par des liaisons de faible énergie (liaisons hydrogène) qui s'établissent entre leurs bases azotées complémentaires (Adénine–Thymine et Guanine–Cytosine) pour former un dimère (Figure V).

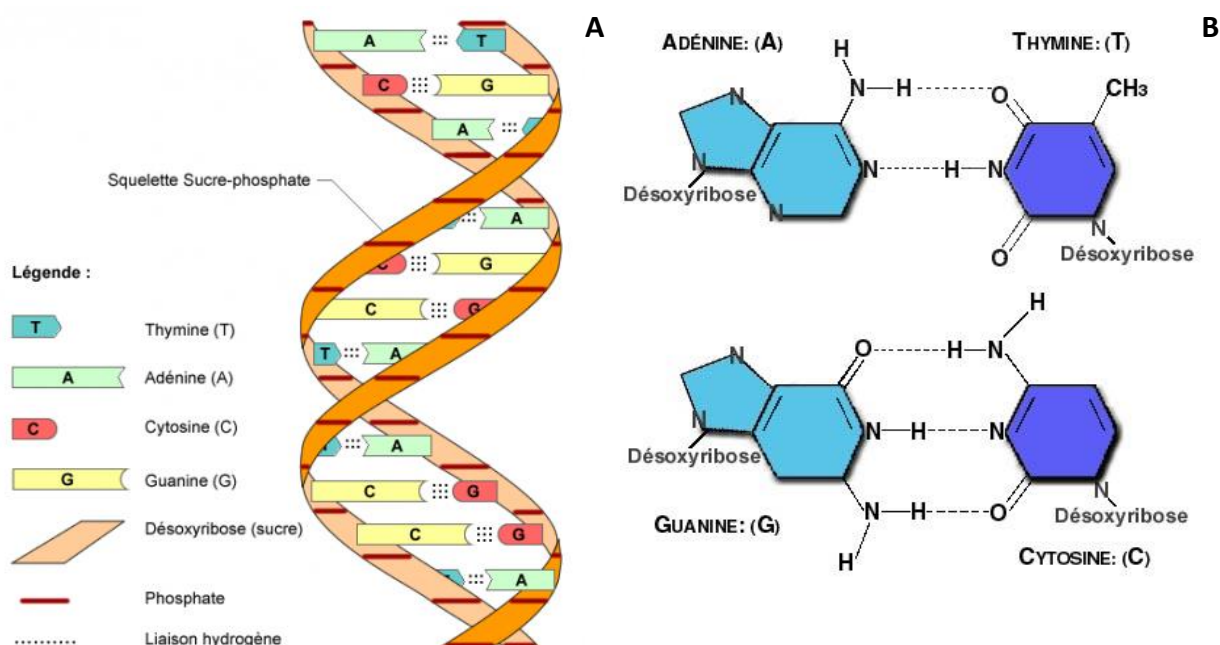


Figure V : (A) Double-brin d'ADN. (B) Structures des quatre bases azotées.

L'interaction très spécifique entre ces bases assure une procédure de reconnaissance très spécifique entre l'ODN sonde et l'ADN cible.

La détection d'un fragment d'ADN par hybridation a gagné beaucoup d'importance ces dernières années et notamment, pour ce qui nous intéresse, dans la détection de certains marqueurs de maladies héréditaires,³⁰ et de biomarqueurs de cancers. Quelques exemples récents de ces derniers sont présentés ci-après.

1.5.2.2. Exemples de détections de biomarqueurs de cancers du sein

Le développement de deux biocapteurs électrochimiques d'ADN pour la détection de biomarqueurs de cancer du sein sera mis en avant dans ce paragraphe.³⁰⁻³¹

Le premier biocapteur présenté permet la détection du **gène BRCA1**, impliqué dans le cancer du sein.³²⁻³⁴ L'équipe de Wang a développé un biocapteur possédant comme biorécepteur un ODN sonde de séquence spécifique pour BRCA1.³⁵ Cet ODN est thiolé à son extrémité 3' ce qui permet son immobilisation sur le transducteur composé de nanoparticules d'or déposés sur électrode de carbone. La surface est bloquée par de l'albumine de sérum bovin pour éviter les interactions non spécifiques. Une gamme allant **de 50 fM à 1 nM** de BRCA1 a été réalisée et l'hybridation a été suivie par spectroscopie d'impédance. La **limite de détection** calculée est de **1,72 fM**. La sélectivité a été vérifiée en mettant en présence le biocapteur avec différentes séquences d'ADN non complémentaires.

Le deuxième exemple permet la détection d'un micro-ARN. Les micro-ARN (ou miARN) sont de courts acides ribonucléiques (ARN) simple-brin propres aux cellules eucaryotes très utilisés dans le développement de biocapteurs pour le diagnostic de cancers.^{36,37} Plus particulièrement, le **miRNA-21** est impliqué dans le cancer du sein et est un biomarqueur potentiel pour son diagnostic précoce.³⁸⁻⁴⁰ L'équipe de Keshavarz a développé un biocapteur possédant comme biorécepteur un ODN sonde de séquence spécifique pour miRNA-21.³¹ Le biocapteur est composé d'une électrode de carbone sur laquelle sont déposés des nanotubes de carbone modifiés par des groupements –COOH. La séquence d'ODN complémentaire au marqueur est immobilisée sur le transducteur par une liaison amide créée au niveau de son extrémité 3'. Une gamme allant **de 0,1 pM à 500 nM** de miRNA-21 a été réalisée et l'hybridation a été suivie par voltampérométrie cyclique et par spectroscopie d'impédance. La **limite de détection** calculée est de **84,3 fM**. La sélectivité a été vérifiée en mettant en présence le biocapteur avec le miRNA-192.

1.5.3. Biocapteurs à base d'aptamères

1.5.3.1. Principe

Les aptamères sont des oligonucléotides (molécules d'ADN, simple ou double brin, et ARN) qui peuvent se lier avec de grandes affinité et spécificité à de nombreuses molécules cibles comme des protéines, des peptides ou des vitamines. Les aptamères sont de taille intermédiaire (environ 8 à 15 kDa), entre les petits peptides (environ 1 kDa) et les fragments d'anticorps simple chaîne (environ 25 kDa).

Il existe de multiples exemples d'applications de ces biorécepteurs, dont plusieurs sont étudiés au laboratoire, mais également dans le domaine de la détection de biomarqueurs cancéreux. Des exemples seront présentés ci-après.

1.5.3.2. Exemples développés au laboratoire

J'ai choisi de présenter le développement de trois biocapteurs électrochimiques à base d'aptamères élaborés au laboratoire.^{41–44}

- *La détection de la thrombine associée à l'indicateur électrochimique bleu de méthylène.* Dans ce cas, l'ADN aptamère, possédant en son extrémité 5' une séquence de grande affinité pour la thrombine, est biotinylé à son extrémité 3' et immobilisé à la surface de l'électrode par l'affinité avidine–biotine.⁴¹
- *La détection de l'ochratoxine A (OTA).* Dans ce cas, l'ADN aptamère, possédant en son extrémité 5' une séquence spécifique pour l'OTA, est thiolé à son extrémité 3', et immobilisé sur une électrode d'or par chimisorption.⁴²
- *La détection de la protéine prion cellulaire humaine (PrP^c).* Dans ce cas, l'ADN aptamère, possédant en son extrémité 5' une séquence spécifique pour PrP^c, est biotinylé à son extrémité 3' et immobilisé à la surface de l'électrode par l'affinité avidine–biotine. Deux transducteurs ont été étudiés lors de cette détection : nanotubes de carbone multifeuilletts + dendrimères PAMAM + ferrocène⁴³ ou polypyrrole + dendrimères PAMAM + ferrocène (Schéma VI).⁴⁴

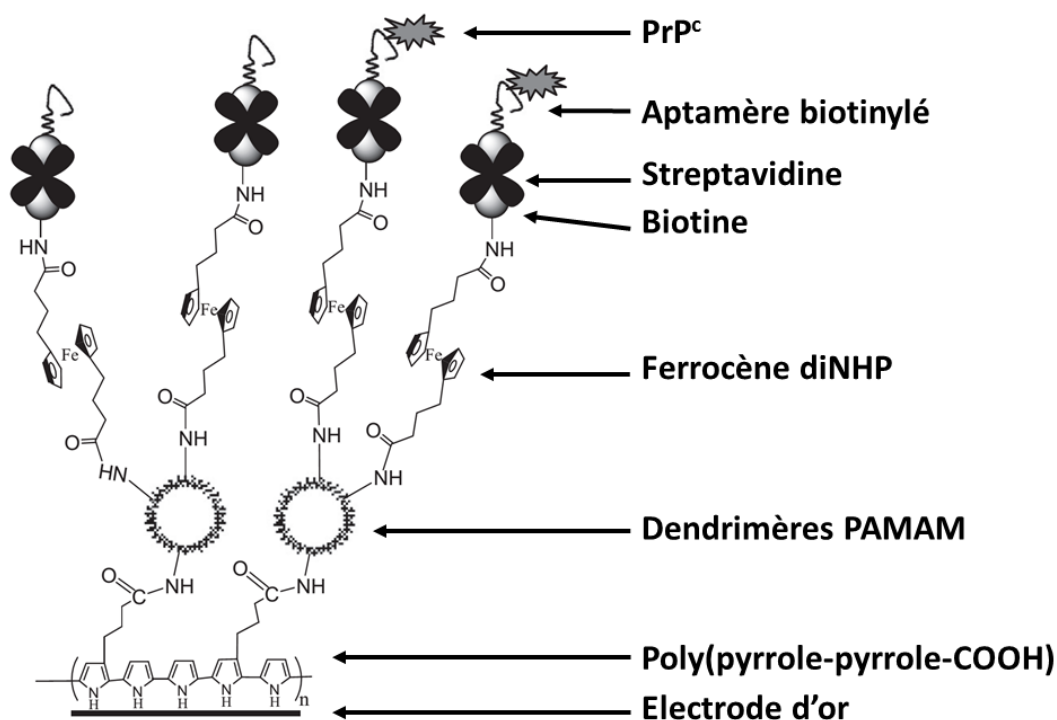


Schéma VI : Un exemple de biocapteur élaboré au laboratoire pour la détection de PrP^c.⁴⁴

1.5.3.3. Exemple de détection du PSA

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'antigène prostatique spécifique (**PSA**) est un biomarqueur du cancer de la prostate utilisé en clinique. Le biocapteur développé par l'équipe de Frost est composé d'une électrode d'or sur laquelle viennent s'adsorber des aptamères thiolés à leur extrémité 3' et possédant en leur extrémité 5' une séquence spécifique pour le PSA.⁴⁵ Une gamme allant de 1 ng/mL à 10 µg/mL de PSA a été réalisée et l'hybridation a été suivie par spectroscopie d'impédance.

1.5.4. Immunocapteurs

1.5.4.1. Principe

Par définition, les immunocapteurs (ou biocapteurs immunologiques) sont des dispositifs d'analyse qui détectent l'interaction entre un antigène et son anticorps spécifique.

Les anticorps ou immunoglobulines sont des protéines complexes utilisées par le système immunitaire pour détecter et neutraliser les agents pathogènes comme les bactéries et les virus. Ils sont sécrétés par des cellules dérivées des lymphocytes B, les plasmocytes, et reconnaissent des antigènes de manière spécifique. La structure générale d'un anticorps est donnée sur la Figure VI.

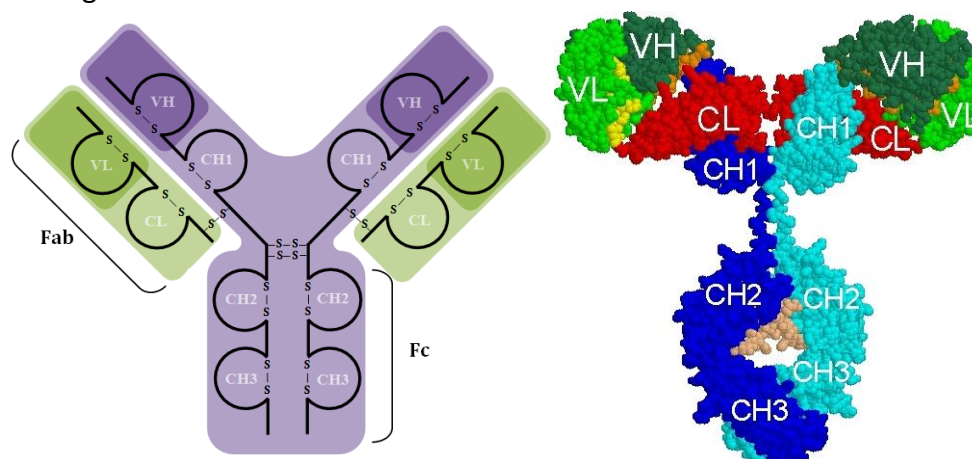


Figure VI : Structures d'un anticorps.

Les anticorps ont la même structure de base constituée de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L), associées par des ponts disulfures. Les chaînes légères sont constituées de deux domaines : un domaine variable (VL) et un domaine constant (CL). Tandis que les chaînes lourdes se composent généralement d'un domaine variable (VH) et de trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3). Les immunoglobulines peuvent ainsi être divisées en trois fragments : deux fragments servant à la liaison avec l'antigène (Fab pour Fragment Antigen Binding) et un fragment constant (Fc pour Fragment Constant).

Pour l'élaboration d'un biocapteur immunologique, les parties les plus intéressantes des anticorps sont les fragments variables (Fab) où l'interaction antigène–anticorps est optimale.

Il existe de multiples exemples d'applications de ces biorécepteurs (dont plusieurs sont étudiés au laboratoire) et certains dans le domaine de la détection de biomarqueurs cancéreux. Des exemples seront présentés ci-après.

1.5.4.2. Exemples pour la détection d'une toxine et d'une protéine

J'ai choisi de développer deux exemples de biocapteurs immunologiques existant dans la littérature dont l'un a été élaboré au laboratoire.⁴⁶

- *La détection de l'Aflatoxine B₁ (AFB₁)*. AFB₁ est une mycotoxine produite par les champignons *Aspergillus*. Un biocapteur a été développé en immobilisant un anticorps spécifique à cette molécule, modifié au niveau de son fragment constant par une chaîne thiolée et immobilisé par chimisorption sur des nanoparticules d'or.⁴⁷
- *La détection de la protéine PB1-F2 du virus influenza* (Schéma VII). PB1-F2 est une petite protéine non-structurale impliquée dans la virulence des souches de virus. Un biocapteur a été développé en immobilisant un anticorps spécifique pour la protéine, modifié au niveau de son fragment constant par une biotine et immobilisé par l'affinité avidine–biotine.⁴⁶

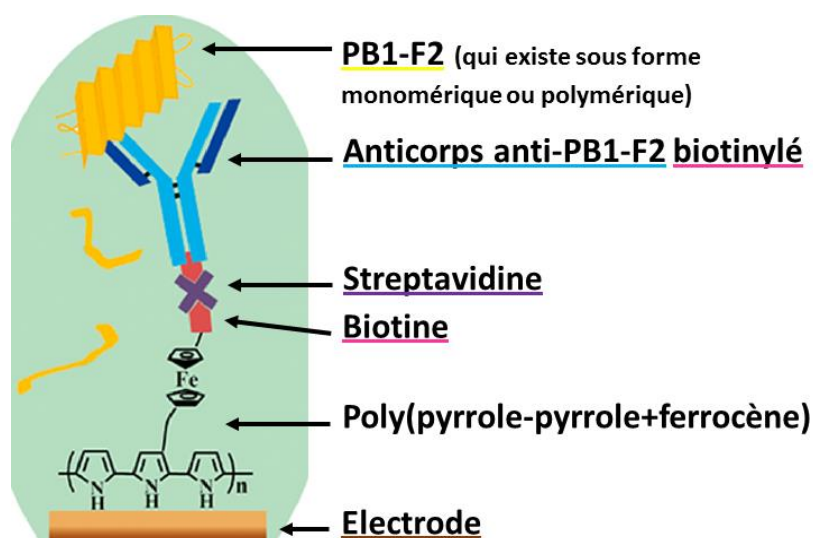


Schéma VII : Biocapteur élaboré au laboratoire pour la détection de PB1-F2.⁴⁶

1.5.4.3. Exemples pour la détection de biomarqueurs cancéreux

Plusieurs publications présentent l'utilisation des anticorps pour détecter des biomarqueurs de cancer.^{48–50} J'ai choisi de ne détailler que l'élaboration du biocapteur le plus sensible.

L'équipe de Ali a développé un biocapteur composé de nanofibres d'oxyde de zinc sur lesquels sont immobilisés des anticorps anti-ErbB2.⁴⁸ **ErbB2** est un gène appartenant au récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) qui joue un rôle important dans le développement des cancers du sein. Les analyses ont été réalisées par spectroscopie d'impédance. La détection a été effectuée sur une gamme de **1,0 fM à 0,5 μ M** et une **limite de détection de 1,0 fM** a été estimée.

1.5.5. Biocapteur à base de sucres

Peu d'exemple dans la littérature sont décrits sur l'utilisation de biocapteurs à base de monosaccharides pour détecter des biomolécules. La plupart concerne la détection de lectines.⁵¹ Par contre de nombreuses études rapportent l'utilisation d'oligosaccharides, une revue écrit par Raz Jelinek et Sofiya Kolusheva regroupe diverses études à ce sujet.⁵²

Je citerai cependant un exemple récent et tout-à-fait intéressant d'un biocapteur enzymatique à base de sucres développé par l'équipe de Huang.⁵³ Le biocapteur élaboré permet la détection d'anticorps anti-glycane surexprimés chez l'individu ayant un cancer. L'importance de ce taux peut être un indice de la progression de la maladie. Ainsi, les anticorps visant les glycanes sont des biomarqueurs potentiels pour le diagnostic précoce des maladies cancéreuses. Le biorécepteur utilisé est un mannose fonctionnalisé par une chaîne thiolée en son carbone C1. Ce sucre est greffé au transducteur par adsorption sur des nanoparticules d'or enchevêtrées dans un film de nanotubes de carbone multifeuillets déposés sur électrode de carbone. La détection a été réalisée par voltampérométrie impulsionnelle différentielle (DPV : *Differential Pulse Voltammetry*).

1.6. Sondes redox

La sonde redox est une molécule électroactive qui permet de suivre la variation électrochimique du milieu. Ce suivi se fait en analysant le pic d'oxydo-réduction correspondant à la sonde redox. Ainsi, le choix d'une bonne sonde redox repose sur la stabilité de ses formes oxydées et réduites pendant les conditions d'analyse sur la gamme du potentiel où la sonde redox est électroactive, sur la cinétique de transfert d'électrons, et sur la sensibilité de la sonde à son environnement électronique et stérique.

Elle peut être de deux types : associée au transducteur, ce qui confère au biocapteur un potentiel d'oxydo-réduction, ou libre dans la solution d'analyse. Dans chaque cas, le signal électrochimique créé permet de visualiser directement les modifications de transfert de charge se faisant à la surface de l'électrode.

1.6.1. Sonde redox associée au transducteur

Les molécules redox largement décrites dans la littérature et utilisées associées au transducteur sont le *ferrocène*^{54,55} et ses dérivés^{56,57}, le *viologène*¹⁵, les *complexes d'osmium*⁵⁸ et les *métalloporphyrines*^{59,60}. Quelques structures sont présentées sur la Figure VII.

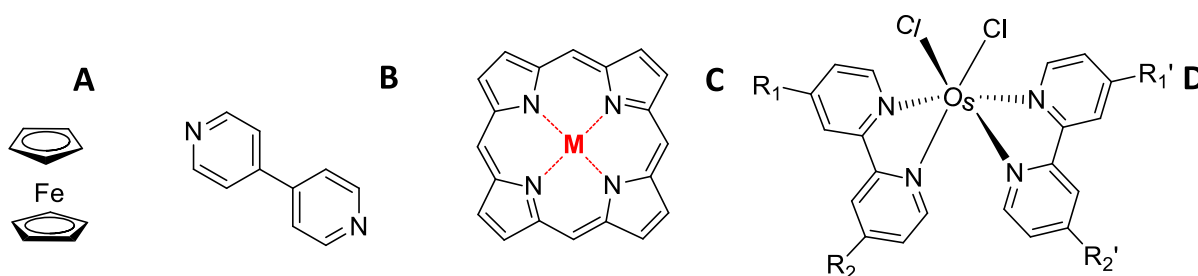
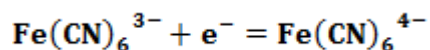


Figure VII : Structures de quatre sondes redox couramment utilisées au laboratoire (A) ferrocène, (B) viologène, (C) métalloporphyrine (avec M un métal tel que le manganèse Mn ou le fer Fe) et (D) complexe d'osmium avec deux ligands chloro et deux ligands bipyridine sur lesquels il est possible de greffer des groupements en position R₁ ou R₂.

1.6.2. Sonde redox libre

Le principe est alors d'immerger l'électrode dans un électrolyte contenant deux espèces capables de donner ou d'accepter des électrons. Les métaux hexacyanoferrates tels que le *Bleu de Prusse*⁶¹ sont les plus largement utilisés dans ce cas-là car le couple redox K₃[Fe(CN)₆] et K₄[Fe(CN)₆] est le plus réversible connu. La réaction d'oxydo-réduction associée est présentée ci-après.



Équation 1 : Réaction d'oxydo-réduction du couple ferricyanure-ferrocyanure.

C'est ce couple redox que nous avons utilisé pour réaliser nos études électrochimiques.

1.7. Méthodes électrochimiques utilisées

Au cours de ce travail de thèse, trois techniques électrochimiques ont principalement été utilisées : la voltampérométrie cyclique, la voltampérométrie à vague carrée et la spectroscopie d'impédance. Voici quelques explications sur le principe de fonctionnement de ces trois méthodes. Un aperçu de quelques notions de base en électrochimie et du montage électrochimique utilisé est disponible dans l'[annexe 1](#).

Ces trois méthodes sont dites à potentiel imposé : le potentiostat impose le potentiel de l'électrode de travail et mesure le courant électrique qui la traverse. L'allure du potentiel imposé et le choix des représentations graphiques permettent l'obtention de résultats complémentaires les uns des autres.

1.7.1. Voltampérométrie cyclique et à vague carrée

La voltampérométrie cyclique (CV : *Cyclic Voltammetry*) est la technique la plus largement utilisée pour acquérir des informations qualitatives sur les réactions électrochimiques. Elle consiste à balayer linéairement le potentiel d'une électrode de travail. Pendant le balayage de potentiel, le potentiostat mesure le courant résultant de réactions électrochimiques. Le voltammogramme cyclique est une réponse du courant en fonction du potentiel appliqué.

Parmi les techniques électroanalytiques, la voltampérométrie à vague carrée (SWV : *Square Wave Voltammetry*) combine la suppression du bruit de fond avec la sensibilité de la DPV (*Differential Pulse Voltammetry*). La SWV permet ainsi de détecter des courants faradiques particulièrement faibles. L'onde carrée est caractérisée par une hauteur d'impulsion (P_H) et une largeur d'impulsion (P_W).

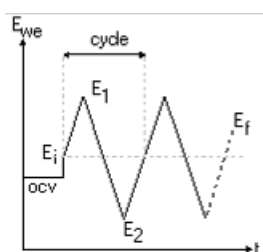


Schéma VIII : Allure du potentiel imposé en voltampérométrie cyclique.

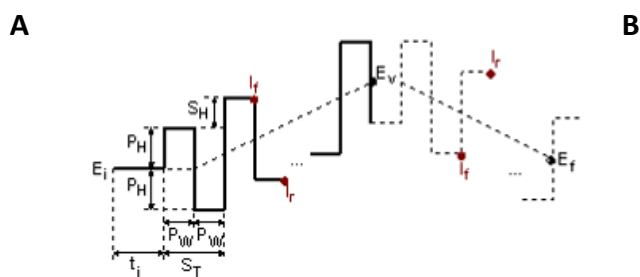


Schéma IX : Allure du potentiel imposé en voltampérométrie à vague carrée.

Après modification de l'électrode, et cela après chaque étape de construction du biocapteur, les voltampérogrammes de CV ou SWV présentent deux modifications notables : d'une part les intensités des courants des pics d'oxydation/réduction augmentent ou diminuent ; d'autre part la réversibilité du système redox varie selon l'état de la surface. Ces deux modifications de signal traduisent un changement de la vitesse des réactions.

La vitesse des réactions électrochimiques au niveau de la surface modifiée est globalement liée à deux facteurs : tout d'abord l'encombrement de la double couche, puis la présence éventuelle de charges à la surface de l'électrode. Ainsi, la molécule redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ va atteindre la surface métallique pour subir la réaction d'oxydo-réduction avec une facilité ou difficulté plus ou moins importante.

1.7.2. Spectroscopie d'impédance

1.7.2.1. Principe général des analyses

Afin de confirmer les propriétés de transfert électronique de la couche formée sur la surface de l'électrode à chaque étape majeure de construction du biocapteur, une étude par impédancemétrie a été réalisée. Cette étude fournit des informations plus détaillées sur la propriété électronique interfaciale de l'électrode modifiée.

Le potentiostat dans ce mode de fonctionnement maintient le potentiel à 0 V par rapport à E_{oc} , balaye une gamme de fréquence allant de **100 kHz à 0,1 Hz** et détermine pour chaque fréquence l'impédance du système électrochimique. Les résultats sont (principalement) présentés sous deux formes graphiques : le **diagramme de Nyquist** et les **diagrammes de Bode**. Nous ne montrerons que des représentations en diagramme de Nyquist lors de ce travail.

Pour le diagramme de Nyquist, les courbes représentent l'opposé de la partie imaginaire de l'impédance ($-\text{Im}(Z)$ en Ohm) en fonction de sa partie réelle ($\text{Re}(Z)$ en Ohm) et se décomposent en deux parties. La première partie correspond à un semi-cercle. Il est obtenu à des fréquences élevées et correspond au processus limité par le transfert d'électrons. La seconde partie est située sur la droite des graphes, elle correspond à une partie linéaire obtenue aux faibles fréquences et permet de montrer un processus de diffusion. L'analyse consiste donc essentiellement à mesurer la résistance de transfert de charge (R_{ct}) à l'interface des électrodes modifiées. La valeur de cette résistance (diamètre selon l'axe des abscisses du semi-cercle) dépend des caractéristiques électriques à l'interface électrode—électrolyte.

Une fois les mesures réalisées, les données d'impédance sont fittées de manière à déterminer le circuit électrique équivalent au biocapteur. Il existe quatre composants électriques principaux couramment utilisés pour établir les circuits équivalents :

- le conducteur ohmique caractérisé par une **résistance (R)**,
- le condensateur caractérisé par une **capacité (C)**,
- l'élément de phase constant (CPE) caractérisé par deux grandeurs indépendantes de la fréquence : **Q** et **n**,
- l'élément de Warburg (W) caractérisé par la constante de Warburg **Aw**.

Les formules donnant les impédances de la CPE et du W sont données par les équations présentées ci-après. Le paramètre n est adimensionnel avec une valeur comprise entre -1 et 1 . Par exemple : si $n = 1$, une **capacité** (pure) est obtenue tandis que si $0 < n < 1$ une **CPE** au sens usuel du terme est obtenue. Ainsi nous pouvons dire que le comportement CPE est obtenu quand la distribution de la constante de temps n'est pas uniforme sur toute la surface.

$$Z_{CPE} = \frac{1}{Q \cdot (j \cdot \omega)^n} \quad Z_W = \frac{\sqrt{2} \cdot A_W}{(j \cdot \omega)^{0.5}}$$

avec la fréquence angulaire :
 $\omega = 2 \cdot \pi \cdot f$
 et j le nombre imaginaire tel que
 $j^2 = -1$

Équation II : Formules des impédances de la CPE et du W.

1.7.2.2. Méthode utilisée pour le fitting

Il existe différents algorithmes de minimisation disponibles dans le logiciel EC-Lab utilisé pour la correction des données. La méthode choisie est appelée « **Randomisation + Levenberg–Marquardt** ». Elle se produit en deux étapes consécutives : tout d'abord une randomisation, suivie d'une minimisation réelle utilisant le minimiseur Levenberg–Marquardt. L'option « randomiser » signifie que le logiciel va choisir des valeurs aléatoires pour tous les paramètres constituant le circuit équivalent à trouver (R , C , W ...), calculer le χ^2 à chaque mesure et garder pour chaque paramètre la valeur qui a donné le χ^2 le plus faible. La randomisation est donc utilisée pour fournir des valeurs initiales aussi près que possible des valeurs expérimentales réelles, afin d'avoir un bon point de départ pour poursuivre avec la minimisation Levenberg–Marquardt, utilisant un algorithme mathématique.

Afin de montrer l'influence de chaque paramètre sur le diagramme de Nyquist, différentes simulations sont effectuées à partir de données expérimentales. Le logiciel EC-Lab permet de tracer des points simulés à partir de valeurs de paramètres que nous avons choisies.

La valeur obtenue pour chacun des paramètres après la minimisation a été rentrée puis modifiée une à une pour visualiser son influence sur l'apparence du diagramme de Nyquist résultant (Figure VIII). Les points bleus montrent les points expérimentaux et les points orange montrent les points provenant de la simulation. Le paramètre variable est indiqué sur chaque diagramme.

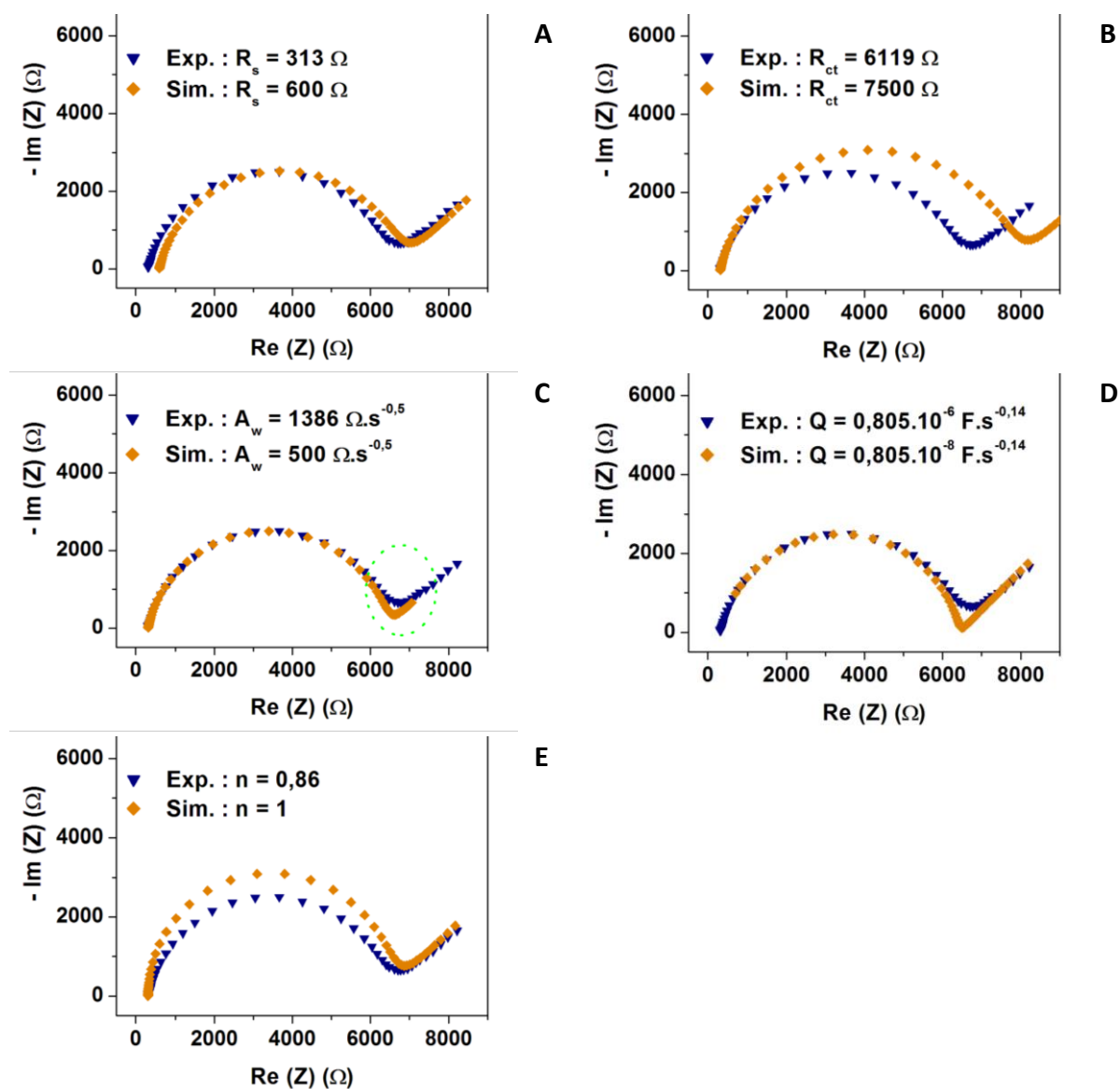


Figure VIII : Différents diagrammes de Nyquist montrant l'influence de chaque paramètre du circuit équivalent.

Sur le premier diagramme (A), nous faisons varier la résistance de l'électrolyte R_s . Elle vaut expérimentalement 313 Ω et nous avons fait une simulation avec une valeur plus élevée : 600 Ω . Nous pouvons voir que le diagramme de Nyquist est décalé vers la droite. Le R_s indique donc l'abscisse de départ du semi-cercle.

Sur le deuxième diagramme (B), nous faisons varier la résistance de transfert de charge R_{ct} . Elle vaut expérimentalement 6119 Ω et nous l'avons simulée à 7500 Ω . Nous pouvons observer que le diamètre du semi-cercle a augmenté. Le R_{ct} influe donc sur le diamètre du semi-cercle.

Sur le troisième diagramme (**C**) nous faisons varier la constante de Warburg A_w . Elle vaut $1386 \Omega \cdot s^{-0,5}$ expérimentalement et nous la simulons à $500 \Omega \cdot s^{-0,5}$. Nous pouvons observer que pour les basses fréquences, l'influence de la diffusion est diminuée sur la simulation, le semi-cercle étant presque entièrement refermé sur sa droite, avant que l'impédance de Warburg n'influe réellement.

Sur les deux derniers diagrammes (**D** et **E**), nous faisons varier les deux paramètres caractérisant la CPE : Q et n . Pour le Q , sa diminution sur la simulation provoque un « décalage » des points par rapport à la courbe d'origine. Les impédances du circuit peuvent ne pas varier mais des valeurs identiques s'observent à des fréquences différentes. Ainsi, le sommet du semi-cercle correspond à la fréquence de 70 Hz sur la courbe expérimentale et à 15 kHz sur la simulation où Q a été divisé par 100. Pour le n , il est de 0,86 expérimentalement, d'où la CPE. Nous l'avons bloqué à 1 de manière à simuler un comportement de capacité pure. Nous pouvons voir que dans ce cas, le semi-cercle devient un vrai demi-cercle.

Chapitre 2. Détermination des composants du biocapteur

La problématique de mon travail de thèse présentée dans la partie A est la conception et l'évaluation d'un biocapteur électrochimique pour la détection de l'AMF/PGI. Il s'agit d'établir une preuve de concept sur la faisabilité de la détection de cette protéine et la possibilité de la suivre par voie électrochimique. Il faut tout d'abord déterminer la nature du transducteur qui sera utilisé pour l'élaboration du biocapteur puis celle du biorécepteur qui permettra la détection de l'AMF/PGI. Une fois ces deux éléments mis en place, la stratégie choisie, étape par étape, pour concevoir le biocapteur ainsi que le rôle de chacun des composants seront présentés.

2.1. Élaboration du transducteur

Nous avons vu dans le chapitre 1 qu'il existait une grande palette de choix de transducteurs possibles pour élaborer un biocapteur. Le transducteur choisi pour élaborer notre preuve de concept est constitué d'une simple électrode d'or fonctionnalisée par des groupements amine. Il a été construit en deux étapes (Schéma X).

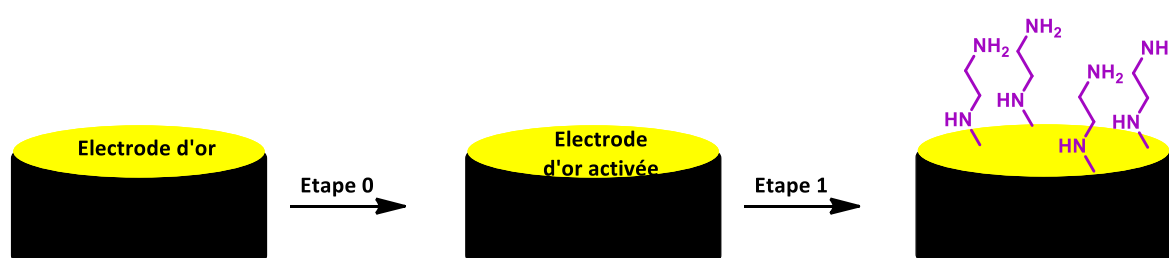


Schéma X : Schéma général de construction du transducteur.

Lors de la première étape (appelée étape 0) l'électrode est « activée » électrochimiquement de manière à nettoyer parfaitement la surface d'or. La deuxième étape (appelée étape 1) consiste en la fonctionnalisation de la surface d'or par des groupements amine *via* une électrodéposition.

2.1.1. Nettoyage de la surface d'or (étape 0)

Lors de la construction d'un biocapteur il est important que chaque étape de construction soit parfaitement contrôlée et donne des résultats reproductibles. Pour cela nous avons choisi de réaliser systématiquement un nettoyage électrochimique des surfaces d'or avant utilisation des électrodes.

Le nettoyage électrochimique des surfaces d'or (ou « activation ») consiste à oxyder électrochimiquement les surfaces d'or dans une solution d'acide sulfurique. Cette étape se produit après polissage des électrodes et va permettre d'éliminer tous les contaminants, de manière à obtenir des surfaces d'or les plus identiques possibles avant chaque utilisation.

Trois conditions d'activation ont été testées, faisant varier la gamme de potentiel ou la concentration de la solution d'acide sulfurique utilisée. Ces conditions sont présentées dans le Tableau II. Le nombre de cycles est toujours égal à 10 et la vitesse de balayage à 100 mV/s. La solution d'acide sulfurique est toujours dégazée sous argon avant l'oxydation électrochimique.

Tableau II : Conditions d'activation de la surface d'or testées.

	Gamme de potentiel	Nombre de cycles	Vitesse de balayage	Concentration en acide sulfurique
A	Aucune activation			
B : conditions 1	De 0 à 1,2 V	10	100 mV/s	0,1 M
C : conditions 2	De 0 à 1,8 V	10	100 mV/s	0,1 M
D : conditions 3	De 0 à 1,8 V	10	100 mV/s	0,5 M

Pour effectuer cette optimisation, douze électrodes d'or ont été utilisées. Quatre électrodes ont été nettoyées dans chacune des trois conditions présentées. Le fait d'utiliser quatre électrodes à chaque fois permet de déterminer la reproductibilité des surfaces des électrodes après le nettoyage. Une fois les électrodes activées, les surfaces sont analysées dans une solution contenant 5 mM d'ions ferricyanures ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) et 5 mM d'ions ferrocyanures ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) dans du tampon phosphate (PBS: *Phosphate Buffer Saline*) à pH 7,4. Les voltammogrammes résultants sont présentés sur la Figure IX.

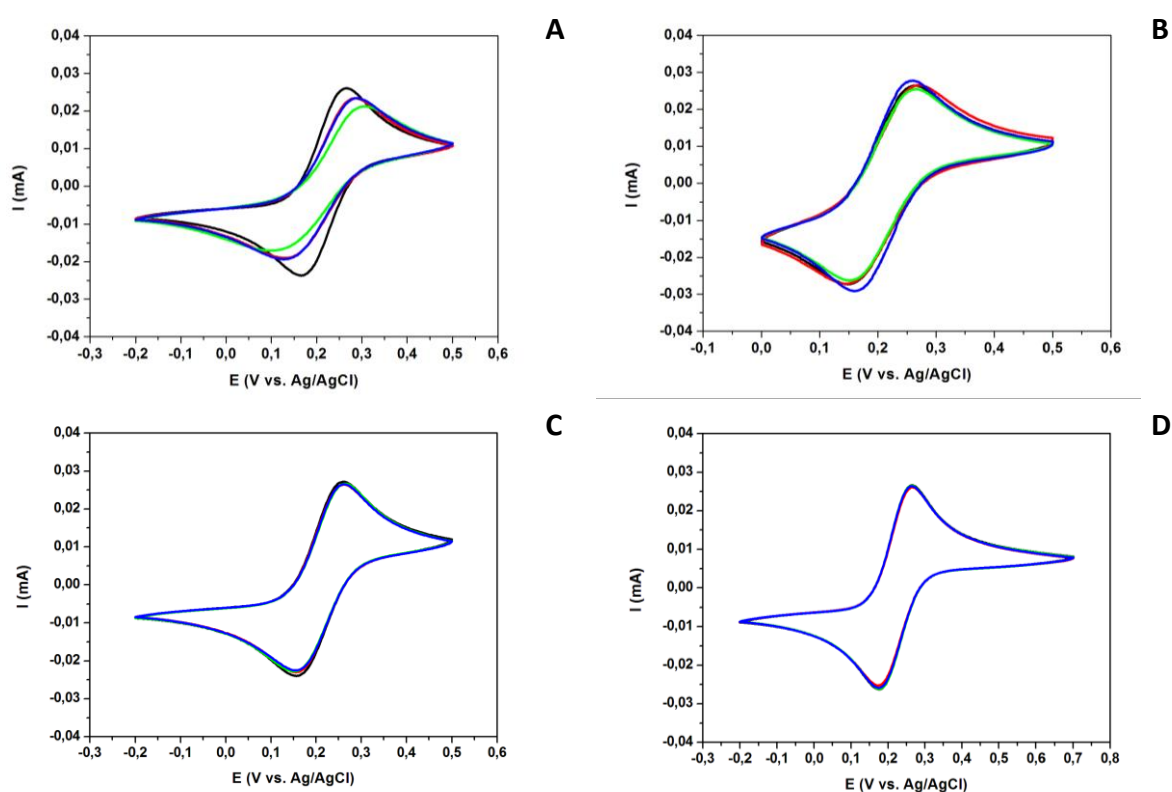


Figure IX : Analyse par voltampérométrie cyclique des surfaces d'or avant (A) et après activation à l'acide sulfurique (B conditions 1, C conditions 2 et D conditions 3) de quatre électrodes (courbes noir, rouge, verte et bleue). Les analyses se font dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans du PBS 10 mM à pH 7,4, durant 3 cycles à 50 mV/s.

Le voltammogramme **A** correspond à l'analyse des surfaces d'or de quatre électrodes sans pré-traitement acide et montre des signaux d'oxydo-réduction de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ très différents en fonction de l'électrode, d'où la nécessité de nettoyer les surfaces.

Le **B** montre que les quatre électrodes n'ont pas encore une surface tout à fait identique. Les conditions 1 ne sont donc pas optimum pour avoir une bonne reproductibilité.

Pour les voltammogrammes **C** et **D**, la reproductibilité est très bonne, avec une légère préférence pour les conditions appliquées en **D** où les signaux des quatre électrodes se superposent parfaitement lors de l'analyse dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

Ce sont donc les conditions 3 qui seront utilisées pour pré-traiter les électrodes d'or avant la construction du biocapteur : **nettoyage électrochimique de 0 à 1,8 V durant 10 cycles à 100 mV/s dans une solution d'acide sulfurique à 0,5 M dégazée sous argon** (Figure X A).

De manière à étudier l'influence du nettoyage des surfaces d'or, des plaques d'or ont été activées de la même manière et l'hydrophilie des plaques a été mesurée avant et après activation par mesure d'angle de contact en présence d'eau. Les résultats sont présentés sur la Figure X B.

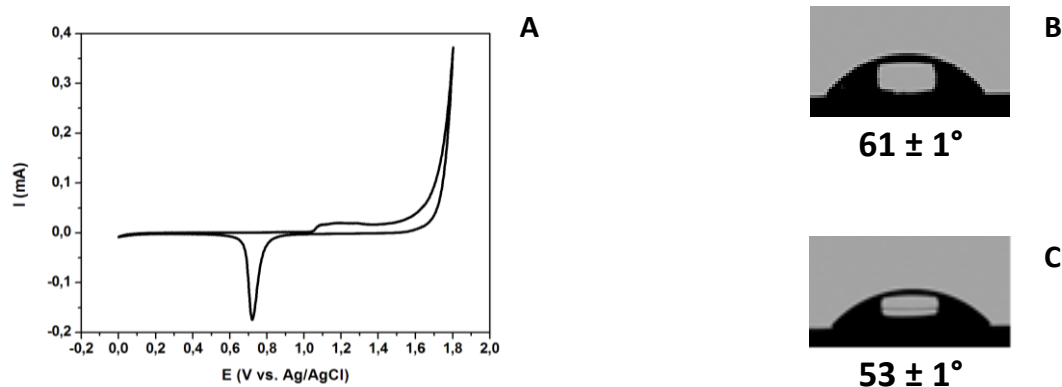


Figure X : (A) Activation d'une électrode d'or par voltampérométrie cyclique dans une solution d'acide sulfurique dégazée sous argon à 0,5 M, de 0 à 1,8 V durant 10 cycles à 100 mV/s. Seul le dernier cycle est représenté ici. (B et C) Mesure des angles de contact avant (B) et après (C) l'activation de la surface d'or à l'acide sulfurique.

Une goutte d'eau de 3 μL est déposée sur les plaques d'or et les angles de contact de la goutte sur la plaque sont mesurés. Plus la surface est hydrophile et plus la goutte va s'étaler et avoir un faible angle de contact. Cette expérience a été renouvelée six fois pour obtenir une moyenne et un écart-type. Il est observé une augmentation de l'hydrophilie des surfaces après nettoyage, l'angle de contact à l'eau diminuant de $61 \pm 1^\circ$ à $53 \pm 1^\circ$. Ceci est dû aux liaisons Au^+-OH , polaires, que nous avons créées lors de l'activation.

2.1.2. Fonctionnalisation de la surface d'or (étape 1)

De manière à greffer des molécules à la surface d'une électrode d'or, il est nécessaire de la fonctionnaliser pour créer des groupements fonctionnels en surface. Une des méthodes couramment utilisée est l'électrodéposition d'une molécule aminée. Cette réaction a notamment été largement décrite par l'équipe de Pinson.⁶²

Afin d'avoir des extrémités -NH_2 à la surface, deux approches ont été étudiées. La première consiste à déposer une diamine monoprotégée par son extrémité libre, puis de déprotéger ensuite l'autre extrémité. Cette approche favorise la formation d'une monocouche d'amine.⁶² La deuxième consiste à déposer directement une diamine non protégée, de manière à former un film de polyéthylèneimine (PEI).⁶² Par contre, cette deuxième approche favorise la formation défavorable de ponts sur la surface bloquant le transfert de charge à l'électrode. Une optimisation doit être réalisée en jouant sur le potentiel d'oxydation, la concentration en diamine, le temps de réaction et/ou la vitesse de balayage lors de l'électrodéposition. Dans les deux cas, la diamine utilisée est l'éthylène diamine (ED).

2.1.2.1. Mécanisme de l'électrodéposition

Lors d'une électrodéposition, les amines primaires sont oxydées de manière à former un radical cation qui va ensuite perdre un proton. Le radical formé va pouvoir réagir directement avec la surface d'or riche en électrons (Schéma XI).⁶³ Cette réaction peut être réalisée sur les électrodes d'or, de carbone ou de platine.⁶⁴

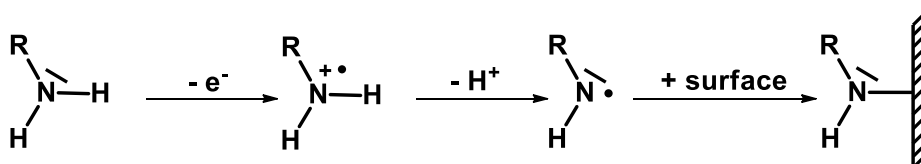


Schéma XI : Mécanisme de l'électrodéposition.

2.1.2.2. Utilisation d'une diamine monobocquée

L'éthylène diamine monobocquée (EDBoc) est synthétisée à partir d'éthylène diamine et de dicarbonate de di-*tert*-butyle dans du dichlorométhane anhydre (Schéma XII).⁶⁵

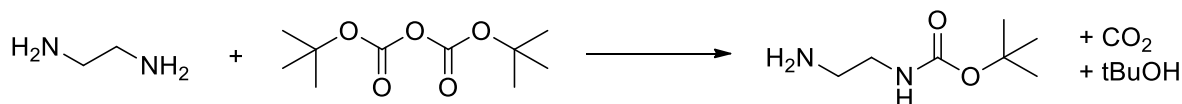


Schéma XII : Synthèse de l'éthylène diamine monobocquée.

Électrodéposition de l'éthylène diamine monobocquée

L'électrodéposition de la diamine monobocquée sur surface d'or a été réalisée selon la méthode décrite par Bartlett sur électrode de carbone.⁶⁶ Pour cela l'éthylène diamine monobocquée est dissoute à **10 mM dans une solution d'acétonitrile avec du tétrafluoroborate de tétrabutylammonium (TBATFB) à 0,1 M**. Un balayage de potentiel allant de **0,5 à 1,8 V** durant **4 cycles** à une vitesse de **50 mV/s** est effectué (Figure XI).

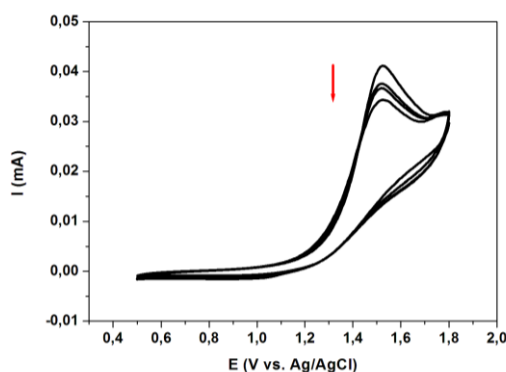


Figure XI : Électrodéposition d'éthylène diamine monobocquée par voltampérométrie cyclique de 0,5 à 1,8 V durant 4 cycles à une vitesse de 50 mV/s.

Le voltammogramme montre un pic d'oxydation aux environs de 1,5 V correspondant à la formation du radical cation. Ce pic est irréversible et l'intensité diminue au cours du balayage ce qui prouve bien que le radical réagit avec la surface d'or.

Afin de contrôler la modification de la surface, des analyses ont été faites par voltampérométrie cyclique et impédancemétrie dans une solution de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans du KCl à 100 mM. Les résultats sont présentés sur la Figure XII.

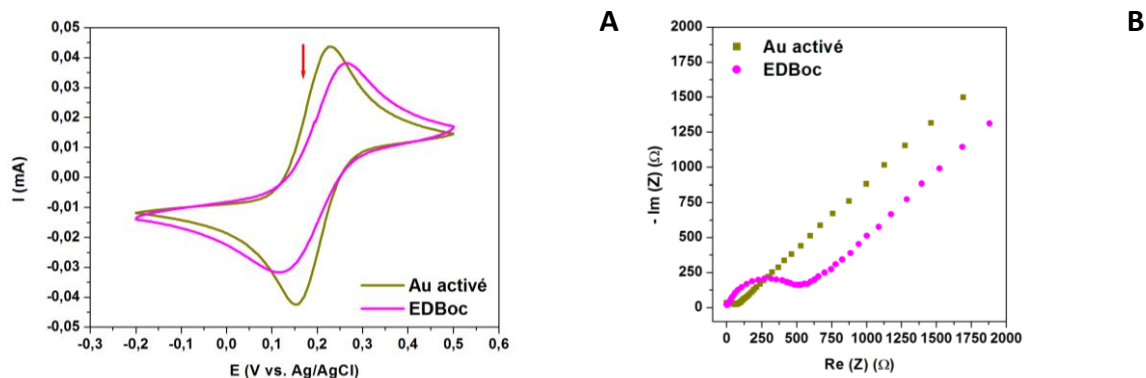


Figure XII : Analyses de la surface avant et après l'électrodéposition de l'EDBoc dans une solution de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans du KCl à 100 mM. (A) Analyses de la surface par voltampérométrie cyclique durant 3 cycles à 50 mV/s. (B) Analyses de la surface par impédancemétrie (diagrammes de Nyquist), obtenues dans une gamme de fréquence allant de 100 kHz à 0,1 Hz.

La Figure XII A montre une diminution de l'intensité du courant de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ et une moins bonne réversibilité du signal lorsque l'on passe de la surface d'or activée (courbe kaki) à la surface d'or activée + l'éthylène diamine monobocquée (courbe magenta). Ces changements sont dus à la présence du groupement Boc, très volumineux, à la surface de l'électrode, qui gêne la diffusion de la sonde $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

La Figure XII B montre une augmentation de la résistance de la couche lorsque l'on passe de la surface d'or activée (courbe kaki) à la surface d'or activée + l'éthylène diamine monobocquée (courbe magenta). Ceci est en accord avec les modifications observées sur le voltammogramme de la Figure XII A.

Déprotection de l'éthylène diamine

Par la suite, les groupements Boc sont enlevés de la surface en laissant l'électrode incubée durant **4 heures à température ambiante** dans une **solution d'acide chlorhydrique à 4 M dans du dioxane**.⁶⁶ Après différentes étapes de lavage, l'électrode est analysée dans une solution de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans du KCl à 100 mM par voltampérométrie cyclique et impédancemétrie (Figure XIII).

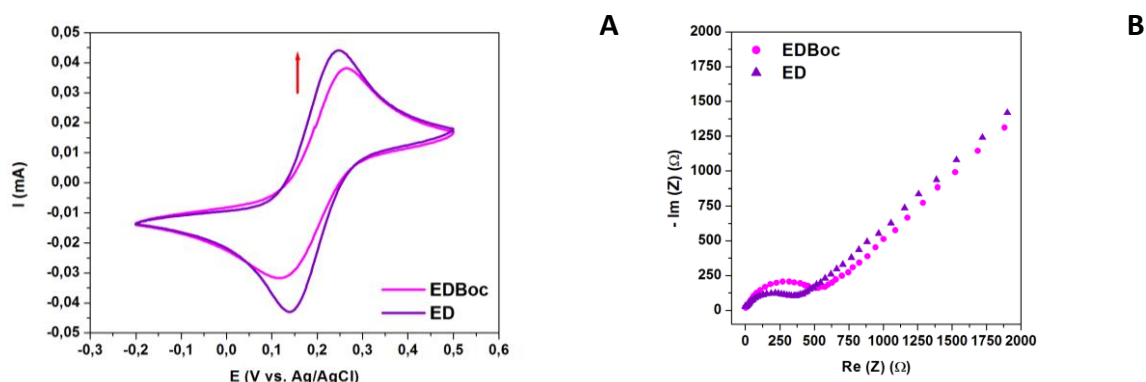


Figure XIII : Analyses de la surface avant et après la déprotection de l'éthylène diamine monobocquée par une solution de HCl à 4 M dans du dioxane. (A) Analyses de la surface par voltampérométrie cyclique durant 3 cycles à 50 mV/s. (B) Analyses de la surface par impédancemétrie (diagrammes de Nyquist), obtenues dans une gamme de fréquence allant de 100 kHz à 0,1 Hz.

Sur la Figure XIII A, on observe une augmentation de l'intensité du courant de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ lorsque l'on passe de la surface d'or activée + l'éthylène diamine monobocquée (courbe magenta) à la surface d'or activée + l'éthylène diamine déprotégée (courbe violette). Cette augmentation est due à un meilleur transfert de charges à la surface de l'électrode provoqué d'une part par le désencombrement résultant de la déprotection, et d'autre part par la protonation des amines à pH 7 (pH de la solution d'analyse).

La Figure XIII B montre une réduction de la résistance de la couche lorsque l'on passe de la surface d'or activée + l'éthylène diamine monobocquée (courbe magenta) à la surface d'or activée + l'éthylène diamine déprotégée (courbe violette). Ceci est en accord avec l'augmentation de l'intensité du courant observée sur le voltammogramme de la Figure XIII A.

En plus des analyses par voltampérométrie cyclique et impédancemétrie, de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été réalisée. Trois plaques d'or sont préparées selon les conditions présentées dans le Tableau III.

Tableau III : Conditions d'électrodéposition utilisées pour les trois plaques d'or pour mesurer les spectres infrarouge à transformée de Fourier.

Molécule électrodéposée sur l'électrode	Vitesse de balayage (mV/s)	Gamme de potentiel (V)	Nombre de cycles	Déprotection
EDBoc à 10 mM dans TBATFB à 0,1 M dans ACN	50	0,5—1,8	4	HCl 4 M / dioxane
ED à 10 mM dans LiClO_4 à 0,5 M	50	0—1,1	10	/
EDBoc à 10 mM dans TBATFB à 0,1 M dans ACN	50	0,5—1,8	4	/

La première plaque est modifiée par de l'éthylène diamine monobocquée par électrodéposition suivant le mode opératoire utilisé auparavant, puis le groupement Boc est hydrolysé suivant les conditions décrites auparavant. La deuxième plaque est modifiée par de l'éthylène diamine suivant les conditions habituelles du laboratoire. La troisième plaque est modifiée par de l'éthylène diamine monobocquée et ne sera pas déprotégée par la suite.

Le spectre infrarouge à transformée de Fourier de ces trois plaques est ensuite enregistré avec un ATR utilisant un cristal de Germanium. Le spectre résultant est présenté sur la Figure XIV.

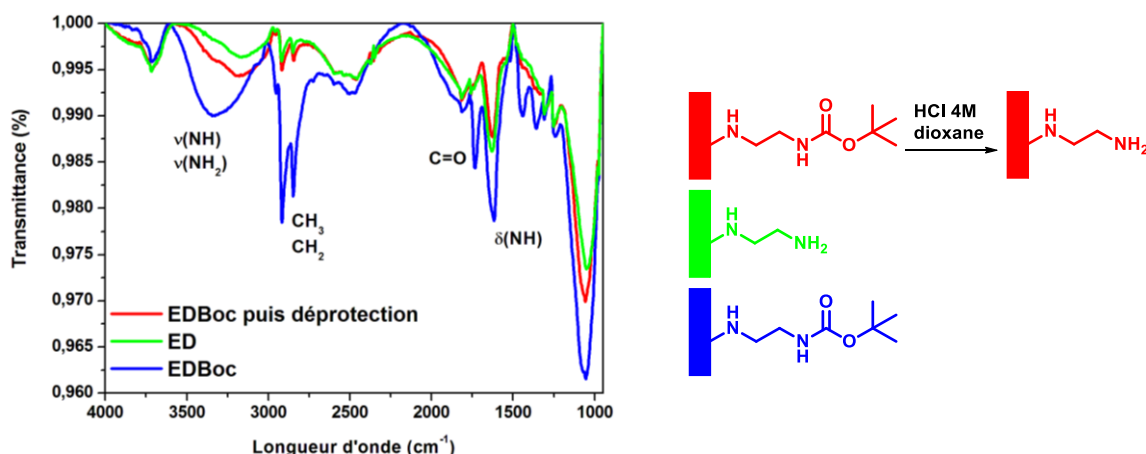


Figure XIV : Spectre infrarouge à transformée de Fourier mesuré au Germanium.

Les deux premières plaques possèdent le même profil avec notamment aucune bande aux alentours de 1750 cm^{-1} correspondant aux vibrations de la liaison C=O du Boc. Cette analyse confirme que la déprotection du groupement Boc fonctionne dans les conditions utilisées.

2.1.2.1. Utilisation d'une diamine non protégée

Une particularité de notre travail est que nous avons mis au point des conditions d'électrodéposition d'amines primaires en milieu aqueux. La plupart des réactions d'électrodéposition décrites dans la littérature se déroulent en milieu organique, dans de l'acétonitrile par exemple.

Premier essai en conditions diluées

La première tentative d'électrodéposition de l'ED non protégée sur l'électrode d'or suit les conditions couramment utilisées par Bartlett sur électrode de carbone.⁶⁶ L'éthylène diamine est en solution à **10 mM dans du perchlorate de lithium (LiClO_4) à 0,5 M** dans l'eau. Un balayage de potentiel allant **de 0 à 1,1 V** durant **10 cycles** à une vitesse de **50 mV/s** est effectué (Figure XV A). Ensuite, afin de voir si la surface a bien été modifiée, une analyse dans une solution de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans du PBS 10 mM à pH 7,4 a été faite (Figure XV B).

Le voltammogramme présenté à la Figure XV A montre un pic d'oxydation aux environs de 0,6 V, relativement large, correspondant à la formation du radical cation. Ce pic est irréversible ce qui prouve bien qu'au fur et à mesure que le radical se forme, il réagit avec la surface d'or. Le signal se stabilise assez vite montrant que la surface est saturée en amines.

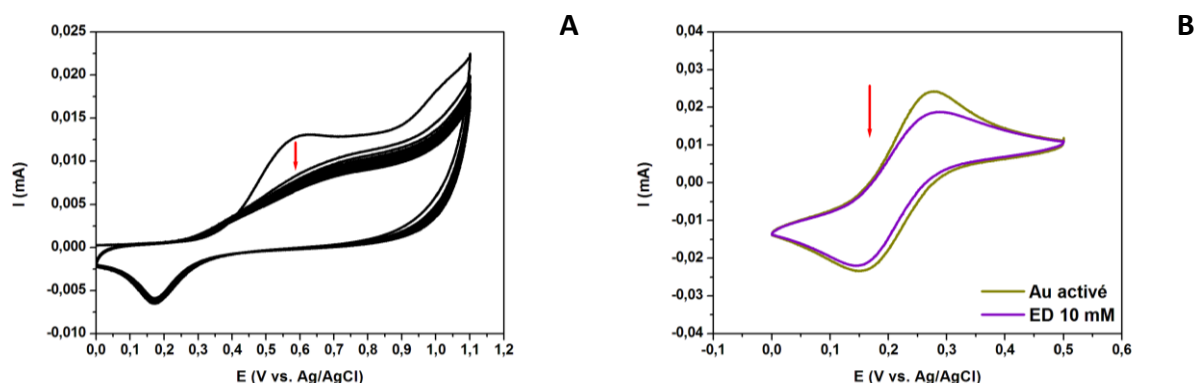


Figure XV : Électrodéposition de l'éthylène diamine à 10 mM. (A) Voltammogramme montrant l'électrodéposition. (B) Analyse de la surface par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans du PBS 10 mM à pH 7,4, durant 3 cycles à 50 mV/s, avant et après l'électrodéposition.

La Figure XV B montre une diminution de l'intensité du courant de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ lorsque l'on passe de la surface d'or activée (courbe kaki) à la surface d'or activée + l'éthylène diamine (courbe violette). Cette diminution indique que le transfert de charges de la sonde redox se fait plus difficilement à la surface de l'électrode. Une hypothèse serait que les deux amines se soient oxydées et greffées à la surface, favorisant ainsi la formation de ponts (Schéma XIII) gênant la diffusion de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ à la surface de l'électrode.

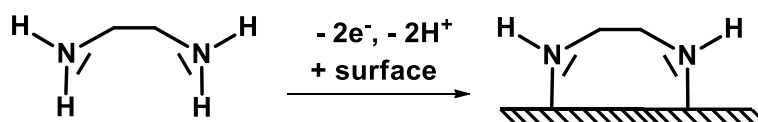


Schéma XIII : Formation de ponts en conditions diluées.

Deuxième essai en conditions concentrées

Afin de limiter l'apparition de ponts diaminés à la surface de l'électrode, nous avons travaillé avec une concentration en éthylène diamine 100 fois plus concentrée qu'auparavant. En effet, l'éthylène diamine est en solution à **1 M dans LiClO₄ à 0,5 M** dans l'eau. De plus, nous avons mis au point les conditions d'électrodéposition pour qu'elle ait lieu **à faibles potentiels**. Ceci nous permet de travailler sous atmosphère non contrôlée. Ainsi, un balayage de potentiel allant **de 0 à 0,7 V** durant **6 cycles** à une vitesse de **50 mV/s** est effectué (Figure XVI A). Ensuite, afin de voir si la surface a bien été modifiée, une analyse dans une solution de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans du PBS 10 mM à pH 7,4 a été faite (Figure XVI B).

Le voltammogramme présenté à la Figure XVI A montre un pic d'oxydation irréversible aux environs de 0,5 V, relativement large, correspondant à la formation du radical cation et à sa réaction avec la surface d'or. Le signal se stabilise au bout de cinq cycles montrant que la surface est saturée en amines.

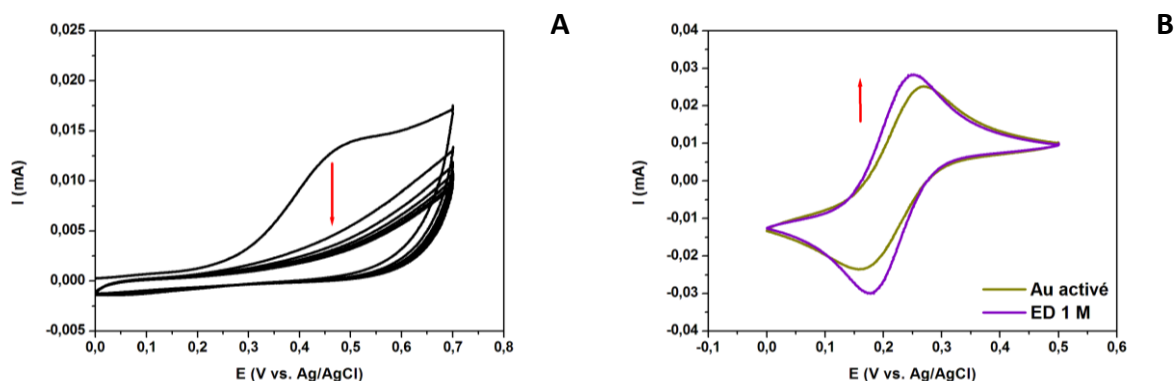


Figure XVI : Électrodéposition de l'éthylène diamine à 1 M. (A) Voltammogramme montrant l'électrodéposition. (B) Analyse de la surface par voltampérométrie cyclique dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans du PBS 10 mM à pH 7,4, durant 3 cycles à 50 mV/s, avant et après l'électrodéposition.

La Figure XVI B montre une augmentation de l'intensité du courant de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ lorsque l'on passe de la surface d'or activée (courbe kaki) à la surface d'or activée + l'éthylène diamine (courbe violette), contrairement au cas précédent où nous travaillions dans des conditions diluées d'éthylène diamine. Cette augmentation montre que le transfert de charges se fait plus rapidement à la surface de l'électrode. Ceci grâce à l'apparition de charges positives à la surface de l'électrode (les amines sont protonées à pH 7, pH du tampon phosphate utilisé pour faire les analyses), permettant de faciliter la diffusion de la sonde redox vers la surface de l'électrode.

2.1.3. Conclusion

Nous avons réussi à concevoir un transducteur stable constitué d'une simple électrode d'or fonctionnalisée par des groupements amine par deux méthodes : la méthode utilisant une diamine protégée et celle utilisant une diamine non protégée.

Aux vues de toutes les analyses effectuées, nous pouvons conclure que le greffage de l'éthylène diamine monobocquée fonctionne et que les groupements amines sont bien accessibles à la surface pour un éventuel greffage après la déprotection d'EDBoc dans l'acide chlorhydrique à 4 M dans le dioxane. Ce type de greffage permet d'avoir une monocouche sur la surface mais nécessite par ailleurs une étape d'hydrolyse en milieu acide.

D'autre part, pour greffer l'éthylène diamine non protégée, il est nécessaire de travailler en conditions concentrées (1 M), afin de limiter la formation de « ponts » diaminés à la surface de l'électrode. Cette méthode permet d'obtenir une surface aminée mais n'exclut pas la formation d'une multicouche de polyéthylènimine.

Dans la suite de ce travail, nous avons élaboré un biocapteur pour la détection de l'AMF/PGI dans lequel la surface d'or a été fonctionnalisée par de l'éthylène diamine par électrodéposition en conditions concentrées (1 M dans du LiClO_4 à 0,5 M).

2.2. Élaboration de la zone de reconnaissance

2.2.1. Choix du biorécepteur

Le biorécepteur est la molécule qui va être reconnue par l'AMF/PGI. L'interaction entre l'enzyme et le biorécepteur va provoquer une modification des propriétés de transfert de charge du biocapteur. Plus l'affinité entre le biorécepteur et l'enzyme est importante et meilleure sera la sensibilité du biocapteur. Dans cet esprit, un substrat ou un inhibiteur de l'enzyme serait l'idéal, avec la contrainte de pouvoir greffer la molécule choisie à la surface de l'électrode d'une manière qui ne modifiera pas son affinité avec l'AMF/PGI.

Il nous faut donc déterminer quelle position de quel substrat ou inhibiteur peut être modifiée pour y greffer l'espaceur relié aux groupements amine fonctionnalisant l'électrode d'or. L'analyse du site actif de différentes structures tridimensionnelles de complexes AMF/PGI–substrat et AMF/PGI–inhibiteur disponibles dans la littérature (Figure XVII)^{67–71} permet d'obtenir des informations à ce sujet. Les structures des substrats et inhibiteurs en question sont représentées sur Schéma XIV.

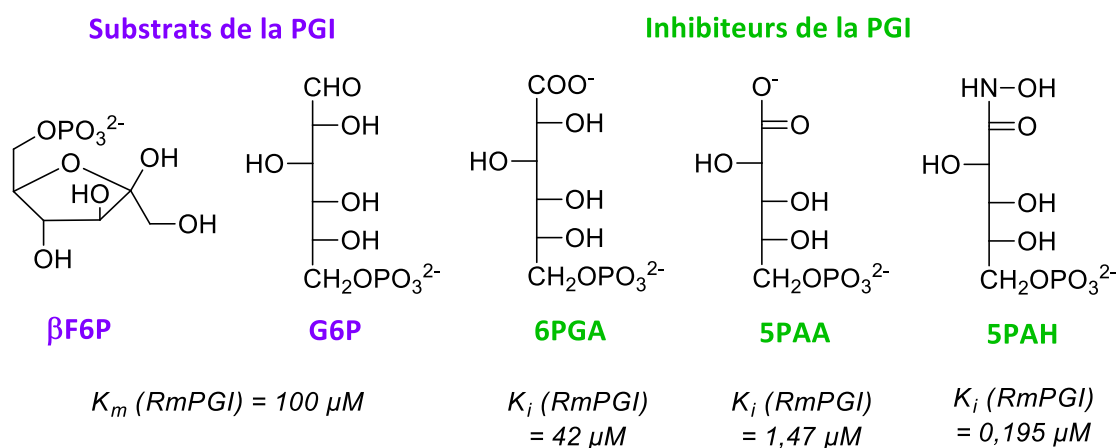


Schéma XIV : Structures des substrats et inhibiteurs ciblés : βF6P = β-D-fructofuranose 6-phosphate ; G6P = D-glucose 6-phosphate ; 6PGA = 6-phospho-D-gluconate ; 5PAA = 5-phospho-D-arabinonate ; 5PAH = acide 5-phospho-D-aribinonohydroxamique.

Les structures du site actif des complexes RmPGI–βF6P (Figure XVII A),⁶⁷ TbPGI–G6P (Figure XVII B)⁶⁸ et RmPGI–6PGA (Figure XVII C)⁶⁹ montrent que le groupement hydroxyle en C2 du substrat (βF6P, G6P) ou de l'inhibiteur (6PGA) est potentiellement accessible pour un greffage covalent avec la surface d'or.

En revanche, les inhibiteurs connus les plus efficaces semblent particulièrement bien enfouis au sein du site actif de l'enzyme comme le montrent la Figure XVII D (RmPGI–5PAA)⁷⁰ et la Figure XVII E (RmPGI–5PAH)⁷¹ et sont donc peu accessibles à une fonctionnalisation.

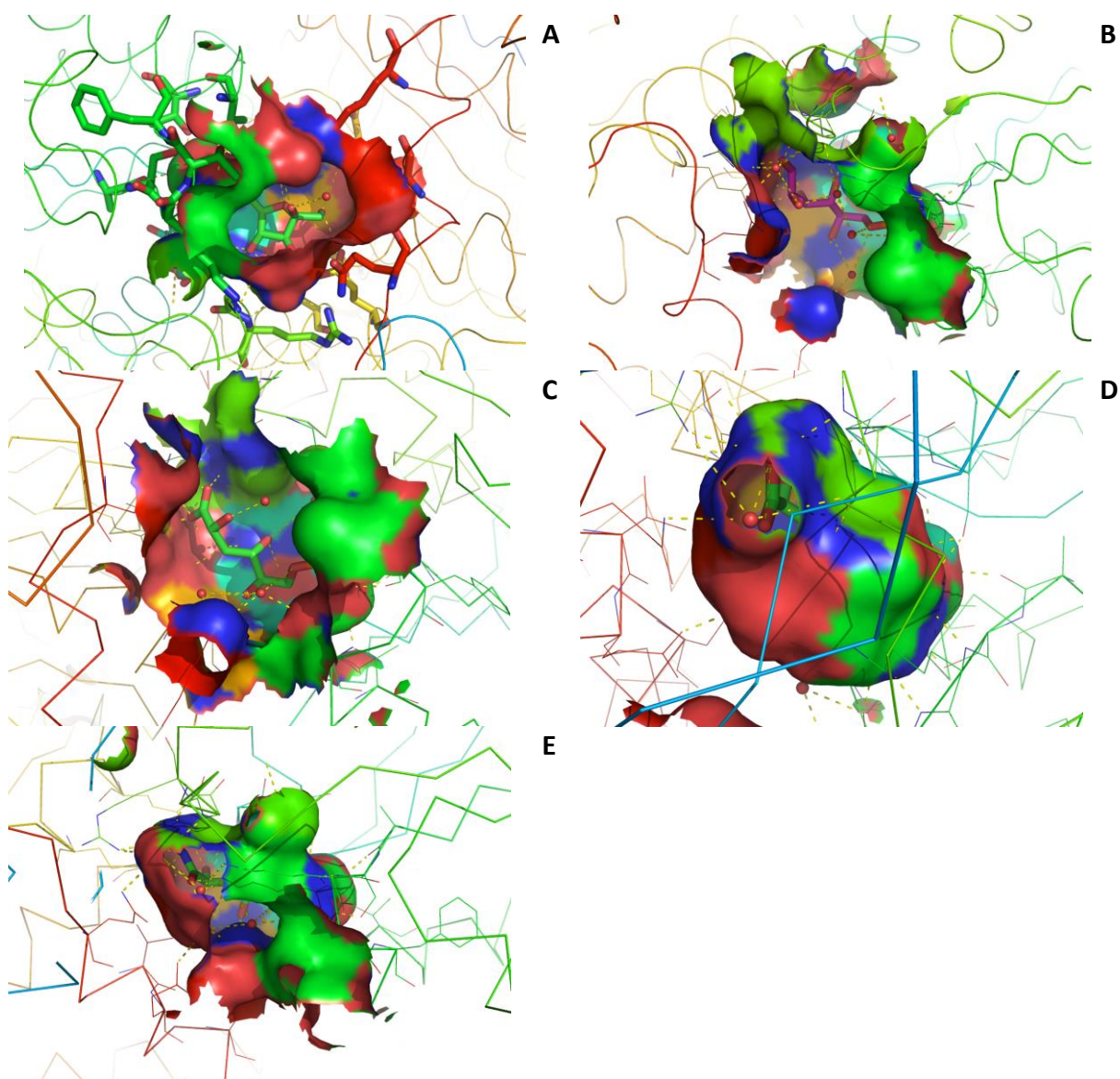


Figure XVII : Site actif de différents complexes AMF/PGI-substrat et AMF/PGI-inhibiteur obtenus avec le logiciel de visualisation Pymol. (A) RmPGI-βF6P, (B) TbPGI-G6P, (C) RmPGI-6PGA, (D) RmPGI-5PAA et (E) RmPGI-5PAH. Rm : rabbit muscle et Tb : *Trypanosoma brucei*.

Le F6P est choisi comme biorécepteur pour établir notre preuve de concept. Cette molécule étant le substrat de l'AMF/PGI, davantage d'informations cristallographiques sont disponibles. De plus, cette molécule étant commerciale, nous pouvons y avoir accès plus aisément. Il sera greffé par sa position C2 (Schéma XV).

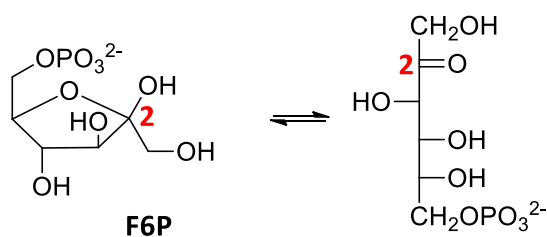


Schéma XV : Structure du biorécepteur F6P à greffer en position C2.

2.2.2. Choix du mode de liaison du biorécepteur

2.2.2.1. Ligations chimiosélectives

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, il existe différentes méthodes pour immobiliser un biorécepteur sur une surface. Nous avons choisi d'utiliser une **liaison covalente**. Un des objectifs de ma thèse est de développer une méthode de synthèse afin de lier covalamment un carbohydrate phosphaté à une molécule immobilisée sur la surface de l'électrode. Pour cela, nous avons utilisé des **ligations chimiosélectives** qui présentent l'avantage d'être facile à mettre en œuvre et ne nécessitant pas l'utilisation de groupements protecteurs.

Il existe de nombreuses méthodes de ligations chimiosélectives dont des exemples sont présentés sur le Schéma XVI. Elles sont efficaces pour permettre l'assemblage de biomolécules complexes. Ces ligations sont en effet réalisables en milieu aqueux à des pH proches d'un pH physiologique et compatibles avec la plupart des groupements fonctionnels présents dans les systèmes biomoléculaires comme les peptides, les oligosaccharides, les oligonucléotides ou encore les protéines.⁷²

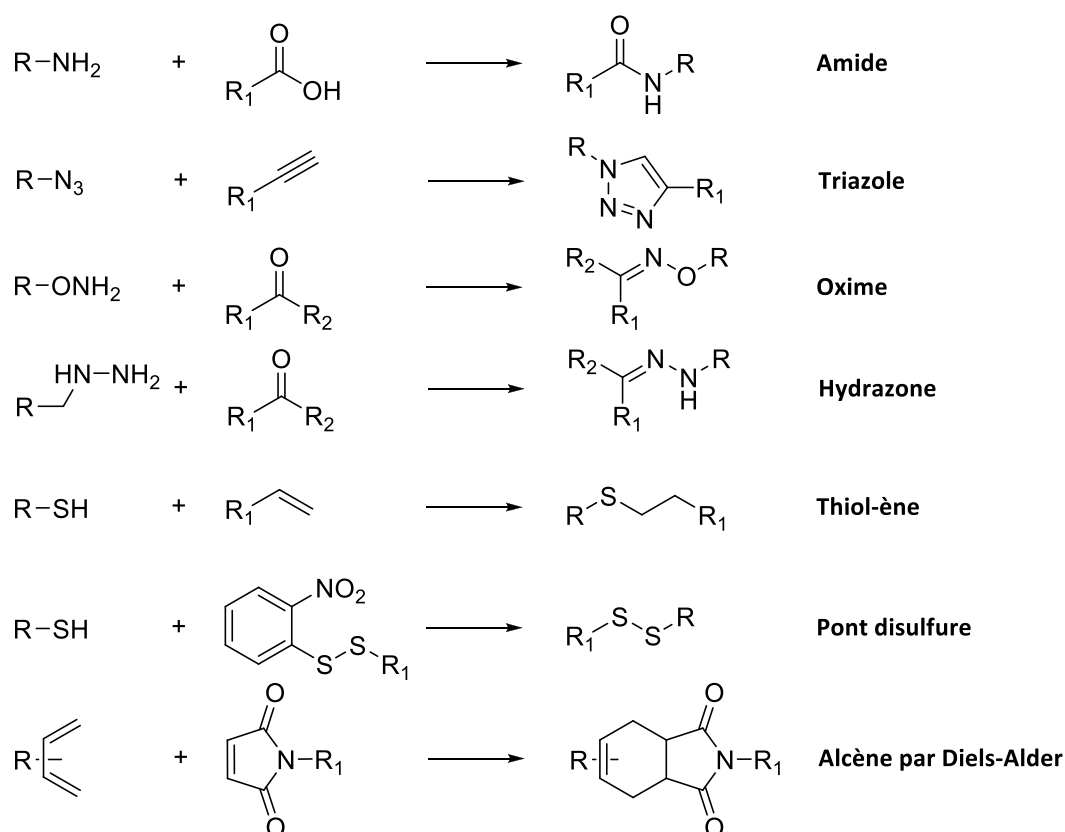


Schéma XVI : Exemples de ligations chimiosélectives pour le couplage covalent de biomolécules.

Dans notre cas, le biorécepteur est le F6P et doit être greffé par sa position C2 (ce que nous venons d'établir au paragraphe précédent). Sur la forme linéaire du F6P, il s'agit d'une fonction cétone (Schéma XV). Parmi les ligations chimiosélectives intéressantes, nous avons le choix entre un lien oxime ou un lien hydrazone. C'est le **lien oxime** (ligne 3 du Schéma XVI) qui a été choisi pour greffer le biorécepteur à la surface car il est couramment utilisé dans la construction de biocapteurs à base de sucres.

2.2.2.2. Lien oxime

La formation des éthers d'oxime (conduisant au lien communément appelé « lien oxime »), requiert une attaque nucléophile par l'oxyamine sur le composé carbonylé approprié (Schéma XVII).

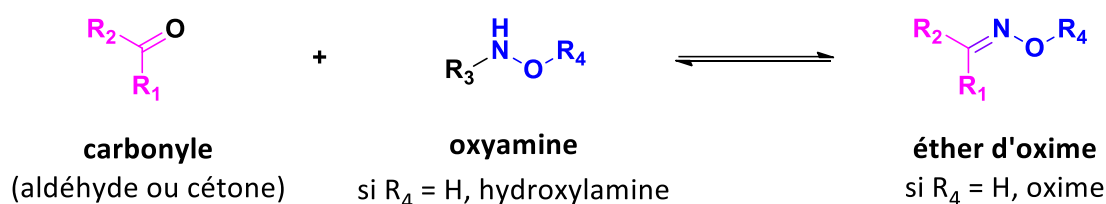


Schéma XVII : Réaction de formation d'un éther d'oxime.

Ce type de réaction a été étudié pour la première fois en 1959 par W. P. Jencks⁷³ puis utilisé bien plus tard en 1994 par K. Rose pour la synthèse de protéines de haut poids moléculaire.⁷⁴ Cette ligation présente de nombreux intérêts. La formation du lien oxime se déroule dans des **conditions aqueuses légèrement acides** (dans une gamme de pH allant de 3 à 5). Plus précisément un **pH autour de 4,5** est souvent optimal. En effet, une valeur plus basse renverse le caractère nucléophile de l'oxyamine car celle-ci sera sous forme protonnée, ce qui réduit la vitesse de l'attaque en première étape. À titre d'exemple, $pK_a(H_3N^+-O-CH_3 / H_2N-O-CH_3) = 4,6$. De plus, cette réaction est généralement **quantitative** avec une **cinétique de réaction rapide**. Et pour finir, ce lien est **stable** dans une gamme de pH allant de 2 à 9 et en milieu biologique.⁷⁵

La formation d'un lien carbone-azote double relativement rigide permet aux oximes d'exister sous forme *anti* et *syn* (Schéma XVIII). À l'état solide, les deux isomères sont stables tandis qu'en solution les deux espèces sont typiquement en équilibre. Le produit *anti* thermodynamiquement favorisé par la minimisation des répulsions stériques est généralement observé en plus grande proportion⁷⁶. L'isomérisation des formes *anti* ou *syn* pures en conditions légèrement acides a été observée par Lee et ses collaborateurs dans le cadre d'une étude sur le réarrangement de Beckmann.⁷⁷

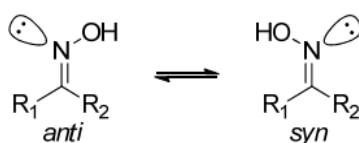


Schéma XVIII : Représentation des isomères *anti* et *syn* d'une oxime. Le groupement R₁ est considéré prioritaire sur le groupement R₂ selon les règles de Cahn, Ingold et Prelog.

Un des premiers exemples de greffage d'une biomolécule utilisant un lien oxime a été décrit par Mutter et coll. pour la synthèse d'un analogue glycosylé de la somatostatine RC-160.⁷⁸ Dans cet exemple, les auteurs ont utilisé un peptide fonctionnalisé par un groupe oxyamine qui a été condensé avec l'extrémité réductrice aldéhyde d'un trisaccharide (Schéma XIX).

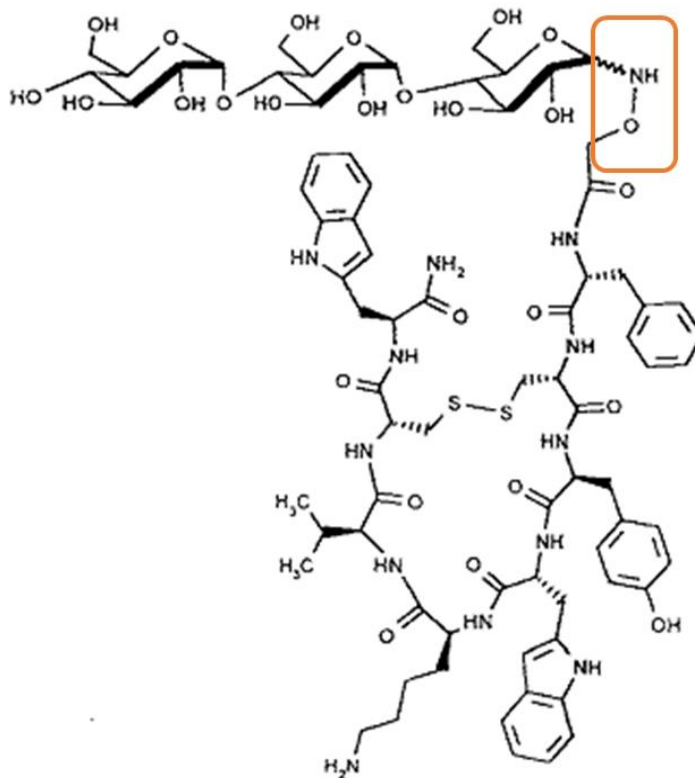


Schéma XIX : Analogue de la somatostatine RC-160 synthétisé par l'équipe de Mutter et coll. via un lien oxime encadré en orange. Image tirée directement de leur publication⁷⁸.

Un grand nombre d'exemples ont été ensuite décrits par différents groupes, en particulier l'équipe de C. R. Bertozzi. Un des exemples récents de ce groupe a montré qu'il est possible de suivre l'embryogénèse des poissons Zébra via les résidus sialylés de la surface cellulaire par un processus d'oxydation et de marquage par un composé fluorescent oxyaminé (Schéma XX).⁷⁹

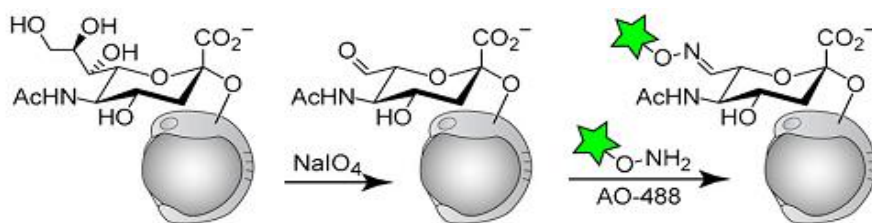


Schéma XX : Étapes de marquage des résidus sialylés présentés à la surface cellulaire par un composé fluorescent oxyaminé. Image tirée directement de la publication de l'équipe de C. R. Bertozzi⁷⁹.

Dans une étude récente, Dawson et coll. ont montré que l'utilisation d'aniline peut servir de catalyseur nucléophile durant la formation d'éthers d'oxime.^{80,81} En effet, ceci induit la formation d'une quantité significative de la base de Schiff correspondante à pH 7 évoluant rapidement vers le produit attendu (Schéma XXI). Dans ses publications de 2006, l'équipe de Dawson montre que la réaction entre l'extrémité aldéhydique du premier peptide avec l'extrémité oxyaminé du deuxième peptide (présents tous deux à une concentration de 100 mM) va 30 fois plus vite en présence de 10 mM d'aniline et 430 fois plus vite avec 100 mM d'aniline.⁸⁰

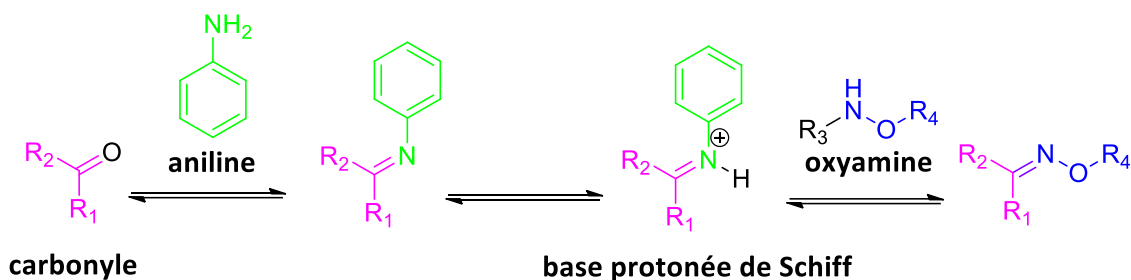


Schéma XXI : Formation d'un lien oxime en présence d'aniline.

2.2.3. Mise en place de l'espaceur oxyamine

Maintenant que nous avons choisi le transducteur (électrode d'or activée fonctionnalisée par des extrémités $-NH_2$), le biorécepteur (F6P) et le mode de liaison du biorécepteur (par un lien oxime), il nous faut définir de quelle manière obtenir des extrémités oxyamines à la surface de l'électrode d'or fonctionnalisée.

2.2.3.1. Choix de l'oxyamine

La molécule que nous avons choisie est l'acide aminooxyéthanoïque. Cette molécule pourra être greffée aux groupements $-NH_2$ de la surface *via* son extrémité acide carboxylique par une liaison peptidique et son extrémité oxyamine restera libre pour le greffage du biorécepteur (Schéma XXII).

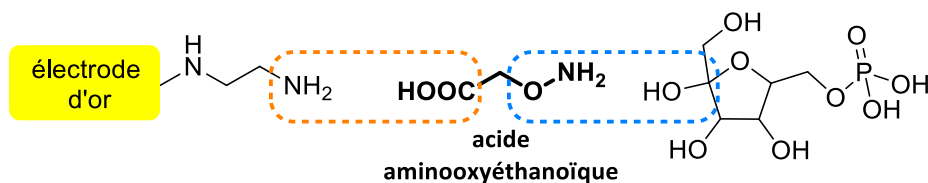


Schéma XXII : Structure de l'acide aminooxyéthanoïque et stratégie de greffages.

Pour pouvoir greffer l'oxyamine aux amines libres de la surface de l'électrode *via* une liaison peptidique, il nous faut au préalable synthétiser son équivalent protégé au niveau de l'oxyamine, par un groupement Boc par exemple. Ainsi, nous avons synthétisé l'acide (Boc)aminooxyéthanoïque.

2.2.3.2. Synthèse de l'acide (Boc)aminooxyéthanoïque

L'acide (Boc)aminooxyéthanoïque est synthétisé à partir d'acide 2-(aminooxy)éthanoïque, de triéthylamine et de dicarbonate de di-*tert*-butyle dans du dichlorométhane, à pression atmosphérique, à température ambiante, durant 10 heures (Schéma XXIII).⁸² Le composé est obtenu avec un rendement de 95 % sous forme d'une poudre blanche conformément à la littérature.

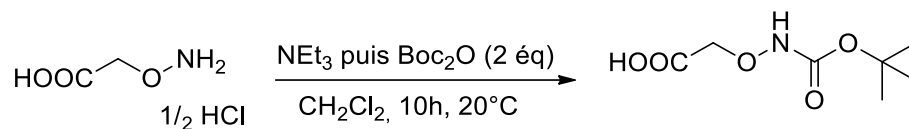


Schéma XXIII : Synthèse de l'acide (Boc)aminooxyéthanoïque.

2.3. Bilan : stratégie choisie pour la construction

Une fois déterminés les différents composants constitutifs du biocapteur (transducteur fonctionnalisé, bras espaceur et biorécepteur), nous allons pouvoir construire le premier biocapteur pour la détection de l'AMF/PGI.

2.3.1. Schéma général de construction du biocapteur

La stratégie d'élaboration que nous allons employer comporte sept étapes (Schéma XXIV).

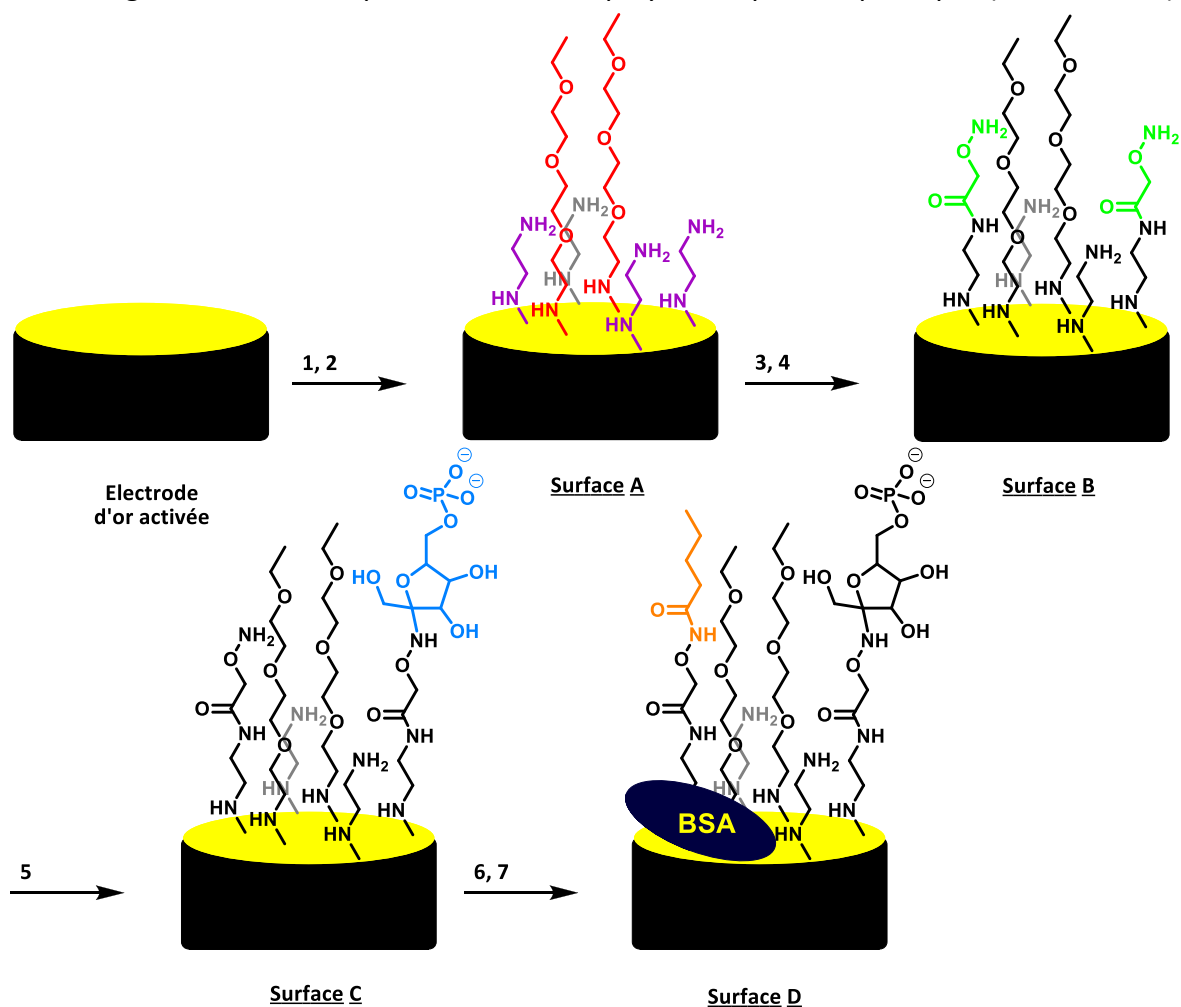


Schéma XXIV : Schéma général de construction du biocapteur.

Les deux premières correspondent à la **fonctionnalisation de la surface** par *électrodéposition de l'éthylène diamine* et *électrodéposition du polyéthylène glycol aminé*, conduisant à la surface A. L'immobilisation de l'éthylène diamine (étape 1) par des liaisons covalentes assure la formation du film avec des extrémités amines à la surface de l'électrode. Ensuite, l'électrodéposition du polyéthylène glycol aminé (étape 2) permet d'éviter les adsorptions non spécifiques sur la surface, son intérêt sera mis en évidence juste après.

Les deux suivantes permettent le **greffage de l'oxyamine** en immobilisant l'*acide (Boc)aminoxyéthanoïque* (étape 3) puis en hydrolysant le *groupement dicarbonate de di-tert-butyle (Boc)* (étape 4). Ces deux étapes conduisent à la surface B.

S'ensuit le **greffage du biorécepteur** (étape 5) conduisant à la surface C, et pour finir, la nécessité de faire un **blocage de la surface** en deux étapes : *blocage des extrémités oxyamines* n'ayant pas réagi avec l'*acide pentanoïque* (étape 6) et *blocage des espaces d'or par l'albumine de sérum bovin (BSA)* (étape 7). Ces deux dernières étapes mènent à la surface D, correspondant au biocapteur final. Chaque étape va être détaillée dans le chapitre 3 suivant.

2.3.2. Mise en évidence de l'intérêt du polyéthylène glycol de l'étape 3

Afin de prouver que le polyéthylène glycol empêche bien les adsorptions non spécifiques de l'enzyme à la surface, deux électrodes d'or ont été polies et activées à l'acide sulfurique, puis du polyéthylène glycol aminé a été électrodéposé sur l'une d'entre elles, dans les mêmes conditions que précédemment. Ensuite, ces deux électrodes ont chacune été incubées dans des solutions de concentrations croissantes d'enzyme RmPGI (de 100 pM à 100 nM). Les électrodes sont lavées puis analysées dans une solution de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans PBS pH 7,4 (Figure XVIII).

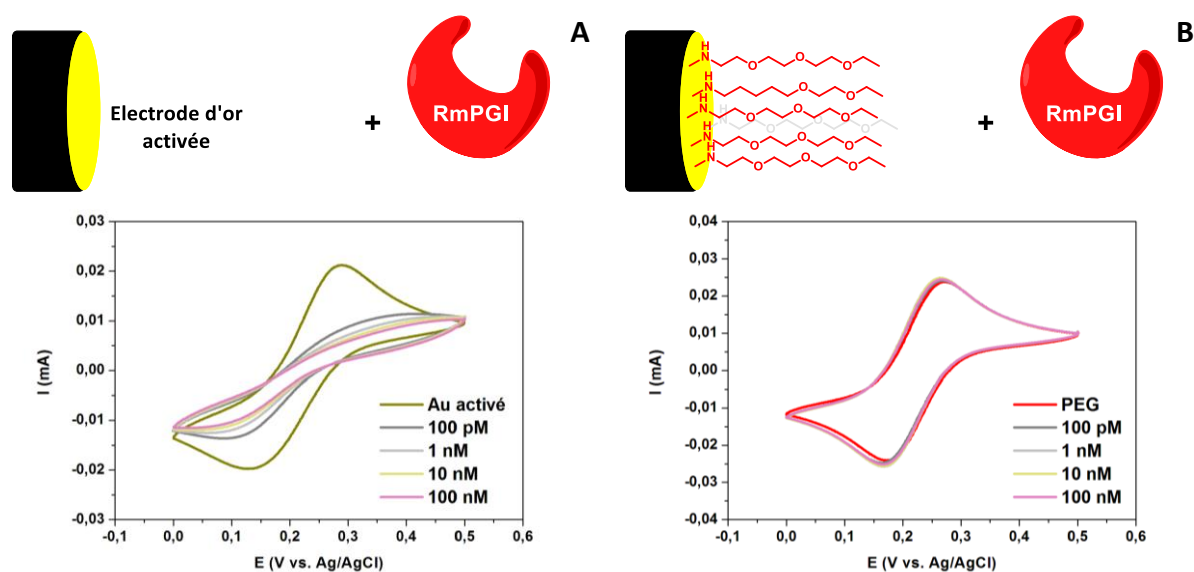


Figure XVIII : (A) Voltammogramme cyclique de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ d'une électrode d'or activée en contact avec différentes concentrations de RmPGI. (B) Voltammogramme cyclique de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3/4}$ d'une électrode d'or activée et où du PEG a été électrodéposé en contact avec différentes concentrations de RmPGI.

Le voltammogramme de l'électrode d'or activée seule (Figure XVIII A) montre que le signal de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ est très fortement modifié lorsque l'on rajoute des concentrations croissantes d'enzyme sur la surface. De plus, plus la concentration est importante, et plus l'intensité du signal diminue, ce qui signifie que la surface devient de moins en moins conductrice car l'enzyme s'y est adsorbée de manière non spécifique et bloque le transfert de charge.

En revanche, lorsque la surface d'or est « protégée » par le PEG (Figure XVIII B), le signal électrochimique de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ reste identique après les ajouts successifs de concentrations croissantes de RmPGL. Ceci signifie que l'enzyme ne s'adsorbe pas du tout sur la surface, prouvant ainsi que le PEG permet de diminuer les adsorptions non spécifiques de l'enzyme sur la surface d'or.

2.3.3. Optimisation de l'étape 4 de déprotection

Trois conditions de déprotection ont été testées avant de choisir celle utilisée à l'étape 4 de la construction du biocapteur : la première est une solution d'acide chlorhydrique à 2 M dans de l'acide acétique, la deuxième est un mélange équimolaire d'acide trifluoroacétique et dichlorométhane et la troisième est une solution d'acide chlorhydrique à 3 M dans de l'acétate d'éthyle.

L'objectif de cette étude est de trouver la méthode de déprotection la plus efficace parmi les trois testées, c'est-à-dire celle qui permet d'avoir le plus d'oxyamines libres à la surface de l'électrode après réaction. Pour cela, l'étude consiste à faire réagir ces extrémités libres avec une molécule électro-active. Ainsi, lorsque nous analysons la surface par voltampérométrie après la réaction, un pic apparaît au potentiel d'oxydo-réduction de la molécule greffée. À partir de ce pic, le taux de greffage (appelé aussi taux de recouvrement) en molécule électro-active peut être déterminé, ce qui nous permet d'en déduire le nombre d'oxyamines libres à la surface.

La molécule électro-active choisie pour évaluer l'efficacité des trois méthodes de déprotection testées est le **ferrocène**. Une fois les électrodes incubées dans chacune des trois solutions acides (*étape A*), il réagit avec les oxyamines libres de par l'un de ses esters *N*-hydroxyphthalimide (*étape B*). Ces groupements sont très réactifs et il faut donc bloquer l'autre extrémité du ferrocène avec une molécule neutre (ici l'**éthanolamine**) afin d'assurer la stabilité du signal électrochimique lors des analyses (*étape C*). Un schéma synthétique de cette étude est présenté sur le Schéma XXV.

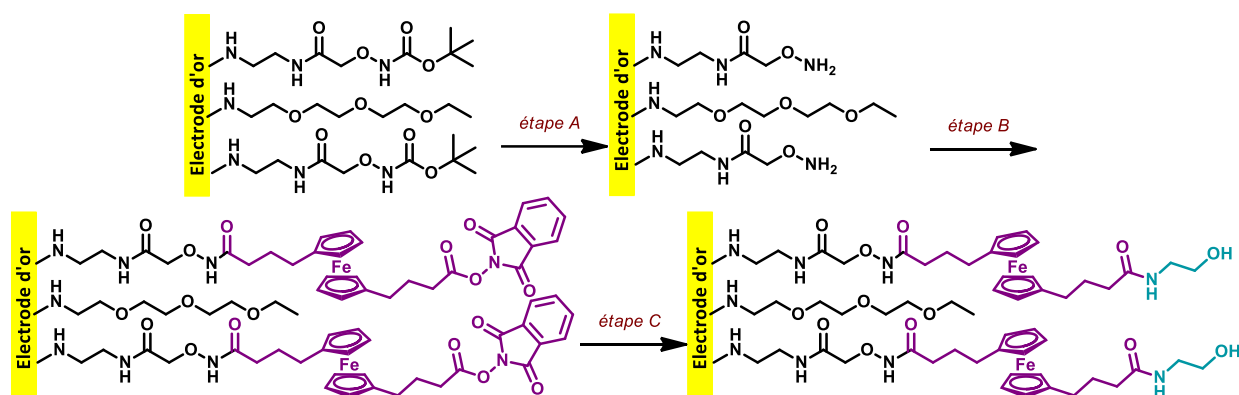


Schéma XXV : Schéma de synthèse utilisé pour estimer la qualité des déprotections réalisées.

Etape A : déprotection du groupement Boc suivant trois conditions différentes. Etape B : greffage du ferrocène di-NHP (à 10 mM dans ACN, 1 h 30 à température ambiante). Etape C : blocage des extrémités du ferrocène avec l'éthanolamine (à 20 mM dans PBS pH 7,4), EDC (à 100 mM dans PBS pH 7,4) et NHS (à 100 mM dans PBS pH 7,4), 1 h à température ambiante.

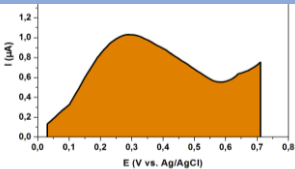
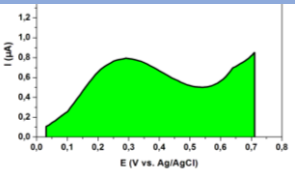
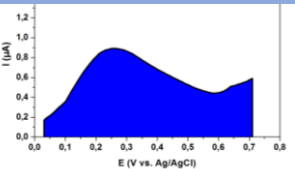
Le taux de recouvrement Γ en ferrocène est exprimé selon la formule donnée ci-après où Q représente la charge électrique échangée au cours du processus redox (exprimée en Coulombs), n le nombre d'électrons échangés entre l'oxydant et le réducteur (ici $n = 1$ électron), F la constante Faraday ($F = 96485 \text{ C/mol}$) et A la surface de l'électrode ($A = 0,0201 \text{ cm}^2$).

$$\Gamma = \frac{Q}{n \cdot F \cdot A}$$

Équation III : Taux de recouvrement en ferrocène.

La charge est calculée à partir de l'intégration du pic d'oxydo-réduction du ferrocène visible de 0,1 à 0,6 V sur les voltammogrammes présentés dans le Tableau IV avec les résultats obtenus.

Tableau IV : Calcul du taux de recouvrement en ferrocène pour chacune des trois méthodes de déprotection utilisées, à partir des analyses de voltampérométrie à vague carrée effectuées dans du PBS à pH 7,4 de 0 à 0,7 V, à 50 mV/s.

	Conditions 1 HCl 2 M/CH ₃ COOH	Conditions 2 TFA/DCM (1/1)	Conditions 3 HCl 3 M/AcOEt
			
Q	22,22 mC	14,21 mC	20,39 mC
Γ	11,46 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$	7,33 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$	10,51 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$

Le meilleur taux de recouvrement est obtenu lorsque la déprotection est effectuée dans les conditions 1. Nous avons donc déprotégé l'oxyamine par une solution d'acide chlorhydrique à 2 M dans de l'acide acétique.

2.3.4. Choix des molécules de blocage des étapes 6 et 7

Les extrémités oxyamines présentes à la surface de l'électrode et qui n'ont pas réagi avec le F6P et également les espaces interstitiels d'or de l'électrode peuvent provoquer des interactions non spécifiques avec l'enzyme. Il faut donc les bloquer, c'est-à-dire les rendre inactifs vis-à-vis de l'AMF/PGL.

2.3.4.1. Polarité de surface de la PGL

Pour trouver une molécule de blocage qui n'interagira pas avec l'enzyme, nous avons tout d'abord analysé la polarité en surface de l'enzyme qui servira à faire nos tests de biocapteur : la PGL de muscle de lapin (RmPGL) qui possède un haut degré d'homologie avec l'AMF humaine. La Figure XIX présente deux vues de la RmPGL complexée avec le F6P (PDB 1HOX) montrant la polarité de surface de l'enzyme. Les acides aminés polaires sont représentés en bleu et les acides aminés hydrophobes en rouge.

Nous pouvons voir sur cette figure que les acides aminés présents à la surface de la protéine sont majoritairement polaires. Ainsi, pour éviter les interactions de cette protéine avec la surface, il faudrait bloquer les fonctions réactives avec une chaîne alkyle par exemple. Nous avons choisi de greffer l'acide pentanoïque.

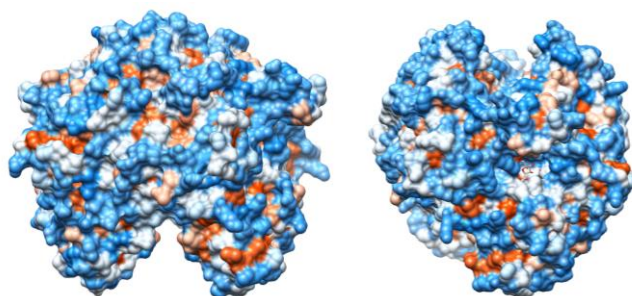


Figure XIX : Deux vues de la RmPGI complexée au F6P (PDB 1HOX) montrant la polarité de surface. Rouge : + hydrophobe ; bleu : -hydrophobe.

2.3.4.2. Preuve de l'efficacité des étapes de blocage

Afin de vérifier que l'acide pentanoïque empêche les adsorptions non spécifiques de l'enzyme à la surface, une électrode d'or est préparée suivant le même mode opératoire de construction des étapes 1 à 6. Elle est ensuite incubée dans des solutions de concentrations croissantes d'enzyme RmPGI (de 100 pM à 100 nM). Puis après des étapes de lavages, elle est analysée dans une solution de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans PBS pH 7,4 (Figure XX A).

La même expérience a été réalisée avec une électrode d'or polie, activée à l'acide sulfurique et avec de l'albumine de sérum bovin déposée à la surface afin de prouver que celle-ci empêche les adsorptions non spécifiques de l'enzyme sur l'électrode (Figure XX B).

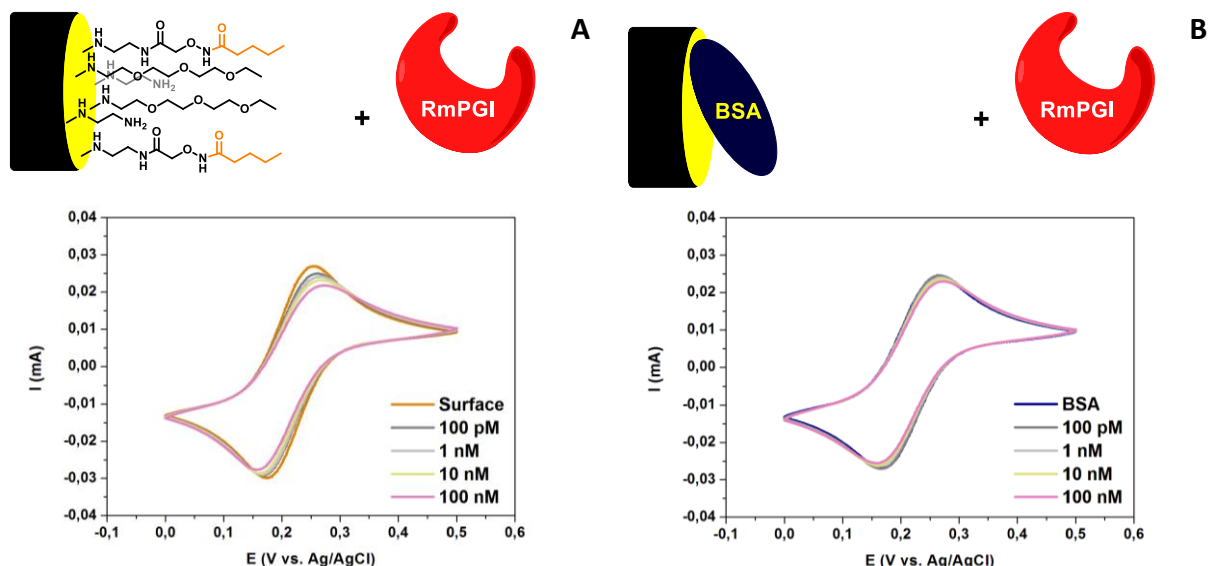


Figure XX : (A) Voltammogramme cyclique de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ d'une électrode d'or activée + ED + PEG + OxNH₂, et où les extrémités oxyamines sont bloquées par de l'acide pentanoïque, en contact avec différentes concentrations de RmPGI. (B) Voltammogramme cyclique de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ d'une électrode d'or activée + BSA, en contact avec différentes concentrations de RmPGI.

Nous pouvons voir d'après la Figure XX A que l'intensité du signal $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ varie très peu en fonction des concentrations croissantes de RmPGi ajoutées, lorsque les oxyamines sont bloquées par de l'acide pentanoïque. La chaîne alkyle protège bien des interactions non spécifiques avec la protéine.

Cette même expérience a été réalisée avec de l'acide succinique, la surface de l'électrode est alors davantage polaire puisque c'est une fonction acide carboxylique qui se retrouve à l'extrémité à la place de la chaîne alkyle avec l'acide pentanoïque. Les analyses, présentées à l'**annexe 2**, montrent une très forte variation du signal $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ prouvant qu'il y a interaction entre la surface de l'électrode et l'enzyme, ce que nous voulons éviter. L'acide succinique n'était donc pas un bon candidat pour notre étude.

D'après la Figure XX B, nous pouvons voir qu'il n'existe aucune interaction entre la BSA et l'enzyme puisqu'aucune modification du signal $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ est observée. La BSA empêchera bien les adsorptions non spécifiques à la surface du biocapteur.

Chapitre 3. Élaboration et évaluation des performances du biocapteur

Dans ce chapitre, les sept étapes de construction du biocapteur vont être détaillées. À chacune d'elles, des analyses ont été réalisées par voltampérométrie, spectroscopie d'impédance ou angle de contact à l'eau pour prouver la faisabilité et la bonne reproductibilité de l'étape en question. Des tests de stabilité de surface ont régulièrement été réalisés pour vérifier qu'aucune dégradation n'avait lieu au cours du temps. De plus, l'utilité/nécessité de chaque élément de construction du biocapteur est démontré. Ensuite, les performances du biocapteur élaboré pour la détection de l'AMF/PGI ont été évaluées, de manière à déterminer notamment la limite de détection du biocapteur et sa sélectivité.

3.1. Élaboration du biocapteur pour la détection de l'AMF/PGI

3.1.1. Construction étape par étape

Avant de commencer, chaque électrode est lavée, polie et activée suivant la procédure décrite auparavant, c'est-à-dire : **activation dans une solution d'acide sulfurique dégazée sous argon à 0,5 M, de 0 à 1,8 V durant 10 cycles à 100 mV/s**, de manière à avoir des surfaces qui soient bien toutes équivalentes et donc avoir des expériences reproductibles.

3.1.1.1. Fonctionnalisation de la surface (surface A)

La fonctionnalisation de la surface s'effectue en deux étapes (Schéma XXVI) : *électrodéposition de l'éthylène diamine* et *électrodéposition du polyéthylène glycol aminé*. L'immobilisation de l'éthylène diamine (étape 1) par des liaisons covalentes assure la formation du film avec des extrémités amines à la surface de l'électrode. Ensuite, l'électrodéposition du polyéthylène glycol aminé (étape 2) permet d'éviter les adsorptions non spécifiques sur la surface, comme nous l'avons montré au paragraphe 2.3.2.

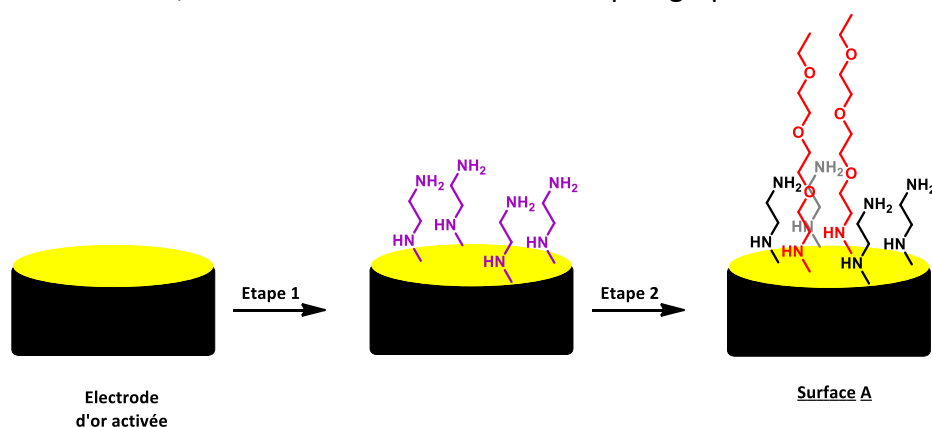


Schéma XXVI : Schéma de la fonctionnalisation de la surface d'or.

La première étape a déjà été décrite au paragraphe 2.1.2.1. Il s'agit de l'électrodéposition d'éthylène diamine à **1 M dans LiClO₄ à 0,5 M dans l'eau** dans une gamme de potentiel allant de **0 à 0,7 V** durant **6 cycles** à une vitesse de **50 mV/s**.

Pour la deuxième étape, il s'agit également d'une électrodéposition d'une molécule aminée. Le mode opératoire est sensiblement semblable à l'étape 1. Le polyéthylène glycol aminé est en solution à **10 mM dans LiClO₄ à 0,5 M** dans l'acétonitrile. Un balayage de potentiel allant **de 0 à 1,1 V** durant **10 cycles** à une vitesse de **50 mV/s** est effectué de manière à avoir une saturation complète de l'électrode.

3.1.1.2. Greffage de l'oxyamine (surface B)

Le greffage de l'oxyamine s'effectue en deux étapes (Schéma XXVII) : *greffage de l'acide (Boc)aminooxyéthanoïque* et *déprotection du groupement dicarbonate de di-tert-butyle (Boc)*.

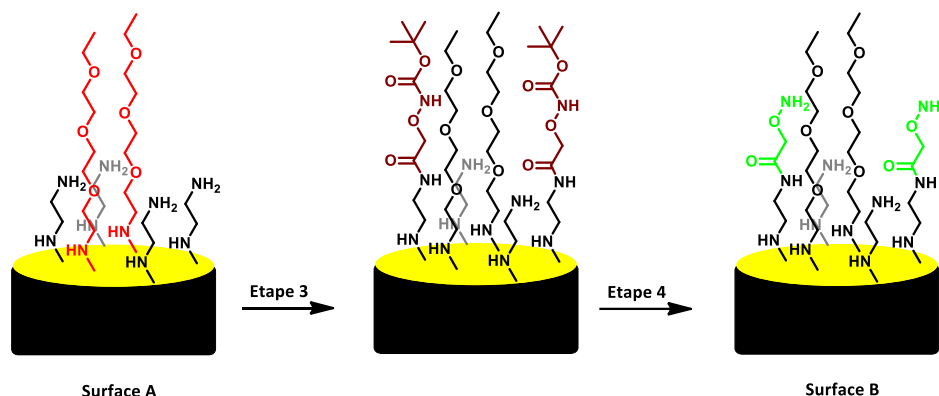


Schéma XXVII : Schéma du greffage de l'oxyamine.

Lors de l'étape 3, l'acide (Boc)aminooxyéthanoïque est greffé covalamment aux extrémités aminées libres par une liaison amide par l'intermédiaire d'un ester activé, *via* l'utilisation d'agents de couplage, le 1-éthyl-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et le N-hydroxysuccinimide (NHS).

Puis à l'étape 4, le groupement dicarbonate de di-tert-butyle est déprotégé en milieu acide de manière à faire apparaître l'oxyamine libre. Plusieurs conditions de déprotection ont été envisagées. Elles sont présentées au paragraphe suivant.

3.1.1.3. Greffage du biorécepteur (surface C)

Le greffage du biorécepteur se fait en une seule étape, c'est la cinquième étape de construction du biocapteur (Schéma XXVIII). Le 6-phosphate-D-fructose est en équilibre entre sa forme cyclique et sa forme ouverte. En solution il est majoritairement cyclique (à 99 %), en revanche les éthers d'oxime sont connus pour être plutôt sous forme linéaire. Ainsi, nous ne savons pas sous quelle forme le biorécepteur se trouve une fois lié à l'électrode par le lien oxime.

À l'étape 5, l'électrode est incubée dans une solution de 6-phosphate-D-fructose à pH 4,6 durant une nuit à 50 °C. Comme nous l'avons vu au paragraphe 2.2.2.2, un pH autour de 4,5 est optimal pour réaliser cette réaction entre l'extrémité oxyamine de la surface et la forme linéaire du sucre. Le détail mécanistique est présenté sur le Schéma XXIX où R représente la surface de l'électrode.

À cette étape, il a fallu de nombreux essais pour trouver les conditions de temps et de température optimale pour effectuer ce greffage. En effet, dans la littérature, les exemples décrits concernent le greffage de monosaccharides non phosphatés ou bien d'oligosaccharides. Ces méthodes de greffage n'ont ainsi pas pu être utilisées dans notre cas où le sucre concerné est un monosaccharide phosphaté.

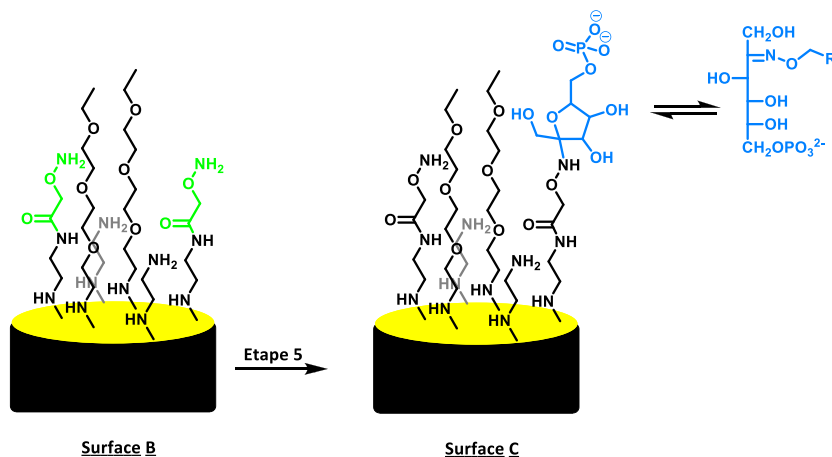


Schéma XXVIII : Schéma du greffage du biorécepteur.

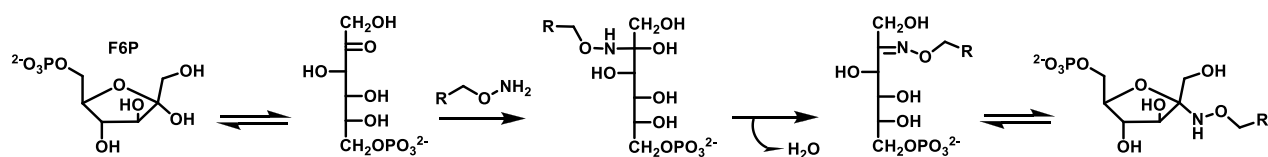


Schéma XXIX : Mécanisme du greffage du biorécepteur.

3.1.1.4. Blocage de la surface (surface D)

De manière à réduire au minimum les interactions non spécifiques potentielles de l'électrode avec la protéine à détecter, le blocage de la surface s'effectue en deux étapes (Schéma XXX) : *blocage des extrémités oxyamines n'ayant pas réagi avec l'acide pentanoïque* et *blocage des espaces d'or par l'albumine de sérum bovin (BSA)*.

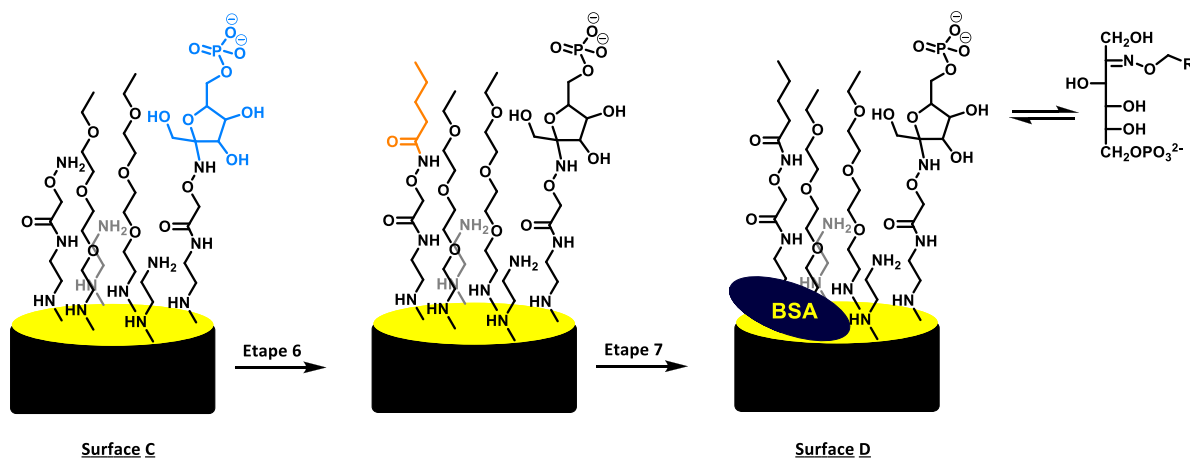


Schéma XXX : Schéma du blocage de la surface.

L'étape 6 est effectuée en plongeant l'électrode dans une solution de PBS contenant de l'acide pentanoïque, de l'EDC et du NHS durant 5,5 heures à température ambiante. Lors de l'étape 7, l'électrode est immergée dans une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) dans un mélange de PBS/Tween pendant 10 minutes à température ambiante (20 °C).⁸³

3.1.2. Confirmation des modifications de surface

3.1.2.1. Analyses par voltampérométrie cyclique

La Figure XXI illustre les réponses en voltampérométrie cyclique de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sur les électrodes à chaque modification majeure de la surface menant au biocapteur anti-AMF/PGI. Les quatre principales étapes de construction du biocapteur rappelées ci-dessous.

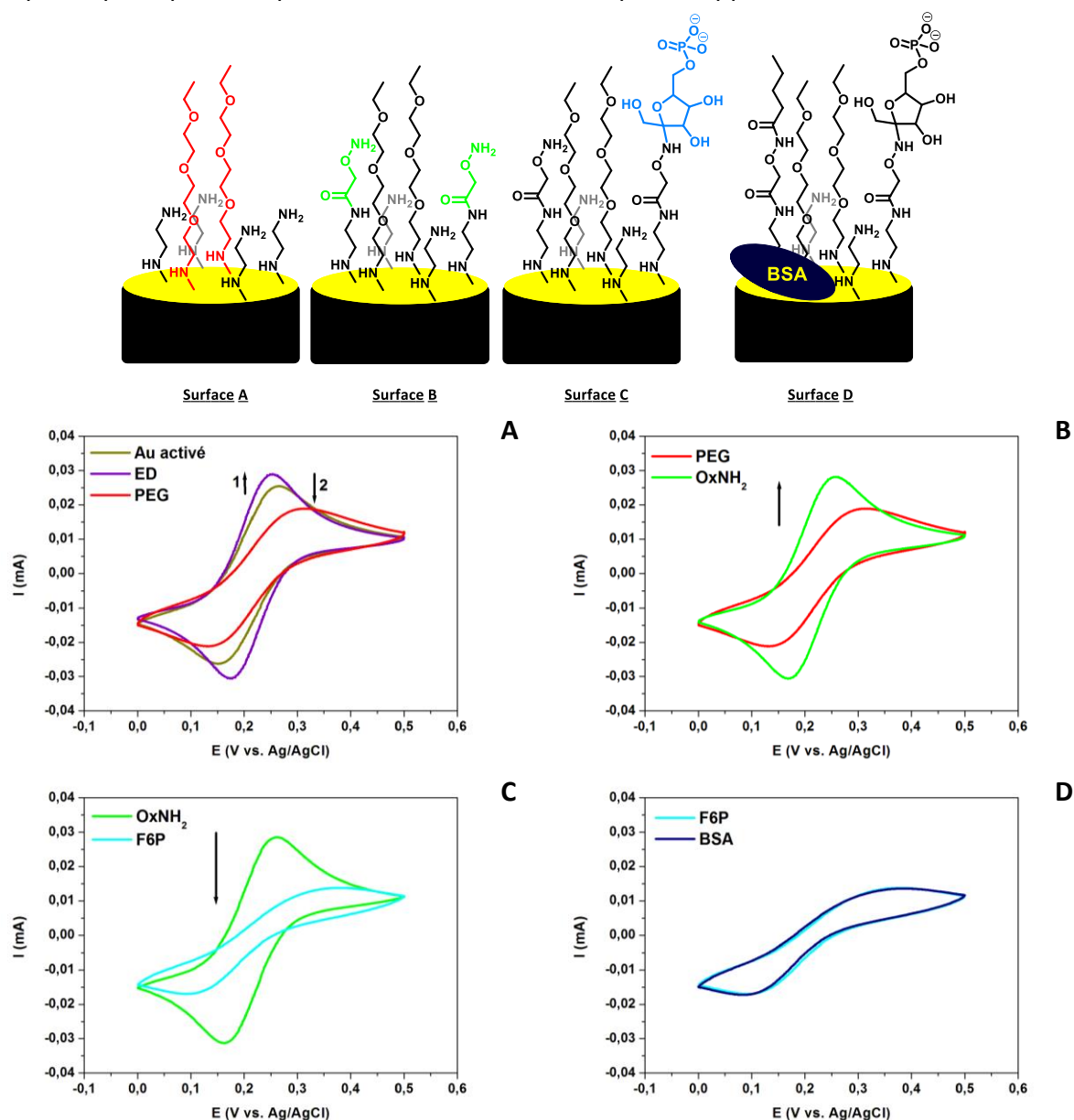


Figure XXI : Voltammogrammes cycliques de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ montrant l'élaboration du biocapteur, à une vitesse de balayage de 50 mV/s. (A) Pour arriver à la surface A, (B) pour arriver à la surface B, (C) pour arriver à la surface C et (D) pour arriver à la surface D.

Tableau V : Récapitulatif des valeurs des intensités maximales des pics anodiques (pa) et cathodiques (pc) (en mA), ainsi que les valeurs des potentiels correspondants aux abscisses de ces pics (en V vs. Ag/AgCl).

	i_{pa}^{max}	i_{pc}^{max}	E_{pa}^{max}	E_{pc}^{max}	ΔE_p (mV)
1 Au activé	0,025	-0,026	0,26	0,15	110
2 ED	0,029	-0,030	0,25	0,17	80
3 PEG	0,019	-0,021	0,30	0,14	160
4 OxNH ₂	0,029	-0,031	0,25	0,16	90
5 F6P	0,013	-0,017	0,34	0,11	230
6 BSA	0,013	-0,017	0,34	0,11	230

Pour arriver à la surface A il faut faire deux étapes (Figure XXI A et Tableau V 1.1-3).

Après l'électrodéposition de l'éthylène diamine (**ED**) (étape 1), les intensités maximales au niveau des pics d'oxydation/réduction augmentent et la différence de potentiels ΔE_p diminue, ce qui indique que le système tend à devenir plus réversible. Cette augmentation de la réversibilité et de l'intensité est probablement due à l'apparition de charges positives à la surface de l'électrode. En effet, les amines sont protonées à pH 7, pH du tampon phosphate utilisé pour faire les analyses.

Par contre, après l'électrodéposition du polyéthylène glycol aminé (**PEG**) (étape 2), les intensités maximales des pics d'oxydation/réduction diminuent considérablement et le ΔE_p des pics varie fortement en passant à 160 mV. Ceci indique que les réactions d'oxydo-réduction associées à $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ sont bloquées par la surface modifiée. Ceci est sans aucun doute provoqué par l'encombrement stérique de la double couche par les chaînes PEG.

Pour arriver à la surface B, deux étapes ont eu lieu : tout d'abord le greffage covalent de l'acide (Boc)aminooxyéthanoïque puis sa déprotection en milieu acide conduisant à l'oxyamine libre (**OxNH₂**) (Figure XXI B et Tableau V 1.3-4).

Les intensités maximales des pics d'oxydation/réduction augmentent fortement après le greffage de l'oxyamine et le ΔE_p diminue, ce qui indique que la vitesse des réactions est nettement augmentée. Cela est certainement dû au fait que le couplage peptidique entre l'éthylène diamine et l'acide (Boc)aminooxyéthanoïque a obligé le PEG à se repositionner perpendiculairement à la surface de manière à permettre à la sonde d'atteindre la surface d'or plus rapidement pour subir la réaction d'oxydo-réduction.

Pour arriver à la surface C, une seule étape suffit : le greffage covalent du 6-phosphate-D-fructose (**F6P**) en milieu tamponné légèrement acide. Le greffage du sucre phosphaté entraîne une diminution remarquable des intensités maximales au niveau des pics d'oxydation/réduction et une augmentation très importante de ΔE_p (Figure XXI C et Tableau V 1.4-5), ce qui indique que le système est devenu nettement moins réversible. Cette diminution de la réversibilité est due à l'apparition de charges négatives à la surface de l'électrode, gênant la sonde qui parvient plus difficilement à atteindre la surface métallique pour subir la réaction d'oxydo-réduction.

Pour finir, la surface D est obtenue après blocage des espaces interstitiels de l'électrode par de l'acide pentanoïque puis de l'albumine de sérum bovin (**BSA**). D'après l'allure du voltammogramme cyclique (Figure XXIV D), les blocages n'ont pas eu d'impact sur les réactions redox. Les deux courbes sont en effet superposables avec les mêmes valeurs caractéristiques des pics anodiques et cathodiques (Tableau V 5.5-6).

3.1.2.2. Analyses par spectroscopie d'impédance

Dans notre cas, les données d'impédance sont fittées par un circuit équivalent de type **Randles** (Schéma XXXI) où R_s est la résistance de l'électrolyte, R_{ct} est la résistance de transfert de charge, W est l'élément de Warburg, tandis que la capacité de la double couche (C) est remplacée par l'élément de phase constant (**CPE**).

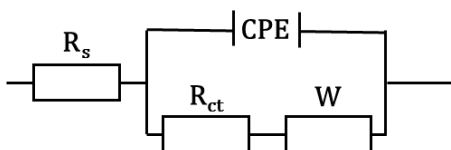


Schéma XXXI : Circuit électrique de type Randles équivalent à notre double-couche.

La Figure XXII montre les diagrammes de Nyquist obtenus après les quatre principales étapes de construction du biocapteur rappelées ci-dessous.

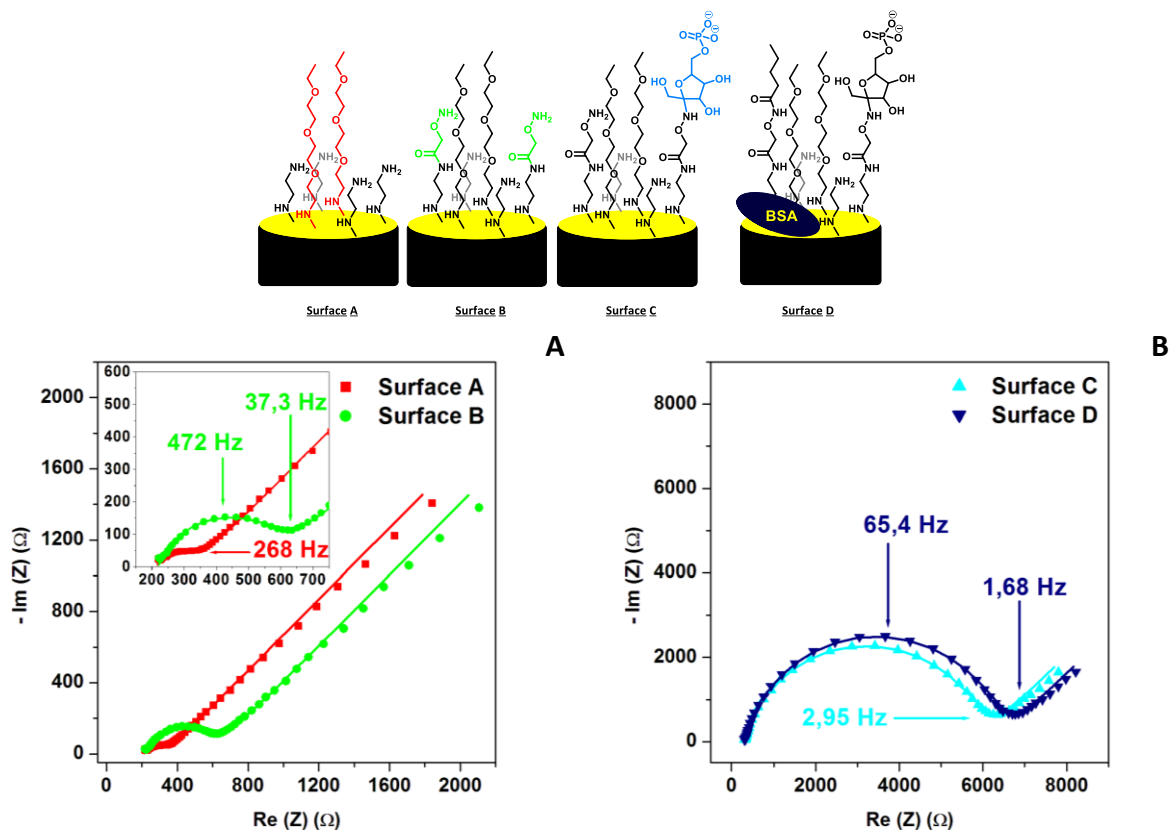


Figure XXII : Diagrammes de Nyquist obtenus après les quatre principales étapes de construction du biocapteur. Les graphes ont été réalisés dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans PBS, pH 7,4, dans une gamme de fréquence allant de 100 kHz à 0,1 Hz. Les symboles sont les données expérimentales tandis que les traits pleins correspondent aux courbes de fit utilisant le circuit électrique de type Randles équivalent. (A) Surfaces A (carrés rouges) et B (ronds verts), avec un zoom montré en insert.

(B) Surfaces C (triangles cyans pointes en haut) et D (triangles bleus pointes en bas).

Les valeurs de chaque paramètre des composants du circuit électrique Randles équivalent à notre biocapteur ont été déterminées par fitting des données d'impédance. Elles sont présentées dans le Tableau VI.

Tableau VI : Données des différents paramètres du fitting d'impédance. χ^2 donne une estimation de la distance entre les données réelles et les données ajustées, plus la valeur est basse et plus le fitting est bon.

	R_s / Ω	R_{ct} / Ω	$A_w / \Omega \cdot s^{-0,5}$	$Q / \mu F \cdot s^{n-1}$	n	χ^2
Surface A	214,9 ± 0,3	126 ± 1	1156,0 ± 0,5	4,2 ± 0,5	0,86	0,03995
Surface B	219,8 ± 0,3	390 ± 1	1152,0 ± 0,3	4,0 ± 0,1	0,86	0,03874
Surface C	308,9 ± 0,2	5672,0 ± 0,7	1378,0 ± 0,5	0,920 ± 0,001	0,86	0,05713
Surface D	313,0 ± 0,2	6119,0 ± 0,7	1386,0 ± 0,5	0,805 ± 0,001	0,86	0,06107

Tout d'abord il peut être remarqué que la valeur de n est aux environs de 0,86 ce qui est cohérent avec un circuit comportant une CPE et non une capacité. Cela nous indique que la distribution de la constante de temps n'est pas uniforme sur toute la surface, c'est-à-dire qu'il y a une rugosité de surface.

Ensuite, nous voyons que la surface A, correspondant à l'électrode modifiée après le greffage du polyéthylène glycol aminé (PEG), montre un semi-cercle de diamètre plus faible qu'après le greffage de l'oxyamine OxNH₂ (surface B). Cela correspond à une augmentation de la résistance de transfert de charge de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} et effectivement la R_{ct} est passée de 126 Ω à 390 Ω (d'après le Tableau VI) après le greffage de l'oxyamine. Lorsque l'on arrive à la surface C, correspondant à l'addition du F6P sur l'oxyamine, la R_{ct} qui était à 390 Ω passe à 5672 Ω . Il y a une importante augmentation de la valeur de R_{ct} dû à l'encombrement causé par l'addition du F6P sur la surface de l'électrode. Le passage à la surface D, correspondant au biocapteur final (dont la dernière étape de construction est le blocage par la BSA), conduit à une nouvelle augmentation de R_{ct} , mais moindre, qui passe de 5672 Ω à 6119 Ω .

3.1.2.3. Analyses par angle de contact à l'eau des étapes 1 et 2

Ddes mesures d'angles de contact à l'eau ont également été réalisées sur des plaques d'or activées puis modifiées par les étapes 1 et 2 (Figure XXIII).

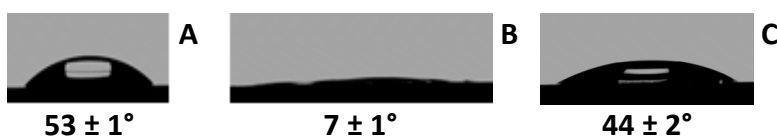


Figure XXIII : Mesures des angles de contact d'une plaque d'or activée (A), d'une plaque d'or activée puis avec de l'éthylène diamine électrodéposée (B) et d'une plaque d'or activée puis avec de l'éthylène diamine et du polyéthylène glycol aminé électrodéposés (C).

L'angle vaut 53 ± 1° sur l'or activé et diminue jusqu'à 7 ± 1° après l'électrodéposition de l'éthylène diamine. Ceci est dû à l'apparition de charges positives à la surface de la plaque (groupements -NH₃⁺) au contact de l'eau. La surface est donc extrêmement polaire ce qui provoque l'étalement de la goutte sur la plaque. Ce changement d'hydrophilie nous assure que la surface a bien été modifiée.

Il augmente considérablement lors de l'ajout du polyéthylène glycol en passant à $44 \pm 2^\circ$. Ceci est logique car le polyéthylène glycol possède une chaîne hydrophobe qui va faire diminuer l'hydrophilie de la surface. Nous avons bien modifié la surface d'or.

3.1.3. Études des stabilités de surface

Des études de stabilité après les quatre principales étapes de construction du biocapteur rappelées ci-dessous ont été réalisées. Ces études comprennent l'incubation de l'électrode dans du PBS pH 7,4 pendant un certain temps et son analyse par spectroscopie d'impédance de manière à contrôler les modifications de la surface éventuelles.

La Figure XXIV présente, pour chaque surface, une superposition des diagrammes de Nyquist obtenus au cours de la stabilisation.

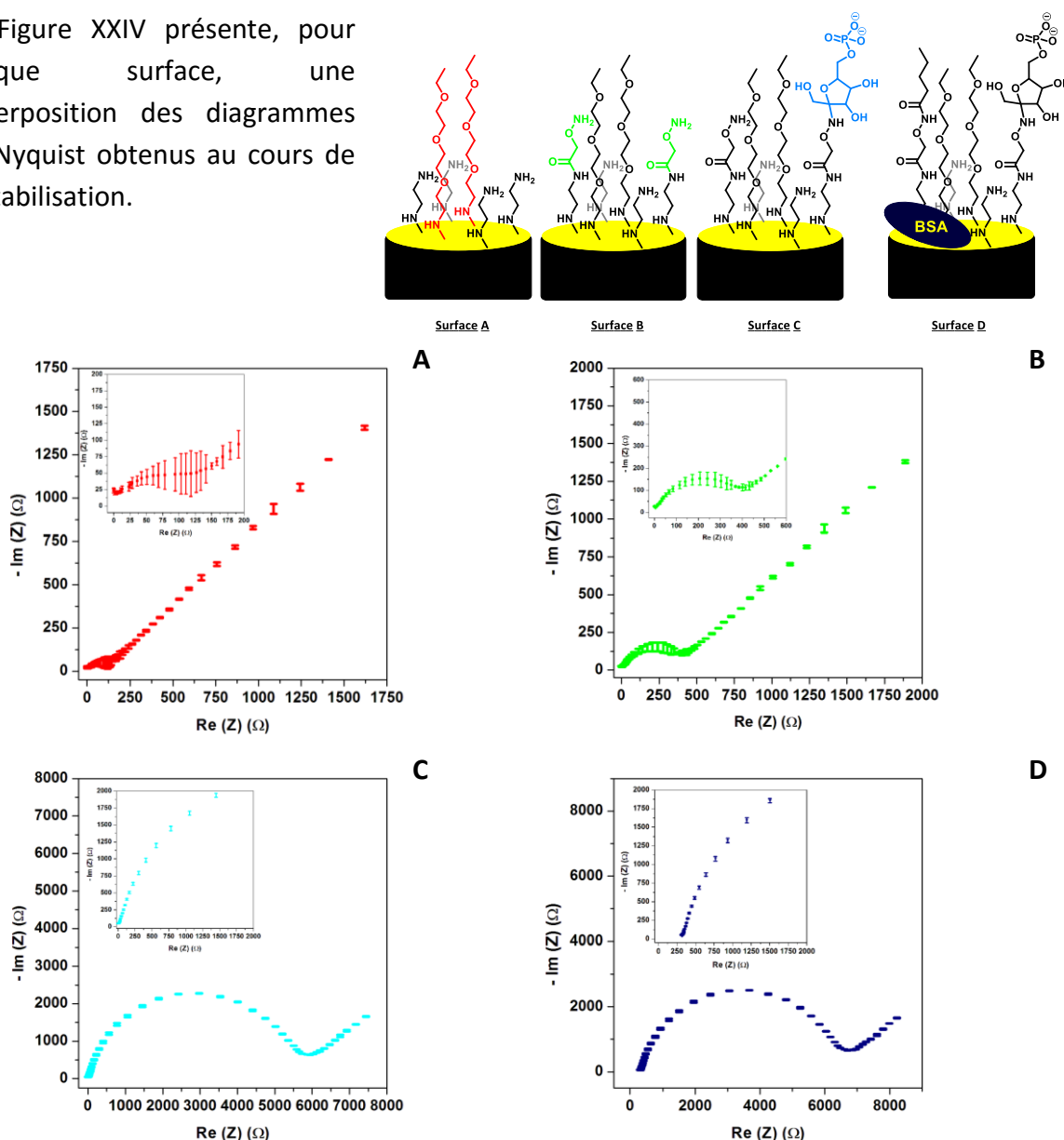


Figure XXIV : Étude par spectroscopie d'impédance de la stabilité des surface A (diagramme en A), B (diagramme en B), C (diagramme en C) et D (diagramme en D). Les diagramme de Nyquist montrent la moyenne des quatre mesures faites à intervalles de 30 min lors d'une stabilisation de l'électrode durant 1 h 30 dans PBS avec les écart-types correspondants aux variations lors de la stabilisation. L'expérience a été renouvelée sur plusieurs électrodes et montre toujours ce même profil. Un zoom aux hautes fréquences est montré en insert.

La Figure XXIV montre que la réponse électrochimique de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ne varie que très peu au cours du temps après chacune des quatre principales étapes de construction du biocapteur. Cela signifie que les surfaces A, B, C et D sont stables. Ces informations permettent de valider que les modifications de la réponse électrochimique de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ observées lors des différentes étapes de construction du biocapteur proviennent bien des réactions de greffage sur l'électrode et non d'une dégradation des molécules présentes à la surface.

La stabilité de la surface D, correspondant au biocapteur final pour la détection de l'AMF/PGI, a été étudiée sur une plus longue durée (10 h au lieu de 1 h 30) par voltampérométrie cyclique dans une solution de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans PBS pH 7,4. Quinze analyses ont été réalisées durant 10 h. Les résultats sont présentés sur la Figure XXV qui montre la stabilité au cours du temps de l'intensité des pics d'oxydation et de réduction de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ de quatre électrodes élaborées indépendamment.

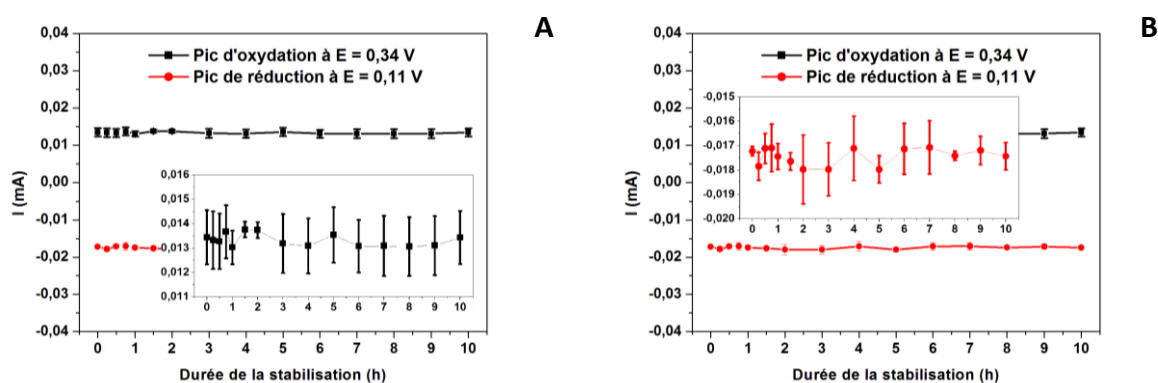


Figure XXV : Étude par voltampérométrie cyclique de la stabilité de la surface D sur quatre électrodes, durant 10 heures avec quinze analyses. (A) Stabilité de l'intensité du pic d'oxydation (A) et de réduction (B) du signal $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ avec un zoom montré en insert indiquant les écart-types des quatre électrodes étudiées.

L'intensité des pics reste identique au cours du temps, ce qui prouve que la surface est stable dans la période de temps considérée. Ainsi, nous pouvons nous concentrer sur l'évaluation des performances du tout premier biocapteur pour la détection de l'AMF/PGI que nous venons d'élaborer.

3.2. Performances du biocapteur élaboré

Les propriétés les plus importantes d'un biocapteur sont : 1) qu'il détecte la plus faible concentration en analyte, 2) qu'il soit spécifique de l'analyte et 3) qu'il soit reproductible. Chacune de ces propriétés va être approfondie et étudiée dans le cas du biocapteur élaboré pour la détection de l'AMF/PGL.

3.2.1. Limite de détection et sensibilité

3.2.1.1. Utilisation d'une enzyme modèle

Pour tester notre biocapteur, nous avons utilisé une enzyme modèle : la phosphoglucose isomérase (PGI) de muscle de lapin. Cette enzyme possède un haut degré d'homologie (93 %) avec l'AMF/PGL humaine. Tous les acides aminés au voisinage du site actif sont conservés. Un alignement de séquence est présenté sur la Figure XXVI. L'avantage de l'utilisation de cette enzyme modèle est qu'elle est commerciale et que c'est une protéine dont les propriétés structurales et catalytiques sont bien connues notamment dans l'équipe.

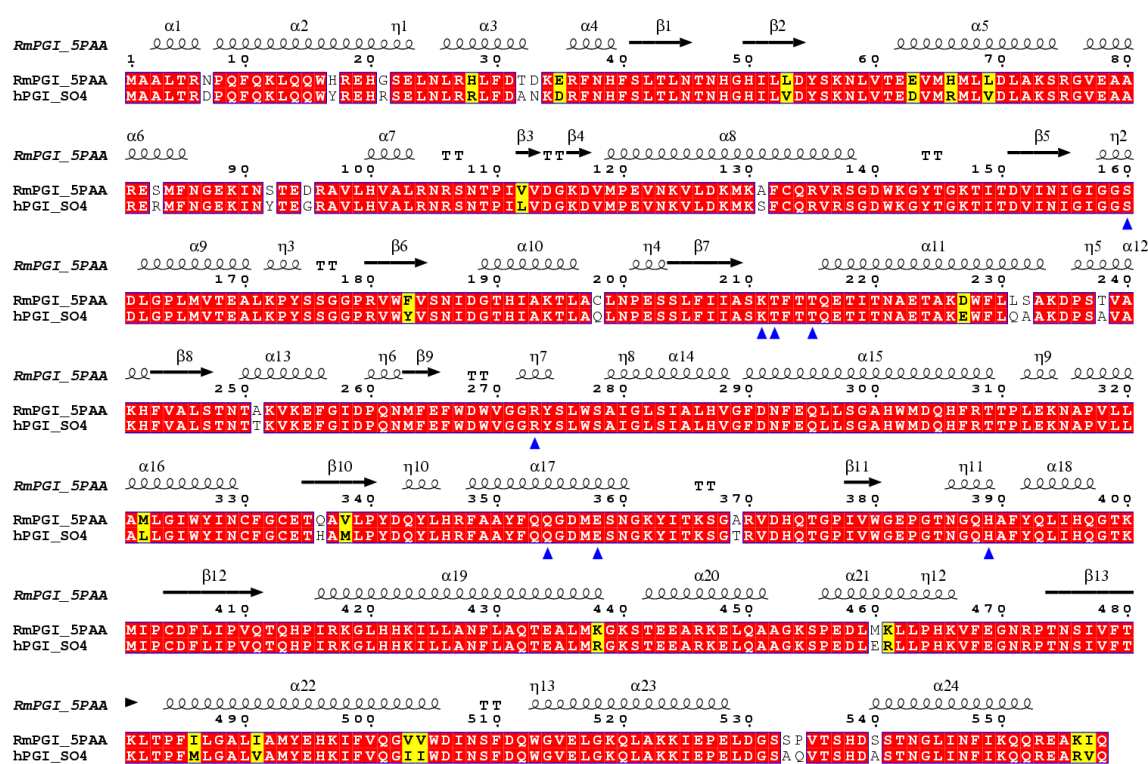


Figure XXVI : Alignement de séquence entre l'AMF/PGL humaine et celle de lapin. Les acides aminés du site actif sont pointés par les triangles bleus. Les acides aminés identiques sont surlignés en rouge, les acides aminés fortement similaires sont en jaune et les faiblement similaires ne sont pas surlignés.

Avant de faire les tests avec le biocapteur, l'activité spécifique de l'enzyme vs. le F6P a été mesurée et la valeur est estimée à 1,6 mU/μL (en très bon accord avec la valeur théorique commerciale de 2,0 mU/μL). Ainsi nous nous sommes assurés que l'enzyme n'était pas dénaturée. Le principe de l'évaluation de l'activité de la RmPGI est expliqué dans l'annexe 3.

3.2.1.2. Gamme de détection de RmPGI

La phosphoglucose isomérase de muscle de lapin (RmPGI) a été détectée dans une gamme de concentration variant de **10 fM à 100 nM**. Toutes les solutions ont été préparées dans un tampon Tris à 50 mM (pH 8,0), filtrées à l'aide de micro-filtres et maintenues à 0 °C avant utilisation. L'électrode biocapteur est incubée avec la solution de RmPGI à la concentration désirée durant 1 heure à température ambiante. Le biocapteur est ensuite lavé et analysés par voltampérométrie cyclique, voltampérométrie à vague carrée et impédancemétrie.

Voltampérométrie cyclique et voltampérométrie à vague carrée

La Figure XXVII illustre les réponses en CV et SWV de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ sur les électrodes après incubation avec chacune des huit concentrations de RmPGI.

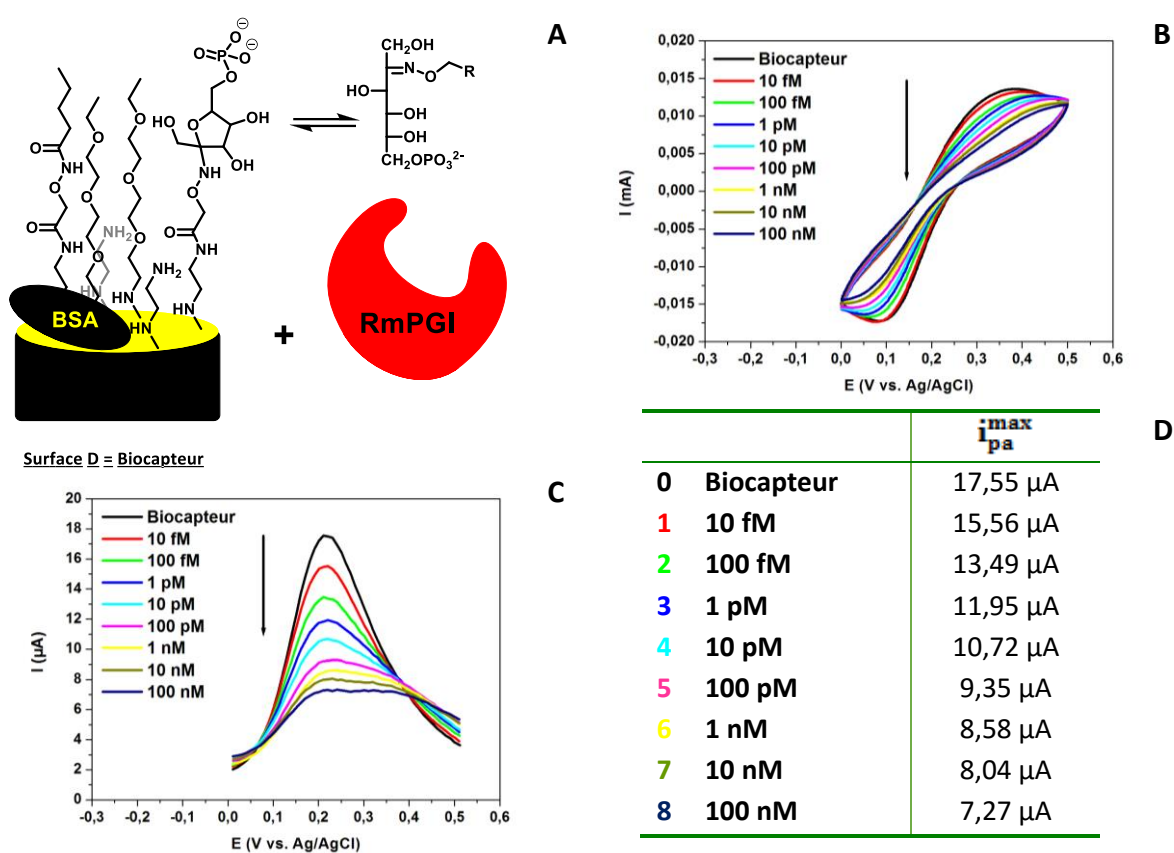


Figure XXVII : (A) Rappel de la structure du biocapteur. (B) Voltammogrammes cycliques de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ montrant la gamme de détection, à une vitesse de balayage de 50 mV/s. (C) Voltammogrammes à vague carrée de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ montrant la gamme de détection, à une vitesse de balayage de 50 mV/s. (D) Récapitulatif des valeurs des intensités maximales des pics anodiques (i_{pa}) provenant de la voltampérométrie à vague carrée pris à un potentiel de 0,21 V vs. Ag/AgCl.

Nous voyons sur les figures B et C que les intensités de courant maximales au niveau des pics d'oxydation/réduction diminuent progressivement lorsque la concentration d'enzyme à détecter augmente (tableau en D). Les potentiels correspondants aux abscisses de ces pics restent stables à 0,21 V vs. Ag/AgCl. Cette diminution indique que les réactions d'oxydo-réduction sont de plus en plus difficiles à se réaliser à la surface de l'électrode. Ceci s'explique par l'encombrement stérique lié à la formation du complexe enzyme—substrat sur la surface.

Spectroscopie d'impédance

La Figure XXVIII montre les diagrammes de Nyquist obtenus après chacune des huit concentrations de RmPGI testées.

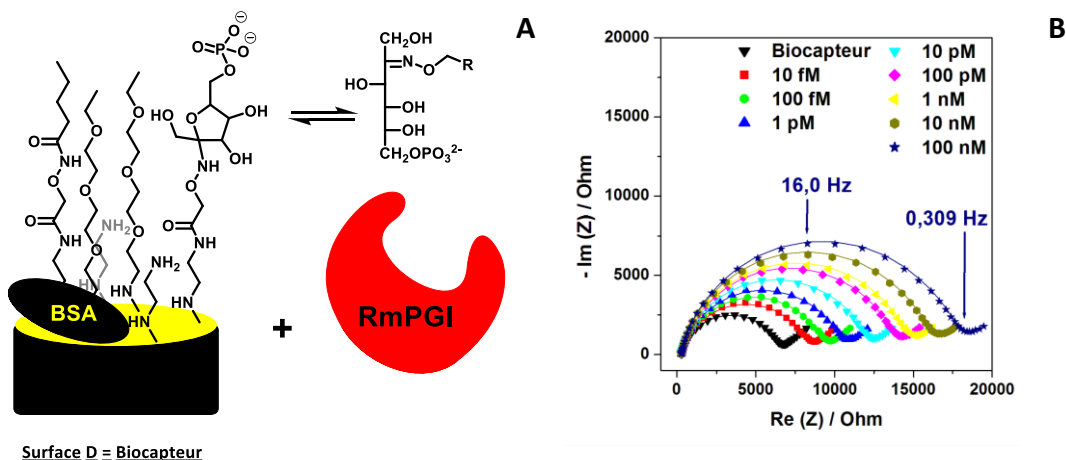


Figure XXVIII : (A) Rappel de la structure du biocapteur. (B) Diagrammes de Nyquist obtenus après chacune des huit concentrations de RmPGI testées (de 10 fM à 100 nM). Les graphes ont été réalisés dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans PBS, pH 7,4, dans une gamme de fréquence allant de 100 kHz à 0,1 Hz. Les symboles sont les données expérimentales tandis que les traits plein correspondent aux courbes de fit utilisant le circuit électrique de type Randles équivalent.

Les valeurs de chaque paramètre des composants du circuit équivalent électrique de Randles lié au biocapteur ont été déterminées par fitting des données d'impédance. Elles sont présentées dans le Tableau VII.

Tableau VII : Données des différents paramètres du fitting d'impédance. χ^2 donne une estimation de la distance entre les données réelles et les données ajustées, plus la valeur est basse et plus le fitting est bon. Les écart-types donnés dans ce tableau sont ceux établis par le logiciel lors du fitting.

		R_s / Ω	R_{ct} / Ω	$A_w / \Omega \cdot s^{-0,5}$	$Q / nF \cdot s^{-n-1}$	n	χ^2
▼	Biocapteur	$313,0 \pm 0,2$	$6119,0 \pm 0,7$	$1386,0 \pm 0,5$	805 ± 1	0,86	0,06107
■	10 fM	$311,9 \pm 0,2$	$7956,0 \pm 0,7$	$1394,0 \pm 0,5$	934 ± 1	0,86	0,05309
●	100 fM	$307,0 \pm 0,2$	$8954,0 \pm 0,7$	$1372,0 \pm 0,6$	$896,7 \pm 0,9$	0,86	0,06588
▲	1 pM	$279,8 \pm 0,2$	$10162,0 \pm 0,7$	$1328,0 \pm 0,6$	$952,2 \pm 0,8$	0,86	0,05627
▼	10 pM	$247,9 \pm 0,2$	$11867,0 \pm 0,7$	$1237,0 \pm 0,6$	$980,1 \pm 0,7$	0,86	0,05811
◆	100 pM	$269,1 \pm 0,2$	$13513,0 \pm 0,7$	$1290,0 \pm 0,7$	$928,3 \pm 0,6$	0,86	0,04785
◀	1 nM	$303,8 \pm 0,2$	$14306,0 \pm 0,7$	$1281,0 \pm 0,7$	$902,3 \pm 0,5$	0,86	0,05482
◆	10 nM	$290,7 \pm 0,2$	$15751,0 \pm 0,7$	$1255,0 \pm 0,7$	$859,3 \pm 0,5$	0,86	0,05316
★	100 nM	$280,8 \pm 0,2$	$17570,0 \pm 0,7$	$1253,0 \pm 0,8$	$912,9 \pm 0,4$	0,86	0,05476

Comme le montrent la Figure XXVIII et le Tableau VII, plus la concentration d'enzyme à détecter est importante, et plus le diamètre du semi-cercle augmente. Cela signifie que la résistance de transfert de charge de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ devient de plus en plus grande, effectivement la valeur de R_{ct} est passée progressivement de 6119 Ω à 17570 Ω lorsque l'on détecte la RmPGI de 10 fM à 100 nM. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par SWV.

3.2.1.3. Estimation de la limite de détection

Afin de pouvoir estimer la limite de détection et la sensibilité du biocapteur, une courbe de calibration a été réalisée à partir de résultats obtenus par spectroscopie d'impédance en mesurant la variation de transfert de charge normalisée $\Delta R_{ct}/R_{ct0}$ sur quatre électrodes indépendantes. Les résultats sont présentés sur la Figure XXIX.

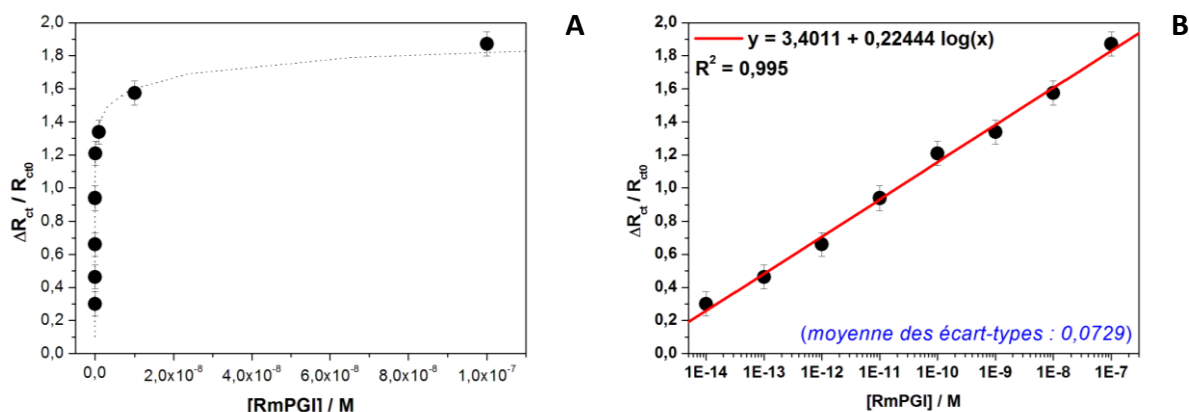


Figure XXIX : Courbes de calibration établies à partir des résultats de spectroscopie d'impédance, en échelle non logarithmique (A) et en échelle logarithmique (B).

Ces courbes de calibration montrent une grande gamme dynamique de détection s'étendant de 10 fM à 100 nM. L'équation de la droite d'étalonnage correspondante est : $\Delta R_{ct}/R_{ct0} = 3,4011 + 0,22444 \log(x)$. Le calcul de la limite de détection est effectué comme décrit dans la méthode au paragraphe 1.4.1. Le s_a de $\Delta R_{ct}/R_{ct0}$ pris en compte est 0,0729.

$$x_{LD} = 10^{\left(\frac{-a+3s_a}{b}\right)} = 6,6 \text{ fM}$$

Nous obtenons donc une limite de détection de 6,6 fM.

3.2.2. Sélectivité

3.2.2.1. Utilisation d'une enzyme modèle

Pour tester la sélectivité du biocapteur que nous avons élaboré, nous avons utilisé une enzyme modèle : la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette enzyme a été choisie pour deux raisons. La première est qu'elle a pour substrat le G6P, dont la structure est très proche de notre biorécepteur F6P. La deuxième est qu'elle est présente à de faibles concentrations dans le plasma humain.

Tout comme pour la PGI de muscle de lapin, l'activité spécifique de la ScG6PDH a été évaluée avant de l'utiliser comme témoin. Une activité spécifique de 0,61 mU/ μ L a été obtenue.

3.2.2.2. Gamme de détection de ScG6PDH

La glucose-6-phosphate déshydrogénase de *Saccharomyces cerevisiae* (ScG6PDH) a été mise en contact avec notre biocapteur dans une gamme de concentration variant de **100 fM à 100 nM**. Toutes les solutions ont été préparées dans un tampon Tris à 50 mM (pH 8,0) contenant 0,01 M de $MgCl_2$. Le biocapteur est incubé dans une solution de ScG6PDH à la concentration désirée durant 1 heure à température ambiante. L'électrode est ensuite lavée puis analysée par voltampérométrie à vague carrée et impédancemétrie.

Diagrammes de Nyquist

La Figure XXX montre les diagrammes de Nyquist obtenus après chacune des trois concentrations de ScG6PDH testées.

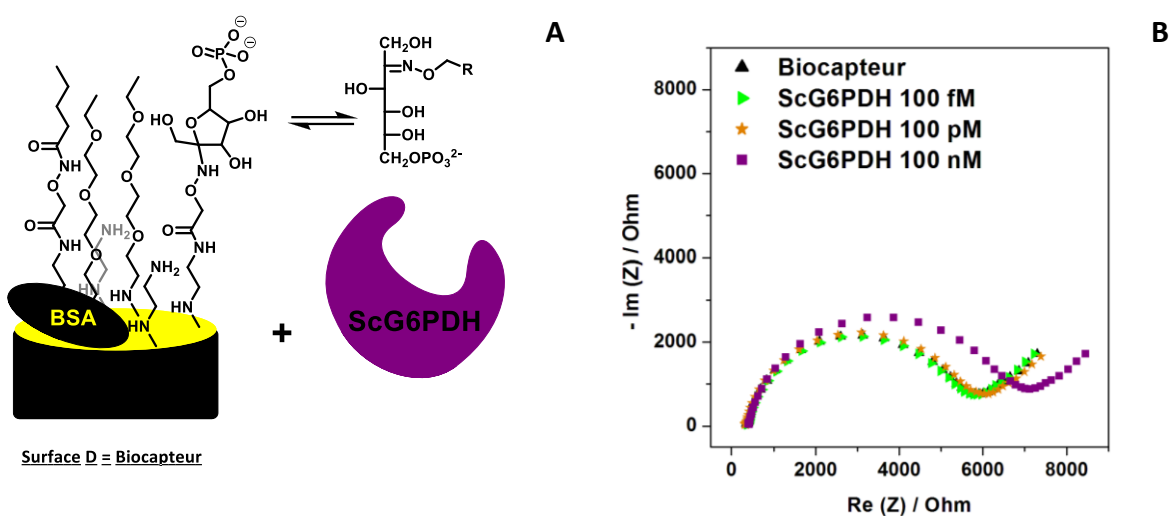


Figure XXX : (A) Rappel de la structure du biocapteur. (B) Diagrammes de Nyquist obtenus après chacune des trois concentrations de ScG6PDH testées (de 100 fM à 100 nM). Les graphes ont été réalisés dans $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ dans PBS, pH 7,4, dans une gamme de fréquence allant de 100 kHz à 0,1 Hz.

La Figure XXX illustre les réponses en EIS de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ sur les électrodes après l'incubation dans 100 fM, 100 pM et 100 nM d'enzyme. Les plus basses concentrations ne montrent aucune modification du signal de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ (même observation en voltampérométrie). Ce n'est que lors de l'incubation avec 100 nM de ScG6PDH qu'une légère augmentation de R_{ct} est observée, montrant une faible interaction de la glucose-6-phosphate déshydrogénase avec le biocapteur.

Comparaison des résultats obtenus avec l'enzyme spécifique RmPGI

La Figure XXXI montre une superposition des résultats obtenus par voltampérométrie et par spectroscopie d'impédance, après incubation du biocapteur dans 100 nM de G6PDH (en violet) et 100 nM de PGI (en rouge). Les graphes ont été réalisés dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans PBS, pH 7,4.

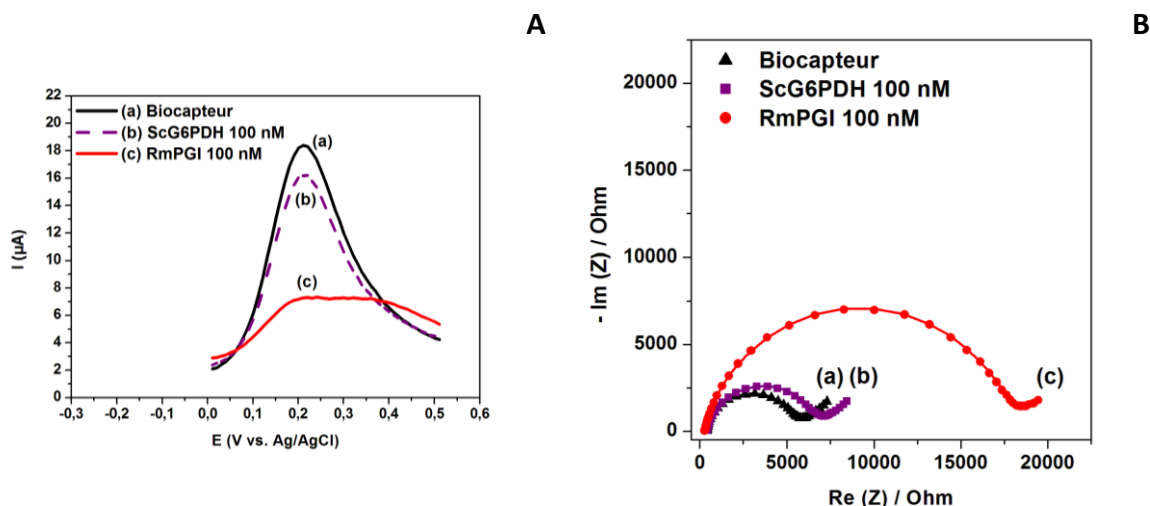


Figure XXXI : (A) Voltammogrammes à vague carrée de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ montrant la gamme de détection, à une vitesse de balayage de 50 mV/s. (B) Diagrammes de Nyquist montrant la gamme de détection, dans une gamme de fréquence allant de 100 kHz à 0,1 Hz. Les symboles sont les données expérimentales tandis que les traits plein correspondent aux courbes de fit utilisant le circuit électrique de type Randles équivalent.

Les valeurs de chaque paramètre des composants du circuit équivalent électrique de Randles lié au biocapteur ont été déterminées par fitting des données d'impédance. Elles sont présentées dans le Tableau ci-dessous.

	R_s / Ω	R_{ct} / Ω	$A_w / \Omega \cdot s^{-0,5}$	$Q / nF \cdot s^{-n-1}$	n	χ^2
Biocapteur	366.3 ± 0.2	5164.0 ± 0.7	1375.0 ± 0.6	1466 ± 2	0.86	0.09068
100 nM ScG6PDH	404.9 ± 0.2	6269.0 ± 0.8	1393.0 ± 0.6	1537 ± 2	0.86	0.08863
100 nM RmPGI	276.0 ± 0.2	$17547.0 \pm 0,7$	1267.0 ± 0.8	940.0 ± 0.4	0.86	0.04862

Les Figure XXXI A et B montrent une nette différence entre la détection par le biocapteur de l'enzyme RmPGI **(c)** où une forte modification du signal de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a lieu lors des analyses SWV et EIS (R_{ct} passe de 5164 Ω à 17547 Ω soit une **variation de 239 %**), et la détection de la ScG6PDH non spécifique **(b)** où une très légère détection a lieu à la concentration de 100 nM (R_{ct} passe de 5164 Ω à 6269 Ω soit une **variation de 21 %**). **Le biocapteur est bien spécifique de l'AMF/PGI.**

3.2.3. Analyses dans le plasma humain

La sensibilité et la spécificité du biocapteur ont été également évaluées dans du plasma humain, afin de démontrer la validité de notre concept en milieu physiologique. Le plasma n'a été ni dilué, ni filtré avant de l'utiliser pour les analyses. Une fois le biocapteur élaboré, il a été incubé dans du plasma humain durant 3 h pour vérifier sa stabilité. Ensuite, les tests de sensibilité et de spécificité ont pu être effectués.

3.2.3.1. Sensibilité

La sensibilité a été évaluée par la même méthode que dans le tampon phosphate PBS : l'électrode est mise en présence de concentrations croissantes de RmPGI (de 1 fM à 10 pM) en solution directement dans le plasma humain. Les analyses par spectroscopie d'impédance sont présentées sur la Figure XXXII.

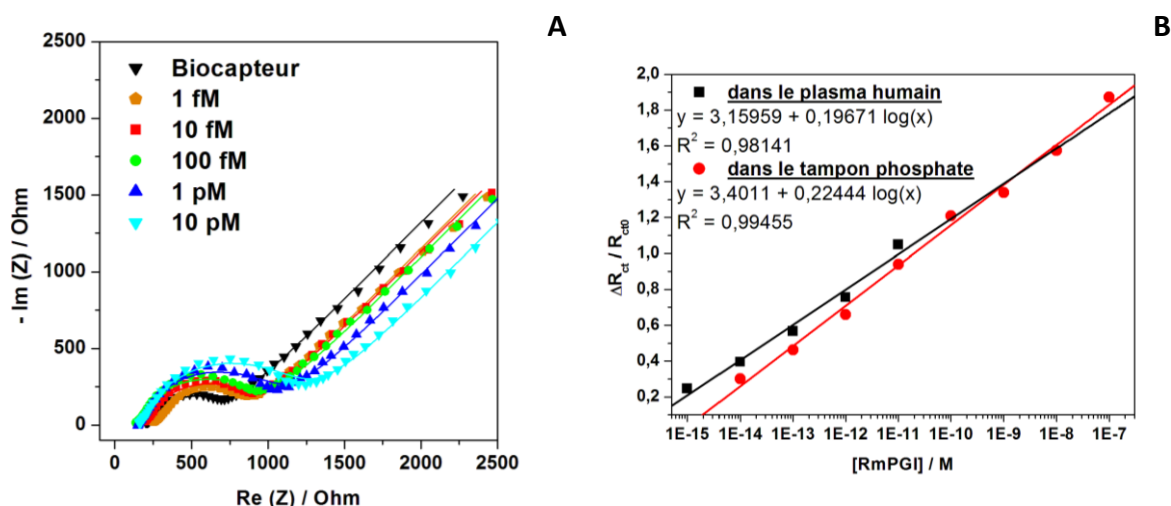


Figure XXXII : (A) Diagrammes de Nyquist obtenus après chacune des cinq concentrations de RmPGI testées (de 1 fM à 10 pM). Les graphes ont été réalisés dans $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ dans PBS, pH 7,4, dans une gamme de fréquence allant de 100 kHz à 0,1 Hz. Les symboles sont les données expérimentales tandis que les traits plein correspondent aux courbes de fit utilisant le circuit électrique de type Randles équivalent. (B) Droites d'étalonnage établies à partir des résultats de d'impédancemétrie avec en noir les mesures dans le plasma humain et en rouge les mesures dans le tampon phosphate.

Les valeurs de chaque paramètre des composants du circuit électrique équivalent de Randles relatif au biocapteur ont été déterminées par fitting des données expérimentales d'impédance. Elles sont présentées dans le Tableau VIII.

Tableau VIII : Données des différents paramètres du fitting d'impédance. χ^2 donne une estimation de la distance entre les données réelles et les données ajustées, plus la valeur est basse et plus le fitting est bon.

		R_s / Ω	R_{ct} / Ω	$A_w / \Omega \cdot s^{-0,5}$	$Q / \mu F \cdot s^{n-1}$	n	χ^2
▼	Biocapteur	$209,3 \pm 0,3$	517 ± 1	$1224,0 \pm 0,4$	$11,3 \pm 0,2$	0,73	0,05701
◆	1 fM	$252,3 \pm 0,3$	644 ± 1	$1198,0 \pm 0,4$	$10,3 \pm 0,2$	0,73	0,06311
■	10 fM	$191,3 \pm 0,3$	721 ± 1	$1209,0 \pm 0,5$	$8,1 \pm 0,1$	0,73	0,08657
●	100 fM	$141,0 \pm 0,3$	810 ± 1	$1180,0 \pm 0,5$	$7,7 \pm 0,1$	0,73	0,09431
▲	1 pM	$155,2 \pm 0,3$	908 ± 1	$1181,0 \pm 0,5$	$6,28 \pm 0,07$	0,73	0,06774
▼	10 pM	$165,5 \pm 0,3$	1059 ± 1	$1178,0 \pm 0,5$	$5,89 \pm 0,05$	0,73	0,08971

Tout d'abord il peut être remarqué que la valeur de n qui est aux environs de 0,86 lorsque la détection a lieu dans le PBS, a diminué et est maintenant de **0,73** lorsque nous travaillons dans le plasma humain. C'est toujours cohérent avec un circuit comportant une CPE et non une capacité, mais la diminution de sa valeur indique qu'il y a plus d'inhomogénéités sur la surface. Ceci peut être la conséquence du nombre élevé de protéines dans le plasma humain.

De plus, nous voyons que la valeur de Q , associée également au comportement CPE, diminue lorsque la concentration en enzyme augmente en passant de $11,3 \mu\text{F}\cdot\text{s}^{-0,27}$ (sans enzyme) à $5,89 \mu\text{F}\cdot\text{s}^{-0,27}$ (avec 10 pM d'enzyme). Cela montre que l'épaisseur de la couche augmente en fonction de la concentration d'enzyme.

Nous pouvons émettre deux remarques au sujet des valeurs de R_{ct} obtenues.

La première est que la résistance de transfert de charge du biocapteur final est très faible ici (517Ω) par rapport à la valeur obtenue lors des analyses faites dans PBS ($6119,0 \Omega$). Cette valeur plus faible de R_{ct} n'est pas due à la stabilisation du biocapteur dans le plasma humain, mais à la moins bonne qualité de la surface d'or utilisée. En effet, les valeurs de la résistance de transfert de charge sont, lors de ces expériences, très inférieures à celles obtenues lors des expériences antérieures réalisées dans le PBS au début de ce travail.

La deuxième remarque est que, comme dans le PBS, plus la concentration d'enzyme à détecter est importante, et plus le diamètre du semi-cercle augmente. La résistance de transfert de charge de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ devient de plus en plus grande. Effectivement, la valeur de R_{ct} est passée progressivement de 517Ω à 1059Ω lorsque l'on détecte la RmPGL de 1 fM à 10 pM. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par SWV.

Cette étude dans le plasma humain n'a été réalisée qu'une seule fois. Ainsi je n'ai pas pu déterminer d'écart-type sur les valeurs de $\Delta R_{ct}/R_{ct0}$. Néanmoins, de manière à calculer une limite de détection, j'ai pris comme valeur de s_a l'écart-type sur l'ordonnée à l'origine de la droite de régression donnée par le logiciel Origin. La valeur est de 0,20447. Ainsi nous obtenons une **limite de détection estimée à 113 fM dans le plasma humain** alors que nous avons observé une modification du signal de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ par spectroscopie d'impédance dès la première concentration mesurée de 1 fM de RmPGL. Ceci est dû à la perte de sensibilité du biocapteur dans le plasma humain, puisque la sensibilité passe de 0,22444 dans le PBS à 0,19671 dans le plasma humain. Mis à part ce petit changement de sensibilité, les profils des deux courbes de calibration sont comparables.

3.2.3.2. Sélectivité

La sélectivité a été testée en mettant l'électrode en présence de concentrations croissantes de ScG6PDH (de 100 fM à 100 nM) en solution directement dans le plasma humain en absence de RmPGI. Les analyses par voltampérométrie à vague carrée sont présentées sur la Figure XXXIII.

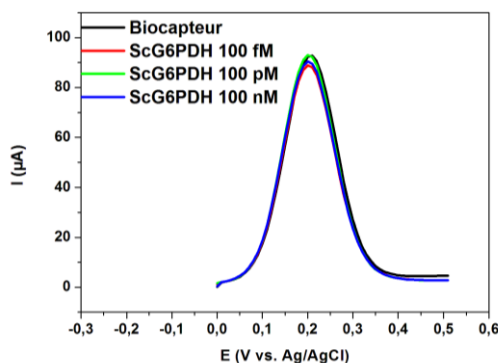
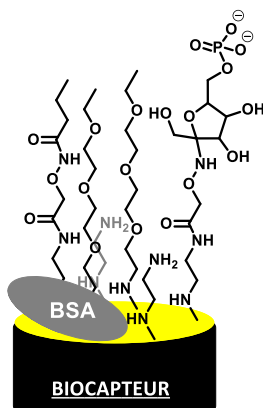


Figure XXXIII : Voltammogrammes à vague carrée de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ montrant la gamme de détection, à une vitesse de balayage de 50 mV/s.

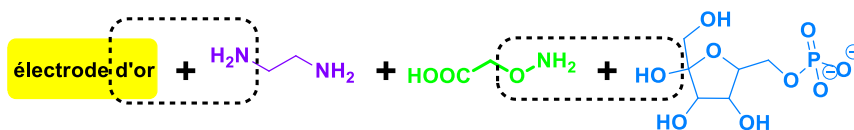
Aucun changement de signal de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ n'est observé sur les voltammogrammes lors d'ajout de concentrations de 100 fM, 100 pM et 100 nM de glucose-6-phosphate déshydrogénase dans le plasma humain. **Le biocapteur est également spécifique de l'AMF/PGI en milieu physiologique.**

3.3. Bilan : preuve de concept validée

Nous avons réussi à développer le **premier biocapteur pour la détection de l'AMF/PGI**. Chaque étape de construction du biocapteur a été caractérisée et l'intérêt de tous les éléments le composant a été démontré. Le biocapteur est obtenu de manière stable et toutes les étapes de construction sont hautement reproductibles.

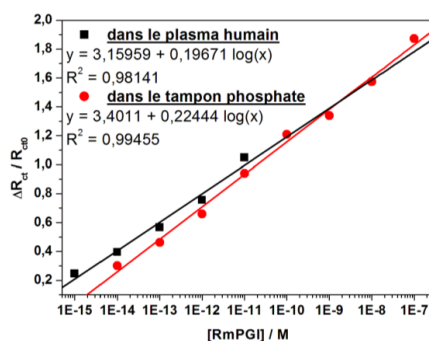


Nous avons permis la **mise au point de deux réactions majeures** au cours de la construction du biocapteur. La première est l'électrodéposition de l'éthylène diamine en milieu aqueux à faibles potentiels. La deuxième est le greffage du 6-phosphate-D-fructose avec l'oxyamine en milieu acide tamponné pH 4,6.



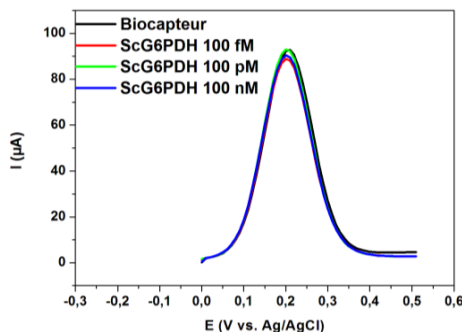
Les performances du biocapteur ont été évaluées **dans deux matrices : un tampon phosphate et du plasma humain**.

Dans le PBS, les analyses par spectroscopie d'impédance présentant $\Delta R_{ct}/R_{ct0}$ en fonction du logarithme de la concentration, ont permis d'obtenir une gamme dynamique de détection s'étendant de 10 fM à 100 nM d'enzyme avec une limite de détection de 6,6 fM. La sensibilité est de 0,224440. Dans le plasma humain, la gamme dynamique varie de 1 fM à 10 pM d'enzyme et la limite de détection obtenue est de 113 fM. La sensibilité du biocapteur est moindre dans le plasma humain (0,19671) que dans le PBS mais nous obtenons une très bonne corrélation des résultats obtenus dans chacune des deux matrices.



Une perspective de ce travail serait d'élaborer un nouveau transducteur, possédant des propriétés architecturales différentes de manière à augmenter la sensibilité du biocapteur en milieu biologique. Des expériences préliminaires à ce sujet seront présentées au **chapitre 4**.

La spécificité du biocapteur a été validée dans le PBS et dans le plasma humain.



La reproductibilité a été confirmée tout au long de la construction du biocapteur et de l'évaluation de ses performances, puisque plusieurs électrodes ont toujours été testées (hormis pour les expériences dans le plasma humain).

Ces premiers résultats obtenus dans le plasma humain sont remarquables et très encourageants car la détection de l'AMF/PGI en milieu biologique doit être possible lorsque l'enzyme est présente à des concentrations inférieures au picomolaire (motilité des cellules cancéreuses *in vitro*).⁸⁴ **L'objectif est atteint** et ces résultats ouvrent des perspectives capitales pour le projet d'une détection de l'AMF/PGI dans des échantillons de sérums réels de patients cancéreux (collaboration avec le Pr Fabrice André, IGR Villejuif).

Dans le **chapitre 1**, nous avons présenté quelques performances de biocapteurs pour la détection de biomarqueurs de cancers rapportés dans la littérature. Nous pouvons ainsi comparer les résultats que nous avons obtenus avec ceux des autres équipes qui ont également utilisés la spectroscopie d'impédance dans le PBS (Tableau IX).

Tableau IX : Comparaison des performances de quelques biocapteurs pour la détection de biomarqueurs de cancers étudiés par spectroscopie d'impédance électrochimique.

Biomarqueur	Matrice étudiée	Gamme dynamique	LD	Référence
BRCA1	PBS	50 fM – 1,0 nM	1,7 fM	35
miRNA-21	PBS	100 fM – 500 nM	84,3 fM	31
ErbB2	PBS	1,0 fM – 500 nM	1,0 fM	48
RmPGI	PBS	10 fM – 100 nM	6,6 fM	notre étude

Les performances du biocapteur pour la détection de l'AMF/PGI que nous avons développé sont tout-à-fait comparables avec celles décrites dans la littérature.

Chapitre 4. Perspective d'un nouveau transducteur

Au cours de ce travail de thèse, un deuxième transducteur a été élaboré dans l'objectif de concevoir par la suite un deuxième biocapteur pour la détection de l'AMF/PGI qui serait plus sensible en milieu biologique.

Ce deuxième transducteur est constitué d'une électrode d'or associée à des nanotubes de carbone fonctionnalisés par une sonde redox viologène (Schéma XXXII). Nous espérons que la structuration tridimensionnelle des nanotubes de carbones (NTC) permettra d'augmenter la surface active de l'électrode et d'améliorer la sensibilité de notre biocapteur dans le plasma.

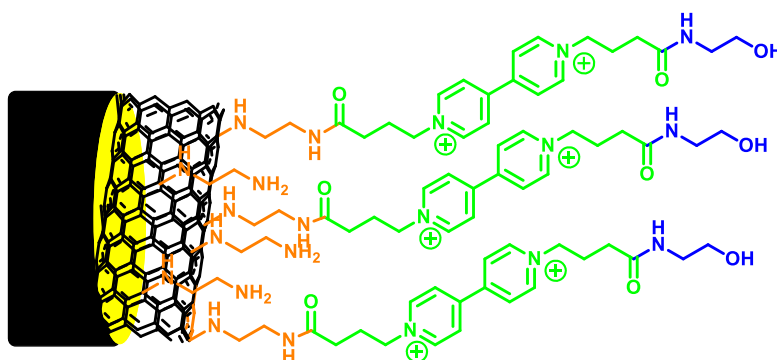


Schéma XXXII : Présentation du deuxième transducteur élaboré.

La sonde interne choisie est le viologène. Cette sonde chargée positivement peut interagir fortement avec les nanotubes de carbone (NTC) qui seront modifiés par des groupements -COOH. Ce type d'interaction permettrait par la suite d'obtenir un matériau composite sensible à son environnement électronique et stérique. Le viologène associé aux NTC possède un potentiel redox intense et bien défini qui permettra par la suite de suivre directement et facilement les interactions moléculaires sur la surface de l'électrode.

Ce dernier chapitre présente les différentes étapes d'élaboration de ce transducteur ainsi que les analyses de surface effectuées. De plus, plusieurs optimisations ont été nécessaires pour obtenir cette architecture de manière reproductible et stable. En effet, ce transducteur présente deux étapes clés que sont l'association des nanotubes de carbone sur la surface d'or et la liaison de la sonde redox viologène sur celui-ci.

4.1. Association des NTC sur la surface de l'électrode d'or

Un des gros défis pour une association efficace des nanotubes de carbone sur une surface est leur dispersion. En effet, les nanotubes de carbone sont insolubles en milieu aqueux, polaires et ont une tendance à s'agglomérer à cause des interactions hydrophobes et des forces de Van der Waals existantes entre les nanotubes. Différentes stratégies ont donc été développées pour leur dispersion en solution.

4.1.1. Stratégies pour la dispersion

4.1.1.1. Fonctionnalisation

Une des stratégies possible pour accroître la dispersion des NTC en solution est basée sur la fonctionnalisation des nanotubes de carbone par des groupes fonctionnels polaires. Il existe quatre stratégies généralement utilisées pour fonctionnaliser les nanotubes par des biomolécules : par liaison covalente, par liaison non covalente, par encapsulation et par électropolymérisation.⁸⁵

La fonctionnalisation covalente consiste à modifier chimiquement les nanotubes de carbone. Il s'agit de la méthode la plus classiquement utilisée. Pour ce qui est de la fonctionnalisation non-covalente, cette méthode présente l'avantage de conserver les propriétés conductrices des nanotubes en utilisant des surfactants. La fonctionnalisation se fait alors *via* des interactions électrostatiques ou *via* des interactions de type π -stacking. Il reste également les méthodes d'encapsulation et d'électropolymérisation. Dans ce dernier cas, le polypyrrole, un polymère organique conducteur très largement utilisé dans le domaine des biocapteurs, peut être électropolymérisé en présence de nanotubes de carbone afin d'augmenter la conductivité du transducteur ainsi que la surface active.

4.1.1.2. Oxydation

Une autre possibilité est d'oxyder les nanotubes de carbone dans une solution acide pour créer des défauts dans la structure des nanotubes (*via* l'apparition de groupements C=O, CHO, COOH), de manière à casser les interactions de type π -stacking.⁸⁵ La dispersion peut alors être obtenue dans des solvants polaires comme le DMF ou dans des conditions beaucoup plus drastiques (acides concentrés) comme l'utilisation de l'acide sulfurique, de l'acide nitrique ou le mélange des deux. Cette solution est couramment utilisée et c'est celle-ci que nous avons choisie dans le cadre de mon travail.

4.1.2. Synthèse et caractérisation des NTC-COOH

Les nanotubes oxydés, que nous appellerons NTC-COOH, sont préparés selon deux grandes étapes : ils subissent tout d'abord une purification dans une solution d'acide nitrique, puis sont ensuite oxydés dans une solution d'acide nitrique et d'acide sulfurique.

Afin de vérifier la bonne modification des nanotubes de carbone, une analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier a été effectuée avec un ATR utilisant un cristal de diamant. Le spectre est présenté à la Figure XXXIV.

Ce spectre montre une nette différence d'allure entre celui en noir qui correspond à l'analyse des nanotubes de carbone avant oxydation et celui en rouge qui correspond à l'analyse des nanotubes de carbone après oxydation.

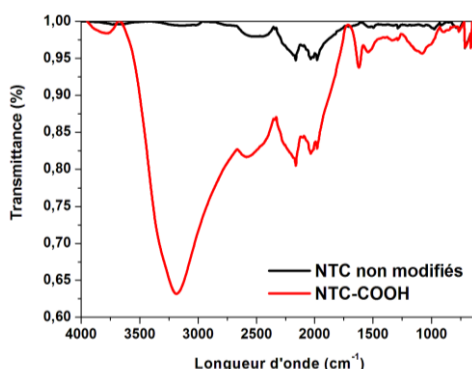


Figure XXXIV : Spectre infrarouge à transformée de Fourier des NTC avant oxydation et après oxydation, mesuré avec un ATR utilisant un cristal de Diamant sur 256 scans.

En effet, le spectre rouge, montre une bande forte et large entre 3500 et 3000 cm^{-1} ainsi qu'une bande moyenne et large entre 3000 et 2500 cm^{-1} correspondant aux vibrations de la liaison O—H. La bande vers 1600 cm^{-1} correspond aux vibrations de la liaison C=O. Toutes ces informations montrent que les nanotubes de carbone ont bien été modifiés par des groupements COOH.

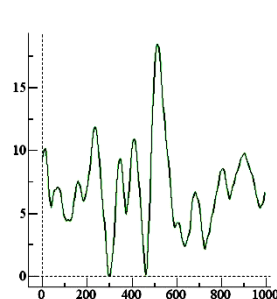
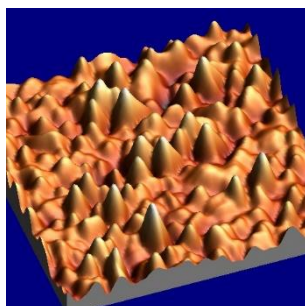
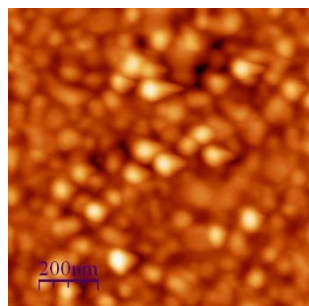
4.1.3. Préparation et caractérisation de la surface Au + NTC-COOH

4.1.3.1. Préparation des surfaces

L'électrode d'or (ou la plaque) est préalablement polie (ou lavée avec piranha) et activée avant le dépôt des NTC-COOH. Puis, l'association des nanotubes de carbone modifiés sur la surface d'or est réalisée en déposant une goutte de solution de NTC-COOH à 2 mg/mL dans du DMF. Le solvant est évaporé à l'air. Plusieurs dépôts successifs de 2 μL ont lieu jusqu'à obtenir une surface d'or parfaitement recouverte de nanotubes. Pour finir, différents lavages à l'acétonitrile et à l'eau ultra pure ont lieu.

4.1.3.2. Caractérisation par AFM

L'allure de la surface d'or modifiée par des nanotubes de carbone oxydés a été observée par microscopie à force atomique (AFM : *Atomic Force Microscopy*). Les images sont présentées sur la Figure XXXV.



A

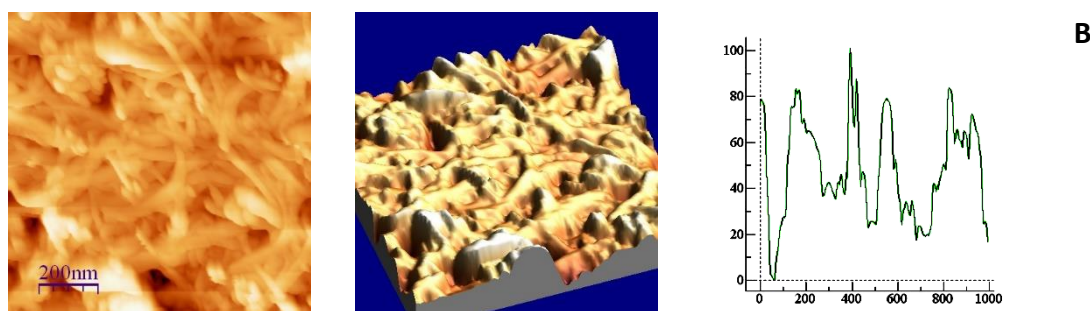


Figure XXXV : Visualisation de la surface d'or activée seule (A) et de la surface d'or activée puis modifiée par des NTC-COOH (B) par AFM.

La Figure XXXV montre que les nanotubes de carbone sont bien adsorbés sur toute la surface d'or. Nous observons également une augmentation de la rugosité de la surface (coupe transversale) due à la présence des nanotubes de carbone sur la surface d'or.

4.2. Présentation du viologène

4.2.1. Synthèse du viologène diCOOH diPF₆

Pour synthétiser la sonde redox viologène diCOOH, nous avons procédé en deux étapes successives impliquant d'abord la synthèse du diester (**1**), puis son hydrolyse en diacide (**2**).

4.2.1.1. Synthèse du diester

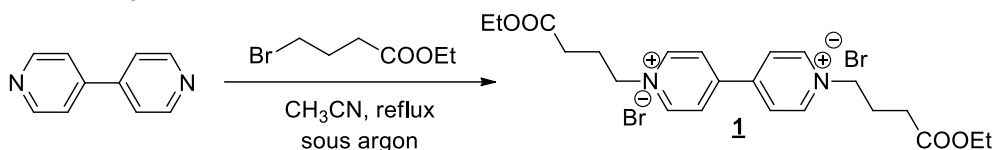


Schéma XXXIII : Synthèse du viologène diCOOEt diBr (**1**).

Comme le montre le Schéma XXXIII, le composé (**1**) a été synthétisé par une réaction de substitution nucléophile de type 2 (S_N2) à partir de 4,4'-bipyridine et de 4-bromobutanoate d'éthyle d'après l'article de V. L. Pecoraro et coll..⁸⁶

À la fin de la réaction, un mélange de deux produits est obtenu avec un taux de conversion de 50 % chacun : le composé monosubstitué non voulu et le produit disubstitué (**1**) souhaité. Le composé (**1**) n'a pas pu être isolé (le taux de conversion a été déterminé d'après les intégrations du spectre RMN ¹H), et la deuxième étape a été réalisée avec le mélange des deux composés.

4.2.1.2. Hydrolyse pour former le diacide

L'hydrolyse des esters est réalisée en présence d'acide bromhydrique à 2 M. Il s'agit de conditions classiques pour hydrolyser les esters. Après cinq jours d'agitation, la réaction est complète et conduit au mélange de diacide et monoacide. L'ajout d'hexafluorophosphate de potassium permet d'induire la précipitation du diacide souhaité en laissant le monoacide, plus soluble, en solution.⁸⁶ Le passage du composé diester (**1**) au composé diacide (**2**) est effectué avec un rendement de 98 %.

Schéma XXXIV : Synthèse du viologène diCOOH diPF₆ (**2**).

Au final, le viologène diCOOH diPF₆ (**2**) est obtenu pur sous forme d'une poudre blanche à partir de la 4,4'-bipyridine avec un rendement global sur deux étapes de 49 %.

4.2.2. Études électrochimiques en solution

L'analyse en solution de la sonde redox viologène diacide synthétisée (**2**) est effectuée par voltampérométrie à vague carrée (SWV) dans du PBS à 10 mM, pH 7,4 (Figure XXXVI A).

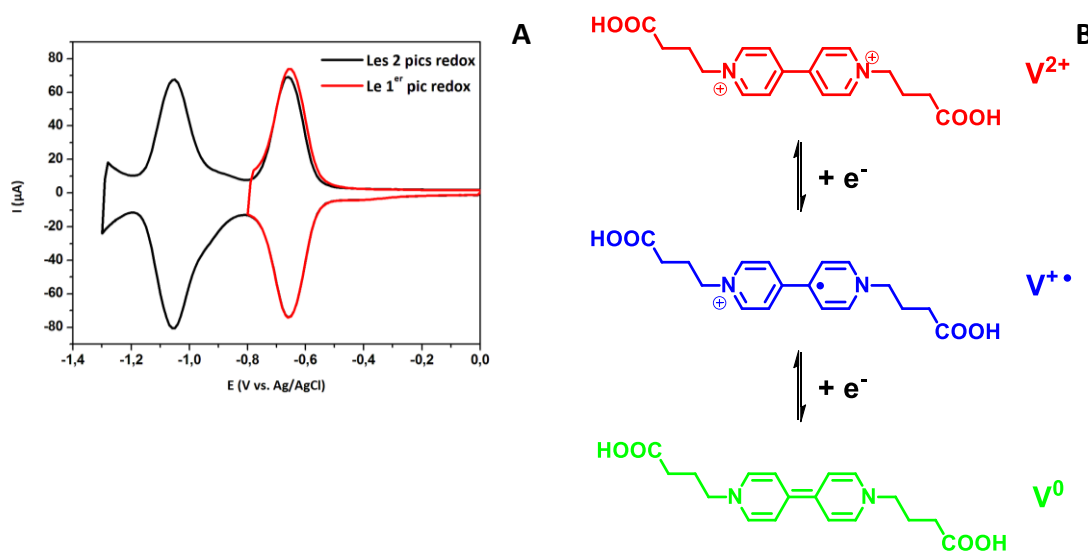


Figure XXXVI : (A) Analyse de la sonde viologène diacide à 10 mM dans du PBS (10 mM, pH 7,4) par SWV à 100 mV/s. (B) Les trois états redox du viologène.

Le voltammogramme du viologène diCOOH diPF₆ (**2**) présente deux systèmes d'oxydo-réduction réversibles aux potentiels *E*_{1/2} = -0,62 V et *E*_{1/2} = -1,04 V qui correspondent aux deux réactions d'oxydo-réduction présentées sur la Figure XXXVI B.

Cette figure montre que le viologène possède trois états redox. La première réduction correspond au passage du **viologène dicationique** appelé V²⁺, au **viologène radical-cation** V^{•+}. Cette réaction correspond au premier pic redox à *E*_{1/2} = -0,62 V. La deuxième réduction correspond au passage du **viologène radical-cation** V^{•+} au **viologène neutre** V⁰ (pic redox à *E*_{1/2} = -1,04 V).

La forme dicationique est la plus stable parmi les trois états redox du viologène en présence de deux contre anions. La forme radical-cation existe car elle est stabilisée par la délocalisation de l'électron dans le noyau aromatique de la bipyridine. Ces résultats sont en accord avec la littérature.⁸⁷

La Figure XXXVII présente les variations du courant en fonction de la vitesse de balayage du premier pic redox du viologène diCOOH (**2**). Cette étude permet d'évaluer d'une part la constante de vitesse de transfert de charge entre le viologène en solution et la surface de l'électrode, et d'autre part de déterminer les interactions du viologène avec la surface.

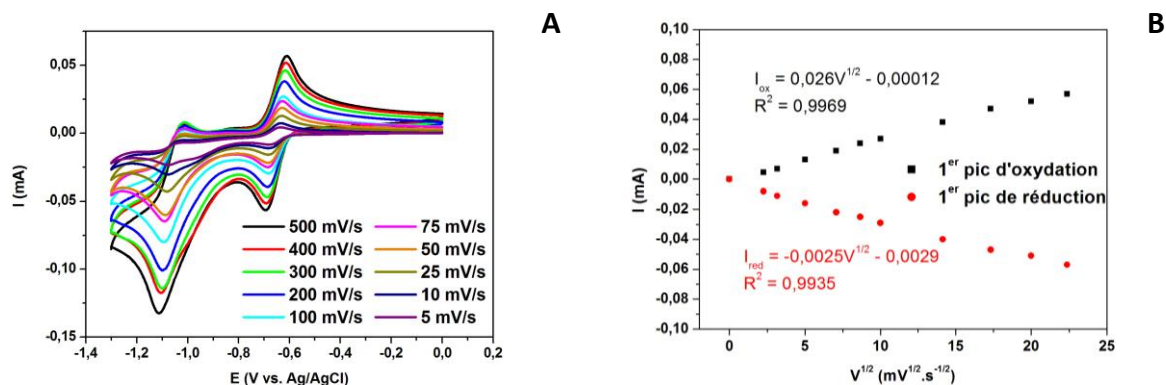


Figure XXXVII : Étude de la variation du courant en fonction de la vitesse de balayage du premier système redox.

Nous constatons que plus la vitesse de balayage augmente (les vitesses varient de 5 mV/s à 500 mV/s), plus l'intensité du courant augmente, mais surtout, moins le signal est réversible. Ce résultat montre que **le transfert d'électron du viologène n'est pas très rapide**.

De plus, la Figure XXXVII B montre qu'une relation linéaire entre l'intensité du courant et la racine carrée de la vitesse de balayage de 5 à 500 mV/s est obtenue. Ce résultat suggère que **la réaction redox du couple V^{2+}/V^{+} du viologène en solution est contrôlée par la diffusion des charges**. Autrement dit, c'est bien le viologène en solution que nous analysons et pas une espèce sur la surface de l'électrode.

Nous pouvons remarquer sur la Figure XXXVII A que le deuxième pic de réduction, à $-1,1$ V est de moins en moins réversible montrant la présence d'une réaction tierce. Une hypothèse serait que la réduction du dioxygène entraînerait cette augmentation du courant cathodique.

4.3. Construction du transducteur

4.3.1. Schéma général de construction du transducteur

L'élaboration du transducteur se fait en quatre étapes (Schéma XXXV). Les deux premières étapes correspondent au dépôt des nanotubes de carbone modifiés (NTC-COOH) puis à leur fonctionnalisation par l'éthylène diamine. Les deux étapes suivantes consistent au greffage du viologène et au blocage des extrémités libres du viologène avec de l'éthanolamine.

Chaque étape de construction du transducteur a été caractérisée par voltampérométrie cyclique. Les analyses sont décrites ci-après.

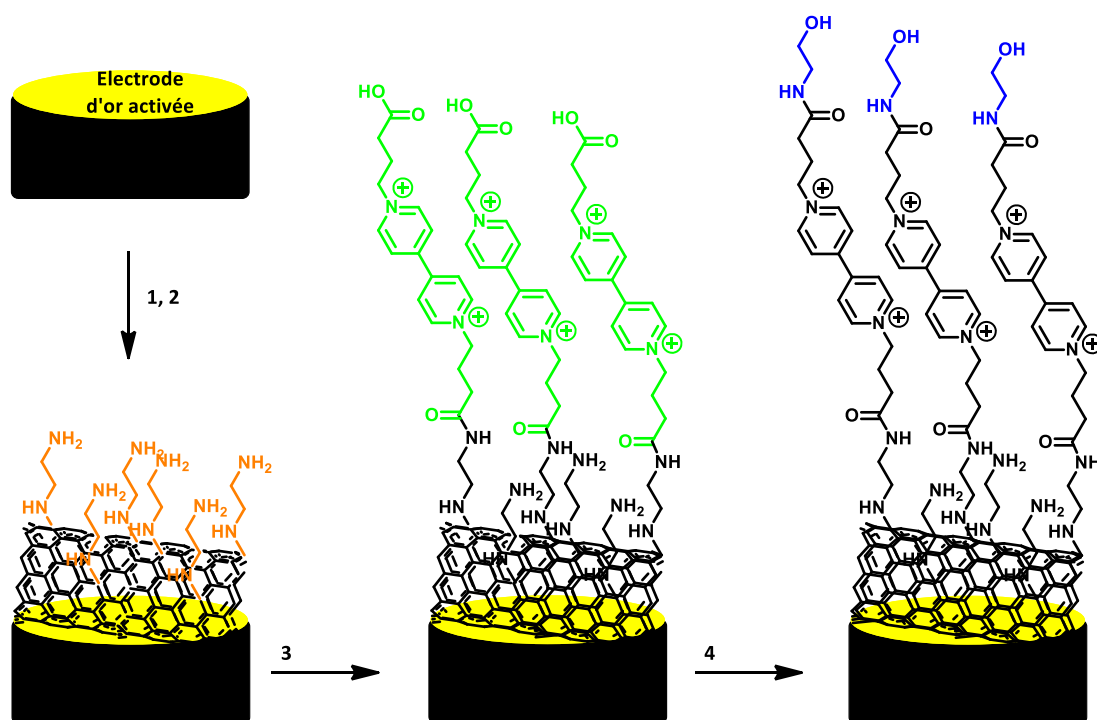


Schéma XXXV : Schéma général de construction du transducteur.

4.3.2. Analyses de surface

Étape 1 : Dépôt des nanotubes de carbone modifiés (NTC-COOH) sur la surface d'or

Cette étape a été présentée au paragraphe 4.1.3.

Étape 2 : Électrodéposition de l'éthylène diamine

L'influence du nombre de cycles lors de l'électrodéposition de l'éthylène diamine sur les nanotubes de carbone a été étudiée. Les trois conditions testées sont présentées dans le Tableau X. Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque l'électrodéposition a lieu durant 10 cycles (conditions 2).

Tableau X : Trois conditions testées pour l'électrodéposition de l'ED sur les NTC.

	Gamme de potentiel	Nombre de cycles	Vitesse de balayage	Concentration en ED
(1)	De 0 à 1,1 V	5	50 mV/s	10 mM dans LiClO ₄ à 0,5 M dans ACN
(2)	De 0 à 1,1 V	10	50 mV/s	10 mM dans LiClO ₄ à 0,5 M dans ACN
(3)	De 0 à 1,1 V	15	50 mV/s	10 mM dans LiClO ₄ à 0,5 M dans ACN

Le voltampérogramme de l'électrodéposition est présenté à la Figure XXXVIII A. Une vague d'oxydation aux alentours de 0,8 V est visible lors de l'électrodéposition. Cette vague témoigne d'un processus irréversible, caractéristique du greffage de l'éthylène diamine.

La voltampérométrie cyclique de la Figure XXXVIII B montre une diminution de l'intensité du signal après le greffage de l'éthylène diamine (courbe orange) sur les nanotubes de carbone (courbe noire). Ceci provient de la diminution de la conductivité des nanotubes en accord avec la littérature.⁸⁸

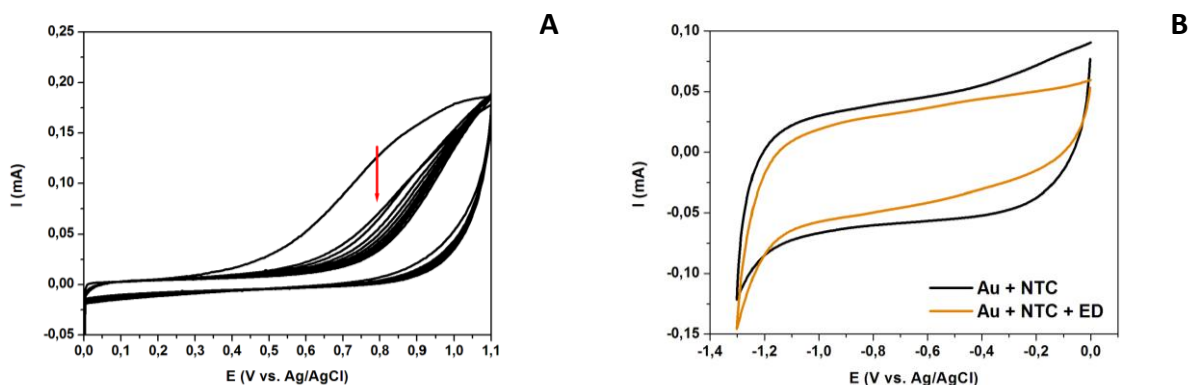


Figure XXXVIII : (A) Voltampérogramme de l'électrodéposition de l'éthylène diamine (10 mM dans LiClO₄ à 0,5 M dans ACN), durant 10 cycles à 50 mV/s. (B) Analyse par voltampérométrie cyclique dans PBS durant 5 cycles à 100 mV/s après l'électrodéposition de l'éthylène diamine sur les NTC-COOH.

Étapes 3 et 4 : Greffage du viologène puis blocage par l'éthanolamine

L'étape 3 est le greffage de la sonde redox viologène à la surface. Pour cela l'électrode est incubée durant deux heures à température ambiante dans une solution de viologène diCOOH contenant de l'EDC et du NHS. Après lavages, l'électrode est analysée dans du PBS par voltampérométrie cyclique (Figure XXXIX A).

Lors de l'étape 4, l'extrémité -COOH libre de la sonde viologène est bloquée par une molécule « neutre », ici l'éthanolamine (EA). Cette étape est réalisée pour pouvoir étudier par la suite la sonde viologène greffée. En effet, le viologène possède une extrémité qui peut être encore sous la forme d'ester activé (à cause de la réaction précédente de couplage peptidique avec l'éthylène diamine faisant intervenir l'EDC et le NHS). Grâce au blocage par l'éthanolamine, aucune modification de signal ne pourra être causée par l'hydrolyse de l'ester activé éventuel. Pour effectuer cette étape, l'électrode est incubée trente minutes à température ambiante dans une solution d'éthanolamine à 10 mM dans PBS. Après lavages, l'électrode est analysée par voltampérométrie cyclique (Figure XXXIX B).

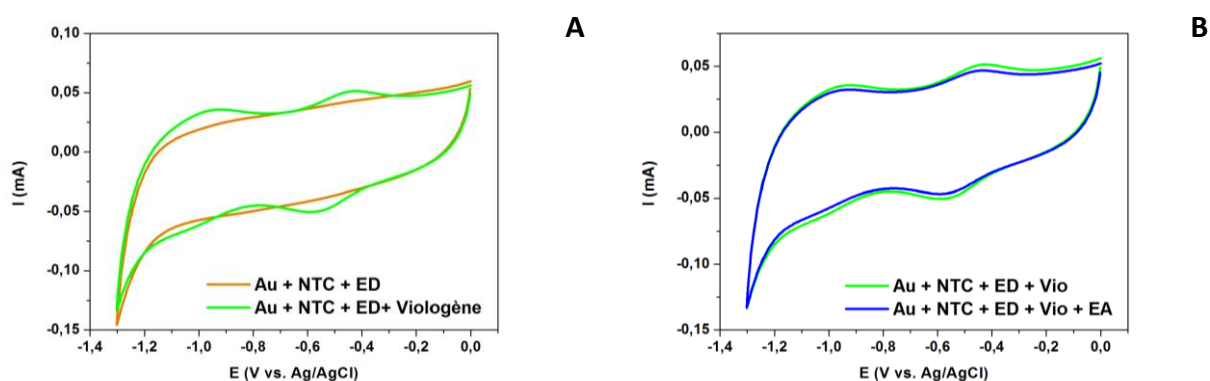


Figure XXXIX : Voltampérogrammes cycliques du greffage du viologène (A) et du blocage de la surface par l'éthanolamine (B). Les analyses ont lieu dans du PBS durant 5 cycles à 100 mV/s.

Le voltampérogramme de la Figure XXXIX A montre les deux systèmes redox aux potentiels attendus pour le viologène à - 0,5 V et - 1,1 V. Le viologène est bien greffé covalamment à la surface.

Le voltampérogramme de la Figure XXXIX B montre qu'après le couplage peptidique de l'éthanolamine avec le viologène, l'intensité du signal de la sonde redox diminue légèrement. Cette diminution de vitesse de réaction est causée par l'encombrement de la surface, prouvant ainsi le bon greffage de l'éthanolamine.

Stabilité des surfaces

La stabilité des surfaces a ensuite été évaluée en immergeant l'électrode dans du PBS durant quatre heures et en réalisant des analyses par voltampérométrie cyclique régulièrement au cours du temps. Les résultats sont présentés sur la Figure XL.

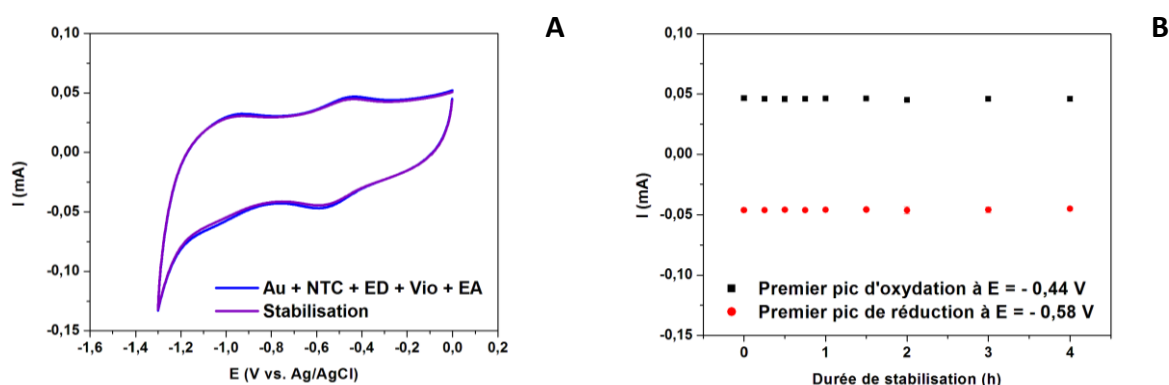


Figure XL : Étude de la stabilité du transducteur à base de NTC-COOH Les analyses ont lieu dans du PBS durant 5 cycles à 100 mV/s.

Le voltampérogramme de la Figure XL A montre que le signal redox du viologène greffé covalentement au transducteur est stable au cours du temps. En effet, toutes les courbes se superposent et l'électrode donne toujours le même signal électrochimique au bout de 4 heures d'incubation dans PBS et neuf analyses. La Figure XL B montre l'intensité des pics du premier système redox du viologène en fonction du temps. Quatre électrodes ont été conçues de manière à vérifier la bonne reproductibilité de la construction du transducteur. Les écart-types mesurés entre les quatre électrodes sont extrêmement faibles et ne se distinguent pratiquement pas sur cette figure. Ceci prouve bien que les nanotubes de carbone modifiés par des groupements COOH permettent de faire un transducteur stable efficace pour l'élaboration d'un biocapteur.

4.3.3. Expérience de contrôle

Pour démontrer que la modification chimique des nanotubes de carbone par oxydation est une étape importante pour la formation de ce transducteur, une expérience de contrôle a été menée en utilisant des nanotubes de carbone non modifiés.

Les résultats sont présentés dans l'**annexe 4**. Le dépôt des NTC non modifiés s'est fait de manière homogène et reproductible malgré les difficultés de dispersion. Toutes les étapes de construction ont été analysées et caractérisées avec succès. Cependant, lors de l'étude de la stabilité du transducteur final, une diminution de l'intensité du signal redox du viologène greffé covalamment au transducteur est observée au cours du temps, indiquant que le transducteur n'est pas suffisamment stable pour l'élaboration d'un biocapteur.

4.3.4. Comportement redox du transducteur élaboré

Le comportement redox du viologène immobilisé sur les NTC-COOH a ensuite été étudié. Pour cela, nous faisons varier la vitesse de balayage de 10 à 100 mV/s et observons les changements d'intensité de courant obtenus (Figure XLI A). La Figure XLI B présente les variations du courant en fonction de la vitesse de balayage du premier pic redox du viologène greffé sur les NTC-COOH.

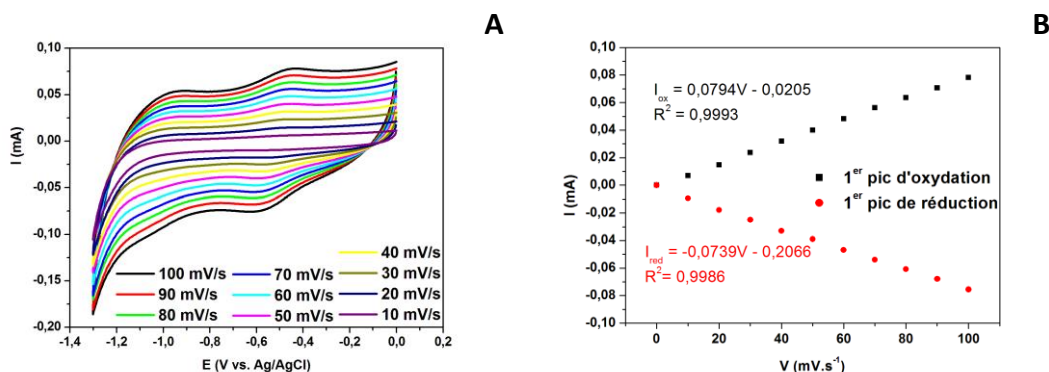


Figure XLI : Étude de la variation du courant en fonction de la vitesse de balayage du premier système redox.

Nous constatons que plus la vitesse de balayage augmente, plus l'intensité du courant augmente et que le signal reste réversible. Ce résultat montre que **le transfert d'électron du viologène est rapide**. De plus, une relation linéaire entre l'intensité du courant et la vitesse de balayage de 10 à 100 mV/s est obtenue. Afin de s'assurer que la présence du courant capacitif n'influe pas ce résultat, la même expérience a été réalisée en SWV et la même corrélation a été obtenue.

4.4. Bilan : nouveau transducteur prêt à l'emploi

Aux vues de toutes ces analyses, nous pouvons conclure que le greffage de la sonde redox viologène sur les nanotubes de carbone modifiés a été réalisé avec succès. D'autre part, nous avons prouvé que la fonctionnalisation des nanotubes est nécessaire pour obtenir un transducteur électrochimique stable au cours du temps pour permettre l'élaboration par la suite d'un biocapteur.

L'objectif futur sera de construire le biocapteur *via* un lien oxime comme précédemment de manière à greffer covalamment le F6P pour permettre la détection de l'AMF/PGI.

RÉFÉRENCES DE LA PARTIE A

- (1) Malhotra, B. D.; Chaubey, A. *Sens. Actuators B Chem.* **2003**, *91* (1–3), 117–127.
- (2) de Boer, E.; Beumer, R. R. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *50* (1–2), 119–130.
- (3) Patel, P. D. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2002**, *21* (2), 96–115.
- (4) Stetter, J. R.; Jurs, P. C.; Rose, S. L. *Anal. Chem.* **1986**, *58* (4), 860–866.
- (5) Rösler, S.; Lucklum, R.; Borngräber, R.; Hartmann, J.; Hauptmann, P. *Sens. Actuators B Chem.* **1998**, *48* (1–3), 415–424.
- (6) Clark, L. J. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* **1956**, *2*, 41–48.
- (7) Clark, L. C.; Lyons, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29–45.
- (8) Guilbault, G. G.; Montalvo, J. G., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91* (8), 2164–2165.
- (9) Lowe, C. R. *Trends Biotechnol.* **1984**, *2* (3), 59–65.
- (10) Heller, A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7* (1), 50–54.
- (11) Daniels, P. B.; Deacon, J. K.; Eddowes, M. J.; Pedley, D. G. *Sens. Actuators* **1988**, *15* (1), 11–18.
- (12) Davis, K. A.; Leary, T. R. *Anal. Chem.* **1989**, *61* (11), 1227–1230.
- (13) Azevedo, A. M.; Prazeres, D. M. F.; Cabral, J. M. S.; Fonseca, L. P. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *21* (2), 235–247.
- (14) Zhang, Y.; Tadigadapa, S. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *19* (12), 1733–1743.
- (15) Gondran, C.; Orio, M.; Rigal, D.; Galland, B.; Bouffier, L.; Gulon, T.; Cosnier, S. *Electrochem. Commun.* **2010**, *12* (2), 311–314.
- (16) Lê, H. Q. A.; Chebil, S.; Makrouf, B.; Sauriat-Dorizon, H.; Mandrand, B.; Korri-Youssofi, H. *Talanta* **2010**, *81* (4–5), 1250–1257.
- (17) Uygun, A. *Talanta* **2009**, *79* (2), 194–198.
- (18) Wang, P.; Liu, M.; Kan, J. *Sens. Actuators B Chem.* **2009**, *140* (2), 577–584.
- (19) Li, Y.; Zhang, L.; Li, M.; Pan, Z.; Li, D. *Chem. Cent. J.* **2012**, *6* (1), 103.
- (20) Yang, K.; Zhang, C. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *28* (1), 257–262.
- (21) Zhang, Y.; Huang, L. *Microchim. Acta* **2012**, *176* (3–4), 463–470.
- (22) Wang, X.; Zhang, X. *Electrochimica Acta* **2013**, *112*, 774–782.
- (23) Song, Y.; Chen, J.; Sun, M.; Gong, C.; Shen, Y.; Song, Y.; Wang, L. *J. Hazard. Mater.* **2016**, *304*, 103–109.
- (24) Mendes, R. K.; Carvalhal, R. F.; Kubota, L. T. *J. Electroanal. Chem.* **2008**, *612* (2), 164–172.
- (25) Sokolov, K.; Follen, M.; Aaron, J.; Pavlova, I.; Malpica, A.; Lotan, R.; Richards-Kortum, R. *Cancer Res.* **2003**, *63* (9), 1999–2004.
- (26) Frederix, F.; Friedt, J.-M.; Choi, K.-H.; Laureyn, W.; Campitelli, A.; Mondelaers, D.; Maes, G.; Borghs, G. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (24), 6894–6900.
- (27) Jain, P. K.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (12), 1578–1586.
- (28) Niemeyer, C. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (22), 4128–4158.
- (29) Méthodes de techniques analytiques "calcul de limite de détection".
- (30) Wang, J.; Kawde, A.-N. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *431* (2), 219–224.
- (31) Rafiee-Pour, H.-A.; Behpour, M.; Keshavarz, M. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *77*, 202–207.
- (32) Li, C.; Karadeniz, H.; Canavar, E.; Erdem, A. *Electrochimica Acta* **2012**, *82*, 137–142.
- (33) Miki, Y.; Swensen, J.; Shattuck-Eidens, D.; Futreal, P. A.; Harshman, K.; Tavtigian, S.; Liu, Q.; Cochran, C.; Bennett, L. M.; Ding, W.; Et, A. *Science* **1994**, *266* (5182), 66–71.
- (34) Venkitaraman, A. R. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (4), 266–276.
- (35) Wang, W.; Fan, X.; Xu, S.; Davis, J. J.; Luo, X. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *71*, 51–56.
- (36) Teo, A. K. L.; Lim, C. L.; Gao, Z. *Electrochimica Acta* **2014**, *126*, 19–30.
- (37) Johnson, B. N.; Mutharasan, R. *The Analyst* **2014**, *139* (7), 1576.
- (38) Wu, K.; Li, L.; Li, S. *Tumour Biol.* **2015**, *36* (3), 1973–1981.
- (39) Asaga, S.; Kuo, C.; Nguyen, T.; Terpenning, M.; Giuliano, A. E.; Hoon, D. S. B. *Clin. Chem.* **2011**, *57* (1), 84–91.
- (40) Kumar, S.; Keerthana, R.; Pazhanimuthu, A.; Perumal, P. *Indian J. Biochem.* **2013**, *50* (3), 210–214.
- (41) Hianik, T.; Ostatná, V.; Zajacová, Z.; Stoikova, E.; Evtugyn, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (2), 291–295.
- (42) Castillo, G.; Lamberti, I.; Mosiello, L.; Hianik, T. *Electroanalysis* **2012**, *24* (3), 512–520.
- (43) Miodek, A.; Castillo, G.; Hianik, T.; Korri-Youssofi, H. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (16), 7704–7712.
- (44) Miodek, A.; Castillo, G.; Hianik, T.; Korri-Youssofi, H. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *56*, 104–111.
- (45) Jolly, P.; Formisano, N.; Tkáč, J.; Kasák, P.; Frost, C. G.; Estrela, P. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *209*, 306–312.
- (46) Miodek, A.; Vidic, J.; Sauriat-Dorizon, H.; Richard, C.-A.; Le Goffic, R.; Korri-Youssofi, H.; Chevalier, C. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (18), 9098–9105.

- (47) Sharma, A.; Matharu, Z.; Sumana, G.; Solanki, P. R.; Kim, C. G.; Malhotra, B. D. *Thin Solid Films* **2010**, *519* (3), 1213–1218.
- (48) Ali, M. A.; Mondal, K.; Singh, C.; Malhotra, B. D.; Sharma, A. *Nanoscale* **2015**, *7* (16), 7234–7245.
- (49) Ilkhani, H.; Sarparast, M.; Noori, A.; Zahra Bathaie, S.; Mousavi, M. F. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *74*, 491–497.
- (50) Tang, C. K.; Vaze, A.; Rusling, J. F. *Anal. Methods* **2014**, *6* (22), 8878–8881.
- (51) Hu, Y.; Zuo, P.; Ye, B.-C. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *43*, 79–83.
- (52) Jelinek, R.; Kolusheva, S. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (12), 5987–6016.
- (53) Zhang, X.; Lu, W.; Shen, J.; Jiang, Y.; Han, E.; Dong, X.; Huang, J. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *74*, 291–298.
- (54) Koide, S.; Yokoyama, K. *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *468* (2), 193–201.
- (55) Bourigua, S.; El Ichi, S.; Korri-Youssoufi, H.; Maaref, A.; Dzyadevych, S.; Jaffrezic Renault, N. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *28* (1), 105–111.
- (56) Cass, A. E. G.; Davis, G.; Green, M. J.; Hill, H. A. O. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1985**, *190* (1–2), 117–127.
- (57) Hendry, S. P.; Cardosi, M. F.; Turner, A. P. F.; Neuse, E. W. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *281* (3), 453–459.
- (58) Lu, B.; Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; O’Kennedy, R. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *345* (1–3), 59–66.
- (59) Yang, D.-W.; Gong, F.-C.; Cao, Z. *Sens. Actuators B Chem.* **2006**, *114* (1), 152–157.
- (60) Canonne, F.; Perrée-Fauvet, M.; Mahy, J. P.; Korri-Youssoufi, H. *Sens. Lett.* **2008**, *6* (4), 570–576.
- (61) Garjonyte, R.; Malinauskas, A. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15* (9–10), 445–451.
- (62) Bélanger, D.; Pinson, J. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (7), 3995–4048.
- (63) Deinhammer, R. S.; Ho, M.; Anderegg, J. W.; Porter, M. D. *Langmuir* **1994**, *10* (4), 1306–1313.
- (64) Adenier, A.; Chehimi, M. M.; Gallardo, I.; Pinson, J.; Vilà, N. *Langmuir* **2004**, *20* (19), 8243–8253.
- (65) Friestad, G. K.; Jiang, T.; Mathies, A. K. *Tetrahedron* **2007**, *63* (19), 3964–3972.
- (66) Chrétien, J.-M.; Ghanem, M. A.; Bartlett, P. N.; Kilburn, J. D. *Chem. - Eur. J.* **2008**, *14* (8), 2548–2556.
- (67) Lee, J. H.; Chang, K. Z.; Patel, V.; Jeffery, C. J. *Biochemistry (Mosc.)* **2001**, *40* (26), 7799–7805.
- (68) Arsenieva, D.; Appavu, B. L.; Mazock, G. H.; Jeffery, C. J. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2009**, *74* (1), 72–80.
- (69) Jeffery, C. J.; Bahnson, B. J.; Chien, W.; Ringe, D.; Petsko, G. A. *Biochemistry (Mosc.)* **2000**, *39* (5), 955–964.
- (70) Jeffery, C. J.; Hardré, R.; Salmon, L. *Biochemistry (Mosc.)* **2001**, *40* (6), 1560–1566.
- (71) Arsenieva, D.; Hardré, R.; Salmon, L.; Jeffery, C. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (9), 5872–5877.
- (72) Tiefenbrunn, K.; Dawson, P. E. *Biopolymers* **2009**, *94*, 95–105.
- (73) Jencks, W. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 475–481.
- (74) Rose, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (1), 30–33.
- (75) Spinelli, N.; Edupuganti, O. P.; Defrancq, E.; Dumy, P. *Org. Lett.* **2007**, *9* (2), 219–222.
- (76) Rappoport, Z.; Liebman, J. F. John Wiley and Sons, 2009; Vol. 2.
- (77) Lee, B. S.; Chu, S.; Lee, I. Y.; Song, C. E.; Chi, D. Y. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2000**, *21*.
- (78) Cervigni, S. E.; Dumy, P.; Mutter, M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35* (11), 1230–1232.
- (79) Baskin, J. M.; Dehnert, K. W.; Laughlin, S. T.; Amacher, S. L.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (23), 10360–10365.
- (80) Dirksen, A.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (45), 7581–7584.
- (81) Dirksen, A.; Dirksen, S.; Hackeng, T. M.; Dawson, P. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (49), 15602–15603.
- (82) *US Pat Appl Publ* **2005**.
- (83) Sentandreu, M. Á.; Aubry, L.; Toldrá, F.; Ouali, A. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *224* (5), 623–628.
- (84) Baumann, M.; Kappl, A.; Lang, T.; Brand, K.; Siegfried, W.; Paterok, E. *Cancer Invest.* **1990**, *8* (3–4), 351–356.
- (85) Karousis, N.; Tagmatarchis, N.; Tasis, D. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (9), 5366–5397.
- (86) Mezei, G.; Kampf, J. W.; Pecoraro, V. L. *New J. Chem.* **2007**, *31* (3), 439.
- (87) Mortimer, R. J. *Electrochimica Acta* **1999**, *44* (18), 2971–2981.
- (88) Ghanem, M. A.; Kocak, I.; Al-Mayouf, A.; AlHoshan, M.; Bartlett, P. N. *Electrochimica Acta* **2012**, *68*, 74–80.
- (89) Noltmann, E. A. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1966; Vol. 9, pp 557–565.
- (90) Bonnette, C.; Salmon, L.; Gaudemer, A. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (8), 1221–1224.
- (91) Hardré, R.; Salmon, L.; Oppendoes, F. R. *J. Enzym. Inhib.* **2000**, *15* (5), 509–515.

Partie expérimentale de la partie A

Microscopie à force atomique (AFM)

Les mesures ont été effectuées avec un appareil Veeco di Innova Scanning Probe Microscope en mode Tapping dans l'air et à température ambiante. Les pointes utilisées sont en silicium et ont une résistivité de 0,02 Ω .m. La fréquence de résonance moyenne est de 420 kHz. Les images de 1 μm^2 ont été réalisées avec une fréquence de balayage de 1,5 Hz. Chaque ligne de balayage est constituée de 512 pixels.

Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les études de microscopie électronique à balayage sont effectuées en utilisant un canon à émission de champ SUPRA 55 VP ZEISS à faible tension (1 kV) et à faible courant (quelques pA). Les images sont acquises à très faible distance de l'échantillon pour observer l'échantillon et pas une couche conductrice qui serait absorbée sur l'échantillon.

Angle de contact

Pour déterminer l'hydrophilie de la surface, l'angle de contact des différentes surfaces d'or modifiées est déterminé grâce à la méthode de Young-Laplace avec un goniomètre DSA100 de marque Krüss. Il est piloté par le logiciel « Drop Shape Analyses ». Toutes les analyses sont réalisées à 20 °C avec des gouttes de 3 μL . L'eau est utilisée pour évaluer l'hydrophilie de surface et l'éthylène glycol et le dichlorométhane pour établir l'énergie de surface des films.

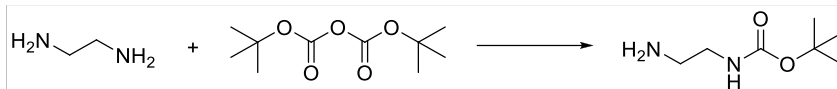
Infrarouge à Transformée de Fourier (IRTF)

Les spectres IR sont enregistrés sur un spectromètre FT-IR Vertex 70 (Bruker), avec un cristal de diamant ou de germanium. Les analyses sont effectuées en utilisant un détecteur MCT, une vitesse de balayage de 20 kHz et un nombre de scans de 50. Les données sont traitées avec le logiciel OPUS (Bruker).

Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été réalisés en utilisant trois appareils différents : DPX 250, DRX 300 et AV 360 de chez Bruker. Les échantillons sont préparés en solubilisant 10 mg de produit dans un solvant deutéré pour les spectres protons et 40 mg pour les spectres carbone.

Synthèse de l'éthylène diamine monobocquée⁶⁵



Dans un ballon sont additionnés du dichlorométhane anhydre (250 mL) et de l'éthylène diamine (6,7 mL, 100,0 mmol). À la solution résultante, maintenue à 0°C à l'aide d'un bain de glace, est ajoutée au goutte à goutte (20 min) une solution de dicarbonate de di-tert-butyle (10,91 g, 50,0 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (100 mL). À la fin de l'ajout on obtient une solution trouble blanchâtre qui est agitée pendant une heure puis filtrée. Le filtrat est concentré à sec, une huile transparente est obtenue et de l'eau (150 mL) est ajoutée. Un précipité blanc se forme, est filtré sous vide pour récupérer le filtrat (transparent) qui est saturé avec du carbonate de potassium (K_2CO_3) (de manière à rendre le milieu basique et permettre à l'amine de passer en phase organique : $K_2CO_3 + H_2O \rightarrow KHCO_3 + KOH$), puis extrait avec de l'éther diéthylique (3×75 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et concentrée à sec de manière à obtenir une huile transparente incolore. Rendement isolé de 50,6 %. HRMS m/z : calc = 160,121 ; trouvé = 161,128.

Électrodéposition de l'éthylène diamine monobocquée⁶⁶

Une solution d'éthylène diamine monobocquée à 10 mM dans du tétrafluoroborate de tétrabutylammonium (TBATFB) à 0,1 M dans l'acétonitrile est préparée et dégazée sous argon. Cette solution est placée dans une microcellule avec l'électrode de travail (l'électrode d'or qui nous servira de biocapteur et qui a été activée préalablement) et la contre-électrode. L'électrode de référence est placée dans la cuve électrochimique contenant une solution de TBATFB à 0,1 M dans l'acétonitrile. Un balayage de potentiel allant de 0,5 à 1,8 V durant 4 cycles à une vitesse de 50 mV/s est effectué.

Déprotection de l'éthylène diamine⁶⁶

Les groupements Boc sont hydrolysés en laissant l'électrode incubée durant 4 heures à température ambiante dans une solution d'acide chlorhydrique à 4 M dans du dioxane. L'électrode est ensuite lavée par du diméthylformamide, une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1 M, de l'eau ultra-pure et de l'éthanol.

Électrodéposition de l'éthylène diamine en conditions diluées

Une solution d'éthylène diamine à 10 mM dans du perchlorate de lithium ($LiClO_4$) à 0,5 M dans l'eau est préparée et dégazée sous argon. Cette solution est placée dans une microcellule avec l'électrode de travail (l'électrode d'or qui nous servira de biocapteur et qui a été activée préalablement) et la contre-électrode. L'électrode de référence est placée dans la cuve électrochimique contenant une solution de $LiClO_4$ à 0,5 M dans l'eau. Un balayage de potentiel allant de 0 à 1,1 V durant 10 cycles à une vitesse de 50 mV/s est effectué.

Électrodéposition de l'éthylène diamine en conditions concentrées

Une solution d'éthylène diamine à 1 M dans LiClO₄ à 0,5 M dans l'eau est préparée et dégazée sous argon. Cette solution est placée dans une microcellule avec l'électrode de travail (l'électrode d'or qui nous servira de biocapteur et qui a été activée préalablement) et la contre-électrode. L'électrode de référence est placée dans la cuve électrochimique contenant une solution de LiClO₄ à 0,5 M dans l'eau. Un balayage de potentiel allant de 0 à 0,7 V durant 6 cycles à une vitesse de 50 mV/s est effectué.

Modes opératoires du chapitre 3

Construction du biocapteur → Surface A

Pour la première étape, une solution d'éthylène diamine à 1 M dans LiClO₄ à 0,5 M dans l'eau est préparée et dégazée sous argon. Cette solution est placée dans une microcellule avec l'électrode de travail et la contre-électrode de platine. L'électrode de référence Ag/AgCl est placée dans la cuve électrochimique contenant une solution de LiClO₄ à 0,5 M dans l'eau. Un balayage de potentiel allant de 0 à 0,7 V durant 6 cycles à une vitesse de 50 mV/s est effectué. À la fin de l'électrodeposition, l'électrode est rincée à l'eau ultra pure.

Pour la deuxième étape, une solution de polyéthylène glycol aminé à 10 mM dans LiClO₄ à 0,5 M dans l'acétonitrile est préparée et dégazée sous argon. Cette solution est placée dans une microcellule avec l'électrode de travail et la contre-électrode de platine. L'électrode de référence Ag/AgCl est placée dans la cuve électrochimique contenant une solution de LiClO₄ à 0,5 M dans l'acétonitrile. Un balayage de potentiel allant de 0 à 1,1 V durant 10 cycles à une vitesse de 50 mV/s est effectué. Suite à cet électrodépôt, l'électrode est rincée à l'acétonitrile.

Construction du biocapteur → Surface B

Un eppendorf contenant 200 µL de PBS pH 7,4 avec 10 mM d'acide (Boc)aminoxyéthanoïque préalablement synthétisé, 25 mM d'EDC et 25mM de NHS est préparé. L'électrode (surface A) y est plongée et est laissée 2,5 heures à température ambiante. L'électrode est ensuite lavée à l'eau ultra pure.

Pour l'étape de déprotection, une solution d'acide chlorhydrique à 2 M dans de l'acide acétique est préparée. 100 µL de cette solution sont introduites dans un eppendorf dans lequel on plonge l'électrode durant 2 heures à température ambiante. Elle est ensuite lavée à l'eau ultra-pure.

Construction du biocapteur → Surface C

Une solution de 6-phosphate-D-fructose à 2 mg/mL est préparée dans du tampon acétate à 100 mM pH 4,6. L'électrode est incubée dans cette solution durant une nuit à 50 °C. Pour cela, l'eppendorf est placé dans un bain-marie thermostaté à 50 °C. L'électrode est ensuite lavée avec une solution de tween à 0,1 % dans PBS. Le tween est un surfactant qui va permettre d'enlever les molécules de fructose non greffées covalamment.

Construction du biocapteur → Surface D

Le blocage des extrémités oxyaminées a été effectué en plongeant l'électrode dans une solution de PBS contenant 10 mM d'acide pentanoïque, 25 mM d'EDC et 25 mM de NHS durant 5,5 heures à température ambiante. L'électrode est ensuite lavée à l'eau ultra-pure.

Ensuite en dernière étape, l'électrode est immergée dans une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) à 100 μ M dans PBS contenant 2,5 % de Tween 20 pendant 10 minutes à température ambiante (20 °C). À la fin de l'incubation, l'électrode est lavée plusieurs fois avec du PBS contenant 0,1 % de Tween 20.

Sensibilité du biocapteur → Détection de la RmPGI

La phosphoglucose isomérase de muscle de lapin (RmPGI) a été détectée dans une gamme de concentration variant de 10 fM à 100 nM. Toutes les solutions ont été préparées dans un tampon Tris à 50 mM (pH 8,0), filtrées à l'aide de micro-filtres et maintenues à 0 °C avant utilisation. L'électrode biocapteur est incubée avec 50 μ L de solution de RmPGI à la concentration désirée durant 1 heure à température ambiante (20 °C). Le biocapteur est ensuite lavé successivement avec du PBS contenant 0,1 % de Tween 20 et de l'eau ultra-pure.

Spécificité du biocapteur → Détection de ScG6PDH

La glucose-6-phosphate déshydrogénase de *Saccharomyces cerevisiae* (ScG6PDH) a été mise en contact avec le biocapteur dans une gamme de concentration variant de 100 fM à 100 nM. Toutes les solutions ont été préparées dans un tampon Tris à 50 mM (pH 8,0) contenant 0,01 M de $MgCl_2$, filtrées à l'aide de micro-filtres et maintenues à 0 °C avant utilisation. L'électrode biocapteur est incubée avec 50 μ L de solution de RmPGI à la concentration désirée durant 1 heure à température ambiante (20 °C). Le biocapteur est ensuite lavé successivement avec du PBS contenant 0,1 % de Tween 20 et de l'eau ultra-pure.

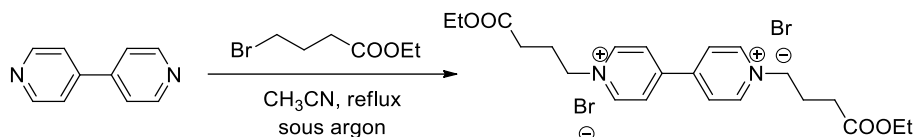
Modes opératoires du chapitre 4

Synthèse des NTC-COOH

La purification consiste à mettre les nanotubes de carbone dans une solution d'acide nitrique à 68% et les sonifier durant 3 h. Afin de récupérer les nanotubes purifiés, nous centrifugeons le mélange de manière à les séparer de l'acide surnageant. Puis plusieurs étapes de lavage des nanotubes à l'eau ultra-pure ont lieu jusqu'à arriver à une solution de nanotubes de pH neutre. Un dernier lavage à l'acétone suivi d'un séchage à 210 °C termineront la procédure de purification. Les nanotubes de carbone sont conservés au frigo en attendant l'étape d'oxydation.

Lors de l'étape d'oxydation, les nanotubes sont mis dans une solution d'acide nitrique et d'acide sulfurique en proportion de volume 1 pour 3 et sont sonifiés durant 4 h. Les étapes suivantes sont les mêmes que précédemment, c'est-à-dire centrifugation pour enlever la solution d'acide, puis lavages jusqu'à atteindre un pH d'environ 7. Pour sécher correctement les NTC-COOH, un dernier lavage à l'acétone puis un passage à l'étuve ont lieu.

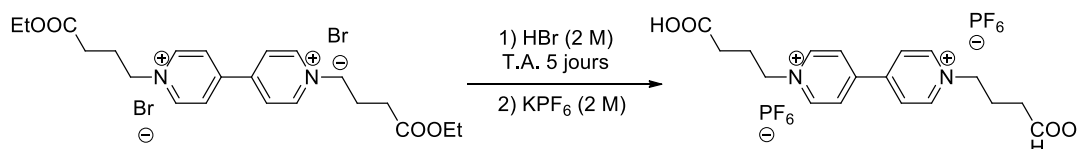
Synthèse du viologène diCOOEt diBr (**1**)⁸⁶



1,16 g de 4,4'-bipyridine (7,43 mmol) et 7,4 mL de 4-bromobutanoate d'éthyle (51,3 mmol) sont portés au reflux durant deux jours dans 40 mL d'acétonitrile sous argon. Après refroidissement à température ambiante, la suspension jaune est versée dans 40 mL d'éther diéthylique, filtrée et lavée avec de l'acétonitrile et de l'éther diéthylique. Pour finir, elle est bien séchée de manière à obtenir une poudre jaune correspondant au mélange du monosubstitué et du disubstitué. Nous n'avons pas trouvé de méthode de séparation efficace des deux composés à ce stade. D'après le RMN effectuée, nous avons exactement 50% de molécule monosubstituée et 50% de molécule disubstituée.

RMN ¹H (D₂O) 250 MHz δ (ppm) : 9,10 (6H, doublet, 6,8 Hz, 6xCHAR) ; 8,98 (2H, doublet, 6,75 Hz, 2xCHAR) ; 8,52 (6H, doublet, 6,8 Hz, 6xCHAR) ; 8,44 (2H, doublet, 6,75 Hz, 2xCHAR) ; 4,08 (6H, quadruplet, 7,25 Hz, CH₂ du COOEt) ; 2,53 (6H, triplet, 7,0 Hz, CH₂-COOEt) ; 2,35 (6H, quintuplet, 7,0 Hz, CH₂) ; 1,18 (9H, triplet, 7,25 Hz, CH₃ du COOEt)

Synthèse du viologène diCOOH diPF₆ (**2**)⁸⁶



Dans un ballon de 5 mL, dissoudre 500 mg du mélange de viologène diCOOEt diBr et monoCOOEt monoBr (correspondant à 304 mg de disubstitué + 196 mg de monosubstitué, c'est-à-dire 0,557 mmol de chaque) dans 1,5 mL de bromure d'hydrogène. Le mélange est agité à température ambiante pendant 5 jours.

Ensuite, le solvant est évaporé pour obtenir un liquide jaunâtre qui est repris dans de l'éther diéthylique (3 mL), filtré, lavé une nouvelle fois à l'éther diéthylique puis filtré sous vide afin d'y être séché. La poudre récupérée est dissoute dans de l'eau ultra pure (1,2 mL), puis une solution d'hexafluorophosphate de potassium (1,8 mL, 2 M) est ajoutée de manière à faire précipiter le composé disubstitué sous forme d'un solide blanc. Ce solide est filtré avec un surplus d'hexafluorophosphate de potassium pour obtenir une belle poudre. La poudre est récupérée puis mise à sécher à l'étuve (30-40°C) afin d'obtenir 337 mg du composé **2** pur, soit un rendement de 98%.

RMN ¹H (D₂O) 300 MHz δ (ppm) : 9,10 (4H, doublet, 6,5 Hz, 4xCHAR) ; 8,51 (4H, doublet, 6,5 Hz, 4xCHAR) ; 4,74 (4H, triplet, 7,2 Hz, CH₂-N) ; 2,50 (4H, triplet, 7,2 Hz, CH₂-COOH) ; 2,3 (4H, quintuplet, 7,2 Hz, CH₂).

Greffage du viologène sur le transducteur

L'électrode est incubée durant deux heures à température ambiante dans une solution de viologène diCOOH à 1 mM contenant de l'EDC à 5 mM et du NHS à 5 mM. L'électrode est lavée à l'eau ultra-pure.

Annexes de la partie A

Annexe 1 : Notions de base en électrochimie (3 pages).

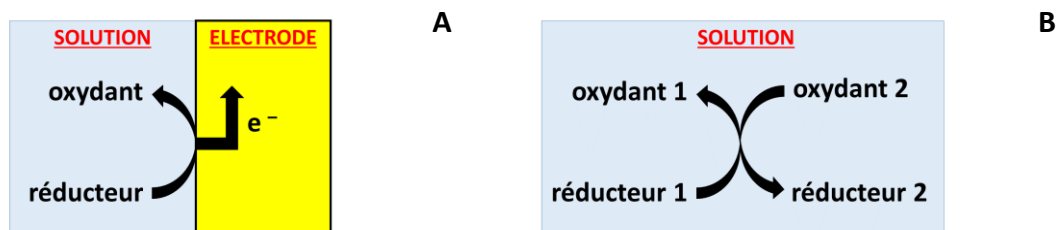
L'électrochimie est une discipline qui étudie la relation entre transformations chimiques et passage de courant électrique. Son domaine d'application est extrêmement vaste : la production d'énergie électrique à partir des réactions chimiques (piles, accumulateurs), la réalisation de réactions chimiques à partir d'énergie électrique (électrolyses), la réalisation de batteries, la détermination de mécanismes et de cinétiques réactionnels (par exemple pour la corrosion) ou encore, en ce qui nous concerne, la détection et le dosage d'espèces chimiques (capteurs électrochimiques).

L'étude des réactions électrochimiques fait appel à des connaissances dans des domaines très variés de la chimie et de la physique. Le but de ce paragraphe est d'introduire quelques-unes des notions de base nécessaires à l'étude de ces réactions : il s'agit principalement des notions d'oxydant-réducteur, d'électrolyte, d'électrode, de cellule et de potentiel électrochimique.

Oxydant et réducteur

Les notions d'oxydant et de réducteur sont définies relativement à un échange d'électron(s) entre un accepteur et un donneur. Par définition, on appelle oxydant l'accepteur d'électron, et réducteur le donneur d'électron. En conséquence, l'oxydation est une perte d'électron(s) subie par le réducteur, alors que la réduction est un gain d'électron(s) subi par l'oxydant.

Il existe deux configurations possibles de la réaction de transfert d'électrons entre un réducteur et un oxydant. Le premier cas correspond au domaine des réactions électrochimiques, alors que le second correspond au domaine des réactions d'oxydo-réduction. Nous nous intéresserons au cas des réactions électrochimiques.

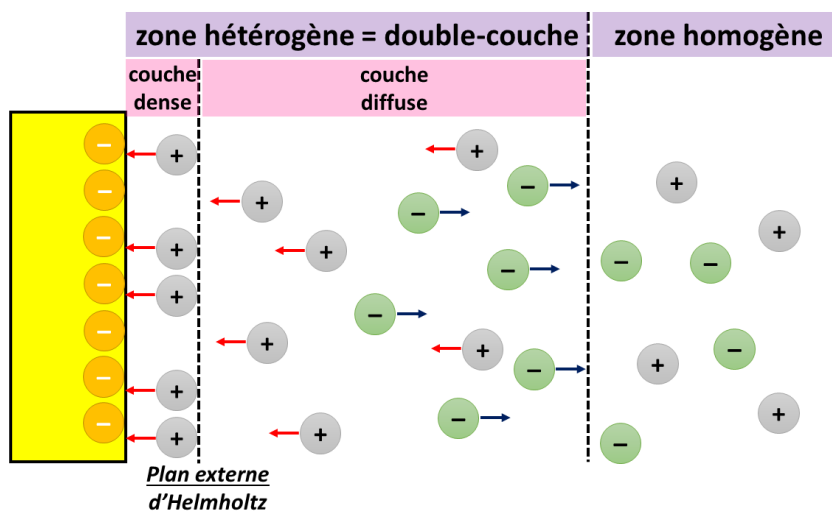


Représentation de la réaction de transfert d'électrons entre le réducteur et l'oxydant dans les deux configurations possibles : (A) réaction électrochimique à l'interface conducteur-solution et (B) réaction chimique en solution.

Réaction électrochimique

Une réaction électrochimique correspond à un transfert d'électron(s) entre un oxydant (ou un réducteur) et une électrode métallique. La vitesse de la réaction électrochimique au contact d'une électrode est proportionnelle à l'intensité du courant traversant l'électrode. Lorsque l'intensité du courant est positive, la réaction à l'électrode est une oxydation (l'électrode est une anode), tandis que lorsque l'intensité est négative, la réaction à l'électrode est une réduction (l'électrode est alors une cathode).

La réaction électrochimique se produit au sein d'un milieu réactionnel hétérogène au voisinage de l'interface de l'électrode—solution, que l'on peut schématiser par le modèle dit de la double-couche proposé par Helmholtz. La solution est donc séparée en deux zones : la zone hétérogène, dite aussi de double-couche, au voisinage de l'électrode, et la zone homogène. La zone hétérogène consiste en deux couches divisées par le plan externe d'Helmholtz : la couche dense, plus proche de l'électrode, où le transfert de charge faradique s'effectue, et la couche diffuse où se produit le transfert de charge non-faradique. Ces deux types de processus de transfert de charge seront étudiés par la suite.



Représentation schématique du modèle dit de « double-couche ».

Le transfert de charge faradique tient compte de la réaction d'oxydo-réduction qui se situe à la surface de l'électrode.

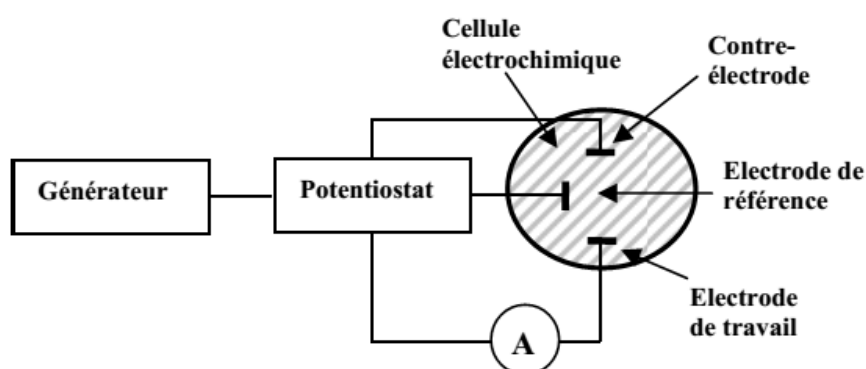
Dans un électrolyte, les particules chargées peuvent se déplacer selon trois phénomènes principaux : la **diffusion**, la **migration** et la **convection**.

La diffusion concerne les molécules ou les ions qui se déplacent dans la solution sous l'effet d'un gradient de concentration. Alors que pour la migration le déplacement des ions a lieu sous l'effet du champ électrique présent dans l'électrolyte. Quant à la convection, elle s'applique lorsqu'une agitation mécanique de la solution est effectuée.

Au cours de notre étude, nous nous sommes toujours placés en solution ionique fortement concentrée en ions non-électroactifs pour assurer le transfert de charge non faradique. La migration des espèces électroactives est ainsi minimisée. De plus, nous n'avons ni agité la solution, ni mis en mouvement les électrodes : nous minimisons donc également le mode convectif. Ainsi, **nous ne considérerons que le phénomène de diffusion pour les espèces électroactives.**

Montage expérimental

Afin d'obtenir une courbe de l'intensité en fonction du potentiel d'une électrode de travail, deux mesures sont à effectuer. Il faut mesurer d'une part, la différence de potentiel entre l'interface électrode—solution et une électrode de référence, et d'autre part, l'intensité du courant qui circule entre l'électrode de travail et la contre-électrode (en précisant si l'électrode reçoit ou fournit des électrons, ce qui correspond au signe du courant). Le montage à trois électrodes utilisé est présenté ci-dessous.

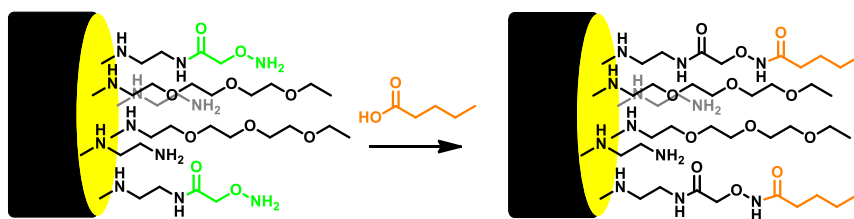


Dispositif expérimental pour les mesures à potentiel contrôlé.

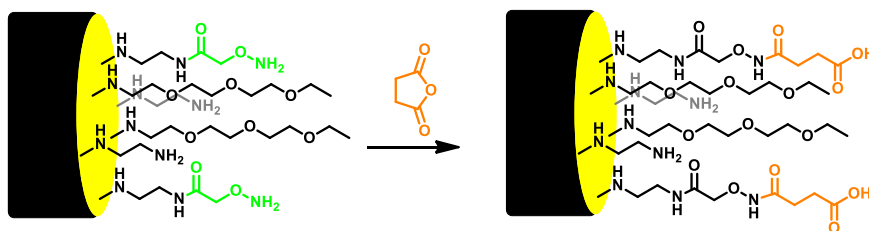
La **cellule électrochimique** contient la solution électrolytique dans laquelle plongent trois électrodes : l'**électrode de travail** dont on mesure le potentiel E par rapport à une **électrode de référence** (Ag/AgCl par exemple, ou E.C.S.) à l'aide d'un voltmètre. Le **potentiostat** contrôle cette différence de potentiel fournie par un générateur extérieur. Un courant circule alors dans la cellule de l'électrode de travail à la contre-électrode (ou l'inverse). Il est mesuré à l'aide d'un **ampèremètre (symbole A)**. Le courant ne circule pas dans l'électrode de référence pour maintenir fixe son potentiel. Les trois électrodes sont rapprochées au maximum dans le but d'éviter les chutes ohmiques. Enfin, afin d'éliminer si nécessaire l'oxygène dissous, le mode opératoire implique généralement de faire barboter un gaz inerte (argon) pendant quelques minutes.

Annexe 2 : Choix de la molécule de blocage à l'étape 5 de construction.

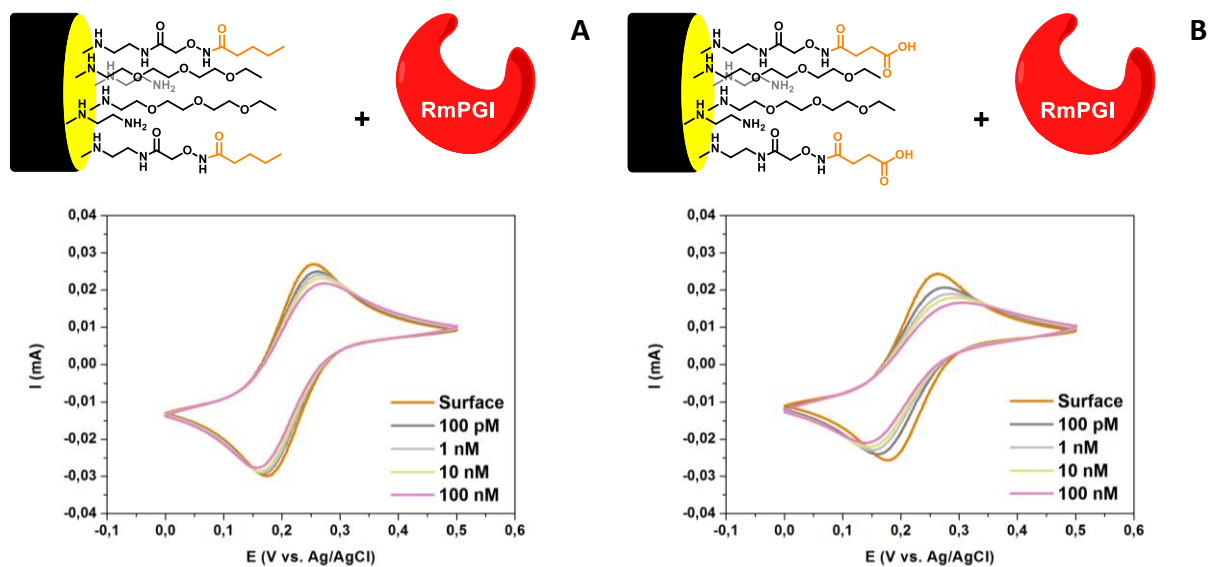
Les acides aminés présents à la surface de l'enzyme sont à la fois polaires et apolaires. Ainsi, nous avons choisi de tester deux molécules de blocage, l'une à l'extrémité plutôt apolaire (**acide pentanoïque**) et l'autre plutôt à l'extrémité polaire (**acide succinique**).



Blocage des oxyamines libres par l'acide pentanoïque.



Blocage des oxyamines libres par l'acide succinique.



(A) Voltammogramme cyclique de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ d'une électrode d'or activée + ED + PEG + OxNH_2 , et où les extrémités oxyamines sont bloquées par de l'acide pentanoïque, en contact avec différentes concentrations de RmPGI.

(B) Voltammogramme cyclique de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ d'une électrode d'or activée + ED + PEG + OxNH_2 , et où les extrémités oxyamines sont bloquées par de l'acide succinique, en contact avec différentes concentrations de RmPGI.

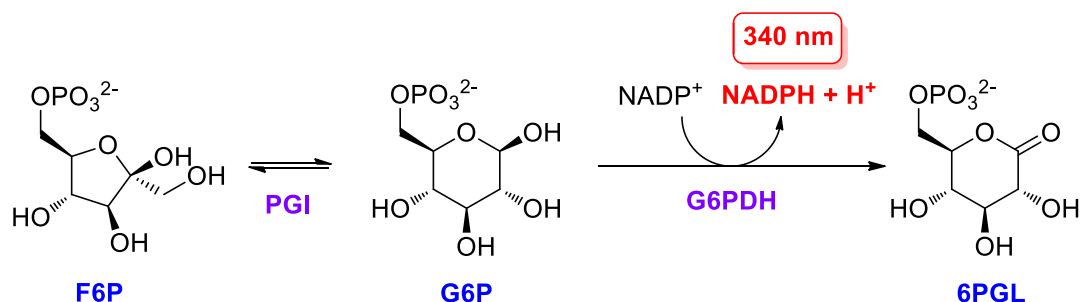
Nous pouvons voir que l'intensité du signal $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ varie moins lorsque les oxyamines sont bloquées par de l'acide pentanoïque, ce qui est cohérent avec le fait que la RmPGI possède plutôt des acides aminés polaires à sa surface. C'est donc l'acide pentanoïque que nous avons choisi pour bloquer les oxyamines qui seront restées libres à la surface de l'électrode après le greffage du biorécepteur F6P.

Annexe 3 : Principe de l'évaluation de l'activité de la RmPGI.

Les substrats des PGI ne présentent pas de signal spectroscopique exploitable. Des enzymes de couplage sont alors utilisées pour générer des espèces détectables (par pHmétrie, spectroscopie...) et mesurer la vitesse initiale de la réaction. Ces enzymes de couplage sont ajoutées en large excès de manière à ce que la réaction catalysée par l'enzyme étudiée soit bien l'étape limitante.

La réaction d'isomérisation du F6P en G6P catalysée par la PGI est réversible : on peut donc mesurer les vitesses initiales de la réaction dans les deux sens. Deux types d'expériences sont donc généralement utilisés :

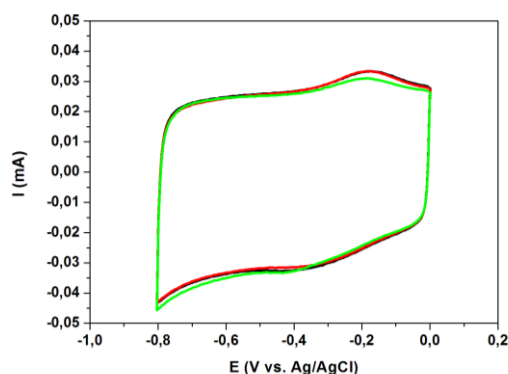
- Dans le sens 6-phosphate-D-glucose (G6P) vers 6-phosphate-D-fructose (F6P), on couple la réaction de la PGI avec la phosphofructokinase (PFK), ce qui permet de passer du G6P au 1,6-diphosphate-D-fructose. L'étape catalysée par la PFK libère des protons, la mesure du pH en fonction du temps donne alors directement accès à la vitesse de formation du F6P et donc à l'activité de la PGI.
- Dans le sens 6-phosphate-D-fructose (F6P) vers 6-phosphate-D-glucose (G6P), la réaction est couplée avec celle de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). Cela permet de passer du F6P à la 6-phosphate-D-gluconolactone. L'étape d'oxydation catalysée par la G6PDH nécessite l'utilisation d'un cofacteur, le NADP⁺ (nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (forme oxydée)), et s'accompagne de la formation de NADPH (nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (forme réduite)) absorbant à 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La mesure de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps donne alors directement accès à la vitesse de formation du F6P et donc à l'activité de la PGI (le NADPH étant la seule espèce en jeu absorbant à cette longueur d'onde).⁸⁹ Cette dernière méthode est la plus largement répandue dans la littérature. Elle a été adaptée et appliquée au laboratoire par C. Bonnette,⁹⁰ et R. Hardré.⁹¹ Nous avons également utilisé cette méthode pour l'évaluation de l'activité PGI.



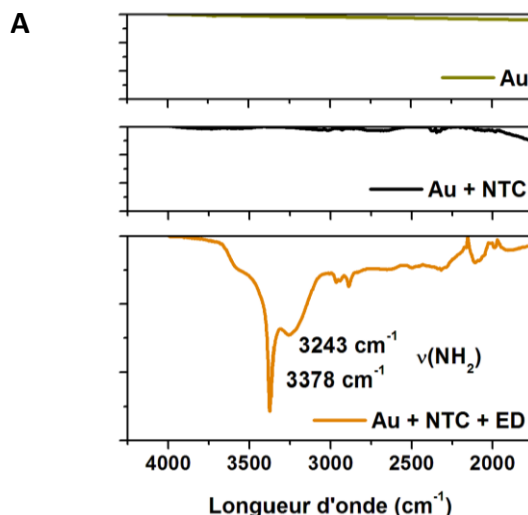
Méthode de dosage enzymatique de la PGI.

Le F6P, la G6PDH et le cofacteur et MgCl₂ sont d'abord mélangés en présence de tampon Hepes à 50 mM pH 7,1. Ce mélange est ensuite transféré dans une cuve spectrophotométrique de 1,5 mL et placé dans le spectrophotomètre, maintenu à la température de 25 °C grâce à un thermostat. Après quelques minutes d'incubation à 25 °C, la PGI est ajoutée, les cuves sont agitées, et on peut observer une augmentation d'absorbance à 340 nm due à la formation de NADPH. La mesure de la pente donne donc accès à la vitesse initiale de la réaction catalysée par la PGI.

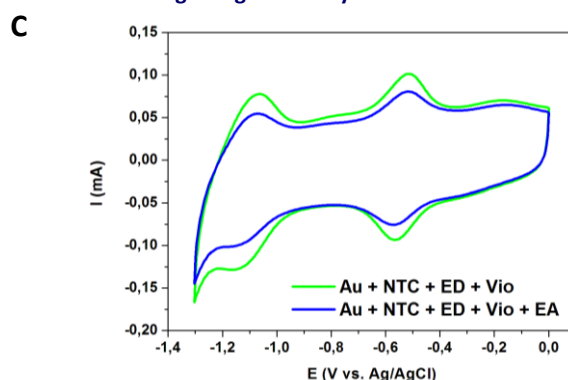
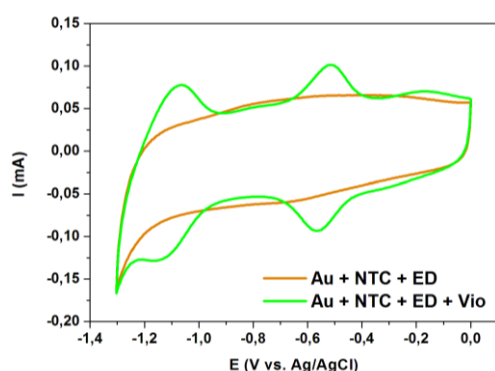
Annexe 4 : Construction du transducteur à base de NTC non modifiés.



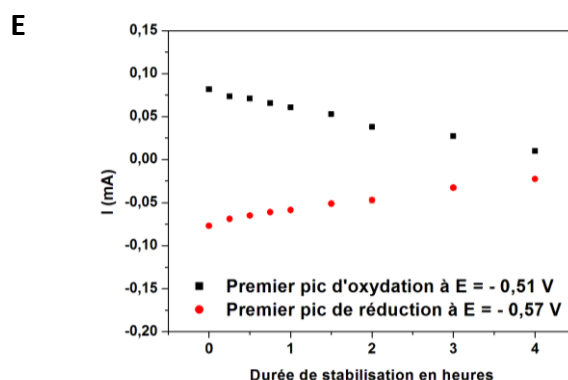
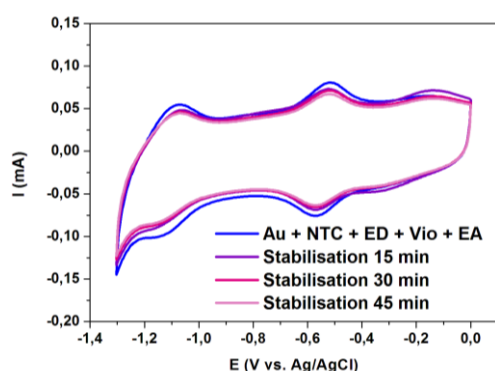
Analyse dans PBS de trois électrodes d'or activées après le dépôt des NTC non modifiés.



Spectre infrarouge à transformée de Fourier avec un ATR utilisant un cristal de Diamant de la surface après le greffage de l'éthylène diamine..



Voltampérogrammes cycliques de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ montrant l'élaboration du transducteur à base de nanotubes de carbone non modifiés.



Stabilité du signal au cours du temps.

L'infrarouge a transformée de Fourier présente deux bandes caractéristiques de l'apparition d'une amine primaire à la surface : une bande à 3378 cm^{-1} et une bande à 3243 cm^{-1} . L'éthylène diamine est bien greffée covalamment aux nanotubes de carbone.

Lorsque la construction a été réalisée sur les nanotubes de carbone non modifiés, le signal n'est pas stable, et diminue, ce qui indique que la vitesse des réactions augmente. Ceci est dû par la perte des nanotubes sur la surface.

—

PARTIE B

Études des interactions AMF/PGI–biocapteur par mécanique moléculaire polarisable

La partie B est divisée en cinq chapitres. Le premier chapitre est une introduction sur les champs de forces. Le deuxième chapitre explique comment nous avons mis en place un modèle d'AMF/PGI pour SIBFA à partir de données cristallographiques disponibles dans la littérature. Chaque étape d'élaboration est présentée. Le troisième chapitre présente la construction d'un mime de biorécepteur et détaille les étapes de calibration de ses fragments constitutifs. Dans le quatrième chapitre, l'étape de docking entre le mime et le modèle d'AMF/PGI est décrite et une discussion est ouverte sur les quelques résultats obtenus sur les interactions existantes au sein du complexe. Le dernier chapitre présente les perspectives dont des études sont déjà en cours de réalisation. Notamment au sujet de l'étude des interactions entre le mime et l'AMF/PGI de muscle de lapin en solution.

SOMMAIRE DÉTAILLÉ

Chapitre 1. Introduction sur les champs de forces	145
1.1. Mécanique moléculaire	145
1.1.1. Champs de forces classiques	145
1.1.2. Champs de forces polarisables	147
1.2. Mécanique moléculaire polarisable SIBFA	148
1.2.1. Principe et historique	148
1.2.2. Formulation de la procédure SIBFA	148
1.2.3. Contributions individuelles de l'énergie	149
1.2.4. Caractéristiques distinctives de la méthode SIBFA	151
Chapitre 2. Mise en place du modèle d'AMF/PGI pour SIBFA	153
2.1. Présentation de la structure 1IRI	153
2.2. Reconstitution du dimère A–B avec SIBFA	154
2.2.1. Représentations schématiques des chaînes A et B	154
2.2.2. Récupération des données cristallographiques	156
2.2.3. Traitement des données	159
2.2.4. Ajout des extrémités <i>N</i> -acétylées	161
2.2.5. Relaxation des monomères	162
2.3. Bilan : assemblage et validation du modèle	163
Chapitre 3. Construction d'un mime de biorécepteur par SIBFA	164
3.1. Présentation du mime d'intérêt	164
3.2. Création des trois nouveaux fragments	164
3.2.1. Méthode générale	165
3.2.2. Numérotation des atomes et des barycentres de liaison	166
3.2.3. Récupération des coordonnées des fragments	167
3.2.4. Récupération des multipôles et polarisabilités	167
3.2.5. Calibration des fragments	168
3.3. Bilan : assemblage et validation du mime	172
Chapitre 4. Docking dans la protéine modélisée	174
4.1. Définition de la zone de docking	174
4.1.1. Choix des segments composant l'AMF réduite	174
4.1.2. Mise en place de l'AMF réduite pour SIBFA	177
4.2. Point d'ancrage du mime dans l'AMF réduite	178
4.3. Molécules d'eau structurales	178
4.4. Docking du mime dans l'AMF réduite	180
4.4.1. Relaxation du mime de biorécepteur dans l'AMF réduite	180
4.4.2. Minimisation d'énergie et interactions mises en jeu	181
4.5. Bilan : interactions mises en jeu lors de la reconnaissance	185

Chapitre 5. Perspectives	186
5.1. Nouvelle interaction favorable mime—AMF/PGI	186
5.2. Tests cinétiques mime vs. RmPGI	188

Chapitre 1. Introduction sur les champs de forces

La structure tridimensionnelle des molécules ou macromolécules peut être obtenue par des techniques expérimentales telles que la diffraction aux rayons X (cristaux) et/ou la spectroscopie de RMN (solutions). Cependant, dans le cas où de telles études ne peuvent pas être mises en œuvre, ou en complément de celles-ci, des études structurales théoriques peuvent aujourd'hui être initiées. En effet, au cours de ces dernières années, le développement important des outils informatiques (vitesse de calcul, stockage de données...) a permis à la biologie et à la chimie de s'enrichir d'outils spécialement dédiés à la représentation des molécules, permettant ainsi aux scientifiques de mieux appréhender les problèmes d'ordre structural.

Par le biais de la **modélisation moléculaire**, il est désormais possible de déterminer, par le calcul, la structure et les propriétés d'une protéine à partir de la connaissance de sa composition et de la résolution de l'équation de Schrödinger correspondante. Les principales méthodes de résolution de cette équation sont des **méthodes de chimie quantique *ab-initio*** comme la méthode Hartree-Fock (HF), la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT) ou encore la méthode Moller-Plesset (MP2).

La chimie quantique permet une étude précise des systèmes moléculaires, en déterminant la structure électronique et l'énergie d'une molécule pour un arrangement donné des noyaux. Elle reste toutefois contrainte à traiter des complexes de taille relativement faible. Le coût de calcul, aussi bien en termes de temps machine que de mémoire vive limite son application à des systèmes d'une centaine d'atomes. Ainsi, l'étude de systèmes étendus tels que des biomolécules, des polymères ou des systèmes solvatés reste difficile à un niveau de précision quantique. C'est pourquoi de tels systèmes sont généralement traités par des **méthodes classiques de mécanique moléculaire** couramment appelées « champs de forces », qui peuvent décrire des biomolécules comportant plusieurs milliers d'atomes.

1.1. Mécanique moléculaire

1.1.1. Champs de forces classiques

Pour les champs de forces usuels de type AMBER,¹ CHARMM² ou GROMOS,³ l'énergie d'interaction entre les atomes (qui représente l'énergie totale du système) est décomposée en deux types d'interactions : intra- et intermoléculaires telles que :

$$E_{\text{totale}} = E_{\text{intramoléculaire}} + E_{\text{intermoléculaire}}$$

Dans tous les champs de forces classiques, chaque terme entrant dans la formulation de l'énergie totale est calibré sur des expériences et/ou des calculs *ab-initio*. Ils diffèrent généralement peu dans l'expression des contributions de leur énergie et ne se distinguent que par les différentes valeurs de leurs paramètres.

1.1.1.1. Interactions intramoléculaires

Les interactions intramoléculaires se distinguent selon trois grandes « familles » de degrés de liberté : un terme d'*élongation* entre deux atomes voisins, un terme de *déformation angulaire* entre trois atomes consécutifs et un terme de *torsion* entre quatre atomes consécutifs. Ainsi, dans les champs de forces classiques, l'énergie d'interaction intramoléculaire est formulée comme :

$$E_{\text{intramoléculaire}} = E_{\text{élongation}} + E_{\text{déformation angulaire}} + E_{\text{torsion}}$$

L'énergie d'élongation ($E_{\text{élongation}}$) décrit la rigidité de la liaison de longueur ρ (Figure I A). L'énergie de déformation angulaire ($E_{\text{déformation angulaire}}$) tend à décrire la capacité de deux liaisons à « s'ouvrir » et à se contracter selon la valeur de l'angle de liaison θ (Figure I B). Quant à l'énergie de torsion (E_{torsion}), elle fait intervenir quatre atomes consécutifs séparés par trois liaisons covalentes. Elle décrit la flexibilité de rotation autour de la liaison formée par les atomes 2 et 3 et nécessite la définition de l'angle dièdre considéré (Figure I C).

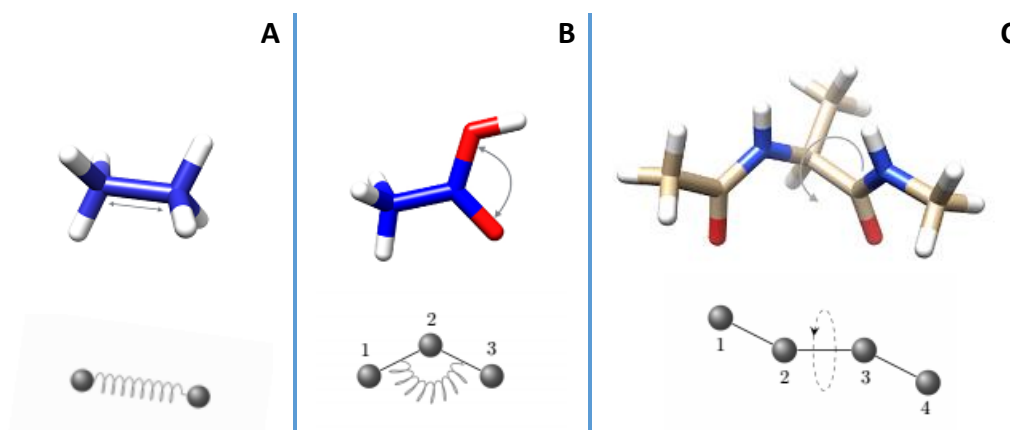


Figure I : (A) Schéma de l'élongation de liaison, cas de l'éthane. (B) Schéma de la déformation angulaire, cas d'un acide. (C) Schéma de la torsion d'un squelette peptidique (angle dièdre considéré : ψ défini par $\text{NH}_{(i)}-\text{C}\alpha_{(i)}-\text{CQ}_{(i)}-\text{NH}_{(i+1)}$).

1.1.1.2. Interactions intermoléculaires

Les interactions intermoléculaires sont les principales forces motrices de complexation. Parmi ces interactions non-covalentes, la plus importante est l'*interaction électrostatique* avec typiquement les liaisons hydrogènes. À cela s'ajoute un traitement à courte et longue distance des *interactions dites de Van der Waals*. Ainsi, dans les champs de forces classiques, l'énergie d'interaction intermoléculaire est formulée comme :

$$E_{\text{intermoléculaire}} = E_{\text{elec}}^{\text{perm}} + E_{\text{vdw}}$$

Le terme **électrostatique** représente l'interaction entre les charges ponctuelles partielles q_i et q_j portées par des atomes i et j séparés d'une distance r_{ij} . Le terme de **Van der Waals** représente la répulsion à courte distance ainsi que la dispersion à plus longue distance. Il est souvent obtenu grâce à un potentiel de Lennard-Jones.⁴ Ce potentiel décrit l'interaction attractive ($1/r^6$) et répulsive ($1/r^{12}$) entre deux particules séparées d'une distance r .

1.1.1.3. Limitations des champs de force classiques

Si de tels champs de forces ont donné des résultats satisfaisants dans de nombreux cas notamment dans le cadre de modélisations dynamiques, ils restent néanmoins limités dans plusieurs situations impliquant un calcul quantitatif des énergies d'interaction intermoléculaire. C'est le cas lorsqu'un cation métallique est présent, mais aussi pour des interactions entre molécules polaires et/ou polarisables. Les champs de forces classiques ne permettent pas de traiter, dans un système, les effets de polarisation et de non-additivité avec une bonne description. C'est pourquoi de nouveaux champs de forces « polarisables » ont été développés.

1.1.2. Champs de forces polarisables

Parmi les champs de forces polarisables, dits de seconde génération, nous pouvons citer AMOEBA⁵ ou SIBFA.^{6,7} Ces deux champs de force sont basés sur l'utilisation de multipôles distribués afin de décrire la distribution de charge. Cependant leur schéma de distribution est différent.

Le champ de forces AMOEBA reste dans un schéma classique de type AMBER ou CHARMM auquel s'ajoutent les calculs des effets électrostatiques des dipôles et quadrupôles et le traitement explicite de la polarisation. Ce champ de forces s'est montré particulièrement intéressant pour reproduire le comportement dynamique de cations solvatés (nombre de coordination...).

Le potentiel de mécanique moléculaire SIBFA adopte une approche différente. Il se base sur les résultats des décompositions en chimie quantique *ab-initio* (QC : *Quantum Chemistry*) de l'énergie d'interaction et inclut la contribution de polarisation mais aussi celle de transfert de charge. Elle s'appuie sur l'utilisation de multipôles (charges, dipôles et quadrupôles) distribués sur les atomes et les milieux de liaisons afin de reproduire au plus près chacune des contributions individuelles de l'énergie d'interaction. L'utilisation de ce potentiel est choisie au cours de notre étude.

1.2. Mécanique moléculaire polarisable SIBFA

1.2.1. Principe et historique

SIBFA (*Sum of Interactions Between Fragments Ab-initio computed*) est une méthode de mécanique moléculaire sophistiquée reposant sur un champ de force polarisable (appelé lui aussi SIBFA) basé sur des multipôles distribués. Il a été conçu et développé en France dans les années 80 par Nohad Gresh, Pierre Claverie et Alberte Pullman.⁷ Il est actuellement co-développé par Nohad Gresh, Jean-Philip Piquemal et leurs collaborateurs.⁶

La méthode SIBFA considère les molécules flexibles comme **un assemblage de fragments moléculaires élémentaires rigides** (correspondant à de petites molécules) reliés entre eux par des pseudo-liaisons formées par des **atomes d'hydrogène fictifs**. Ces fragments peuvent subir des rotations les uns par rapport aux autres ce qui confère une flexibilité à la molécule qu'ils constituent. Les paramètres de ces fragments sont calibrés de manière à reproduire aussi précisément que possible les résultats de calculs-tests de chimie quantique *ab-initio* effectués avec la méthode Hartree-Fock (HF). De plus, des barrières énergétiques de rotation sont fixées pour chaque pseudo-liaison entre fragments à partir de calculs conformationnels obtenus par mécanique quantique sur des petites molécules comme l'éthane ou l'éther diméthylque.⁷

SIBFA permet d'obtenir des calculs fiables à la fois sur les énergies conformationnelles (donc intramoléculaires) et intermoléculaires qui induisent les propriétés de liaisons spécifiques des molécules d'intérêt biologique et pharmacologique. Ce champ de force fait donc l'objet de nombreuses applications pour l'**étude des complexes ligand—macromolécule**. Il permet de modéliser aussi bien des systèmes peptidiques ou protéiques^{8–13} que des systèmes incluant des espèces métalliques telles que le zinc(II)^{10,14} et le cuivre(I).¹⁵

1.2.2. Formulation de la procédure SIBFA

L'**énergie d'interaction intramoléculaire** ($E_{\text{intramoléculaire}}$) qui découle de la méthode SIBFA correspond en fait à l'énergie d'interaction intermoléculaire ($E_{\text{intermoléculaire}}$) entre les fragments constitutifs avec une contribution supplémentaire : l'énergie de torsion (E_{torsion}) décrivant la déformation des angles dièdres.

$E_{\text{intermoléculaire}}$ est formulée comme étant la somme de cinq contributions séparées :

$$E_{\text{intermoléculaire}} = E_{\text{élec}} + E_{\text{rép}} + E_{\text{pol}} + E_{\text{transfert de charge}} + E_{\text{disp}}$$

$E_{\text{élec}}$ pour l'électrostatique multipolaire avec correction à courte portée, $E_{\text{rép}}$ pour l'échange répulsion principalement à courte-portée, E_{pol} pour la polarisation, $E_{\text{transfert de charge}}$ pour le transfert de charge et E_{disp} pour la dispersion et échange-dispersion.⁷ Chaque contribution individuelle de l'énergie va être détaillée par la suite.

1.2.3. Contributions individuelles de l'énergie

1.2.3.1. Énergie électrostatique multipolaire

L'énergie électrostatique multipolaire est calculée comme une somme de six termes décrivant respectivement les interactions entre les multipôles : charge-charge, charge-dipôle, charge-quadrupôle, dipôle-dipôle, dipôle-quadrupôle et quadrupôle-quadrupôle.

L'utilisation de charges ponctuelles atomiques (dans les champs de forces classiques) n'est pas suffisante pour décrire la densité de charge puisque l'anisotropie de la densité électronique n'est pas prise en compte. L'utilisation des multipôles distribués permet une meilleure description de la distribution de charge. Ils sont issus d'un développement multipolaire de la densité de charge calculée au niveau *ab-initio* permettant ainsi d'obtenir les charges (ordre du développement multipolaire 0), les dipôles (ordre 1) et les quadrupôles (ordre 2). Les multipôles peuvent être associés aux orbitales atomiques (Schéma I).

La charge est décrite comme une orbitale sphérique (orbitale s, $\ell = 0$), le dipôle est constitué d'une charge positive et négative (orbitale p, $\ell = 1$) et le quadrupôle est représenté par les orbitales d ($\ell = 2$) avec ℓ le moment angulaire. De cette manière on tient compte de l'hybridation du carbone.

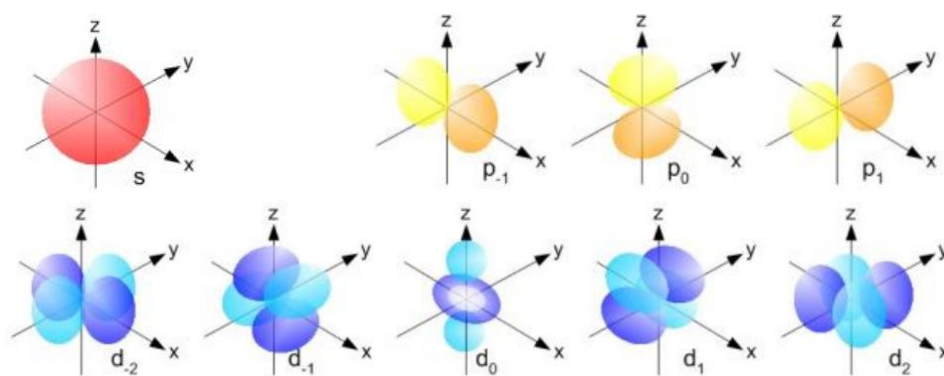


Schéma I : Schéma des orbitales atomiques.

Les multipôles sont distribués sur les atomes et milieux de liaison. Ils sont extraits des orbitales moléculaires (OM) de la molécule à l'aide d'une procédure développée par Fabienne Vigné-Maeder et Pierre Claverie.¹⁶ La dérivation des multipôles distribués a été initialement traitée au début des années 1970 par Marc Dreyfus et Pierre Claverie à partir des orbitales moléculaires *ab-initio*^{17,18} et par Robert Rein à partir des OM résultant de calculs avec une méthode de Huckel itérative.^{19,20}

L'obtention de ces multipôles se base sur la discrétisation de la densité électronique ; elle dépend du niveau de calcul et de la base utilisée. Dans ce travail la méthode Hartree-Fock est utilisée pour calculer la densité. Nous utilisons le programme d'analyse des multipôles distribués de Stone (GDMA) permettant d'obtenir les multipôles à partir de calculs effectués sur de petits fragments au niveau HF.²¹ Cette meilleure description de densité nous permet une évaluation plus précise de l'énergie électrostatique.²²

E_{elec} est augmentée d'un terme attractif, recouvrement-dépendant, dit de pénétration de charge.^{23,24} Sa prise en compte permet une reproduction significativement améliorée de la contribution Coulombienne, à mesure que les deux monomères se rapprochent.²²

1.2.3.2. Énergie d'échange-répulsion

L'énergie d'échange-répulsion s'écrit comme une somme de trois termes correspondant aux paires d'interaction répulsives liaison–liaison, liaison–paire libre et paire libre–paire libre (Figure II).

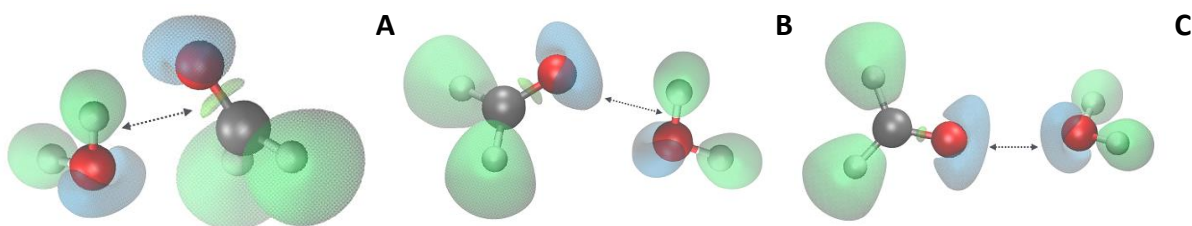


Figure II : Représentation par la fonction de localisation électronique (ELF) de (A) la répulsion liaison–liaison entre l'eau à gauche et le formaldéhyde à droite, (B) la répulsion liaison–paire libre entre la paire libre du formaldéhyde à gauche et la liaison de l'eau à droite et (C) la répulsion paire libre–paire libre entre le formaldéhyde à gauche et l'eau à droite.

La fonction de localisation électronique (*ELF : Electron Localization Function*) est un outil d'analyse topologique de la fonction chimique similaire aux concepts de la théorie VSEPR. Elle permet de distinguer l'espace en différentes régions (nommées bassins) pour différencier les paires libres (représentées en bleu) des liaisons covalentes (représentées en vert).

1.2.3.3. Énergie de polarisation

Il est important de rappeler que l'énergie de polarisation représente la déformation des distributions de charges lors de l'interaction d'une molécule donnée par le champ électrique généré par les molécules environnantes. Elle dépend du champ électrique et des polarisabilités des molécules. Le champ polarisable est calculé avec les mêmes multipôles qu' E_{elec} auquel on ajoute une fonction gaussienne pour écranter les centres polarisables. Cette gaussienne est donc dépendante de la distance entre les deux centres interagissant. Ce type d'écrantage permet d'éviter un effet connu à courte-distance : la catastrophe de polarisation.²⁵

La polarisabilité est le rapport du moment dipolaire au champ électrique, elle peut être définie comme la capacité d'une molécule à acquérir un moment dipolaire induit. Les polarisabilités sont distribuées sur les milieux des liaisons et sur les barycentres des paires libres. Elles sont obtenues en suivant la procédure de David Garmer et Walter Stevens²⁶ après une localisation des orbitales moléculaires (OM) par la méthode de Samuel Francis Boys.²⁷ Selon cette approche, les polarisabilités sont distribuées sur un fragment moléculaire sans interagir ensemble. Leur valeur ne sera modifiée que par le champ électrique global créé par les autres fragments moléculaires.

1.2.3.4. Énergie de transfert de charge

Le transfert de charge désigne le transfert d'électrons des orbitales occupées d'un atome vers les orbitales non occupées d'un atome voisin. L'énergie de transfert de charge a été formulée suivant les travaux de Murrell et coll..²⁸ Cette contribution a été explicitement intégrée à $E_{\text{intermoléculaire}}$ en 1982-1986.^{29,30} Elle dépend du recouvrement entre les doublets d'électrons libres du fragment donneur et les orbitales moléculaires anti-liantes localisées sur les liaisons chimiques de l'accepteur.

1.2.3.5. Énergie de dispersion

La dispersion représente les interactions attractives à longue distance des dipôles instantanés. Elle est formulée comme la somme de trois interactions : atome—atome, paire libre—paire libre et atome—paire libre en fonction de r^{-6} , r^{-8} et r^{-10} . À courte distance, ces termes sont ajustés par une fonction exponentielle d'amortissement. Cette fonction permet de prendre en compte les interactions mutuelles entre les divers fragments (phénomène d'échange-dispersion).

1.2.4. Caractéristiques distinctives de la méthode SIBFA

Pour qu'une méthodologie de mécanique moléculaire puisse reproduire les résultats de la chimie quantique avec précision, elle doit représenter les caractéristiques essentielles suivantes^{31,32} : *séparabilité*, *anisotropie*, *non-additivité* et *transférabilité*. La méthode SIBFA répond à l'ensemble de ces critères ce qui lui permet d'être tout-à-fait adaptée pour l'étude des interactions ligand-macromolécule.

1.2.4.1. Séparabilité

$E_{\text{intermoléculaire}}$ doit être exprimée sous la forme de contributions séparées et distinctes. Chaque contribution doit être formulée et calibrée afin de reproduire au plus près sa contrepartie d'un calcul de chimie quantique résultant d'une analyse de décomposition d'énergie.

1.2.4.2. Anisotropie

$E_{\text{intermoléculaire}}$ et ses contributions individuelles doivent être capables de reproduire les évolutions angulaires des contributions correspondantes en chimie quantique, lors de variations dans ou hors du plan de l'approche d'une molécule par rapport à l'autre.

1.2.4.3. Non-additivité

$E_{\text{intermoléculaire}}$ et ses contributions individuelles doivent être capables de refléter la non-additivité de leurs équivalents d'un calcul de chimie quantique lors du passage de complexes bimoléculaires à des complexes multimoléculaires. Dans ces derniers, les énergies totales d'interaction peuvent différer de façon très significative des interactions correspondantes sommées deux à deux : elles peuvent être plus grandes ou plus petites en valeurs absolues : c'est le cas des interactions coopératives et anti-coopératives, respectivement.

1.2.4.4. Transférabilité

Le potentiel de mécanique moléculaire, ayant été calibré à la base sur un ensemble de fragments limités pour reproduire les résultats de chimie quantique, doit pouvoir être validé sur une diversité de complexes biomoléculaires, puis sur des complexes multimoléculaires sans avoir à changer la calibration initiale.

Chapitre 2. Mise en place du modèle d'AMF/PGI pour SIBFA

La problématique de mon travail de thèse présentée dans la partie B est l'étude des interactions AMF/PGI—biocapteur par mécanique moléculaire polarisable. Pour cela il faut tout d'abord construire un modèle d'AMF/PGI. Deux choix s'offraient à nous : modéliser l'AMF/PGI de lapin, afin de comparer avec les résultats de détection en milieu PBS et plasma humain déjà disponibles ; ou bien modéliser l'AMF/PGI humaine dans la perspective de tester le biocapteur sur des échantillons réels de sérum de patients atteints de cancer. Or, ces deux enzymes possèdent 93 % d'homologie et les acides aminés du site actif (entrant dans le mécanisme de reconnaissance) sont hautement conservés. De ce fait, les résultats d'interaction devraient être comparables dans les deux cas. L'AMF/PGI humaine a donc été choisie. Ce chapitre présente la méthode employée pour reconstituer cette protéine avec SIBFA à partir des données cristallographiques de la littérature.

2.1. Présentation de la structure 1IRI

L'étude théorique présentée dans ce chapitre utilise comme support initial les coordonnées de la structure de l'AMF humaine complexée avec l'érythrose-4-phosphate (E4P) rapportée dans la Protein Data Bank (**PDB 1IRI**).³³ La structure PDB 1IRI possède deux homodimères **A–B** et **C–D**. Nous travaillerons sur le dimère **A–B** (Figure III A).

Afin d'étudier les interactions entre le biocapteur et l'AMF/PGI, nous n'avons besoin de modéliser que le site de fixation du biorécepteur, c'est-à-dire un seul site actif du dimère **A–B**. La première idée est donc de ne prendre en compte qu'un seul monomère, soit **A** soit **B**. Malheureusement, cette solution est impossible car **une histidine de la chaîne A (His 389 A) est impliquée dans le site actif de la chaîne B** et vice versa (Figure III). Nous avons donc été contraints de construire le dimère **A–B** dans son entièreté.

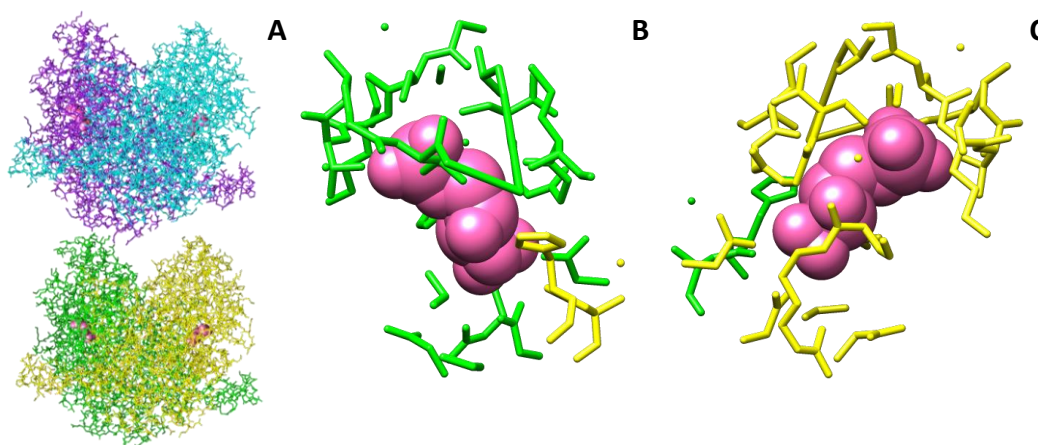


Figure III : (A) Visualisation par Chimera des deux homodimères A–B et C–D de l'AMF humaine (PDB 1IRI)³³ (chaînes A en vert, B en jaune, C en violet et D en bleu). (B) et (C) Érythrose-4-phosphate et acides aminés au voisinage (jusqu'à une distance de 5 Å) au niveau du monomère A et du monomère B respectivement.

2.2. Reconstitution du dimère A–B avec SIBFA

La méthode SIBFA repose sur une représentation des molécules en termes de coordonnées internes (distances inter-fragments, angles de liaisons et angles dièdres). Les fragments constituant l'AMF/PGI ont tout d'abord été schématisés puis les angles dièdres du squelette peptidique de l'AMF/PGI ont été mesurés sur la structure cristalline. Avec la séquence de la protéine et ces angles dièdres, des programmes intégrés à SIBFA permettent de reconstruire la protéine à partir de ses fragments constitutifs pris dans la bibliothèque standard de SIBFA.

2.2.1. Représentations schématiques des chaînes A et B

La première étape à effectuer pour réussir à construire le dimère entier est de dessiner une représentation schématique de chacune des deux chaînes **A** et **B** sur papier en se servant de leurs fragments constitutifs. Pour les oligopeptides, la chaîne principale est constituée d'une succession de groupes **formamides** et **méthanés** ayant la distribution multipolaire d'un *N*-méthylformamide (Schéma II).

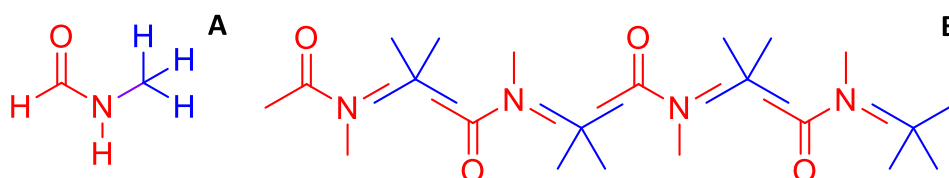


Schéma II : Représentations du *N*-méthylformamide (A) et de la chaîne principale d'un oligopeptide selon SIBFA (pour plus de clarté les hydrogènes ne sont pas représentés) (B).

De la même façon, chaque chaîne latérale est reconstruite à partir de groupes méthanés et du groupe terminal spécifique de la chaîne latérale (Schéma III).

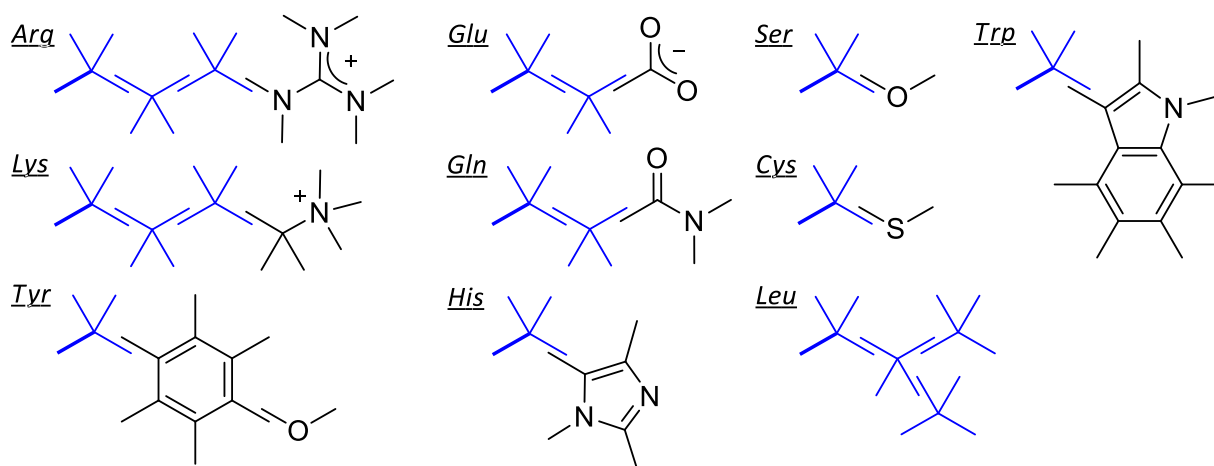


Schéma III : Exemples de chaînes latérales de quelques acides aminés représentés selon les modalités SIBFA. Les hydrogènes ne sont pas représentés pour plus de clarté. La liaison en gras représente la liaison par laquelle on va greffer la chaîne latérale sur la chaîne principale de la protéine.

Les groupements terminaux de l'*arginine* (Arg, R) et de la *lysine* (Lys, K) sont modélisés par des groupements **guanidinium** et **méthylammonium** respectivement. En revanche, pour l'*aspartate* (Asp, D) et le *glutamate* (Glu, E) ce sera un groupement **carboxylate**. Pour l'*asparagine* (Asn, N) et la *glutamine* (Gln, Q), nous utiliserons un groupement **formamide**. L'hydroxyle de la *sérine* (Ser, S) et de la *thréonine* (Thr, T), sera tout simplement modélisé par une molécule d'**eau**. Tandis que pour la *cystéine* (Cys, C) et la *méthionine* (Met, M), nous avons besoin de **sulfure d'hydrogène**. Le cycle aromatique de la *phénylalanine* (Phe, F) et de la *tyrosine* (Tyr, Y) sera représenté par un groupement **phényle**.

Les acides aminés possédant un groupement terminal un peu plus complexe seront modélisés par un groupement **indole** pour le *tryptophane* (Trp, W) et par un groupement **imidazole** pour l'*histidine* (His, H). Les acides aminés aliphatiques, *alanine* (Ala, A), *valine* (Val, V), *isoleucine* (Ile, I) et *leucine* (Leu, L) seront modélisés par des groupes **méthanés**. Pour la *glycine* (Gly, G), nous n'ajoutons aucune chaîne latérale. Dans le cas de la *proline* (Pro, P), l'ossature de la chaîne principale doit être modifiée (Schéma IV).

Chacun des fragments de ces oligopeptides doit ensuite être **numéroté**, ainsi que chaque atome de ces fragments, selon un **ordre précis** défini par SIBFA en commençant par la chaîne principale puis la chaîne latérale. Après avoir reconstruit toute la chaîne **A** (557 acides aminés car on ne modélise pas le dernier de la chaîne : la glutamine 558) selon ce modèle, ce sont 2495 fragments et 26669 centres qui ont été dénombrés, soient **4990 fragments et 53338 centres pour le dimère entier**. En effet, chaque sous-unité du modèle contient les résidus 1 à 557, les deux acides aminés terminaux de chaque sous-unité (la glutamine 558) étant désordonnés.

À titre d'exemple, la construction d'une partie de la chaîne **A** de l'AMF (de l'asparagine 7 à la phénylalanine 10) selon le procédé SIBFA est présentée au Schéma V. Ainsi, pour un oligopeptide de 4 acides aminés, 14 fragments et 91 centres ont été répertoriés. Il peut être remarqué sur ce schéma le cas particulier des prolines qui s'intègrent directement dans la chaîne principale. La rigueur lors de la numérotation est donc particulièrement importante. Chaque proline est modélisée par une 1-pyrrolidinecarbaldéhyde (Schéma IV).

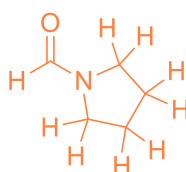


Schéma IV : Structure de la 1-pyrrolidinecarbaldéhyde.

Au final, pour le monomère **A**, les fragments vont **du n°1 au n°1095** pour la chaîne principale et **du n°1096 au n°2495** pour les chaînes latérales, tandis que pour le monomère **B**, les fragments vont **du n°2496 au n°3590** pour la chaîne principale et **du n°3591 au n°4990** pour les chaînes latérales.

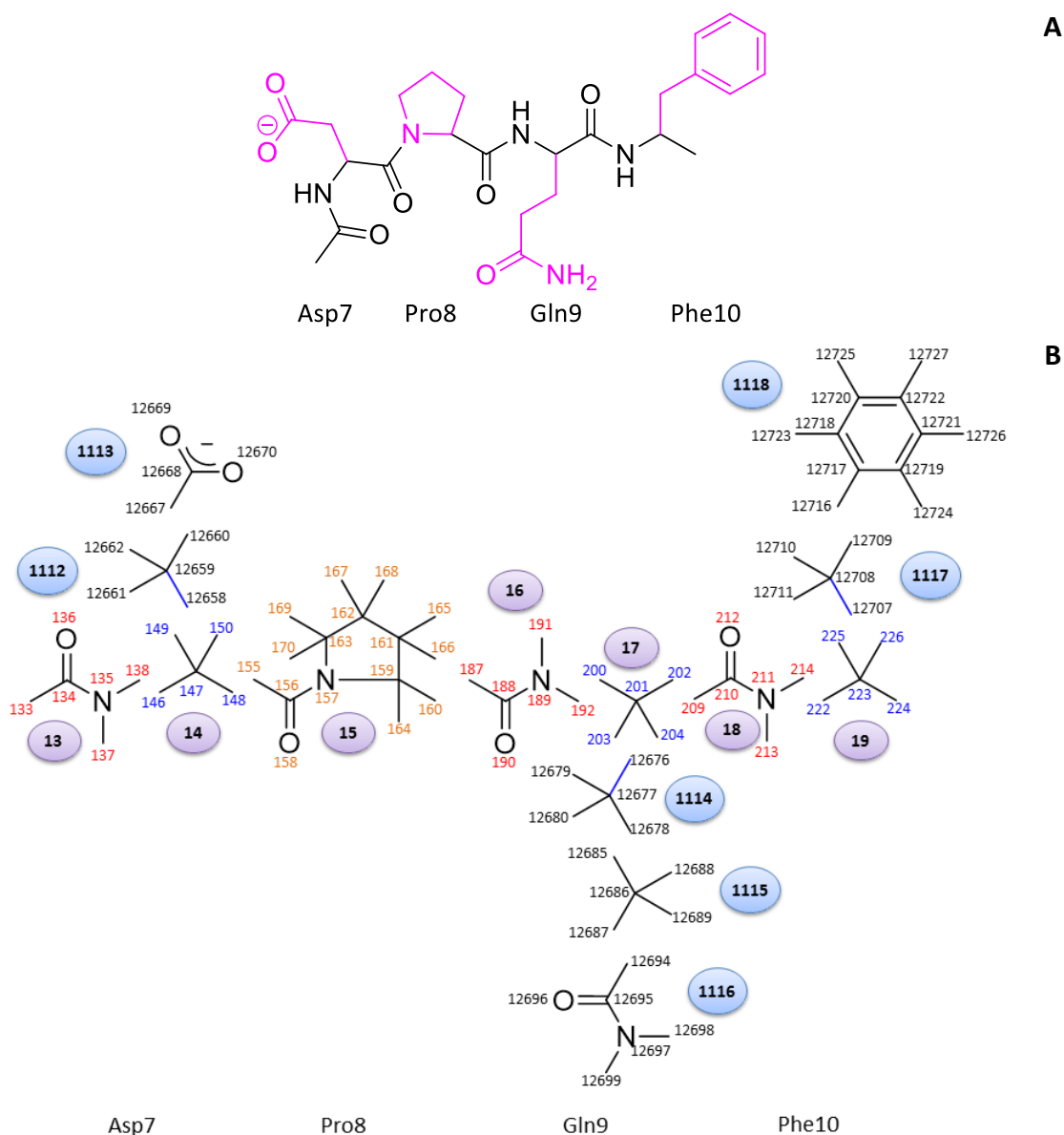


Schéma V : (A) Représentation du segment Asp7–Phe10. (B) Représentation schématique de ce même segment reconstruit selon les modalités SIBFA. Chaque atome est numéroté ainsi que chaque fragment (dans un cercle).

2.2.2. Récupération des données cristallographiques

2.2.2.1. Les atomes

Les coordonnées des atomes du dimère AMF/PGI sont extraites du fichier PDB (1IRI). Les acides aminés étant des résidus dits standard (tout comme les constituants des acides nucléiques : bases, sucre et groupement phosphodiester), leurs coordonnées atomiques sont données par le champ « ATOM » de PDB. La Figure IV présente le fichier de récupération des données pour le segment Asp7–Gln9 du monomère **A** de l'AMF/PGI. Une structure de ce segment ainsi qu'un tableau expliquant la signification des colonnes pour le champ « ATOM » du fichier PDB sont donnés au Schéma VI.

Schéma VI : (A) Représentation topologique du segment Asp7–Gln9 du monomère A de l'AMF/PGI numéroté selon la PDB (1IRI). (B) Tableau décrivant le champ « ATOM ».

Figure IV : Fichier de récupération des coordonnées des atomes du segment Asp7–Gln9 du monomère A de l'AMF/PGI de la PDB (1IRI).

2.2.2.2. Les angles dièdres

Ensuite, la valeur des **angles dièdres** (**phi** (ϕ), **psi** (ψ), **chi₁** (χ_1), **chi₂** (χ_2), **chi₃** (χ_3) et **chi₄** (χ_4)) de chaque acide aminé du monomère **A** d'une part, et du monomère **B** d'autre part, sont récupérés. Ces angles dièdres ont été mesurés sur la structure cristallographique de l'AMF/PGI (1IRI) à l'aide du programme Insight II d'Accelrys (version 2005).

Les angles dièdres ϕ et ψ concernent la chaîne principale tandis que les angles dièdres χ_1 , χ_2 , χ_3 et χ_4 confèrent la liberté conformationnelle aux chaînes latérales. Les chaînes latérales n'ont pas toutes la même longueur et ne possèdent donc pas toutes le même nombre d'angles chis. Le Schéma VII représente la liste des vingt acides aminés avec la décomposition de leur chaîne latérale, les atomes allant d'**alpha** - α - à **êta** - η -, ainsi que le nombre d'angles chis qui leur est associé.

Sur ce schéma, les acides aminés entourés en **rouge** sont ceux qui ne possèdent que l'angle χ_1 . Les acides aminés entourés en **vert** possèdent un angle χ_1 et un angle χ_2 . Les acides aminés entourés en **bleu** possèdent les angles χ_1 , χ_2 et χ_3 . Les acides aminés entourés en **rose**, Lys et Arg, possèdent les angles χ_1 , χ_2 , χ_3 et χ_4 .

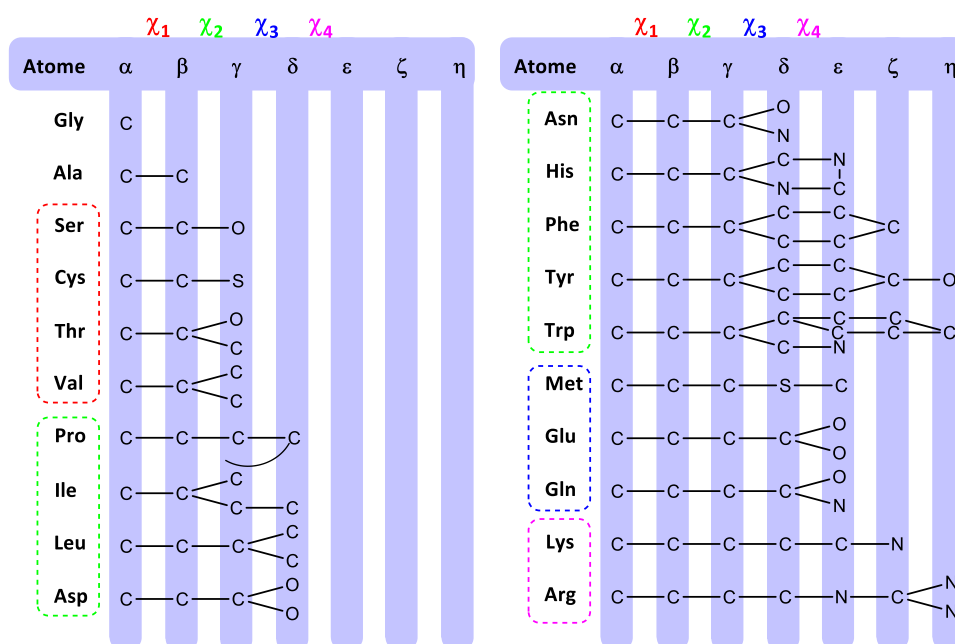


Schéma VII : Décomposition des chaînes latérales des vingt acides aminés et angles χ_1 , χ_2 , χ_3 et χ_4 qui leur sont associés.

Afin de mesurer chaque angle dièdre de chaîne latérale, les **coordonnées des quatre atomes** sont nécessaires. Il en est d'ailleurs de même pour les angles ϕ et ψ de la chaîne principale. La Figure V montre comment sont mesurés les angles phi, psi et chis du segment Asp7–Pro8–Gln9 de l'AMF/PGI.

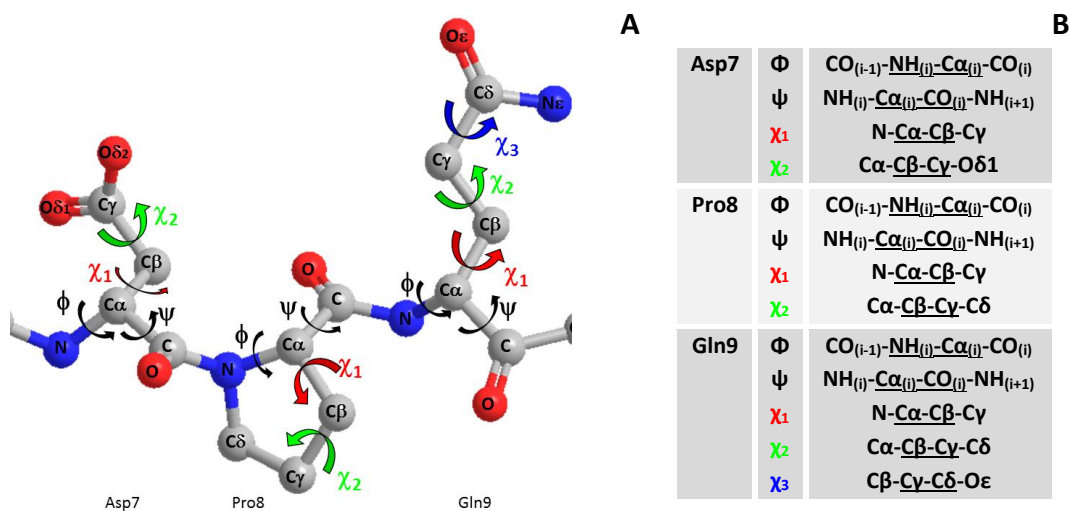


Figure V : Étude des angles phi, psi et chis du segment Asp7–Gln9 de l'AMF/PGI. (A) Représentation d'après ChemBio3D du segment avec le nom de chaque atome. Pour plus de clarté, les hydrogènes ne sont pas représentés. (B) Tableau montrant comment mesurer chaque angle du segment.

2.2.3. Traitement des données

2.2.3.1. Les atomes

Nous avons vu que SIBFA implique la fragmentation de molécules flexibles en un assemblage de petites molécules rigides. Ainsi pour les chaînes principale et latérale, les liaisons de jonction C–C ou C–N entre deux fragments connectés sont créées par superposition des liaisons finales correspondantes (C–H/H–C ou C–H/H–N). Les multipôles appartenant aux atomes d'hydrogènes fictifs et les barycentres des liaisons C–H ou N–H sont redistribués sur les deux atomes. Le centre de la liaison de jonction nouvellement créée préserve ainsi la charge nette de la molécule reconstituée.

Les coordonnées des atomes de l'AMF/PGI doivent donc être fragmentées. Pour cela, un programme qui lit la structure PDB, récupère les coordonnées de la chaîne principale seulement (pas les chaînes latérales) puis les sépare par fragments créés, a été utilisé. Des hydrogènes fictifs sont rajoutés en dupliquant les coordonnées de certains atomes et une ligne de tirets séparatrice est insérée entre les fragments successifs.

La permutation manuelle des coordonnées des oxygènes « O » et celles des azotes « N » permet à SIBFA de lire l'ensemble des coordonnées correctement. L'inconvénient de ce programme est qu'il ne reconnaît pas les prolines. Ces dernières se retrouvent fragmentées comme le reste de la chaîne principale en une alternance de formamides et de méthanes, au lieu d'être prise en compte comme une 1-pyrrolidinecarbaldéhyde. Les coordonnées des atomes dans le bon ordre pour les 44 prolines (2 x 22) de la protéine ont donc été complétées manuellement dans le fichier. La Figure VI présente le fichier de récupération des données traitées pour le segment Asp7–Gln9 du monomère A de l'AMF/PGI représenté sur le Schéma VIII.

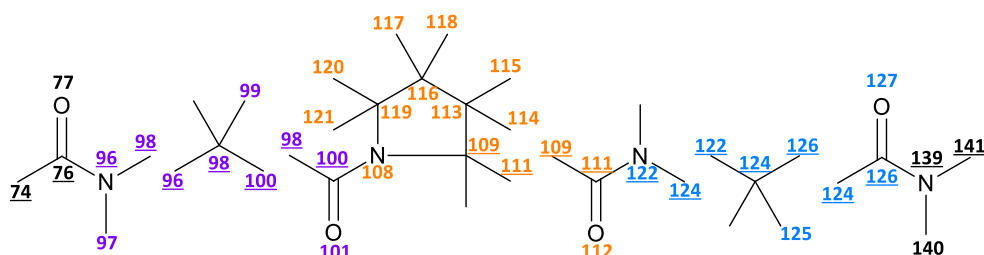


Schéma VIII : Représentation schématique du segment Asp7-Gln9 fragmenté selon SIBFA avec les coordonnées de certains atomes dupliques.

-9.02000	-4.87000	67.47000	74	CA	ARG+	6
-8.50000	-5.05000	66.06000	76	C	ARG+	6
-7.24000	-4.70000	65.82000	96	N	ASP-	7
-9.24000	-5.46000	65.17000	77	O	ARG+	6
-6.64000	-4.39000	66.60000	97	HN	ASP-	7
-6.69000	-4.74000	64.47000	98	CA	ASP-	7
-7.24000	-4.70000	65.82000	96	N	ASP-	7
-6.69000	-4.74000	64.47000	98	CA	ASP-	7
-6.41000	-6.17000	64.04000	100	C	ASP-	7
-7.39000	-4.31000	63.75000	99	HA	ASP-	7
-6.69000	-4.74000	64.47000	98	CA	ASP-	7
-6.41000	-6.17000	64.04000	100	C	ASP-	7
-7.01000	-6.59000	62.93000	108	N	PRO	8
-5.68000	-6.88000	64.71000	101	O	ASP-	7
-6.85000	-7.95000	62.41000	109	CA	PRO	8
-5.40000	-8.34000	62.18000	111	C	PRO	8
-7.57000	-7.93000	61.06000	113	CB	PRO	8
-8.40000	-6.70000	61.03000	116	CG	PRO	8
-7.93000	-5.77000	62.12000	119	CD	PRO	8
-7.25000	-8.72000	63.08000	110	HA	PRO	8
-8.18000	-8.83000	61.00000	114	HB1	PRO	8
-6.80000	-7.91000	60.29000	115	HB2	PRO	8
-8.28000	-6.22000	60.06000	118	HG2	PRO	8
-9.44000	-6.97000	61.19000	117	HG1	PRO	8
-7.32000	-4.94000	61.76000	120	HD1	PRO	8
-8.72000	-5.47000	62.81000	121	HD2	PRO	8
-6.85000	-7.95000	62.41000	109	CA	PRO	8
-5.40000	-8.34000	62.18000	111	C	PRO	8
-4.59000	-7.41000	61.68000	122	N	GLN	9
-5.04000	-9.50000	62.43000	112	O	PRO	8
-4.96000	-6.48000	61.43000	123	HN	GLN	9
-3.20000	-7.71000	61.48000	124	CA	GLN	9
-4.59000	-7.41000	61.68000	122	N	GLN	9
-3.20000	-7.71000	61.48000	124	CA	GLN	9
-2.60000	-8.00000	62.84000	126	C	GLN	9
-3.13000	-8.58000	60.83000	125	HA	GLN	9
-3.20000	-7.71000	61.48000	124	CA	GLN	9
-2.60000	-8.00000	62.84000	126	C	GLN	9
-2.95000	-7.18000	63.82000	139	N	PHE	10
-1.84000	-8.96000	63.00000	127	O	GLN	9
-3.61000	-6.40000	63.65000	140	HN	PHE	10
-2.38000	-7.39000	65.13000	141	CA	PHE	10

Figure VI : Fichier contenant les coordonnées des atomes du segment Asp7-Gln9 fragmenté du monomère A de l'AMF/PGI de la PDB (1IRI).

2.2.3.2. Les angles dièdres

Le fichier de récupération des angles dièdres de BioSym n'est pas lisible tel quel par le logiciel SIBFA. Il faut l'arranger de telle sorte que les valeurs séparées par des tabulations le soient par des espaces. De plus, tous les angles doivent être alignés en colonne. Après avoir effectué ces petits ajustements manuellement ou avec l'aide de programmes, un fichier texte est obtenu comme présenté à la Figure VII.

:MET_A1	97.9	-75.0	-85.7	168.5		
:ALA_A2	-75.3	168.0				
:ALA_A3	-53.6	-35.8				
:LEU_A4	-73.9	-39.5	170.9	60.8		
:THR_A5	-75.0	-22.8	34.6			
:ARG_A6	-80.9	-14.7	-71.1	167.7	176.5	-167.2
:ASP_A7	-75.1	123.2	-179.2	102.4		
:PRO_A8	-55.9	-39.4	-14.6	15.8		
:GLN_A9	-62.6	-43.8	-74.0	-33.5	118.5	
:PHE_A10	-60.0	-49.9	177.5	62.6		
:GLN_A11	-52.8	-44.7	-78.4	164.3	45.8	
:LYS_A12	-57.6	-44.5	-176.7	158.4	164.4	-170.3
:LEU_A13	-58.6	-47.5	-117.4	-147.8		
:GLN_A14	-58.1	-47.6	-76.1	-180.0	126.7	
:GLN_A15	-51.7	-56.7	174.9	152.8	-98.5	
:TRP_A16	-56.9	-41.5	-164.1	98.4		
:TYR_A17	-56.0	-48.9	174.2	73.5		
:ARG_A18	-55.1	-47.2	-73.6	-158.7	-52.8	-86.6
:GLU_A19	-74.4	-46.8	-60.7	162.9	-13.6	
:HIS_A20	-105.2	-3.2	-48.9	-80.6		

Figure VII : Fichier des angles phi (colonne 2), psi (colonne 3), χ_1 (colonne 4), χ_2 (colonne 5), χ_3 (colonne 6) et χ_4 (colonne 7) des vingt premiers acides aminés du monomère A.

2.2.4. Ajout des extrémités N-acétylées

Afin que la séquence soit lisible par le logiciel SIBFA, une extrémité N-acétylée doit être ajoutée sur chaque monomère au niveau de leur extrémité N-terminale. Pour cela, nous travaillons directement sur la structure PDB 1IRI. La structure est modifiée, les nouvelles coordonnées correspondantes à ce fragment sont récupérées puis imposées dans le fichier SIBFA. La Figure VIII montre la structure de l'extrémité N-terminale modifiée pour le monomère A.

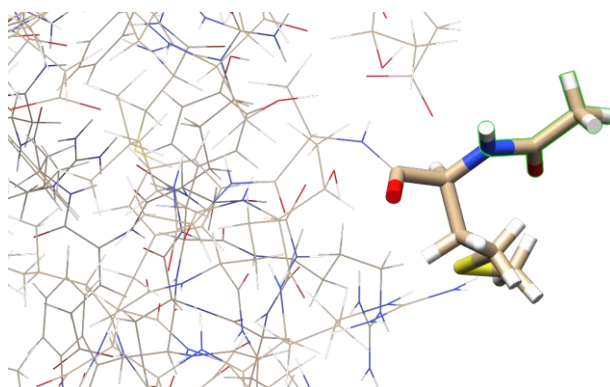


Figure VIII : Visualisation par Chimera de l'extrémité N-terminale (Met1) modifiée par un groupement N-acétyle (mis en évidence en vert).

2.2.5. Relaxation des monomères

Une fois les deux monomères construits dans SIBFA grâce aux informations contenues dans la PDB, les deux fichiers SIBFA sont convertis en coordonnées xyz afin de les visualiser avec le logiciel Chimera.

Un premier calcul ponctuel SIBFA sur chaque monomère a mis en évidence des interactions stériques défavorables (*clashes* stériques) entre chaînes latérales. Ces *clashes* ont été relaxés par minimisation d'énergie en utilisant le minimiseur MERLIN, interfacé avec SIBFA et un potentiel simplifié. Ce potentiel limite l'énergie électrostatique multipolaire E_{elec} aux interactions charge-charge. Les contributions d'ordre supérieur ainsi que la polarisation sont traités de manière effective par un potentiel de LENNARD-JONES. Ainsi, pour relaxer ces *clashes*, les fragments appartenant aux chaînes latérales des acides aminés concernés ont été énumérés dans SIBFA.

La Figure IX montre d'une part une superposition dans PyMol de la structure du monomère A provenant de la PDB (en vert) et celle provenant de la minimisation SIBFA (en orange), et d'autre part une superposition dans PyMol de la structure du monomère B provenant de la PDB (en rouge) et celle provenant de la minimisation SIBFA (en bleu).

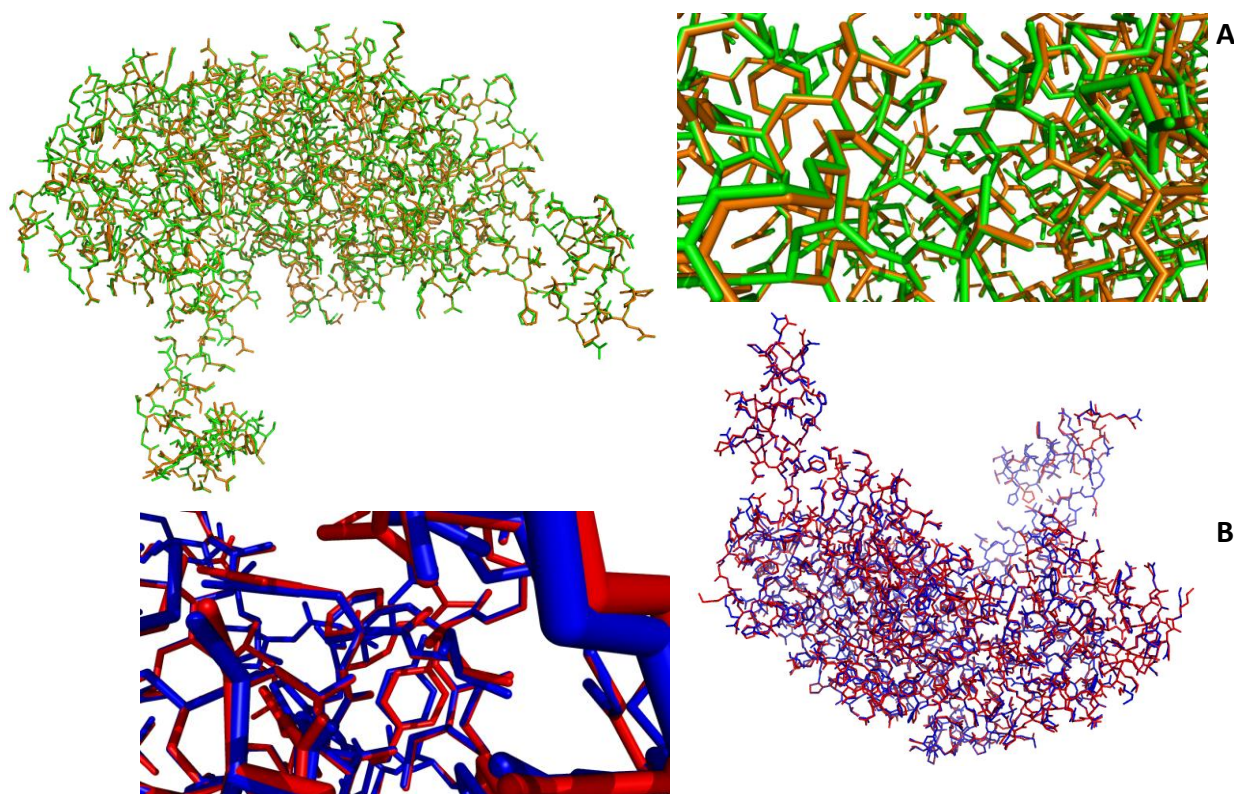


Figure IX : (A) Superposition dans PyMol de la structure PDB du monomère A (en vert) avec la structure SIBFA du monomère A (en orange), vue d'ensemble et zoom. (B) Superposition dans PyMol de la structure PDB du monomère B (en rouge) avec la structure SIBFA du monomère B (en bleu), vue d'ensemble et zoom.

Ces figures montrent que tous les *clashes* stériques ont été relaxés. Les chaînes principales se superposent parfaitement et les chaînes latérales peuvent avoir de légers décalages du fait que SIBFA utilise des angles standard. Cette excellente superposition du modèle théorique avec les données expérimentales de la PDB montre que la construction de chaque monomère par SIBFA est un succès.

2.3. Bilan : assemblage et validation du modèle

Les deux monomères ont ensuite été assemblés pour former le dimère A—B de l'AMF/PGI. Une comparaison de la structure PDB et de la structure SIBFA est présentée à la Figure X.

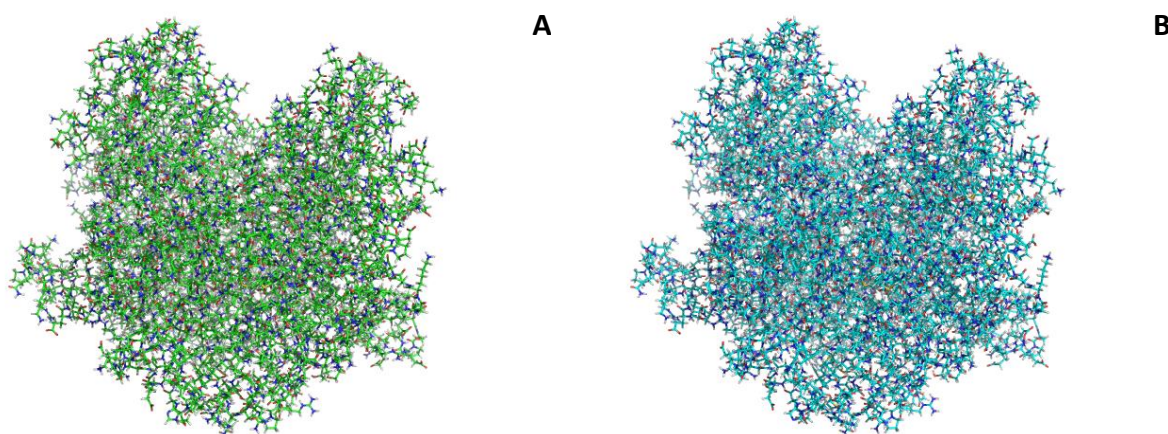


Figure X : (A) Structure PDB du dimère AB 1IRI sans les molécules d'eau. Les hydrogènes sont représentés. (B) Structure SIBFA du dimère AB 1IRI sans les molécules d'eau. Les hydrogènes sont représentés.

Ces deux structures sont identiques. L'assemblage des deux monomères est donc réussi.

Nous avons réussi à mettre en place un modèle d'AMF/PGI pour SIBFA en construisant tout d'abord les deux monomères indépendamment, puis en les assemblant pour former la protéine dans son entièreté.

Chapitre 3. Construction d'un mime de biorécepteur par SIBFA

3.1. Présentation du mime d'intérêt

Afin d'étudier la nature des interactions existantes entre le biocapteur et l'AMF, nous avons choisi dans un premier temps d'étudier **une molécule simple qui pourrait mimer le biorécepteur du biocapteur élaboré**. Cette molécule est dérivée du 6-phosphate-D-fructose et possède une fonction oxime comme dans le biocapteur élaboré (Schéma IX).

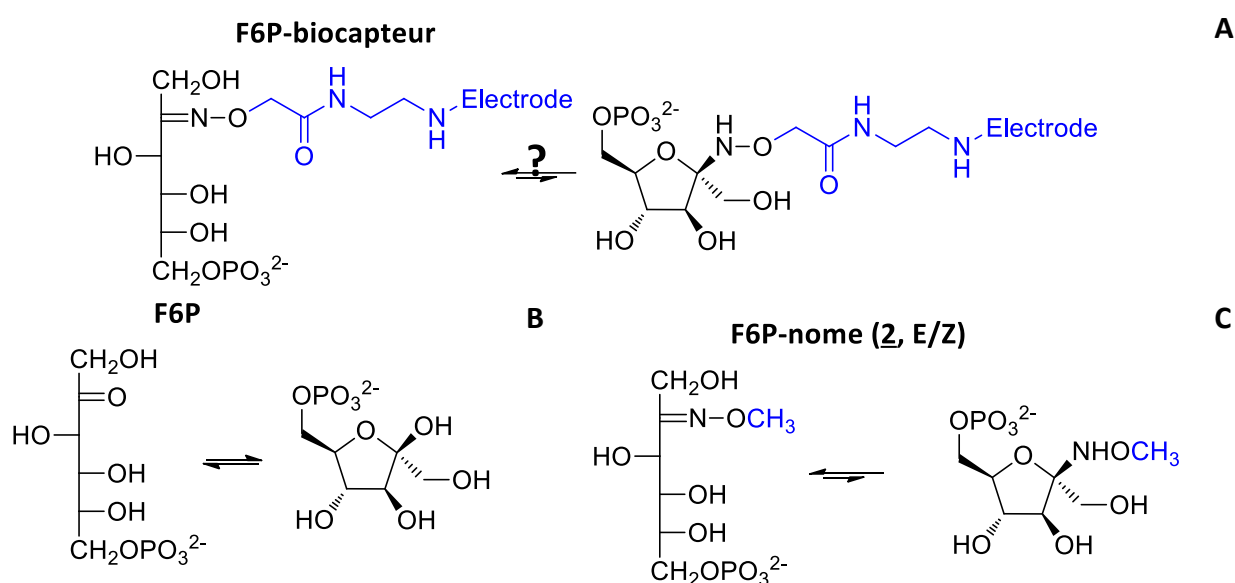


Schéma IX : (A) Rappel de la structure du biocapteur, (B) 6-phosphate-D-fructose sous ses deux formes, (C) 6-phosphate-D-fructose N-méthyloxime : mime du biorécepteur.

Le F6P existe sous deux formes : cyclique et linéaire. Il en est de même pour les oximes qui sont majoritairement linéaires, et existent sous la forme de deux diastéréoisomères Z et E. Nous ne savons pas à l'heure actuelle si notre biorécepteur est sous forme cyclique ou linéaire. Il est donc nécessaire d'étudier les interactions entre l'enzyme et notre molécule d'intérêt, présentée sur le Schéma IX C, sous ses deux formes. Malheureusement, seuls les résultats de la forme cyclique ont été obtenus au jour d'aujourd'hui. Ainsi, seuls les résultats pour le mime sous forme cyclique sont présentés.

3.2. Création des trois nouveaux fragments

Le mime cyclique a été construit dans SIBFA selon la même méthode que pour la protéine, c'est-à-dire en partant de fragments. Cependant, trois des fragments nécessaires à sa construction n'étaient pas encore disponibles dans la bibliothèque SIBFA, leur création a donc été nécessaire. Le Schéma X présente la fragmentation nécessaire pour créer le mime cyclique selon SIBFA.

Le mime est composé de quatre fragments : le **tétrahydrofurane-3,4-diol** (en magenta), le **méthylphosphate** (en orange), l'**o-méthylhydroxylamine** (en gris) et le **méthanol** (en marron). Le méthanol est déjà disponible dans la base de données SIBFA.

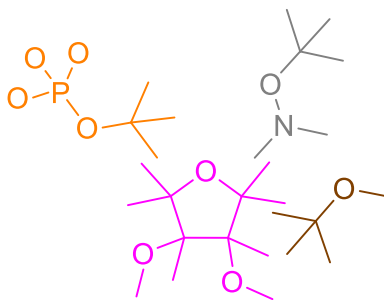


Schéma X : Fragments permettant la création du mime cyclique selon SIBFA. Les hydrogènes ne sont pas représentés pour plus de clarté.

3.2.1. Méthode générale

La démarche générale de création d'un nouveau fragment pour la base de données SIBFA est présentée au Schéma XI.

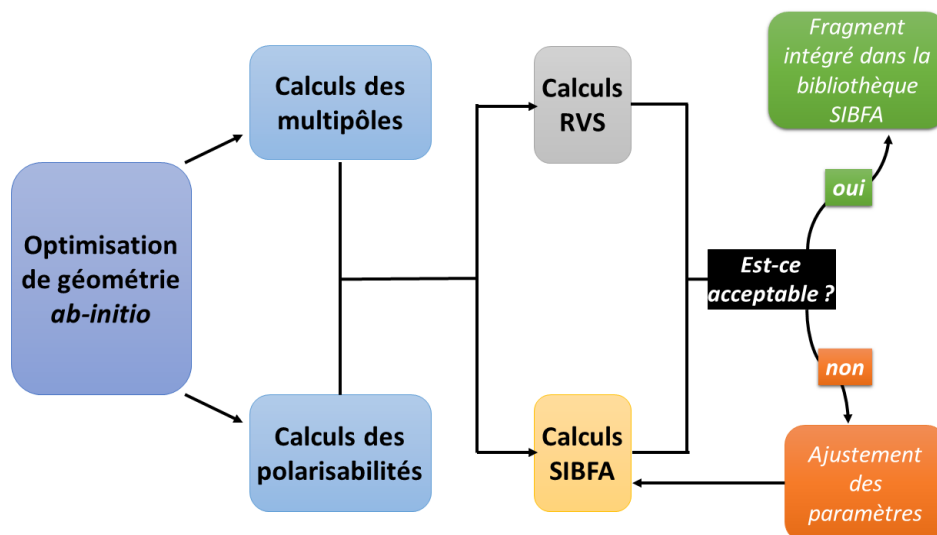


Schéma XI : Démarche générale de création des fragments pour SIBFA.

Chaque fragment est tout d'abord numéroté, dessiné avec le logiciel Avogadro³⁴ et subit une première optimisation de géométrie par l'algorithme de plus forte pente, avec le champ de forces MMFF94s (*Merck Molecular Force Field, static*)^{35,36} tel qu'implémenté dans Avogadro. La structure est ensuite optimisée par des calculs de chimie quantique *ab-initio* de manière à récupérer les coordonnées associées. Les multipôles (charges, dipôles et quadripôles) et les polarisabilités distribués sont calculés et les données sont récupérées.

Par la suite, la calibration des fragments est effectuée. Cette méthode repose sur l'ajustement des paramètres SIBFA de manière à reproduire les différentes contributions énergétiques des résultats de la chimie quantique (approche RVS) sur des calculs-tests.

Chaque étape de la création des fragments sera détaillée par la suite.

3.2.2. Numérotation des atomes et des barycentres de liaison

Chaque **atome** de chaque nouveau fragment est d'abord numéroté de manière lisible par SIBFA, c'est-à-dire en commençant toujours par l'atome qui sera relié par la suite à un autre fragment lors de la construction du mime. Les barycentres de liaison sont également numérotés (Schéma XII).

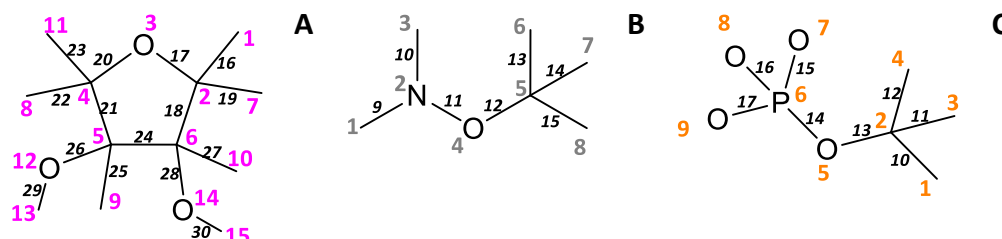


Schéma XII : Numérotation des trois fragments selon SIBFA : (A) le tétrahydrofurane-3,4-diol, (B) l'o-méthylhydroxylamine et (C) le méthylphosphate.

Un fichier rassemblant toutes ces données sur les atomes fictifs du milieu de chaque liaison ainsi que sur les liaisons à créer est préparé pour chaque fragment. La Figure XI présente, à titre d'exemple, le fichier correspondant au tétrahydrofurane-3,4-diol.

15						← nombre de liaisons dans la molécule
1	2	16				← l'atome n°1 est relié à l'atome n°2 et cela crée un atome fictif n°16 qui représente le milieu de la liaison 1-2
2	3	17				
2	6	18				
2	7	19				
3	4	20				
4	5	21				
4	8	22				
4	11	23				
5	6	24				
5	9	25				
5	12	26				
6	10	27				
6	14	28				
12	13	29				
14	15	30				
1	2	0	0	0	1	
2	1	3	7	0	4	
3	2	4	0	0	2	
4	3	5	8	11	4	
5	4	6	9	12	4	
6	2	5	10	14	4	
7	2	0	0	0	1	
8	4	0	0	0	1	
9	5	0	0	0	1	
10	6	0	0	0	1	
11	4	0	0	0	1	
12	5	13	0	0	2	
13	12	0	0	0	1	
14	6	15	0	0	2	
15	14	0	0	0	1	

N°	Signification des colonnes
1-2	Numéros (en commençant par le plus petit) des atomes qui vont créer la liaison
3	Numéro de l'atome fictif du milieu de la liaison défini par les deux premières colonnes (barycentre de la liaison)

N°	Signification des colonnes
1	Numéro des atomes de la molécule
2-5	Numéros des atomes auxquels l'atome défini en colonne n°1 est connecté
6	Nombre de liaisons formées

Figure XI : Fichier de données concernant les liaisons du tétrahydrofurane-3,4-diol et signification de chaque partie du fichier.

3.2.3. Récupération des coordonnées des fragments

Une fois la structure de chaque fragment établie avec le logiciel Avogadro, elle est optimisée par des calculs de chimie quantique *ab-initio* au niveau Hartree-Fock en base aug-cc-pVTZ avec le programme GAUSSIAN. Les coordonnées cartésiennes des atomes de chaque fragment peuvent alors être récupérées. La Figure XII présente, à titre d'exemple, le fichier du tétrahydrofurane-3,4-diol.

← nom de la molécule				
← nombre d'atomes réels dans la molécule				
tetrahydrofurane-3,4-diol				
15				
H	-0.993500	-1.656924	-0.953468	1
C	-0.978007	-1.190324	0.025029	6
O	-1.806667	-0.049506	0.043572	8
C	-1.047753	1.129881	-0.067197	6
C	0.385969	0.686243	-0.344082	6
C	0.419823	-0.679113	0.324554	6
H	-1.340052	-1.900276	0.753344	1
H	-1.099723	1.685278	0.866027	1
H	0.542028	0.549231	-1.405191	1
H	0.540132	-0.542183	1.398224	1
H	-1.453316	1.753598	-0.851146	1
O	1.375893	1.580440	0.074224	8
H	1.239252	1.827357	0.971830	1
O	1.385921	-1.556373	-0.164568	8
H	2.243809	-1.192685	-0.035268	1

N°	Signification des colonnes
1	Symbole de l'élément
2	Coordonnées cartésiennes pour X en Å
3	Coordonnées cartésiennes pour Y en Å
4	Coordonnées cartésiennes pour Z en Å
5	Numéro atomique de l'élément

Figure XII : Fichier de données pour le tétrahydrofurane-3,4-diol et signification de chaque partie du fichier.

3.2.4. Récupération des multipôles et polarisabilités

Des informations sur les **multipôles** et les **polarisabilités distribués** des fragments doivent ensuite être rajoutées.

Les multipôles (charges, dipôles et quadrupôles) sont obtenus à partir des OM calculées avec logiciel GAUSSIAN G09³⁷ grâce à la méthode due à Anthony Stone dénotée GDMA (*Gaussian Distributed Multipole Analysis of wavefunctions*).²¹ Les multipôles sont ensuite redistribués sur les atomes et les barycentres des liaisons à l'aide d'une méthode développée par Fabienne Vigné-Maeder et Pierre Claverie.¹⁶

Les polarisabilités sont distribuées sur les barycentres des liaisons et sur les extrémités des doublets d'électrons libres des hétéroatomes à l'aide de la méthode développée par David Garmer et Walter Stevens,²⁶ méthode intégrée dans le logiciel GAMESS.³⁸

La Figure XIII montre la répartition des doublets d'électrons libres et des barycentres de liaisons du méthylphosphate.

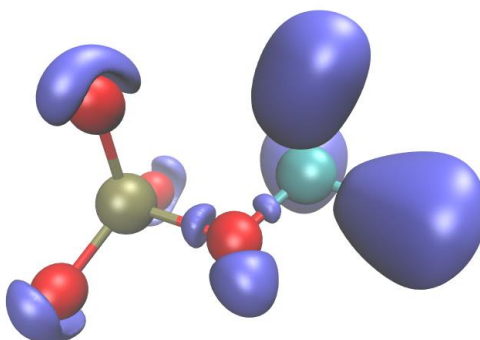


Figure XIII : Visualisation par le logiciel VMD des bassins ELF du méthylphosphate (HF/aug-cc-pVTZ).

3.2.5. Calibration des fragments

Une partie des fragments nécessaires à la modélisation du mime de biorécepteur dans SIBFA était absente de la bibliothèque standard. Il s'agit des fragments tétrahydrofurane-3,4-diol, méthylphosphate et *o*-méthylhydroxylamine. Les multipôles et polarisabilités distribués des nouveaux fragments ayant été calculés, la calibration des trois fragments créés peut avoir lieu.

3.2.5.1. Principe général

La méthode de calibration repose sur l'ajustement des paramètres de SIBFA de manière à reproduire les résultats de la chimie quantique (méthode RVS) sur des calculs-tests. Ces calculs-tests consistent à approcher de manière axiale un ion Zn^{2+} sur certains atomes (typiquement les hétéroatomes) du fragment en cours de calibration à différentes distances (Figure XIV).

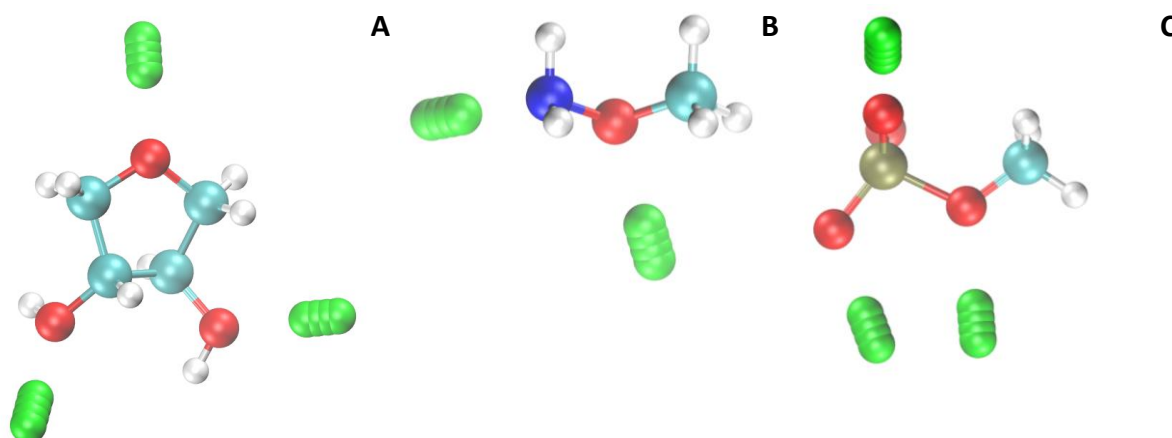


Figure XIV : Visualisation par le logiciel VMD de l'attaque du Zn^{2+} sur chaque hétéroatome des trois nouveaux fragments à calibrer, selon sept distances différentes. Le zinc est représenté en vert, selon seulement une distance sur deux pour plus de clarté dans la représentation. (A) Approche du Zn^{2+} sur les oxygènes O_3 , O_{12} et O_{14} du tétrahydrofurane-3,4-diol, de la distance 1,7 Å à 2,3 Å. (B) Approche du Zn^{2+} sur l'azote N_2 et l'oxygène O_4 de l'*o*-méthylhydroxylamine, de la distance 1,8 Å à 2,4 Å. (C) Approche du Zn^{2+} sur les oxygènes O_5 , O_7 , O_8 et O_9 (l'attaque de O_7 n'est pas représentée pour plus de visibilité) du méthylphosphate, de la distance 1,7 Å à 2,3 Å.

3.2.5.2. Méthode RVS

En chimie quantique, la méthode RVS (*reduced variational space*)³⁹ est une méthode de décomposition de l'énergie qui peut servir à interpréter les interactions intermoléculaires d'un système entre deux fragments A et B (Schéma XIII).

La méthode RVS décompose l'énergie comme une somme de quatre termes (ordre 1 : électrostatique et échange-répulsion ; ordre 2 : polarisation et transfert de charge). La dispersion est exclue car RVS se limite à la méthode Hartree-Fock (la corrélation électronique n'est pas prise en compte). Schématiquement, l'énergie du fragment A du complexe AB est obtenue en « gelant » les fonctions d'onde du fragment B et inversement.

Le Schéma XIII indique quelles sont les orbitales mises en jeu lors du calcul des différentes contributions énergétiques. Par exemple, pour le calcul de l'énergie de polarisation du fragment A, les orbitales occupées et virtuelles du fragment B sont « gelées », évitant ainsi tout transfert de charge (c'est-à-dire le transfert d'un électron de l'orbitale occupée du fragment A vers l'orbitale virtuelle du fragment B).

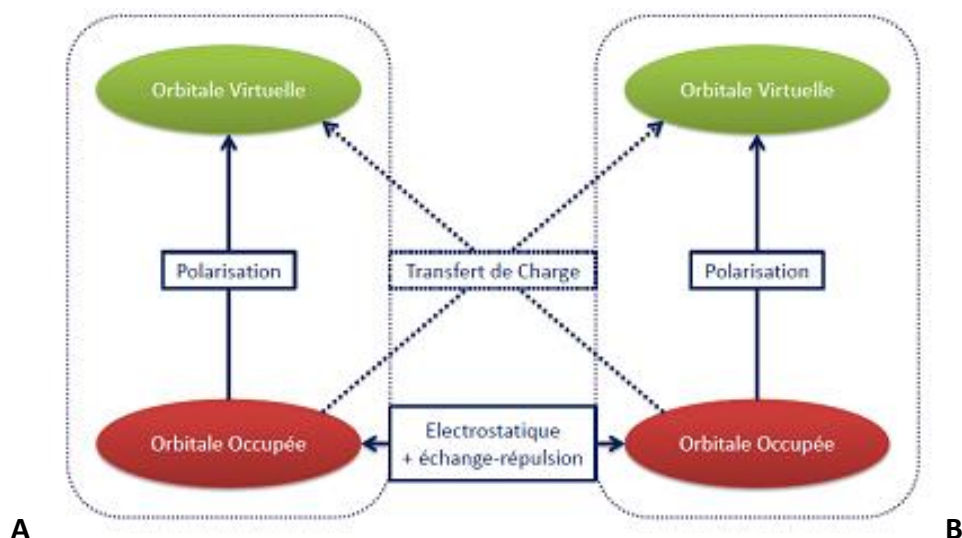


Schéma XIII : Décomposition de l'énergie d'interaction par l'approche RVS.

3.2.5.3. Comparaison RVS/SIBFA et ajustements

Ici la méthode RVS permet donc de séparer l'énergie d'interaction de la sonde Zn^{2+} avec le fragment en cours de calibration en ses différentes contributions. L'objectif est d'affiner les paramètres de SIBFA pour atteindre un accord satisfaisant *contribution par contribution*. Les paramètres généraux de la méthode ont été calibrés par Mike Devereux à partir de calculs de chimie quantique *ab-initio* au niveau Hartree-Fock en base aug-cc-pVTZ à l'aide du logiciel I-NoLLS.⁴⁰ Les calculs RVS sont réalisés avec le logiciel GAMESS.

Les différents types d'atomes constitutifs du mime ayant été déjà définis dans le cadre de SIBFA, quelques paramètres restent ajustables pour optimiser l'accord de chacune des contributions QC et de leur contrepartie SIBFA : l'incrément des rayons effectifs des doublets d'électrons libres utilisé pour le calcul de $E_{\text{rép}}$ et de $E_{\text{transfert de charge}}$ ainsi que les paramètres de la fonction gaussienne d'écrantage du champ polarisant.

Pour chaque atome sondé, les différentes contributions de l'énergie en QC et en SIBFA sont calculées. La Figure XV et la Figure XVI montrent l'exemple des résultats du sondage de Zn^{2+} sur l'oxygène 3 et sur l'oxygène 12 du tétrahydrofurane-3,4-diol respectivement. Les résultats du sondage de l'oxygène 14 du tétrahydrofurane-3,4-diol et ceux de l'azote 2 et l'oxygène 4 de l'o-méthylhydroxylamine sont présentés sur les [annexes 2, 3 et 4](#). Les résultats pour le sondage des quatre oxygènes du méthylphosphate ne seront pas présentés dans ce manuscrit.

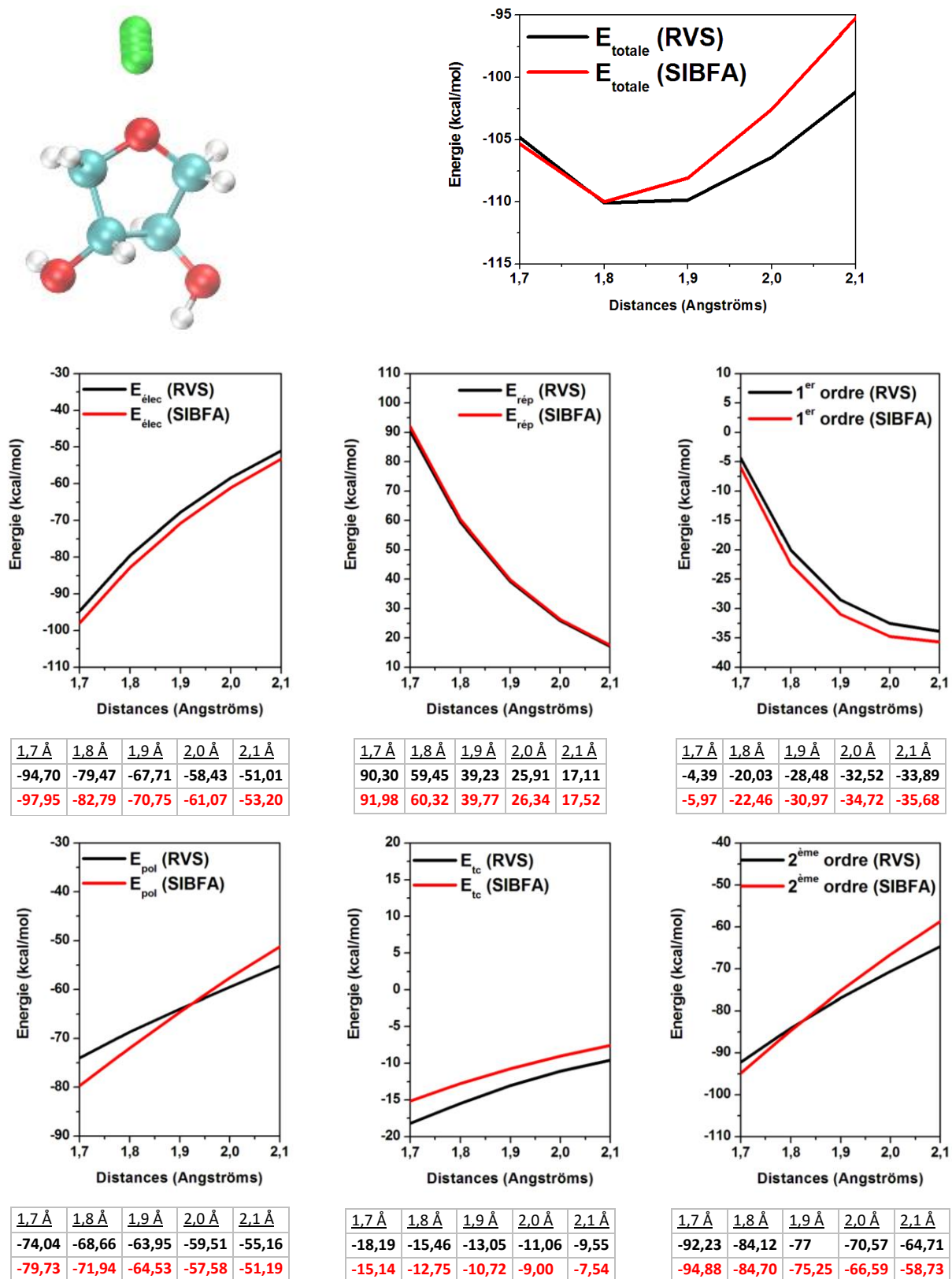


Figure XV : Comparaison des énergies obtenues par QC et par SIBFA lors du sondage par Zn^{2+} de l'oxygène 3 du tétrahydrofurane-3,4-diol.

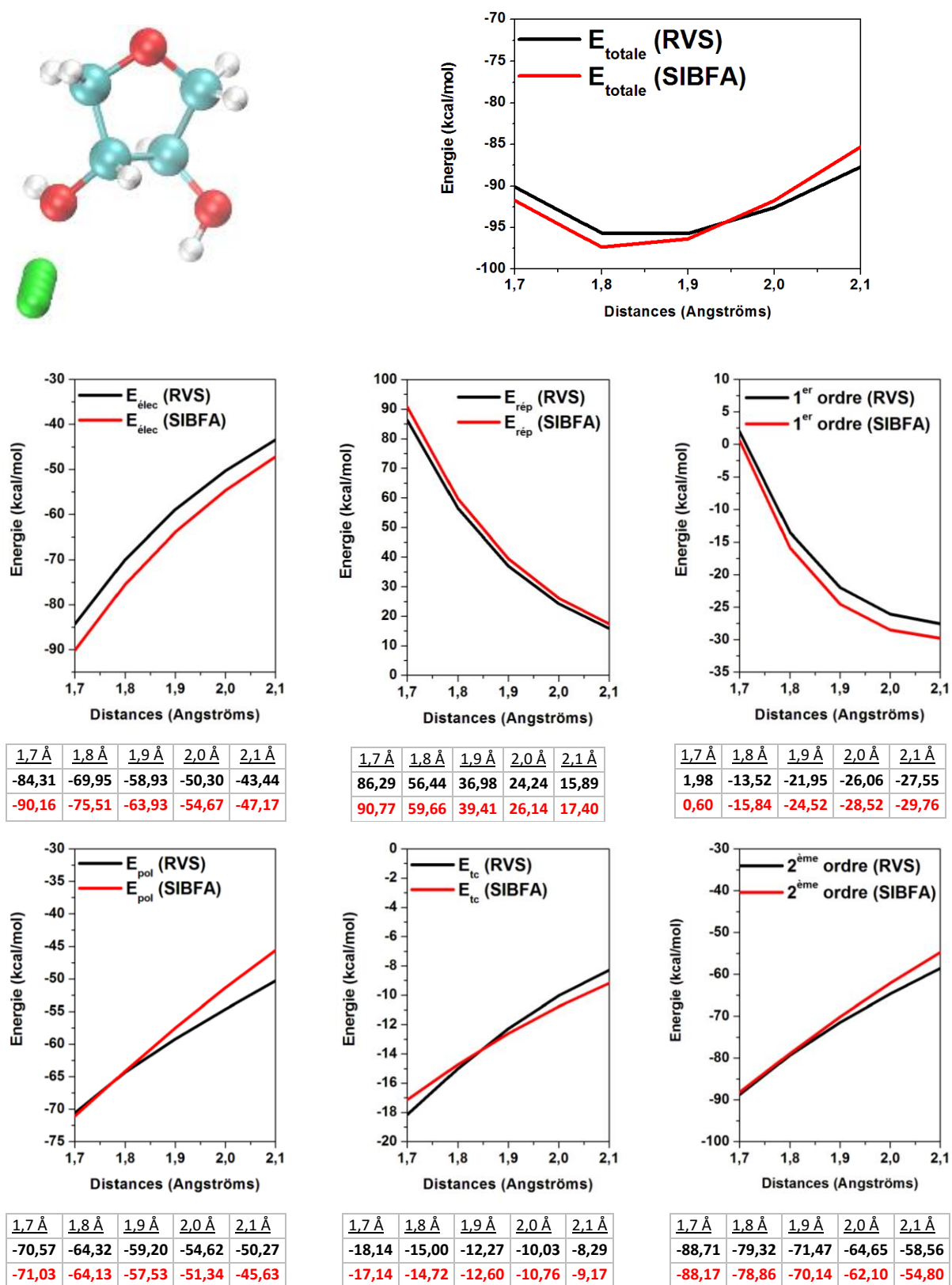


Figure XVI : Comparaison des énergies obtenues par QC et par SIBFA lors du sondage par Zn^{2+} de l'oxygène 12 du tétrahydrofurane-3,4-diol.

Ces figures montrent une bonne corrélation de chaque contribution énergétique des calculs-tests QC avec leurs contreparties SIBFA. En effet, les courbes se superposent de manière très correcte. Cela prouve que nous avons bien mis en place les fragments nécessaires à l'élaboration du mime de biorécepteur. Cependant, leur amélioration ultérieure est possible en continuant les ajustements, notamment pour la calibration du méthylphosphate qui donne la moins bonne corrélation de chaque contribution QC avec sa contrepartie SIBFA.

3.3. Bilan : assemblage et validation du mime

La dernière étape de la construction du mime consiste à fragmenter les groupements constitutifs du mime afin de permettre les rotations autour des liaisons de connexion (Schéma XIV). Ainsi le tétrahydrofurane-3,4-diol se fragmente en pseudo-tétrahydrofurane (fragment 1) et en deux pseudo-eaux (fragments 2 et 3), l'*o*-méthylhydroxylamine en pseudo-ammoniac (fragment 1), pseudo-eau (fragment 2) et pseudo-méthane (fragment 3) et le méthylphosphate en pseudo-méthane (fragment 1), pseudo-eau (fragment 2) et pseudo-méthylphosphonate (fragment 3). Les sous-fragments comportent des hydrogènes fictifs dits de multipôles nuls.

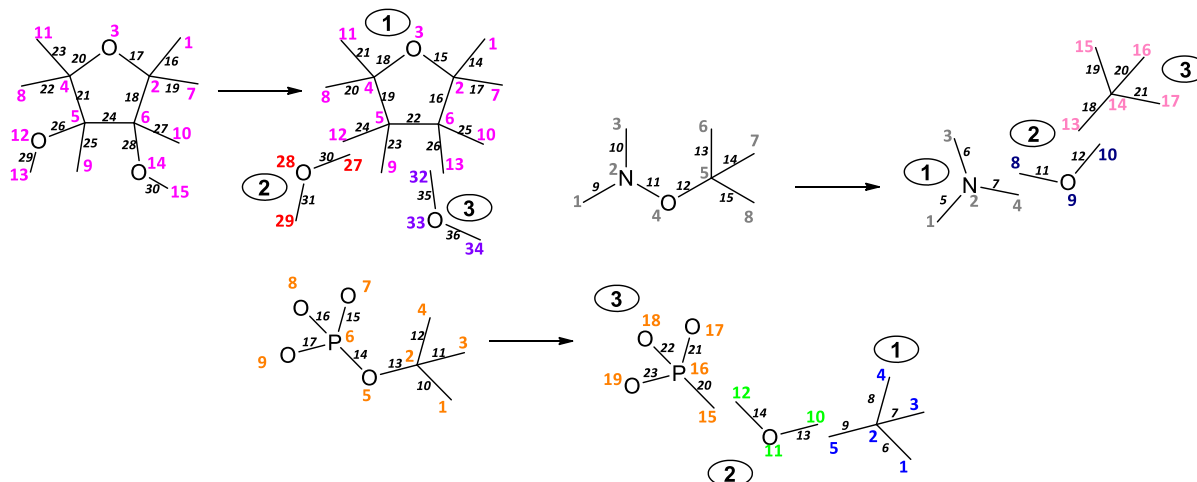


Schéma XIV : Fragmentation pour obtenir les sous-fragments.

Après l'assemblage de tous les sous-fragments, nous obtenons la structure du mime du biocapteur présenté sur le Schéma XV. Il possède donc onze fragments constitutifs. La Figure XVII montre la visualisation du mime de biorécepteur construit par SIBFA.

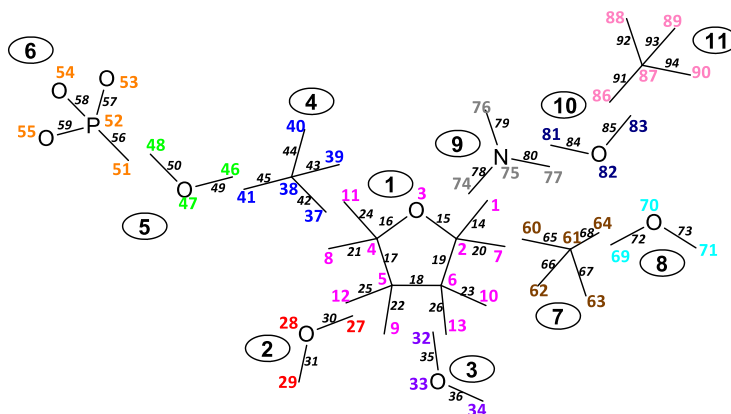


Schéma XV : Représentation du mime du biocapteur construit par SIBFA.

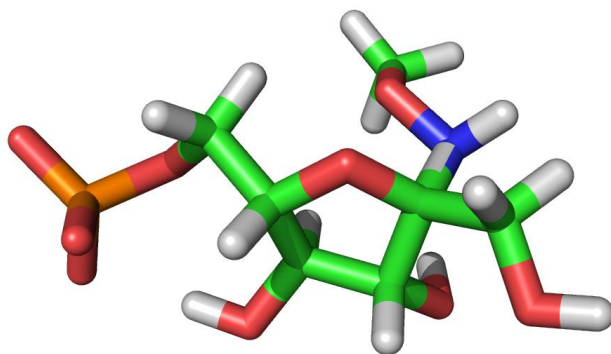


Figure XVII : Visualisation dans PyMol du mime de biorécepteur construit par SIBFA.

Chapitre 4. Docking dans la protéine modélisée

La problématique de mon travail de thèse présentée dans la partie B est l'étude des interactions AMF/PGI—biocapteur par mécanique moléculaire polarisable. L'AMF/PGI humaine a été reconstituée avec SIBFA à partir des données cristallographiques de la littérature. La molécule servant de mime du biorécepteur a également été construite par SIBFA. Cependant, le docking du mime du biorécepteur dans le dimère entier de l'AMF que nous avons construit ne peut être réalisé, la taille de la protéine étant trop grosse pour le logiciel SIBFA. Nous devons donc définir une zone de docking plus restreinte.

4.1. Définition de la zone de docking

Nous avons vu, lors de la présentation de la structure 1IRI, que nous ne pouvons pas limiter notre étude à un seul monomère (par exemple la chaîne A) à cause de l'histidine 389 du monomère B qui vient également interagir dans le site actif de A. Généralement dans le cas d'une très grosse molécule à modéliser, la zone d'étude est réduite à une portion limitée de cette molécule, c'est-à-dire quelques segments d'acides aminés.

4.1.1. Choix des segments composant l'AMF réduite

Une simulation sur Chimera a été effectuée afin de déterminer les acides aminés présents dans un rayon de 40, 35, 30, 25, 20, 15 et 10 Å autour de l'histidine 389 appartenant au monomère B (Figure XVIII).

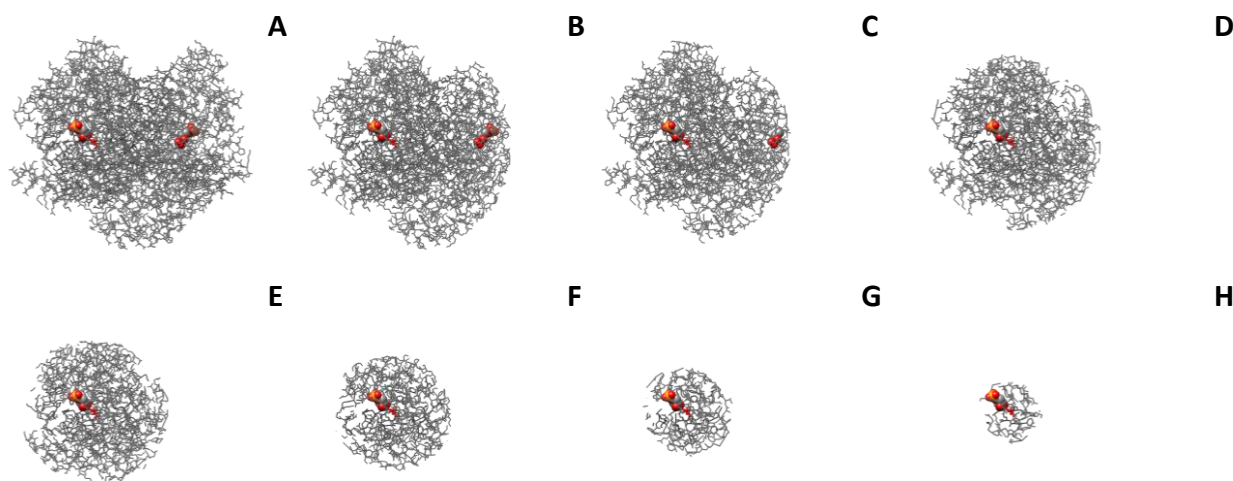
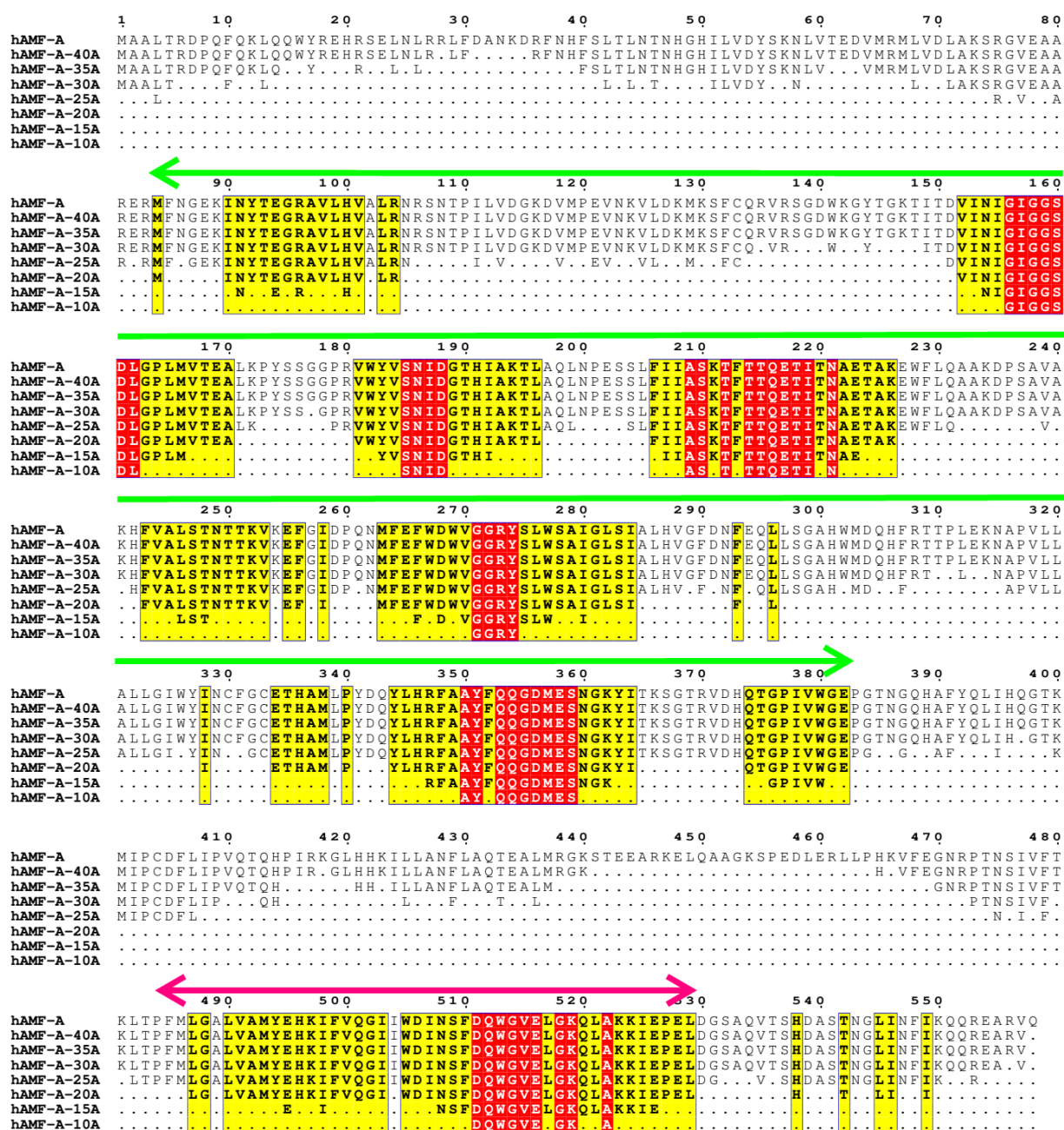


Figure XVIII : (A) Visualisation par Chimera du dimère A-B entier de l'AMF. (B, C, D, E, F, G, H) AMF réduites à 40, 35, 30, 25, 20, 15 et 10 Å respectivement autour de l'His389-B.

L'étude des portions restantes de la protéine montre que **les structures sont très disjointes**. Ceci est particulièrement visible lorsque l'on aligne la séquence du dimère entier avec la séquence des différents dimères réduits (Schéma XVI et Schéma XVII).



SEGMENT 1 : Met84-A à Glu382-A

SEGMENT 2 : Pro484-A à Leu529-A

Schéma XVI : Alignement des séquences de la chaîne A de l'AMF entière et des AMF réduites (à 40, 35, 30, 25, 20, 15 et 10 Å) par rapport à l'His389-B, fait par ESPrpt 3. En rouge sont mis en avant les acides aminés de l'AMF présents dans un rayon de 10 Å et en jaune dans un rayon de 20 Å.



SEGMENT 3 : Thr335-B à Phe479-B

Schéma XVII : Alignement des séquences de la chaîne B de l'AMF entière et des AMF réduites (à 40, 35, 30, 25, 20, 15 et 10 Å) par rapport à l'His389-B, fait par ESPrnt 3. En rouge sont mis en avant les acides aminés de l'AMF présents dans un rayon de 10 Å et en jaune dans un rayon de 20 Å.

Après examen de ces alignements, nous avons décidé de travailler sur trois segments : (1) Met84-A → Glu382-A, (2) Pro484-A → Leu529-A et (3) Thr335-B → Phe479-B. Ces segments, ainsi que le nombre d'acides aminés et de fragments SIBFA (chaînes principales et latérales comprises) qui les composent, sont présentés à la Figure XIX. Un total de 490 acides aminés composés de 2158 fragments selon SIBFA sont à modéliser afin de faire le docking.

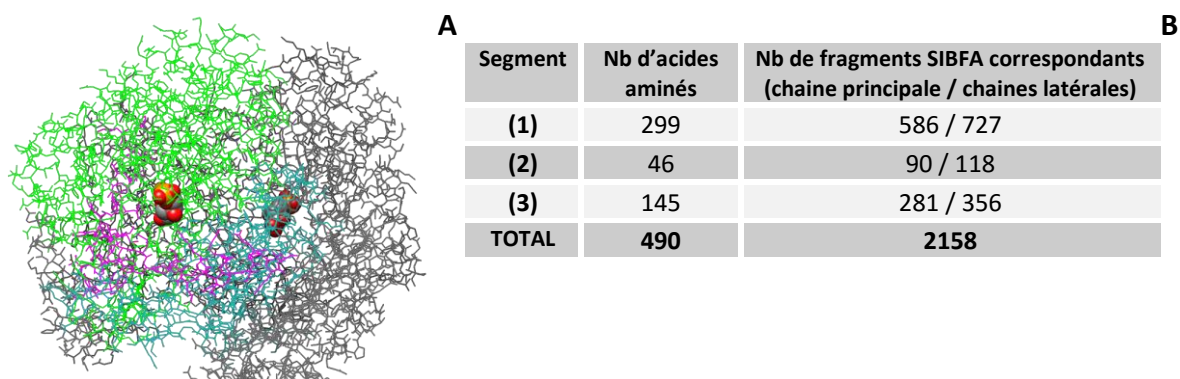


Figure XIX : (A) Visualisation par Chimera des trois segments choisis autour de l'His389-B (site actif A). (B) Tableau regroupant le nombre d'acides aminés ainsi que le nombre de fragments composant ces segments selon SIBFA.

4.1.2. Mise en place de l'AMF réduite pour SIBFA

Afin que les calculs SIBFA ne prennent en compte que les acides aminés de la zone de docking, nous définissons dans le fichier do1 les valeurs des indicateurs dénotés « ntraf ». Deux fragments dotés de ntraf différents interagiront entre eux. Deux fragments dotés du même ntraf n'interagiront pas mutuellement mais avec l'ensemble des autres fragments dotés de ntraf différents. Tout fragment doté d'un ntraf nul n'interagira avec aucun autre fragment. Ainsi, les fragments à ne pas modéliser sont dotés d'un « ntraf » nul « 0 » et ceux à modéliser sont dotés d'une valeur correspondant à leur numéro de fragment (par exemple 166, 1521...). La Figure XX présente une portion de la do1 contenant les « ntraf » du fragment 121 au fragment 260, sachant qu'au complet le fichier s'étend du fragment 1 au fragment 4990. Le fragment 166 correspond au formamide de la chaîne principale du premier acide aminé de l'AMF réduite : la méthionine 84. L'AMF réduite ainsi construite par SIBFA est présentée sur la Figure XXI.

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220
221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260

Figure XX : Portion de la file do1 définissant l'AMF réduite.

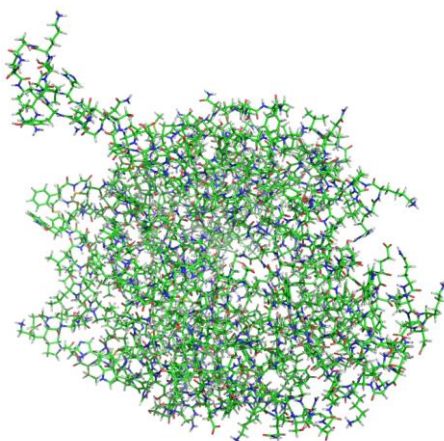


Figure XXI : Visualisation dans Chimera de l'AMF réduite construite par SIBFA.

4.2. Point d'ancrage du mime dans l'AMF réduite

Afin de placer le mime de biorécepteur au sein de l'AMF réduite, nous nous sommes appuyés sur la position du ligand de la PDB 1IRI : l'érythrose-4-phosphate (E4P). Ainsi nous avons superposé cinq atomes du mime à cinq atomes de l'E4P (Figure XXII).

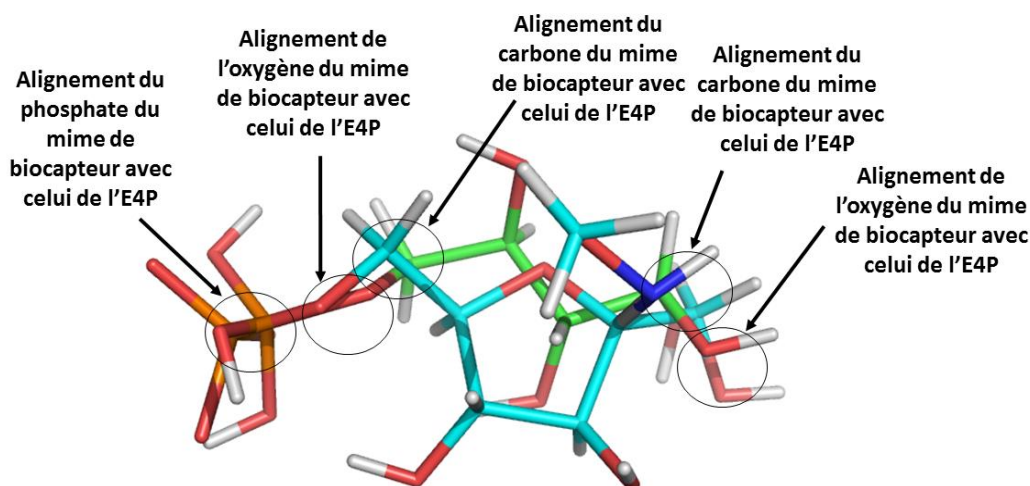


Figure XXII : Amarrage du mime (en cyan) au sein de l'AMF réduite par superposition avec le ligand E4P de la structure PDB 1IRI (en vert).

4.3. Molécules d'eau structurales

Lors du docking, nous allons prendre en compte certaines molécules d'eau connues dans la structure cristallographique. En effet, elles peuvent avoir un intérêt majeur dans le mécanisme, comme nous l'avons vu dans l'introduction.

D'après la structure cristallographique (PDB 1IRI) présentée sur la Figure XXIV, **onze molécules d'eau** apparaissent potentiellement importantes (appartenant au monomère A : 608, 622, 654, 675, 678, 685, 690, 693, 707, 719 ; appartenant au monomère B : 709). Ce sont des molécules d'eau situées dans le site actif et créant des liaisons hydrogène avec l'érythrose-4-phosphate ou les chaînes latérales de la protéine complexant le mime. Certaines de ces molécules d'eau servent de relais entre le mime et des résidus du site actif. Une fois les molécules d'eau choisies, nous pouvons récupérer leurs coordonnées cartésiennes dans la PDB afin de rajouter ces informations pour le calcul SIBFA. Une partie du fichier résultant (présentant les molécules d'eau 608 et 622) est présenté dans la Figure XXIII.

HETATM	557	O	HOH	A	608	16.260	17.866	75.261	1.00	19.71	O
HETATM	558	H01	HOH	A	608	17.190	18.097	75.201	1.00	19.71	H
HETATM	559	H02	HOH	A	608	15.959	17.979	76.166	1.00	19.71	H
HETATM	560	O	HOH	A	622	7.872	22.004	83.144	1.00	18.69	O
HETATM	561	H01	HOH	A	622	7.217	21.304	83.098	1.00	18.69	H
HETATM	562	H02	HOH	A	622	8.095	22.174	84.062	1.00	18.69	H

Figure XXIII : Fichier de récupération des coordonnées de deux des onze molécules d'eau intéressantes. La signification des colonnes est la même que lorsque nous avons récupéré les coordonnées cartésiennes des atomes précédemment.

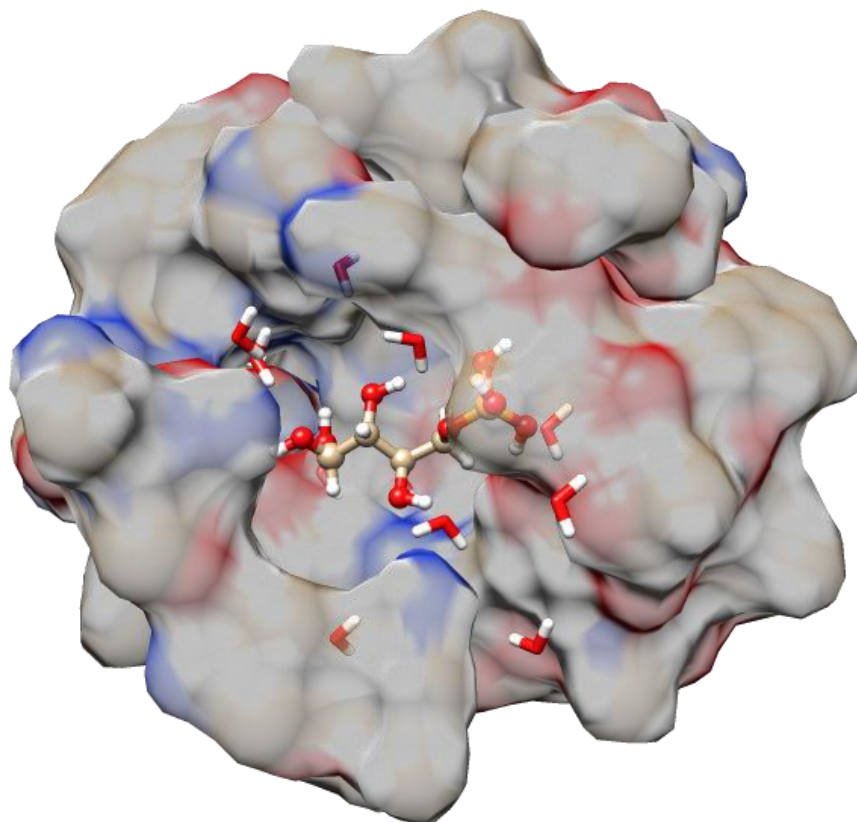


Figure XXIV : (A) Visualisation par Chimera des molécules d'eau intéressantes dans notre structure.

4.4. Docking du mime dans l'AMF réduite

4.4.1. Relaxation du mime de biorécepteur dans l'AMF réduite

Pour réaliser le docking, toutes les chaînes latérales de l'AMF réduite ne sont pas relaxées, c'est-à-dire celles correspondant aux acides aminés lointains du mime (2^{ème} et 3^{ème} sphère de coordination). Seules sont relaxées celles situées à 10 Å autour de l'His389-B (Figure XVIII H) qui correspondent aux acides aminés surlignés en rouge sur le Schéma XVI et le Schéma XVII. Ainsi, l'ensemble des fragments de la chaîne principale (maintenue rigide) et des fragments des chaînes latérales non relaxées seront dotés de « ntraf » tous égaux à 1, tandis que les fragments des acides aminés relaxés (situés à 10 Å autour de l'His389-B), les fragments constitutifs du mime de biorécepteur et les onze molécules d'eau sont dotés de « ntraf » correspondant à leur numéro de fragment.

Après relaxation, des *clashes stériques* sont apparus entre le mime de biorécepteur et deux des molécules d'eau sélectionnées dans l'AMF réduite (Figure XXV) où les onze molécules d'eau de la PDB sont représentées en orange tandis que celles provenant de la relaxation sont en magenta.

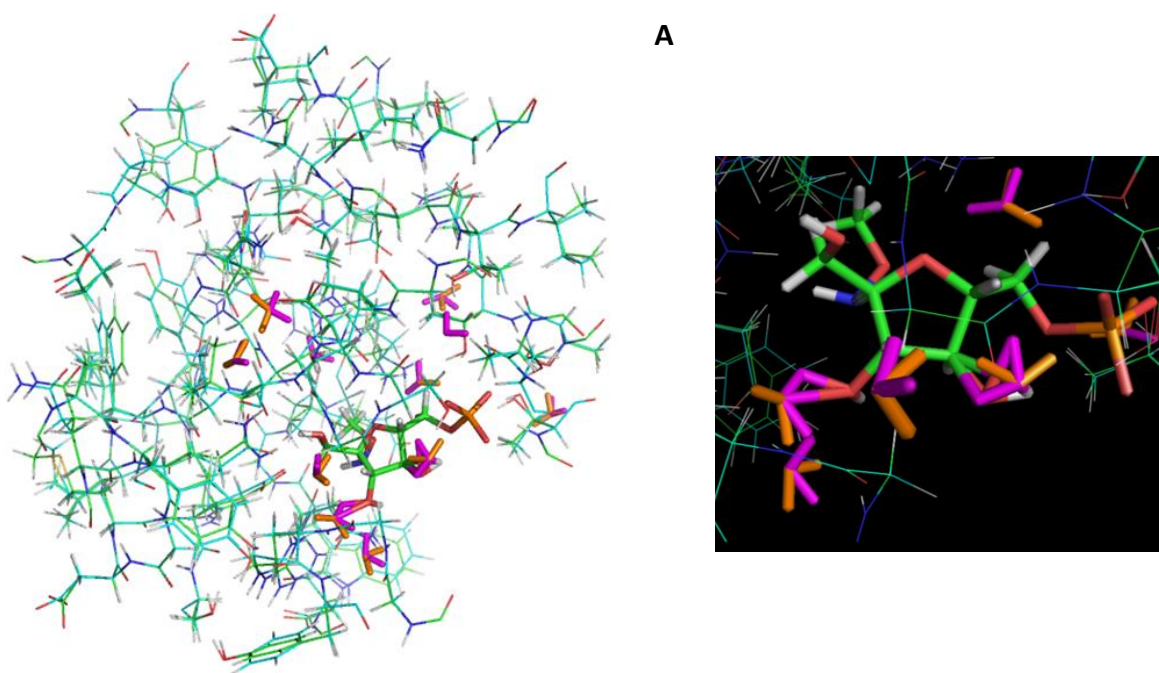


Figure XXV : Présence de clashes stériques lors de l'insertion du mime de biorécepteur dans l'AMF réduite en présence des onze molécules d'eau. (A) Vue d'ensemble et (B) zoom sur le mime de biorécepteur.

Nous pouvons voir sur la Figure XXV B, sur la gauche de la structure un *clash* entre la molécule d'**H₂O 654 (wat3 en SIBFA)** avec un OH du mime de biorécepteur (cap3 en SIBFA) et sur la droite un *clash* entre la molécule d'**H₂O 690 (wat7 en SIBFA)** avec un OH du mime de biorécepteur (cap2 en SIBFA). Après ajustement manuel nous avons pu éliminer ces *clashes stériques* et ainsi assembler le modèle d'AMF/PGI avec le mime de biorécepteur inséré dans son site actif.

4.4.2. Minimisation d'énergie et interactions mises en jeu

La minimisation du complexe peut alors avoir lieu et est encore en cours à l'heure où nous écrivons ce manuscrit. Régulièrement au cours du temps, la minimisation est arrêtée de manière à visualiser la structure du complexe et étudier les interactions de reconnaissance mises en jeu. Des analyses d'une structure en cours de minimisation sont présentées ci-après.

4.4.2.1. Méthode d'analyse des interactions mises en jeu

Tout d'abord, les distances interatomiques du mime de biorécepteur minimisé au sein de la protéine et des acides aminés susceptibles d'interagir avec lui sont mesurées. Ensuite, afin de visualiser les interactions non covalentes intermoléculaires existantes entre le mime de biorécepteur et la protéine, le programme NCIPLOT est utilisé.

NCIPLOT donne une représentation graphique des résultats de la méthode NCI (*Non-Covalent Interaction*). Cette méthode étudie les variations du gradient réduit de la densité électronique s en fonction de la densité elle-même ρ :

$$s(\rho) = \frac{1}{2(\pi^2)^{\frac{1}{3}}} \times \frac{|\nabla\rho|}{\rho^{\frac{4}{3}}}$$

Les points critiques (ρ proche de 0 et $s \rightarrow 0$) permettent de mettre en évidence les zones d'interaction.

En complétant la méthode par le calcul du signe de la seconde valeur propre (λ_2) du Laplacien de la densité, nous pouvons distinguer trois types d'interactions : les interactions stabilisantes fortes comme les liaisons hydrogène (codées en bleu), les interactions stabilisantes très faibles de type Van der Waals (codées en vert) et les interactions répulsives comme les *clashes stériques* (codées en rouge). La Figure XXVI présente trois exemples de représentation de ces interactions par NCIPLOT.

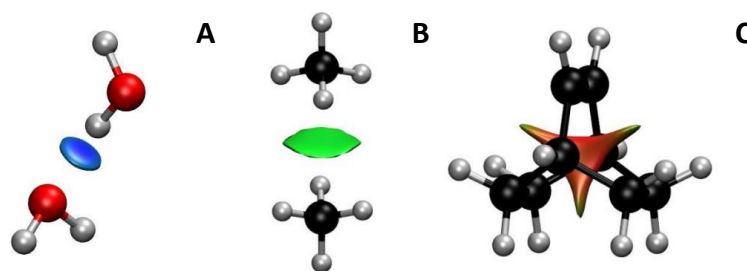


Figure XXVI : Représentation des différents types d'interaction : (A) une liaison hydrogène entre deux molécules d'eau, (B) une interaction de Van der Waals entre deux molécules de méthane et (C) une interaction répulsive au sein du bicyclo[2,2,2]octène.

4.4.2.2. Interactions intramoléculaires au sein du mime de biorécepteur

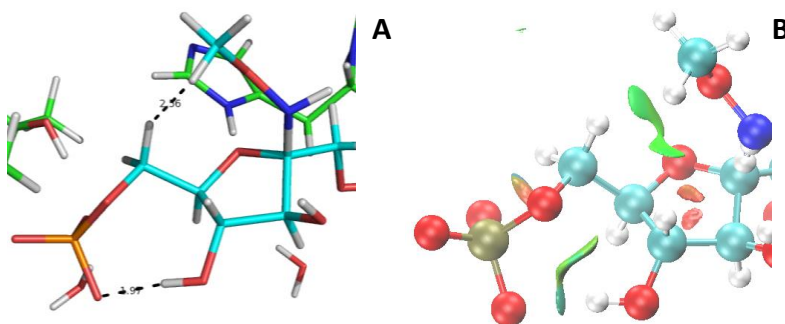


Figure XXVII : Interactions intramoléculaires mises en jeu au sein du mime de biorécepteur. (A) Mesure des distances avec PyMol et (B) visualisation des interactions par NCIplot.

Les Figure XXVII A et B montrent la présence d'une liaison hydrogène intramoléculaire forte entre le phosphate et l'hydroxyle en C4 du mime de biorécepteur (1,97 Å). De plus, nous pouvons voir une interaction attractive de type Van de Waals entre le C5 du mime et le méthyle de l'oxime (2,56 Å). Ces informations suggèrent que le mime est dans une conformation stable.

4.4.2.3. Interactions intermoléculaires impliquant le phosphate du mime

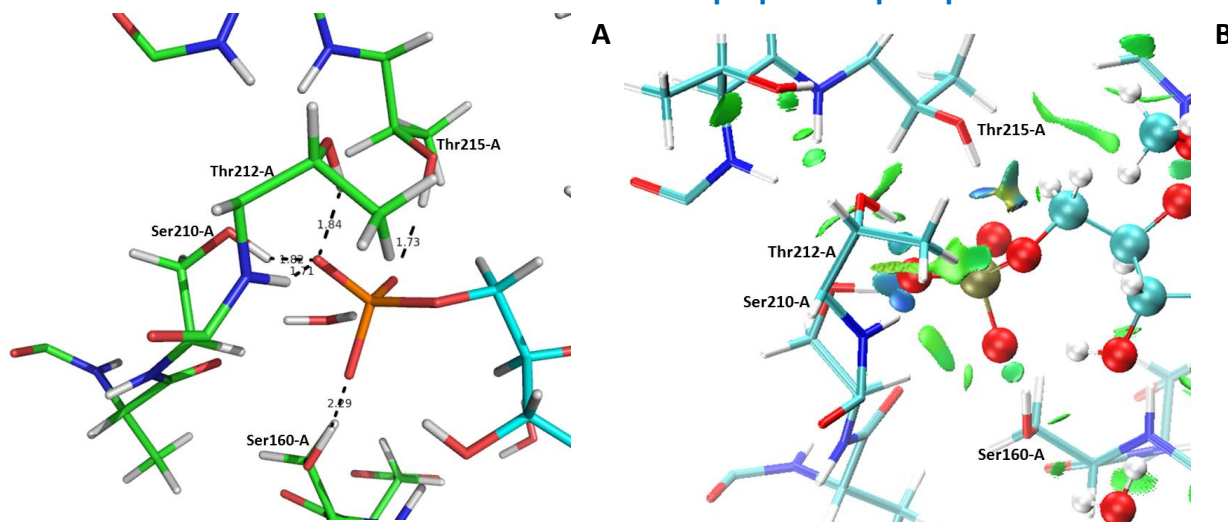


Figure XXVIII : Interactions mises en jeu par le phosphate du mime de biorécepteur. (A) Mesure des distances avec PyMol et (B) visualisation des interactions par NCIplot.

La Figure XXVIII A montre que le phosphate du mime de biorécepteur interagit avec le site actif de l'AMF/PGI *via* cinq liaisons hydrogène formées avec l'hydroxyle de la chaîne latérale de la serine 210-A (1,82 Å), l'hydroxyle de la chaîne latérale de la thréonine 215-A (1,73 Å), l'hydroxyle de la chaîne latérale de la sérine 160-A (2,29 Å), l'amide de la chaîne principale de la thréonine 212-A (1,71 Å) et l'hydroxyle de la chaîne latérale de la thréonine 212-A (1,84 Å).

Ces résultats sont corroborés par la Figure XXVIII B montrant les résultats obtenus par NCIplot. En effet, ces résultats révèlent bien la présence des liaisons hydrogène, représentées par les nuages bleus, entre les acides aminés Ser210-A, Thr215-A, Ser160-A et Thr212-A du site actif de l'enzyme et le phosphate du mime de biorécepteur.

4.4.2.4. Autres interactions intermoléculaires du mime

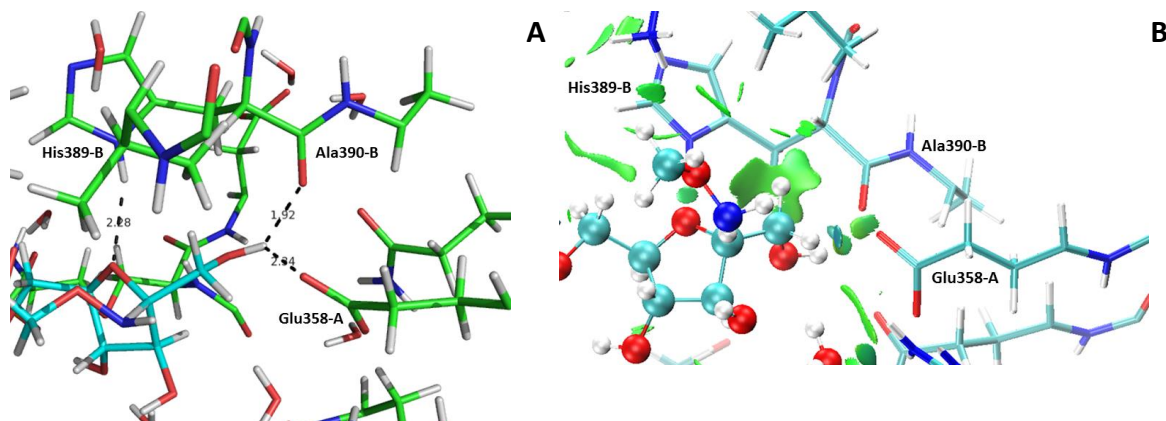


Figure XXIX : Autres interactions mises en jeu par le mime de biorécepteur. (A) Mesure des distances avec PyMol et (B) visualisation des interactions par NCIplot.

Les Figure XXIX A et B montrent que l'oxygène cyclique du mime de biorécepteur interagit avec l'amine secondaire de l'histidine 389-B *via* une liaison hydrogène (2,28 Å). De plus, nous pouvons voir que le groupement CH₂OH du mime de biorécepteur interagit avec l'oxygène anionique du glutamate 358-A (2,34 Å) et avec l'oxygène du carbonyle de la chaîne principale de l'alanine 390-B (1,92 Å).

4.4.2.5. Interactions *via* les molécules d'eau

L'ajout des molécules d'eau permet de donner une représentation plus réelle du milieu expérimental. Étudier les interactions dans lesquelles elles sont impliquées est d'une importance majeure car elles jouent un rôle important dans la stabilisation des composés (ligands ou inhibiteurs) au site actif de l'enzyme.

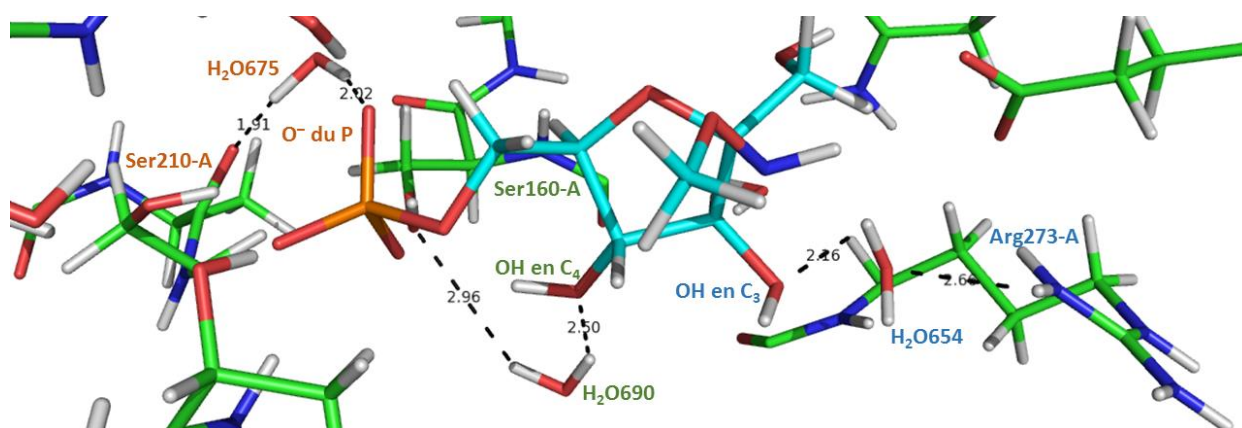


Figure XXX : Interactions mettant en jeu des molécules d'eau.

La Figure XXX met en évidence trois molécules d'eau servant de relais entre le mime de biorécepteur et les acides aminés du site actif de l'AMF/PGL.

Le premier réseau est représenté *en bleu*. La première molécule d'eau relais (H₂O654 ou wat3 en SIBFA) permet la liaison de l'hydroxyle en C₃ du mime avec l'arginine 273-A (2,16 Å puis 2,66 Å)

Le deuxième réseau représenté *en marron* implique la molécule d'eau H₂O675 (ou wat4 en SIBFA) et fait le relais entre l'oxygène anionique du phosphate du mime (2,02 Å) et le carbonyle de la chaîne principale de la sérine 210-A (1,91 Å).

La dernière molécule d'eau relais est H₂O690 (ou wat7 en SIBFA). Elle fait partie du réseau représenté *en vert* sur la Figure XXX. Cette fois-ci, l'hydroxyle en C₄ du mime est relié à l'hydroxyle de la sérine 160-A via la molécule d'eau (2,50 Å puis 2,96 Å).

4.5. Bilan : interactions mises en jeu lors de la reconnaissance

La minimisation du complexe AMF/PGI—mime du biocapteur est encore en cours de réalisation au moment de la rédaction de ce manuscrit. Cependant, les premières structures étudiées ont permis de mettre en évidence un certain nombre d'interactions favorables entre le mime du biorécepteur et l'enzyme AMF/PGI modélisés par SIBFA. Au total, sept interactions impliquant directement des acides aminés du site actif de la protéine et le mime ont été dénombrées. Ces interactions sont comparables à celles observées dans la structure de la PGI de souris complexée au 6-phosphate-D-fructose (Schéma XVIII).⁴¹ Ce résultat est remarquable, cela signifie que de lui-même lors de la minimisation, le mime s'est positionné au site actif de l'enzyme de la même manière que le F6P.

De plus, trois réseaux de molécules d'eau assurant la stabilité du mime au sein du site actif de l'enzyme ont été déterminés.

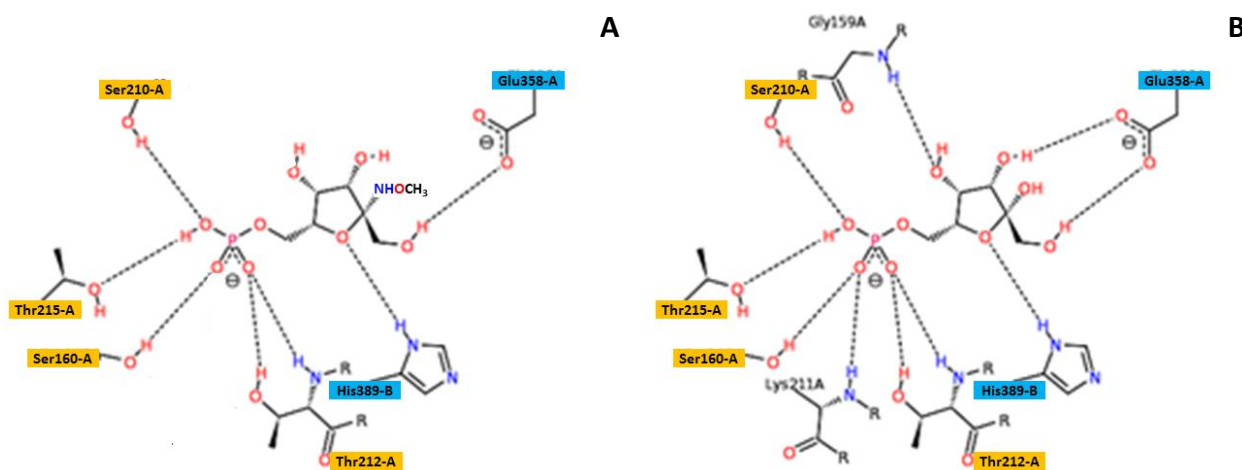


Schéma XVIII : (A) Interactions intermoléculaires déterminées dans le complexe hAMF/PGI—F6P-nome. (B) Interactions intermoléculaires déterminées dans le complexe mAMF/PGI—F6P (PDB 2CXS).

Pour le moment, aucune interaction de la partie méthyloxime du mime du biorécepteur avec l'enzyme n'a été déterminée. Cette partie ne semble donc pas gêner l'interaction du F6P avec l'AMF/PGI, assurant ainsi une bonne détection par le biocapteur. Des études cinétiques en solution vont également être réalisées pour déterminer l'influence de ce groupement sur sa complexation avec l'enzyme. Des résultats préliminaires sont présentés au chapitre suivant.

Par la suite, d'autres études SIBFA seront réalisées avec des mimes de biorécepteur plus complexes, davantage représentatifs du biocapteur. Ainsi, la nature des interactions de tout le biocapteur avec l'AMF/PGI pourra être déterminée. Des exemples sont présentés sur le Schéma XIX.

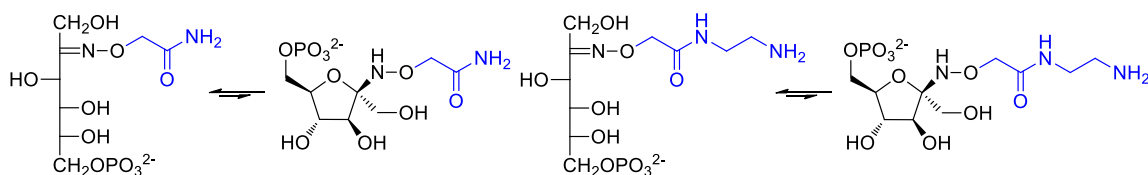


Schéma XIX : Deux exemples de futurs mimes de biorécepteur.

Chapitre 5. Perspectives

Deux études sont encore en cours de réalisation. La première concerne la minimisation du complexe AMF/PGI—mime du biorécepteur par le logiciel SIBFA. Une structure récente provenant du calcul de minimisation présente une nouvelle interaction très favorable entre le phosphate du mime et la lysine 519-A de l'enzyme. La deuxième étude en cours concerne l'étude en solution de l'interaction du mime de biorécepteur avec l'enzyme. Pour cela, des tests cinétiques sont en cours de réalisation.

5.1. Nouvelle interaction favorable mime—AMF/PGI

La Figure XXXI présente un alignement de quatre structures montrant l'évolution de la minimisation sans prendre en compte les molécules d'eau.

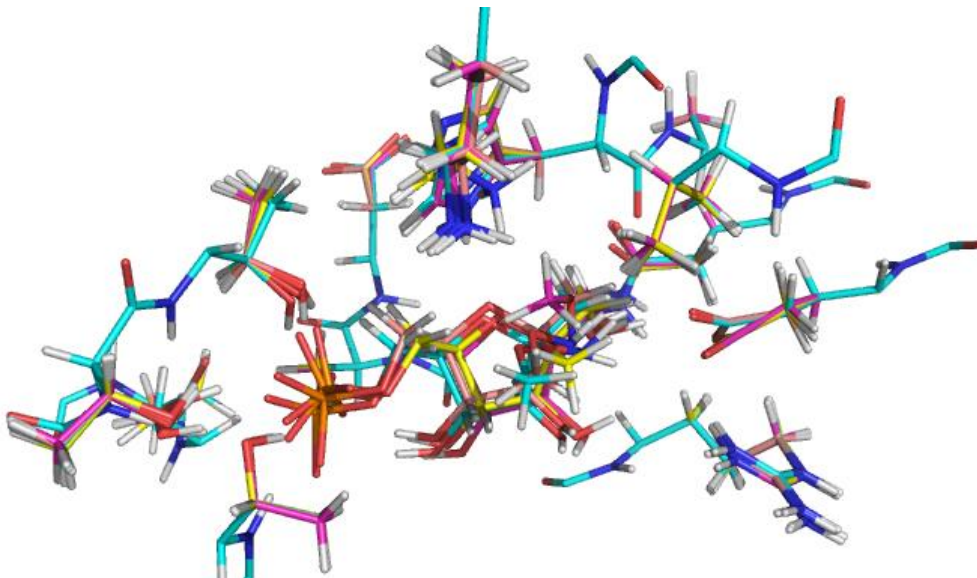


Figure XXXI : Alignement de quatre structures en cours de minimisation sans les molécules d'eau. La vue est délimitée au site actif de l'AMF/PGI.

Les quatre structures restent globalement dans la même conformation au cours de la minimisation. Cependant, une structure est sortie du lot et présente une conformation relativement différente des autres. Elle est présentée à la Figure XXXII alignée avec une structure présentée à la Figure XXXI.

La nouvelle structure en cours de minimisation qui « sort du lot » par rapport aux autres est représentée *en magenta*. La différence majeure se situe au niveau du phosphate du mime. En effet, dans cette conformation ce dernier vient interagir directement avec la lysine 519-A. Ceci s'explique par la distance entre l'oxygène anionique du phosphate et l'hydrogène de l'amine primaire de la lysine passe de 7,92 Å dans les autres structures à 1,91 Å dans la structure en magenta. Une interaction très favorable s'est donc ajoutée par rapport aux autres structures.

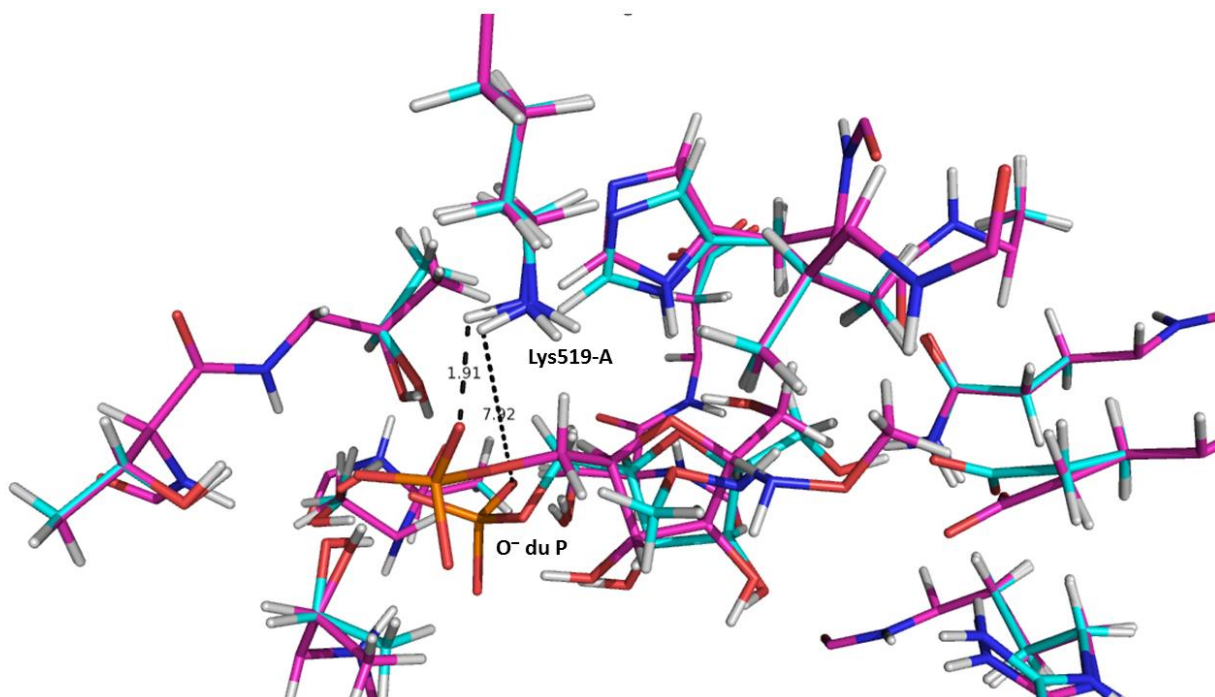


Figure XXXII : Alignement de deux structures en cours de minimisation sans les molécules d'eau.

Ce résultat est confirmé par NCIPLOT avec l'apparition d'une interaction stabilisante forte de type liaison hydrogène entre l'oxygène anionique du phosphate du mime et la lysine 519-A (Figure XXXIII).

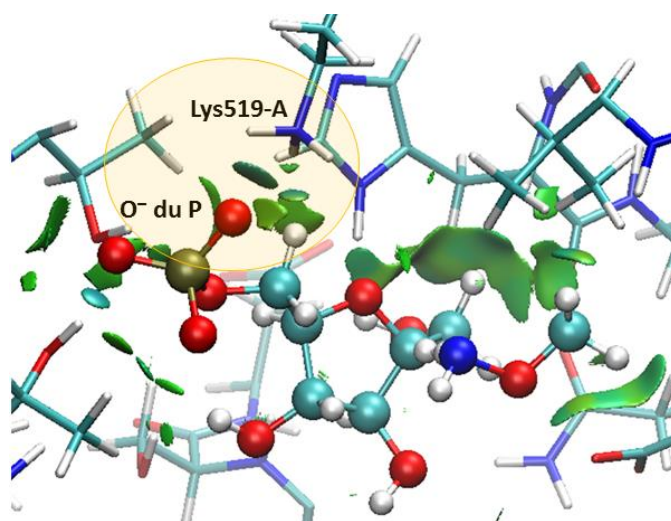
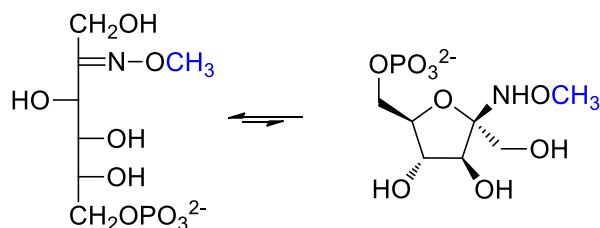


Figure XXXIII : Visualisation des interactions intermoléculaires via NCIPLOT entre le phosphate du mime et la lysine 519-A sur une structure en cours de minimisation.

5.2. Tests cinétiques mime vs. RmPGI



La synthèse de l'éther d'oxime du 6-phosphate-D-fructose a été mise au point par Florence Wieczorek.⁴² Les premiers tests de compétition du mime avec la PGI de muscle de lapin donnent un **IC₅₀ de 81 μ M** (Figure XXXIV).

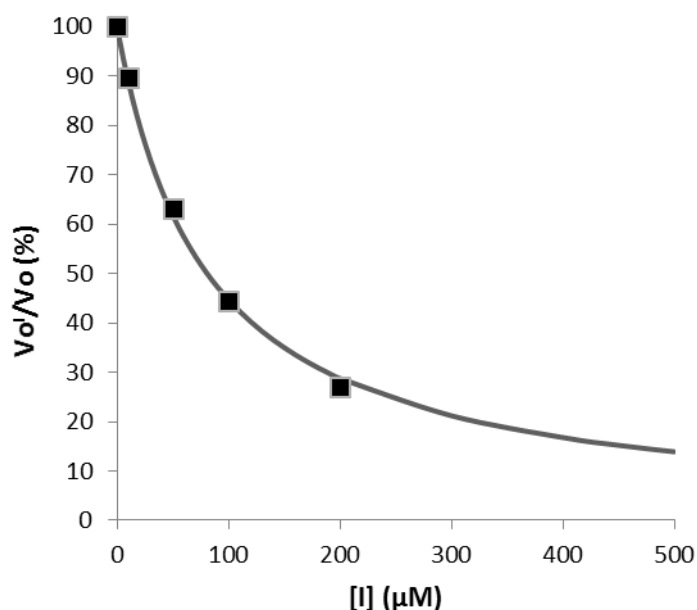


Figure XXXIV : Mesure de l'IC₅₀ du mime avec la RmPGI.

Le K_m du F6P étant de 100 μ M, le rapport K_m^{F6P}/K_i donne **2,5**, une valeur bien inférieure à celle obtenue pour le meilleur inhibiteur rapporté dans la littérature, le SPAH, dont le rapport K_m^{F6P}/K_i est de **500**.⁴³ Le mime n'est donc pas un bon inhibiteur de la PGI de muscle de lapin. La valeur de son K_i (40,5 μ M) correspond typiquement à un inhibiteur analogue de substrat. La chaîne méthyloxime ajoutée en position C₂ du F6P n'influe pas sur son interaction avec la protéine. Ces premiers résultats expérimentaux sont cohérents avec les résultats obtenus en modélisation moléculaire où les interactions mises en évidence au sein du complexe mime-AMF/PGI sont identiques à celles au sein du complexe F6P-AMF/PGI.

RÉFÉRENCES DE LA PARTIE B

- (1) Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26* (16), 1668–1688.
- (2) Brooks, B. R.; Brooks, C. L.; Mackerell, A. D.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; Caflisch, A.; Caves, L.; Cui, Q.; Dinner, A. R.; Feig, M.; Fischer, S.; Gao, J.; Hodoscek, M.; Im, W.; Kuczera, K.; Lazaridis, T.; Ma, J.; Ovchinnikov, V.; Paci, E.; Pastor, R. W.; Post, C. B.; Pu, J. Z.; Schaefer, M.; Tidor, B.; Venable, R. M.; Woodcock, H. L.; Wu, X.; Yang, W.; York, D. M.; Karplus, M. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (10), 1545–1614.
- (3) Oostenbrink, C.; Villa, A.; Mark, A. E.; Van Gunsteren, W. F. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (13), 1656–1676.
- (4) Jones, J. R. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. Math. Phys. Eng. Sci.* **1924**, *106*, 463–477.
- (5) Wu, J. C.; Piquemal, J.-P.; Chaudret, R.; Reinhardt, P.; Ren, P. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6* (7), 2059–2070.
- (6) Gresh, N.; Cisneros, G. A.; Darden, T. A.; Piquemal, J.-P. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, *3* (6), 1960–1986.
- (7) Gresh, N.; Claverie, P.; Pullman, A. *Theor. Chim. Acta* **1984**, *66* (1), 1–20.
- (8) Gresh, N.; Kafafi, S. A.; Truchon, J.-F.; Salahub, D. R. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (6), 823–834.
- (9) Gresh, N.; Shi, G.-B. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (2), 160–168.
- (10) Gresh, N.; Derreumaux, P. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (20), 4862–4870.
- (11) Antony, J.; Gresh, N.; Olsen, L.; Hemmingsen, L.; Schofield, C. J.; Bauer, R. *J. Comput. Chem.* **2002**, *23* (13), 1281–1296.
- (12) Garmer, D. R.; Gresh, N.; Roques, B. P. *Proteins* **1998**, *31* (1), 42–60.
- (13) Gresh, N.; Roques, B.-P. *Biopolymers* **1997**, *41* (2), 145–164.
- (14) Gresh, N.; Šponer, J. E.; Špačková, N. 'a; Leszczynski, J.; Šponer, J. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107* (33), 8669–8681.
- (15) Gresh, N.; Policar, C.; Giessner-Prettre, C. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106* (23), 5660–5670.
- (16) Vigné-Maeder, F.; Claverie, P. *J. Chem. Phys.* **1988**, *88* (8), 4934–4948.
- (17) Dreyfus, M. In *PhD Thesis*; University of Paris, 1970.
- (18) Claverie, P. In *PhD Thesis*; University of Paris, 1973.
- (19) Rein, R.; Rabinowitz, J. R.; Swissler, T. J. *J. Theor. Biol.* **1972**, *34* (2), 215–218.
- (20) Rein, R. In *Advances in Quantum Chemistry*; Löwdin, P.-O., Ed.; Academic Press, 1973; Vol. 7, pp 335–396.
- (21) Stone, A. J. *J. Chem. Theory Comput.* **2005**, *1* (6), 1128–1132.
- (22) Narth, C.; Lagardère, L.; Polack, E.; Gresh, N.; Wang, Q.; Bell, D. R.; Rackers, J. A.; Ponder, J. W.; Ren, P. Y.; Piquemal, J.-P. *J. Comput. Chem.* **2015**.
- (23) Piquemal, J.-P.; Gresh, N.; Giessner-Prettre, C. *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107* (48), 10353–10359.
- (24) Piquemal, J.-P.; Chevreau, H.; Gresh, N. *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, *3* (3), 824–837.
- (25) Piquemal, J.-P.; Chelli, R.; Procacci, P.; Gresh, N. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111* (33), 8170–8176.
- (26) Garmer, D. R.; Stevens, W. J. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93* (25), 8263–8270.
- (27) Foster, J. M.; Boys, S. F. *Rev. Mod. Phys.* **1960**, *32* (2), 300–302.
- (28) Murrell, J. N.; Williams, D. R. *Proc. R. Soc. Lond. Math. Phys. Eng. Sci.* **1966**, *291* (1425), 224–234.
- (29) Gresh, N.; Claverie, P.; Pullman, A. *Int. J. Quantum Chem.* **1982**, *22* (1), 199–215.
- (30) Gresh, N.; Claverie, P.; Pullman, A. *Int. J. Quantum Chem.* **1986**, *29* (1), 101–118.
- (31) Gresh, N. *J. Chim. Phys. Phys.-Chim. Biol.* **1997**, *94* (7-8), 1365–1416.
- (32) Gresh, N. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12* (17), 2121–2158.
- (33) Tanaka, N.; Haga, A.; Uemura, H.; Akiyama, H.; Funasaka, T.; Nagase, H.; Raz, A.; Nakamura, K. *T. J. Mol. Biol.* **2002**, *318* (4), 985–997.
- (34) Hanwell, M. D.; Curtis, D. E.; Lonie, D. C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G. R. *J. Cheminformatics* **2012**, *4* (1), 17.
- (35) Halgren, T. A. *J. Comput. Chem.* **1996**, *17* (5-6), 490–519.
- (36) Halgren, T. A. *J. Comput. Chem.* **1999**, *20* (7), 720–729.
- (37) M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R.

-
- Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox. Gaussian, Inc., Wallingford CT 2009.
- (38) Schmidt, M. W.; Baldridge, K. K.; Boatz, J. A.; Elbert, S. T.; Gordon, M. S.; Jensen, J. H.; Koseki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K. A.; Su, S.; Windus, T. L.; Dupuis, M.; Montgomery, J. A. *J. Comput. Chem.* **1993**, *14* (11), 1347–1363.
- (39) Stevens, W. J.; Fink, W. H. *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *139* (1), 15–22.
- (40) Law, M. M.; Hutson, J. M. *Comput. Phys. Commun.* **1997**, *102* (1–3), 252–268.
- (41) Tanaka, N.; Haga, A.; Naba, N.; Shiraiwa, K.; Kusakabe, Y.; Hashimoto, K.; Funasaka, T.; Nagase, H.; Raz, A.; Nakamura, K. T. *J. Mol. Biol.* **2006**, *356* (2), 312–324.
- (42) Wieczorek, F. *Thèse* **2010**.
- (43) Hardré, R.; Bonnette, C.; Salmon, L.; Gaudemer, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8* (23), 3435–3438.

Annexes de la partie B

Annexe 1 : Fichiers d'entrée et de sortie pour un calcul d'énergie SIBFA.

Fichiers d'entrée

Le fichier **fort.1** :

Il comprend de très nombreuses options utilisées pour le calcul. Parmi celles-ci, nous pouvons citer : exécution d'un calcul ponctuel, ou de variations discrètes d'une variable donnée, minimisation de l'énergie, Monte-Carlo, dynamique moléculaire, fichiers de sortie désirés, etc. Il comprend également la liste des fragments avec le nombre de leurs atomes et de leurs liaisons, les indicateurs des fragments permettant de savoir lesquels interagiront mutuellement. Il liste également ceux des résidus dont les coordonnées seront lues, et pour lesquels, hormis lors des simulations par dynamique moléculaire, aucune variation ne sera possible.

Le fichier **fort.2** :

Il comprend la liste des fragments successifs avec leurs caractéristiques telles que leurs coordonnées internes (angle de liaison θ , angle dièdre ϕ et longueur de liaison ρ), les types d'atomes mis en jeu, les connectivités, ainsi que les multipôles et polarisabilités distribués.

Le fichier **fort.3** :

Il comprend les connectivités inter-fragment, la liste des barrières de rotation avec leur périodicité et leur amplitude.

Le fichier **fort.4** :

Il comprend les données d'entrée pour le minimiseur Merlin.

Le fichier **fort.9** :

Il indique les liaisons à contracter au niveau des positions inter-fragments, de façon à éviter des recouvrements au niveau des

jonctions qui pourraient causer des sur-estimations de l'énergie de polarisation.

Le fichier **fort.27** :

Il définit la localisation et la population électronique des doublets d'électrons libres.

Le fichier **fort.31** :

Ce sont les paramètres du minimiseur Merlin.

Fichiers de sortie

Le fichier **fort.18** :

Il s'agit du fichier principal de résultats listant les énergies et leurs contributions, les géométries en cours, et à l'issue de l'optimisation, les liaisons hydrogène, les éventuelles collisions stériques, etc.

Le fichier **fort.19** :

Il s'agit du fichier pouvant être lu par les logiciels de visualisation (*VMD : Visual Molecular Dynamics*, *PyMol*, *Chimera...*).

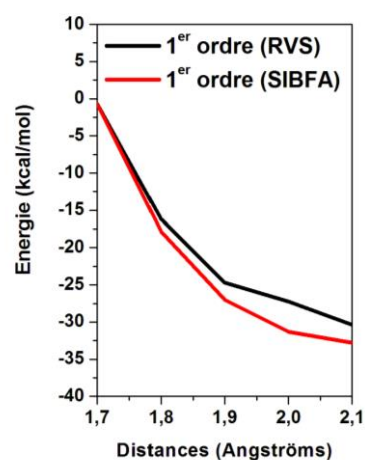
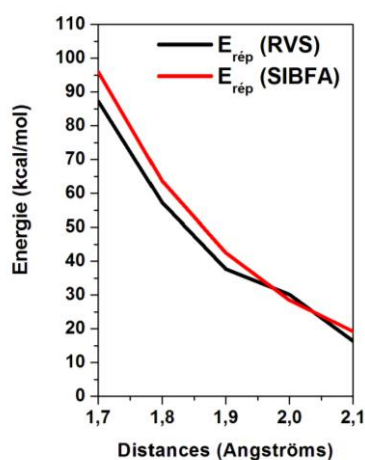
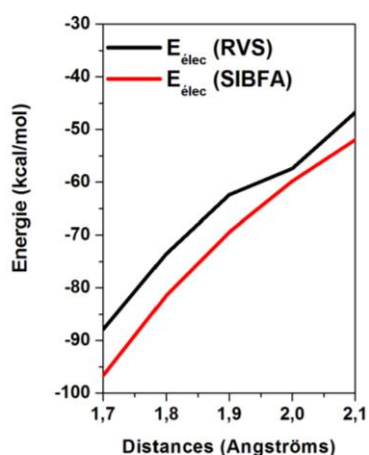
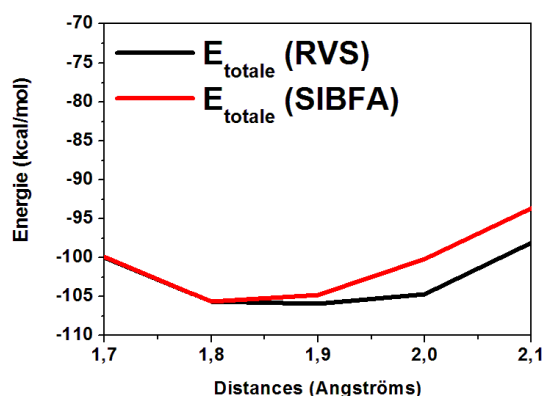
Le fichier **fort.21** :

Il s'agit du fichier contenant les coordonnées des centres polarisables, que l'on visualise afin de vérifier qu'ils coïncident avec les atomes dans l'espace réel.

Le fichier **fort.35** :

C'est l'équivalent d'un fichier fort.2 qui contient la géométrie finale du système en termes de coordonnées internes. Ce fichier est utilisé pour relancer un calcul de minimisation.

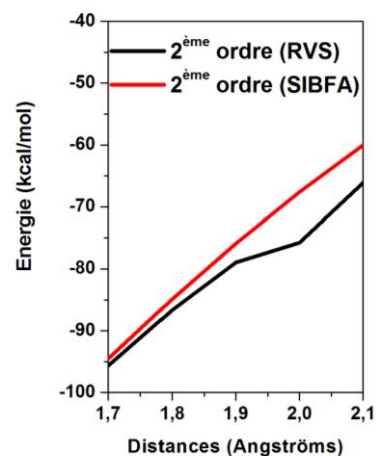
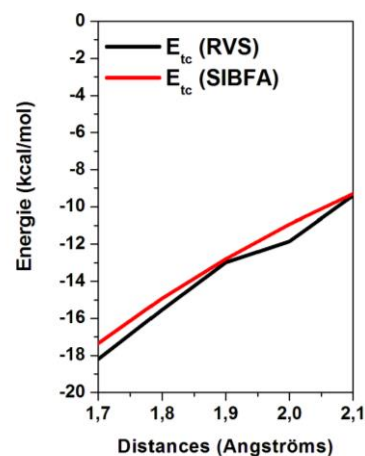
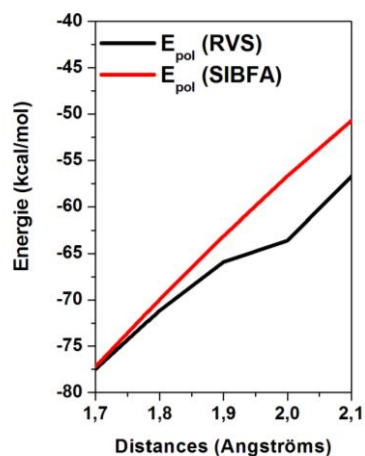
Annexe 2: Courbes de l'énergie d'interaction intermoléculaire et de ses différentes contributions énergétiques entre le Zn^{2+} et l'atome d'azote O_{14} du tétrahydrofurane-3,4-diol.



1,7 Å	1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å
-87,93	-73,50	-62,40	-57,43	-46,77
-96,65	-81,46	-69,43	-59,80	-51,99

1,7 Å	1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å
87,27	57,29	37,71	30,20	16,39
95,98	63,63	42,46	28,49	19,23

1,7 Å	1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å
-0,66	-16,21	-24,70	-27,23	-30,38
-0,67	-17,82	-26,97	-31,30	-32,76

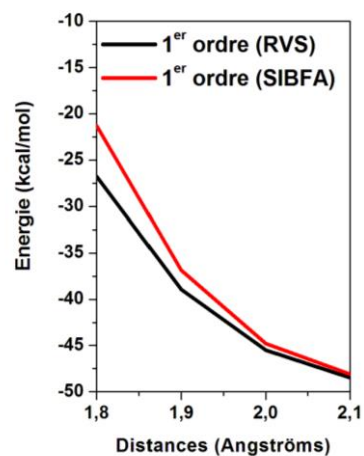
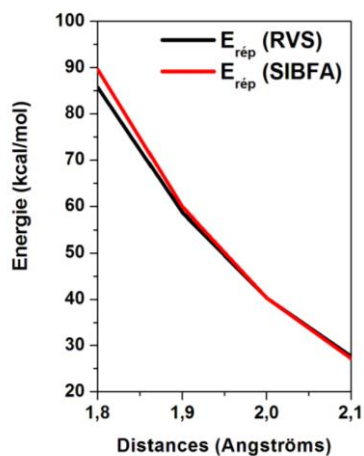
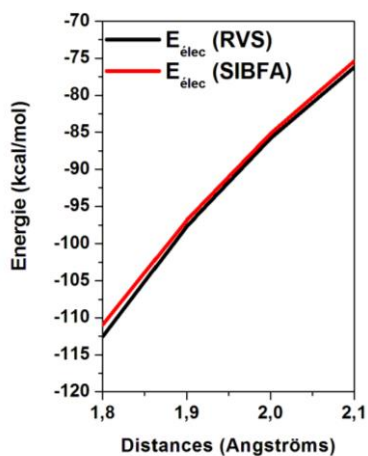
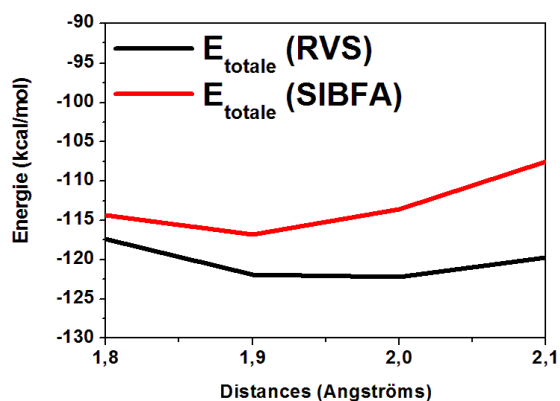
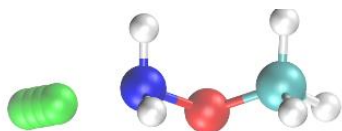


1,7 Å	1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å
-77,47	-71,16	-65,93	-63,60	-56,73
-77,18	-69,97	-63,11	-56,67	-50,73

1,7 Å	1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å
-18,20	-15,53	-12,99	-11,84	-9,40
-17,35	-14,91	-12,78	-10,92	-9,30

1,7 Å	1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å
-95,67	-86,69	-78,92	-75,74	-66,13
-94,53	-84,89	-75,89	-67,59	-60,04

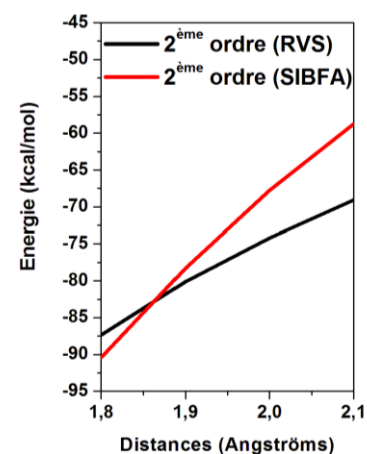
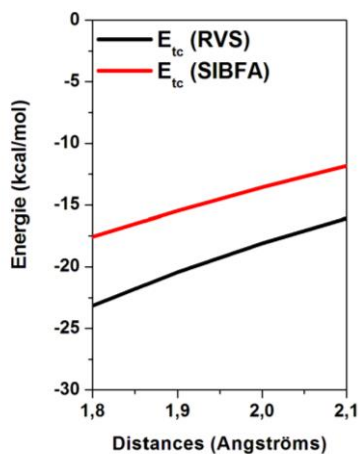
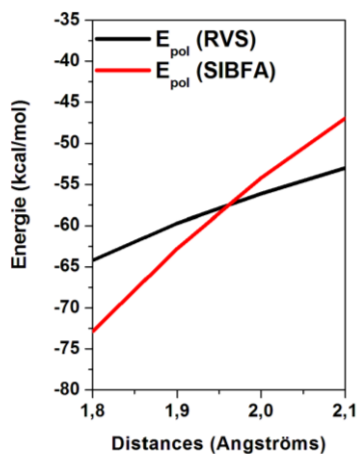
Annexe 3: Courbes de l'énergie d'interaction intermoléculaire et de ses différentes contributions énergétiques entre le Zn^{2+} et l'atome d'azote N_2 de l'*o*-méthylhydroxylamine.



1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å
-112,55	-97,69	-85,8	-76,16
-110,93	-96,86	-85,14	-75,34

1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å
85,79	58,77	40,32	27,68
89,66	59,99	40,34	27,24

1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å
-26,75	-38,92	-45,48	-48,47
-21,26	-36,86	-44,80	-48,09

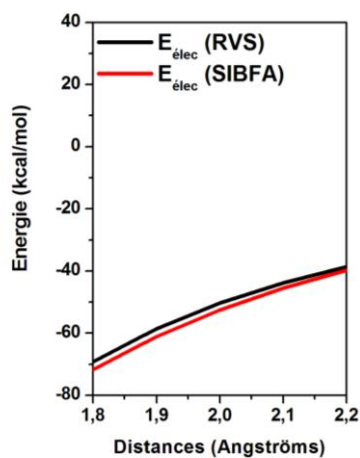
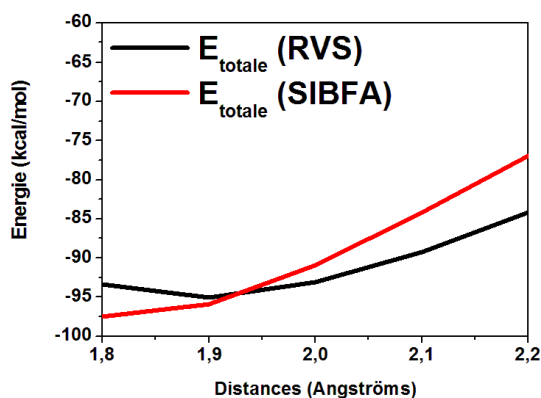
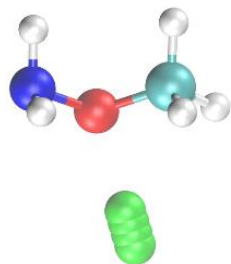


1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å
-64,19	-59,7	-56,11	-53,01
-72,88	-62,77	-54,20	-46,93

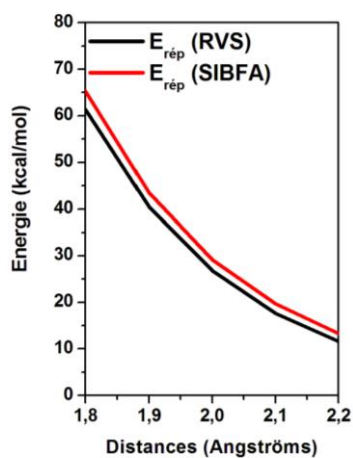
1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å
-23,16	-20,43	-18,09	-16,07
-17,57	-15,47	-13,55	-11,81

1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å
-87,35	-80,13	-74,20	-69,08
-90,46	-78,25	-67,75	-58,74

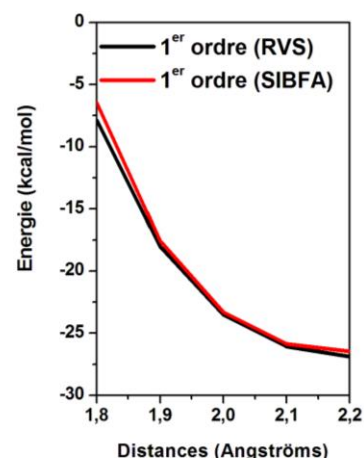
Annexe 4 : Courbes de l'énergie d'interaction intermoléculaire et de ses différentes contributions énergétiques entre le Zn^{2+} et l'atome d'azote O_4 de l'*o*-méthylhydroxylamine.



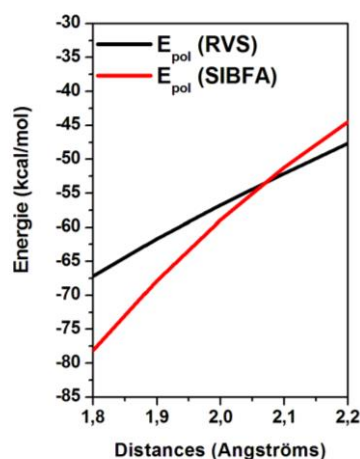
1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å	2,2 Å
-69,28	-58,55	-50,27	-43,75	-38,54
-71,75	-61,09	-52,49	-45,5	-39,77



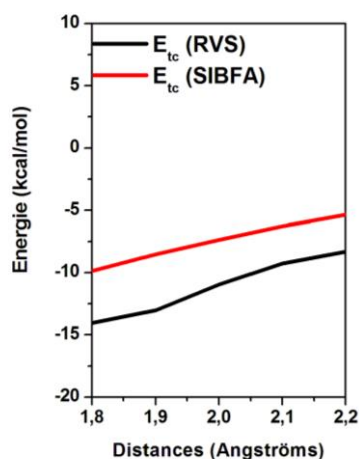
1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å	2,2 Å
61,42	40,51	26,76	17,66	11,64
65,28	43,51	29,16	19,64	13,28



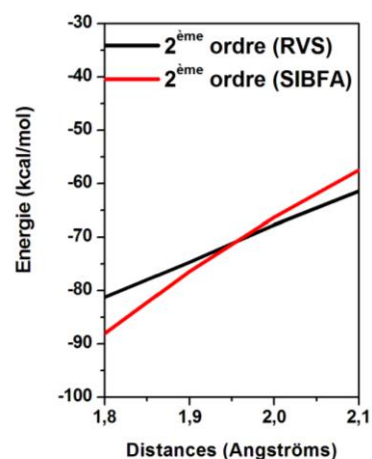
1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å	2,2 Å
-7,86	-18,04	-23,51	-26,09	-26,9
-6,46	-17,57	-23,32	-25,86	-26,48



1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å	2,2 Å
-67,19	-61,66	-56,74	-52,1	-47,63
-78,16	-67,88	-58,93	-51,18	-44,51



1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å	2,2 Å
-14,05	-13,03	-10,96	-9,27	-8,33
-9,86	-8,54	-7,35	-6,28	-5,35



1,8 Å	1,9 Å	2,0 Å	2,1 Å
-81,24	-74,69	-67,7	-61,37
-88,03	-76,43	-66,28	-57,47

—

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Conclusion générale

Un premier biocapteur pour la détection du facteur de motilité autocrine (AMF/PGI), une cytokine sécrétée par les cellules tumorales de patients en cancer métastatique, a été développé au laboratoire. Cette protéine peut être utilisée comme un biomarqueur métastatique puisqu'elle stimule la motilité des cellules cancéreuses *in vitro* et provoque des métastases *in vivo*. Elle est non spécifique et a été retrouvée dans le sérum et l'urine de patients cancéreux de plusieurs types de cancers comme les reins, les seins ou la prostate.

Pour le moment ce biocapteur a été testé sur une protéine modèle, l'AMF/PGI de lapin (identique à 93 % avec la protéine humaine). Deux matrices ont été utilisées : du tampon phosphate et du plasma humain. Ses performances telles que sa limite de détection et sa sensibilité ont été évaluées. Elles sont excellentes puisque des concentrations de l'ordre du femtomolaire (10^{-15} M) de protéine ont été détectées dans les deux matrices. L'objectif qui était de détecter des concentrations inférieures au picomolaire (10^{-12} M, déclenchement de la motilité des cellules *in vitro*) a été largement atteint. De plus, ses performances sont comparables à celles décrites dans la littérature pour d'autres systèmes de type ADN-ADN ou anticorps-antigène utilisés dans la conception de biocapteurs permettant la détection d'autres biomarqueurs de cancers. La spécificité du biocapteur ainsi que la reproductibilité des résultats ont été prouvées. Notre biocapteur est une preuve de concept très prometteuse d'un futur dispositif analytique miniaturisé conçu pour la détection rapide, facile et précise de l'AMF dans le but de faire du diagnostic et du suivi de l'évolution des métastases après traitements chimiothérapiques.

Le biocapteur a été construit par liaison de 6-phosphate-D-fructose (F6P) sur une électrode à surface d'or fonctionnalisée covalamment par des groupements oxyamine. Deux réactions clés pour la construction ont été mises au point lors de ce travail. Le biorécepteur F6P a été modifié par un lien oxime pour pouvoir être greffé à la surface. Cette modification n'interfère pas dans le mécanisme de reconnaissance avec la protéine AMF/PGI ($K_m/K_i = 2,5$). Les sucre-oximes sont le plus souvent observés en solution sous leur forme ouverte, ainsi la question légitime de savoir si le biorécepteur était sous forme fermée ou ouverte s'est posée.

Afin de répondre à cette question, des études de mécanique moléculaire polarisable via le champ de forces SIBFA ont été réalisées. SIBFA est un champ de forces de seconde génération basé sur les résultats des décompositions *ab-initio* de l'énergie d'interaction et inclut donc la polarisation mais aussi l'énergie de transfert de charge. SIBFA a fait ses preuves dans de nombreuses applications pour l'étude des complexes ligand—macromolécule et permet de très bien modéliser des systèmes protéiques incluant ou non des espèces métalliques. Afin de savoir sous quelle forme se trouve le biorécepteur, il a fallu déterminer dans lequel de ces deux cas les interactions ligand—protéine étaient le plus favorable. Pour cette étude nous avons mis en place deux modèles d'AMF pour SIBFA, une forme entière et une forme réduite,

et nous avons construit un mime méthylxime du biorécepteur pour SIBFA (le F6P-nome). Pour cela, il a fallu concevoir et calibrer chaque fragment nécessaire à l'élaboration du mime. Ensuite différentes minimisations d'énergie ont été réalisées, en prenant en compte ou non la solvation, puis des études sur les interactions mises en jeu ont été effectuées. Au total, sept interactions entre le mime cyclique du biorécepteur (F6P-nome) et la protéine (AMF/PGI) ont été dénombrées et il se trouve qu'elles sont identiques à celles du substrat naturel de l'enzyme (F6P). De plus, trois réseaux de molécules d'eau stabilisantes ont été trouvés. Toutes ces interactions intermoléculaires stabilisantes indiquent qu'une structure sous forme cyclique du biorécepteur est plausible. Malheureusement, les interactions entre le mime ouvert du biorécepteur et la protéine n'ont pas encore été déterminées et nous empêchent de conclure sur la forme du biorécepteur pour le moment.

Perspectives

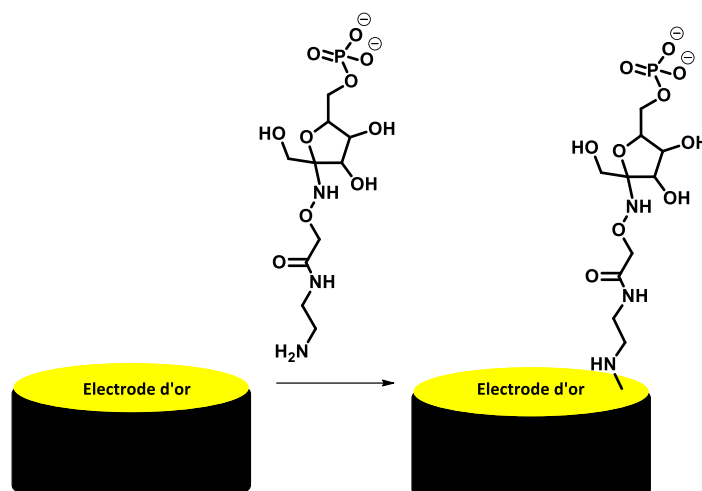
① Une première perspective à ce travail serait de valider l'approche en détectant de l'AMF/PGI humaine et non plus de l'AMF/PGI de lapin. Étant donné que la protéine humaine n'est pas commerciale, il faudrait la produire au laboratoire en faisant de la surexpression. Si des résultats similaires à la détection de l'AMF/PGI de lapin sont obtenus avec l'AMF/PGI humaine, nous pourrions tester le biocapteur sur des échantillons réels de patients en cancer métastatique. Le développement récent d'une collaboration avec le Professeur Fabrice André (Institut de cancérologie Gustave Roussy à Villejuif) va dans ce sens.

② Une deuxième perspective serait d'améliorer les performances du biocapteur. Pour cela deux stratégies peuvent être envisagées.

La première serait d'utiliser un autre transducteur, possédant par exemple une meilleure conductivité ou bien une architecture tridimensionnelle permettant d'avoir une plus grande quantité de biorécepteurs à la surface. Cette option a commencé à être étudiée et un transducteur à base de nanotubes de carbone et d'une sonde redox interne a été élaboré. Ce transducteur a été construit à de multiples reprises de manière stable et chaque étape de construction a été caractérisée. Il suffira à présent d'y greffer le biorécepteur F6P pour voir si des améliorations au niveau de la limite de détection et de la sensibilité sont obtenues.

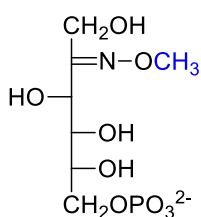
La deuxième stratégie envisageable est d'utiliser un autre biorécepteur qui serait encore plus affiné pour la cible AMF. Des molécules ayant beaucoup plus d'affinité en solution que le F6P (substrat) sont des inhibiteurs de l'enzyme. Par exemple des inhibiteurs de l'intermédiaire de haute énergie tels que le 5-phospho-D-arabinonate (5PAA, $K_m/K_i = 70$) et l'acide 5-phospho-D-arabinonohydroxamique (5PAH, $K_m/K_i = 500$). À première vue il semble difficile de concevoir un biocapteur avec l'une de ces deux molécules comme biorécepteur car elles paraissent (d'après les données cristallographiques) très enfouies au sein de la protéine. Ainsi, l'idée de greffer la structure à l'électrode par l'une de ses fonctions chimiques sans entraver son affinité avec l'enzyme semble compromise. Cependant le test mérite d'être réalisé.

③ Une troisième perspective serait d'améliorer la construction du biocapteur en diminuant le nombre d'étapes de chimie de surface. En effet, ces étapes sont souvent difficiles à caractériser et actuellement il faut trois journées pour construire le biocapteur. Il faudrait synthétiser le bras espaceur + biorécepteur en solution de manière à n'avoir que l'étape d'électrodéposition à faire avant de pouvoir se servir du biocapteur. Si nous arrivons à obtenir la molécule de manière stable, la durée de construction du biocapteur serait nettement diminuée. Cela irait davantage dans le sens d'une production industrielle d'un outil analytique de routine rapide et efficace de détection de l'AMF/PGI.

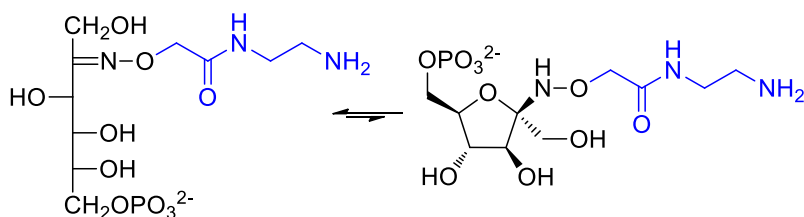


④ Enfin, une quatrième et dernière perspective serait d'utiliser la modélisation moléculaire pour construire de nouveaux mimes du biorécepteur.

Tout d'abord la forme ouverte du F6P-nome (structure ci-dessous) afin de voir si cette structure possède plus ou moins d'interactions intermoléculaires stabilisantes avec l'AMF/PGI que son homologue cyclique et ainsi conclure sur la forme théorique probable du biorécepteur à la surface de l'électrode.



Et enfin d'autres mimes plus représentatifs du biocapteur (exemple ci-dessous) pourront être modélisés afin de voir les interactions mises en jeu par l'ensemble biorécepteur-espaceur.



Titre : Conception, évaluation et modélisation de biocapteurs pour la détection électrochimique du facteur de motilité autocrine : biomarqueur potentiel de cancers métastatiques.

Mots clés : biocapteur électrochimique, facteur de motilité autocrine, mécanique moléculaire polarisable

Résumé : Le facteur de motilité autocrine (AMF) est une cytokine sécrétée par les cellules tumorales qui a été détectée dans le sérum et l'urine de patients cancéreux. Cette enzyme stimule la motilité des cellules cancéreuses *in vitro* et provoque des métastases *in vivo*. Elle peut être utilisée comme un biomarqueur métastatique.

Dans cette étude, un biocapteur électrochimique sensible et spécifique a été conçu pour la détection et la quantification d'une enzyme modèle de l'AMF humain : la PGI de mammifère. Le biocapteur a été construit par liaison de 6-phosphate-D-fructose (F6P) sur une électrode à surface d'or d' fonctionnalisée covalamment par des groupements oxyamine. La reconnaissance entre l'enzyme et le biorécepteur a été quantifiée par spectroscopie d'impédance électrochimique et voltammétrie dans une gamme de 10 fM à 100 nM. La limite de détection estimée est de 6,6 fM. La sélectivité a été prouvée, ainsi que la reproductibilité. Notre biocapteur est une preuve de concept très prometteuse

d'un futur dispositif analytique miniaturisé conçu pour la détection rapide, facile et précise de l'AMF.

Afin d'étudier les interactions mises en jeu dans la reconnaissance entre l'enzyme et le biorécepteur, des études de mécanique moléculaire polarisable via le champ de forces SIBFA ont été réalisées. SIBFA est un champ de forces de seconde génération basé sur les résultats des décompositions *ab-initio* de l'énergie d'interaction et inclut donc la polarisation mais aussi l'énergie de transfert de charge.

Pour cette étude nous avons mis en place deux modèles d'AMF pour SIBFA, une forme entière et une forme réduite, et nous avons construit un mime du biorécepteur pour SIBFA. Pour cela, il a fallu concevoir et calibrer chaque fragment nécessaire à l'élaboration du mime. Ensuite différentes minimisations d'énergie ont été réalisées, en prenant en compte ou non la solvation, puis des études sur les interactions mises en jeu ont été effectuées.

Title: Design, evaluation and modeling of biosensors for the electrochemical detection of autocrine motility factor: potential biomarker of metastatic cancers.

Keywords: electrochemical biosensor, autocrine motility factor, polarizable molecular mechanic

Abstract: Autocrine motility factor (AMF) is a cytokine secreted by tumor cells that could be detected in the serum and the urine of cancer patients. This enzyme stimulates tumor cells motility *in vitro* and causes metastasis *in vivo*. It can be used as a biomarker of metastasis.

In this study, a sensitive and specific electrochemical biosensor was designed for the detection and quantitation of a model of the human enzyme AMF: the mammalian PGI. The biosensor was constructed by covalently binding D-fructose 6-phosphate (F6P) on the oxyamine functionalized surface of a gold electrode. Recognition between the enzyme and the bioreceptor was quantified by electrochemical impedance spectroscopy and voltammetry in the range of 10 fM to 100 nM. The detection limit was calculated to be 6.6 fM. Selectivity and reproducibility were also proven. Our biosensor is a promising proof of concept for the

design of a future miniaturized analytical device for fast, easy and accurate detection of AMF.

To study the interactions involved in the recognition process between the enzyme and the bioreceptor, we performed polarizable molecular mechanic studies using the force field SIBFA. SIBFA is a second-generation force field based on the results of *ab-initio* decomposition energy of interaction and therefore includes not only the polarization but also the charge transfer energy. For this study we have developed two models of AMF for SIBFA, an entire form and a reduced form, and we built a mime of the bioreceptor for SIBFA. For this, it was necessary to design and calibrate each fragment essential for the development of the mime. Then, different energy minimizations were carried out, some of which taking into account solvation parameters. Studies of interactions between the mime and the AMF model were done.

