



Développement de biocapteurs ampérométriques pour la détermination de l'activité de la transcétolase et pour la détection d'inhibiteurs de cette enzyme

Nadia Touisni

► To cite this version:

Nadia Touisni. Développement de biocapteurs ampérométriques pour la détermination de l'activité de la transcétolase et pour la détection d'inhibiteurs de cette enzyme. Autre. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2013. Français. <NNT : 2013CLF22416>. <tel-01136223>

HAL Id: tel-01136223

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01136223>

Submitted on 26 Mar 2015

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

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

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF) dirigé par Madame Anne-Marie Delort, Directeur de recherche.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Madame Laurence Hecquet, Professeur à l'Université Blaise Pascal et à Madame Christine Mousty, Directeur de Recherche à l'ICCF pour m'avoir encadrée et conseillée au cours de ces trois années de thèse. Enfin j'ai été extrêmement sensible à leurs qualités humaines, d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail. Je remercie aussi Monsieur Franck Charmantray, Chargé de Recherche à l'ICCF et co-encadrant de cette thèse pour sa disponibilité, ses idées et conseils.

J'adresse mes sincères remerciements aux personnes qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail en qualité de rapporteurs : Monsieur Loïc Blum, Professeur à l'Université Claude Bernard de Lyon et Madame Elisabeth Lojou, Directeur de Recherche - CNRS à l'Institut de Microbiologie de Méditerranée de Marseille. Je remercie également Monsieur Jean-Yves Winum, Maître de Conférences à l'Université Montpellier 2 d'avoir accepté d'être examinateur.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur Virgil Helaine, Maître de Conférences et Monsieur Claude Forano, Professeur à l'Université Blaise Pascal pour leurs aides et leur amabilité tout au long de la thèse. Je remercie également Madame Martine Sancelme pour sa contribution à ce travail et sa sympathie ainsi que Monsieur le Pr. Thierry Noguer de l'Université de Perpignan pour nous avoir gracieusement donnés des électrodes sérigraphiées modifiée au Bleu de Prusse.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide financière du CNRS et de la région Auvergne

Je souhaite remercier tous les membres des thématiques BIOMETA et HDL pour leurs conseils et leur gentillesse échangés dans un couloir, une réunion ou autour d'un café. Je ne saurais oublier mes collègues thésards, postdoc et contractuels pour leur gaieté, leur gentillesse et leur écoute au laboratoire comme à l'extérieur. Ils m'ont permis de passer trois belles années inoubliables en Auvergne notamment avec de très bonnes tartellettes.

Enfin, j'ai une pensée particulière pour mes parents qui m'ont accompagnée au cours de mes études et sans lesquels je n'en serais pas là aujourd'hui et pour Anthony qui m'a soutenue et encouragée.

Liste des abréviations

AcOEt	Acétate d'éthyle
ADH	Alcool déshydrogénase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALT	Alanine transaminase
AST	Aspartate transaminase
ATP	Adénosine triphosphate
BP	Bleu de prusse
BSA	Albumine de sérum bovin
C.D.R.I.	Central Drug Research Institute
CA	Chrono-ampérométrie
CCM	Chromatographie sur couche mince
CE50	Concentration efficace médiane
CEA	Capacité d'échange anionique
CI50	Concentration inhibitrice médiane
CLEAs	Agrégats d'enzymes réticulées
CLECs	Cristaux d'enzymes réticulées
D-A5P	D-arabinose-5-phosphate
D-E4P	D-érythrose-4-phosphate
D-F6P	D-fructose-6-phosphate
D-G3P	D-glycéraldéhyde-3-phosphate
D-G6P	D-glucose-6-phosphate
DHA	Dihydroxyacétone
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DL	Domaine de linéarité
D-R5P	D-ribose-5-phosphate
DRX	Diffraction de rayons X
D-S7P	D-sédoheptulose-7-phosphate
D-X5P	D-xylulose-5-phosphate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Eapp	Potentiel appliqué
ECS	Electrode au calomel saturé
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FBPA	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase
Fc	Ferrocène
FSA	Fructose-6-phosphate aldolase
FTIR	Infrarouge à transformée de Fourier
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase

GA	Glycolaldéhyde
GAOx	Galactose oxydase
Gly-Gly	Glycyl-glycine
GOx	Glucose oxydase
GPDH	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
HCT-116	Lignées cellulaires humaines de cancer du côlon
HDL	Hydroxydes doubles lamellaires
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)1-pipérazine éthane sulfonique
His-Tag	Queue six histidines
HPA	Hydroxypyruvate
HPP	<i>p</i> -hydroxyphénylpyruvate
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution
HRP	Peroxydase de raifort
I_{an}	Courant d'oxydation
I_{cat}	Courant de réduction
ICP-AES	Spectrométrie d'Emission Atomique Source Plasma à Couplage Inductif
I_{max}	Courant maximum
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
ISE	Electrodes sélectives à ions
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K_D	Constante de dissociation
K_{Dapp}	Constante de dissociation apparente
K_I	Constante d'inhibition
K_M	Constante de Michaelis
LaDH	Lactate déshydrogénase
LC/MS	Chromatographie en phase liquide/spectrométrie de masse
L-Ery	L-érythrulose
LoD	Limite de détection
MEB	Microscopie électronique à balayage
Med.	Méiateur rédox
MeOH	Méthanol
MOPS	Acide-3-(N-morpholino)propanesulfonique
N-Ac-Tyr-OEt	Ester éthylique de la N-acétyl-L-tyrosine
NAD^+	β -nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	β -nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	β -nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
Ni-NTA	Nickel-acide nitriloacétique
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PEDOT	Poly(3,4-éthylène-3,4-dioxythiophène)

PEP	Poly(N-glycidylpyrrol-co-pyrrole)
PFK1	Phosphofructokinase 1
PGI	Phosphoglucose isomérase
PGMA-VFc	poly(glycidylméthacrylate-co-vinylferrocène)
PMP	Poly(4-méthoxyphénol)
PPO	Polyphénol oxydase
Ppy	Polypyrrole
PPy/PEG	Polyanion/poly(éthylène glycol) de polypyrrole
PPy-PHEMA	Poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) de polypyrrole
PRPP	5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate
PVFc	Polyvinylferrocène
Q _{exp}	Rapport expérimental
Q _{ini}	Rapport initial
Q _{th}	Rapport théorique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
rpm	Rotation par minute
RSD	Déviatiion standard relative
S	Sensibilité
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Laurylsulfate de sodium
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SWNT	Nanotube de carbone à paroi simple
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
ThDP	Thiamine diphosphate
TK	Trancétolase
TKs	Transcétolases
TPI	Triose phosphate isomérase
TPPK	Thiamine pyrophosphokinase
TRIS	2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
VC	Voltammétrie cyclique
VL	Voltammétrie linéaire
XOx	Xanthine oxydase
YADH	Alcool désydrégénase de levure

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Etude bibliographique.....	7
I.1. La transcétolase	9
I.1.1. Caractérisation et production de la TK.....	9
I.1.1.1. Réaction catalysée <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> par la TK.....	9
I.1.1.2. Structures tridimensionnelles des transcétolases	11
I.1.1.3. Mécanisme réactionnel de la TK	16
I.1.1.4. Production des TKs	17
I.1.2. Rôle métabolique de la TK.....	20
I.1.2.1. Rôle de la TK dans la voie des pentoses phosphates	20
I.1.2.2. Implication de la TK dans les maladies humaines	22
I.1.3. Inhibiteurs de la TK.....	25
I.1.3.1. Inhibiteurs de la TK de <i>S. cerevisiae</i>	25
I.1.3.1. Inhibiteur de la TK d' <i>E. coli</i>	27
I.1.3.2. Inhibiteurs de la TK humaine.....	28
I.1.3.3. Inhibiteurs de la TK de <i>P. falciparum</i>	32
I.1.4. Tests permettant de déterminer l'activité de la TK	35
I.1.4.1. Tests <i>in vitro</i> en présence de substrats donneurs non modifiés	35
I.1.4.2. Tests <i>in vitro</i> en présence de substrats donneurs modifiés	38
I.2. Immobilisation d'enzymes	41
I.2.1. Modes d'immobilisation.....	42
I.2.1.1. Immobilisation sur un support à deux dimensions.....	42
I.2.1.2. Immobilisation d'enzymes par réticulation.....	43
I.2.1.3. Immobilisation par encapsulation	43
I.2.2. Immobilisation d'enzymes dans les Hydroxydes Doubles Lamellaires (HDL)	44
I.2.2.1. Préparation des HDL.....	46
I.2.2.2. Immobilisation d'enzymes dans les HDL.....	47
I.2.3. Immobilisation de la TK sur divers supports.....	50
I.2.3.1. Greffage de la TK sur des polymères.....	50
I.2.3.2. Immobilisation de la TK sur les HDL.....	51
I.3. Les biocapteurs ampérométriques	53
I.3.1. Généralités sur les biocapteurs	53
I.3.1.1. Les biorécepteurs	53
I.3.1.2. Les transducteurs	54
I.3.2. Biocapteurs ampérométriques à polyphénol oxydase.....	55
I.3.3. Biocapteurs ampérométriques à galactose oxydase.....	58

I.4. Conclusion.....	60
I.5. Références bibliographiques	61
Chapitre II : Mesure de l'activité de la TK libre en solution.....	71
II.1. Introduction.....	73
II.2. Obtention des TKs	76
II.2.1. Méthode de purification	76
II.2.2. Détermination de l'activité des TKs.....	77
II.3. Biocapteur ampérométrique à polyphénol oxydase	79
II.3.1. Principe.....	79
II.3.2. Synthèse du composé 1, substrat de la TK.....	80
II.3.2.1. Synthèse de l'aldéhyde 7	80
II.3.2.2. Synthèse enzymatique du composé 1	81
II.3.3. Suivi de la transformation du composé 1 par la TK en voltammétrie cyclique	82
II.3.4. Amplification par détection électro-enzymatique	85
II.3.4.1. Optimisation du biocapteur à PPO	85
II.3.4.2. Performance du biocapteur PPO@Zn ₂ Al-Alg pour la détection de l'activité de la TK.....	87
II.3.5. Suivi de la transformation du composé 1 par la TK en LC/MS.....	90
II.3.6. Bilan des expériences réalisées avec le biocapteur à PPO	92
II.4. Biocapteur ampérométrique à galactose oxydase	93
II.4.1. Principe.....	93
II.4.2. Elaboration du biocapteur à galactose oxydase.....	94
II.4.2.1. Choix de la matrice d'immobilisation	95
II.4.2.2. Choix du tampon	97
II.4.2.3. Choix du rapport GAOx/laponite	97
II.4.2.4. Détection du galactose et des autres galactosides.....	98
II.4.2.5. Stabilité du biocapteur dans le temps	99
II.4.2.6. Bilan des expériences réalisées avec le biocapteur à GAOx	99
II.4.3. Détection de l'activité des TKs	99
II.4.3.1. Détection du L-érythrose.....	100
II.4.3.2. Détermination des interférents.....	101
II.4.3.3. Détermination de l'activité des TKs libres en solution	102
II.4.4. Détermination de la constante de dissociation de la thiamine diphosphate	107
II.5. Conclusion	109
II.6. Références bibliographiques	110

Chapitre III : Mesure de l'activité de la TK d'<i>E. Coli</i> immobilisée sur des HDL	113
III.1. Introduction	115
III.2. Synthèses et caractérisation des phases HDL en milieux tamponnés.....	118
III.2.1. Synthèse des HDL.....	118
III.2.2. Caractérisation physico-chimique des phases Mg ₂ Al-NO ₃ et Mg ₂ Al-MOPS _{ech}	120
III.2.2.1. Diffraction des rayons X	120
III.2.2.2. Spectroscopie Infrarouge.....	121
III.2.3. Caractérisation physico-chimique des phases Mg ₂ Al-Gly-Gly	122
III.2.3.1. Diffraction des rayons X	122
III.2.3.2. Spectroscopie Infrarouge.....	123
III.2.3.3. Analyse chimique.....	124
III.3. Etude de l'adsorption de molécules phosphorylées sur les HDL	126
III.3.1. Adsorption de la thiamine diphosphate (ThDP)	128
III.3.2. Adsorption du D-fructose-6-phosphate (D-F6P)	130
III.3.3. Bilan sur l'adsorption de molécules organiques sur les HDL.....	132
III.4. Préparation des biohybrides TK@HDL	133
III.4.1. Optimisation des conditions d'adsorption de la TK d' <i>E. coli</i> sur les HDL : TK@HDL _{ads}	134
III.4.1.1. Effet des anions interlamellaires : Zn ₂ Al-X	135
III.4.1.2. Effet des cations dans le feuillet: M ^{II} ₂ Al-X.....	136
III.4.1.3. Comparaison avec la laponite et l'hydroxyde d'aluminium	137
III.4.1.4. Effet de la nature du tampon	138
III.4.1.5. Etude du potentiel Zêta des biomatériaux	140
III.4.1.6. Effet du conditionnement du matériau HDL utilisé pour l'adsorption	141
III.4.2. Préparation des biohybrides TK@HDL _{cop} par coprécipitation.....	143
III.4.2.1. Effet du rapport TK:HDL (Q _{th})	144
III.4.2.2. Effet de la concentration en Gly-Gly	144
III.4.2.3. Influence de la nature de la TK	145
III.4.3. Caractérisations physico-chimiques des biohybrides TK@HDL	145
III.4.3.1. Effets des conditions de synthèse sur la composition chimique des matériaux.....	146
III.4.3.2. Caractérisations structurales des phases TK@HDL	146
III.4.3.3. Stabilité thermique des matériaux	148
III.4.4. Stabilité des biohybrides TK@HDL _{cop}	149
III.5. Préparation d'un film TK@HDL.....	151
III.6. Conclusion.....	154
III.7. Références bibliographiques.....	155

Chapitre IV : Biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK.....	157
IV.1. Introduction	159
IV.2. Elaboration du biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK	161
IV.2.1. Mise au point du biocapteur.....	161
IV.2.1.1. Effet de la réticulation avec le glutaraldéhyde	162
IV.2.1.2. Effet de la quantité de biohybrideTK@HDL.....	163
IV.2.2. Influence des constituants du milieu réactionnel.....	164
IV.2.2.1. Effet de la nature du tampon	164
IV.2.2.2. Etude de la diffusion des substrats de la GAOx.....	164
IV.2.2.3. Influence de la concentration en substrats de la TK	165
IV.2.2.4. Effet de l'oxygène	166
IV.2.2.5. Reproductibilité et stabilité du biocapteur dans le temps.....	167
IV.2.3. Bilan de l'élaboration du biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK	167
IV.3. Détermination des activités inhibitrices d'analogues du cofacteur et des substrats de la TK d' <i>E. coli</i>	168
IV.3.1. Influence des inhibiteurs de la TK sur la GAOx	169
IV.3.2. Détermination de la constante de dissociation du pyrophosphate de thiamine vis-à-vis de la TK immobilisée	172
IV.3.3. Mise en évidence de l'inhibition de la TK d' <i>E. coli</i> au sein du biocapteur bi-enzymatique.....	174
IV.3.3.1. Analogues du cofacteur de la TK.....	174
IV.3.3.2. Analogues des substrats de la TK	178
IV.4. Conclusion.....	180
IV.5. Références bibliographiques	181
Conclusion et perspectives	183
Matériel et méthodes.....	191
A. Matériel.....	193
B. Méthodes.....	196
ANNEXES	213

INTRODUCTION GENERALE

La transcétolase (TK, EC 2.2.1.1.) est une transférase à thiamine diphosphate (ThDP), étudiée depuis plusieurs années par l'équipe Synthèse Et Etude de Systèmes à Intérêt Biologique (SEESIB) de l'Institut de Chimie de Clermont-Ferrand (ICCF). Cette enzyme issue de *Saccharomyces cerevisiae*, ou encore d'*Escherichia coli*, est utilisée *in vitro* pour son potentiel synthétique car elle conduit à la synthèse de polyols chiraux par formation d'une liaison C-C de façon hautement stéréosélective. Cette enzyme est présente dans tous les organismes et elle participe au cycle des pentoses phosphates pour la synthèse de cétooses phosphorylés, notamment le D-ribose-5-phosphate, jouant un rôle clé dans le métabolisme des nucléotides.

Depuis peu, des travaux ont montré que chez l'Homme la TK est impliquée dans de nombreuses maladies telles que le diabète, certains cancers ou encore certaines maladies neurologiques comme le syndrome de Wernicke-Korsakoff et la maladie d'Alzheimer. Dans un but thérapeutique, des inhibiteurs spécifiques de cette enzyme sont actuellement conçus et synthétisés au niveau académique et industriel. Il s'agit essentiellement d'analogues du cofacteur, le ThDP.

Dans le but de déterminer l'effet de ces inhibiteurs sur l'activité de la TK, il est nécessaire de disposer de tests spécifiques et sensibles. Ceux décrits dans la littérature, sont basés sur des modes de détection spectrophotométrique, ou fluorométrique, mais aucun ne permet d'allier rapidité, sensibilité, faible coût.

Nous avons envisagé un mode de détection ampérométrique *via* un biocapteur, système encore jamais exploré avec la TK. Un biocapteur est défini comme un outil analytique associant intimement un composé biologique, comme une enzyme, à un transducteur, dans notre cas une électrode. En effet, les biocapteurs ampérométriques sont des dispositifs simples, sensibles et compacts permettant la reconnaissance spécifique et le dosage d'une espèce chimique en traduisant sa concentration en courant électrique mesurable. Le principal verrou technologique dans la fabrication des biocapteurs demeure l'immobilisation des biomolécules à la surface du transducteur. L'encagement d'une forte densité de biomolécules dans une matrice hôte apparaît comme une méthode assez efficace tout en veillant à maintenir la structure de la biomolécule et son accessibilité par les substrats.

Le développement des biocapteurs envisagés dans le cadre de cette thèse s'appuie sur les compétences de l'équipe Matériaux Inorganiques (MI) de l'ICCF dans les domaines des biocapteurs enzymatiques et de l'immobilisation d'enzymes dans des matériaux inorganiques lamellaires, les hydroxydes doubles lamellaires (HDL), étudiées par cette équipe depuis plusieurs années. L'intérêt accordé à ces matériaux se justifie par leur porosité, leur

biocompatibilité et leur capacité d'échange anionique. Cette dernière propriété les rend favorable à la chimisorption d'une grande variété d'enzymes dont les points isoélectriques sont généralement bas. De plus, la préparation de matériaux biohybrides notés enzyme@HDL dans des conditions de « chimie douce » permet de conserver les propriétés structurales et biologiques de l'enzyme. Ces matériaux s'avèrent donc être de très bonnes matrices d'immobilisation d'enzymes pour la réalisation de biocapteurs ampérométriques.

Ce projet collaboratif pluridisciplinaire, qui fait l'objet de cette thèse, implique à la fois la biocatalyse, la chimie des matériaux inorganiques, et l'électrochimie. Il a donc été développé grâce à la complémentarité des équipes SEESIB (production, étude et utilisation de la TK) et MI (immobilisation d'enzymes et développement de biocapteurs ampérométriques) de l'ICCF.

Des travaux antérieurs réalisés au sein de l'ICCF par les équipes SEESIB et MI ont permis de développer un premier système électro-enzymatique pour la détection de l'activité de la TK de *S. cerevisiae* en solution. La réaction catalysée par la TK ne conduisant pas à un signal mesurable directement en électrochimie, le système de mesure envisagé fait appel à une enzyme auxiliaire, la polyphénol oxydase (PPO, EC 1.14.18.1), qui fournit un signal ampérométrique proportionnel à l'activité de la TK.

Sur la base de ces premiers résultats, nous envisagerons dans un premier temps, d'optimiser ce premier biocapteur. Le substrat de la TK nécessaire au développement de ce système n'étant pas commercial, sa synthèse par voie chimio-enzymatique sera optimisée. Enfin, dans le but d'amplifier le signal généré par le biocapteur à PPO, différents paramètres seront étudiés, la source de TK, la concentration en substrat, la nature du tampon.

Afin d'augmenter les performances de cette stratégie, une alternative au biocapteur à PPO sera envisagée pour proposer un système susceptible de conduire à une réponse ampérométrique plus élevée et plus simple à mettre en œuvre grâce à des substrats physiologiques de la TK et, de plus, commerciaux. Ce nouveau système consistera en l'utilisation d'une autre enzyme auxiliaire, la galactose oxydase (GAOx, EC 1.1.3.9). La détection de l'activité de la TK libre en solution sera tout d'abord envisagée. De plus, dans le but de détecter des inhibiteurs de la TK et de développer un système réutilisable, la co-immobilisation de la TK à la surface de l'électrode sera étudiée. Pour cela la TK sera immobilisée dans les HDL. En effet, des travaux préliminaires réalisés au sein de l'Institut ont montré la faisabilité de l'immobilisation de la TK de *S. cerevisiae* sur ces matériaux conduisant à des biohybrides réutilisables et très stables dans le temps en termes d'activité enzymatique.

Au laboratoire nous disposons de plusieurs souches qui surexpriment la TK, notamment la TK de *S. cerevisiae*, la TK d'*E. coli*. A la fin de cette thèse, une collaboration avec le Pr. Sprenger (Stuttgart, Allemagne) nous a permis de produire au laboratoire la TK humaine surexprimée dans *E. coli*. Ces enzymes ont une forte homologie structurale entre elles. Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi d'utiliser la TK d'*E. coli* comme modèle car nous pouvons l'obtenir pure et sous sa forme d'apo-enzyme avec une activité spécifique bien supérieure aux autres sources de TK disponibles.

Le premier chapitre de ce mémoire sera consacré à une étude bibliographique. Nous présenterons tout d'abord la TK puis nous nous intéresserons tout particulièrement à l'implication de cette enzyme dans certaines maladies et nous recenserons les différents inhibiteurs de la TK et les différents tests d'activité décrits dans la littérature. Les différentes stratégies proposées pour immobiliser des enzymes, plus particulièrement celles développées en utilisant les HDL comme matrice hôte seront exposées. Une revue des modes d'immobilisation de la TK sur divers supports sera présentée. Nous terminerons par la description du principe de fonctionnement d'un biocapteur ampérométrique. Nous nous intéresserons aux deux types de biocapteurs ampérométriques qui seront utilisés dans le cadre des travaux de thèse, les biocapteurs à PPO et à GAOx et au rôle des matrices d'immobilisation, sur leurs performances.

Dans le second chapitre, nos résultats concernant la détection ampérométrique de l'activité de la TK libre en solution *via* les deux biocapteurs envisagés seront présentés. Nous indiquerons le principe, les conditions de mise en œuvre, les limitations ainsi que les avantages des biocapteurs ampérométriques à PPO et à GAOx. Enfin, nous nous attacherons plus particulièrement aux conditions de détection des activités des TKs d'*E. coli* et humaine avec le biocapteur ampérométrique à GAOx.

Le troisième chapitre sera consacré à l'immobilisation de la TK dans les HDL. Nous présenterons l'étude physico-chimique des HDL en présence de solutions tampons et de molécules phosphorylées, nécessaire à la TK. Nous comparerons deux modes d'immobilisation soit l'adsorption de la TK sur les HDL préformés, soit la formation d'un matériau biohybride noté TK@HDL par la méthode de coprécipitation. Puis, dans le but de mettre au point le biocapteur TK-GAOx, l'activité enzymatique de la TK immobilisée dans les HDL et déposée à la surface de l'électrode sera évaluée.

Dans le dernier chapitre, nos travaux dédiés à la détection d'inhibiteurs de la TK seront présentés. Nous décrirons tout d'abord le principe et les conditions de mise en œuvre du biocapteur bi-enzymatique pour lequel la GAOx et la TK sont co-immobilisées à la surface de l'électrode. Finalement, les résultats concernant la détection d'inhibiteurs de la TK avec le système développé seront discutés.

Nous concluons en dressant le bilan des résultats obtenus et indiquerons les perspectives offertes par ces travaux.

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Deux cofacteurs sont essentiels à l'activité de la TK. Il s'agit de la thiamine diphosphate (ThDP) et d'un cation divalent, Mg^{2+} ou Ca^{2+} . Le ThDP est constituée de trois domaines : le cycle 2-méthyl-4-aminopyrimidine (**A**), le cycle 4-méthyl-thiazolium (**B**) et un groupement diphosphate (Figure I.3). Le carbone 2 (*) du cycle **B** intervient directement dans le mécanisme catalytique de la TK (cf. paragraphe I.1.1.3).

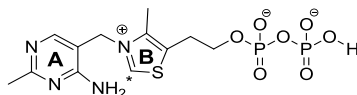


Figure I.3 : Structure et conformations du ThDP dans le site actif de la TK

In vitro, la spécificité de substrat des TKs issues de *S. cerevisiae* et d'*E. coli*¹⁻³ ainsi que récemment celle de *Geobacillus stearothermophilus*⁴ ont été étudiées par divers groupes dont celui du prof. L. Hecquet. De nombreux substrats non physiologiques et notamment non-phosphorylés ont également été décrits. Les constantes de Michaelis (K_M) de ces substrats pour différentes sources de TKs sont comparées à celles obtenues avec les substrats physiologiques phosphorylés⁵⁻⁷ (Tableau I.1).

Tableau I.1 : Constante de Michaelis (K_M) de différents substrats pour les TKs de *S. cerevisiae*, d'*E. coli* et humaine déterminées à 30°C et à pH 8,5 (ND : non déterminé et NS : non substrat)

	K_M TK <i>S. cerevisiae</i> ^{5,6} (mM)	K_M TK <i>E. coli</i> ⁶ (mM)	K_M TK humaine ⁷ (mM)
<i>Substrats donneurs</i>			
D-xylulose-5-phosphate	0,21	0,16	0,49
D-fructose-6-phosphate	1,8	1,1	0,34
D-sédoheptulose-7-phosphate	ND	4	ND
Hydroxypyruvate	33	18	NS
L-érythrulose	5	ND	ND
<i>Substrats accepteurs</i>			
D-ribose-5-phosphate	0,4	1,4	0,53
D-érythrose-4-phosphate	ND	0,09	0,36
D-glycéraldéhyde-3-phosphate	4,9	2,1	ND
Glycolaldéhyde	21	14	ND
D-glycéraldéhyde	40	48	ND
D-érythrose	214	150	ND

L'hydroxypyruvate (HPA) est le substrat donneur de la TK le plus utilisé dans les réactions de synthèse car la décarboxylation de ce substrat au cours de la réaction catalysée par la TK rend la réaction irréversible (Figure I.4). Cette découverte a permis d'exploiter le potentiel synthétique de la TK pour la synthèse de nombreux cétooses et analogues⁸⁻¹³. Plus récemment des études analytiques ont montré que des analogues du pyruvate (bromo,

dibromo, chloro, dichloro et fluoro pyruvate) sont des substrats donneurs de la TK d'*E. coli*¹⁴. Cependant ces composés n'ont pas été utilisés en présence de substrats accepteurs à des fins synthétiques pour accéder aux analogues de cétooses correspondants.

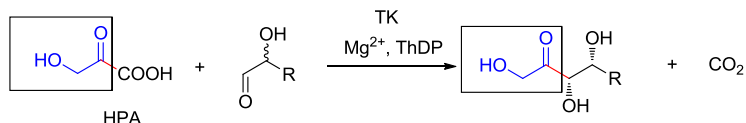


Figure I.4 : Réaction catalysée par la TK basée sur l'utilisation du HPA

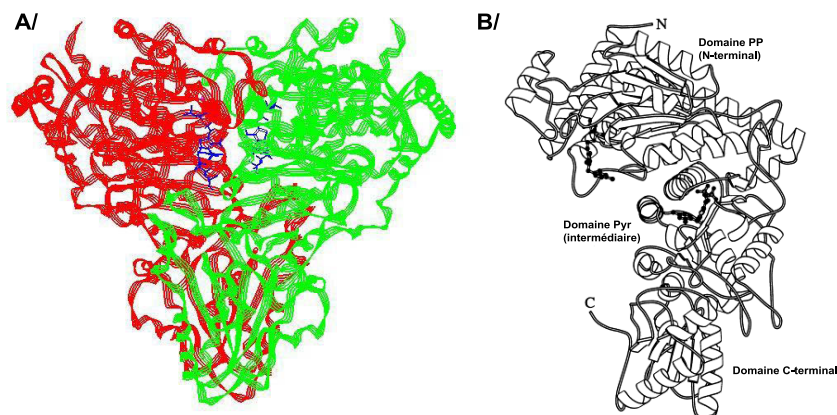
Une large variété de substrats accepteurs a été testée en présence d'HPA comme substrat donneur¹⁵. Le meilleur substrat accepteur non phosphorylé pour les TKs de *S. cerevisiae* et de *E. coli* est le glycolaldéhyde⁶. La TK accepte très préférentiellement des α -hydroxyaldéhydes de configuration (2*R*) conduisant ainsi à des cétooses de configuration *D-thréo* (3*S*,4*R*). Cette propriété est exploitée pour dédoubler des mélanges racémiques d' α -hydroxyaldéhydes afin d'obtenir des (2*S*)-hydroxyaldéhydes¹⁶. Les aldéhydes aliphatiques et éthyléniques sont également transformés par la TK, mais avec une moindre activité comparée à celle des aldéhydes polyhydroxylés. La TK de *S. cerevisiae* accepte aussi quelques aldéhydes aromatiques et hétéroaromatiques, contrairement à la TK d'*E. coli*. Actuellement, les études portent sur la modification de la spécificité de substrat de la TK d'*E. coli*¹⁷ et de *G. stearothermophilus* (travaux actuellement en cours dans le groupe du prof. L. Hecquet) essentiellement par mutagenèse, afin d'élargir son champ d'application.

I.1.1.2. Structures tridimensionnelles des transcétolases

Les structures tridimensionnelles des TKs issues de microorganismes (*S. cerevisiae*¹⁸⁻²⁰, *E. coli*^{21,22}, *Leishmania mexicana*²³, *Bacillus anthracis*²⁴, *Mycobacterium tuberculosis*²⁵, *Burkholderia pseudomallei*²⁶, *Burkholderia thailandensis*²⁷, *Campylobacter jejuni*²⁸, *Francisella tularensis*²⁹ et *Thermus thermophilus*³⁰) de végétaux (maïs³¹) et la TK humaine³² ont été résolues en présence des cofacteurs seuls, mais aussi en présence de certains substrats donneurs ou accepteurs.

Les structures tridimensionnelles des TKs montrent une forte analogie. De façon générale, les TKs se présentent toutes sous forme de dimère avec des nombres d'acides aminés et des poids moléculaire très proches. De plus, elles possèdent un site actif pour chaque sous unité situé à l'interface entre les deux monomères.

En particulier, la TK de *S. cerevisiae* est constituée de deux sous-unités identiques de 74 kDa (Figure I.5-A) comportant chacune 680 acides aminés. Chaque monomère comporte un site actif qui est situé à l'interface entre les deux sous-unités et deux sites de fixation pour ses cofacteurs, le ThDP et le cation divalent (Mg^{2+} ou Ca^{2+}), localisés à proximité du site actif. Chaque monomère est caractérisé par trois domaines distincts : le domaine N-terminal (domaine PP), le domaine intermédiaire (domaine Pyr) et le domaine C-terminal (Figure I.5-B). Les trois domaines sont interconnectés par des régions flexibles qui n'adoptent pas une structure secondaire définie. Le domaine PP lie la partie pyrophosphate du ThDP et le domaine Pyr est en contact avec la partie aminopyrimidine. Les domaines PP et Pyr sont impliqués dans la stabilisation du dimère et englobent également le site actif. Aucune implication dans la catalyse enzymatique n'a été démontrée pour le domaine C-terminal.



A : structure de l'homodimère ; B : les trois domaines N-terminal (PP), intermédiaire (Pyr) et C-terminal

Figure I.5 : Structure de la TK avec deux molécules de ThDP

Des études cristallographiques, couplées à des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier les résidus clés du site actif des TKs qui sont impliqués dans la reconnaissance des substrats. Par ailleurs, ces études ont également permis de définir les interactions entre les cofacteurs et les résidus du site actif pour proposer un mécanisme réactionnel de catalyse^{18,21,32}.

Etude du site actif de la TK en présence du ThDP et des cations divalents

Le ThDP est enchâssé dans une cavité profonde qui est située à l'interface des deux sous-unités protéiques. Son groupement diphosphate interagit avec le cation Ca^{2+} , trois molécules d'eau et trois résidus pour la TK de *S. cerevisiae* (His69, His263 et Gly158) (Figure I.6) et sept résidus pour la TK humaine (Ser40, Lys75, His77, Asn185, Lys244, Gly156 et Glu157). Le cycle thiazolium (B) du ThDP, quant à lui, forme des liaisons de type de Van Der Waals avec certains résidus du site actif. Les résidus Asp382 (TK de *S. cerevisiae*) et Gln189 (TK humaine) interviennent dans la stabilisation de la charge du cycle thiazolium (B) et sont indispensables à la liaison du ThDP à l'enzyme. Le cycle 4-aminopyrimidine (A) est stabilisé dans la zone hydrophobe par les résidus Phe442, Phe445 et Tyr448 pour la TK de *S. cerevisiae* et Glu366, Gly123, Gln428, Phe389 et Phe392 pour la TK humaine.

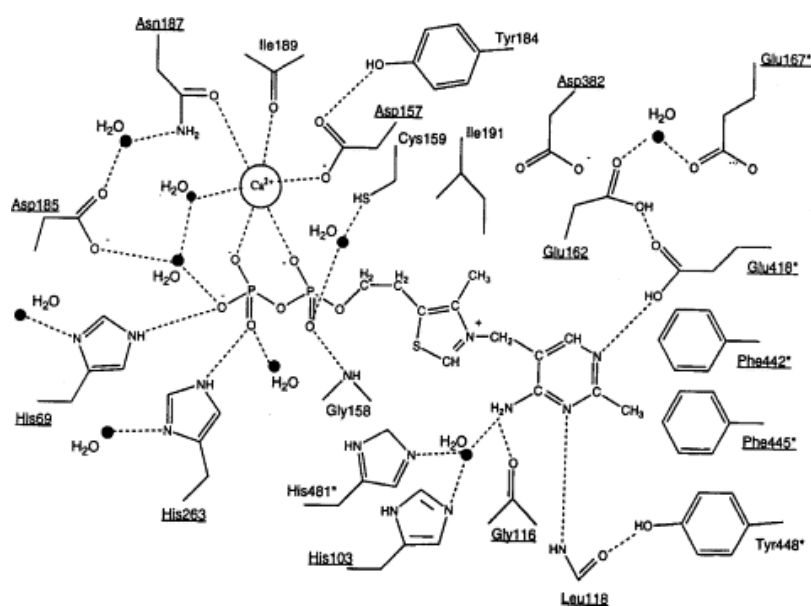


Figure I.6 : Interactions entre les cofacteurs et les résidus du site actif de la TK de *S. cerevisiae*

Les données cristallographiques montrent que le cation divalent Ca^{2+} interagit avec les acides aminés Asp157, Asn187 et Ile189 du site actif de la TK *S. cerevisiae* (Figure I.6) et les acides aminés Asp155, Asn185 et leu187 de celui de la TK humaine. Le Ca^{2+} interagit également avec le groupement pyrophosphate du ThDP. Sa présence est essentielle pour que le ThDP se lie à l'apoenzyme.

Etude du site actif de la TK en présence des substrats physiologiques

L'étude du site actif de la TK de *S. cerevisiae* en présence de ses substrats a fait l'objet de nombreux travaux.

La TK accepte des cétooses et des aldoses phosphates comportant trois à sept carbones. Parmi eux, seul le D-érythrose-4-phosphate (D-E4P, un des substrats accepteurs) a été co-cristallisé avec la TK de *S. cerevisiae*, avec une résolution de 2,4 Å¹⁹. Les études cristallographiques couplées à des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de proposer un modèle des interactions entre les résidus du site actif et le D-E4P (Figure I.7).

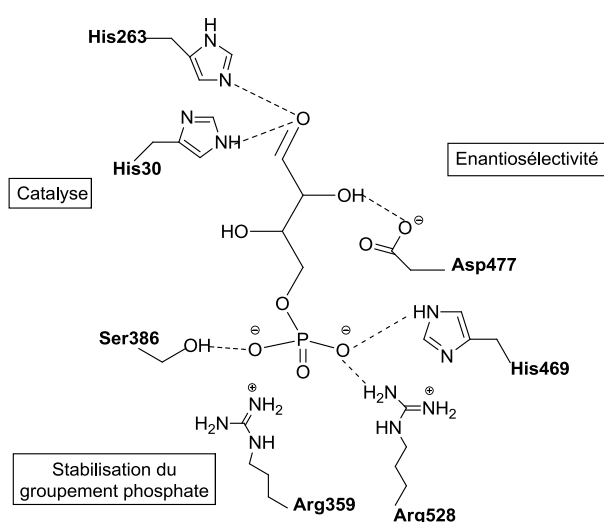


Figure I.7 : Mise en évidence des acides aminés du site actif de la TK de *S. cerevisiae* impliqués dans la fixation du substrat accepteur (D-E4P) et dans la catalyse

L'Asp477 interagit par une liaison hydrogène avec le groupe hydroxyle en position α de la fonction aldéhydique du D-E4P et contrôle ainsi l'énantiosélectivité vis-à-vis des aldéhydes α -hydroxylés de configuration *R*.³³ De plus, les deux Arg359 et 528 stabilisent les groupements phosphates des substrats ayant une chaîne carbonée supérieure ou égale à quatre unités tandis que l'His469 et la Ser386 stabilisent les groupements phosphates des cétooses comportant trois ou quatre carbones.

Comparaison des résidus clés intervenant dans le site actif des TKs de *S. cerevisiae*, *E. coli* et humaine

Il apparaît que les résidus clés notamment les deux His30 et His263 chez *S. cerevisiae*¹⁹ intervenant dans la catalyse jouent le même rôle chez *E. coli*³⁴ et chez l'homme³⁵ (Tableau I.2). Pour les trois TK, trois résidus Arg, Ser et His sont retrouvés pour stabiliser le groupement phosphate. Pour la stabilisation des groupements hydroxyles du substrat donneur, les résidus His jouent un rôle majeur. De plus, nous avons vu précédemment que l'énantiosélectivité est contrôlée chez la TK de *S. cerevisiae* par l'Asp477 et récemment chez *E. coli* il a été montré qu'un résidu Asp469 a la même fonction. Toutefois, la TK humaine comporte quelques différences, la Gln428 remplace une histidine (His481 chez *S. cerevisiae* et His473 chez *E. coli*) qui pourrait jouer un rôle dans la liaison du substrat. Le résidu Gln189 remplace une Ile au niveau de la liaison avec le cycle thiazolium. Ce résidu Gln189 pourrait empêcher par son encombrement stérique, la dissociation du cofacteur, expliquant ainsi la liaison quasi-irréversible du ThDP à l'enzyme. Le résidu Lys260 non retrouvé chez *S. cerevisiae* et *E. coli*, est quant à lui situé à l'entrée de la poche contenant le substrat et il pourrait interagir avec le groupement phosphate du substrat.

Tableau I.2 : Résidus intervenant dans le site actif des TKs

Rôle du résidu	<i>S. cerevisiae</i> ¹⁹	<i>E. coli</i> ³⁴	Humaine ³⁵
Catalyse	His30	His26	His37
	His263	His261	His258
Enantiosélectivité	Asp477	Asp469	-
	His469	His461	His461
Stabilisation du groupement phosphate du substrat	Ser386	Ser385	Ser345
	Arg359	Arg358	Arg318
	-	-	Arg474
	-	-	Lys260
Liaison avec le cycle thiazolium	Ile	Ile	Gln189
Alignement orbitalaire des intermédiaires	His481	His473	Gln428

I.1.1.3. Mécanisme réactionnel de la TK

D'après les expériences de mutagenèse dirigée et après analyse des données cristallographiques, un mécanisme catalytique pour la TK de *S. cerevisiae*¹⁹ a été proposé. Celui-ci peut être adapté aux TKs d'*E. coli*²² et humaine^{32,35}, les sites actifs étant similaires, comme nous l'avons vu précédemment dans le paragraphe I.1.1.2.

La première étape commune à toutes les enzymes qui utilisent le ThDP consiste en la déprotonation du C₂ du cycle thiazolium qui conduit à la forme activée du ThDP. Le résidu Glu418 (Glu336 pour la TK humaine) protone l'atome d'azote N1' du cycle pyrimidine (**a**) conduisant à la formation du groupe iminium (**b**). Le C₂ du cycle thiazole est alors déprotoné (**c**) par le résidu His481 (His110 pour la TK humaine et His473 pour la TK d'*E. coli*) (Figure I.8). Bien que la conformation en V du ThDP ne soit pas favorisée thermodynamiquement, elle permet la stabilisation du carbanion du C₂ du cycle thiazolium par le groupement iminium du cycle pyrimidine.

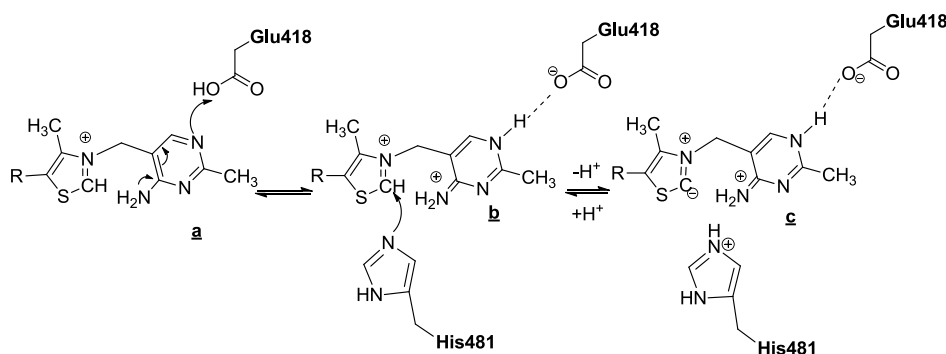


Figure I.8 : Mécanisme d'activation du ThDP

Puis, le carbanion **c** formé attaque le groupe carbonyle du D-X5P (**d**) qui peut être protoné soit par le groupe iminium du cycle pyrimidine ou bien par le résidu His481 (cette dernière hypothèse est retenue dans le mécanisme décrit dans la Figure I.9).

Ensuite, l'His263 (His261 pour la TK d'*E. coli* et His258 pour la TK humaine) est parfaitement positionnée pour arracher le proton du groupement hydroxyle du C₃ du substrat donneur lié au ThDP (**e**). Le D-G3P est alors libéré. La charge négative de l'intermédiaire α,β -dihydroxyéthyl-pyrophosphate de thiamine (**f**) est stabilisée par effet mésomère (**g**).

Le carbanion (**f**) attaque alors la face *Re* de la fonction aldéhyde du substrat accepteur, l'oxygène étant protoné par l'His263. Le nouveau carbone asymétrique formé est de configuration *S*. La rupture de la liaison qui lie le C₂ du cycle thiazolium (**h**) via la

déprotonation du groupement hydroxyle conduit à la libération du produit final de configuration (3*S*,4*R*) et du ThDP (i).

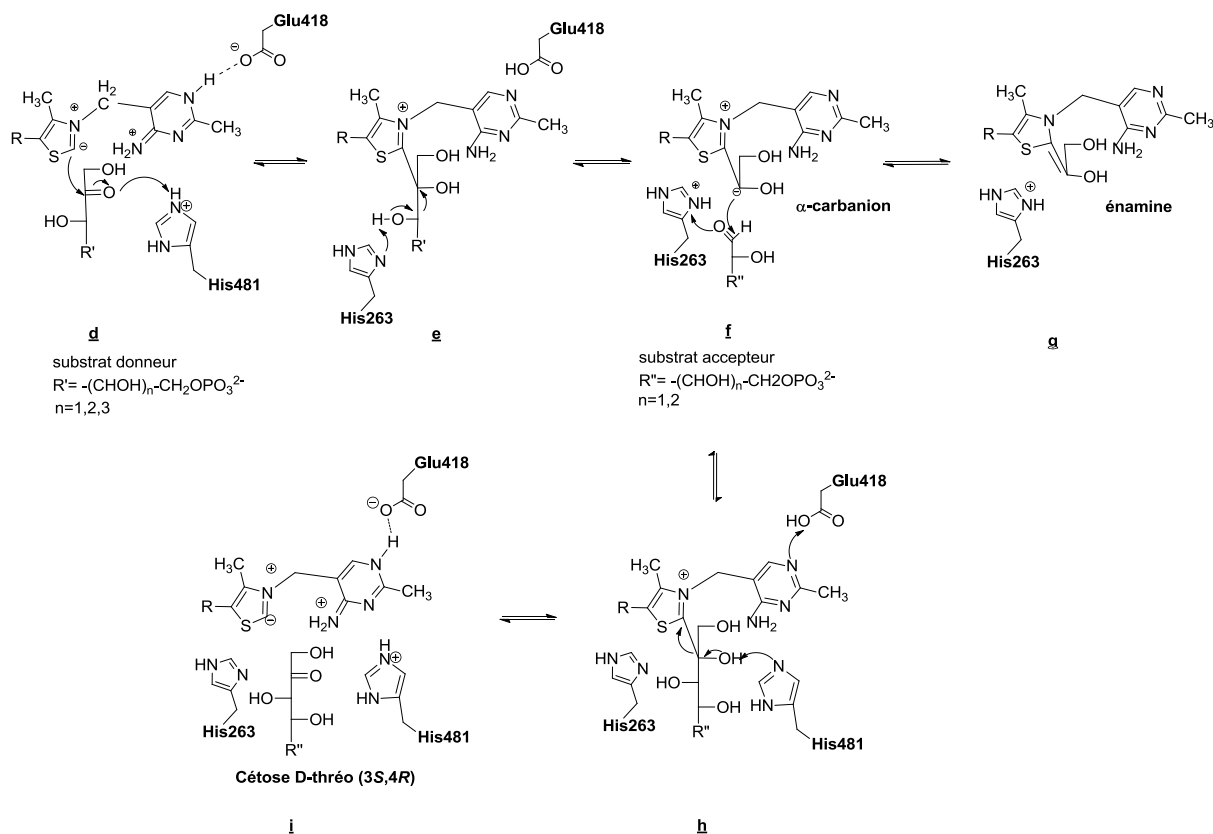


Figure I.9 : Mécanisme réactionnel

I.1.1.4. Production des TKs

Quelques TKs, essentiellement issues de *S. cerevisiae*, d'*E. coli*, de *Geobacillus stearothermophilus*, *Leishmania mexicana* et la TK humaine, ont été surexprimées et produites en grande quantité en raison de leur intérêt pour la biocatalyse dans le cas des TK microbiennes, ou pour le domaine médical dans le cas de la TK humaine.

TK de *S. cerevisiae*

Deux gènes codant des enzymes ayant une activité TK, *TKL1* et *TKL2*, ont été identifiés chez *S. cerevisiae*. Les deux enzymes correspondantes présentent 71 % d'homologie de séquence mais semblent jouer des rôles différents au sein de la cellule. En effet, le gène *TKL2* est peu exprimé et ne semble pas indispensable au métabolisme de *S. cerevisiae*³⁶,

contrairement à la TK codée par le gène *TKL1*. Tous les travaux décrits dans la littérature concernent la TK codée par le gène *TKL1*.

La TK de *S. cerevisiae* a été la première à avoir été clonée et surexprimée. Sundstorm et ses collaborateurs ont construit le plasmide pTKL1, contenant le gène *tkl1*, à partir d'une banque génomique de *S. cerevisiae* dans le vecteur pHR81³⁷. Ce vecteur navette a la particularité de se répliquer dans *E. coli* et dans *S. cerevisiae*. Grâce à l'utilisation de ce vecteur, les auteurs obtiennent un taux de surexpression de la TK qui représente 15 % de la quantité de protéines cellulaires.

Une méthode de purification de la TK produite dans *S. cerevisiae* H402 (pTKL1) est décrite par l'équipe de Schneider³⁸. Elle fait intervenir successivement une précipitation au sulfate d'ammonium, trois chromatographies d'exclusion moléculaire (Sephadex G-25, Sephacryl S-300 et Sephadex G-50) et une chromatographie sur résine anionique (Mono-Q HR). Cette méthode permet d'obtenir la TK avec une activité spécifique de 37 U.mg⁻¹, déterminée en présence des substrats naturels et un rendement de 32 %.

TK d'*E. coli*

Deux gènes *tktA* et *tktB* ont été identifiés chez *E. coli*. Les séquences protéiques des deux TK présentent 70 % d'homologie et sont indispensables à la survie cellulaire.

La TK issu du gène *tktA* est l'enzyme la plus exprimée dans *E. coli* et aussi la plus étudiée. Woodley et ses collaborateurs ont cloné le gène *tktA* dans un plasmide multicopie de type pBGS18 portant un gène de résistance à la kanamycine. Après transformation dans *E. coli*, des cultures à grande échelle (20 et 1000 litres) en réacteur ont été réalisées afin de produire la TK. La lyse des bactéries par un homogénéisateur haute-pression a permis d'obtenir un extrait cellulaire clarifié avec une activité spécifique de 26,4 U.mg⁻¹, déterminée en présence des substrats naturels. La TK représente 40 % de la quantité totale de protéines dans l'extrait³⁹.

La purification des protéines a été facilitée par le greffage d'une étiquette six histidines (His-Tag) en position N-terminale. Cet oligopeptide présente une grande affinité pour le nickel et a permis de purifier la TK par chromatographie d'affinité sur une résine Ni-NTA (nickel-acide nitriloacétique)⁴⁰.

TK de *Leishmania mexicana*

La TK de *Leishmania mexicana* a également été clonée dans un vecteur sous le contrôle d'un promoteur T7 et d'un opérateur *lacZ*, avec une étiquette six histidines. Après transformation dans *E. coli* et induction par l'IPTG, la TK représentait 5 à 8 % des protéines de l'extrait cellulaire issu de la culture. Une chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA a permis d'obtenir une TK avec une activité spécifique de 1,65 U.mg⁻¹ déterminée en présence des substrats naturels, et un rendement de 10 à 15 mg par litre de culture⁴¹.

TK de *Geobacillus stearothermophilus*

Un seul gène *tk1* a été identifié récemment à partir du génome de *Geobacillus stearothermophilus*⁴. Ces travaux ont été développés par le groupe du prof. L. Hecquet en collaboration avec le Génoscope d'Evry. La séquence protéique présente 70 % d'homologie avec celle de *Bacillus anthracis*. Un gène synthétique de cette TK a été obtenu et a été surexprimé dans *E. coli*.

La purification des protéines a été facilitée par le greffage d'une queue six histidines (His-Tag) en position N-terminale. Une purification par choc thermique peut être envisagée comme alternative compte-tenu de la thermostabilité de cette TK. En présence des substrats naturels, l'activité spécifique à 25°C de la TK purifiée par choc thermique est de 0,9 U.mg⁻¹. Elle est similaire à celle de la TK purifiée par chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA. Cette technique de purification plus rapide et plus simple à mettre en œuvre a donc été retenue. De plus, l'activité spécifique à 50°C est de 2,8 U.mg⁻¹.

TK humaine

La TK humaine a été clonée tout d'abord par Wang et ses collaborateurs dans un vecteur de surexpression sous le contrôle d'un promoteur T7 et d'un opérateur *lacZ*, avec une étiquette six histidines en position N-terminale⁴². Cette stratégie a conduit après purification, en présence des substrats naturels, à une activité spécifique de 6 à 10 U.mg⁻¹ et un rendement de 0,8 à 1,5 mg par litre de culture. Plus récemment, Nixon et ses collaborateurs ont utilisé le vecteur pCL476, ce qui a permis aussi l'introduction d'une étiquette His-Tag⁴³. Le promoteur est inductible par la chaleur. Le vecteur pCL476/TK a été transformé dans une souche d'*E. coli*. La souche obtenue a été cultivée à 30°C, puis la production de la TK a été induite en plaçant la culture à 42°C. Après purification par chromatographie sur hydroxyapatite, suivie

d'une chromatographie d'affinité au nickel, la TK recombinante humaine exprimée dans *E. coli* a été obtenue avec une activité spécifique de $13,5 \text{ U.mg}^{-1}$, déterminée en présence des substrats naturels, et un rendement de 2,5 %.

I.1.2. Rôle métabolique de la TK

La TK est ubiquitaire. Chez les végétaux la TK intervient dans le cycle de Calvin en relation avec la photosynthèse, et chez les microorganismes et les organismes supérieurs, la TK est présente dans la voie des pentoses phosphates plus précisément dans le segment non oxydatif. Nous limiterons cette étude au rôle de la TK dans cette dernière voie métabolique (Figure I.10).

I.1.2.1. Rôle de la TK dans la voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphate commence par une phase oxydative durant laquelle le D-glucose-6-phosphate (D-G6P) provenant de la phosphorylation du D-glucose est transformé en D-ribulose-5-phosphate avec production de deux molécules de NADPH et d'une molécule de CO_2 . Dans le segment non-oxydatif de la voie des pentoses phosphates, la TK catalyse la transformation du D-ribose-5-phosphate (D-R5P) et du D-xylulose-5-phosphate (D-X5P) en D-glycéraldéhyde-3-phosphate (D-G3P) et D-sédoheptulose-7-phosphate (D-S7P) ainsi que la transformation du D-érythrose-4-phosphate (D-E4P) et du D-X5P en D-fructose-6-phosphate (D-F6P) et D-G3P (Figure I.10).

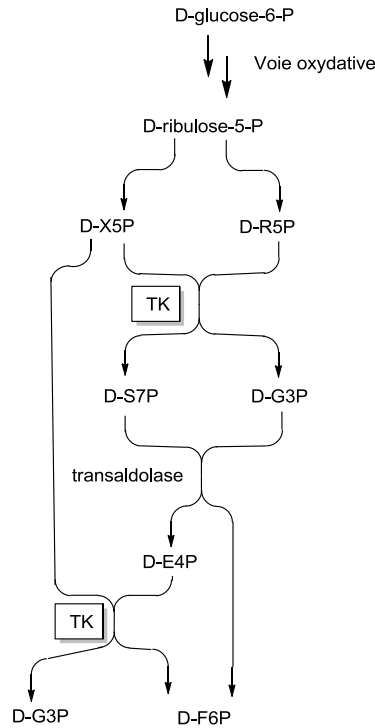


Figure I.10 : Segment non oxydatif de la voie des pentoses phosphates

Les monosaccharides phosphorylés jouent un rôle essentiel comme précurseurs de différentes voies métaboliques (Figure I.11).

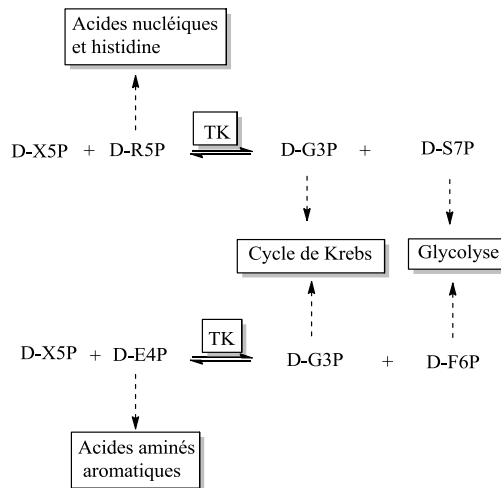


Figure I.11 : Importance de la réaction catalysée par la TK dans la cellule

Notamment, le D-R5P généré par la voie des pentoses phosphates est phosphorylé par la ribose phosphate pyrophosphokinase en présence d'une molécule d'adénosine triphosphate (ATP) pour donner le 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP). Ce précurseur est impliqué dans la biosynthèse de l'histidine, des nucléotides et du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺).

Le D-F6P et le D-S7P permettent de faire un lien entre la voie des pentoses phosphates et la glycolyse. Le D-F6P et le D-S7P sont phosphorylés par la phosphofructokinase 1 (PFK1) en présence d'ATP pour accéder au D-fructose-1,6-bisphosphate et au D-sédoheptulose-1,7-diphosphate. Le D-S7P est aussi un précurseur des lipopolysaccharides des parois bactériennes.

I.1.2.2. Implication de la TK dans les maladies humaines

Les différents monosaccharides phosphorylés du segment non-oxydatif de la voie des pentoses phosphates, substrats de la TK, sont impliqués dans de nombreuses voies métaboliques, notamment la glycolyse (Figure I.12). De plus, lors d'une déficience en thiamine, l'activité de la TK comme celles des autres enzymes ThDP dépendantes, est diminuée chez les organismes supérieurs et notamment chez l'Homme. Ces facteurs peuvent engendrer des maladies sévères.

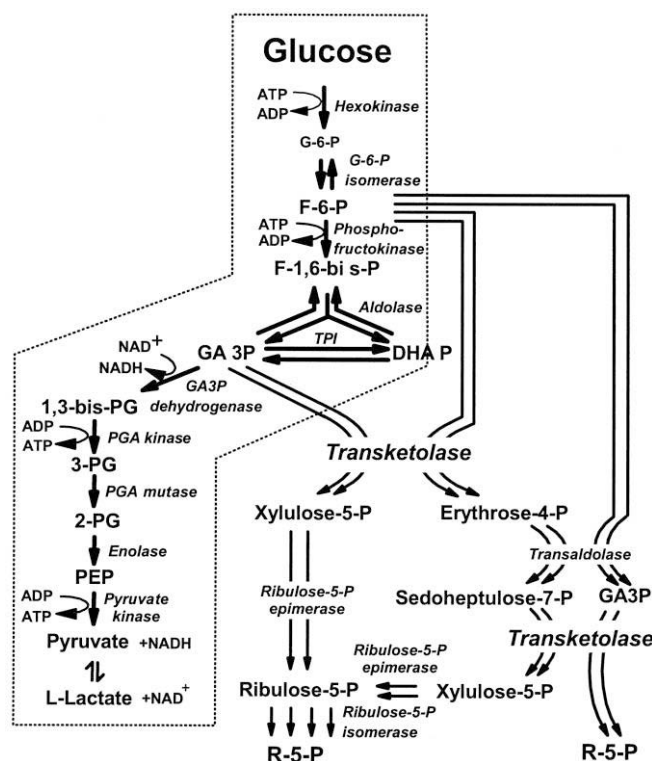


Figure I.12 : Implication de la glycolyse dans le segment non oxydatif de la voie des pentoses phosphates⁴⁴

Maladies neurologiques

Le syndrome de Wernicke-Korsakoff est une maladie souvent rencontrée chez les alcooliques chroniques et chez les patients ayant une maladie gastro-intestinale ou le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) associé à une malnutrition. Ce syndrome génère une paralysie des muscles moteurs et des troubles de la conscience. Cette maladie est provoquée par une déficience en thiamine qui se traduit par une diminution de l'activité des enzymes ThDP dépendantes. Parmi ces enzymes, il a été montré *in vivo* que l'activité de la TK diminue en premier et celle-ci est totalement restaurée en présence d'un excès de thiamine⁴⁵. La thiamine est prescrite chez l'homme pour le traitement de cette maladie^{46,47}. Cependant, ces études ont montré que la neuropathologie ne dépend pas uniquement du rôle de la TK mais aussi d'autres facteurs encore peu connus^{48,49}.

Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, une diminution de l'activité de la TK a été également montrée lors d'un examen post-mortem des cerveaux et autres tissus des patients atteints⁴⁸. Chez ces malades, la structure de la TK identifiée dans les fibroblastes est différente de celle des patients sains. Cette anomalie serait due à une protéolyse partielle de la TK produisant une plus petite sous-unité présentant une faible activité TK. Cette caractéristique peut représenter un marqueur pour cette maladie. Des études ont montré que les cathepsines lysosomales, plus précisément les cystéines protéinases, seraient impliquées et pourraient être des cibles pour le traitement de cette maladie⁵⁰.

Dans le cadre des maladies neurologiques, l'activité enzymatique de la TK peut être dosée post-mortem dans les différents tissus du corps humain dont le cerveau mais aussi dans le sang des malades permettant d'évaluer aussi la déficience en thiamine. La TK a été isolée et purifiée à partir des érythrocytes humains⁵¹. Son activité a été détectée selon le test conventionnel qui sera développé par la suite dans le paragraphe I.1.4.1.

Cancer

Le glucose est une source de carbone lors de la synthèse des acides nucléiques dans les cellules tumorales. La branche non oxydative de la voie des pentoses phosphates dans laquelle intervient la TK joue donc un rôle important pour la synthèse de D-R5P dans les cellules cancéreuses. Dans certaines cellules tumorales, plus de 85 % du D-R5P nécessaire à la synthèse nucléosidique dérive directement ou indirectement de cette branche. Ces cellules montrent une utilisation accrue de glucose, utilisé dans le segment non oxydatif de la voie des

pentoses phosphates conduisant à une sur-régulation de la TK (Figure I.12)^{52,53}. De nombreuses études montrent que la TK et la thiamine ont effectivement un haut coefficient de contrôle dans la croissance des cellules tumorales, du cancer du colon, des hépatomes, des carcinomes épithéliaux des poumons, des carcinomes de la thyroïde et des adénocarcinomes pancréatiques⁵⁴⁻⁵⁷. De plus, un apport nutritionnel en thiamine permet la survie et la prolifération des cellules cancéreuses^{58,59}. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation d'inhibiteurs de la TK. L'oxythiamine induit ainsi la suppression de la prolifération tumorale ce qui se traduit par un arrêt de la phase G1 du cycle cellulaire dans les cellules cancéreuses d'Ehrlich⁶⁰. Récemment une étude a montré l'expression de la TK dans les cellules tumorales sous hypoxie⁶¹.

L'activité de la TK dans des cellules tumorales est détectée *in vitro* dans des extraits cellulaires. Ceci a été réalisé dans le cas de cellules tumorales ascitiques d'Ehrlich^{59,60}. De plus, l'influence de la TK *in vivo* sur la prolifération des cellules cancéreuses est étudiée soit en présence d'inhibiteurs soit avec un apport en thiamine⁵⁶.

Diabète

La TK joue également un rôle important dans le diabète⁴⁸. Un haut niveau de glucose dans le sang induit simultanément une forte concentration en glucose dans les cellules rétiniennes, endothéliales et neuronales. Quand la concentration en glucose est élevée dans le sang, le glucose et d'autres sucres réagissent de façon non enzymatique avec les groupements amino des protéines. Cela conduit à une modification post traductionnelle appelée glycation non enzymatique qui diminue l'activité des enzymes et notamment celle de la TK. Cette glycation peut être diminuée dans le cas de la TK par la prescription de vitamine B₁ ce qui active la TK et permet de remédier en partie à l'accumulation de glucose dans le sang. Il a été aussi montré que la benfotiamine en activant indirectement l'activité de la TK *via* la glucokinase responsable de la conversion du glucose en glucose-6-phosphate, active la voie des pentoses phosphate et prévient du diabète (Figure I.12)^{44,62}. La TK peut donc être une nouvelle cible pour la prévention et le traitement du diabète chronique. L'activité enzymatique de la TK est dosée dans le sang comme dans le cas des maladies neurologiques.

Paludisme

Dans le cas de cette maladie, la TK humaine n'est pas impliquée comme dans le cas des autres maladies citées ci-dessus. En revanche, la TK du parasite *Plasmodium falciparum* ayant moins d'homologie avec la TK humaine, elle est envisagée depuis peu comme une nouvelle cible dans le traitement du paludisme⁶³.

I.1.3. Inhibiteurs de la TK

La littérature recense de nombreuses molécules ayant des activités inhibitrices sur des TKs provenant de différentes sources. Les travaux dans ce domaine ont pris de l'ampleur ces dernières années, comme nous venons de le voir, des études ont montré l'implication de la TK dans de nombreuses maladies, notamment dans les cancers et plus récemment dans le paludisme. De nouveaux inhibiteurs de cette enzyme ont été ainsi découverts.

I.1.3.1. Inhibiteurs de la TK de *S. cerevisiae*

Les premiers inhibiteurs de la TK ont été mis en évidence avec l'enzyme de *S. cerevisiae*. Il s'agit d'inhibiteurs compétitifs, analogues du ThDP, ou de substrats.

Inhibiteurs analogues du ThDP

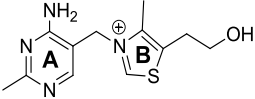
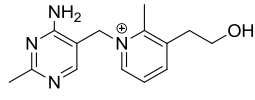
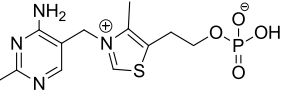
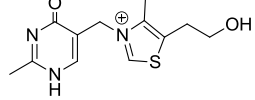
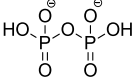
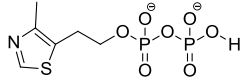
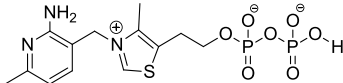
La première étude portant sur l'inhibition de la TK en présence d'analogues du ThDP a été effectuée en 1971⁶⁴ en présence de la TK de *S. cerevisiae* sous forme d'apoenzyme. Les auteurs de ces travaux ont étudié l'influence des trois éléments structuraux caractéristiques du ThDP (cycle **A** aminopyrimidine, cycle **B** thiazolium et groupement pyrophosphate) à l'aide des composés présentés dans le Tableau I.3.

Le rôle de ces molécules en tant qu'inhibiteurs a été évalué d'après leurs constantes d'inhibition (K_I). Ainsi, l'affinité d'un inhibiteur est d'autant plus grande que le K_I est petit. Cette constante d'inhibition K_I , correspond aussi à la constante de dissociation (K_D) du complexe enzyme-inhibiteur ou du complexe enzyme-substrat-inhibiteur.



Les valeurs de K_I obtenus avec les composés non phosphorylés (**1**), mono (**3**) et diphosphorylés (**6**) et avec le pyrophosphate (**5**), permettent d'en déduire que le groupement pyrophosphate en présence du cycle **B** contribuerait de façon significative à l'effet inhibiteur. En effet, les composés comportant un groupement diphosphate ont des K_I plus petit.

Tableau I.3 : Les premiers inhibiteurs de la TK analogues du cofacteur (K_I déterminés à température ambiante et à pH 7,4 ou 7,6)

Inhibiteurs	K_I (mM)
1 	34
2 	4,3
3 	2,0
4 	1,4
5 	0,28
6 	$5,4 \cdot 10^{-3}$
7 	$1,3 \cdot 10^{-6}$

Pour mieux comprendre l'influence des cycles **A** et **B**, deux autres molécules ont été étudiées⁶⁵ : la néopyrithiamine (**2**) et l'oxythiamine (**4**) (Tableau I.3). Leurs constantes d'inhibition, respectivement de $1,4 \cdot 10^6$ et $4,3 \cdot 10^6$ nM, sont meilleures que celles de la thiamine. Ainsi l'introduction d'une modification sur le cycle aminopyrimidine (**4**) a un effet plus marqué pour l'inhibition qu'une modification sur le cycle thiazolium (**2**). Mais ces molécules sont de mauvais inhibiteurs par rapport au composé **6**.

Sur la base de ces travaux, une trentaine d'années plus tard la recherche de nouveaux inhibiteurs, analogues du ThDP de type aminopyridine, tel que le pyrophosphate de N3'-pyridyl-thiamine (**7**) (Tableau I.3) a été étudié avec la TK de *S. cerevisiae*⁶⁶. Cet

analogue interagit avec les mêmes acides aminés de l'enzyme que le ThDP, excepté la liaison entre le Glu418 et l'atome d'azote en position 1 du cycle aminopyrimidine du ThDP. Cet analogue est un très bon inhibiteur compétitif de la TK avec une constante d'inhibition de 1,3 nM.

Inhibiteur analogue du substrat donneur

L'hydroxyphénylpyruvate est un analogue de l'hydroxypyruvate (HPA), substrat donneur de la TK, car il présente un groupement hydroxyacétyle, et c'est aussi un métabolite cellulaire précurseur de la tyrosine (Figure I.13). Son rôle d'inhibiteur compétitif de la TK de *S. cerevisiae* a été étudié. Il conduit à une constante d'inhibition de 3,0 mM (à 25°C et à pH 7,6) proche de la constante de Michaelis (K_M) du D-F6P. Cette molécule pourrait intervenir dans la régulation de la biosynthèse de la tyrosine⁶⁷.

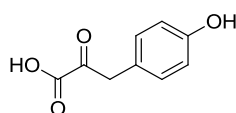


Figure I.13 : Structure du *p*-hydroxyphénylpyruvate

I.1.3.1. Inhibiteur de la TK d'*E. coli*

Le D-arabinose-5-phosphate (D-A5P) est un aldose qui a été envisagé comme inhibiteur de la TK d'*E. coli* en tant qu'analogue du substrat accepteur (Figure I.14). Dans le cas de la TK de *S. cerevisiae*, il est décrit comme substrat accepteur malgré sa configuration *R* au niveau du C₂. Cependant, il a été démontré qu'il agit comme un inhibiteur compétitif de la TK d'*E. coli* avec un K_i de 6 mM (à température ambiante et à pH 7,6)⁶.

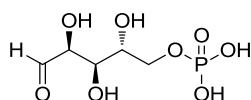


Figure I.14 : Structure du D-A5P

I.1.3.2. Inhibiteurs de la TK humaine

Ce domaine est largement exploré à l'heure actuelle en raison du rôle clé joué par la TK dans de nombreux cancers. Les stratégies consistent à réaliser des études de type structure-activité *in vitro* (en présence de l'enzyme isolée) et *in vivo* (en présence de cellules tumorales) en présence d'antagonistes, analogues du ThDP. Depuis peu, des études *in silico* sur des modèles de la TK humaine, en présence de bibliothèque de composés non antagonistes, permettent de mettre en évidence de nouvelles molécules ayant des activités inhibitrices.

Inhibiteurs analogues du ThDP

Une série d'analogues du ThDP a été élaborée dans le cadre d'études visant à inhiber la TK humaine impliquée dans certains cancers. Les molécules envisagées, diffèrent par la structure du cycle **A** et/ou du cycle **B** et/ou par l'absence ou la présence du groupement pyrophosphate. (Figure I.15).

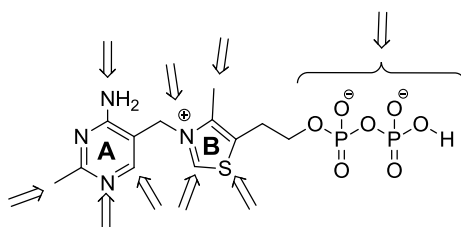


Figure I.15 : Modifications apportées aux éléments structuraux du ThDP

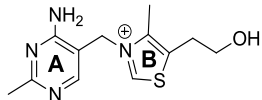
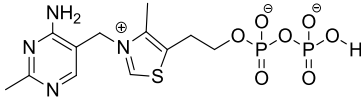
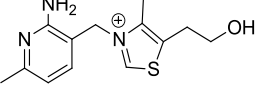
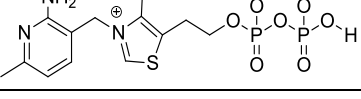
La stratégie qui a été publiée par les sociétés Array BioPharma Inc. et AVEO Pharmaceuticals Inc., repose sur l'élaboration de pro drogues, analogues du ThDP, comportant un alcool primaire libre sur la chaîne latérale du cycle **B** qui *in vivo* sera phosphorylé par la thiamine pyrophosphokinase (TPPK)^{68,69} par analogie avec le processus physiologique de phosphorylation de la thiamine en ThDP par la TPPK qui a lieu dans les cellules.

Pour détecter *in vitro* l'activité de la TK en présence de ces pro-drogues et déterminer les constantes d'inhibition (K_i), les auteurs de ces travaux ont conçu un test couplant la TPPK avec l'apo-TK. De plus, des études *in vivo* ont été réalisées sur des lignées cellulaires humaines de cancer du côlon (HCT-116). Ces dernières études ont permis d'obtenir les concentrations efficaces médianes (CE50) qui représentent la concentration plasmatique

nécessaire pour obtenir 50 % d'un effet maximal *in vivo*. Les valeurs des K_I et des CE50 sont indiquées dans le Tableau I.4 et le Tableau I.5.

Les premiers essais ont montré qu'en présence de l'apo-TK seule, le K_D de la thiamine (**1**) qui est non phosphorylée est bien supérieur à celui de son analogue phosphorylé le ThDP (**8**) montrant ainsi la nécessité de la phosphorylation de l'alcool primaire pour améliorer l'affinité⁶⁸ (Tableau I.4). La stratégie basée sur des pro-drogues non phosphorylées a été validée *in vitro* avec des analogues du ThDP, les composés (**9**) et (**7**), modifiés au niveau du cycle A. Lorsque l'apo-TK est couplée *in vitro* avec la TPPK, la valeur de K_I (22 nM) du composé non phosphorylé (**9**) est proche de celle obtenue avec ce même composé phosphorylé (**7**) en présence de l'apo-TK seule ($K_I = 33$ nM). Le composé (**7**) avait déjà été décrit comme meilleur inhibiteur de la TK de *S. cerevisiae* ($K_I = 1,3$ nM, page 10, Tableau I.1).

Tableau I.4 : Analogues de la thiamine et du ThDP modifiés au niveau du cycle A (K_D déterminés à température ambiante et à pH 8)

	Inhibiteurs	Apo-TK K_D (nM)	TPPK/apo-TK K_D (nM)
1		6,8.10 ⁶	-
8		170	-
9		-	22
7		33	-

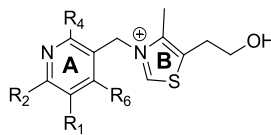
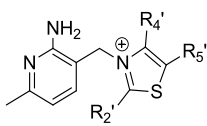
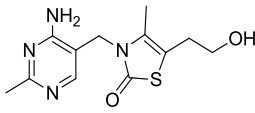
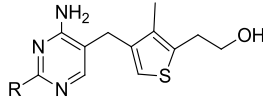
Selon cette stratégie, deux approches ont été menées en parallèle avec des composés dont le cycle B est chargé, de type thiazolium (séries **10** et **11**), ou non chargé, de type thiazolone (**12**) ou thiophène (**13**) (Tableau I.5).

Avec la série de composés chargés (**10**), il apparaît que la modification du cycle A permet de diminuer le K_D par rapport à celui du ThDP (170 nM). En effet, *in vitro* en présence du couple TPPK/apo-TK, le composé de la série **10** substitué en position R₄ du cycle A par un hydrogène donne le meilleur K_I (7,0 nM) mais celui-ci n'a pas l'effet attendu sur les

cellules HCT-116⁶⁸ (EC = 1600 nM) (Tableau I.5). En revanche, les meilleures CE50 avec cette série (CE50 = 8,3 - 9,0 nM) ont été observées avec les composés dont le R₄ est un groupe amino et R₂ est un groupe méthyl, éthyl, ou un atome de chlore.

L'étude a été complétée par une deuxième série d'analogues chargés (**11**) comportant un cycle A de type aminopyridine et un cycle B chargé modifié sur les trois positions 2', 4' et 5'⁶⁸ (Tableau I.5). Les K_i obtenus *in vitro* sont globalement inférieurs à ceux des composés (**10**) mais ne permettent pas d'obtenir des valeurs inférieures à 7 nM comme dans le cas précédent. En revanche, la protection de l'alcool primaire en position 5' par un acétate permet d'améliorer la CE50 (4,7 nM) par rapport à l'analogue libre (**9**) (CE50 = 26 nM). L'influence du groupement acétyle n'a pas été élucidée.

Tableau I.5 : Inhibiteurs de la TK humaine antagonistes du ThDP (K_D et déterminés à température ambiante et à pH 8)

Inhibiteurs	Apo-TK K _D (nM)	TPPK/apo- TK K _D (nM)	HCT-116 CE50 (nM)
<p>10 Composés chargés : Cycle A pyridine Cycle B thiazolium</p>  <p>R₁ : H, I, Me R₂ : Me, CF₃, H ... R₄ : NH₂, H R₆ : H, CF₃, Me, NH₂</p>	-	7,0 - 1460	8,3 - 38000
<p>11 Composés chargés : Cycle A aminopyridine Cycle B thiazolium</p>  <p>R₂' : H, Me, Et ... R₄' : Me, H, Et, CH₂OH R₅' : CH₂CH₂OH, CH₂CH₂OCOCH₃ ...</p>	-	25 - 120	4,7 - 25000
<p>12 Composés non chargés : Cycle A aminopyrimidine Cycle B thiazolone</p> 	170 - 3,4.10 ⁴	-	2,71.10 ³
<p>13 Composés non chargés: Cycle A aminopyrimidine Cycle B thiophène</p>  <p>R : H, Me, NH₂, CF₃, NHCOCH₃, <i>i</i>-propyl et <i>c</i>-propyl</p>	1,1.10 ³ - >500.10 ³	3,0 - 64	0,66.10 ³ - 52.10 ³

D'autres analogues comportant un cycle B non chargé ont été envisagés notamment le composé **12**, dans lequel le cycle B de type thiazolium est remplacé par un cycle à 5 chaînons de type thiazolone⁶⁹.

Enfin, une dernière série de composés non chargés (**13**) a été testée dans laquelle les cycles A et B sont modifiés respectivement par un cycle aminopyrimidine substitué en position 2, et par un noyau thiophène. Globalement, *in vitro* et *in vivo* les valeurs de K_i et les

CE50 sont meilleures que pour les autres séries. Le caractère hydrophobe du noyau thiophène pourrait expliquer ces résultats mais cette hypothèse nécessiterait des études plus précises.

En conclusion, *in vitro* les composés non chargés comportant un cycle thiophène (**13**) présentent les K_i les plus bas, et donc les plus fortes affinités pour la TK. *In vivo*, la série de composés (**11**) comportant un cycle aminopyridine (**A**), et chargés au niveau du cycle thiazolium (**B**), semblent être la plus prometteuse.

Autres inhibiteurs

Un criblage sans *a priori* d'une bibliothèque de 64320 composés a été effectué sur la TK humaine, sur deux lignées cellulaires de cancer du côlon et sur une lignée de carcinome pancréatique pour déterminer de nouveaux inhibiteurs de cette enzyme⁷⁰. Les concentrations inhibitrices médianes (CI50) ont été déterminées *in vitro*. Elles représentent la concentration de la molécule qui est requise *in vitro* pour une inhibition de 50 % de l'activité de l'enzyme. Les plus faibles CI50 (4,0 et 3,9 μM) sont obtenues respectivement avec les composés **15** et **16** (Tableau I.6). Le rôle des éléments structuraux de ces composés dans le processus d'inhibition de la TK n'a pas été étudié.

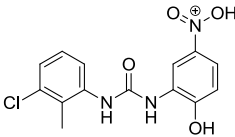
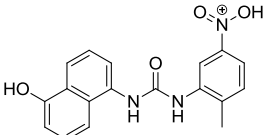
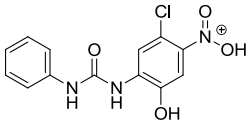
Tableau I.6 : Structures des deux composés les plus actifs après le criblage d'une bibliothèque de 64320 composés (CI50 déterminés à température ambiante et à pH 7,5)

Inhibiteurs	CI50 (μM)
15	4,0
16	3,9

Une autre stratégie basée cette fois sur un criblage virtuel de différents composés présentant une structure commune de type diphenyle urée a été réalisé avec le modèle de la TK humaine⁷¹. L'activité de ces composés est confirmée *in vitro* par l'inhibition de la TK et *in vivo* par l'inhibition de la croissance des cellules de deux lignées tumorales humaines de côlon. Les meilleurs candidats (**17**, **18**, **19**) conduisent *in vitro* à des CI50 de 100 à 200 μM (Tableau I.7). Les auteurs ont montré que ces composés interagissaient avec la séquence

Asp200-Gly201 de l'hélice alpha au niveau de la TK. Ceci contribuerait certainement à modifier le processus de dimérisation de l'enzyme.

Tableau I.7 : Activité des composés diphényles urées (CI50 déterminés à 37°C et à pH 7,6)

	Inhibiteurs	CI50 (μM)
<u>17</u>		200
<u>18</u>		150
<u>19</u>		100

I.1.3.3. Inhibiteurs de la TK de *P. falciparum*

Tout récemment, l'inhibition de la TK de *P. falciparum* a été envisagée en vue du traitement du paludisme. En effet, cette enzyme ayant peu d'homologie avec la TK humaine, la TK de *P. falciparum* peut donc être une cible pour la conception d'inhibiteurs spécifiques. Les stratégies développées consistent tout d'abord en des criblages *in silico* puis *in vitro* et *in vivo* en présence d'inhibiteurs potentiels de la TK de *P. falciparum*^{63,72}. Pour le criblage virtuel, un modèle de la structure de la TK de *P. falciparum* a été construit par homologie avec la TK de *S. cerevisiae* (la structure tridimensionnelle de la TK humaine n'étant pas connue au moment de cette étude). Ce modèle a permis de définir par « docking » les liaisons de l'enzyme avec le cofacteur (ThDP), avec le substrat (D-F6P) puis avec les inhibiteurs pour la recherche de nouveaux pharmacophores. Deux approches ont été envisagées, la première avec divers composés et la deuxième approche à partir de molécules développées pour la chimiothérapie du paludisme.

Une première étude repose sur le criblage *in silico* d'une bibliothèque de 5784 composés issus du « Central Drug Research Institute » (C.D.R.I.) de Lucknow en Inde⁶³. Les modèles obtenus par « docking » en présence du ThDP ou en présence du D-F6P ont été utilisés et ont permis de sélectionner respectivement huit et treize composés. Ces composés

ont été ensuite criblés *in vitro* et les pourcentages d'inhibition sont comparés avec ceux obtenus en présence de deux inhibiteurs témoin : le pyrophosphate d'oxythiamine **20** et l'hydroxyphénylpyruvate **21** qui ont montré au préalable des activités anti-paludiques *in vivo*.

Le composé **22** provenant du criblage *in silico* réalisé avec le modèle construit en présence du ThDP conduit à une concentration de 200 μM à une inhibition de 37 % de l'activité de la TK de *P. falciparum*, le composé **22** reste un moins bon inhibiteur que la molécule de référence **20** (inhibition de 74 % de l'activité de la TK de *P. falciparum* à la même concentration) (Tableau I.8).

Tableau I.8 : Inhibition de la TK de *P. falciparum* avec le modèle construit en présence de ThDP (% Inhibition déterminés à température ambiante et à pH 7,6)

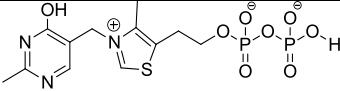
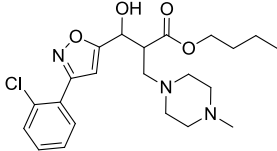
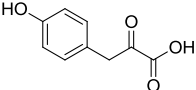
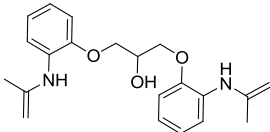
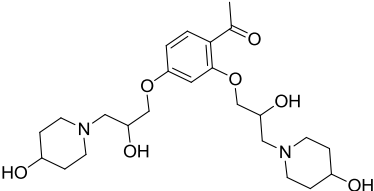
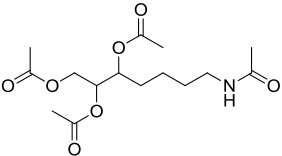
Inhibiteurs	Concentration (μM)	% Inhibition TK <i>P. falciparum</i>
<p>20</p> 	200	74
<p>22</p> 	200	37

Tableau I.9 : Inhibition de la TK de *P. falciparum* avec le modèle construit en présence de D-F6P (% Inhibition déterminés à température ambiante et à pH 7,6)

Inhibiteurs	Concentration (μM)	% Inhibition TK <i>P. falciparum</i>
<p>21</p> 	200	56
<p>23</p> 	200	45
<p>24</p> 	200	41
<p>25</p> 	200	34

De plus, trois composés **23**, **24** et **25**, provenant du criblage *in silico* réalisé avec le modèle construit en présence du D-F6P, ont conduit à une concentration de 200 μM à des inhibitions de 34 à 45 % de l'activité de la TK de *P. falciparum* inférieures là encore à celle obtenue avec le témoin, l'hydroxyphénylpyruvate **21** (Tableau I.9). Les études de « docking » ont permis aux auteurs de montrer que ces composés ont les mêmes sites d'interaction avec l'enzyme que le D-F6P, le substrat donneur physiologique.

Une deuxième étude a été effectuée par la même équipe⁷² à partir d'une bibliothèque de molécules déjà développée pour la chimiothérapie du paludisme. Après un criblage *in silico*, sept composés (de **26** à **32**) ont été sélectionnés pour le criblage *in vitro* (Tableau I.10). Tous les composés ont des CI50 de 72 à 85 μM et ils sont plus actifs que le témoin, l'hydroxyphénylpyruvate **21** (CI50 = 103 μM), ce qui en fait des candidats intéressants. Le rôle des éléments structuraux de ces composés dans le processus d'inhibition de la TK de *P. falciparum* n'a pas été encore étudié.

Tableau I.10 : Inhibition de la TK de *P. falciparum* (CI50 déterminés à température ambiante et à pH 7,6)

	Inhibiteurs		CI50 (μM) <i>in vitro</i>
	R ₁	R ₂	
26			75,0
27			76,7
28			80,2
29			74,5
30			76,4
31			72,7
32			85,5

En conclusion sur cette partie consacrée aux inhibiteurs de la TK, il apparait que pour toutes les sources de TKs envisagées actuellement dans la littérature, les analogues du ThDP sont de meilleurs inhibiteurs *in vitro* par rapport aux analogues de substrats et aux molécules non antagonistes. Cependant, les valeurs des constantes d'inhibition des analogues du ThDP obtenues en présence de cellules, principalement des cellules cancéreuses ne sont pas suffisantes pour envisager de les utiliser à des fins thérapeutiques. Les recherches doivent se poursuivre pour mieux comprendre les mécanismes d'inhibition au niveau cellulaire.

I.1.4. Tests permettant de déterminer l'activité de la TK

L'activité spécifique d'une enzyme est définie en $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ce qui correspond à la transformation d'une micromole de substrat par minute par milligramme d'enzyme. Les tests d'activité *in vitro* décrits dans la littérature sont basés sur des modes de détection spectrophotométrique⁷³⁻⁷⁸, fluorométrique^{70,79,80} ou ampérométrique⁸¹. Avec ces modes de détection, les substrats ou les produits de la réaction catalysée par la TK ne peuvent pas être détectés directement et nécessitent donc l'utilisation d'enzymes ou de réactifs auxiliaires. Ces tests d'activité sont effectués en présence de divers substrats donneurs physiologiques ou non, commerciaux ou spécialement synthétisés qui vont grâce à des réactions auxiliaires permettre de détecter l'activité de la TK. Les tests peuvent donc être classés en fonction de la nature du substrat donneur utilisé.

I.1.4.1. Tests *in vitro* en présence de substrats donneurs non modifiés

Tests spectrophotométriques

La méthode conventionnelle pour doser l'activité de la TK est l'utilisation des substrats naturels le D-X5P, substrat donneur et le D-R5P, substrat accepteur⁷³. Le D-G3P généré est converti en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) par la triose phosphate isomérase (TPI) (Figure I.16). Le DHAP est ensuite converti par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH) en D-glycérol-3-phosphate. La variation de la concentration en NADH peut être mesurée par spectrophotométrie à 340 nm ou le dosage par fluorimétrie (FLINT) avec une excitation à 330 nm et une émission à 450 nm. Cette stratégie a été utilisée pour le criblage *in vitro* d'inhibiteurs de la TK⁷⁰. Parmi tous les tests qui sont décrits dans la

littérature et présentés ici, ces deux stratégies sont les seules à être utilisées pour le criblage *in vitro* d'inhibiteurs de la TK.

Le D-X5P étant devenu commercialement indisponible, de nouveaux tests ont été développés. Ils mettent tous en jeu des déshydrogénases, et sont basés sur la production de D-X5P *in situ* ou l'utilisation d'autres substrats donneurs.

L'originalité de cette nouvelle approche, qui reprend le principe du test classique en présence du D-X5P comme donneur, repose sur l'utilisation de la xylulose-5-phosphate kinase recombinante de *S. cerevisiae*, clonée et exprimée dans *E. coli*. cette enzyme va générer *in situ* le D-X5P à partir du D-xylulose, en présence d'ATP⁷⁶ (Figure I.16, partie gauche).

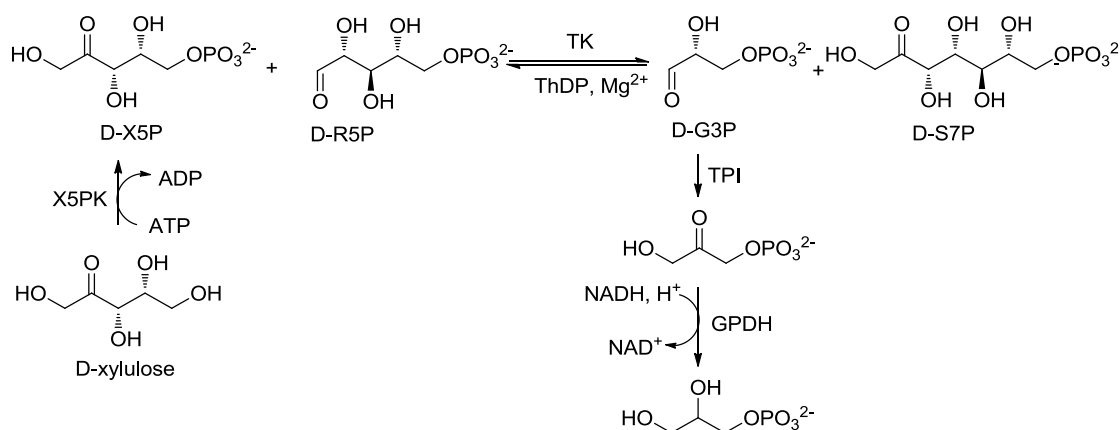


Figure I.16 : Test basé sur l'utilisation des substrats naturels

Un autre test repose sur l'utilisation du D-F6P comme substrat donneur et du D-G3P comme accepteur en présence de l'érythrose-4-phosphate déshydrogénase. La TK catalyse alors la formation du D-X5P et du D-E4P. La réaction est rendue irréversible par la conversion du D-E4P en D-érythronate-4-phosphate par l'érythrose-4-phosphate déshydrogénase en présence de NAD⁷⁵ (Figure I.17).

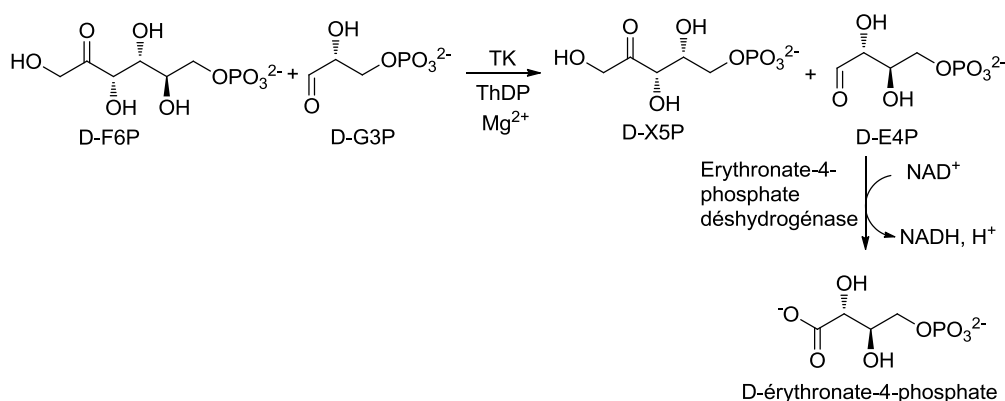


Figure I.17 : Test basé sur l'utilisation du D-F6P comme substrat donneur

Dans le test mis au point par le groupe du prof. L. Hecquet, le L-érythrulose (L-éry) remplace les substrats donneurs phosphorylés physiologiques des tests précédents. La réaction devient irréversible lorsque le glycolaldéhyde (GA) libéré est réduit par l'alcool déshydrogénase de *S. cerevisiae* (YADH, EC 1.1.1.1) en présence de NADH⁷⁴ (Figure I.18).

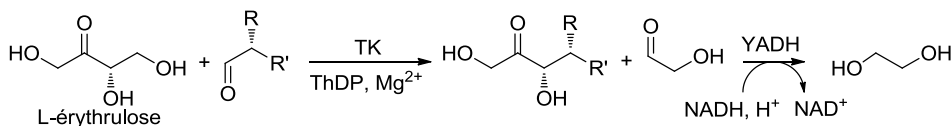


Figure I.18 : Test basé sur l'utilisation du L-érythrulose comme substrat donneur

Ces quatre tests sont basés sur l'utilisation d'oxydoréductases NADH-dépendantes ayant pour substrat l'aldéhyde α -hydroxylé formé. L'utilisation du NADH rend ces tests coûteux notamment si de nombreux échantillons sont à analyser. C'est le cas lors du criblage de banques d'inhibiteurs.

Tests colorimétriques

Un autre substrat donneur non physiologique a été envisagé, l'hydroxypyruvate. Ce substrat est commercial ou peut aussi être synthétisé facilement en une étape à partir du bromopyruvate. Ces tests ne font pas appel à des enzymes auxiliaires mais à des chromophores introduits dans le milieu réactionnel.

Test basé sur la formation du formazan. L'activité de la TK en présence de l'hydroxypyruvate (HPA) et de différents aldéhydes non α -hydroxylés a été déterminée par la formation du formazan (composé rouge) à partir d'un sel de tétrazolium (le chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium, incolore) (Figure I.19). Cette méthode repose sur l'utilisation d'un excès de tétrazolium et de soude en fin de réaction afin d'évaluer la quantité de cétose formée. Cette méthode est rapide, peu coûteuse et relativement sensible mais l'utilisation de ce test est limitée aux substrats accepteurs non hydroxylés en α et c'est un test discontinu⁷⁷.

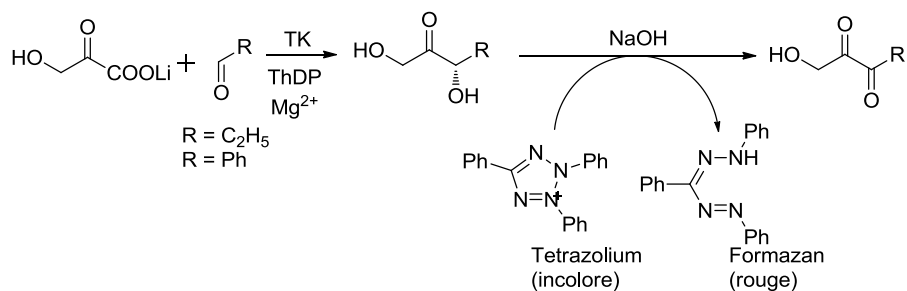


Figure I.19 : Test colorimétrique basé sur la formation du formazan

Test basé sur la variation du pH. Ce test développé par le groupe du prof. L. Hecquet est basé sur le suivi direct du pH avec comme indicateur colorimétrique le rouge de phénol. Cette méthode repose sur l'utilisation du Li-HPA comme substrat donneur. Celui-ci étant décarboxylé par la réaction catalysée par la TK. Les ions bicarbonates générés par la réaction entraînent une augmentation du pH du milieu réactionnel (Figure I.20). L'utilisation d'une faible concentration en tampon est nécessaire afin de ne pas masquer les variations de pH. La méthode est peu coûteuse, facile à mettre en œuvre et peut permettre la détermination des paramètres cinétiques. De plus, l'activité de la TK peut être évaluée avec un panel d'analogues de substrats accepteurs⁷⁸. Cependant, la détection de faibles activités reste délicate. Dans ce cas la variation de couleur est lente et nécessite quelques dizaines d'heures.

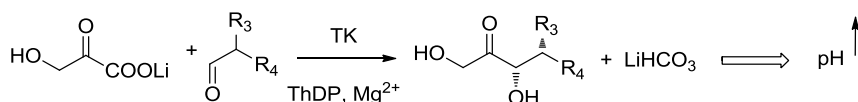


Figure I.20 : Test colorimétrique basé sur la variation du pH

I.1.4.2. Tests *in vitro* en présence de substrats donneurs modifiés

Ces tests développés par les équipes du Dr. C. Mousty et du Prof. L. Hecquet font appel à des substrats donneurs modifiés qui portent un motif reconnu par la TK et un groupement partant qui va générer un signal physique (fluorimétrique ou ampérométrique) permettant de détecter l'activité de la TK. Dans ces tests, une protéine auxiliaire, l'albumine de sérum bovin (BSA) catalyse la β -élimination du groupement partant.

Test fluorogénique

Une des méthodes les plus largement utilisées dans le cadre des dosages enzymatiques consiste à utiliser un substrat fluorogénique⁸². Un test stéréospécifique développé par le groupe du Prof. L. Hecquet repose sur l'utilisation d'un substrat modifié préalablement synthétisé comportant un motif reconnu par la TK (cétose *D-thréo*) sur lequel est greffé un groupement partant, l'umbelliférone, fluorescente lorsqu'elle est libre (Figure I.21). Celle-ci est libérée *via* une β -élimination catalysée par la BSA^{79,83,84}. Les principaux inconvénients de cette stratégie sont, d'une part, la faible activité du substrat fluorogénique vis-à-vis de la TK, due à l'encombrement du groupement partant, et d'autre part, l'étape catalysée par la BSA, qui est limitante⁸⁰.

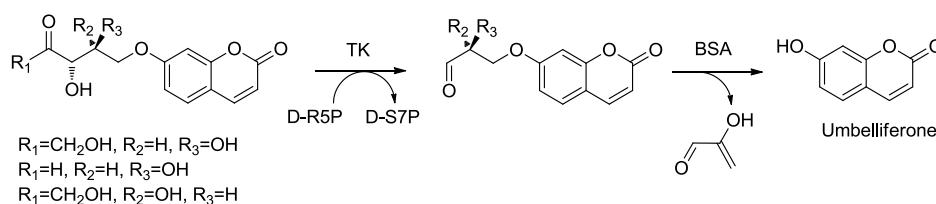


Figure I.21 : Test basé sur l'utilisation d'un substrat fluorogénique

Test ampérométrique

Selon la stratégie analogue à celle décrite ci-dessus, un autre substrat a été envisagé dans lequel l'umbelliférone est remplacée par l'ester éthylique de la *N*-acétyl-L-tyrosine (N-Ac-Tyr-OEt)⁸⁵. Le N-Ac-Tyr-OEt est détecté ampérométriquement par un biocapteur à polyphénol oxydase (PPO, EC 1.14.18.1). La PPO oxyde la N-Ac-Tyr-OEt en orthoquinone, puis la réduction de celle-ci est détectée à -0,2 V traduisant ainsi une activité de la TK en courant électrique mesurable⁸¹ (Figure I.22). Cette méthode développée conjointement par les groupes du Dr. C. Mousty et du Prof. L. Hecquet conduit à une détection du groupement partant N-Ac-Tyr-OEt de façon plus rapide (quelques secondes) que dans le cas de l'umbelliférone, ceci avec une très bonne sensibilité, due au mode de détection ampérométrique. Cependant, le précurseur de la N-Ac-Tyr-OEt n'est pas commercial et la stratégie de synthèse comporte de nombreuses étapes délicates à mettre en œuvre, ce qui ne permet pas d'obtenir des quantités importantes. De plus le substrat utilisé dans ce test n'est pas un meilleur substrat de la TK par rapport à l'analogue comportant l'umbelliférone.

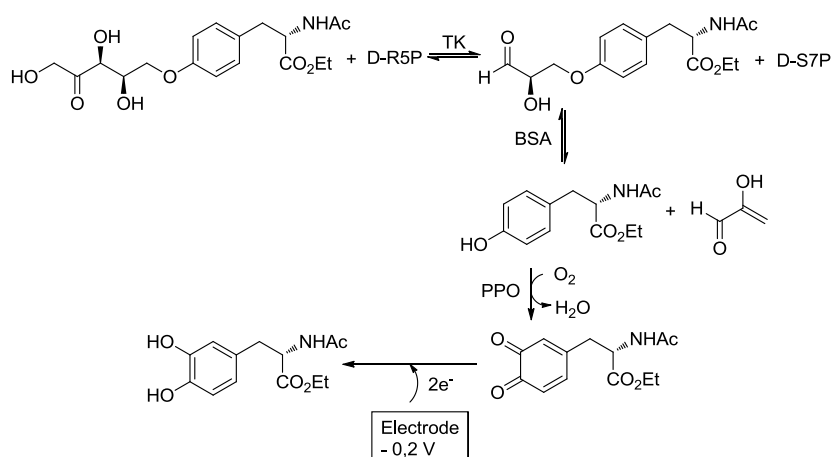


Figure I.22 : Test basé sur une détection ampérométrique

En résumé, de nombreux tests permettant de détecter l'activité de la TK *in vitro* ont été développés. Cependant aucun n'allie toutes les qualités requises pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons : rapide, sensible, peu coûteux, facile à mettre en œuvre et miniaturisable. Les méthodes ampérométriques *via* un biocapteur enzymatique étant très sensibles, rapides et miniaturisables pourraient être optimisées afin de détecter l'activité de la TK en présence de substrat donneur physiologique. Ces méthodes impliquent l'immobilisation d'enzymes à la surface du biocapteur. Le paragraphe suivant dresse un bilan des méthodes d'immobilisation.

I.2. Immobilisation d'enzymes

L'utilisation d'enzymes est de plus en plus fréquente dans les secteurs industriels. Cependant le coût de production des enzymes est souvent excessif et, de plus, les enzymes se dénaturent dans le temps. Il est donc essentiel de trouver des méthodes simples qui permettent de les réutiliser et les stabiliser. L'immobilisation dans des matrices permet la réutilisation de l'enzyme en la séparant du milieu réactionnel et peut conduire à la stabilisation de son activité. Les principes d'immobilisation des enzymes ont évolué et trois grandes étapes se sont succédé⁸⁶. La première a commencé au XIX^{ème} siècle, avec l'utilisation d'enzymes immobilisées pour le développement d'un filtre bactérien pour clarification des eaux usées. La deuxième étape, à partir des années 60, a permis de déterminer les bases des techniques d'immobilisation actuelles. Les années 70 marquent la troisième étape avec l'immobilisation de plusieurs enzymes couplées entre elles permettant le développement de réactions en cascade et incluant parfois la régénération des cofacteurs. Les applications visées touchent plusieurs disciplines, telles que l'industrie alimentaire, la chimie fine, le développement de biocapteurs ou de biopiles, la production de biodiesel... Dans les années 80, l'immobilisation de cellules entières (bactéries) a également été décrite avec des applications similaires à celles des enzymes isolées (bioréacteurs, biopiles). Le mode d'immobilisation développé doit être adapté aux applications visées.

Différents modes d'immobilisation sont rapportés dans la littérature, ils peuvent être divisés en trois catégories : l'immobilisation sur un support à deux dimensions, la réticulation chimique et l'encapsulation dans une matrice hôte. Ces différents modes d'immobilisation ont largement été décrits dans la littérature⁸⁷⁻⁸⁹ et je n'en ferai ici qu'une présentation succincte (Figure I.23). Certaines de ces méthodes d'immobilisation, notamment le greffage chimique, ont été appliquées à l'immobilisation de la TK. Cet aspect sera abordé dans le paragraphe I.2.3. Je m'attarderai d'avantage sur l'encapsulation des enzymes dans une matrice hôte, en particulier dans les Hydroxydes Doubles Lamellaires (HDL). En effet, cette méthode d'immobilisation fait partie intégrante de mon travail de thèse.

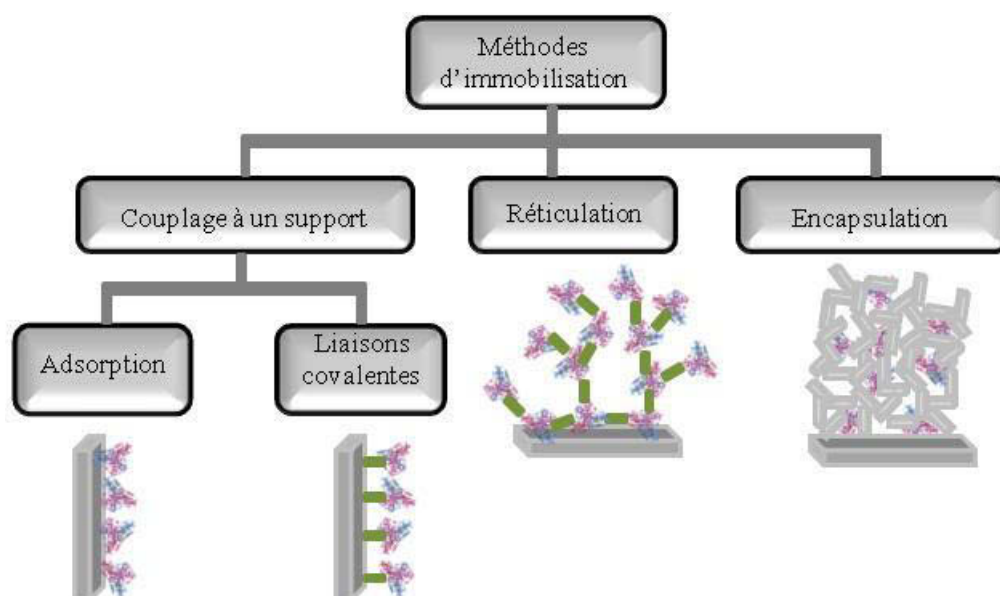


Figure I.23 : Les différentes méthodes d'immobilisation des enzymes

I.2.1. Modes d'immobilisation

I.2.1.1. Immobilisation sur un support à deux dimensions

Les interactions d'une enzyme avec une surface du type polymère, carbone, silice, peuvent être de différents types, comme par exemple la simple adsorption qui met en jeu des liaisons faibles du type Van der Waals, hydrophobes ou des liaisons hydrogènes et des liaisons ioniques. Cette méthode est la plus simple à mettre en œuvre, l'enzyme est en solution et le support est placé en contact avec celle-ci et l'adsorption se produit de façon spontanée. Avec cette technique, l'activité enzymatique n'est généralement pas détruite et le support n'a pas besoin d'être fonctionnalisé. Cependant les liaisons sont généralement trop faibles pour conserver l'enzyme fixée au support pendant son utilisation surtout avec des conditions industrielles drastiques. En effet, leur désorption peut se produire suite à des changements de température, de pH et de force ionique du milieu.

Le greffage covalent est réalisé par la formation de liaisons fortes entre l'espèce biologique et la surface du support en présence des groupements fonctionnels, tels que les groupements carboxylique (-COOH), amine (-NH₂), hydroxyle (-OH) ou thiol (-SH), situés à la surface du solide. Ces groupements doivent être activés avant leurs interactions avec l'espèce biologique. Les principaux agents d'activation sont les carbodi-imides (-N=C=N-) et le bromure de cyanogène (CNBr). Cette technique d'immobilisation permet d'obtenir des liaisons stables pouvant parfois dénaturer la biomolécule. Une autre contrainte de cette

méthode est de trouver une surface de solide facilement fonctionnalisable. Ainsi, des résines échangeuses d'ions tel que l'Amberlite[®] qui a une grande surface spécifique permet l'adsorption d'enzyme mais pas la création de liaisons covalentes avec l'enzyme. Celle-ci peut donc être facilement désorbée du support. Pour éviter ce désagrément, l'Eupergit-C[®], une résine fonctionnalisée en surface, permet la formation de liaisons covalentes avec l'enzyme.

Enfin, l'immobilisation par affinité consiste en la création de liaisons entre un support activé par un groupement fonctionnel qui permet une interaction spécifique avec un groupement de l'enzyme. Citons par exemple les interactions entre des enzymes ayant une étiquette histidine et le complexe nickel-acide nitrilotriacétique (Ni-NTA). Une autre alternative consiste à marquer l'enzyme avec un motif biotine ou avidine qui interagit avec le motif complémentaire fixé sur le support. En raison des fortes interactions affines entre la biotine et l'avidine, la fixation de l'enzyme sur le support fonctionnalisé se fait spontanément par simple immersion de la surface dans une solution aqueuse d'enzyme marquée.

La quantité d'enzyme immobilisée par ces méthodes est généralement limitée par des problèmes d'encombrement stériques sur la surface.

I.2.1.2. Immobilisation d'enzymes par réticulation

Il y a un accroissement d'intérêt pour l'immobilisation par réticulation d'enzymes car cette méthode permet de s'affranchir d'un support et offre de nets avantages : une forte activité enzymatique, une grande stabilité et un coût de production faible. La réticulation des agrégats d'enzymes réticulées (CLEAs)⁹⁰ ou des cristaux d'enzymes réticulées (CLECs)⁹¹ avec un réactif bifonctionnel généralement par glutaraldéhyde est utilisée pour préparer des macroparticules enzymatiques. Ces dernières sont robustes et la taille des particules est contrôlable. Les CLEAs sont quant à eux préparés par précipitation. Cette technique est simple à mettre en œuvre, peu coûteuse et c'est une alternative à la cristallisation.

I.2.1.3. Immobilisation par encapsulation

Cette méthode consiste à incorporer l'enzyme dans une matrice hôte à trois dimensions. Les interactions entre l'enzyme et la matrice hôte sont identiques à celles décrites pour les surfaces 2D, mais contrairement à celle-ci, cette méthode permet d'immobiliser une plus grande quantité d'enzymes. Cependant, la matrice d'immobilisation doit être suffisamment poreuse pour permettre la diffusion des espèces (substrats et produits de la

réaction enzymatique) tout en évitant le relargage de la biomolécule. Outre les interactions électrostatiques, l'immobilisation de l'enzyme dans la matrice hôte peut être stabilisée par une réticulation chimique avec le glutaraldéhyde ou par des liaisons covalentes, par exemple. La matrice hôte est choisie pour protéger l'enzyme de l'environnement en minimisant par exemple les effets des solvants hydrophobes. Cette méthode permet aussi l'immobilisation simultanée de l'enzyme et d'autres molécules telles que les cofacteurs ou des médiateurs redox.

Les matrices hôtes utilisées sont des polymères organiques synthétiques comme le polypyrrole, la polyaniline. Des polymères naturels sont également utilisés pour l'immobilisation d'enzymes, principalement des polysaccharides insolubles dans l'eau, comme l'alginate, le chitosan, le carraghénane, mais aussi la cellulose qui est le polymère naturel le plus abondant, l'agarose, l'amidon, la pectine et la sépharose. Les protéines les plus exploitées sont le collagène, la gélatine et l'albumine.

Des matériaux inorganiques sont également utilisés pour l'immobilisation d'enzyme tels que les matériaux amorphes siliciés préparés par voie sol-gel, des zéolithes qui sont des solides tridimensionnels microporeux, des matériaux lamellaires comme les argiles cationiques et les hydroxydes doubles lamellaires.

I.2.2. Immobilisation d'enzymes dans les Hydroxydes Doubles Lamellaires (HDL)

Les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) appelés aussi argiles anioniques sont en majorité des matériaux synthétiques constitués de plaquettes hexagonales. Dans la nature on trouve toutefois les hydrotalcites ayant une composition chimique : $Mg_6Al_2(OH)_6CO_3 \cdot 4H_2O$.

Les feuillets des HDL sont constitués de cations métalliques entourés de six atomes d'oxygène des groupes hydroxyles et forment des octaèdres $M(OH)_6$. Ces derniers s'assemblent par leurs arêtes de façon co-planaire et constituent alors un feuillet plan. La substitution d'une partie des cations divalents (Mg, Zn, Ca, Co, Ni...) par des cations trivalents (Al, Cr, Fe...) génère une charge positive variable du feuillet. Pour permettre l'électroneutralité de l'édifice des anions, $(NO_3^-, Cl^-, CO_3^{2-} \dots)$ s'insèrent entre les feuillets, Des molécules d'eau complètent l'édifice. Ces composés sont définis par la formule générale : $[M^{II}_{1-x} M^{III}_x (OH)_2]^{x+} [X^{m-}_{x/m} \cdot nH_2O]^{x-}$ où M^{II} et M^{III} sont les cations divalents et trivalents respectivement et X l'anion intercalé (Figure I.24). Les HDL ont des propriétés physico-chimiques et morphologiques modulables. Leur diversité dépend de la nature des cations

métalliques divalents et trivalents constituant les feuillets, de leur rapport, des conditions de précipitation, ainsi que de la nature de l'anion intercalé. En comparaison avec les argiles cationiques, les HDL ne présentent pas de propriétés de gonflement et ont une densité de charge plus importante. Leur capacité d'échange anionique (CEA), qui dépend de la valeur de x dans la formule, est comprise entre 200 et 400 meq/100 g.

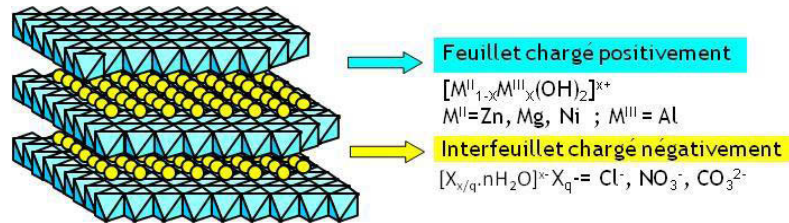
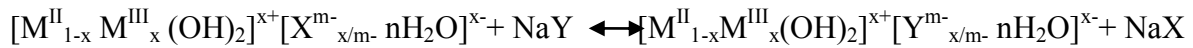


Figure I.24 : Représentation schématique des HDL

Une réaction d'échange anionique permet de remplacer l'anion intercalé par un autre anion, le choix de l'HDL précurseur joue donc un rôle important. La réaction d'échange peut être résumée par l'équation suivante :



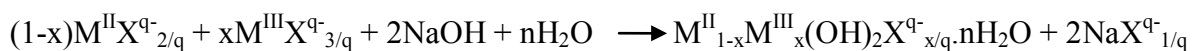
L'échange est favorisé pour un anion ayant une forte affinité pour le feuillet HDL. L'affinité des anions pour les HDL dépend de leurs densité de charge, plus elle est élevée, plus sa stabilité dans l'espace interlamellaire est importante. Des listes d'affinité décroissante pour l'HDL ont été établies⁹² pour les anions monovalent : $OH^- > F^- > Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^-$ et les anions divalents : $CO_3^{2-} > C_{10}H_4N_2O_8S^{2-} > SO_4^{2-}$. Ces résultats confirment la forte affinité des anions carbonates.

Les matériaux HDL peuvent être également délaminés sous certaines conditions⁹³. Les plaquettes d'HDL exfoliées peuvent être ré-empilées en présence d'anions à intercaler. Il est à noter qu'une très grande variété d'anions plus ou moins volumineux peut ainsi être intercalée dans l'espace interlamellaire des HDL, comme des polymères⁹⁴⁻⁹⁶, des porphyrines⁹⁷, des molécules organiques électroactives^{98,99}, des médicaments¹⁰⁰, des acides aminés¹⁰¹, des brins d'ADN¹⁰²...

I.2.2.1. Préparation des HDL

Différentes voies de synthèses sont décrites dans la littérature^{103,104}. Elles font appel pour la plupart à des procédés de chimie douce, ce qui va permettre la synthèse des HDL en présence d'enzymes, comme nous le verrons par la suite.

La méthode de coprécipitation est une des voies les plus utilisées pour préparer des HDL (Figure I.25). La coprécipitation à pH constant est recommandée pour favoriser l'obtention de phases chimiquement homogènes, c'est à dire dont la composition globale du précipité correspond à celle attendue et ne contient pas de phases secondaires. Le pH est donc maintenu constant pendant la réaction par l'addition simultanée d'une solution basique (NaOH, KOH, NH₄OH, Na₂CO₃) et d'une solution de sels de M^{II} et M^{III}. La réaction qui se produit est la suivante :



Le choix de la valeur du pH dépend de la nature des cations métalliques utilisés. Cette méthode permet aussi de choisir la nature de l'anion à intercaler lors de la formation du matériau (chlorure, nitrate, carbonate). D'autres paramètres peuvent influencer les propriétés morphologiques des HDL tels que la température, le pH, la vitesse d'ajout des sels et l'agitation. L'utilisation d'une base retard telle que l'urée comme agent de précipitation permet d'empêcher l'agrégation des particules et conduit à l'obtention de très grandes particules monodispersées (0,5 à 20 μm). Un traitement par microonde pendant la synthèse va accélérer les étapes de croissance et d'agrégation. En général, la surface spécifique et la porosité sont augmentées avec le temps de traitement. La cristallinité du matériau peut être aussi améliorée sous ultrasons. Des traitements hydrothermaux sont également utilisés pour améliorer la cristallinité et augmenter le taux d'échange anionique vis-à-vis d'anions ayant une faible affinité.

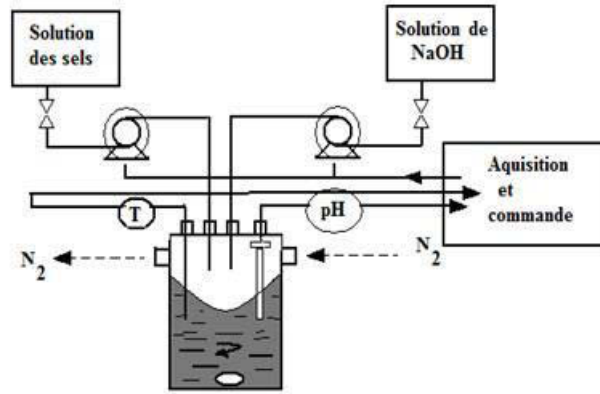


Figure I.25 : Dispositif expérimental de la synthèse des HDL par coprécipitation

La méthode calcination/reconstruction est liée à la propriété unique d'effet mémoire structurale. La méthode consiste à calciner un HDL contenant un anion volatil pour obtenir des oxydes métalliques mixtes amorphes. Ensuite une étape de réhydratation / reconstruction du matériau HDL dans une solution aqueuse contenant l'anion à intercaler, est effectuée.

I.2.2.2. Immobilisation d'enzymes dans les HDL

Les HDL apparaissent comme des matériaux uniques pour l'immobilisation d'enzymes. En effet, les enzymes présentent dans la majorité des cas des points isoélectriques bas et donc des charges de surfaces globalement négatives à leur pH optimum en général voisin de 7, ce qui va être favorable aux interactions avec les feuillets d'HDL, chargés positivement. De plus, ces matériaux sont fortement hydratés, ce qui procure un environnement très favorable, notamment pour les enzymes. Différentes méthodes ont été développées pour la préparation des matériaux biohybrides enzyme@HDL. La plupart de ces méthodes de préparation est effectuée dans des conditions douces (pression, pH, température...) pour conserver les propriétés structurales et biologiques de l'enzyme. Comme décrit par Mousty *et al*, deux stratégies sont développées : d'une part l'immobilisation de l'enzyme sur le matériau HDL déjà formé et d'autre part la formation du matériau en présence de l'enzyme^{105,106}. Des études structurales par diffraction des rayons X ont montré que quelle que soit la méthode utilisée, l'immobilisation des enzymes dans les phases HDL ne modifie pas la distance interlamellaire mais provoque une désorganisation de la structure d'empilement des feuillets. Ce qui signifie que les enzymes ne sont pas intercalées entre les feuillets mais que des amas de feuillets s'organisent autour de l'enzyme (Figure I.26).

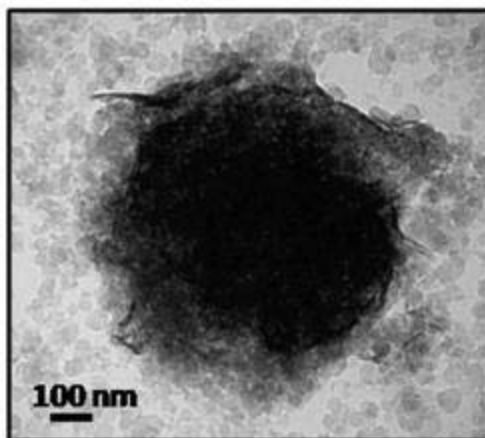


Figure I.26 : Image par microscopie électronique à transmission du biohybride HDL@hémoglobine¹⁰⁷ (au centre de l'image : agrégat de protéines recouvert de petites plaquettes hexagonales d'HDL)

Immobilisation de l'enzyme sur le matériau HDL déjà formé

Cette méthode est basée sur l'interaction de l'enzyme avec le matériau HDL (Figure I.27, dans ce schéma la taille respective des objets n'est pas respectée).

L'immobilisation par adsorption de l'enzyme à la surface des plaquettes d'HDL est le procédé le plus étudié. De fait, de nombreuses enzymes (la glucose oxydase^{108,109}, la peroxydase de raifort¹¹⁰⁻¹¹², la polyphénol oxydase^{113,114}, l'uréase¹¹⁵...) et protéines (l'hémoglobine^{107,116}...) ont été adsorbées sur les HDL. Des études par diffraction de rayons X (DRX) ont montré, qu'après immobilisation de la protéine, la structure du matériau n'est pas modifiée. Pendant l'adsorption, le paramètre crucial est le pH. Une forte capacité d'adsorption est généralement obtenue à des valeurs de pH supérieures au point isoélectrique de l'enzyme, en raison des interactions électrostatiques favorables entre l'enzyme et les feuillettes chargées positivement de l'HDL. De plus, la nature des cations métalliques des feuillettes de l'HDL conduisant à un pH de surface, le rapport entre les cations divalents et trivalents déterminant une densité de charge et la nature de l'anion interlamellaire jouent un rôle dans les propriétés d'adsorption de l'enzyme. L'aggrégation, la taille et la cristallinité des particules qui sont différentes selon le mode de préparation et de stockage ont également un effet sur le rendement d'adsorption. Habituellement, après immobilisation, la désorption de l'enzyme n'est pas observée, traduisant des paramètres thermodynamiques très favorables au phénomène d'adsorption. La désorption peut être plus prononcée lors de la conservation du biohybride dans des milieux tamponnés. En effet, les molécules constituant le tampon peuvent rentrer en compétition avec l'enzyme.

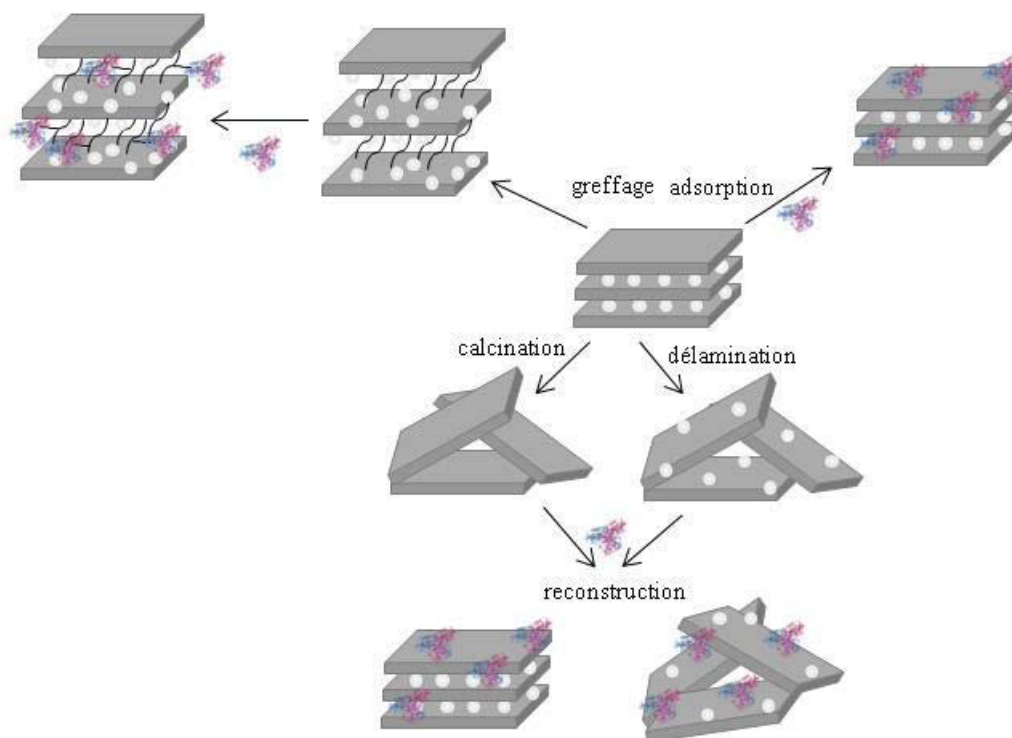


Figure I.27 : Méthodes d'immobilisation des enzymes dans les HDL préformés

La reconstruction à partir de phases HDL délaménées ou calcinées sont des méthodes de préparation des HDL qui ont été décrites pour l'immobilisation d'enzymes telles que l'uréase^{117,118}, la peroxydase de raifort¹¹¹ et la glucose oxydase¹¹⁹. Après délamination des HDL, l'auto-assemblage du biohybride s'effectue en présence d'enzymes qui sont piégées lors du réempilement lamellaire. Après calcination des HDL, la reconstruction s'effectue par simple réhydratation des oxydes métalliques mixtes en présence d'enzymes. En parallèle, l'assemblage couche par couche de nanofeuillets d'HDL en présence de deux protéines différentes l'hémoglobine et la peroxydase de raifort a été également réalisé sur une électrode en oxyde d'indium-étain¹²⁰. Dans ce cas unique, des biohybrides ont été élaborés en films minces et les analyses par DRX ont montré une intercalation des protéines entre les feuillets.

Le greffage par liaisons covalentes a également été testé. La pénicilline G-amidase¹²¹ et la glucose oxydase¹²² ont été immobilisées selon cette méthode en trois étapes. La première étape consiste dans l'intercalation du glutamate dans l'HDL, ensuite les amines libres réagissent avec le glutaraldéhyde. Et la dernière étape est la formation de la liaison covalente entre les fonctions amine de l'enzyme et les aldéhydes intercalés dans l'HDL. L'immobilisation de l'anhydrase carbonique¹²³ quant à elle est effectuée sur des HDL/hydrogel activé par le N-hydroxysuccinimide. Dans ce cas, l'activité enzymatique est largement diminuée, cela pourrait provenir d'une dénaturation partielle du site actif.

Formation du matériau HDL en présence de l'enzyme

La deuxième stratégie développée est l'encapsulation des enzymes dans les HDL lors de leur préparation. Au laboratoire, la méthode de coprécipitation à pH constant a été adaptée à des petites quantités de solution d'enzyme (5-10 mL). Selon la nature des cations métalliques, la coprécipitation des HDL peut s'effectuer dans une grande gamme de pH, ce qui permet l'immobilisation d'une grande variété d'enzymes (l'uréase¹¹⁸, la phosphatase alcaline¹²⁴, la fructose-6-phosphate aldolase¹²⁵...) et de protéines (l'hémoglobine¹⁰⁷...) ayant des points isoélectriques différents. Pendant la préparation du biohybride le processus de nucléation et de croissance des cristaux et l'agrégation des particules inorganiques sont modifiés par la présence de l'enzyme. Selon la nature de l'enzyme et de l'HDL, le taux d'immobilisation et la conservation de l'activité enzymatique varient. En comparaison avec l'adsorption, les biohybrides enzyme@HDL préparés par coprécipitation sont obtenus en une seule étape, ils sont généralement stables dans le temps et peuvent être stockés sous forme de poudre lyophilisée, ou en suspension dans une solution aqueuse.

I.2.3. Immobilisation de la TK sur divers supports

L'immobilisation de la TK a été très peu rapportée dans la littérature¹²⁶⁻¹³³. Quelques articles décrivent son immobilisation sur des supports polymériques. D'autre part, récemment au laboratoire, nous avons immobilisé pour la première fois avec succès la TK sur un support inorganique, à savoir les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) par adsorption et par encapsulation¹³³.

I.2.3.1. Greffage de la TK sur des polymères

Les premiers travaux ont été décrits avec la TK de *S. cerevisiae* en 1978. La TK a été immobilisée par des liaisons covalentes sur un support organique naturel : le gel de Sepharose activé par le bromure de cyanogène (CNBr)¹²⁶. L'activité spécifique de l'enzyme immobilisée correspond à 70 % de l'activité initiale.

La TK a ensuite été immobilisée par des liaisons covalentes sur des support synthétiques, les résines acryliques : l'Eupergit-C[®] et l'Amberlite[®] XAD-7^{127,128}. Ces résines ont été choisies pour leur faible coût et leur stabilité. Les billes d'Eupergit-C sont fonctionnalisées en surface par l'addition d'un groupe oxirane. L'Amberlite[®] XAD-7, quant à

elle est activée par le glutaraldéhyde. Les procédés d'immobilisation sur ces deux résines permettent de limiter l'inactivation de la TK due à la formation de bases de Schiff entre les acides aminés à la surface de la TK et son substrat aldéhydique, le glycolaldéhyde (GA). La formation de bases de Schiff peut entraîner un changement de la structure tridimensionnelle de l'enzyme et peut donc l'inactiver de façon irréversible. Il semblerait que l'immobilisation réduise significativement cette interaction et rigidifie la structure de la protéine.

La TK a aussi été immobilisée par des liaisons covalentes sur des billes de nylon en utilisant un carbodi-imide (-N=C=N-), le 1,3-dicyclohexylcarbodi-imide comme agent d'activation des groupements carboxyliques de la surface¹²⁹. Dans ce cas 85 % de l'activité est retrouvée après immobilisation.

Plus récemment, l'immobilisation réversible de la TK portant une étiquette 6-Histidine a été effectuée par création de liaisons de coordination avec le complexe Ni-NTA, situé sur une surface de capillaire en silice fondue. L'immobilisation de la TK conduit à la formation d'une simple couche à la surface. L'application visée est le développement de microréacteurs enzymatiques^{130,131}. Cette méthode d'immobilisation permettrait d'offrir une plus grande facilité d'utilisation en vue d'applications en synthèse, un faible coût, et une réutilisation du microréacteur.

En 1986, la TK a été également immobilisée de façon covalente par encapsulation dans des gels de polyacrylamide¹³². Lors de l'immobilisation, la présence du substrat est nécessaire pour protéger le site actif de l'enzyme. Après immobilisation, seulement 60 % de l'activité est retrouvée, mais l'enzyme est stable et ne montre aucune perte d'activité sur une période de neuf mois.

I.2.3.2. Immobilisation de la TK sur les HDL

Un extrait brut de TK de *S. cerevisiae* a été immobilisé par adsorption sur les HDL de type Mg₂Al-NO₃ et Zn₂Al-NO₃ avec un taux d'immobilisation de 95 et 98 % respectivement. Pour le meilleur rapport TK/HDL = 0,38, 100 % de l'activité de l'enzyme est retrouvé par rapport à l'enzyme libre. Le biohybride ainsi obtenu a été utilisé en biocatalyse dans une réaction modèle. Les taux de conversion des substrats sont similaires à ceux obtenus avec l'enzyme libre. La réutilisation du biohybride a été étudiée mais après six cycles d'utilisation successifs une perte de 80 % d'activité est observée qui peut être imputée à la désorption de l'enzyme. De plus, l'enzyme immobilisée peut être stockée sous forme de poudre lyophilisée, l'étude de la stabilité de l'enzyme montre une perte de 15 % d'activité au bout de trois mois.

Les équipes SEESIB et MI ont aussi immobilisées l'extrait brut de TK de *S. cerevisiae* par encapsulation dans les HDL Mg_2Al-NO_3 et Zn_2Al-NO_3 par la méthode de coprécipitation en présence d'enzyme. Le taux d'immobilisation est respectivement de 96 et 97 %, ce qui est comparable à l'adsorption. De même, il est retrouvé 97 et 100 % d'activité par rapport à l'enzyme libre. Par contre, lors de l'utilisation en biocatalyse, il a été observé une stabilité de l'activité du biohybride sur six cycles. L'étude de stabilité dans le temps a également été effectuée pour ce mode d'immobilisation. Il a été observé seulement 8 % de perte d'activité sur trois mois.

En conclusion, par comparaison avec les autres supports de nature organique étudié pour l'immobilisation de la TK, les HDL (support inorganique) conduisent à un meilleur taux d'immobilisation de l'enzyme, sans perte d'activité lors de l'immobilisation, et au cours du temps, lors de son utilisation.

I.3. Les biocapteurs ampérométriques

I.3.1. Généralités sur les biocapteurs

D'après l'IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) un biocapteur est un dispositif intégré capable de fournir des informations spécifiques quantitatives ou semi-quantitatives grâce à un élément de reconnaissance d'origine biologique en contact direct avec un élément de transduction. Ainsi, un biocapteur est constitué de macromolécules biologiques (enzyme, anticorps...), appelées aussi biorécepteur, immobilisées à la surface d'un transducteur qui convertit le signal de reconnaissance biologique d'une substance cible en un signal électrique mesurable après amplification (Figure I.28)¹³⁴.

Le premier biocapteur a été développé dans les années 60 par Clark et Lyons pour le dosage du glucose par une électrode à glucose oxydase¹³⁵. Depuis la recherche sur les biocapteurs a connu un essor important dans le domaine médical, environnemental et agroalimentaire.

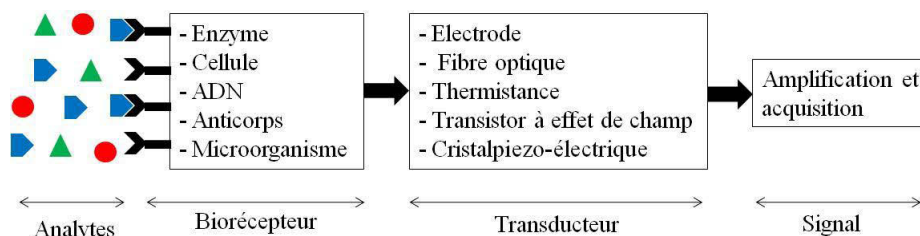


Figure I.28 : Principe de fonctionnement d'un biocapteur

I.3.1.1. Les biorécepteurs

Les biorécepteurs permettent la reconnaissance biologique d'une espèce à identifier et/ou à quantifier. Les avantages d'utiliser un biorécepteur par rapport à un récepteur chimique sont la sélectivité et la sensibilité. Les biomolécules utilisées peuvent être des enzymes, des brins d'acides désoxyribonucléiques (ADN), des anticorps ou des microorganismes. Les brins d'ADN et les anticorps permettent une reconnaissance par une interaction spécifique avec des structures complémentaires cibles telles que les antigènes. La détection nécessite en général un marquage d'une biomolécule. Les enzymes ou les microorganismes vont catalyser des réactions de biotransformation spécifiques des molécules à doser. Les biocapteurs les plus utilisés sont de types enzymatiques. En effet, une large gamme d'enzymes est commercialisée et leurs lots sont reproductibles. Les enzymes peuvent

être immobilisées à la surface du transducteur selon les différents modes d'immobilisation décrits précédemment.

I.3.1.2. Les transducteurs

Le transducteur est un système physique qui convertit en un signal électrique la modification biochimique survenue au niveau du biorécepteur. Le transducteur est choisi en fonction de la modification biochimique. Les plus courants sont de type électrochimique où le transducteur est une électrode, mais d'autres modes de détection existent : les transducteurs optiques, thermiques et piézo-électriques.

Les transducteurs électrochimiques peuvent être divisés en trois catégories selon la mesure effectuée :

- Les biocapteurs potentiométriques reposent sur la mesure de la différence de potentiel entre le transducteur et une électrode de référence. Ces transducteurs sont soit des électrodes sélectives à ions (ISE) ou des transistors à effet de champ (FET-Field-Effect Transistor). En milieu aqueux, les électrodes de références les plus utilisées sont l'électrode au calomel saturé (ECS) ou l'électrode argent/chlorure argent (Ag/AgCl).

- Les biocapteurs conductimétriques sont basés sur la mesure de variation de concentration en espèces chargées générées au cours des bio-réactions.

- Les biocapteurs ampérométriques reposent sur la mesure de l'intensité de courant obtenu lors d'une réaction d'oxydoréduction se produisant à un potentiel donné. Le courant enregistré est proportionnel à la concentration de l'espèce électro-active générée au cours d'une réaction enzymatique, par exemple. Les biocapteurs ampérométriques impliquant des enzymes du type oxydoréductase comme par exemple la glucose oxydase (GOx), sont répartis en trois générations selon les réactions électro-enzymatiques se produisant à la surface de l'électrode (Figure I.29)¹³⁶.

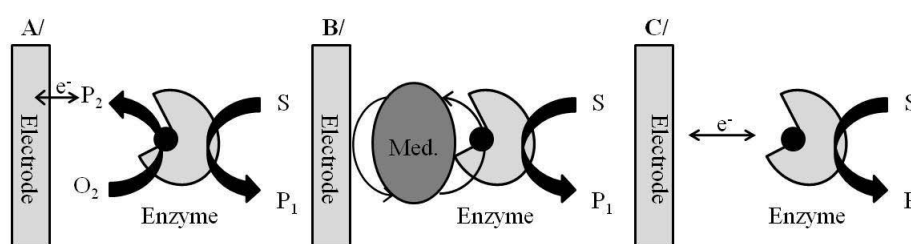


Figure I.29 : Les trois générations de biocapteurs ampérométriques A/ 1^{ère} génération, B/ 2^{ème} génération et C/ 3^{ème} génération (Med. : médiateur redox)

D'une manière générale avec les biocapteurs ampérométriques de première génération, l'espèce enzymatiquement générée (P_2) est directement oxydée ou réduite à la surface de l'électrode. Les biocapteurs ampérométriques de deuxième génération utilisent des médiateurs rédox. Ces médiateurs rédox transportent les électrons entre l'électrode et le centre rédox de l'enzyme, pour permettre la régénération du cofacteur enzymatique (comme la flavine adénine dinucléotide (FAD) pour la GOx). Ils ont été développés pour abaisser le potentiel de détection à l'électrode et réduire ainsi les phénomènes d'interférences. Enfin, les biocapteurs ampérométriques de troisième génération, plus rares, mettent en jeu le transfert direct des électrons entre l'électrode et le site actif de l'enzyme.

Un biocapteur est défini généralement par sa sensibilité, sa gamme dynamique de concentration, sa limite de détection et son temps de réponse. La sensibilité correspond à la pente de la partie linéaire de la droite d'étalonnage. Pour un biocapteur ampérométrique elle s'exprime en $\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$. La limite de détection est généralement définie comme étant la valeur de la concentration correspondant à un signal égal à trois fois le bruit de fond.

Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons plus particulièrement à deux types de biocapteurs ampérométriques qui seront utilisés dans le cadre de mes travaux de thèse, les biocapteurs à polyphénol oxydase (PPO) et à galactose oxydase (GAOx). En effet comme nous l'avons décrit précédemment, un biocapteur à PPO a déjà été utilisé par les équipes MI et SEESIB, pour détecter l'activité de la TK libre en solution⁸¹. Dans ce travail nous allons proposer une alternative à ce biocapteur en utilisant la galactose oxydase.

I.3.2. Biocapteurs ampérométriques à polyphénol oxydase

La polyphénol oxydase (PPO, EC 1.14.18.1) est une enzyme contenant du cuivre. Elle catalyse l'hydroxylation et l'oxydation des mono-phénols et l'oxydation des *o*-diphénols en *o*-quinones. Les quinones formées peuvent être réduites électrochimiquement en substrat phénolique à un potentiel faiblement négatif (-0.2 V/Ag-AgCl) (Figure I.30).

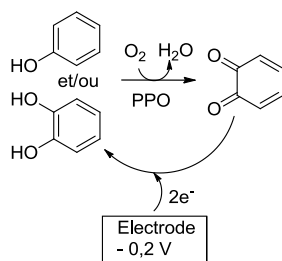


Figure I.30 : Principe d'un biocapteur ampérométrique à PPO

Différentes méthodes d'immobilisation de cette enzyme sur la surface du transducteur ont été décrites dans la littérature^{89,113,114,137-146}. Citons par exemple l'encapsulation dans différentes matrices hôtes, parmi lesquelles des polymères synthétiques comme le polypyrrole¹³⁸, des polymères naturels comme le chitosan¹³⁹, des matériaux inorganiques comme des matériaux à base de silicium préparés par voie sol-gel¹⁴², une argile cationique, la laponite^{113,143,145} et une argile anionique, les HDL^{113,114,146}. Le Tableau I.11 résume les caractéristiques de ces différents biocapteurs pour la détection du catéchol comme molécule modèle, en comparant leur sensibilité et/ou leur limite de détection. Il apparaît clairement que le biocapteur basé sur l'immobilisation de la PPO dans les HDL présente de très bonnes performances. Ces performances sont encore améliorées lorsqu'on remplace la matrice ZnAl-Cl par des HDL hybrides Zn₂Al-Alginate¹¹¹. En effet, il existe une synergie très marquée entre les propriétés de porosité des HDL et la biocompatibilité de l'alginate qui fournit un environnement favorable à l'activité de la PPO.

Tableau I.11 : Performances des biocapteurs ampérométriques à PPO pour le catéchol

Matrices d'immobilisation		Sensibilité (mA.M ⁻¹ .cm ⁻²)	Gamme linéaire (M)	limite de détection (M)	Références
Polymère organique synthétique	Polypyrrole	680	-	10.10 ⁻⁹	138
	Chitosan	2113	1,0.10 ⁻¹⁰ - 2,3.10 ⁻⁸	5,0.10 ⁻¹¹	139
Polymères naturels	Agarose et gomme de guar	-	6.10 ⁻⁵ - 8.10 ⁻⁴	6.10 ⁻⁶	140
	Nanoparticules d'or	10	1.10 ⁻⁶ - 6.10 ⁻⁶	3,0.10 ⁻⁶	141
Matériaux inorganiques	Silice/nafion	200	1.10 ⁻⁶ - 1.10 ⁻⁴	0,35.10 ⁻⁶	142
	TiO ₂	2000	2,2.10 ⁻⁷ - 0,13.10 ⁻⁶	9.10 ⁻⁸	144
	Brushite	46000	1,0.10 ⁻⁸ - 3,0.10 ⁻⁶	3,0.10 ⁻⁹	145
	Laponite	2729	6,5.10 ⁻⁸ - 8,0.10 ⁻⁵	7.10 ⁻¹⁰	113,145
	Laponite/chitosan	674	-	5,3.10 ⁻⁹	143
	Zn ₃ Al-Cl	7807	1,7.10 ⁻⁹ - 13,3.10 ⁻⁶	1,7.10 ⁻⁹	113
	Zn ₃ Al-Cl/chitosan	2750	3,6.10 ⁻⁹ - 4.10 ⁻⁵	0,36.10 ⁻⁹	146
	Zn ₂ Al-Alginate	73600	2.10 ⁻⁹ - 3.10 ⁻⁵	0,5.10 ⁻⁹	114

Comme nous avons vu dans le paragraphe I.1.4, un couplage entre l'activité de la PPO et celle de la TK a permis de doser l'activité de la TK en solution (Figure I.22)⁸¹. Le biocapteur utilise la PPO immobilisée dans un HDL MgAl-Cl à la surface de l'électrode de carbone vitreux. Dans un premier temps, la détection l'ester éthylique de la *N*-acétyl-L-tyrosine (N-Ac-Tyr-OEt) a été étudiée avec ce type de biocapteur. La sensibilité est de 969 mA.M⁻¹.cm⁻² sur une gamme de concentration comprise entre 8,0.10⁻⁸ et 1,5.10⁻⁶ M. Dans un deuxième temps, il a été montré que la quantité de N-Ac-Tyr-OEt formée était proportionnelle à la concentration en TK (U.mL⁻¹) présente dans la solution d'électrolyte. Ainsi, cette méthode a permis la détection rapide de l'activité de la TK et de façon sensible sur une gamme de concentration allant de 0,25 à 1,25 U.mL⁻¹. Cependant, elle comporte quelques inconvénients tels que la synthèse du substrat précurseur de la N-Ac-Tyr-OEt qui nécessite plusieurs étapes et dont la purification est délicate. De plus, l'activité de la TK est faible en présence de ce substrat et l'utilisation d'une protéine auxiliaire, la BSA, est nécessaire.

I.3.3. Biocapteurs ampérométriques à galactose oxydase

La galactose oxydase (GAOx) (EC 1.1.3.9) fait partie de la famille de oxydoréductases. Elle est constituée d'une unité protéique de 68 kDa avec 639 acides aminés structurée en trois domaines. Elle comporte un site actif contenant un atome de Cu(II) qui catalyse une réaction de transfert à deux électrons¹⁴⁷. Elle catalyse l'oxydation du galactose et d'un grand nombre d'alcools primaires en aldéhydes correspondants. Cette réaction s'accompagne de la réduction du dioxygène en peroxyde d'hydrogène. La transduction ampérométrique s'effectue généralement par l'oxydation du peroxyde d'hydrogène sur une électrode de platine à +0,6 V/Ag-AgCl. Dans certains cas, un médiateur redox (le Bleu de Prusse, BP) est utilisé pour permettre la réduction électrocatalytique de H₂O₂ à -0,4 V/SCE¹⁴⁸.

Une dizaine de biocapteurs ampérométriques à GAOx décrits dans la littérature utilisent essentiellement des polymères pour encapsuler l'enzyme (Tableau I.12).

Tableau I.12 : Performances des biocapteurs ampérométriques à GAOx pour le galactose (ND : non déterminé)

Matrices d'immobilisation	Electrodes	Sensibilité (mA.M ⁻¹ .cm ⁻²)	Gamme linéaire (M)	Références	
Polymères organiques synthétiques	PPy-ammonium	Pt	14,7	5,0.10 ⁻⁷ - 2.10 ⁻³	149
	PPy-PHEMA	Pt	-	5,0.10 ⁻⁵ - 1.10 ⁻²	150
	PEP	Au	1,75	2,0.10 ⁻³ - 16.10 ⁻³	151
	PPy-PEG	Pt	0,106	0 - 2,4.10 ⁻²	152
	PMP	Pt	0,162	2,0.10 ⁻³ - 16.10 ⁻³	153
	PEDOT	oxyde d'idium-étain	6,4	0 - 1,0.10 ⁻³	154
	PVFc	Pt	2,2	1,0.10 ⁻³ - 4.10 ⁻²	155
	PGMA-VFc	Pt	0,023	2,0.10 ⁻³ - 2.10 ⁻²	156
Polymères naturels	Chitosan/SWNT	Carbone vitreux	16	ND - 2.10 ⁻²	157
	Chitosan	Bleu de Prusse	1,6	1.10 ⁻⁴ - 1.10 ⁻²	148

En effet, les polymères organiques synthétiques sont les supports les plus utilisés ; quatre sont à base de polypyrrole : l'alkylammonium de polypyrrole¹⁴⁹ (PPy-ammonium), le poly(2-hydroxyethyl méthacrylate) de polypyrrole¹⁵⁰ (PPy-PHEMA), le poly(N-glycidylpyrrol-co-pyrrole)¹⁵¹ (PEP), et le polyanion/poly(éthylène glycol) de polypyrrole¹⁵² (PPy/PEG). La bioélectrode GAOx/PPy-ammonium apporte les meilleurs résultats en termes de sensibilité (de 3,5 à 14,7 mA.M⁻¹.cm⁻²) et de domaine de linéarité de la courbe d'étalonnage (de 5.10⁻⁷ à 2.10⁻³ M).

Pour l'immobilisation de la GAOx dans le poly(4-methoxyphénol)¹⁵³ (PMP) sur électrode de platine, les performances ampérométriques du biocapteur sont diminuées par rapport aux matrices à base de polypyrrole. Avec le poly(3,4-éthylène-3,4-dioxythiophène)¹⁵⁴ (PEDOT) sur l'électrode d'oxyde d'indium-étain, la sensibilité ($6,4 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) et la gamme linéaire (de 0 à 16.10^{-3} M) sont comparables à celles obtenues avec les PPy-ammonium.

Deux polymères contenant un médiateur redox, le ferrocène (Fc) ont été utilisés pour le développement de biocapteurs de deuxième génération. La GAOx est immobilisée sur le polyvinylferrocène¹⁵⁵ (PVFc) et le poly(glycidylméthacrylate-co-vinylferrocène)¹⁵⁶ (PGMA-VFc). Dans ces cas, les sensibilités sont plus faibles que pour les biocapteurs décrits ci-dessus.

Un polymère naturel, le chitosan a également été utilisé^{148,157}. La GAOx est immobilisée sur une électrode modifiée soit avec un mélange chitosan/nanotube de carbone à paroi simple (chitosan/SWNT) soit un mélange chitosan/Bleu de Prusse. De tous les biocapteurs décrits ci-dessus, le biocapteur GAOx/chitosan/SWNT permet d'obtenir la détection du galactose avec la meilleure sensibilité de $16 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$.

I.4. Conclusion

Dans ce chapitre, un état de l'art concernant la TK, en particulier son implication dans les maladies, ses inhibiteurs et les tests déjà utilisés pour la détecter a été effectué. L'objectif de cette thèse étant le développement d'un nouveau test sensible et rapide pour la TK *via* un biocapteur ampérométrique, cette stratégie implique l'immobilisation d'enzymes à la surface de l'électrode de mesure. Les différents modes d'immobilisation d'enzymes sur divers supports notamment les HDL, ont donc été abordés. En effet, les HDL offrent comme avantages par rapport aux autres supports, un environnement fortement hydraté, ainsi qu'une méthode de préparation effectuée dans des conditions douces. L'intérêt des biocapteurs pour la détection d'activité enzymatique a été montrée et deux biocapteurs, l'un impliquant la polyphénol oxydase et la galactose oxydase pour l'autre, seront développés dans le cadre de mes travaux de thèse.

I.5. Références bibliographiques

- (1) Morris, K. G.; Smith, M. E. B.; Turner, N. J.; Lilly, M. D.; Mitra, R. K.; Woodley, J. M. Transketolase from *Escherichia Coli*: A Practical Procedure for Using the Biocatalyst for Asymmetric Carbon-Carbon Bond Synthesis. *Tetrahedron Asymmetry* **1996**, *7*, 2185–2188.
- (2) Racker, E. Transketolase. In *The enzymes*; Boyer, Lardy and Myrback, **1961**; Vol. 5, 397–406.
- (3) Demuynck, C.; Bolte, J.; Hecquet, L.; Dalmas, V. Enzyme-Catalyzed Synthesis of Carbohydrates: Synthetic Potential of Transketolase. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5085–5088.
- (4) Abdoul-Zabar, J.; Sorel, I.; Hélaine, V.; Charmantray, F.; Devamani, T.; Yi, D.; de Berardinis, V.; Louis, D.; Marlière, P.; Fessner, W.-D.; et al. Thermostable Transketolase from *Geobacillus Stearothermophilus*: Characterization and Catalytic Properties. *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 116–128.
- (5) Datta, A. G.; Racker, E. Mechanism of Action of Transketolase I. PROPERTIES OF THE CRYSTALLINE YEAST ENZYME. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 617–623.
- (6) Sprenger, G. A.; Schörken, U.; Sprenger, G.; Sahm, H. Transketolase a of *Escherichia Coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 525–532.
- (7) Schenk, G.; Duggleby, R. G.; Nixon, P. F. Properties and Functions of the Thiamin Diphosphate Dependent Enzyme Transketolase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1998**, *30*, 1297–1318.
- (8) Ziegler, T.; Straub, A.; Effenberger, F. Enzyme-Catalyzed Synthesis of 1-Deoxymannojirimycin, 1-Deoxynojirimycin, and 1,4-Dideoxy-1,4-Imino-D-Arabinitol. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 716–717.
- (9) Demuynck, C.; Bolte, J.; Hecquet, L.; Samaki, H. Enzymes as Reagents in Organic Chemistry: Transketolase-Catalysed Synthesis of D-[1,2-¹³C₂]xylulose. *Carbohydr. Res.* **1990**, *206*, 79–85.
- (10) Myles, D. C.; Andrulis III, P. J.; Whitesides, G. M. A Transketolase-Based Synthesis of (+)-Exo-Brevicomine. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4835–4838.
- (11) Hecquet, L.; Bolte, J.; Demuynck, C. Enzymatic Synthesis of “natural-Labeled” 6-Deoxy-L-Sorbose Precursor of an Important Food Flavor. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 8223–8232.
- (12) Charmantray, F.; Hélaine, V.; Legeret, B.; Hecquet, L. Preparative Scale Enzymatic Synthesis of D-Sedoheptulose-7-Phosphate from B-Hydroxypyruvate and D-Ribose-5-Phosphate. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2009**, *57*, 6–9.
- (13) Ingram, C. u.; Bommer, M.; Smith, M. e. b.; Dalby, P. a.; Ward, J. m.; Hailes, H. c.; Lye, G. j. One-Pot Synthesis of Amino-Alcohols Using a de-Novo Transketolase and B-Alanine: Pyruvate Transaminase Pathway in *Escherichia Coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *96*, 559–569.
- (14) Esakova, O. A.; Meshalkina, L. E.; Kochetov, G. A.; Golbik, R. Halogenated Pyruvate Derivatives as Substrates of Transketolase from *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochem. Mosc.* **2009**, *74*, 1234–1238.
- (15) Sprenger, G. A.; Pohl, M. Synthetic Potential of Thiamin Diphosphate-Dependent Enzymes. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **1999**, *6*, 145–159.
- (16) Effenberger, F.; Null, V.; Ziegler, T. Preparation of Optically Pure L-2-Hydroxyaldehydes with Yeast Transketolase. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5157–5160.
- (17) Galman, J. L.; Steadman, D.; Bacon, S.; Morris, P.; Smith, M. E. B.; Ward, J. M.; Dalby, P. A.; Hailes, H. C. A,α'-Dihydroxyketone Formation Using Aromatic and

- Heteroaromatic Aldehydes with Evolved Transketolase Enzymes. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7608–7610.
- (18) Nikkola, M.; Lindqvist, Y.; Schneider, G. Refined Structure of Transketolase from *Saccharomyces Cerevisiae* at 2.0 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **1994**, *238*, 387–404.
- (19) Schneider, G.; Lindqvist, Y. Crystallography and Mutagenesis of Transketolase: Mechanistic Implications for Enzymatic Thiamin Catalysis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1998**, *1385*, 387–398.
- (20) Fiedler, E.; Thorell, S.; Sandalova, T.; Golbik, R.; König, S.; Schneider, G. Snapshot of a Key Intermediate in Enzymatic Thiamin Catalysis: Crystal Structure of the A-Carbanion of (α,β -Dihydroxyethyl)-Thiamin Diphosphate in the Active Site of Transketolase from *Saccharomyces Cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 591–595.
- (21) Littlechild, J.; Turner, N.; Hobbs, G.; Lilly, M.; Rawas, A.; H, W. Crystallization and Preliminary X-Ray Crystallographic Data with *Escherichia Coli* Transketolase. *Acta Crystallogr. Sect. D* **1995**, *51*, 1074–1076.
- (22) Asztalos, P.; Parthier, C.; Golbik, R.; Kleinschmidt, M.; Hübner, G.; Weiss, M. S.; Friedemann, R.; Wille, G.; Tittmann, K. Strain and Near Attack Conformers in Enzymic Thiamin Catalysis: X-Ray Crystallographic Snapshots of Bacterial Transketolase in Covalent Complex with Donor Ketoses Xylulose 5-Phosphate and Fructose 6-Phosphate, and in Noncovalent Complex with Acceptor Aldose Ribose 5-Phosphate†. *Biochemistry (Mosc.)* **2007**, *46*, 12037–12052.
- (23) Veitch, N. J.; Maugeri, D. A.; Cazzulo, J. J.; Lindqvist, Y.; Barrett, M. P. Transketolase from *Leishmania Mexicana* Has a Dual Subcellular Localization. *Biochem. J.* **2004**, *382*, 759.
- (24) RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB - 3HYL Structure Summary <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3HYL>.
- (25) Fullam, E.; Pojer, F.; Bergfors, T.; Jones, T. A.; Cole, S. T. Structure and Function of the Transketolase from *Mycobacterium Tuberculosis* and Comparison with the Human Enzyme. *Open Biol.* **2012**, *2*.
- (26) RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB - 3UPT Structure Summary <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3UPT>.
- (27) RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB - 3UK1 Structure Summary <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3UK1>.
- (28) RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB - 3L84 Structure Summary <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3L84>.
- (29) RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB - 3KOM Structure Summary <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3KOM>.
- (30) RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB - 2E6K Structure Summary <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2E6K>.
- (31) Gerhardt, S.; Echt, S.; Busch, M.; Freigang, J.; Auerbach, G.; Bader, G.; Martin, W. F.; Bacher, A.; Huber, R.; Fischer, M. Structure and Properties of an Engineered Transketolase from Maize. *Plant Physiol.* **2003**, *132*, 1941–1949.
- (32) Mitschke, L.; Parthier, C.; Schröder-Tittmann, K.; Coy, J.; Lüdtkke, S.; Tittmann, K. The Crystal Structure of Human Transketolase and New Insights into Its Mode of Action. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31559–31570.
- (33) Nilsson, U.; Hecquet, L.; Gefflaut, T.; Guerard, C.; Schneider, G. Asp477 Is a Determinant of the Enantioselectivity in Yeast Transketolase. *FEBS Lett.* **1998**, *424*, 49–52.
- (34) Meshalkina, L.; Nilsson, U.; Wikner, C.; Kostikowa, T.; Schneider, G. Examination of the Thiamin Diphosphate Binding Site in Yeast Transketolase by Site-Directed Mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *244*, 646–652.

- (35) Obiol-Pardo, C.; Rubio-Martinez, J. Homology Modeling of Human Transketolase: Description of Critical Sites Useful for Drug Design and Study of the Cofactor Binding Mode. *J. Mol. Graph. Model.* **2009**, *27*, 723–734.
- (36) Schaaff-Gerstenschläger, I.; Mannhaupt, G.; Vetter, I.; Zimmermann, F. K.; Feldmann, H. TKL2, a Second Transketolase Gene of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *217*, 487–492.
- (37) Sundström, M.; Lindqvist, Y.; Schneider, G.; Hellman, U.; Ronne, H. Yeast TKL1 Gene Encodes a Transketolase That Is Required for Efficient Glycolysis and Biosynthesis of Aromatic Amino Acids. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 24346–24352.
- (38) Wikner, C.; Meshalkina, L.; Nilsson, U.; Nikkola, M.; Lindqvist, Y.; Sundström, M.; Schneider, G. Analysis of an Invariant Cofactor-Protein Interaction in Thiamin Diphosphate-Dependent Enzymes by Site-Directed Mutagenesis. Glutamic Acid 418 in Transketolase Is Essential for Catalysis. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 32144–32150.
- (39) R. Hobbs, G.; K. Mitra, R.; P. Chauhan, R.; M. Woodley, J.; D. Lilly, M. Enzyme-Catalysed Carbon-Carbon Bond Formation: Large-Scale Production of *Escherichia Coli* Transketolase. *J. Biotechnol.* **1996**, *45*, 173–179.
- (40) Hibbert, E. G.; Senussi, T.; Costelloe, S. J.; Lei, W.; Smith, M. E. B.; Ward, J. M.; Hailes, H. C.; Dalby, P. A. Directed Evolution of Transketolase Activity on Non-Phosphorylated Substrates. *J. Biotechnol.* **2007**, *131*, 425–432.
- (41) Bergh, E. R. van den; Baker, S. C.; Riggers, R. J.; Terpstra, P.; Woudstra, E. C.; Dijkhuizen, L.; Meijer, W. G. Primary Structure and Phylogeny of the Calvin Cycle Enzymes Transketolase and Fructosebisphosphate Aldolase of *Xanthobacter Flavus*. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 888–893.
- (42) Wang, J. J.-L.; Martin, P. R.; Singleton, C. K. Aspartate 155 of Human Transketolase Is Essential for Thiamine Diphosphate–magnesium Binding, and Cofactor Binding Is Required for Dimer Formation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1997**, *1341*, 165–172.
- (43) Schenk, G.; Duggleby, R. G.; Nixon, P. F. Heterologous Expression of Human Transketolase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1998**, *30*, 369–378.
- (44) Babaei-Jadidi, R.; Karachalias, N.; Ahmed, N.; Battah, S.; Thornalley, P. J. Prevention of Incipient Diabetic Nephropathy by High-Dose Thiamine and Benfotiamine. *Diabetes* **2003**, *52*, 2110–2120.
- (45) Blass, J. P.; Gibson, G. E. Abnormality of a Thiamine-Requiring Enzyme in Patients with Wernicke-Korsakoff Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **1977**, *297*, 1367–1370.
- (46) Donnino, M. W.; Vega, J.; Miller, J.; Walsh, M. Myths and Misconceptions of Wernicke’s Encephalopathy: What Every Emergency Physician Should Know. *Ann. Emerg. Med.* **2007**, *50*, 715–721.
- (47) Galvin, R.; Bråthen, G.; Ivashynka, A.; Hillbom, M.; Tanasescu, R.; Leone, M. A. EFNS Guidelines for Diagnosis, Therapy and Prevention of Wernicke Encephalopathy. *Eur. J. Neurol.* **2010**, *17*, 1408–1418.
- (48) Zhao, J.; Zhong, C.-J. A Review on Research Progress of Transketolase. *Neurosci. Bull.* **2009**, *25*, 94–99.
- (49) Nixon, P. F.; Price, J.; Norman-Hicks, M.; Williams, G. M.; Kerr, R. A. The Relationship between Erythrocyte Transketolase Activity and the “TPP Effect” in Wernicke’s Encephalopathy and Other Thiamine Deficiency States. *Clin. Chim. Acta* **1990**, *192*, 89–98.
- (50) Paoletti, F.; Mocali, A.; Tombaccini, D. Cysteine Proteinases Are Responsible for Characteristic Transketolase Alterations in Alzheimer Fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **1997**, *172*, 63–68.

- (51) Himmo, S. D.; Thomson, M.; Gubler, C. J. Isolation of Transketolase from Human Erythrocytes. *Prep. Biochem.* **1988**, *18*, 261–276.
- (52) Zhang, S.; Yang, J.-H.; Guo, C.-K.; Cai, P. Gene Silencing of TKTL1 by RNAi Inhibits Cell Proliferation in Human Hepatoma Cells. *Cancer Lett.* **2007**, *253*, 108–114.
- (53) Gatenby, R. A.; Gillies, R. J. Why Do Cancers Have High Aerobic Glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 891–899.
- (54) Langbein, S.; Zerilli, M.; zur Hausen, A.; Staiger, W.; Rensch-Boschert, K.; Lukan, N.; Popa, J.; Ternullo, M. P.; Steidler, A.; Weiss, C.; et al. Expression of Transketolase TKTL1 Predicts Colon and Urothelial Cancer Patient Survival: Warburg Effect Reinterpreted. *Br. J. Cancer* **2006**, *94*, 578–585.
- (55) Fröhlich, E.; Fink, I.; Wahl, R. Is Transketolase like 1 a Target for the Treatment of Differentiated Thyroid Carcinoma? A Study on Thyroid Cancer Cell Lines. *Invest. New Drugs* **2009**, *27*, 297–303.
- (56) Boros, L. G.; Puigjaner, J.; Cascante, M.; Lee, W.-N. P.; Brandes, J. L.; Bassilian, S.; Yusuf, F. I.; Williams, R. D.; Muscarella, P.; Melvin, W. S.; et al. Oxythiamine and Dehydroepiandrosterone Inhibit the Nonoxidative Synthesis of Ribose and Tumor Cell Proliferation. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4242–4248.
- (57) Boros, L. G.; Torday, J. S.; Lim, S.; Bassilian, S.; Cascante, M.; Lee, W.-N. P. Transforming Growth Factor β 2 Promotes Glucose Carbon Incorporation into Nucleic Acid Ribose through the Nonoxidative Pentose Cycle in Lung Epithelial Carcinoma Cells. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1183–1185.
- (58) Cascante, M.; Centelles, J. J.; Veech, R. L.; Lee, W.-N. P.; Boros, L. G. Role of Thiamin (Vitamin B-1) and Transketolase in Tumor Cell Proliferation. *Nutr. Cancer* **2000**, *36*, 150–154.
- (59) Comín-Anduix, B.; Boren, J.; Martinez, S.; Moro, C.; Centelles, J. J.; Trebukhina, R.; Petushok, N.; Lee, W. N.; Boros, L. G.; Cascante, M. The Effect of Thiamine Supplementation on Tumour Proliferation. A Metabolic Control Analysis Study. *Eur. J. Biochem. FEBS* **2001**, *268*, 4177–4182.
- (60) Ra s, B.; Comin, B.; Puigjaner, J.; Brandes, J. L.; Creppy, E.; Saboureau, D.; Ennamany, R.; Paul Lee, W.-N.; Boros, L. G.; Cascante, M. Oxythiamine and Dehydroepiandrosterone Induce a G1 Phase Cycle Arrest in Ehrlich's Tumor Cells through Inhibition of the Pentose Cycle. *FEBS Lett.* **1999**, *456*, 113–118.
- (61) Bentz, S.; Cee, A.; Endlicher, E.; Wojtal, K. A.; Naami, A.; Pesch, T.; Lang, S.; Schubert, P.; Fried, M.; Weber, A.; et al. Hypoxia Induces the Expression of Transketolase-Like 1 in Human Colorectal Cancer. *Digestion* **2013**, *88*, 182–192.
- (62) Oh, S.-H.; Witek, R. P.; Bae, S.-H.; Darwiche, H.; Jung, Y.; Pi, L.; Brown, A.; Petersen, B. E. Detection of Transketolase in Bone Marrow-Derived Insulin-Producing Cells: Benfotiamine Enhances Insulin Synthesis and Glucose Metabolism. *Stem Cells Dev.* **2009**, *18*, 37–46.
- (63) Joshi, S. Identification of Potential *P. Falciparum* Transketolase Inhibitors: Pharmacophore Design, in Silico Screening and Docking Studies. *J. Biophys. Chem.* **2010**, *01*, 96–104.
- (64) Kochetov, G. A.; Izotova, A. E.; Meshalkina, L. E. Inhibition of Transketolase by Analogues of the Coenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *43*, 1198–1203.
- (65) Wood, T.; Fletcher, S. The Affinity Chromatography of Transketolase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.* **1978**, *527*, 249–255.
- (66) Meshalkina, L. E.; Usmanov, R. A.; Kochetov, G. A. The Role of the Amino Group and Pyrimidine Ring Nitrogen Atoms of Thiamine Pyrophosphate in the Transketolase Reaction. In *Biochemistry and Physiology of Thiamine Diphosphate Enzymes*; (Bisswanger, H. & Ulrich, J.), **1991**; 343–352. Verlag Chemie, Weinheim.

- (67) Solovjeva, O. N.; Kochetov, G. A. Inhibition of Transketolase by P-Hydroxyphenylpyruvate. *FEBS Lett.* **1999**, *462*, 246–248.
- (68) Thomas, A. A.; Le Huerou, Y.; De Meese, J.; Gunawardana, I.; Kaplan, T.; Romoff, T. T.; Gonzales, S. S.; Condroski, K.; Boyd, S. A.; Ballard, J.; et al. Synthesis, in Vitro and in Vivo Activity of Thiamine Antagonist Transketolase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2206–2210.
- (69) Thomas, A. A.; De Meese, J.; Le Huerou, Y.; Boyd, S. A.; Romoff, T. T.; Gonzales, S. S.; Gunawardana, I.; Kaplan, T.; Sullivan, F.; Condroski, K.; et al. Non-Charged Thiamine Analogs as Inhibitors of Enzyme Transketolase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 509–512.
- (70) Du, M. X.; Sim, J.; Fang, L.; Yin, Z.; Koh, S.; Stratton, J.; Pons, J.; Wang, J. J.-X.; Carte, B. Identification of Novel Small-Molecule Inhibitors for Human Transketolase by High-Throughput Screening with Fluorescent Intensity (FLINT) Assay. *J. Biomol. Screen.* **2004**, *9*, 427–433.
- (71) Obiol-Pardo, C.; Alcarraz-Vizán, G.; Cascante, M.; Rubio-Martinez, J. Diphenyl Urea Derivatives as Inhibitors of Transketolase: A Structure-Based Virtual Screening. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32276.
- (72) Sharma, M.; Chauhan, K.; Chauhan, S. S.; Kumar, A.; Singh, S. V.; Saxena, J. K.; Agarwal, P.; Srivastava, K.; Kumar, S. R.; Puri, S. K.; et al. Synthesis of Hybrid 4-Anilinoquinoline Triazines as Potent Antimalarial Agents, Their in Silico Modeling and Bioevaluation as Plasmodium Falciparum Transketolase and B-Hematin Inhibitors. *MedChemComm* **2012**, *3*, 71–79.
- (73) Horecker, B. L.; Smyrniotis, P. Z. [53] Transketolase from Liver and Spinach: Ribulose-5-P + Ribose-5-P \rightleftharpoons Sedoheptulose-7-P + Glyceraldehyde-3-P. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, **1955**; Vol. 1, 371–375.
- (74) Hecquet, L.; Bolte, J.; Demuynck, C. New Assays for Transketolase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 2174–2176.
- (75) Naula, C.; Alibu, V. P.; Brock, J. M.; Veitch, N. J.; Burchmore, R. J. S.; Barrett, M. P. A New Erythrose 4-Phosphate Dehydrogenase Coupled Assay for Transketolase. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2008**, *70*, 1185–1187.
- (76) Lee, J.-Y.; Cheong, D.-E.; Kim, G.-J. A Novel Assay System for the Measurement of Transketolase Activity Using Xylulokinase from *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 899–904.
- (77) Smith, M. E. B.; Kaulmann, U.; Ward, J. M.; Hailes, H. C. A Colorimetric Assay for Screening Transketolase Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7062–7065.
- (78) Yi, D.; Devamani, T.; Abdoul-Zabar, J.; Charmantray, F.; Helaine, V.; Hecquet, L.; Fessner, W.-D. A pH-Based High-Throughput Assay for Transketolase: Fingerprinting of Substrate Tolerance and Quantitative Kinetics. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2290–2300.
- (79) Sevestre, A.; Hélaïne, V.; Guyot, G.; Martin, C.; Hecquet, L. A Fluorogenic Assay for Transketolase from *Saccharomyces Cerevisiae*. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 827–830.
- (80) Charmantray, F.; Légeret, B.; Hélaïne, V.; Hecquet, L. Fluorogenic Substrates for the Screening Assay of Transketolase through Beta-Elimination of umbelliferone—Development, Scope and Limitations. *J. Biotechnol.* **2010**, *145*, 359–366.
- (81) Lopez, M. S.-P.; Charmantray, F.; Helaine, V.; Hecquet, L.; Mousty, C. Electrochemical Detection of Transketolase Activity Using a Tyrosinase Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 139–143.
- (82) Goddard, J.-P.; Reymond, J.-L. Recent Advances in Enzyme Assays. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 363–370.

- (83) Sevestre, A.; Charmantray, F.; Hélaïne, V.; Lásiková, A.; Hecquet, L. Synthesis of Stereochemical Probes for New Fluorogenic Assays for Yeast Transketolase Variants. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 3969–3976.
- (84) Klein, G.; Reymond, J.-L. An Enantioselective Fluorimetric Assay for Alcohol Dehydrogenases Using Albumin-Catalyzed B-Elimination of Umbelliferone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1113–1116.
- (85) Charmantray, F.; Hélaïne, V.; Lásiková, A.; Legeret, B.; Hecquet, L. Chemoenzymatic Synthesis of L-Tyrosine Derivative for a Transketolase Assay. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3229–3233.
- (86) Guisán, J. M. *Immobilization of Enzymes and Cells*; Humana Press, **2006**.
- (87) Sheldon, R. A.; Pelt, S. van. Enzyme Immobilisation in Biocatalysis: Why, What and How. *Chem. Soc. Rev.* **2013**.
- (88) Hwang, E. T.; Gu, M. B. Enzyme Stabilization by Nano/microsized Hybrid Materials. *Eng. Life Sci.* **2013**, *13*, 49–61.
- (89) Sassolas, A.; Blum, L. J.; Leca-Bouvier, B. D. Immobilization Strategies to Develop Enzymatic Biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 489–511.
- (90) Sheldon, R. A. Characteristic Features and Biotechnological Applications of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 467–477.
- (91) Jegan Roy, J.; Emilia Abraham, T. Strategies in Making Cross-Linked Enzyme Crystals. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3705–3722.
- (92) Miyata, S. Anion-Exchange Properties of Hydrotalcite-Like Compounds. *Clays Clay Miner.* **1983**, *31*, 305–311.
- (93) Leroux, F.; Adachi-Pagano, M.; Intissar, M.; Chauvière, S.; Forano, C.; Besse, J.-P. Delamination and Restacking of Layered Doublehydroxides. *J. Mater. Chem.* **2001**, *11*, 105–112.
- (94) Challier, T.; Slade, R. C. T. Nanocomposite Materials: Polyaniline-Intercalated Layered Double Hydroxides. *J. Mater. Chem.* **1994**, *4*, 367–371.
- (95) Darder, M.; López-Blanco, M.; Aranda, P.; Leroux, F.; Ruiz-Hitzky, E. Bio-Nanocomposites Based on Layered Double Hydroxides. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 1969–1977.
- (96) Leroux, F.; Gachon, J.; Besse, J.-P. Biopolymer Immobilization during the Crystalline Growth of Layered Double Hydroxide. *J. Solid State Chem.* **2004**, *177*, 245–250.
- (97) Taviot-Guého, C.; Halma, M.; Charradi, K.; Forano, C.; Mousty, C. Structural and Electrochemical Characterization of Metallo-Porphyrins Intercalated into ZnCr-Layered Double Hydroxides: Some Evidence of Dimer Formation. *New J. Chem.* **2011**, *35*, 1898–1905.
- (98) Itaya, K.; Chang, H. C.; Uchida, I. Anion-Exchanged Clay (hydrotalcite-like Compounds) Modified Electrodes. *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 624–626.
- (99) Mousty, C.; Therias, S.; Forano, C.; Besse, J.-P. Anion-Exchanging Clay-Modified Electrodes: Synthetic Layered Double Hydroxides Intercalated with Electroactive Organic Anions. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *374*, 63–69.
- (100) Khan, A. I.; Lei, L.; Norquist, A. J.; O'Hare, D. Intercalation and Controlled Release of Pharmaceutically Active Compounds from a Layered Double Hydroxide. *Chem. Commun.* **2001**, 2342–2343.
- (101) Nakayama, H.; Wada, N.; Tsuchioka, M. Intercalation of Amino Acids and Peptides into Mg–Al Layered Double Hydroxide by Reconstruction Method. *Int. J. Pharm.* **2004**, *269*, 469–478.
- (102) Desigaux, L.; Belkacem, M. B.; Richard, P.; Cellier, J.; Léone, P.; Cario, L.; Leroux, F.; Taviot-Guého, C.; Pitard, B. Self-Assembly and Characterization of Layered Double Hydroxide/DNA Hybrids. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 199–204.

- (103) Forano, C.; Hibino, T.; Leroux, F.; Taviot-Guého, C. Chapter 13.1 Layered Double Hydroxides. In *Handbook of clay science*; F. Bergaya, B.K.G. Theng and G. Lagaly, **2006**; 1021–1096.
- (104) Forano, C.; Constantino, U.; Prévot, V.; Taviot-Guého, C. Chapter 14.1 Layered Double Hydroxides (LDH). In *Handbook of clay science*; F. Bergaya and G. Lagaly, **2013**; 745–782.
- (105) Prévot, V.; Mousty, C.; Forano, C. State of the Art in Biomolecules and Layered Double Hydroxide Assemblies. In *Advances in Chemistry Research*; James C Taylor, **2012**; Vol. 17, 35–84.
- (106) Mousty, C.; Prévot, V. Hybrid and Biohybrid Layered Double Hydroxides for Electrochemical Analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 3513–3523.
- (107) Charradi, K.; Forano, C.; Prevot, V.; Madern, D.; Ben Haj Amara, A.; Mousty, C. Characterization of Hemoglobin Immobilized in MgAl-Layered Double Hydroxides by the Coprecipitation Method. *Langmuir* **2010**, *26*, 9997–10004.
- (108) Cosnier, S.; Mousty, C.; Gondran, C.; Lepellec, A. Entrapment of Enzyme within Organic and Inorganic Materials for Biosensor Applications: Comparative Study. *Mater. Sci. Eng. C* **2006**, *26*, 442–447.
- (109) Shi, Q.; Han, E.; Shan, D.; Yao, W.; Xue, H. Development of a High Analytical Performance Amperometric Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase Immobilized in a Composite Matrix: Layered Double Hydroxides/chitosan. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2008**, *31*, 519–526.
- (110) Shan, D.; Cosnier, S.; Mousty, C. HRP/[Zn–Cr–ABTS] Redox Clay-Based Biosensor: Design and Optimization for Cyanide Detection. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20*, 390–396.
- (111) Chen, X.; Fu, C.; Wang, Y.; Yang, W.; Evans, D. G. Direct Electrochemistry and Electrocatalysis Based on a Film of Horseradish Peroxidase Intercalated into Ni–Al Layered Double Hydroxide Nanosheets. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 356–361.
- (112) Baccar, Z. M.; Hafaiedh, I. Immobilization of HRP Enzyme on Layered Double Hydroxides for Biosensor Application. *Int. J. Electrochem.* **2011**, *2011*, ID 934893.
- (113) Shan, D.; Cosnier, S.; Mousty, C. Layered Double Hydroxides: An Attractive Material for Electrochemical Biosensor Design. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3872–3879.
- (114) Lopez, M. S.-P.; Leroux, F.; Mousty, C. Amperometric Biosensors Based on LDH-ALGINATE Hybrid Nanocomposite for Aqueous and Non-Aqueous Phenolic Compounds Detection. *Sens. Actuators B Chem.* **2010**, *150*, 36–42.
- (115) De Melo, J. V.; Cosnier, S.; Mousty, C.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N. Urea Biosensors Based on Immobilization of Urease into Two Oppositely Charged Clays (Laponite and Zn–Al Layered Double Hydroxides). *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4037–4043.
- (116) Li, M.; Chen, S.; Ni, F.; Wang, Y.; Wang, L. Layered Double Hydroxides Functionalized with Anionic Surfactant: Direct Electrochemistry and Electrocatalysis of Hemoglobin. *Electrochimica Acta* **2008**, *53*, 7255–7260.
- (117) Barhoumi, H.; Maaref, A.; Rammah, M.; Martelet, C.; Jaffrezic, N.; Mousty, C.; Vial, S.; Forano, C. Urea Biosensor Based on Zn₃Al–Urease Layered Double Hydroxides Nanohybrid Coated on Insulated Silicon Structures. *Mater. Sci. Eng. C* **2006**, *26*, 328–333.
- (118) Vial, S.; Prevot, V.; Leroux, F.; Forano, C. Immobilization of Urease in ZnAl Layered Double Hydroxides by Soft Chemistry Routes. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *107*, 190–201.
- (119) Zhang, Y.; Chen, X.; Wang, J.; Yang, W. The Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase Based on Layered Double-Hydroxide Nanosheets. *Electrochem. Solid-State Lett.* **2008**, *11*, F19–F21.

- (120) Kong, X.; Rao, X.; Han, J.; Wei, M.; Duan, X. Layer-by-Layer Assembly of Bi-Protein/layered Double Hydroxide Ultrathin Film and Its Electrocatalytic Behavior for Catechol. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 549–554.
- (121) Ren, L.; He, J.; Zhang, S.; Evans, D. .; Duan, X. Immobilization of Penicillin G Acylase in Layered Double Hydroxides Pillared by Glutamate Ions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2002**, *18*, 3–11.
- (122) Forano, C.; Vial, S.; Mousty, C. Nanohybrid Enzymes - Layered Double Hydroxides: Potential Applications. *Curr. Nanosci.* **2006**, *2*, 283–294.
- (123) Zhang, Y.-T.; Zhi, T.-T.; Zhang, L.; Huang, H.; Chen, H.-L. Immobilization of Carbonic Anhydrase by Embedding and Covalent Coupling into Nanocomposite Hydrogel Containing Hydrotalcite. *Polymer* **2009**, *50*, 5693–5700.
- (124) Geraud, E.; Prevot, V.; Forano, C.; Mousty, C. Spongy Gel-like Layered Double Hydroxide–alkaline Phosphatase Nanohybrid as a Biosensing Material. *Chem. Commun.* **2008**, 1554–1556.
- (125) Guérard-Hélaine, C.; Légeret, B.; Fernandes, C.; Prévot, V.; Forano, C.; Lemaire, M. Efficient Immobilization of Fructose-6-Phosphate Aldolase in Layered Double Hydroxide: Improved Stereoselective Synthesis of Sugar Analogues. *New J. Chem.* **2011**, *35*, 776–779.
- (126) Kochetov, G. A.; Solovieva, O. N. Active Subunits of Transketolase from Baker's Yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *84*, 515–519.
- (127) Brocklebank, S. P.; Mitra, R. K.; Woodley, J. M.; Lilly, M. D. Carbon-Carbon Bond Synthesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1996**, *799*, 729–736.
- (128) Brocklebank, S.; Woodley, J. M.; Lilly, M. D. Immobilised Transketolase for Carbon–carbon Bond Synthesis: Biocatalyst Stability. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **1999**, *7*, 223–231.
- (129) Bhattacharya, S.; Schiavone, M.; Gomes, J.; Bhattacharya, S. K. Cascade of Bioreactors in Series for Conversion of 3-Phospho-D-Glycerate into D-Ribulose-1,5-Bisphosphate: Kinetic Parameters of Enzymes and Operation Variables. *J. Biotechnol.* **2004**, *111*, 203–217.
- (130) Matosevic, S.; Lye, G. J.; Baganz, F. Design and Characterization of a Prototype Enzyme Microreactor: Quantification of Immobilized Transketolase Kinetics. *Biotechnol. Prog.* **2010**, *26*, 118–126.
- (131) Matosevic, S.; Lye, G. J.; Baganz, F. Immobilised Enzyme Microreactor for Screening of Multi-Step Bioconversions: Characterisation of a de Novo Transketolase- Ω -Transaminase Pathway to Synthesise Chiral Amino Alcohols. *J. Biotechnol.* **2011**, *155*, 320–329.
- (132) Reimer, L. M.; Conley, D. L.; Pompliano, D. L.; Frost, J. W. Construction of an Enzyme-Targeted Organophosphonate Using Immobilized Enzyme and Whole-Cell Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 8010–8015.
- (133) Benaissi, K.; Hélaine, V.; Prévot, V.; Forano, C.; Hecquet, L. Efficient Immobilization of Yeast Transketolase on Layered Double Hydroxides and Application for Ketose Synthesis. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1497–1509.
- (134) Canh, T. M. *Les Biocapteurs : Principes, Construction et Applications*; collection mesures physiques; Masson.; **1991**.
- (135) Clark, L. C.; Lyons, C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29–45.
- (136) Mousty, C. Sensors and Biosensors Based on Clay-Modified Electrodes—new Trends. *Appl. Clay Sci.* **2004**, *27*, 159–177.
- (137) Mousty, C. Biosensing Applications of Clay-Modified Electrodes: A Review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 315–325.

- (138) Cosnier, S.; Fombon, J.-J.; Labbé, P.; Limosin, D. Development of a PPO-Poly(amphiphilic Pyrrole) Electrode for on Site Monitoring of Phenol in Aqueous Effluents. *Sens. Actuators B Chem.* **1999**, *59*, 134–139.
- (139) Wang, G.; Xu, J.-J.; Ye, L.-H.; Zhu, J.-J.; Chen, H.-Y. Highly Sensitive Sensors Based on the Immobilization of Tyrosinase in Chitosan. *Bioelectrochemistry* **2002**, *57*, 33–38.
- (140) Tembe, S.; Inamdar, S.; Haram, S.; Karve, M.; D'Souza, S. F. Electrochemical Biosensor for Catechol Using Agarose–guar Gum Entrapped Tyrosinase. *J. Biotechnol.* **2007**, *128*, 80–85.
- (141) Singh, S.; Jain, D. V. S.; Singla, M. L. Sol–gel Based Composite of Gold Nanoparticles as Matix for Tyrosinase for Amperometric Catechol Biosensor. *Sens. Actuators B Chem.* **2013**, *182*, 161–169.
- (142) Kim, M. A.; Lee, W.-Y. Amperometric Phenol Biosensor Based on Sol–gel silicate/Nafion Composite Film. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *479*, 143–150.
- (143) Fan, Q.; Shan, D.; Xue, H.; He, Y.; Cosnier, S. Amperometric Phenol Biosensor Based on Laponite Clay–chitosan Nanocomposite Matrix. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 816–821.
- (144) Kochana, J.; Gala, A.; Parczewski, A.; Adamski, J. Titania Sol–gel-Derived Tyrosinase-Based Amperometric Biosensor for Determination of Phenolic Compounds in Water Samples. Examination of Interference Effects. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1275–1281.
- (145) Sanchez-Paniagua López, M.; López-Cabarcos, E.; López-Ruiz, B. Influence of the Host Matrix of the Enzyme in the Performance of Amperometric Biosensors. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, *171–172*, 387–397.
- (146) Han, E.; Shan, D.; Xue, H.; Cosnier, S. Hybrid Material Based on Chitosan and Layered Double Hydroxides: Characterization and Application to the Design of Amperometric Phenol Biosensor. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 971–975.
- (147) Shleev, S.; Tkac, J.; Christenson, A.; Ruzgas, T.; Yaropolov, A. I.; Whittaker, J. W.; Gorton, L. Direct Electron Transfer between Copper-Containing Proteins and Electrodes. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2517–2554.
- (148) Wang, Y.; Zhu, J.; Zhu, R.; Zhu, Z.; Lai, Z.; Chen, Z. Chitosan/Prussian Blue-Based Biosensors. *Meas. Sci. Technol.* **2003**, *14*, 831.
- (149) Coche-Guerente, L.; Cosnier, S.; Innocent, C.; Mailley, P. Development of Amperometric Biosensors Based on the Immobilization of Enzymes in Polymer Films Electrogenerated from a Series of Amphiphilic Pyrrole Derivatives. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *311*, 23–30.
- (150) Brahim, S. I.; Maharajh, D.; Narinesingh, D.; Guiseppi-Elie, A. Design and Characterization of a Galactose Biosensor Using a Novel Polypyrrole-Hydrogel Composite Membrane. *Anal. Lett.* **2002**, *35*, 797–812.
- (151) Şenel, M.; Bozgeyik, İ.; Çevik, E.; Fatih Abas yan k, M. A Novel Amperometric Galactose Biosensor Based on Galactose Oxidase-poly(N-Glycidylpyrrole-Co-Pyrrole). *Synth. Met.* **2011**, *161*, 440–444.
- (152) Sung, W. J.; Bae, Y. H. Glucose Oxidase, Lactate Oxidase, and Galactose Oxidase Enzyme Electrode Based on Polypyrrole with polyanion/PEG/enzyme Conjugate Dopant. *Sens. Actuators B Chem.* **2006**, *114*, 164–169.
- (153) Ekinçi, E.; Paşahan, A. Poly (4-Methoxyphenol) Film as a Galactose-Sensing Material. *Eur. Polym. J.* **2004**, *40*, 1605–1608.
- (154) Lee, K. N.; Lee, Y.; Son, Y. Enhanced Sensitivity of a Galactose Biosensor Fabricated with a Bundle of Conducting Polymer Microtubules. *Electroanalysis* **2011**, *23*, 2125–2130.
- (155) Gülce, H.; Ataman, İ.; Gülce, A.; Y ld z, A. A New Amperometric Enzyme Electrode for Galactose Determination. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30*, 41–44.

- (156) Çevik, E.; Şenel, M.; Fatih Abas yan k, M. Construction of Biosensor for Determination of Galactose with Galactose Oxidase Immobilized on Polymeric Mediator Contains Ferrocene. *Curr. Appl. Phys.* **2010**, *10*, 1313–1316.
- (157) Tkac, J.; Whittaker, J. W.; Ruzgas, T. The Use of Single Walled Carbon Nanotubes Dispersed in a Chitosan Matrix for Preparation of a Galactose Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1820–1824.

CHAPITRE II : MESURE DE L'ACTIVITE DE LA TK LIBRE EN SOLUTION

II.1. Introduction

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre (*cf.* I.1.2.2), la TK est impliquée dans plusieurs maladies sévères chez l'Homme telles que certaines maladies neurologiques, certains cancers et le diabète. Les études qui ont été conduites montrent chez les patients atteints de ces maladies, une augmentation, ou une diminution, de l'activité enzymatique de la TK, associée dans certains cas à une déficience en thiamine. Il est donc intéressant de pouvoir déterminer l'activité de la TK notamment dans des extraits cellulaires ou des fluides biologiques. Les tests déjà décrits sont essentiellement basés sur l'utilisation de différents substrats donneurs conduisant en présence d'un réactif auxiliaire (protéine ou colorant), ou d'un cofacteur comme le NADH, à une détection spectrophotométrique¹⁻⁷ ou fluorimétrique⁸. Le principe de ces tests ne permet pas d'allier rapidité, sensibilité et faible coût. La mise au point d'un système électro-enzymatique *via* un biocapteur ampérométrique permettrait d'envisager la détection d'une activité enzymatique combinant ces avantages.

Dans la littérature, seulement quelques articles décrivent la détermination de l'activité d'enzymes, notamment dans des fluides biologiques selon des mesures électrochimiques⁹⁻¹⁴. Par exemple, dans les années 80, l'activité de l'alcool déshydrogénase (ADH) a été déterminée par polarographie impulsionnelle différentielle dans le sérum humain et les tissus de foie de rat⁹. De même, la détection de l'activité de la lactate déshydrogénase (LaDH) a été effectuée dans les érythrocytes humains, par électrophorèse capillaire couplée à une détection électrochimique¹⁰. Citons encore la détection de l'activité de l'aspartate transaminase (AST) et de l'alanine transaminase (ALT) dans le plasma humain¹¹, et de la caséine kinase 2 et de protéines tyrosine kinases dans des lysats cellulaires par voltammétrie cyclique.^{12,13}

La détermination de l'activité enzymatique en solution par voie électrochimique peut être réalisée soit directement sans intermédiaire, soit en utilisant des médiateurs redox ou une enzyme auxiliaire, comme illustré dans la Figure II.1.

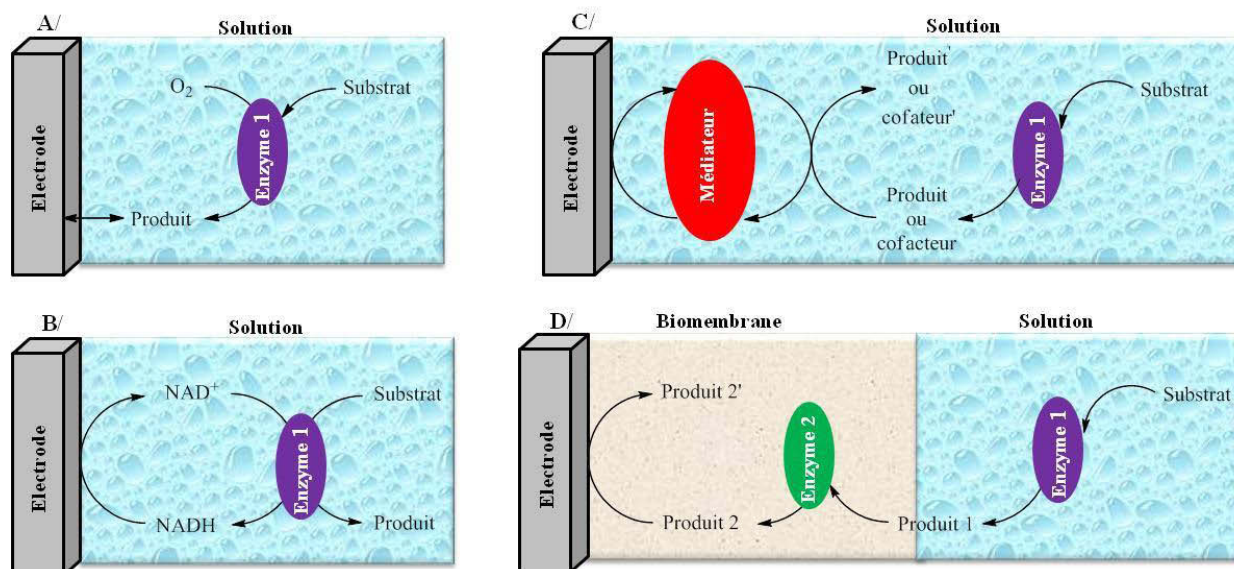


Figure II.1 : Détermination de l'activité enzymatique en solution par voie électrochimique A/ Détection directe du produit B/ Détection du cofacteur C/ Détection avec un médiateur redox, qui peut être soit en solution, soit immobilisé D/ Détection avec une enzyme auxiliaire immobilisée

Dans le premier cas, le produit formé lors de la réaction enzymatique peut être détecté directement en chrono-ampérométrie par une réaction d'oxydo-réduction se produisant à l'électrode. C'est le cas pour le peroxyde d'hydrogène avec la glucose oxydase GO_x , ou l'acide urique avec la xanthine oxydase (XO_x)¹⁴. De même, l'apparition de la forme réduite du cofacteur NADH peut être également suivie par chrono-ampérométrie après l'ajout de l'alcool déshydrogénase (ADH) dans une solution d'électrolyte (Figure II.2).

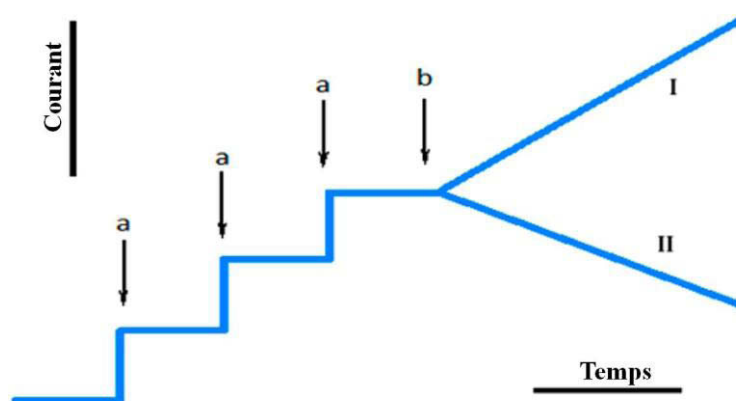


Figure II.2 : Détection directe en chrono-ampérométrie lors de la réaction enzymatique a : ajout du produit ou du cofacteur (NADH) à doser pour l'étalonnage, b : ajout de l'enzyme, I ou II : réponse ampérométrique du produit généré ou du substrat (ou cofacteur) consommé par unité de temps¹⁴

D'autres tests électrochimiques font appel à un médiateur rédox mais également dans certains cas à des enzymes auxiliaires. Le médiateur rédox peut être soit solubilisé dans la solution à analyser, soit immobilisé sur la surface de l'électrode. Par exemple, le NADH,

impliqué dans la mécanisme enzymatique de l'ADH a été dosé indirectement par l'intermédiaire de la *p*-nitroso-N,N-diméthyl aniline⁹. La détection de l'activité de l'AST et de l'ALT a été réalisée par un biocapteur impliquant deux enzymes auxiliaires, la pyruvate oxydase, et l'oxaloacétate décarboxylase¹¹.

Dans ce chapitre, nous présenterons les différentes étapes qui nous ont permis de développer un système électro-enzymatique pour détecter les activités des TKs d'*E. coli* et humaine *in vitro*, libre en solution. Comme dans les cas de l'AST et de l'ALT déjà décrits dans la littérature, une enzyme auxiliaire immobilisée à la surface de l'électrode sera envisagée. Dans le cadre de notre étude, deux biocapteurs ampérométriques ont été étudiés pour détecter l'activité des TKs. Le premier à polyphénol oxydase (PPO, EC 1.14.18.1) a précédemment été développé conjointement par les groupes du prof. L. Hecquet et du Dr. C. Mousty pour détecter l'activité de la TK de *S. cerevisiae* sous forme d'extrait brut en solution¹⁵. Le deuxième biocapteur à galactose oxydase (GAOx, EC 1.1.3.9) est sans précédent. Pour tester la faisabilité de la détection électro-enzymatique, la TK d'*E. coli* a été choisie comme modèle car elle est produite en plus grande quantité par rapport à la TK de *S. cerevisiae* et facilement purifiée grâce à la présence d'une étiquette six histidines. Le système sera appliqué ensuite à la TK humaine. En effet, une collaboration établie à la fin de cette thèse avec l'équipe du Prof. G. Sprenger (Stuttgart, Allemagne) nous a permis d'obtenir une souche recombinante d'*E. coli* surexprimant la TK humaine.

II.2. Obtention des TKs

II.2.1. Méthode de purification

Pour développer ces travaux, nous avons utilisé trois sources de TK : la TK de *S. cerevisiae* surexprimée dans *S. cerevisiae* et les TKs d'*E. coli* et humaine surexprimées dans *E. coli* avec une étiquette six histidines en position N-terminale. Ces TKs ont été obtenues dans le cadre de collaborations antérieures avec le Prof. G. Schneider (Université de Stockholm, Suède) pour la TK de *S. cerevisiae*, avec le Prof. W. D. Fessner (Université de Darmstadt, Allemagne) pour la TK d'*E. coli* et avec le Prof. G. Sprenger (Université de Stuttgart, Allemagne) pour la TK humaine.

Les souches sont cultivées au laboratoire et les enzymes recombinantes sont exprimées sous le contrôle de l'opéron lactose et l'induction est réalisée avec de l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). La TK de *S. cerevisiae* est extraite des cellules par une lyse sous pression et les TKs d'*E. coli* et humaine par sonication. Après élimination des débris cellulaires par centrifugation, les extraits bruts sont semi-purifiés par chromatographie sur résine anionique (Q-sépharose) pour la TK de *S. cerevisiae* et purifiés par chromatographie sur résine Ni-NTA (nickel acide nitrilotriacétique), pour les TK d'*E. coli* et humaine.

Le principe de la purification des TKs comportant une étiquette six histidines consiste à fixer par des liaisons covalentes de coordination les six histidines portées par l'enzyme à une résine Ni-NTA contenue dans une colonne. Ensuite, il est nécessaire d'éluer l'enzyme en utilisant une solution tampon contenant une molécule compétitrice capable de complexer avec les ions nickel et qui ne dénaturera pas l'enzyme (Figure II.3).

La méthode classique pour purifier les protéines portant une étiquette six histidines dans des conditions non dénaturantes préconise une élution avec une solution tampon contenant une forte concentration d'imidazole. L'histidine et l'imidazole ont une homologie de structure, ces composés possèdent un noyau imidazole. L'imidazole en prenant la place de l'histidine sur la résine Ni-NTA va alors permettre l'élution de la TK. Ainsi, en une seule étape, la protéine est purifiée.

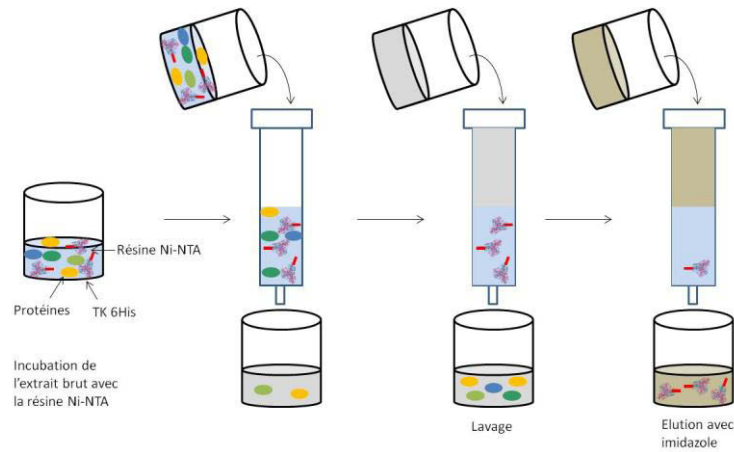


Figure II.3 : Purification par chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA

La TK n'étant pas stable en présence d'imidazole, celui-ci est éliminé par ultrafiltration ou par dialyse et la TK est recueillie dans le tampon choisi. Cette technique permet de plus de concentrer les extraits de TK. Une électrophorèse dénaturante (SDS-PAGE) révélée au bleu de Coomassie a été réalisée avec des échantillons de l'extrait brut et purifié. Cette méthode permet de séparer les protéines selon leur masse molaire sous l'effet d'un champ électrique. La Figure II.4 montre la présence après purification s'une seule bande correspondant au poids moléculaire d'un monomère de chaque TK (70 et 72,5 kDa pour la TK humaine et d'*E. coli*).

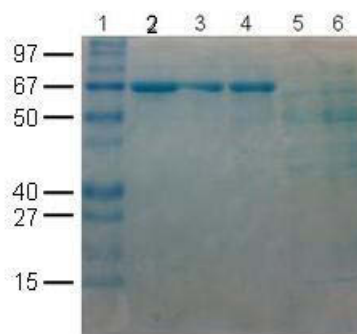


Figure II.4 : Electrophorèse dénaturante (SDS-PAGE) 1) marqueur de masses moléculaires 2 et 3) extrait purifié TK d'*E. coli* 4) extrait purifié TK humaine 5) extrait brut TK humaine 6) extrait brut TK d'*E. coli* (pour chaque échantillon, 20 μ L sont déposés)

II.2.2. Détermination de l'activité des TKs

Après purification, l'activité des TKs a été déterminée en présence de L-érythrulose (L-Ery) comme substrat donneur et du D-ribose-5-phosphate (D-R5P) comme substrat accepteur¹. Le glycolaldéhyde libéré, est alors réduit par une enzyme auxiliaire, l'alcool déshydrogénase, en présence de NADH, H^+ (Figure II.5). La disparition du NADH est suivie à 340 nm par spectrophotométrie. La concentration en protéine est déterminée par le test

spectrophotométrique dit test de Bradford¹⁶. Ce test est basé sur l'utilisation du bleu de Coomassie dont la couleur s'intensifie lorsqu'il se lie aux acides aminés basiques et aromatiques.

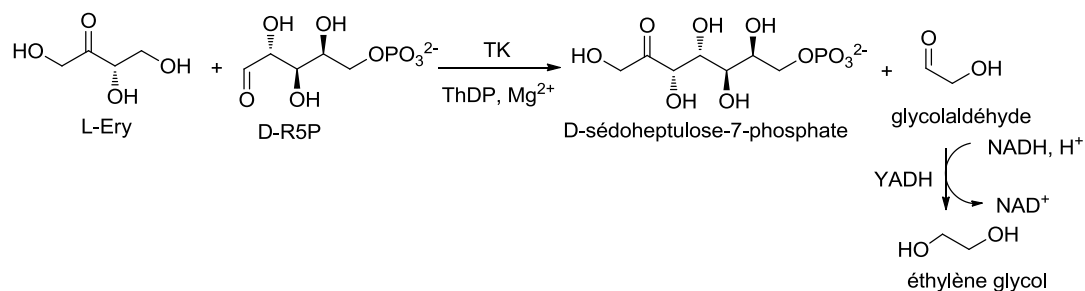


Figure II.5 : Test d'activité basé sur l'utilisation du L-Ery comme substrat donneur

Le Tableau II.1 montre qu'à 25°C la TK d'*E. coli* purifiée a la meilleure activité spécifique (35 U.mg⁻¹). De plus, à cette température la TK humaine est inactive. Pour observer une activité avec la TK humaine, il faut se placer à une température de 37°C, mais son activité reste largement inférieure à celle d'*E. coli* dans les mêmes conditions (Tableau II.2). Cette faible activité a également été constatée par l'équipe de Prof. Sprenger qui nous l'a fournie (données non publiées). Il sera nécessaire d'envisager l'étude plus fine du spectre d'activité de la TK humaine car les substrats utilisés dans ce test conduisent à de faibles activités avec la TK humaine.

Tableau II.1 : Caractéristiques des TKs de *S. cerevisiae*, d'*E. coli* et humaine à 25°C

TK	Quantité de cellules (g)	Volume (mL)	Quantité totale de protéines (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U.mg ⁻¹)
<i>S. cerevisiae</i> brute	5	50	60	260	4,5 ± 1
<i>S. cerevisiae</i> semi-purifiée	5	50	51	100	3,9 ± 1
<i>E. coli</i> brute	5	40	515	8240	16 ± 2
<i>E. coli</i> purifiée	5	10	200	7050	35 ± 2
Humaine brute	4	40	305	0	0
Humaine purifiée	4	7	10	0	0

Tableau II.2 : Caractéristiques des TKs d'*E. coli* et humaine à 37°C

TK	Quantité de cellules (g)	Volume (mL)	Quantité totale de protéines (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U.mg ⁻¹)
<i>E. coli</i> purifiée	5	10	200	50400	252 ± 7
Humaine purifiée	4	7	10	19,7	2,0 ± 0,3

II.3. Biocapteur ampérométrique à polyphénol oxydase

II.3.1. Principe

Un biocapteur à polyphénol oxydase (PPO, EC 1.14.18.1) a été développé précédemment au laboratoire pour permettre la détection de l'activité de la TK de *S. cerevisiae* libre en solution (sous forme d'extrait brut ou semi-purifié), selon la réaction décrite dans la Figure II.6¹⁵. Le biocapteur était préparé par immobilisation de la PPO à la surface d'une électrode de carbone vitreux par encapsulation de l'enzyme dans une matrice hydroxydes doubles lamellaire (HDL) de type Zn₂Al-Cl.

Le composé **1**, synthétisé au laboratoire¹⁷, est utilisé comme substrat donneur de la TK en présence de D-R5P comme substrat accepteur. Ce composé **1** comporte un motif reconnu par la TK (cétose D-thréo) et un groupement partant, l'ester éthylique de la N-acétyl-L-tyrosine (N-Ac-Tyr-OEt). Des études antérieures menées au laboratoire ont montré que le composé **1** est un substrat de la TK qui conduit après rupture de la liaison C₂-C₃ à la formation de l' α -hydroxyaldéhyde (composé **2**)¹⁷. L'albumine de sérum bovin (BSA) joue alors le rôle de catalyseur basique *via* ses résidus lysine et catalyse une réaction de β -élimination conduisant à la libération du groupement partant, la N-Ac-Tyr-OEt **3**. Le composé **3** est alors oxydé par la PPO en orthoquinone (composé **4**) qui est réduite à -0,2 V / Ag-AgCl en diphenol (composé **5**) traduisant ainsi l'activité de la TK par un courant électrique mesurable.

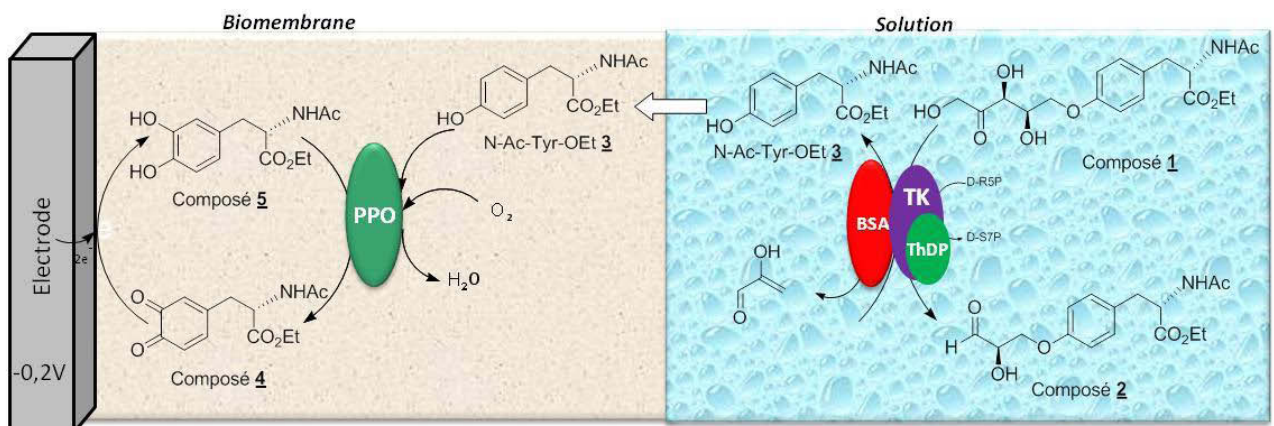


Figure II.6 : Détection de l'activité de la TK de *S. cerevisiae* en solution avec le biocapteur à PPO

Dans le cadre de cette thèse, nous avons envisagé d'appliquer cette stratégie à la TK d'*E. coli* car il est possible de la produire en plus grande quantité que la TK de *S. cerevisiae* et sous forme purifiée grâce à l'étiquette six histidines. Nous allons maintenant exposer de façon plus détaillée la synthèse du composé **1** qui a été optimisée par rapport à celle déjà décrite¹⁷. La transformation du composé **1** par la TK sera ensuite étudiée par électrochimie et par LC/MS.

II.3.2. Synthèse du composé **1**, substrat de la TK

Le motif *D-thréo* (3*S*, 4*R*) du composé **1** a été généré par voie enzymatique en faisant intervenir une aldolase catalysant la formation stéréospécifique de la liaison C₃-C₄ (3*S*, 4*R*). Cette approche permet de créer en une étape les deux centres chiraux souhaités. L'intérêt de privilégier une voie chimio-enzymatique par rapport à une voie chimique est bien sûr de limiter les étapes de protection et déprotection des différentes fonctions (Figure II.7).

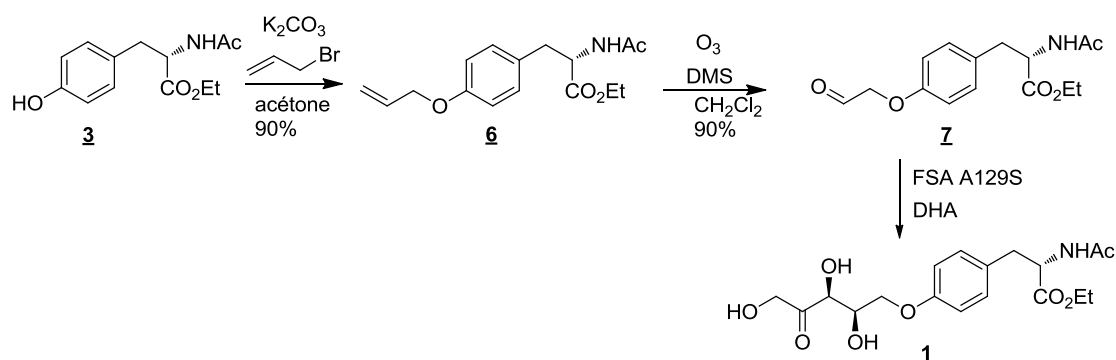


Figure II.7 : Synthèse du composé **1** (DMS : sulfure de diméthyle, FSA : fructose-6-phosphate aldolase mutée et DHA : dihydroxyacétone)

II.3.2.1. Synthèse de l'aldéhyde **7**

La synthèse de l'aldéhyde a été envisagée selon une voie décrite dans la littérature¹⁷, en deux étapes à partir de l'ester éthylique de la *N*-acétyl-*L*-tyrosine commerciale **3** (N-Ac-Tyr-OEt). Cette stratégie consiste à obtenir la fonction aldéhyde à partir du dérivé allylique.

La synthèse du dérivé allylique **6** a été effectuée à partir du composé **3** dans l'acétone en présence de carbonate de potassium et de bromure d'allyle (Figure II.7). Après l'addition des réactifs à température ambiante, la réaction est laissée au reflux de l'acétone pendant 4 heures. Après purification par plusieurs lavages à l'éther, le composé **6** est obtenu sous la

forme d'un solide blanc avec un rendement de 90 %. L'analyse du spectre de RMN ^1H confirme l'obtention du composé **6** par la présence entre autre de deux doublets à 5,28 et 5,40 ppm avec des constantes de couplage de 12 et 20 Hz caractéristiques des protons éthyléniques. L'analyse du spectre de RMN ^{13}C indique des déplacements caractéristiques des deux carbones éthyléniques à 117,3 et 133,1 ppm.

Le dérivé aldéhydique **7** a été obtenu à partir du dérivé allylique **6** par une réaction d'ozonolyse de la double liaison à -78°C dans le dichlorométhane (Figure II.7). Après purification sur gel de silice, le composé **7** est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 90 %. L'aldéhyde **7** subit ensuite plusieurs lavages à l'éther. L'oxydation de la double liaison est confirmée par l'analyse des spectres de RMN ^1H (disparition des deux doublets à 5,28 et 5,40 ppm caractéristiques des protons éthyléniques et apparition du proton aldéhydique à 9,82 ppm) et de RMN ^{13}C (présence d'un signal caractéristique de la fonction aldéhyde à 199,4 ppm).

II.3.2.2. Synthèse enzymatique du composé **1**

Pour accéder au composé **1**, nous avons modifié le protocole déjà décrit¹⁷. En effet selon cette stratégie, le composé **1** était obtenu en deux étapes, la première permettait la condensation de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) sur le composé **7** en présence de la fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBPA) suivi d'une deuxième étape de déphosphorylation catalysé par la phosphatase acide. Le DHAP n'étant pas commercial et la synthèse de celui-ci conduisant à un faible rendement (12 %), nous avons envisagé une voie enzymatique qui implique l'analogue non phosphorylé du DHAP, la dihydroxyacétone (DHA) qui est commerciale. Cette stratégie est rendue possible par la découverte récente d'une aldolase¹⁸ qui accepte d'autres substrats accepteurs que le DHAP : la fructose-6-phosphate aldolase (FSA). Elle a depuis été modifiée pour la rendre plus efficace pour la DHA par mutation d'un résidu en position 129¹⁹. Ainsi, nous avons pu obtenir le composé **1** en une étape au lieu de deux ; la condensation de la DHA sur le composé **7** étant catalysée par la FSA A129S, produite et purifiée au laboratoire à partir d'une souche recombinante d'*E. coli*¹⁹ (Figure II.7).

Après 24 heures de réaction, l'aldéhyde **7** est totalement consommé comme l'indique le suivi par CCM. La méthode de purification la plus performante consiste en une première chromatographie sur gel de silice suivi d'une extraction en phase solide (phase inverse). Le composé **1** est alors obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 24 %. Ce

faible rendement peut être du à la dégradation du substrat et/ou du produit notamment par la libération du groupement partant dans le milieu réactionnel.

La stabilité du composé **7** a été étudiée par RMN, celui-ci a été dissous dans le tampon Gly-Gly 200 mM à pH 7,5. Après 24 heures, on observe une dégradation de l'aldéhyde dans ce tampon de l'ordre de 50 %. La stabilité de ce composé a été étudiée dans d'autres tampons : borate et HEPES. L'aldéhyde **7** s'est avéré stable dans ces deux derniers tampons. Les fonctions amines du tampon Gly-Gly doivent réagir avec la fonction aldéhyde de l'accepteur pour donner des bases de Schiff.

La synthèse du composé **1** a donc été effectuée dans le tampon HEPES 100 mM à pH 7,5, le composé **1** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 60 %. L'analyse des spectres de RMN ¹³C confirme la formation du composé **1** par la présence d'un signal à 68,0 ppm correspondant au carbone portant la fonction alcool primaire et d'un signal à 213,4 ppm correspondant au carbonyle.

En résumé, le composé **1** a été obtenu en trois étapes avec un rendement global de 49 % à partir de la N-Ac-Tyr-OEt **3**. Ce rendement est légèrement inférieur à celui obtenu en utilisant la FBPA à partir du DHAP comme substrat donneur mais cette stratégie nécessite la préparation de ce substrat alors que la DHA utilisée dans cette nouvelle synthèse du composé **1** est commerciale.

II.3.3. Suivi de la transformation du composé **1** par la TK en voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique (VC) permet de suivre la libération de la N-Ac-Tyr-OEt **3**. Cette méthode électrochimique permet de réaliser la détection de l'activité enzymatique directement à l'électrode.

Lors de la première étape catalysée par la TK, la liaison C₂-C₃ du composé **1**, substrat donneur, est rompue pour donner l' α -hydroxyaldéhyde **2** correspondant. Le substrat accepteur utilisé est le D-R5P La BSA joue alors le rôle de catalyseur basique *via* ses résidus lysine et catalyse une réaction de β -élimination de l'aldéhyde **2** conduisant à la libération du groupement partant, la N-Ac-Tyr-OEt **3** (Figure II.8). Cette stratégie a été déjà utilisée par notre groupe⁸ avec la TK et par d'autres groupes avec divers enzymes tel que celui du Pr. J.L. Reymond^{20,21} avec l'alcool déshydrogénase en présence de composés analogues comportant une coumarine comme groupement partant.

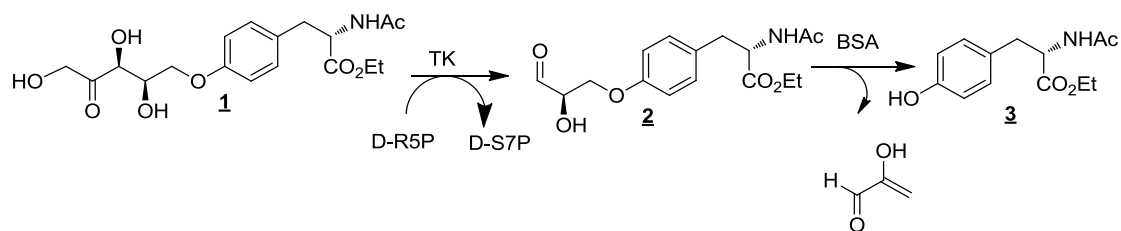
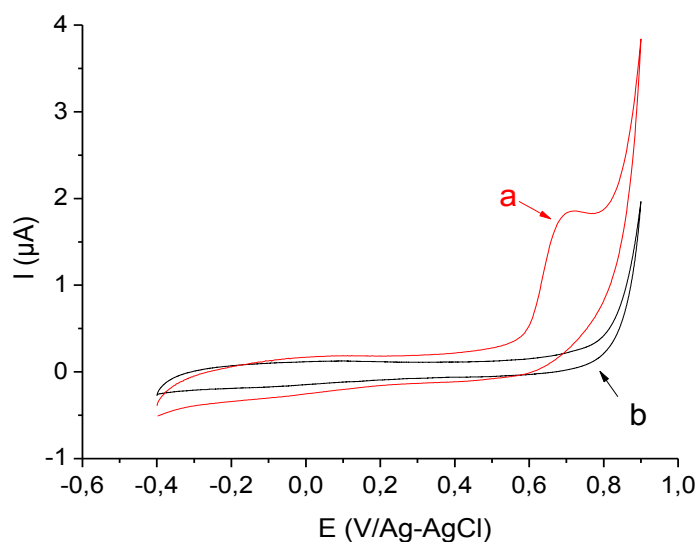


Figure II.8 : Réactions suivies par VC

Les courbes d'intensité-potential permettent d'étudier les processus d'oxydo-réduction se produisant à la surface de l'électrode et de mettre en évidence la présence d'espèces électro-actives dans une solution. Ainsi, la voltammétrie cyclique (VC) permet de suivre la libération de la N-Ac-Tyr-OEt **3**, car elle contient une fonction phénol facilement oxydable. Cette méthode électrochimique permet donc de réaliser la détection directement à l'électrode de l'activité enzymatique en solution.

Une première étude sans la TK a été réalisée afin de montrer que la N-Ac-Tyr-OEt **3** était détectable sans interférence avec le composé **1**. La Figure II.9 montre les courbes de VC enregistrées sur électrode de carbone vitreux dans une solution de 100 μM de N-Ac-Tyr-OEt **3** et de 100 μM de composé **1** dans un tampon acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique (MOPS) 0,05 M à pH 7,5. Pour la N-Ac-Tyr-OEt **3**, un pic anodique à 0,7 V est observé correspondant à l'oxydation de la fonction phénol. Comme attendu, aucun signal n'est observé pour le composé **1**.

Figure II.9 : Voltammogrammes de a) 100 μM de N-Ac-Tyr-OEt **3** et de b) 100 μM de composé **1** (0,05 M MOPS pH 7,5, $\nu = 25 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$)

Une seconde étude a été réalisée pour suivre la transformation du composé **1** catalysée par la TK pendant une nuit par VC conduisant à la formation de la N-Ac-Tyr-OEt **3**, composé

électroactif. Les mesures de VC ont été enregistrées dans le milieu réactionnel contenant la BSA en faisant varier la concentration en composé **1** et le nombre d'unités de TK (Figure II.10).

Avec la TK d'*E. coli* purifiée, une augmentation du pic d'oxydation à 0,6 V est observé au bout d'une nuit quand la concentration en composé **1** ou la quantité de TK augmentent. Des résultats similaires avaient été obtenus avec la TK de *S. cerevisiae* semi-purifiée. Cependant il faut signaler qu'un phénomène de passivation de l'électrode se produit à partir d'un deuxième cycle en VC dû à des réactions de polymérisation consécutives à l'oxydation de dérivés phénoliques. Ce phénomène conduit à une diminution du signal ampérométrique.

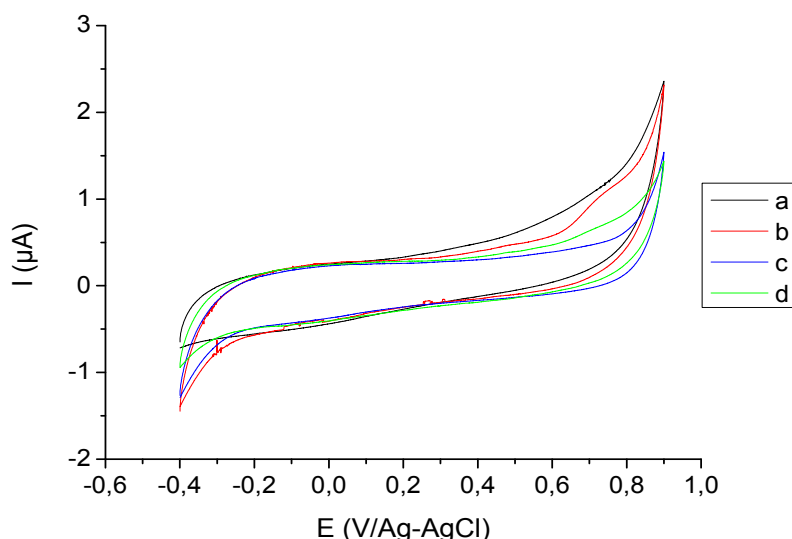


Figure II.10 : Courbes de voltammétrie cyclique avec la TK a) 500 μM de composé **1** et 1 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ de TK de *S. cerevisiae* b) 500 μM de composé **1** et 1 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ de TK de *E. coli* c) 100 μM de composé **1** et 1 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ de TK de *E. coli* d) 100 μM de composé **1** et 3 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ de TK de *E. coli* (0,05 M MOPS pH 7,5, 2 mM ThDP, 3 mM MgCl_2 , 100 μM D-R5P, 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA, $\nu = 25 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$)

Pour pallier cet inconvénient et obtenir une meilleure sensibilité, une autre approche a été envisagée. Nous avons effectué la détection ampérométrique de la N-Ac-Tyr-OEt **3** avec un biocapteur à PPO. En effet, cette méthode permet de s'affranchir du phénomène de passivation de l'électrode par une détection non plus en oxydation mais en réduction. De plus, la sensibilité est augmentée par un phénomène d'amplification provenant de la génération à l'électrode du catéchol **5**, lui-même substrat de la PPO.

II.3.4. Amplification par détection électro-enzymatique

II.3.4.1. Optimisation du biocapteur à PPO

L'utilisation d'une bioélectrode sur laquelle est immobilisée la PPO permet la détection électro-enzymatique de la N-Ac-Tyr-OEt **3** grâce à la réduction de l'orthoquinone à $-0,2$ V/Ag-AgCl en catéchol qui est lui-même un substrat de la PPO et permet donc l'amplification du signal (Figure II.11).

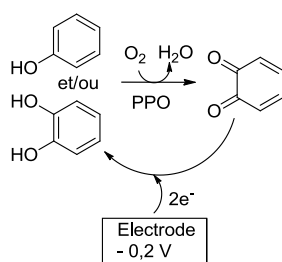


Figure II.11 : Réaction catalysée par la PPO suivie d'une réduction électrochimique

Les bioélectrodes ont été préparées suivant le protocole décrit dans la littérature¹⁵ en immobilisant l'enzyme dans une matrice HDL par la méthode d'adsorption. Afin d'optimiser la réponse du biocapteur, pour le dosage de la N-Ac-Tyr-OEt **3**, la nature du tampon (MOPS et Gly-Gly) et différentes matrices HDL (Mg_2Al-Cl , Zn_2Al-Cl et $Zn_2Al-Alginate$) ont été testées, le rapport PPO/HDL étant toujours fixé à 1.

Pour établir les courbes d'étalonnage, des quantités croissantes d'une solution mère de N-Ac-Tyr-OEt **3** sont utilisées. La réponse du biocapteur sera enregistrée par chrono-ampérométrie à un potentiel appliqué (E_{app}) de $-0,2$ V/Ag-AgCl sur électrode tournante. La réponse en courant de réduction (I_{cat}) est enregistrée en fonction du temps (Figure II.12). La courbe d'étalonnage est établie à partir de ces données (Figure II.13), la sensibilité (S) du biocapteur est définie à partir de la pente de la partie linéaire, le domaine de linéarité (DL) étant choisi en fonction du meilleur coefficient de corrélation (R^2). Le courant maximum (I_{max}) correspond à la concentration de saturation du biocapteur. Enfin, la limite de détection (LoD) est calculée pour un rapport signal/bruit de 3.

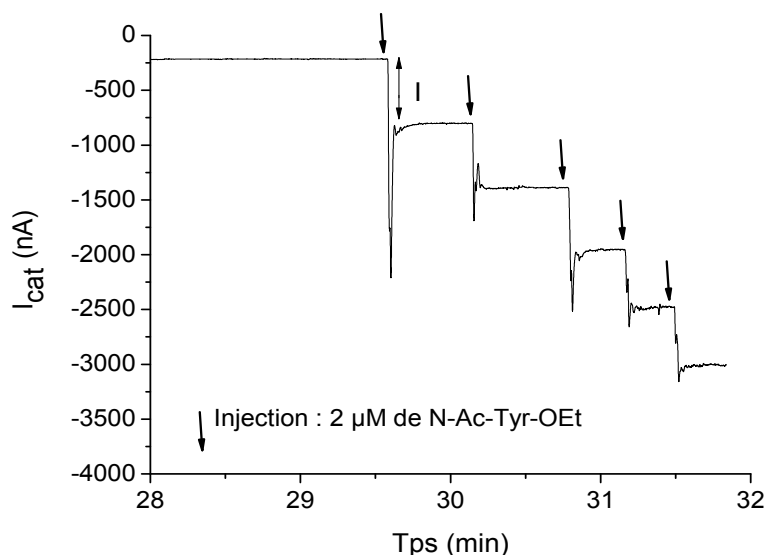


Figure II.12 : Réponse du biocapteur à PPO@Zn₂Al-Alg après ajout de 5 x 2 μM de N-Ac-Tyr-OEt **3** (de 2.10⁻³ mM à 10.10⁻³ mM) (0,05 M MOPS pH 7,5, E_{app} = -0,2 V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

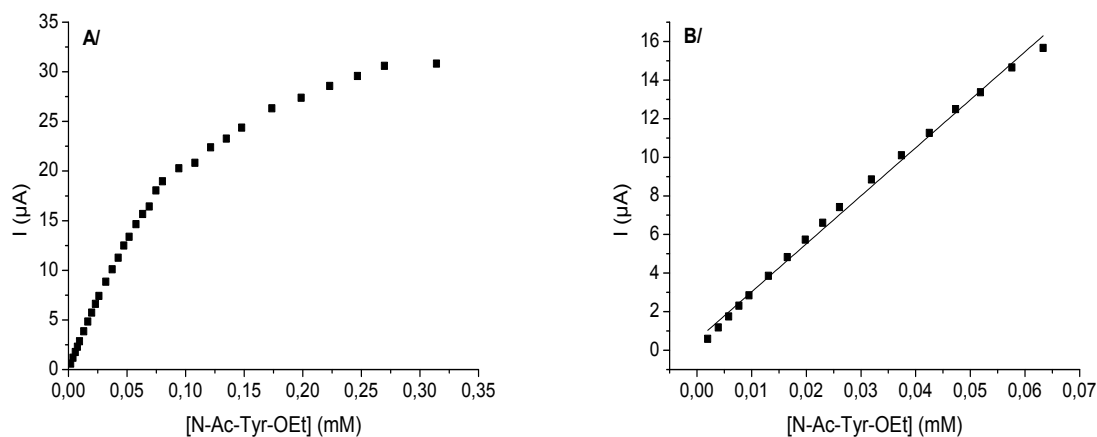


Figure II.13 : A/ Courbe d'étalonnage du biocapteur à PPO@ZnAl-Alg avec la N-Ac-Tyr-OEt **3**
B/ Domaine de linéarité de la courbe d'étalonnage (0,05 M MOPS pH 7,5, E_{app} = -0,2 V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

Les caractéristiques des biocapteurs à PPO sont comparées dans le Tableau II.3 en faisant varier la nature des anions interlamellaires et des cations métalliques divalents des feuillettes de l'HDL et celle du tampon (0,05 M MOPS et Gly-Gly à pH 7,5). Comme montré par Sanchez-Paniagua Lopez²² avec le catéchol, le biocapteur construit en utilisant l'HDL Zn₂Al-Alg conduit à la meilleure sensibilité.

Cette matrice est donc retenue pour réaliser l'étalonnage du biocapteur avec la N-Ac-Tyr-OEt **3** dans le milieu réactionnel qui sera nécessaire au fonctionnement de la TK d'*E. coli* (Tableau II.4). Le tampon utilisé est le MOPS puisqu'il donne la plus grande sensibilité. Dans ces conditions nécessaire à la TK, on note une diminution des performances

du biocapteur, la sensibilité est diminuée de 28 % sans TK et 33 % en présence de TK par rapport au milieu réactionnel, contenant seulement le tampon MOPS.

Tableau II.3 : Caractéristiques des biocapteurs à PPO selon la nature de l'HDL et du tampon pour le dosage de la N-Ac-Tyr-OEt **3 (0,05 M MOPS ou Gly-Gly pH 7,5, $E_{app} = -0,2$ V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)**

HDL	Milieu	S (mA.M ⁻¹ .cm ⁻²)	I _{max} (μA.cm ⁻²)	DL (M)	R ² (n)	LoD (M)
Mg ₂ Al-Cl	MOPS	598	104	2.10 ⁻⁶ - 6.10 ⁻⁵	0,9978 (21)	2.10 ⁻⁶
Zn ₂ Al-Cl	MOPS	459	79	2.10 ⁻⁶ - 6.10 ⁻⁵	0,9974 (17)	2.10 ⁻⁶
Zn ₂ Al-Alg	MOPS	1305	157	2.10 ⁻⁶ - 6.10 ⁻⁵	0,9963 (17)	2.10 ⁻⁶
Zn ₂ Al-Alg	Gly-Gly	1016	159	2.10 ⁻⁶ - 9.10 ⁻⁵	0,9960 (18)	2.10 ⁻⁶

Tableau II.4 : Caractéristiques du biocapteur PPO@Zn₂Al-Alg selon la composition du milieu réactionnel pour le dosage de la N-Ac-Tyr-OEt **3 a) 0,05 M MOPS pH 7,5 b) 0,05 M MOPS pH 7,5, 2 mM ThDP, 3 mM MgCl₂, 2 mg.mL⁻¹ BSA c) condition identique à b avec 5 U TK d'*E. coli***

milieu	S (mA.M ⁻¹ .cm ⁻²)	I _{max} (μA.cm ⁻²)	DL (M)	R ² (n)	LoD (M)
a	1305	157	2.10 ⁻⁶ - 6.10 ⁻⁵	0,9963 (17)	2.10 ⁻⁶
b	941	164	2.10 ⁻⁶ - 6.10 ⁻⁵	0,9997 (17)	2.10 ⁻⁶
c	878	186	2.10 ⁻⁶ - 9.10 ⁻⁵	0,9995 (21)	2.10 ⁻⁶

Le biocapteur utilisé pour déterminer l'activité de la TK libre en solution aura les caractéristiques suivante : PPO@Zn₂Al-Alg (50/50, μg/μg) avec une sensibilité de 878 mA.M⁻¹.cm⁻², un domaine de linéarité de 2.10⁻⁶ à 9.10⁻⁵ M, un courant maximum de 186 μA.cm⁻² et une limite de détection de 2.10⁻⁶ M.

II.3.4.2. Performance du biocapteur PPO@Zn₂Al-Alg pour la détection de l'activité de la TK

Des tests en chrono-ampérométrie (CA) ont ensuite été effectués avec le biocapteur PPO@Zn₂Al-Alg en présence de TKs d'*E. coli* (purifiée) et de *S. cerevisiae* (semi-purifiée et brute) libre en solution (1 U.mL⁻¹) dans le milieu réactionnel nécessaire à la réaction catalysée par la TK (Tableau II.5). La réponse, rapide (29 s) est enregistrée après les additions successives de 20 μM de composé **1**.

En l'absence de TK, nous obtenons 0,3 % de N-Ac-Tyr-OEt **3** formée à partir 100 μM de composé **1**, provenant de la libération de la N-Ac-Tyr-OEt **3** par la BSA. Nous obtenons un résultat identique en présence de TK de *S. cerevisiae* brute.

En présence de la TK d'*E. coli* purifiée, le taux de conversion est à peine supérieur (0,4 %). Cependant la transformation du composé **1** est multipliée par un facteur 2 (0,8 %) en augmentant la concentration en D-R5P (1 mM), une valeur cinq fois supérieure au K_M . En conclusion, les taux de conversion restent faibles mais il faut bien noter que selon ce système ils sont mesurés seulement quelques secondes après l'ajout du composé **1**.

Tableau II.5 : Résultats obtenus par chrono-ampérométrie avec la TK en solution

source TK	TK (U)	[D-R5P] (μ M)	% N-Ac-Tyr-OEt formée
non	0	100	0,3
<i>S.cerevisiae</i> brute	5	100	0,3
<i>S.cerevisiae</i> semi-purifiée	5	100	0,4
<i>E. coli</i> purifiée	5	100	0,4
<i>E. coli</i> purifiée	5	1000	0,8
<i>E. coli</i> purifiée	10	1000	0,8

Pour pallier cet inconvénient, le suivi d'activité de la TK a été réalisé toutes les heures pendant 3 heures et après 24 heures dans le milieu réactionnel. Les bioélectrodes PPO@Zn₂Al-Alg ont été utilisées avec 5 ou 10 U de TK d'*E. coli* purifiée, 100 ou 1000 μ M de D-R5P et 100 et 200 μ M de composé **1**. Des courbes intensités/potentiel ont été enregistrées en voltammétrie linéaire (VL) sur électrode tournante après différentes durées d'incubation. La Figure II.14, montre clairement après 24 heures de réaction une vague de réduction autour de -0,2 V/Ag-AgCl liée à la réduction de l'orthoquinone issu de la transformation de la N-Ac-Tyr-OEt **3**. L'intensité du courant mesurée peut être convertie en concentration en N-Ac-Tyr-OEt **3** formé grâce à la droite d'étalonnage. Le Tableau II.6 reprend les vitesses de transformation ainsi déterminées en μ M.h⁻¹ et le pourcentage de transformation atteint après 24 heures.

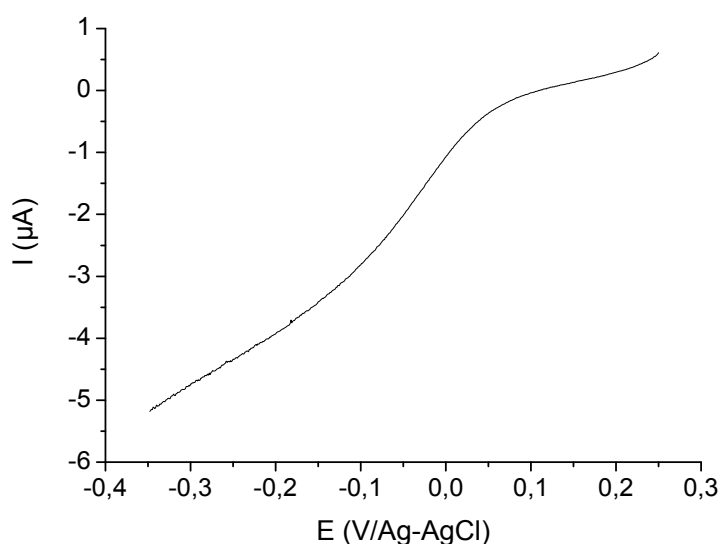


Figure II.14 : Courbe de voltammétrie linéaire avec la bioélectrode PPO@Zn₂Al-Alg, 25/25 µg/µg (0,05 M MOPS pH 7,5, 2 mM ThDP, 3 mM MgCl₂, 2 mg.mL⁻¹ BSA, 100 µM composé 1, 5 U TK *E. coli*, $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$)

Sans TK, après 24 h, 2,7 % de N-Ac-Tyr-OEt 3 sont formés provenant de la libération de la N-Ac-Tyr-OEt 3 par la BSA. Avec 5 U de TK d'*E. coli*, 8 % de N-Ac-Tyr-OEt 3 sont formés. Lorsque la quantité de TK double, le pourcentage de N-Ac-Tyr-OEt 3 est doublé. Avec 100 µM de composé 1 et 1 mM de D-R5P, 25 % de N-Ac-Tyr-OEt 3 sont obtenues. Cette même valeur de 25 % est retrouvée en doublant la concentration en composé 1 et en diminuant celle du D-R5P d'un facteur 10. De plus, l'augmentation de la concentration du composé 1 (200 µM) et de D-R5P (1 mM) a un effet favorable et coopératif sur le rendement de la réaction pour atteindre 49 %. Il faut cependant noter que les cinétiques (µM.h⁻¹) enregistrées sur 3 h, ne suivent pas cette tendance avec des valeurs très proches quelles que soient les concentrations en composé 1 et en D-R5P.

Tableau II.6 : Résultats obtenus par voltammétrie linéaire avec une bioélectrode PPO@Zn₂Al-Alg (0,05 M MOPS pH 7,5, 2 mM ThDP, 3 mM MgCl₂, 2 mg.mL⁻¹ BSA $\nu = 10 \text{ mV.s}^{-1}$)

TK <i>E. Coli</i> (U)	[Composé <u>1</u>] (µM)	[D-R5P] (µM)	pente après 3 heures (µM.h ⁻¹)	% de transformation après 24 heures de réaction
0	100	100	0,16	2,7
5	100	100	2,48	8
10	100	100	2,3	18
5	100	1000	3,46	25
5	200	100	3,24	25
5	200	1000	3,45	49

Afin d'élucider la raison de ce faible taux de transformation du composé **1** en N-Ac-Tyr-OEt **3**, nous avons suivi la cinétique de transformation du composé **1** par LC/MS.

II.3.5. Suivi de la transformation du composé **1** par la TK en LC/MS

Afin de suivre la transformation du composé **1**, substrat donneur de la TK et d'identifier les intermédiaires formés, des conditions d'analyse par LC/MS ont été mises au point antérieurement dans l'équipe du prof. L. Hecquet pour suivre la réaction catalysée par la TK de *S. cerevisiae* en présence du D-R5P comme accepteur¹⁷ et en présence de BSA.

Afin de pouvoir corréler la quantité de N-Ac-Tyr-OEt **3** libérée à l'activité de la TK, une droite d'étalonnage a été préalablement établie avec la N-Ac-Tyr-OEt **3** et avec le composé **1**. Puis, afin de suivre la disparition du composé **1** et l'apparition des composés **2** et **3**, des prélèvements du milieu réactionnel ont été réalisés après une nuit d'incubation dans le tampon MOPS. Des études antérieures réalisées au laboratoire ont montré que ce tampon est le plus adapté pour catalyser la libération de la N-Ac-Tyr-OEt **3** en solution. Les résultats obtenus en absence et en présence de différentes sources de TKs sous forme d'extrait brut, semi-purifiées et purifiées sont indiquées dans le Tableau II.7.

En absence de TK et en présence de BSA, il reste 95 % de composé **1**. Les 5 % de perte sont dus à la libération de N-Ac-Tyr-OEt **3** (< 5 μ M) par la BSA directement à partir du composé **1** (Tableau II.7). Dans le cas d'autres groupements partant notamment l'umbellifénone, cette réaction a été également observée²³.

Tableau II.7 : Résultats obtenus par LC/MS après une nuit d'incubation (50 mM MOPS, pH 7,5, 100 μ M composé **1, 1 mM D-R5P, 2 mM ThDP, 3 mM MgCl₂ et 2 mg.mL⁻¹ BSA)**

TK	Composé 1 consommé (%)	Aldéhyde 2 formé (%)	Diol formé (%)	N-Ac-Tyr-OEt 3 formée (%)
sans	5	0	0	< 5
<i>S. cerevisiae</i> brute	81	34	45	< 5
<i>S. cerevisiae</i> purifiée	74	60	0	14
<i>E.coli</i> purifiée	66	47	0	20

En présence des TKs de *S. cerevisiae* et d'*E. coli* et de BSA, 66 % à 81 % du composé **1** sont transformés. L'analyse des sous-produits de la réaction montre que pour la réaction catalysée par la TK de *S. cerevisiae* brute, une concentration inférieure à 5 μ M de N-Ac-Tyr-OEt **3** est obtenue. La présence d'un diol, représentant 45 % de la concentration initiale du composé **1**, est observée. Celui-ci peut provenir de la réduction de la fonction

aldéhyde du composé **2** par des déshydrogénases contenues dans l'extrait enzymatique de TK limitant ainsi la formation de N-Ac-Tyr-OEt **3**. Avec la TK de *S. cerevisiae* semi-purifiée par Q-sepharose, la concentration en N-Ac-Tyr-OEt **3** est augmentée d'un facteur 3 et le diol n'est plus présent. Ce résultat montre bien que les déshydrogénases présentes dans l'extrait sont responsables de la formation du diol. Enfin avec la TK d'*E. coli* purifiée par chromatographie d'affinité sur résine Ni-NTA, nous n'obtenons pas de diol et 20 % de N-Ac-Tyr-OEt **3** ce qui est similaire au résultat obtenu avec la TK de *S. cerevisiae* semi-purifiée. Dans tous les cas, il apparaît que l'aldéhyde **2** s'accumule dans le milieu et il reste majoritaire par rapport au N-Ac-Tyr-OEt **3**. La réaction de β -élimination catalysée par la BSA est donc limitante.

Des études réalisées dans l'équipe du prof. L. Hecquet avec des composés analogues comportant un groupement partant de type umbelliféone ont montré que la présence d'un groupement hydroxyle en position α de l'aldéhyde (Figure II.15) est beaucoup moins favorable à la réaction de β -élimination par rapport à des composés non α -hydroxylés (Figure II.16) en raison d'une plus grande stabilité de l'intermédiaire cis-énediolate formé dont la reprotonation est favorisée²³.

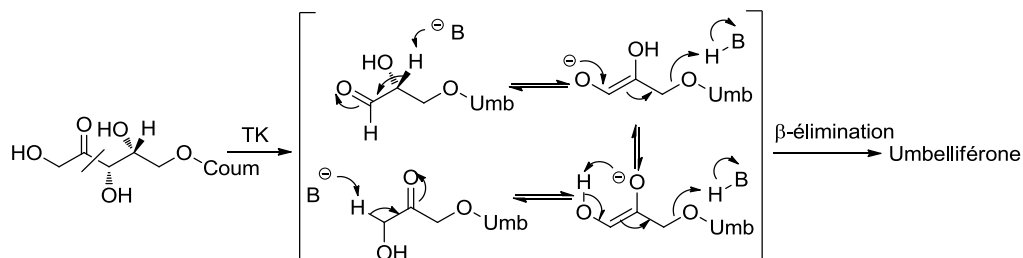


Figure II.15 : Réaction de β -élimination en présence d'aldéhydes α -hydroxylés (coum : coumarine)

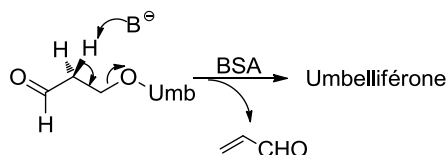


Figure II.16 : Réaction de β -élimination en présence d'aldéhydes non α -hydroxylés

De plus, des études par LC/MS avec le cétose fluorogénique utilisé comme substrat de la TK ont également montré une accumulation de l'aldéhyde α -hydroxylé indiquant que l'étape catalysée par la BSA est limitante.

II.3.6. Bilan des expériences réalisées avec le biocapteur à PPO

Les résultats obtenus en électrochimie (CV, VL et CA) montrent qu'il est possible de détecter l'activité de la TK d'*E. coli* libre en solution par une détection électro-enzymatique avec le biocapteur à PPO. Cependant, les meilleurs taux de conversion du composé **1**, substrat donneur de la TK, en l'ester éthylique de la N-acétyl-tyrosine **3** (N-Ac-Tyr-OEt) sont de l'ordre de 49 % après 24 heures de réaction, ce qui n'est pas compatible avec le développement d'un biocapteur dont la fonction est de donner une réponse rapide en quelques secondes. Les résultats obtenus en électrochimie couplés à ceux obtenus par LC/MS dévoilent clairement que dans ces conditions expérimentales la réaction de formation de la N-Ac-Tyr-OEt **3** à partir du composé **1** substrat donneur de la TK est très lente et limitée par la réaction de β -élimination, catalysée par la BSA. De plus le composé **1** a une faible activité vis-à-vis de la TK du fait de l'encombrement du groupement partant. Enfin, un autre handicap est la synthèse du composé **1** qui n'est pas commercial.

Pour pallier ces inconvénients, une activation de l'étape de β -élimination doit être proposée ou un autre substrat non synthétique ayant une meilleure affinité vis-à-vis de la TK doit être envisagé. Pour cette dernière solution, le produit obtenu après transformation par la TK sera différent, il faudra donc trouver un autre système de détection électro-enzymatique. Cette solution est abordée dans la suite de ce chapitre en utilisant un biocapteur à galactose oxydase.

II.4. Biocapteur ampérométrique à galactose oxydase

II.4.1. Principe

Pour déterminer l'activité de la TK libre en solution, un système électro-enzymatique faisant intervenir une autre oxydoréductase a été envisagé, le biocapteur à galactose oxydase (GAOx). Deux réactions faisant intervenir la TK peuvent être envisagées avec le biocapteur à GAOx (Figure II.17). La première réaction est réversible, la TK en présence de D-fructose-6-phosphate **8** (D-F6P), comme substrat donneur, rompt la liaison C₂-C₃ du D-F6P **8** et libère le L-érythrose **10** (L-Ery) et le D-érythrose-4-phosphate **11** (D-E4P). La deuxième réaction envisagée implique l'hydroxypyruvate **12** (HPA) comme substrat donneur, la TK libère le L-Ery **10** et du dioxyde de carbone qui rend la réaction irréversible. Dans les deux cas, le substrat accepteur est le glycolaldéhyde **9** (GA) qui est le meilleur substrat accepteur non phosphorylé pour la TK. L'avantage de ces stratégies par rapport à celles envisagées antérieurement repose sur les substrats donneurs utilisés qui sont de bien meilleurs substrats pour la TK que le composé **1** utilisé précédemment, et ils sont de plus commerciaux.

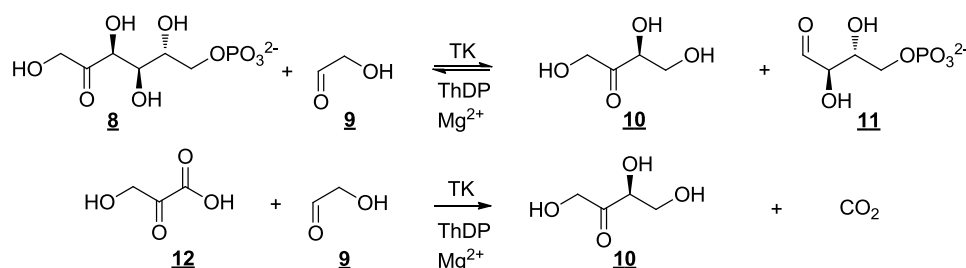


Figure II.17 : Réactions catalysées par la TK produisant du L-Ery

Ces deux stratégies ont en commun de libérer le L-Ery **10**. En effet comme nous le verrons par la suite, le L-Ery **10** peut être détecté par ampérométrie à l'aide d'un biocapteur à GAOx. Le L-Ery **10** est oxydé en (*S*)-2-dihydroxy-3-oxobutanal **13** par la GAOx qui utilise le couple O₂-H₂O₂. Le peroxyde d'hydrogène est dosé par son oxydation à l'électrode de platine, traduisant ainsi une activité de la TK en courant d'oxydation (I_{an}) mesurable (Figure II.18). La réponse du biocapteur est enregistrée par chrono-ampérométrie à un potentiel appliqué (E_{app}) de 0,6 V/Ag-AgCl.

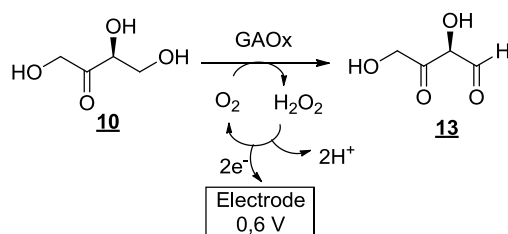


Figure II.18 : Détection du L-Ery avec le biocapteur à GAOx

Nous allons maintenant exposer de façon plus détaillée la mise au point du biocapteur ampérométrique à GAOx avec les différents facteurs étudiés. Nous verrons ensuite la détection de l'activité des TKs d'*E. coli* et humaine libre en solution avec la détermination de la constante de dissociation (K_D) du cofacteur de la TK, la thiamine diphosphate (ThDP).

II.4.2. Elaboration du biocapteur à galactose oxydase

La GAOx catalyse en présence d'oxygène l'oxydation du galactose mais aussi d'un grand nombre d'alcools primaires. Dans la littérature²⁴⁻²⁶, il est montré que la dihydroxyacétone (DHA) est meilleur substrat que le galactose. Nous avons donc choisi la DHA comme substrat modèle lors de la mise au point du biocapteur à GAOx (Figure II.19).

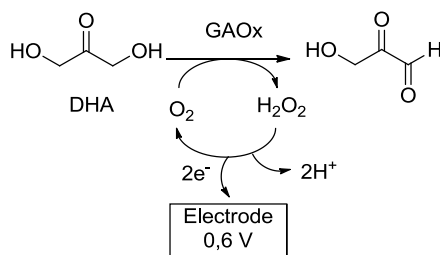


Figure II.19 : Réaction d'oxydation de la DHA par la GAOx suivi d'une oxydation électrochimique du H_2O_2

Les bioélectrodes ont été préparées à partir du protocole semblable à celui utilisé pour les bioélectrodes à base de PPO. Lors de l'élaboration de ce biocapteur, différents paramètres vont être étudiés tels que la nature de la matrice d'immobilisation avec le rapport GAOx : matrice, mais aussi la nature du tampon, le pH du milieu réactionnel, et enfin la stabilité dans le temps de ce biocapteur²⁷.

II.4.2.1. Choix de la matrice d'immobilisation

Une étude comparative de l'immobilisation de la GAOx a été réalisée sur deux argiles synthétiques, l'une cationique (la laponite) et l'autre anionique, HDL (Mg_2Al-NO_3). Comme les HDL, la laponite est une argile synthétique, mais commerciale, de type smectite. Elle est également très utilisée pour immobiliser efficacement des enzymes par adsorption pour la réalisation de biocapteurs²⁸. Il s'agit d'un composé de la famille des hectorites de formule structurale $(Mg_{5,5}Li_{0,5})Si_4O_{10}(OH)_2 (Na^+_x, nH_2O)$ ayant une morphologie en feuillets. Le feuillet des argiles de type smectite est composé d'une couche planaire formée par un cation en coordinance octaédrique, généralement l'aluminium ou magnésium encadrée de deux couches planaires de silicium en coordinance tétraédrique (Figure II.20). Les feuillets 2/1 ayant subi des substitutions isomorphiques sont chargés négativement et ont tendance à se repousser mutuellement. La présence d'un cation compensateur en position interfoliaire induit des interactions attractives entre les deux feuillets adjacents, provoquant un rapprochement des feuillets 2/1 et donc une diminution de l'espace inter-lamellaire. Le cation intercalé peut être plus ou moins hydraté et est échangeable.

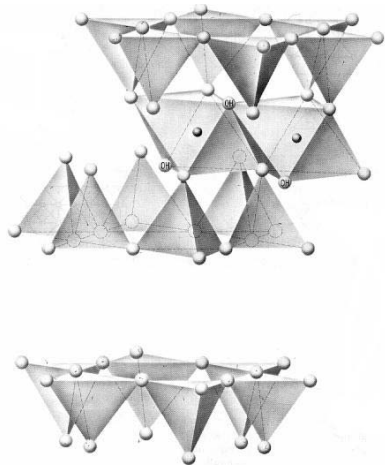


Figure II.20 : Représentation des feuilles de phyllosilicate (2/1)

Des études antérieures ont montré que les HDL étaient des matrices plus efficaces pour la réalisation de biocapteurs que la laponite, notamment avec la PPO^{29,30}. Ainsi, la diffusion des substrats et des produits de la réaction enzymatique à travers la couche active enzyme/matrice est un facteur important qui affecte la réponse du biocapteur. La perméabilité des biomembranes vis-à-vis de ces composés peut varier selon les matrices hôtes. Les HDL ont une perméabilité plus grande ($2 \cdot 10^{-2} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) que celle de la laponite ($2 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$) donc il

est possible d'espérer une meilleure sensibilité pour les biocapteurs à base d'HDL, comme cela a été montré dans le cas de la PPO.

Pour cette étude, le milieu réactionnel est saturé en O₂ afin de ne pas être limité par la concentration de ce cosubstrat. Trois tampons habituels des tests enzymatiques sont utilisés à 50 mM et pH 7,0, le phosphate, l'acide 4-(2-hydroxyéthyl)1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) et le MOPS. En effet, ces molécules ayant des structures différentes peuvent perturber l'interaction entre l'enzyme et les matrices hôtes. Les tampons 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (TRIS) et glycyl-glycine (Gly-Gly) également fréquemment utilisés dans les tests enzymatiques n'ont pas été étudiés car Petersen *et al.* ont montré une instabilité de la GAOx dans ces tampons qui pourrait être due à la complexation du cuivre contenu dans le site actif de l'enzyme et le groupement amine du tampon³¹.

Les caractéristiques des biocapteurs, selon leurs matrices d'immobilisation et la nature du tampon sont reprises dans le Tableau II.8. Le biocapteur construit en utilisant la laponite comme matrice d'immobilisation pour la GAOx présente de meilleures performances, quel que soit le tampon utilisé. Ainsi par rapport aux valeurs obtenues avec la matrice HDL, la sensibilité (S) est augmentée en moyenne d'un facteur 6, le domaine de linéarité (DL) est amélioré.

La différence de perméabilité entre les deux matériaux n'est donc pas le seul facteur intervenant dans la réponse du biocapteur. La quantité d'enzyme immobilisée active doit être également prise en compte. Cette quantité est reliée au courant maximum (I_{max}) qui est en moyenne 2,5 fois supérieur pour les biocapteurs GAOx@laponite alors que la même quantité d'enzyme et d'argile a été déposée sur l'électrode (50 µg : 50 µg) pour les deux types de biocapteurs. Ceci traduit une interaction spécifique entre l'enzyme et la matrice hôte. La GAOx ayant un point isoélectrique de 12³², est donc chargée positivement au pH d'immobilisation (pH = 7,0), ce qui permet une forte interaction avec les couches chargées négativement de la laponite. A titre de comparaison, Kondakova *et al.* ont montré que la GAOx est fortement adsorbée à la surface de la silice, qui est également chargée négativement à un pH de 7³³. Nous avons donc sélectionné la laponite comme matrice hôte pour l'immobilisation de la GAOx.

Tableau II.8 : Caractéristiques des biocapteurs GAOx@laponite (50:50 µg:µg) et GAOx@HDL(50:50 µg:µg) pour le dosage de la DHA (0,05 M tampon pH 7,0, E_{app} = 0,6 V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

Matrices	Tampons	S (mA.M ⁻¹ .cm ⁻²)	I _{max} (µA.cm ⁻²)	DL (M)	R ² (n)
Laponite	phosphate	195	176	5,0.10 ⁻⁷ - 4,8.10 ⁻⁴	0,9999 (56)
	HEPES	224	178	5,0.10 ⁻⁷ - 3,0.10 ⁻⁴	0,9999 (53)
	MOPS	180	140	5,0.10 ⁻⁷ - 4,3.10 ⁻⁴	0,9999 (56)
HDL (Mg ₂ Al-NO ₃)	phosphate	21	69	2,0.10 ⁻⁵ - 6,8.10 ⁻⁴	0,9990 (19)
	HEPES	38	72	2,0.10 ⁻⁶ - 6,1.10 ⁻⁴	0,9995 (40)
	MOPS	38	62	2,0.10 ⁻⁵ - 3,9.10 ⁻⁴	0,9993 (13)

II.4.2.2. Choix du tampon

La GAOx libre a un pH optimum de 7,0, nous avons étudié l'effet du pH du tampon sur la performance du biocapteur. Cette étude a été réalisée avec un biocapteur GAOx@HDL dans le tampon HEPES (Tableau II.9). Le pH qui permet d'obtenir la meilleure performance est de 7,0. En vue de la détection de l'activité de la TK avec ce biocapteur, nous n'avons pas étudié des pH inférieurs qui rendent la TK inactive. De plus, nous pouvons voir qu'avec l'HDL comme matrice hôte aucun tampon ne se démarque, mais qu'avec la laponite la sensibilité du biocapteur dans le tampon HEPES est la plus élevée (Tableau II.8). Nous avons donc sélectionné le tampon HEPES à pH 7,0 pour la suite de l'étude.

Tableau II.9 : Effet du pH sur la performance du biocapteur GAOx@HDL(50:50 µg:µg) pour le dosage de la DHA (0,05 M HEPES pH 7,0, E_{app} = 0,6 V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

pH	S (mA.M ⁻¹ .cm ⁻²)	I _{max} (µA.cm ⁻²)	DL (M)	R ² (n)
7,0	38	72	2.10 ⁻⁶ - 7.10 ⁻⁴	0,9994 (42)
7,5	26	65	2.10 ⁻⁶ - 7.10 ⁻⁴	0,9996 (36)
8	22	45	2.10 ⁻⁶ - 7.10 ⁻⁴	0,9995 (44)

II.4.2.3. Choix du rapport GAOx/laponite

La quantité d'enzyme immobilisée par rapport à la masse de matrice inorganique déposée sur l'électrode est aussi un facteur important dans la préparation d'un biocapteur. Nous avons donc étudié l'effet du rapport GAOx/laponite en masse/masse (Tableau II.10). La sensibilité et le courant maximum augmentent avec le rapport GAOx/laponite. Les rapports 50:50 et 50:25 apportent les meilleurs résultats en termes de sensibilité et de I_{max}, mais le biocapteur GAOx@laponite avec un rapport de 50:25 est plus stable dans le temps.

Tableau II.10 : Performances ampérométriques des différentes configurations du biocapteur GAOx@laponite pour le dosage de la DHA (0,05 M HEPES pH 7,0, $E_{app} = 0,6$ V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

Rapport GAOx/laponite (µg:µg)	S (mA.M ⁻¹ .cm ⁻²)	I _{max} (µA.cm ⁻²)	DL (M)	R ² (n)
25:25	140	121	$5,0.10^{-7} - 1,9.10^{-4}$	0,9997 (45)
50:50	224	178	$5,0.10^{-7} - 3,0.10^{-4}$	0,9999 (53)
25:50	83	88	$3,4.10^{-6} - 2,1.10^{-4}$	0,9996 (42)
50:25	237	155	$5,0.10^{-7} - 2,9.10^{-4}$	0,9999 (52)

II.4.2.4. Détection du galactose et des autres galactosides

Après optimisation du biocapteur GAOx@laponite avec la DHA, la détection du substrat naturel de la GAOx, le galactose a donc été effectuée. La sensibilité du biocapteur pour le galactose est de 85 mA.M⁻¹.cm⁻². D'autres saccharides composés de galactose tel que le raffinose, le lactose et le melibiose ont été également testés à une seule concentration de 20 µM. Les réponses en courant correspondent respectivement à 61, 19 et 89 % par rapport au galactose. L'activité relative de la GAOx pour ces substrats est similaire à celle reportée dans la littérature²⁵. La laponite n'induit aucune sélectivité des galactosides.

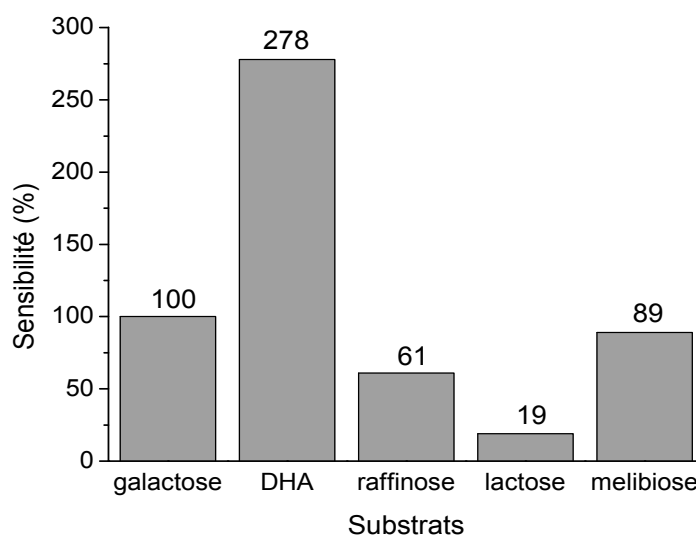


Figure II.21 : Réponses relative du biocapteur GAOx@laponite (50:25 µg:µg) avec différents substrats (0,05 M HEPES pH 7,0, $E_{app} = 0,6$ V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

II.4.2.5. Stabilité du biocapteur dans le temps

Pour finaliser notre étude, nous avons étudié la stabilité dans le temps du biocapteur GAOx@laponite 50:25 ($\mu\text{g}:\mu\text{g}$). Après un mois de conservation du biocapteur à 4°C dans 50 mM de tampon HEPES à un pH de 7,0, 75 % de l'activité initiale est retenue.

II.4.2.6. Bilan des expériences réalisées avec le biocapteur à GAOx

En résumé, cette étude a d'abord montré la mise au point d'un biocapteur à GAOx avec la détection de la DHA. Les caractéristiques du biocapteur qui apportent les meilleurs résultats sont l'immobilisation de la GAOx dans la laponite avec un rapport de 50:25 ($\mu\text{g}:\mu\text{g}$), l'utilisation du tampon HEPES à une concentration de 50 mM à un pH de 7,0. La reproductibilité des résultats a été testée sur cinq biocapteurs différents et les droites d'étalonnages du DHA donnent une sensibilité de $237 \pm 8 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, un courant maximum de $155 \pm 20 \mu\text{A}.\text{cm}^{-2}$, un domaine de linéarité de $5,0.10^{-7}$ à $2,9.10^{-4} \text{ M}$, et une limite de détection de $0,25 \mu\text{M}$.

II.4.3. Détection de l'activité des TKs

Après l'élaboration et l'optimisation du biocapteur à GAOx, nous avons utilisé ce biocapteur pour mettre au point un test de détection de l'activité des TKs d'*E. coli* et humaine libres en solution basé sur la détection du L-érythrose (L-Ery). Le L-Ery **10** est le produit obtenu lors de la transformation par la TK des deux substrats donneurs envisagés, le D-F6P **8** ou le HPA **12** en présence de GA **9** comme accepteur (Figure II.17).

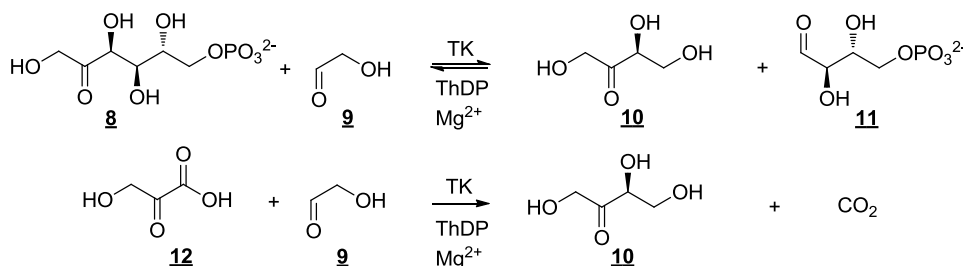


Figure II.17 : Réactions catalysées par la TK produisant du L-Ery

Deux études préliminaires doivent être effectuées. La première porte sur le dosage possible par le biocapteur à GAOx du L-Ery afin d'obtenir les caractéristiques du biocapteur envers ce substrat. La deuxième étude est l'analyse de la réponse du biocapteur vis-à-vis des

réactifs et des cofacteurs de la TK pour avoir une idée sur la possible interférence de ces composés avec le dosage du L-Ery. Enfin, nous pourrions déterminer une activité des TKs en solution et mesurer la constante de dissociation (K_D) de son cofacteur, le ThDP.

Il est à noter que pour les réactions faisant intervenir la TK, un étalon interne, la DHA à une concentration de 5 μ M, est ajoutée en fin de réaction pour vérifier et calibrer l'activité de la GAOx dans ces conditions expérimentales particulières.

II.4.3.1. Détection du L-érythrulose

Afin de vérifier que L-Ery était un substrat de la GAOx, nous avons dans un premier temps effectué un test d'activité de cette enzyme en solution par fluorométrie. En présence de peroxydase de raifort (HRP), l'Amplex® Red est oxydé par le peroxyde d'hydrogène, libéré lors de la réaction catalysée par la GAOx, générant une molécule fluorescente, la résorufine³⁴ (Figure II.22). Les vitesses initiales pour le galactose et le L-Ery ont donc été mesurées (Tableau II.11). En comparaison avec la DHA, nous obtenons des vitesses initiales pour le galactose et le L-Ery de 33 et 22 %, respectivement. Ceci confirme que L-Ery est un assez bon substrat de la GAOx.

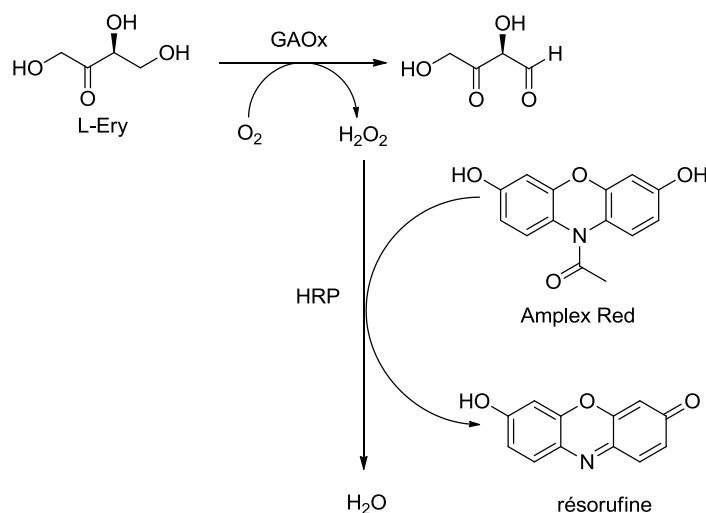


Figure II.22 : Test fluorométrique pour doser l'activité de la GAOx

Ensuite, la détection ampérométrique du L-Ery a donc été effectuée avec le biocapteur à GAOx dans l'HEPES 0,05 M à pH 7,0 (Figure II.23) et la réponse ampérométrique est comparée avec la réponse obtenue pour le DHA et le galactose (Tableau II.11). Les pourcentages sont identiques à ceux déterminés par fluorimétrie. Ces résultats montrent que l'immobilisation de la GAOx n'a aucun effet sur sa sélectivité vis-à-vis de ces substrats.

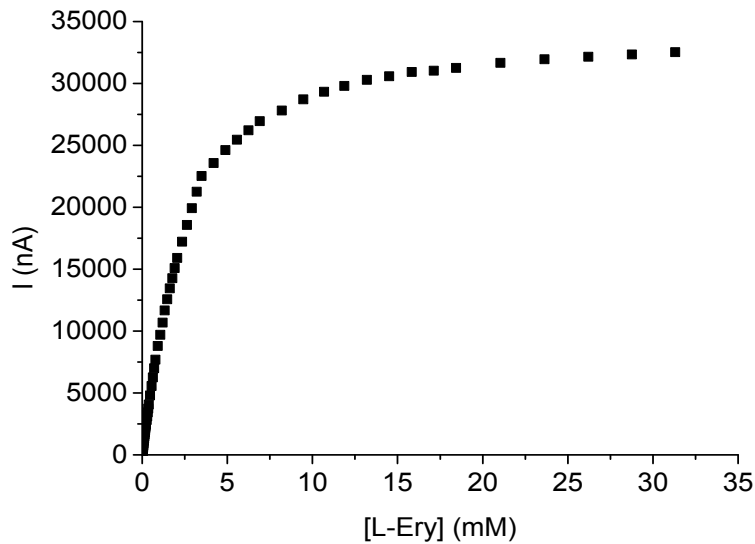


Figure II.23 : Courbe d'étalonnage du biocapteur à GAOx@laponite (50:25 $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) avec le L-Ery (0,05 M HEPES pH 7,0, $E_{\text{app}} = 0,6 \text{ V/Ag-AgCl}$, $500 \text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$)

Tableau II.11 : Détermination de la réactivité des substrats par ampérométrie et fluorimétrie

Détections	Ampérométrie	Fluorimétrie
Substrats	S ($\text{mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Vitesse initiale ($\mu\text{M H}_2\text{O}_2\cdot\text{min}^{-1}$)
DHA	237 (100 %)	6 (100 %)
galactose	85 (33 %)	2 (33 %)
L-Ery	55 (23 %)	1,3 (22 %)

En résumé, le dosage du L-Ery a été effectué par le biocapteur à GAOx. La sensibilité obtenue est de $55 \text{ mA}\cdot\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, celle-ci est proche de celle du substrat naturel de la GAOx, le galactose, le courant maximum est de $165 \mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$ et le domaine de linéarité est situé entre $1,0\cdot 10^{-6}$ et $1,5\cdot 10^{-3} \text{ M}$, enfin la limite de détection est de $0,6 \mu\text{M}$.

II.4.3.2. Détermination des interférents

Nous avons étudié les interférences possibles dans le dosage du L-Ery avec les réactifs et les cofacteurs utilisés pour la détection de l'activité des TKs avec le biocapteur à GAOx, dans 5 mL de HEPES 0,05 M, à pH 7,0.

Pour les cofacteurs de la TK, le cation divalent Mg^{2+} et la thiamine diphosphate (ThDP), aucune interférence n'est remarquée. Quant aux substrats, ils comportent une fonction alcool primaire et pourraient donc être oxydés par la GAOx.

Pour le D-fructose-6-phosphate **8** (D-F6P), aucune interférence n'est perçue. Ce résultat a également été validé par fluorimétrie et complétée par l'étude d'autres sucres phosphorylés qui ne sont également pas substrats de la GAOx.

Le glycolaldéhyde **9** (GA) et l'hydroxypyruvate **12** (HPA) ne s'oxydent pas directement à 0,6 V/Ag-AgCl sur une électrode de platine mais sont quant à eux substrats de la GAOx. Leurs sensibilités sont respectivement de 9 et 7 mA.M⁻¹.cm⁻², ce qui représente 16 et 12 % de la réponse obtenue avec le L-Ery.

Sur la base de ces résultats, la réaction choisie pour la détection de l'activité de la TK est celle faisant intervenir le D-F6P **8** et le GA **9** (Figure II.17), afin qu'un seul des deux réactifs interfère, le GA **9**. Pour minimiser cet effet d'interférence, la mesure du signal ampérométrique est donc effectuée après l'ajout du D-F6P **8**, qui lui ne donne aucun signal ampérométrique. Le seul inconvénient d'avoir choisi le D-F6P **8** comme substrat donneur (première option) plutôt que le HPA **12** est la réversibilité de la réaction.

II.4.3.3. Détermination de l'activité des TKs libres en solution

Cette étude a été réalisée avec les TK d'*E. coli* et humaine en utilisant le biocapteur à GAOx optimisé précédemment. Les paramètres que nous avons étudiés sont les concentrations des substrats de la TK, le substrat donneur, le D-F6P, et le substrat accepteur, le GA à 25°C. Cette étude n'a pas été réalisée avec la TK humaine car elle s'est avérée inactive à 25°C, température retenue lors de ces expériences effectuées avant de disposer au laboratoire de la souche exprimant la TK humaine. Enfin, les droites d'étalonnages des deux TK ont été établies à 37°C.

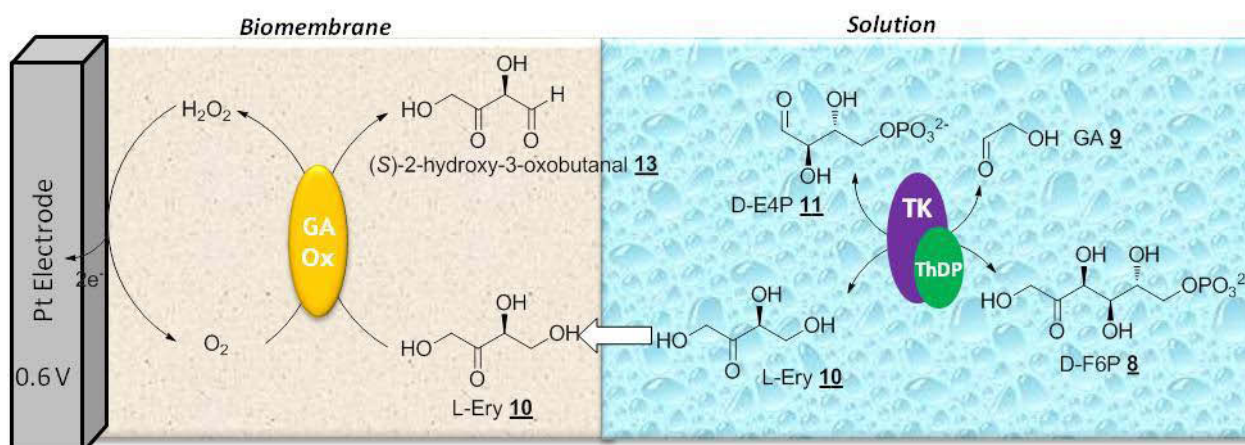


Figure II.24 : Détection de l'activité des TKs d'*E. coli* et humaine en solution avec le biocapteur à GAOx

Optimisation des concentrations des substrats de la TK d'*E. coli*

Nous avons donc étudié les concentrations optimales en GA et en D-F6P nécessaires à la réaction catalysée par la TK d'*E. coli* en utilisant le biocapteur à GAOx.

A partir de 5 mM en GA, nous observons une passivation de l'électrode, ce résultat nous empêche donc de nous placer à une valeur égale ou supérieure à la constante de Michaelis du GA (K_M , 14 mM)³⁵. Entre 1 et 2 mM, aucune différence n'est observée au niveau de l'intensité de la réponse après ajout du D-F6P. Nous avons donc sélectionné la concentration de 1 mM en GA qui minimise le courant de base d'interférence de ce composé.

En ce qui concerne la concentration optimale en D-F6P, nous avons testé trois concentrations 0,1, 1 et 5 mM. De 0,1 à 5 mM, la réponse ampérométrique augmente. Néanmoins avec 5 mM en D-F6P, le bruit de fond est également augmenté. La concentration en D-F6P la plus adaptée est donc de 1 mM.

Avec la TK d'*E. coli*, la réponse ampérométrique obtenue a une allure hyperbolique et atteint un état stationnaire après 3 minutes (Figure II.25). Pour obtenir une réponse plus rapide, l'augmentation de la vitesse de rotation de l'électrode (de 500 tr.min⁻¹ à 1500 tr.min⁻¹) a été envisagée mais elle s'est avérée infructueuse sur l'allure de la courbe. L'activité de la TK d'*E. coli* sera déterminée par la mesure de la vitesse initiale de la réaction qui est proportionnelle à la concentration en enzyme (Figure II.26).

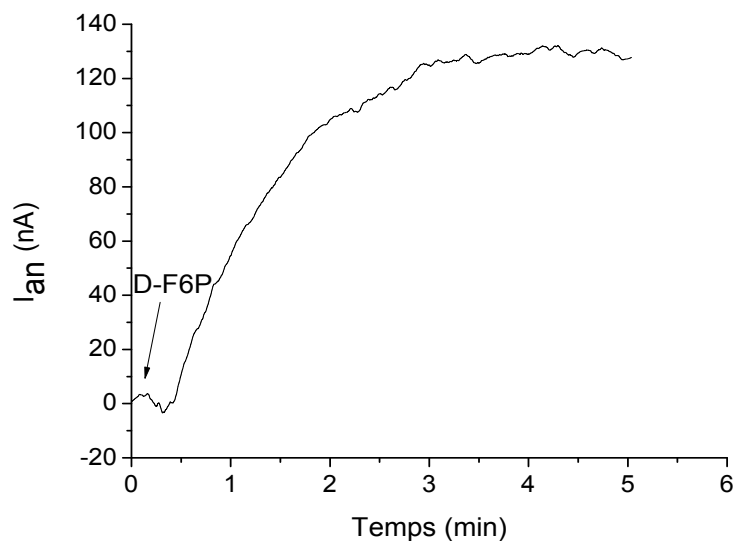


Figure II.25 : Allure logarithmique de la réponse ampérométrique avec la TK d'*E. coli* (GAOx@laponite 50:25 $\mu\text{g}:\mu\text{g}$, 0,05 M HEPES pH 7,0, 0,2 mM ThDP, 1 mM MgCl_2 , 1 mM GA, 1 mM D-F6P, 1 U.mL⁻¹, $E_{\text{app}} = 0,6 \text{ V/Ag-AgCl}$, 500 r.min⁻¹)

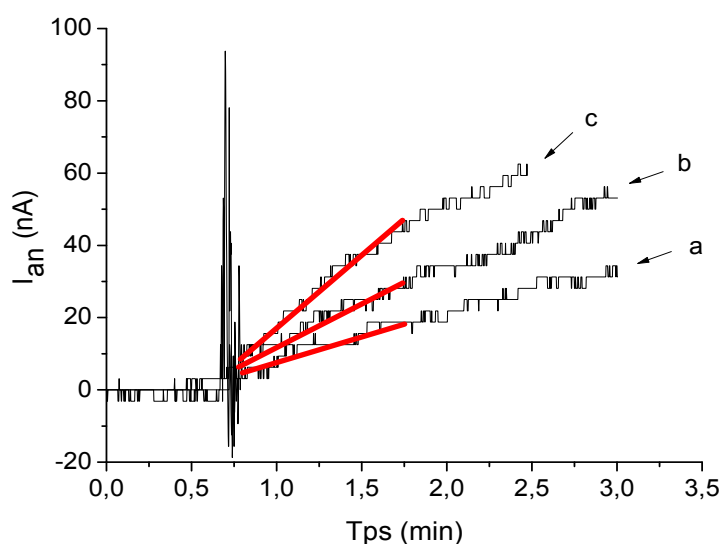


Figure II.26 : Réponse ampérométrique du biocapteur à GAOx@laponite (50:25 µg:µg) en présence de TK *E. coli* a) 0,01 U.mL⁻¹ b) 0,04 U.mL⁻¹ c) 0,1 U.mL⁻¹ (0,05 M HEPES pH 7,0, 0,2 mM ThDP, 1 mM MgCl₂, 1 mM GA, 1 mM D-F6P, E_{app} = 0,6 V/Ag-AgCl, 500 r.min⁻¹)

Droites d'étalonnage des TKs d'*E. coli* et humaine

La droite d'étalonnage de la TK d'*E. coli* a tout d'abord été réalisée à 25°C en utilisant les conditions déterminées au préalable. La reproductibilité des résultats a été testée sur trois biocapteurs distincts (Figure II.27). Les valeurs de courant reportées dans la Figure II.27 correspondent à la réponse mesurée après une minute de réaction avec une déviation standard moyenne de 3,3 %. Le domaine de linéarité obtenu avec ce mode de détection est de 0,01 à 0,1 U.mL⁻¹. Ce résultat peut être comparé avec celui obtenu en spectrophotométrie. Dans ce cas, la TK est couplée à une déshydrogénase NADH dépendante (l'alcool déshydrogénase de *S. cerevisiae*, YADH, EC 1.1.1.1). Ce test est basé sur l'utilisation du L-Ery comme substrat donneur et du D-R5P comme substrat accepteur. La variation de la concentration en NADH est mesurée par spectrophotométrie à 340 nm (Figure II.5). Dans ce cas, le domaine de linéarité se situe entre 0,6 et 7,2 U.mL⁻¹. La détection électro-enzymatique est donc plus sensible. La TK humaine n'étant pas active à 25°C, sa détection électro-enzymatique n'a pas pu être effectuée dans ces conditions.

Une température de 37°C a donc été envisagée. En effet, selon des études encore non publiées et réalisées récemment par le Prof. G. Sprenger (Stuttgart, Allemagne) qui nous a fourni la TK humaine, 37°C correspond à la température optimale pour la TK humaine. De plus, les données de la littérature³⁶ indiquent que la TK d'*E. coli* est thermostable jusqu'à 50°C.

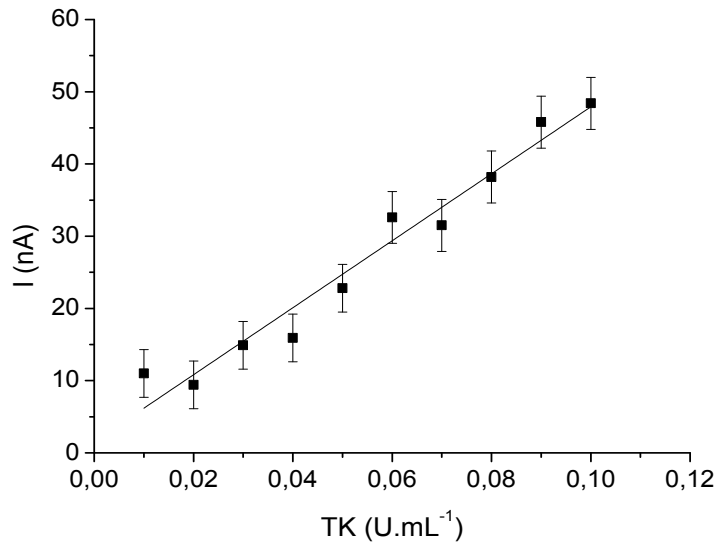


Figure II.27 : Droite d'étalonnage de la TK d'*E. coli* avec le biocapteur GAOx@laponite (50:25 µg:µg) à 25°C (0,05 M HEPES pH 7,0, 0,2 mM ThDP, 1 mM MgCl₂, 1 mM GA, 1 mM D-F6P, E_{app} = 0,6 V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

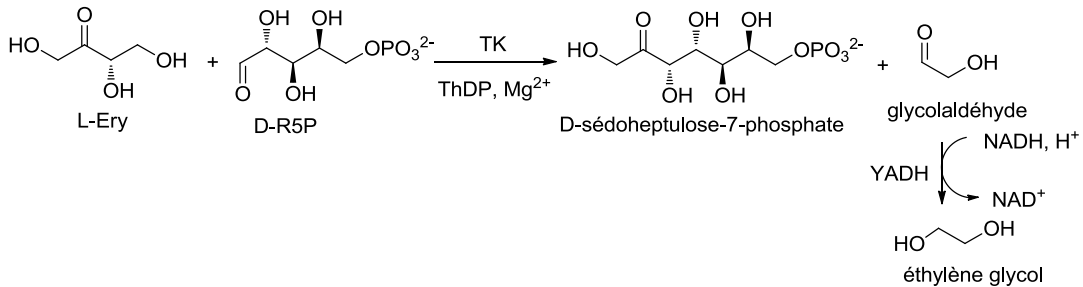


Figure II.5 : Test d'activité basé sur l'utilisation du L-Ery comme substrat donneur

Nous avons donc établi les droites d'étalonnages des TKs d'*E. coli* et humaine à 37°C (Figure II.28). Il est à noter qu'à cette température (37°C), l'activité de la TK d'*E. coli* est 7 fois plus importante que celle obtenue à 25°C, quel que soit le mode de détection (chrono-ampérométrie ou spectrophotométrie). De plus, la comparaison des résultats obtenus avec ces deux enzymes se base sur un nombre d'unités identique déterminé par spectrophotométrie (Figure II.5). La TK humaine ayant une activité spécifique plus faible que la TK d'*E. coli*, la quantité d'enzyme utilisée pour obtenir un même nombre d'unité est donc plus importante et donc la concentration massique dans le milieu réactionnel l'est également. Le domaine de linéarité obtenu par ampérométrie pour ces deux enzymes est de 0,02 à 0,09 U.mL⁻¹. Il faut cependant noter que la réponse ampérométrique de la TK d'*E. coli* est toujours lente, tandis que celle de la TK humaine est beaucoup plus rapide, l'état stationnaire étant obtenu après trente secondes (Figure II.29).

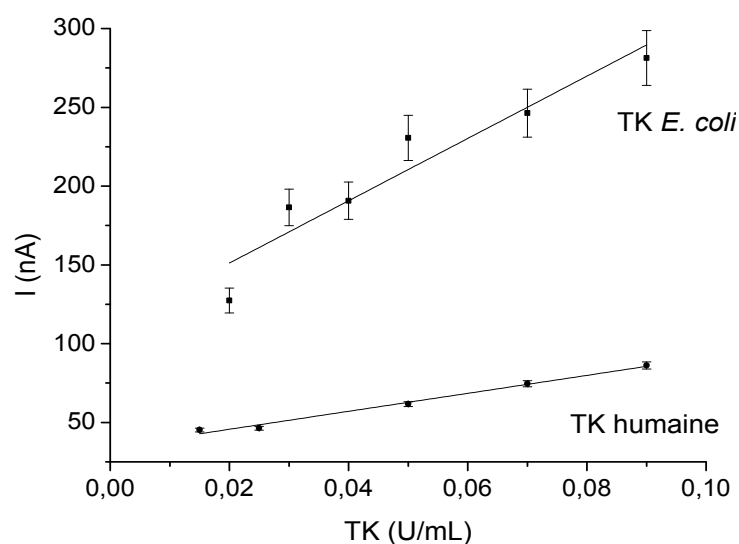


Figure II.28 : Droite d'étalonnage de la TK d'*E. coli* et humaine avec le biocapteur GAOx@laponite (50:25 µg:µg) à 37°C (condition identique à celle de la Figure II.27)

A l'issue de ces expériences, il apparait d'une part que les intensités des réponses ampérométriques mesurées dans les mêmes conditions expérimentales, sont plus importantes avec la TK d'*E. coli* qu'avec la TK humaine. Il y a donc plus de L-Ery formé après une minute de réaction en présence de TK d'*E. coli* qu'avec la TK humaine. L'efficacité catalytique de la TK d'*E. coli* (turn-over) est donc supérieure dans ces conditions, ce qui corrobore les résultats obtenus par spectrophotométrie par le groupe du prof. G. Sprenger (données non publiées). D'autre part, les cinétiques des réactions semblent différentes pour ces deux enzymes comme en témoigne l'allure des courbes de chrono-ampérométrie montrant une cinétique lente pour la TK d'*E. coli* et très rapide pour la TK humaine. Ces derniers résultats nous ont amené à émettre l'hypothèse que dans le cas de la TK humaine, la catalyse s'effectuerait au voisinage de l'électrode, la TK s'adsorbant facilement sur le biohybride GAOx@laponite. De plus, la TK humaine ayant une activité spécifique plus faible que celle d'*E. coli*, elle est introduite en plus grande quantité dans le milieu réactionnel. Dans le cas de la TK d'*E. coli*, l'adsorption sur ce biohybride serait moins favorisée en raison de charges de surface différentes et une concentration massique en solution moins importante. Nous avons été amenés à formuler cette hypothèse car nous verrons dans le chapitre IV, que l'immobilisation de la TK d'*E. coli* à la surface de l'électrode sur d'autres argiles de type HDL, conduisent à une cinétique rapide similaire à celle obtenue avec la TK humaine.

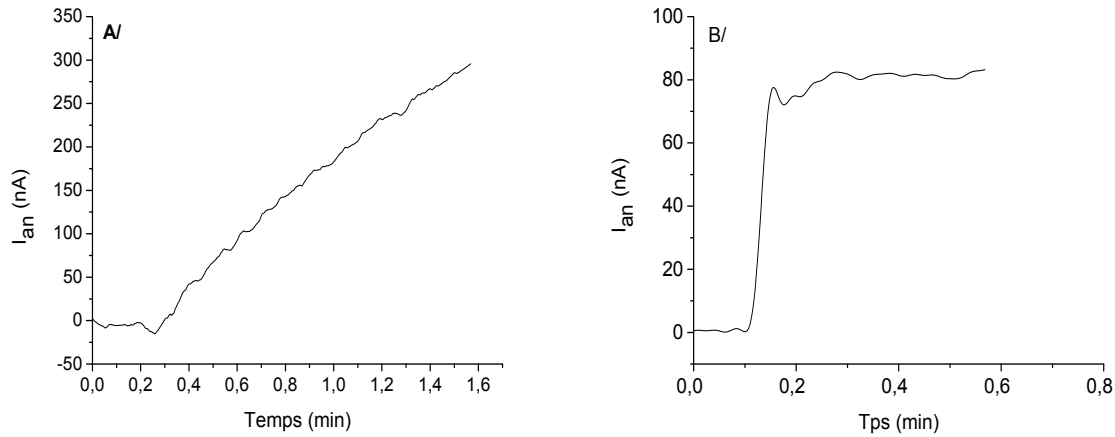


Figure II.29 : Réponse ampérométrique du biocapteur GAOx@laponite (50:25 µg:µg) à 37°C A/ en présence de 50 mU TK d'*E. coli* B/ en présence de 100 mU TK humaine (condition identique à celle de la Figure II.27)

II.4.4. Détermination de la constante de dissociation de la thiamine diphosphate

La constante de dissociation (K_D) de la thiamine diphosphate (ThDP) a été déterminée avec le biocapteur à GAOx et la TK d'*E. coli* libre en solution (Figure II.30). Le K_D est calculée à partir de la linéarisation de la courbe d'étalonnage du ThDP, selon la méthode de linéarisation de Lineweaver Burk. La reproductibilité des résultats a été testée sur trois biocapteurs distincts. Ces résultats ont été comparés à ceux obtenus en utilisant le test spectrophotométrique décrit dans le paragraphe II.4.3.3 (Figure II.31).

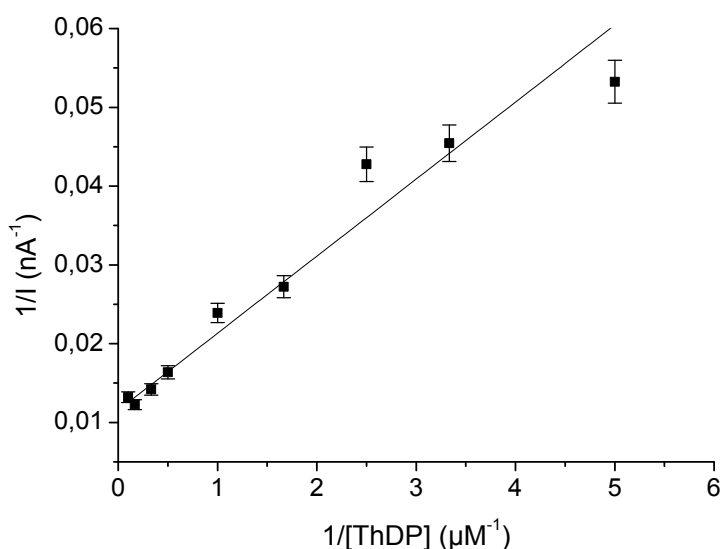


Figure II.30 : Droite d'étalonnage du ThDP avec le biocapteur GAOx@laponite (50:25 μg:μg) et la TK d'*E. coli* en solution à 25°C (0,05 M HEPES pH 7,0, 1 mM MgCl₂, 1 mM GA, 1 mM D-F6P, 100 mU.mL⁻¹ TK, E_{app} = 0,6 V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

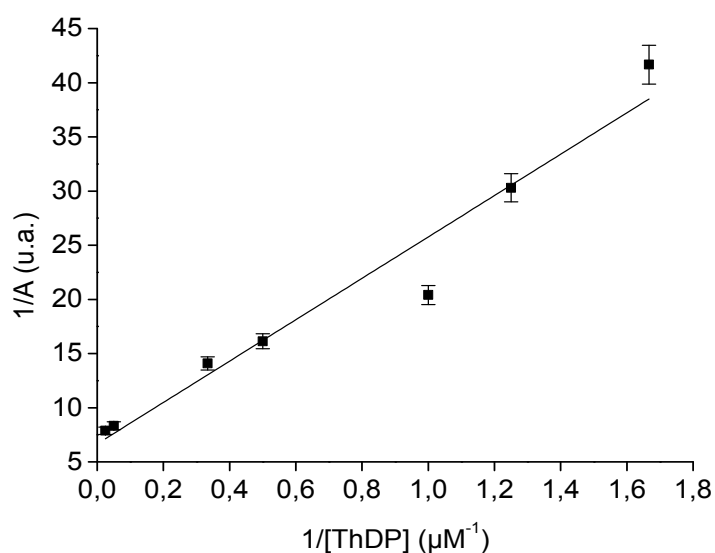


Figure II.31 : Droite d'étalonnage du ThDP en UV-Visible avec la TK d'*E. coli* en solution à 25°C (0,1 M Gly-Gly pH 7,5, 0,5 mM MgCl₂, 85 mM L-Ery, 8,9 mM D-R5P, 0,3 mM NADH, 2 U.mL⁻¹ TK, 25 U YADH)

La valeur de K_D obtenue par ampérométrie avec le biocapteur à GAOx est de 1 μM, elle est très proche de celle obtenue par spectrophotométrie (1,8 μM). Ces résultats très similaires valident l'approche analytique par chrono-ampérométrie.

II.5. Conclusion

L'immobilisation de la galactose oxydase (GAOx) dans une argile cationique, la laponite, a permis d'obtenir un biocapteur très performant en comparaison avec les résultats décrits dans la littérature pour la détection du galactose³⁷⁻⁴⁶ (Tableau I.12). Le biocapteur GAOx@laponite ($S = 85 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$ pour le galactose) que nous avons élaboré est cinq fois plus sensible que le biocapteur GAOx déjà décrit dans lequel la GAOx est immobilisée sur une électrode modifiée avec un mélange chitosan/nanotube de carbone à paroi simple ($S = 16 \text{ mA.M}^{-1}.\text{cm}^{-2}$)⁴⁵.

La détection de l'activité des TKs libres a pu être effectuée selon deux systèmes de détections électro-enzymatiques différents.

Le premier système utilise le biocapteur à polyphénol oxydase (PPO) couplé à la réaction catalysée par la TK en présence du composé **1** précurseur de l'ester éthylique de la N-acétyl-tyrosine **3** (N-Ac-Tyr-OEt **3**). La réponse ampérométrique obtenue est très faible en raison d'une part de la faible affinité du composé **1** vis-à-vis de la TK d'*E. coli* et d'autre part de la réaction de β -élimination du groupement partant, la N-Ac-Tyr-OEt, catalysée par la BSA, qui est limitante. De plus, un autre handicap de ce système est la synthèse du composé **1** qui n'est pas commercial.

Comme alternative, nous avons proposé un deuxième système de détection électro-enzymatique qui fait intervenir le biocapteur GAOx@laponite. Les substrats de la TK d'*E. coli* utilisés dans ce système sont le D-fructose-6-phosphate (D-F6P) qui est un des substrats physiologiques et le glycolaldéhyde (GA) qui est le meilleur substrat non phosphorylé connu pour cette enzyme. De plus ces deux substrats sont commerciaux et peu chers. Les résultats obtenus en chrono-ampérométrie montrent qu'il est possible de détecter L-Ery avec ce biocapteur électro-enzymatique à GAOx, et donc de détecter l'activité des TKs d'*E. coli* et humaine en solution. De plus, ce biocapteur n'a aucun effet sur la réactivité du ThDP envers la TK, elle est identique à celle obtenue avec les méthodes spectrophotométriques décrites à ce jour. Ce système basé sur une détection ampérométrique est plus rapide et au moins dix fois plus sensible que les tests spectrophotométriques permettant de détecter l'activité de la TK *in vitro* déjà connus^{1-8,23}.

II.6. Références bibliographiques

- (1) Hecquet, L.; Bolte, J.; Demuynck, C. New Assays for Transketolase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 2174–2176.
- (2) Horecker, B. L.; Smyrniotis, P. Z. [53] Transketolase from Liver and Spinach: Ribulose-5-P + Ribose-5-P \rightleftharpoons Sedoheptulose-7-P + Glyceraldehyde-3-P. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, **1955**; *1*, 371–375.
- (3) Du, M. X.; Sim, J.; Fang, L.; Yin, Z.; Koh, S.; Stratton, J.; Pons, J.; Wang, J. J.-X.; Carte, B. Identification of Novel Small-Molecule Inhibitors for Human Transketolase by High-Throughput Screening with Fluorescent Intensity (FLINT) Assay. *J. Biomol. Screen.* **2004**, *9*, 427–433.
- (4) Lee, J.-Y.; Cheong, D.-E.; Kim, G.-J. A Novel Assay System for the Measurement of Transketolase Activity Using Xylulokinase from *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 899–904.
- (5) Naula, C.; Alibu, V. P.; Brock, J. M.; Veitch, N. J.; Burchmore, R. J. S.; Barrett, M. P. A New Erythrose 4-phosphate Dehydrogenase Coupled Assay for Transketolase. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2008**, *70*, 1185–1187.
- (6) Smith, M. E. B.; Kaulmann, U.; Ward, J. M.; Hailes, H. C. A Colorimetric Assay for Screening Transketolase Activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7062–7065.
- (7) Yi, D.; Devamani, T.; Abdoul-Zabar, J.; Charmantray, F.; Helaine, V.; Hecquet, L.; Fessner, W.-D. A pH-Based High-Throughput Assay for Transketolase: Fingerprinting of Substrate Tolerance and Quantitative Kinetics. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2290–2300.
- (8) Sevestre, A.; Hélaine, V.; Guyot, G.; Martin, C.; Hecquet, L. A Fluorogenic Assay for Transketolase from *Saccharomyces Cerevisiae*. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 827–830.
- (9) Sulaiman, S. T.; Saleem, M. M. N. M. Determination of Alcohol Dehydrogenase Activity by Differential Pulse Polarography (DPP). *Fresenius Z. Für Anal. Chem.* **1984**, *317*, 751–752.
- (10) Wang, W.; Sun, X.; Jin, W. Determination of Lactate Dehydrogenase in Human Erythrocytes by Capillary Electrophoresis with Electrochemical Detection. *J. Chromatogr. B* **2003**, *798*, 175–178.
- (11) Han, Y. D.; Song, S. Y.; Lee, J. H.; Lee, D. S.; Yoon, H. C. Multienzyme-modified Biosensing Surface for the Electrochemical Analysis of Aspartate Transaminase and Alanine Transaminase in Human Plasma. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 797–805.
- (12) Kerman, K.; Song, H.; Duncan, J. S.; Litchfield, D. W.; Kraatz, H.-B. Peptide Biosensors for the Electrochemical Measurement of Protein Kinase Activity. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9395–9401.
- (13) Ji, J.; Yang, H.; Liu, Y.; Chen, H.; Kong, J.; Liu, B. TiO₂-assisted Silver Enhanced Biosensor for Kinase Activity Profiling. *Chem. Commun.* **2009**, 1508–1510.
- (14) Zhang, M.; Karra, S.; Gorski, W. Rapid Electrochemical Enzyme Assay with Enzyme-Free Calibration. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 6026–6032.
- (15) Lopez, M. S. P.; Charmantray, F.; Helaine, V.; Hecquet, L.; Mousty, C. Electrochemical Detection of Transketolase Activity Using a Tyrosinase Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 139–143.
- (16) Zor, T.; Selinger, Z. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Anal. Biochem.* **1996**, *236*, 302–308.
- (17) Charmantray, F.; Hélaine, V.; Lásiková, A.; Legeret, B.; Hecquet, L. Chemoenzymatic Synthesis of L-tyrosine Derivative for a Transketolase Assay. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3229–3233.

- (18) Schürmann, M.; Sprenger, G. A. Fructose-6-phosphate Aldolase Is a Novel Class I Aldolase from *Escherichia Coli* and Is Related to a Novel Group of Bacterial Transaldolases. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11055–11061.
- (19) Castillo, J. A.; Guérard-Hélaine, C.; Gutiérrez, M.; Garrabou, X.; Sancelme, M.; Schürmann, M.; Inoue, T.; Hélaine, V.; Charmantray, F.; Gefflaut, T.; et al. A Mutant D-Fructose-6-Phosphate Aldolase (Ala129Ser) with Improved Affinity Towards Dihydroxyacetone for the Synthesis of Polyhydroxylated Compounds. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1039–1046.
- (20) Klein, G.; Reymond, J.-L. An Enantioselective Fluorimetric Assay for Alcohol Dehydrogenases Using Albumin-catalyzed B-elimination of Umbelliferone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1113–1116.
- (21) Goddard, J.-P.; Reymond, J.-L. Recent Advances in Enzyme Assays. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 363–370.
- (22) Lopez, M. S. P.; Leroux, F.; Mousty, C. Amperometric Biosensors Based on LDH-ALGINATE Hybrid Nanocomposite for Aqueous and Non-aqueous Phenolic Compounds Detection. *Sensors Actuators B Chem.* **2010**, *150*, 36–42.
- (23) Charmantray, F.; Légeret, B.; Hélaine, V.; Hecquet, L. Fluorogenic Substrates for the Screening Assay of Transketolase through Beta-elimination of umbelliferone—Development, Scope and Limitations. *J. Biotechnol.* **2010**, *145*, 359–366.
- (24) Schumacher, D.; Vogel, J.; Lerche, U. Construction and Applications of an Enzyme Electrode for Determination of Galactose and Galactose-containing Saccharides. *Biosens. Bioelectron.* **1994**, *9*, 85–89.
- (25) Szabó, E. E.; Adányi, N.; Váradi, M. Application of Biosensor for Monitoring Galactose Content. *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 1051–1058.
- (26) Tkáč, J.; Navrátil, M.; Turdák, E.; Gemeiner, P. Monitoring of Dihydroxyacetone Production During Oxidation of Glycerol by Immobilized *Gluconobacter Oxydans* Cells with an Enzyme Biosensor. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 383–388.
- (27) Charmantray, F.; Touisni, N.; Hecquet, L.; Mousty, C. Amperometric Biosensor Based on Galactose Oxidase Immobilized in Clay Matrix. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 630–635.
- (28) Mousty, C. Biosensing Applications of Clay-modified Electrodes: a Review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 315–325.
- (29) Shan, D.; Cosnier, S.; Mousty, C. Layered Double Hydroxides: An Attractive Material for Electrochemical Biosensor Design. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3872–3879.
- (30) Cosnier, S.; Mousty, C.; Gondran, C.; Lepellec, A. Entrapment of Enzyme Within Organic and Inorganic Materials for Biosensor Applications: Comparative Study. *Mater. Sci. Eng. C* **2006**, *26*, 442–447.
- (31) Petersen, A.; Steckhan, E. Continuous Indirect Electrochemical Regeneration of Galactose Oxidase. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2203–2208.
- (32) Kosman, D. J.; Ettinger, M. J.; Weiner, R. E.; Massaro, E. J. The Molecular Properties of the Copper Enzyme Galactose Oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *165*, 456–467.
- (33) Kondakova, L.; Yanishpolskii, V.; Tertykh, V.; Buglova, T. Galactose Oxidase Immobilized on Silica in an Analytical Determination of Galactose-containing Carbohydrates. *Anal. Sci.* **2007**, *23*, 97–101.
- (34) Zhou, M.; Diwu, Z.; Panchuk-Voloshina, N.; Haugland, R. P. A Stable Nonfluorescent Derivative of Resorufin for the Fluorometric Determination of Trace Hydrogen Peroxide: Applications in Detecting the Activity of Phagocyte NADPH Oxidase and Other Oxidases. *Anal. Biochem.* **1997**, *253*, 162–168.
- (35) Sprenger, G. A.; Schörken, U.; Sprenger, G.; Sahm, H. Transketolase of *Escherichia Coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 525–532.

- (36) Abdoul-Zabar, J.; Sorel, I.; Hélaine, V.; Charmantray, F.; Devamani, T.; Yi, D.; de Berardinis, V.; Louis, D.; Marlière, P.; Fessner, W.-D.; Hecquet, L. Thermostable Transketolase from *Geobacillus Stearothermophilus*: Characterization and Catalytic Properties. *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 116–128.
- (37) Coche-Guerente, L.; Cosnier, S.; Innocent, C.; Mailley, P. Development of Amperometric Biosensors Based on the Immobilization of Enzymes in Polymer Films Electrogenerated from a Series of Amphiphilic Pyrrole Derivatives. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *311*, 23–30.
- (38) Brahim, S. I.; Maharajh, D.; Narinesingh, D.; Guiseppi-Elie, A. Design and Characterization of a Galactose Biosensor Using a Novel Polypyrrole-Hydrogel Composite Membrane. *Anal. Lett.* **2002**, *35*, 797–812.
- (39) Şenel, M.; Bozgeyik, İ.; Çevik, E.; Fatih Abas yan k, M. A Novel Amperometric Galactose Biosensor Based on Galactose oxidase-poly(N-glycidylpyrrole-co-pyrrole). *Synth. Met.* **2011**, *161*, 440–444.
- (40) Sung, W. J.; Bae, Y. H. Glucose Oxidase, Lactate Oxidase, and Galactose Oxidase Enzyme Electrode Based on Polypyrrole with polyanion/PEG/enzyme Conjugate Dopant. *Sensors Actuators B Chem.* **2006**, *114*, 164–169.
- (41) Ekinçi, E.; Paşahan, A. Poly (4-methoxyphenol) Film as a Galactose-sensing Material. *Eur. Polym. J.* **2004**, *40*, 1605–1608.
- (42) Lee, K. N.; Lee, Y.; Son, Y. Enhanced Sensitivity of a Galactose Biosensor Fabricated with a Bundle of Conducting Polymer Microtubules. *Electroanalysis* **2011**, *23*, 2125–2130.
- (43) Gülce, H.; Ataman, İ.; Gülce, A.; Y ld z, A. A New Amperometric Enzyme Electrode for Galactose Determination. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30*, 41–44.
- (44) Çevik, E.; Şenel, M.; Fatih Abas yan k, M. Construction of Biosensor for Determination of Galactose with Galactose Oxidase Immobilized on Polymeric Mediator Contains Ferrocene. *Curr. Appl. Phys.* **2010**, *10*, 1313–1316.
- (45) Tkac, J.; Whittaker, J. W.; Ruzgas, T. The Use of Single Walled Carbon Nanotubes Dispersed in a Chitosan Matrix for Preparation of a Galactose Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1820–1824.
- (46) Wang, Y.; Zhu, J.; Zhu, R.; Zhu, Z.; Lai, Z.; Chen, Z. Chitosan/Prussian Blue-based Biosensors. *Meas. Sci. Technol.* **2003**, *14*, 831.

**CHAPITRE III : MESURE DE L'ACTIVITE DE
LA TK D'*E. COLI* IMMOBILISEE SUR DES
HDL**

III.1. Introduction

Dans le but de détecter des inhibiteurs de la TK avec un biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK, le verrou technologique concerne la co-immobilisation de la GAOx et de l'apo-TK sur la surface de l'électrode pour élaborer un test facile à mettre en œuvre, réutilisable et peu coûteux en enzyme.

Ce chapitre III est donc consacré à l'étude de l'immobilisation de la TK d'*E. coli*. Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé la TK d'*E. coli* comme modèle (en effet, nous avons eu la TK humaine à notre disposition que tard dans ce travail). La TK d'*E. coli* sous forme d'apo-TK, étant nécessaire pour la détection des inhibiteurs de type analogues du cofacteur, la thiamine diphosphate (ThDP), est obtenue par purification de l'extrait brut sur résine Ni-NTA, étape décrite dans le chapitre II.

Lors de l'élaboration du biocapteur à GAOx, nous avons montré que l'immobilisation de cette enzyme dans un matériau inorganique lamellaire, la laponite, apporte de meilleurs résultats par rapport aux différents polymères décrits dans la littérature¹⁻¹⁰. Nous pouvons envisager de co-immobiliser la TK et la GAOx dans cette matrice d'argile cationique. Cependant, la laponite est une argile qui possède des charges négatives à la surface de ses feuillets, charges compensées par des cations intercalés entre les feuillets. Si l'on considère le point isoélectrique de la TK de 6,3, il apparaît qu'à son pH optimum (pH 7,5), la TK est globalement chargée négativement. On peut émettre l'hypothèse que cette charge n'est pas favorable aux interactions avec les feuillets de la laponite.

Par contre les Hydroxydes Doubles Lamellaires (HDL), qui sont des argiles anioniques, possèdent des feuillets chargés positivement ce qui est favorable aux interactions avec la TK. D'ailleurs une première étude sur l'immobilisation d'un extrait brut de TK de *S. cerevisiae* dans les HDL, a précédemment été développée au laboratoire pour des applications en biocatalyse¹¹, montrant l'intérêt d'immobiliser la TK dans de tels matériaux (Paragraphe I.2.3.2). Nous avons donc choisi d'immobiliser un extrait purifié de TK d'*E. coli* (la TK de *S. cerevisiae* ne portant pas d'étiquette six histidines, sa purification est délicate) dans ces matériaux inorganiques lamellaires, par les méthodes d'adsorption ou de coprécipitation. Des HDL de différentes compositions seront testés afin de trouver les conditions optimales d'association enzyme/support.

Afin d'assurer la stabilité de l'enzyme, l'immobilisation de la TK doit être effectuée en présence de tampon, l'acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique (MOPS) ou le glycyl-glycine (Gly-Gly) (Figure III.1). Une attention particulière sera donc portée aux interactions spécifiques entre les HDL et ces molécules. Rappelons que les HDL sont des matériaux échangeurs d'anions et qu'il a été montré dans la littérature que les molécules organiques portant des charges négatives comme des groupements sulfonates^{12,13} ou des acides aminés, pouvaient s'intercaler dans l'espace interlamellaire des HDL¹⁴. Ces interactions spécifiques peuvent modifier à la fois la composition du matériau, leurs charges de surface, mais aussi leur morphologie, et avoir des conséquences sur leur capacité d'immobilisation des enzymes.

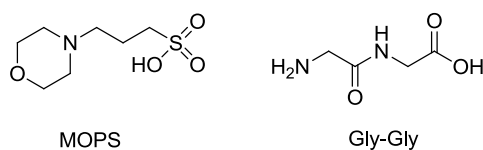


Figure III.1 : Structure des tampons MOPS et Gly-Gly

De plus, lors de l'utilisation du biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK pour détecter des inhibiteurs de la TK, le milieu réactionnel comportera des molécules phosphorylées, comme par exemple le cofacteur de la TK, la thiamine diphosphate (ThDP) et le substrat donneur le D-fructose-6-phosphate (D-F6P). Dans la littérature, l'immobilisation de molécules phosphorylées dans les HDL est également décrite¹⁵⁻¹⁷. Ainsi, la formation d'un matériau hybride bioactif comme catalyseur hétérogène a été obtenue par l'intercalation du ThDP dans des matrices HDL¹⁶. Cette intercalation a été effectuée dans des conditions douces par échange anionique et par coprécipitation. Le ThDP peut s'intercaler en monocouche ou en bicouche entre les feuillettes. L'intercalation de sucres phosphorylés tels que le glucose-1-phosphate, le glucose-6-phosphate et le fructose-1,6-bisphosphate dans les HDL a également été étudiée¹⁷. L'échange anionique entre les nitrates et les sucres phosphorylés est effectué avec une température assez élevée de 60°C et un temps de réaction long (60 h). Dans cette étude nous avons vérifié par une méthode originale si, dans nos conditions expérimentales, les molécules phosphorylés requises pour le développement du biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK, le ThDP et le D-F6P, pouvaient s'adsorber sur les HDL.

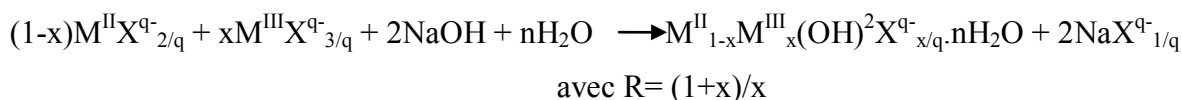
Dans ce chapitre, nous nous intéresserons en premier lieu à l'étude physico-chimique des HDL en présence de tampon. Les isothermes d'adsorption des molécules phosphorylées sur les HDL seront décrites. Nous nous intéresserons par la suite à deux modes d'immobilisation de l'apo-TK dans ces matériaux hôtes, l'adsorption et la coprécipitation. Nous étudierons le taux d'immobilisation, les caractéristiques physio-chimiques des matériaux biohybrides TK@HDL, l'activité enzymatique et la stabilité dans le temps des biohybrides TK@HDL formés. En vue de la co-immobilisation de la GAOx et de la TK d'*E. coli* à la surface de l'électrode, nous nous attacherons à étudier l'élaboration d'un film TK@HDL.

III.2. Synthèses et caractérisation des phases HDL en milieux tamponnés

Dans cette étude, les tampons utilisés pour stabiliser la TK d'*E. coli* sont l'acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique (MOPS) et le glycyl-glycine (Gly-Gly) et leurs effets sur l'HDL ont été étudiés. En nous basant sur l'étude préliminaire effectuée avec la TK de *S. cerevisiae*¹¹, nous avons choisie d'étudier la phase Mg₂Al-NO₃. Ces tampons sont principalement sous forme anionique au pH d'immobilisation de l'enzyme et peuvent donc être intercalés dans la structure des HDL. La préparation de ces matériaux HDL-tampons (Mg₂Al-MOPS et Mg₂Al-Gly-Gly) a été effectuée soit par réaction d'échange anionique soit par coprécipitation. Ces matériaux ont été caractérisés par diffraction de rayon X sur poudre (DRX) et par spectroscopie Infra-Rouge à transformée de Fourier (FTIR). Ils ont été comparés à l'HDL de référence, Mg₂Al-NO₃ préparé par coprécipitation à pH constant dans l'eau.

III.2.1. Synthèse des HDL

Les phases HDL de référence ont été préparées par la méthode de coprécipitation à pH constant. C'est une méthode simple couramment utilisée pour préparer des phases HDL. Elle consiste à réaliser une réaction de précipitation contrôlée à partir d'une solution de sels de métaux divalents et trivalents par une solution de base de Brönsted (NaOH). La réaction est la suivante :



Nous avons choisi un rapport molaire (R) M^{II}/M^{III} = 2, correspondant à une capacité d'échange anionique importante. Le pH de coprécipitation est fixé selon la nature des cations métalliques. Pour les phases MgAl-HDL, le pH a été fixé à une valeur de 9,0. Afin d'éviter la contamination des phases par des anions carbonates, présentant une très forte affinité avec les phases HDL, les synthèses sont réalisées sous atmosphère d'azote. La solution de sels métalliques divalents (M^{II}) et trivalents (M^{III}) est ajoutée à débit constant dans un réacteur contenant une solution aqueuse mise sous agitation et contenant éventuellement des anions à

intercaler (par exemple le Gly-Gly). L'addition de base (solution de NaOH) est simultanée et asservie au pH de consigne par un dispositif entièrement automatisé équipé de pompes péristaltiques et d'un pHmètre. Le pH est ainsi maintenu constant tout au long de la synthèse (Figure III.2). Le produit final est centrifugé, lavé plusieurs fois avec de l'eau décarbonatée et séché. Les conditions expérimentales utilisées pour préparer les phases Mg_2Al-NO_3 et $Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$ sont décrites dans la partie « matériels et méthodes ».

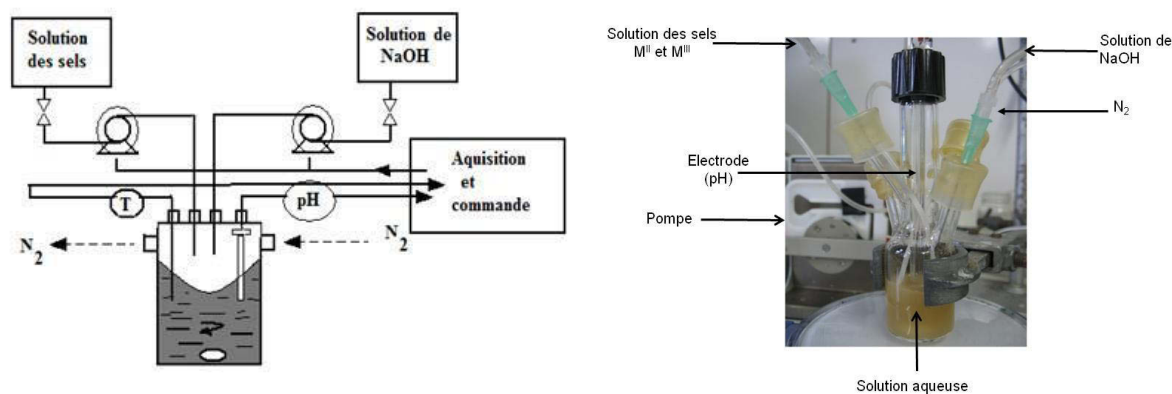


Figure III.2 : Dispositif expérimental de la synthèse des HDL par coprécipitation

D'autres phases HDL (Mg_2Al-Cl , Ni_2Al-Cl , Zn_2Al-Cl , Zn_2Al-NO_3 , $Zn_2Al-Alginate$ et $Zn_2Al-MOPS$) également utilisées dans ce travail ont été gracieusement fournies par des collègues du laboratoire. Leur synthèse a été réalisée selon les protocoles décrits dans la littérature^{18,19}.

Des réactions d'échange de la phase Mg_2Al-NO_3 ont été effectuées en présence de MOPS ou de Gly-Gly. Le matériau de référence Mg_2Al-NO_3 ($m = 35$ mg) a été mis en suspension dans une solution de 50 mM de tampon MOPS à pH 7,5 et maintenu sous agitation sous air pendant une nuit. Avec le Gly-Gly, Mg_2Al-NO_3 ($m = 35$ mg) a été mis en contact une nuit avec une solution 100 mM de tampon à pH 7,5 ou 9,0. Les solides sont récupérés par centrifugation et lavages. Les HDL ainsi obtenus sont nommés $Mg_2Al-MOPS_{ech}$, $Mg_2Al-Gly-Gly_{ech}$ pH 7,5 et $Mg_2Al-Gly-Gly_{ech}$ pH 9,0.

III.2.2. Caractérisation physico-chimique des phases $\text{Mg}_2\text{Al-NO}_3$ et $\text{Mg}_2\text{Al-MOPS}_{\text{ech}}$

III.2.2.1. Diffraction des rayons X

Les diffractogrammes de rayons X sur poudre des phases des HDL se caractérisent par trois domaines distincts. Le premier domaine d'angle faible ($2\theta < 30^\circ$) comporte les réflexions basales $00l$, les positions des raies sont dépendantes de la distance interlamellaire donc de la taille et de l'orientation de l'anion intercalé. Le deuxième domaine de 30 à 50° comporte les réflexions $h0l$ et $0kl$, ces positions sont fortement affectées par des désordres structuraux. Le troisième domaine à haute valeur angulaire ($2\theta > 60^\circ$) comporte les réflexions $hk0$ et hkl caractéristiques de la structuration des couches d'hydroxyde de métal. L'intensité des raies $00l$ est fortement exaltée lorsque les échantillons sont préparés sur plaques par sédimentation, du fait d'une orientation préférentielle des feuilletts parallèlement au support. Ce qui a pour effet d'amplifier la statistique de comptage des raies $00l$. Les paramètres de maille $a = 2d(110)$ et $c = 3d(003)$ sont déduits à partir des diagrammes de RX.

Le diffractogramme de RX du matériau de référence, $\text{Mg}_2\text{Al-NO}_3$, est caractéristique d'un HDL¹⁸ (Figure III.3). La position des raies (003) et (006) permet de calculer une distance interlamellaire de $8,7 \text{ \AA}$ caractéristique de la présence de nitrate entre les feuilletts HDL. Le diffractogramme de RX de la phase $\text{Mg}_2\text{Al-MOPS}_{\text{ech}}$ montre un élargissement des pics $00l$ associé à un déplacement vers les grands angles traduisant une diminution de la distance interlamellaire ($7,7 \text{ \AA}$). Dans ces conditions de préparation, l'intercalation de la forme anionique du tampon MOPS ($\text{O}(\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{-SO}_3^-$) n'est donc pas observée mais ce sont préférentiellement les anions carbonates qui échangent les anions nitrates.

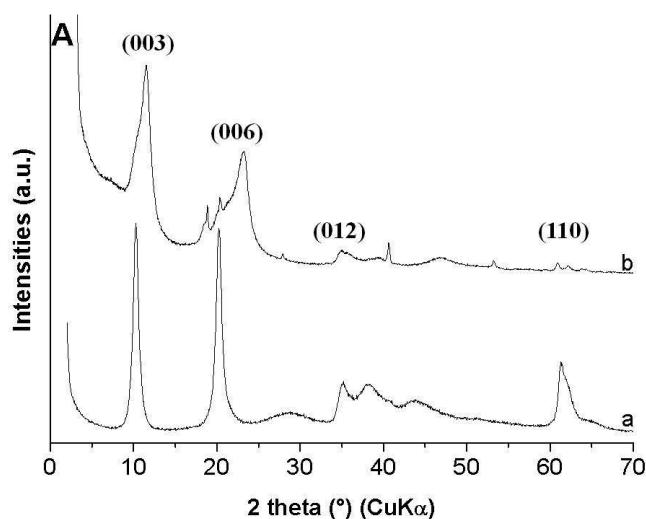


Figure III.3 : Diffractogrammes de RX de a) Mg_2Al-NO_3 b) $Mg_2Al-MOPSech$

III.2.2.2. Spectroscopie Infrarouge

Le spectre FTIR de la phase Mg_2Al-NO_3 montre une large bande d'absorption vers 3400 cm^{-1} qui correspond aux vibrations des groupements O-H et des molécules d'eau présente dans l'HDL. Aux basses fréquences (de 400 à 800 cm^{-1}) les bandes de vibrations observées sont attribuées au réseau caractéristique des feuillets, M-O et O-M-O (Figure III.4). La raie intense à 1384 cm^{-1} correspond à la vibration de valence de l'anion nitrate intercalé.

La comparaison du spectre FTIR de la phase $Mg_2Al-MOPSech$ avec celui de la molécule MOPS suggère que des molécules de tampon sont uniquement adsorbées en faible quantité à la surface des plaquettes d'HDL. En effet, on retrouve des bandes situées à 1200 , 1040 et 680 cm^{-1} , correspondant aux bandes de vibration des fonctions sulfonate, SO et CH_2 du MOPS.

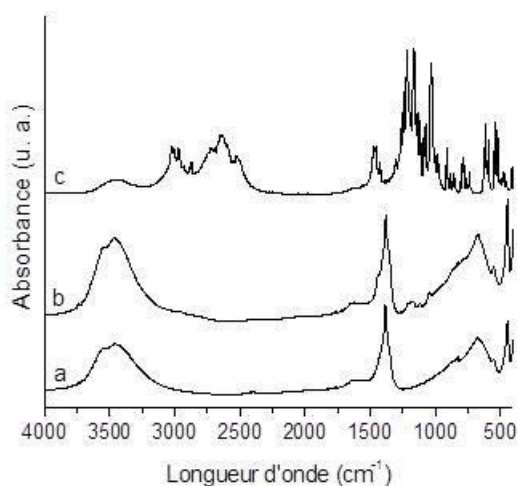


Figure III.4 : Spectres de FTIR de a) Mg_2Al-NO_3 b) $Mg_2Al-MOPS_{ech}$ c) MOPS

III.2.3. Caractérisation physico-chimique des phases $Mg_2Al-Gly-Gly$

III.2.3.1. Diffraction des rayons X

Dans la Figure III.5 sont comparés les diffractogrammes des trois phases $MgAl-Gly-Gly$ préparées par échange avec la phase Mg_2Al-NO_3 de référence ou coprécipitation. Pour les phases échangées à pH 7,5, nous observons un dédoublement des pics $00l$ suggérant un échange progressif des anions nitrates par des carbonates. Cette réaction d'échange devient plus efficace lorsque le pH augmente (de 7,5 à 9,0), pour lequel la concentration de la forme anionique du tampon devient majoritaire. Dans les conditions de coprécipitation, le diffractogramme de $Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$ montre les pics $00l$ d'une phase secondaire à une distance interlamellaire de 7,5 Å correspondant à une phase totalement carbonatée. Cette contamination par les carbonates a pu se produire lors de l'étape de lavage du matériau. En effet, la valeur élevée du pH de la solution (pH 9,0) utilisée lors de la synthèse permet facilement l'adsorption du CO_2 atmosphérique.

De plus nous observons aux plus bas angles un pic à $8,3^\circ$ traduisant une distance interlamellaire de 10,6 Å. Cette distance suggère la possibilité d'une intercalation des zwitterions Gly-Gly. En effet la préparation par coprécipitation de phases hybrides d'HDL $MgAl$ et $ZnAl$ avec de la glycine et du Gly-Gly a été décrite dans la littérature^{14,20}. Ces phases ne sont pas pures, puisque qu'elles contiennent seulement 15 % de ces composés, la compensation des charges étant assurée par des nitrates ou des carbonates. Dans ce cas, les distances basales rapportées sont de 8,1 à 8,8 Å pour la Gly et le Gly-Gly, suggérant une

orientation horizontale des molécules entre les feuillets. Pour le matériau $Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$, une plus grande distance interlamellaire peut s'expliquer par un taux d'intercalation supérieur engendrant un degré de désordre plus important dans l'empilement des feuillets d'HDL ou un taux d'hydratation différent.

Il faut signaler la présence d'une réflexion à $18,5^\circ$ (pic *) qui correspond à une phase bayerite ($Al(OH)_3$) issue d'une dissolution partielle de la phase HDL (Figure III.5). Ce pic devient plus perceptible avec la maturation des suspensions.

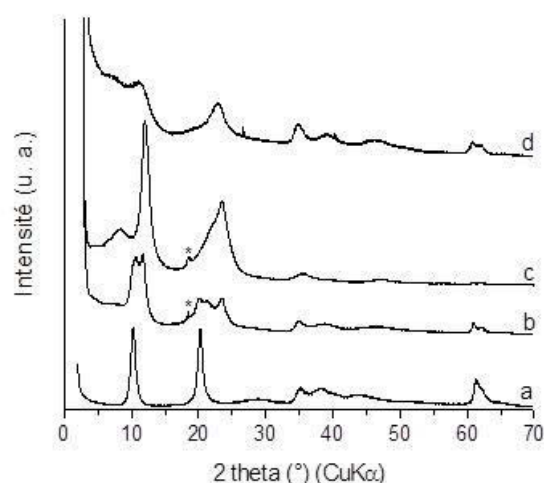


Figure III.5 : Diffractogrammes de RX de a) Mg_2Al-NO_3 b) $Mg_2Al-Gly-Gly_{ech}$ pH 7,5 c) $Mg_2Al-Gly-Gly_{ech}$ pH 9,0 d) $Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$, * phase parasite

III.2.3.2. Spectroscopie Infrarouge

Les spectres FTIR confirment la présence de molécules de Gly-Gly dans les phases HDL par l'apparition de bandes supplémentaires situées à 2900 cm^{-1} ($\nu_s CH_2$) et entre 1600 et 1300 cm^{-1} (Figure III.6). Les pics à 1400 et 1600 cm^{-1} sont attribués aux bandes de vibrations (ν_s et ν_a) des fonctions carboxylates, $-CO_2^-$ ²¹. Dans la même région, nous observons également la bande de vibration caractéristique des carbonates (1365 cm^{-1})^{14,21}. Pour les HDL $Mg_2Al-Gly-Gly_{ech}$, le pic à 1384 cm^{-1} correspondant à la bande de vibration νNO des nitrates intercalés, diminue progressivement à mesure que le pH augmente. De plus, pour les HDL $Mg_2Al-Gly-Gly_{ech}$ et $Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$, les bandes de vibration δMOH (675 cm^{-1}) et δOMO (447 cm^{-1}) sont élargies. Ce résultat suggère une perte de cohésion structurale de l'empilement des feuillets et de rigidité des couches intercalées par le dipeptide. Ces données confirment l'effet du Gly-Gly sur l'amorphisation de la structure de l'HDL. De plus, la

présence d'une bande large à 1070 cm^{-1} peut être attribué à la bande de vibration de Al-OH^{22} . La formation de l'hydroxyde d'aluminium est due à la présence du Gly-Gly pendant la coprécipitation comme expliqué dans le paragraphe suivant.

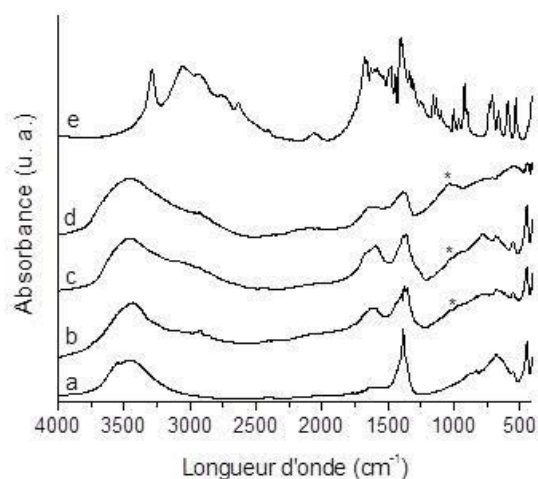


Figure III.6 : Spectres de FTIR de a) $\text{Mg}_2\text{Al-NO}_3$ b) $\text{Mg}_2\text{Al-Gly-Gly}_{\text{éch}}$ pH 7,5 c) $\text{Mg}_2\text{Al-Gly-Gly}_{\text{éch}}$ pH 9,0 d) $\text{Mg}_2\text{Al-Gly-Gly}_{\text{cop}}$ e) Gly-Gly, * produit parasite

III.2.3.3. Analyse chimique

L'analyse chimique de l'HDL MgAl-Gly-Gly a été effectuée par spectrométrie d'émission atomique source plasma à couplage inductif (ICP-AES) (Tableau III.1). Pour le matériau de référence $\text{Mg}_2\text{Al-NO}_3$, le rapport molaire Mg:Al obtenu est de 2,0, celui-ci est égal au rapport fixé initialement, ce qui indique que la coprécipitation des sels métalliques est totale dans les conditions de synthèse utilisées. Pour l'HDL $\text{Mg}_2\text{Al-Gly-Gly}_{\text{cop}}$, nous observons une importante différence entre le rapport théorique fixé à 2 et celui obtenu expérimentalement (0,72). Hibino et Jones ont également reporté un désaccord entre la valeur initiale $\text{Mg:Al}_{\text{ini}}$ et la valeur expérimentale $\text{Mg:Al}_{\text{exp}}$ pour MgAl-Gly^{20} , $\text{Mg:Al}_{\text{exp}}$ étant toujours inférieure à $\text{Mg:Al}_{\text{ini}}$. Il convient de noter que dans ce cas, la quantité molaire de glycine utilisée dans la solution de synthèse était deux fois plus élevée que celle de nitrate. Dans nos conditions expérimentales, $\text{Mg}_2\text{Al-Gly-Gly}_{\text{cop}}$ est préparé dans une solution de 0,1 M de Gly-Gly, ce qui conduit à un rapport encore plus élevé ($\text{Gly-Gly/NO}_3 = 14$). Cette valeur de concentration en Gly-Gly a été choisie car c'est celle utilisée avec la TK.

Il est connu que les peptides, en particulier le Gly-Gly, peuvent être des bons ligands d'ions métalliques tels que Zn^{2+} et $\text{Mg}^{2+23,24}$. Dans nos conditions, la forte concentration en Gly-Gly doit probablement favoriser la complexation des cations Mg^{2+} conduisant à une

diminution du rendement de coprécipitation. La même hypothèse a été récemment proposée par Iyi *et al* lors de la formation d'une phase délamérée de MgAl-ClO₄ dans une solution aqueuse concentrée de Gly-Gly (1 M)²⁵.

On peut supposer que la diminution du rapport de coprécipitation Mg:Al_{exp} conduit à la formation d'un sous-produit, l'hydroxyde d'aluminium, Al(OH)₃ puisque la limite basse de composition Mg:Al dans une phase de type hydrotalcite est égale à 2. Cette hypothèse est confirmée en spectroscopie Infrarouge par la présence dans les spectres d'un pic à 1070 cm⁻¹ qui peut être attribuée à Al-OH (Figure III.6)²². Il convient donc de fixer des conditions de rapport Mg:Al supérieur si on veut minimiser la précipitation d'impureté Al(OH)₃.

Tableau III.1 : Compositions chimiques des HDL déterminées par ICP-AES

Matériaux	Méthode de préparation	Rapport initial Mg:Al	Rapport expérimental Mg:Al
Mg ₂ Al-NO ₃	coprécipitation	2,0	2,03
Mg ₂ Al-Gly-Gly _{ech} pH 7,5	échange	2,0	1,53
Mg ₂ Al-Gly-Gly _{ech} pH 9,0	échange	2,0	1,79
Mg ₂ Al-Gly-Gly _{cop}	coprécipitation	2,0	0,72

III.3. Etude de l'adsorption de molécules phosphorylées sur les HDL

Les HDL sont des matériaux échangeurs d'anions. Ils ont la propriété d'adsorber voir même d'intercaler des molécules organiques portant des groupements sulfonates, carboxyliques, mais aussi des molécules phosphorylées, comme par exemple le glucose-1-phosphate, le glucose-6-phosphate et le fructose-1,6-bisphosphate¹⁵⁻¹⁷. L'immobilisation de la thiamine diphosphate (ThDP) dans les HDL a été également décrite dans la littérature par Baikousi *et al*¹⁶. Le ThDP est intercalé dans les matériaux ZnAl-HDL et MgAl-HDL selon deux méthodes : la coprécipitation et la réaction d'échange anionique.

Il nous est apparu important d'étudier l'adsorption de ces deux molécules phosphorylées, le ThDP (cofacteur de la TK) et le D-fructose-6-phosphate (D-F6P, substrat donneur de la TK). En effet, ces deux molécules seront présentes dans le milieu réactionnel lors de l'utilisation du biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK. Elles pourraient donc s'adsorber sur la matrice HDL utilisée pour immobiliser la TK et éventuellement perturber le système.

Pour étudier l'adsorption de ces molécules sur Mg₂Al-NO₃, l'HDL de référence, nous avons réalisé des isothermes d'adsorption dans les gammes de concentration utilisées dans les réactions enzymatiques. La méthode d'adsorption consiste à mélanger une masse d'HDL *m* à un volume *V* de solution des anions phosphorylés de concentration *C_i*, dans un récipient fermé, sous agitation, à température ambiante. Après un temps d'équilibre, la solution est séparée du solide par centrifugation et la concentration du surnageant *C_e* (concentration à l'équilibre dans la solution) est déterminée. La différence entre la concentration initiale *C_i* et la concentration d'équilibre *C_e* permet de déterminer la concentration de composé adsorbé par masse d'argile *C_s* en utilisant la relation suivante :

$$C_s = \frac{(C_i - C_e)V}{m}$$

L'isotherme d'adsorption est obtenue en traçant la quantité de produit adsorbé (*C_s*) en fonction de la concentration d'adsorbat à l'équilibre (*C_e*). La classification de Giles distingue quatre grands types d'isothermes : type C (partition Constante), type L (Langmuir), type H (Haute affinité) et type S (Sigmoïde) (Figure III.7)²⁶. Les isothermes de la classe C se caractérisent par une partition constante entre la solution et le substrat. La linéarité montre que le nombre de sites libres reste constant au cours de l'adsorption. Ceci signifie que les sites sont

Le D-F6P a également été dosé par un test enzymatique utilisant d'autres enzymes que la TK, la phosphoglucose isomérase (PGI) et la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). La PGI convertit le D-F6P en D-glucose-6-phosphate (D-G6P) qui est transformé par la G6PDH en 6-phosphogluconolactone. L'apparition du NADPH, H⁺ est mesurée par spectrophotométrie à 340 nm (Figure III.8).

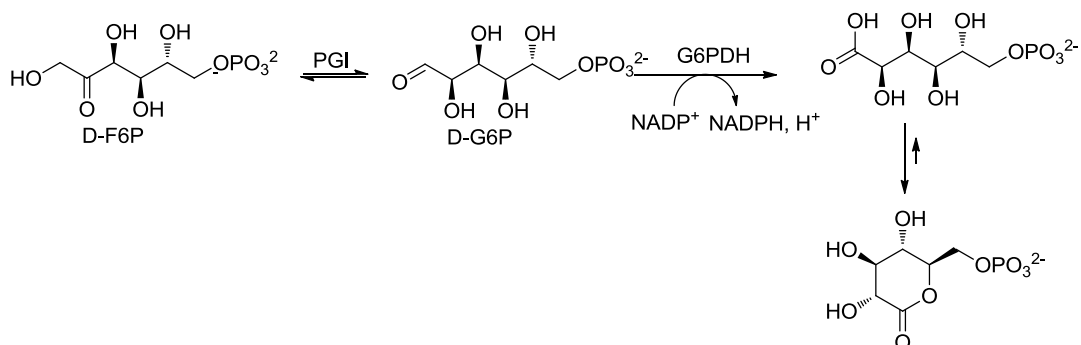


Figure III.8 : Test basé sur la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la phosphoglucose isomérase pour doser le D-F6P

Les résultats présentés ci-dessous correspondent à des moyennes de deux expériences indépendantes.

III.3.1. Adsorption de la thiamine diphosphate (ThDP)

Dans notre étude de l'adsorption du ThDP (Figure III.9) sur Mg₂Al-NO₃, nous avons comparé deux milieux : l'eau pure (pH = 6,5) et 100 mM de tampon Gly-Gly à pH 7,5.

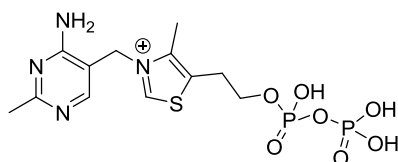


Figure III.9 : Structure du ThDP

La Figure III.10-A montre les courbes d'adsorption du ThDP dans les deux milieux. Elle est légèrement plus importante dans le tampon. Les isothermes qui en découlent s'approchent d'une forme de type S (Figure III.10-B) même si à haute concentration la saturation de la surface n'est pas atteinte. Cette forme pourrait présenter un mécanisme d'adsorption coopérative. Ramené à la capacité d'échange anionique des HDL (meq.g⁻¹), on peut calculer que le premier plateau correspond à 33 % d'échange alors qu'au dernier point on est à 130 % d'échange.

D'autre part, nous pouvons en déduire par extrapolation, que pour les concentrations en ThDP utilisées dans la suite de ce travail (entre 0,002 et 0,2 mM, *cf.* chapitre IV) par rapport à une quantité d'HDL de 50 à 100 µg, nous aurons moins de 8 % de ThDP adsorbé sur la phase HDL. En effet pour des concentrations inférieures à 12 mM, moins de 4,5 µmol de ThDP est adsorbé par milligramme d'HDL.

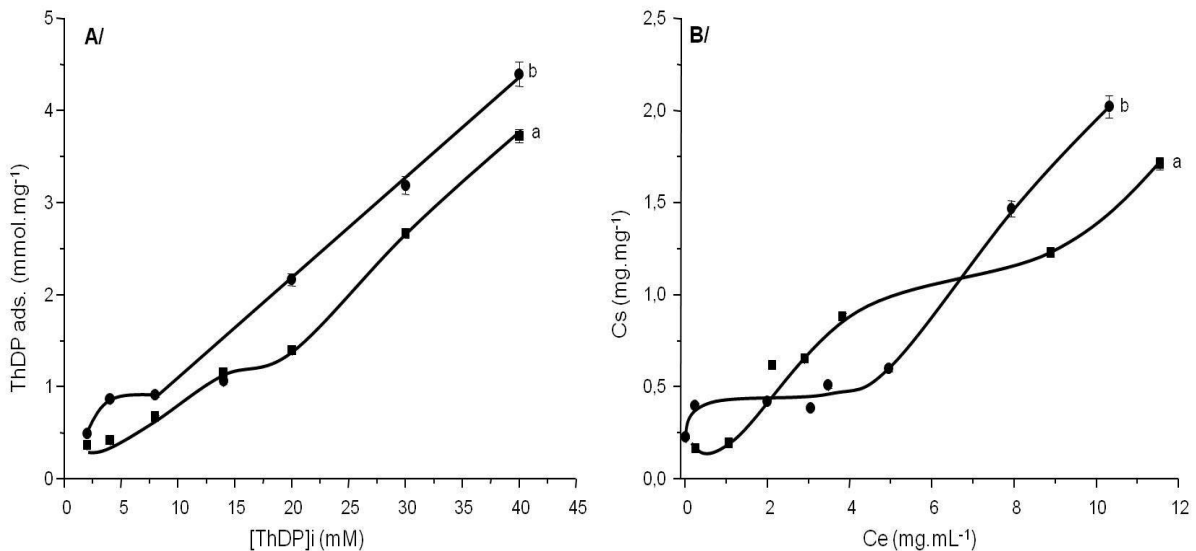


Figure III.10 : Courbes d'adsorption du ThDP dans Mg₂Al-NO₃ A/ [ThDP] adsorbé sur 1 mg d'HDL en fonction de la concentration initiale en ThDP ([ThDP]_i) B/ Isothermes d'adsorption a) dans H₂O b) dans 100 mM Gly-Gly pH 7,5

Les diffractogrammes de RX des phases adsorbées ($C_i = 16$ mM) ont été enregistrées (Figure III.11). Ils montrent les deux raies de diffraction 003 et 006 correspondants à l'intercalation de carbonates entre les feuillets (distance interlamellaire de $7,5$ Å). De plus, nous observons une série de raie $00l$ supplémentaire ($5,4^\circ$; $10,8^\circ$ et $16,2^\circ$ en 2θ) correspondant à une insertion d'une monocouche de ThDP entre les feuillets (distance interlamellaire de 16 Å)¹⁶. En présence de Gly-Gly, nous observons également un pic à $8,1^\circ$ traduisant l'insertion du Gly-Gly (distance interlamellaire de $10,9$ Å).

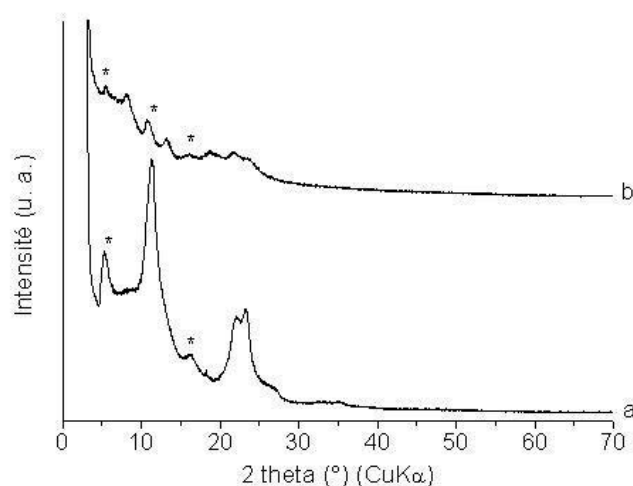


Figure III.11 : Diffractogrammes de RX de l'adsorption du ThDP dans Mg_2Al-NO_3 a) H₂O b) 100 mM Gly-Gly * Insertion du ThDP

III.3.2. Adsorption du D-fructose-6-phosphate (D-F6P)

Comme pour l'adsorption du ThDP, nous avons étudié l'adsorption du D-fructose-6-phosphate (D-F6P) (Figure III.12) sur une suspension de Mg_2Al-NO_3 (4 mg.mL⁻¹) dans l'eau ou dans 100 mM de Gly-Gly. La gamme de concentration en D-F6P varie entre 1 et 658 mM (0,3 et 200 mg). Dans ce cas, le D-F6P dans le surnageant a été dosé par réaction enzymatique avec la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la phosphoglucose isomérase.

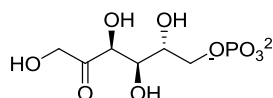


Figure III.12 : Structure du D-F6P

La Figure III.13-A montre les courbes d'adsorption dans les deux milieux. Elle est légèrement plus importante dans le tampon Gly-Gly pour des concentrations inférieures à 40 mM. L'isotherme effectuée dans l'eau s'approche d'une forme de type S avec une forte adsorption pour les faibles concentrations en D-F6P et l'isotherme effectuée dans le tampon Gly-Gly est de type L avec un plateau qui est presque atteint (Figure III.13B). Si l'on compare la quantité de D-F6P adsorbé à la capacité d'échange anionique théorique de l'HDL présent dans la solution, on constate que plus de 100 % des sites peuvent être échangés pour de très faibles concentrations en D-F6P (40 mM). Au-delà, il y a sans doute coprécipitation des molécules de D-F6P sur la surface des plaquettes d'HDL. Dans ce dernier cas, l'isotherme

serait donc la représentation de deux mécanismes, l'adsorption et la précipitation du D-F6P. Par contre, pour les concentrations utilisées dans la suite du travail (0,1 entre et 1 mM, cf. chapitre IV) par rapport à une quantité d'HDL de 50 à 100 µg, nous pouvons estimer par extrapolation, que moins de 10 % de D-F6P sera adsorbé. En effet dans cette étude pour des concentrations inférieures à 60 mM, moins de 27 µmol de D-F6P est adsorbé par milligramme d'HDL.

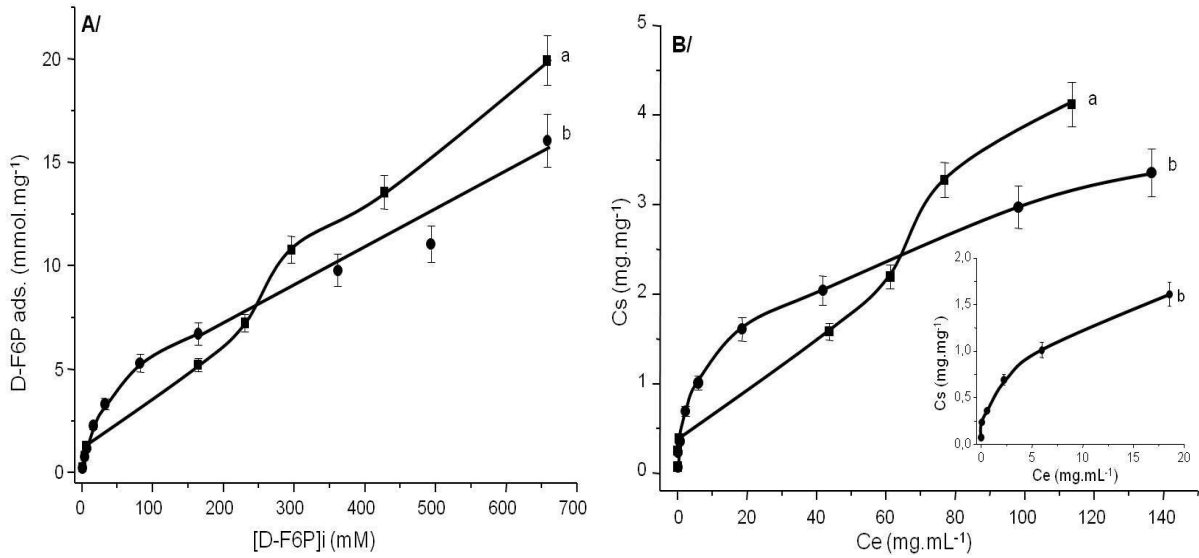


Figure III.13 : Courbes d'adsorption du D-F6P dans Mg₂Al-NO₃ A/ [D-F6P] adsorbé sur 1 mg d'HDL en fonction de la concentration initiale en D-F6P ([D-F6P]_i) B/ Isothermes d'adsorption a) dans H₂O b) dans 100 mM Gly-Gly pH 7,5

Dans les deux milieux étudiés, les diffractogrammes de RX des phases adsorbées (C_i = 110 mg/mL) montrent les pics *00l* à une distance interlamellaire de 7,5 Å qui correspond à l'échange des nitrates par les carbonates (Figure III.14). Nous observons également des pics *00l* supplémentaires à une distance interlamellaire de 10,8 Å qui pourraient correspondre à une insertion du D-F6P entre les feuillets d'HDL. La présence des autres raies fines pourraient être reliées soit à la formation de cristaux de D-F6P soit à la précipitation de phase D-F6P-Al ou D-F6P-Mg. De plus, pour les phases adsorbées dans le Gly-Gly, nous observons toujours un pic à 8,1° traduisant l'insertion du Gly-Gly.

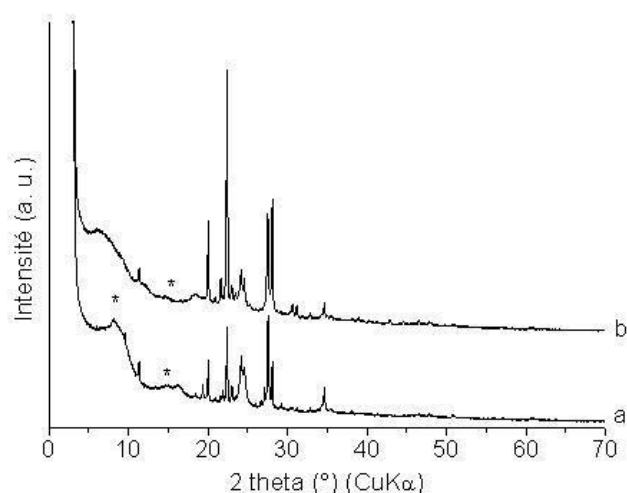


Figure III.14 : Diffractogrammes de RX de l'adsorption du D-F6P dans Mg_2Al-NO_3 a) H_2O b) 100 mM Gly-Gly * Insertion du D-F6P

III.3.3. Bilan sur l'adsorption de molécules organiques sur les HDL

Les résultats obtenus dans cette première partie montrent clairement que les HDL peuvent interagir avec le milieu réactionnel utilisé, notamment avec des molécules organiques portant des fonctions anioniques. Des interactions avec les molécules organiques, constituants du tampon ou les réactifs, peuvent modifier la composition de ces matériaux mais également ses propriétés d'adsorption. Ce sont des facteurs qu'il faudra prendre en compte lors de l'étude de l'adsorption de la TK sur ces matériaux. En ce qui concerne le tampon, le matériau est modifié soit avec des molécules de MOPS adsorbées sur les plaquettes d'HDL soit avec des molécules de Gly-Gly intercalées entre les feuillets d'HDL. En ce qui concerne l'adsorption des réactifs phosphorylés, pour une quantité d'HDL de 50 à 100 μg , nous pouvons estimer que moins de 10 % de D-F6P et moins de 8 % de ThDP seront adsorbés sur la phase HDL.

III.4. Préparation des biohybrides TK@HDL

Différentes méthodes ont été développées pour la préparation des matériaux biohybrides enzyme@HDL. La plupart de ces méthodes sont effectuées dans des conditions douces (pression, pH, température...) pour conserver les propriétés structurales et biologiques de l'enzyme. Deux stratégies sont les plus utilisées : d'une part, l'immobilisation de l'enzyme sur le matériau HDL déjà formé, que nous appellerons l'adsorption et d'autre part, la formation du matériau en présence de l'enzyme par la méthode de coprécipitation^{27,28}. Dans la majorité des études réalisées au laboratoire sur l'élaboration des biohybrides enzyme@HDL, les enzymes étaient mise en solution dans l'eau. Avec la TK, nous testerons différents milieux, l'eau et les tampons MOPS et Gly-Gly. Les biohybrides seront préparés à partir de l'apo-TK d'*E. coli* obtenue après l'étape de purification soit par adsorption, soit par coprécipitation (Figure III.15). Les deux types de matériaux seront appelés respectivement TK@HDL_{ads} et TK@HDL_{cop}. Le rapport initial M^{II}:M^{III} avait été fixé initialement à 2 afin d'avoir la meilleure densité de charge des couches, sans anticiper l'effet néfaste du tampon Gly-Gly sur la composition finale du matériau.

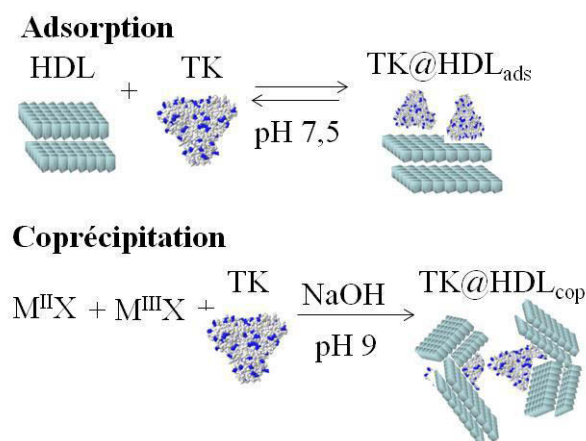


Figure III.15 : Préparation des biohybrides TK@HDL soit par adsorption soit par coprécipitation

III.4.1. Optimisation des conditions d'adsorption de la TK d'*E. coli* sur les HDL : TK@HDL_{ads}

Les propriétés d'adsorption de la laponite et différents HDL vis-à-vis de l'apo-TK d'*E. coli* ont été étudiées. L'influence de différents paramètres a été analysée tels que la nature du contre ion présent dans l'espace interlamellaire des HDL, la nature du cation divalent du feuillet d'HDL et la nature du milieu (eau ou tampon). Dans tous les cas, nous avons vérifié que le pH des solutions ne varie pas au cours du processus d'adsorption.

Nous avons étudié l'évolution du pourcentage d'enzymes immobilisées ($Q_{\text{exp}}/Q_{\text{th}}$) en fonction du rapport TK:HDL initial (Q_{th}). Q_{th} est le rapport entre la quantité totale de protéines utilisées et la quantité d'HDL et Q_{exp} est le rapport entre la quantité de protéines immobilisées et la quantité d'HDL. La quantité de protéines immobilisées est déterminée par différence entre la quantité de protéines initiales et celle d'enzymes non immobilisées situées dans le surnageant. La quantité de protéine résiduelle est déterminée par un test de Bradford réalisés sur le surnageant obtenu après centrifugation.

L'activité de la TK immobilisée ($\text{Act.}_{\text{TKim}}$, U.mL^{-1}) est déterminée par un test spectrophotométrique basé sur le L-érythrose (L-Ery) comme substrat donneur et le D-R5P comme accepteur (Figure II.5). L'activité spécifique de la TK immobilisée ($\text{Act. sp}^{\text{é}}_{\text{TKim}}$, U.mg^{-1}) est calculée à partir de l'activité du biohybride ramenée à la quantité totale du biohybride (enzyme et HDL). Les mesures sont réalisées avec une quantité connue de biohybride mis en suspension dans la solution réactionnelle. Afin de pallier à la variation d'activité de la TK d'un lot à l'autre, nous utiliserons le terme d'activité spécifique relative ($\text{Act. sp}^{\text{é}}_{\text{rel}}$). Il est à noter que l' $\text{Act. sp}^{\text{é}}_{\text{TKim}}$ tient compte de celle obtenue pour une même quantité de TK libre non immobilisée. Nous pourrons ainsi comparer les résultats obtenus pour tous les biohybrides.

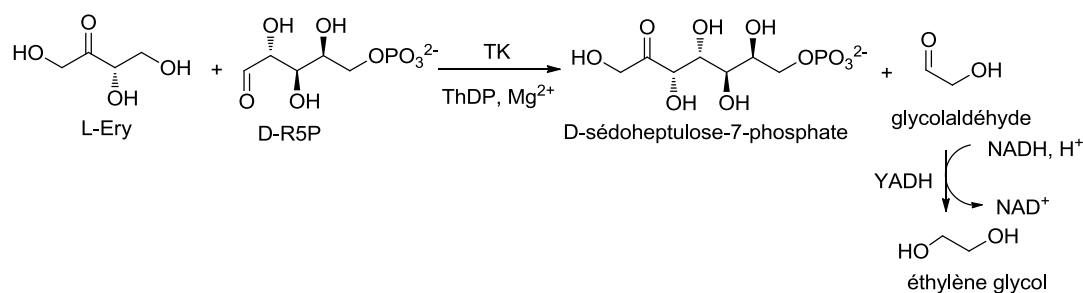


Figure II.5 : Test d'activité basé sur l'utilisation du L-érythrose comme substrat donneur

III.4.1.1. Effet des anions interlamellaires : Zn₂Al-X

L'étude de l'adsorption de l'apo-TK d'*E. coli* sur les HDL a débuté avec les HDL de composition Zn₂Al-X où les anions intercalés étaient différents : chlorure, nitrate, MOPS et alginate (Alg) (Figure III.16). Dans tous les cas, l'adsorption a été réalisée dans le tampon MOPS.

Du point de vue du pourcentage d'immobilisation Q_{exp}/Q_{th} (Figure III.16-A), les HDL intercalés avec des chlorures ou des nitrates donnent des valeurs plus élevées pour un $Q_{th} = 0,2$. Le pourcentage d'enzyme immobilisée décroît lorsque le rapport Q_{th} augmente. Par contre pour l'alginate et le MOPS, le taux d'immobilisation est plus important et reste constant quel que soit Q_{th} . La valeur Q_{exp}/Q_{th} la plus élevée est obtenue pour l'HDL Zn₂Al-Alg ($Q_{exp}/Q_{th} > 92\%$).

La Figure III.16-B montre l'Act. spé_{rel} des différents biohybrides. Dans tous les cas, l'activité spécifique de l'enzyme immobilisée est la plus grande pour un rapport Q_{exp} de 0,2. Le biohybride TK@Zn₂Al-NO₃_{ads} est le plus actif avec une Act. spé_{rel} de 71 % pour un $Q_{exp} = 0,17$. Le rendement d'adsorption est de 85 % pour $Q_{th} = 0,2$. Par contre, il faut remarquer que TK@Zn₂Al-Alg_{ads} a une activité très faible (Act. spé_{rel} < 18 %).

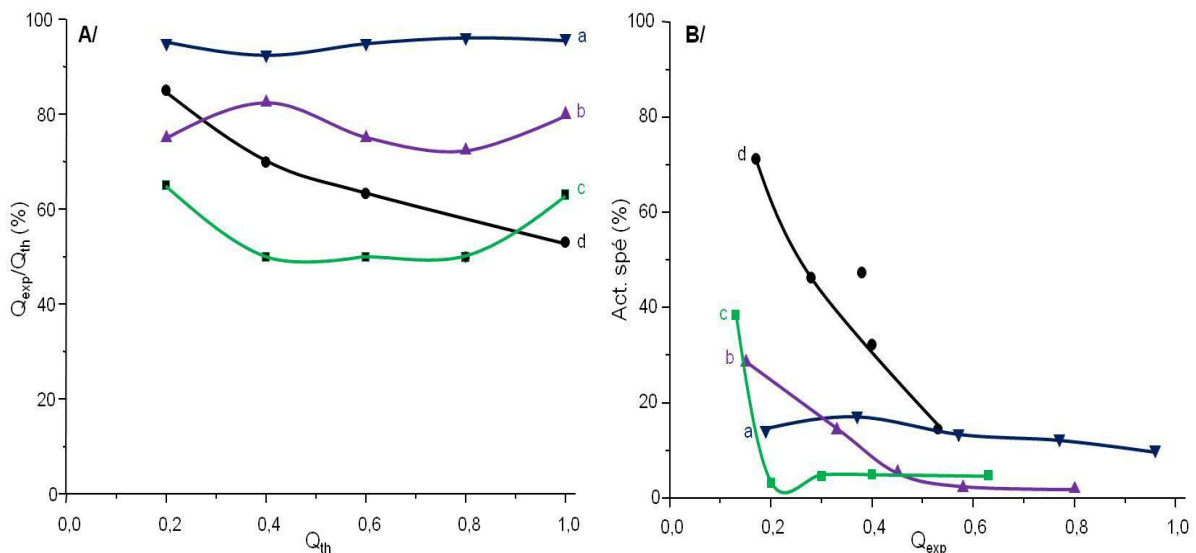


Figure III.16 : A/ Rendement de l'adsorption (Q_{exp}/Q_{th}) de la TK d'*E. coli* en fonction de Q_{th} selon la nature de l'anion intercalé dans Zn₂Al-X et B/ Act. spé_{rel} en fonction de Q_{exp} a) Zn₂Al-Alg b) Zn₂Al-MOPS c) Zn₂Al-Cl d) Zn₂Al-NO₃ (0,05 M MOPS pH 7,5, 3 h)

III.4.1.2. Effet des cations dans le feuillet: M^{II}_2Al-X

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de la nature du cation divalent (M^{II}) dans le feuillet HDL sur l'adsorption de l'apo-TK d'*E. coli*. Nous avons envisagé trois métaux divalents : le magnésium, le zinc et le nickel, avec toujours l'aluminium comme métal trivalent. Les anions sont soit les chlorures (Figure III.17) soit des nitrates (Figure III.18).

Les graphiques présentés dans les Figure III.17-A et Figure III.18-A montrent clairement que quel que soit le Q_{th} TK@HDL et la nature de l'anion intercalé, l'HDL de type Mg_2Al-X permet d'obtenir le meilleur rendement d'adsorption. De nouveau, on remarque que le pourcentage d'immobilisation et l'Act. spé_{rel} sont plus importants pour un rapport de Q_{th} de 0,2 (Figure III.17-A et B et Figure III.18-A et B). Le matériau Mg_2Al-NO_3 apparaît comme étant le mieux adapté à l'adsorption de la TK.

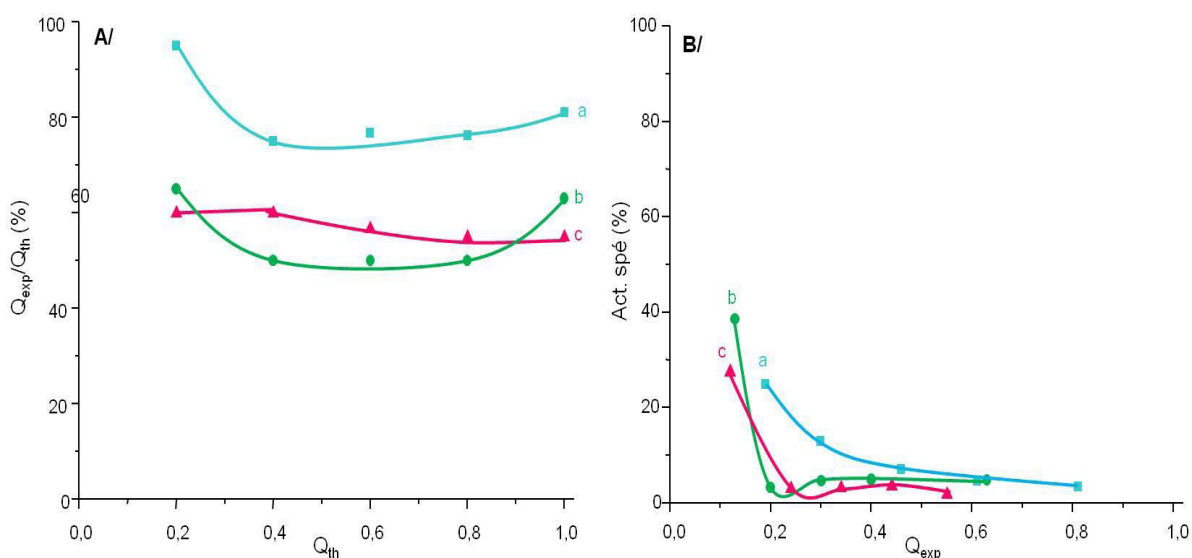


Figure III.17 : A/ Rendement de l'adsorption (Q_{exp}/Q_{th}) de la TK d'*E. coli* en fonction de Q_{th} selon la nature du M^{II} avec le contre ion chlore B/ Act. spé_{rel} en fonction de Q_{exp} a) Mg_2Al-Cl b) Zn_2Al-Cl c) Ni_2Al-Cl (0,05 M MOPS pH 7,5, 3 h)

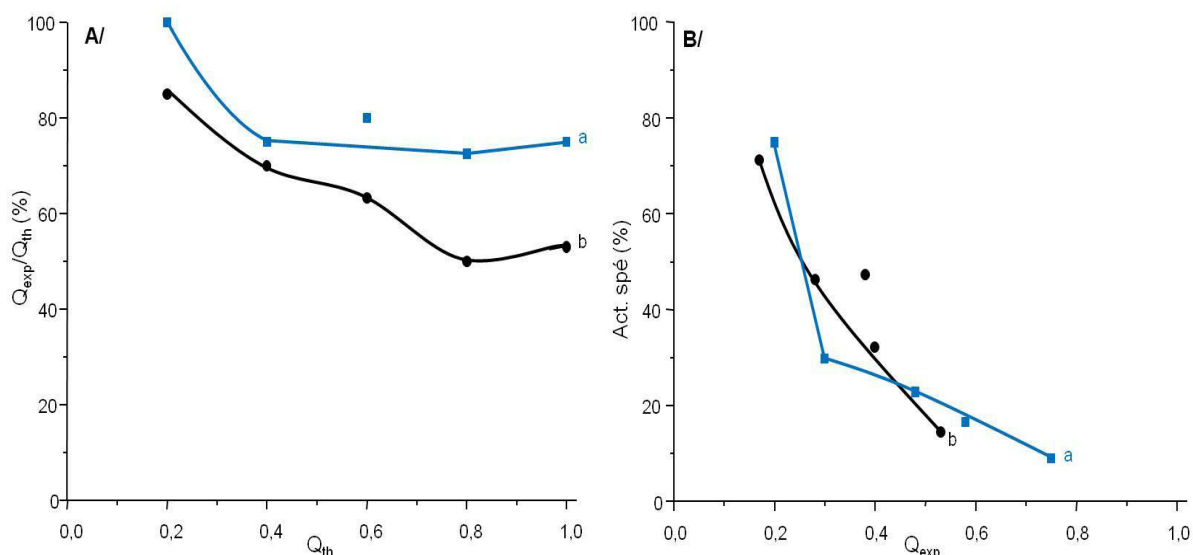


Figure III.18 : A/ Rendement de l'adsorption (Q_{exp}/Q_{th}) de la TK d'*E. coli* en fonction de Q_{th} selon la nature du M^{II} avec le contre ion nitrate B/ Act. spé_{rel} en fonction de Q_{exp} a) Mg_2Al-NO_3 b) Zn_2Al-NO_3 (0,05 M MOPS pH 7,5, 3 h)

III.4.1.3. Comparaison avec la laponite et l'hydroxyde d'aluminium

Afin de valider notre choix d'utiliser des HDL comme matrices d'immobilisation de l'apo-TK d'*E. coli*, nous avons également étudié l'adsorption de la TK, sur la laponite, une argile cationique. En effet, nous avons émis l'hypothèse que la charge négative à la surface des feuillets de la laponite était moins favorable à l'immobilisation de l'apo-TK d'*E. coli* par rapport aux feuillets HDL. Cette hypothèse se vérifierait si l'on considère que l'adsorption des enzymes est essentiellement régie par des phénomènes d'interactions électrostatiques, ce qui n'est vraisemblablement pas le cas.

L'adsorption de l'enzyme sur Mg_2Al-NO_3 a donc été comparée à celle obtenue avec la laponite. Q_{ex}/Q_{th} est légèrement meilleur avec la laponite (Figure III.19-A). Par contre, l'Act. spé_{rel} est plus importante avec l'HDL Mg_2Al-NO_3 (Figure III.19-B). Ce qui conforte notre choix de la matrice Mg_2Al-NO_3 .

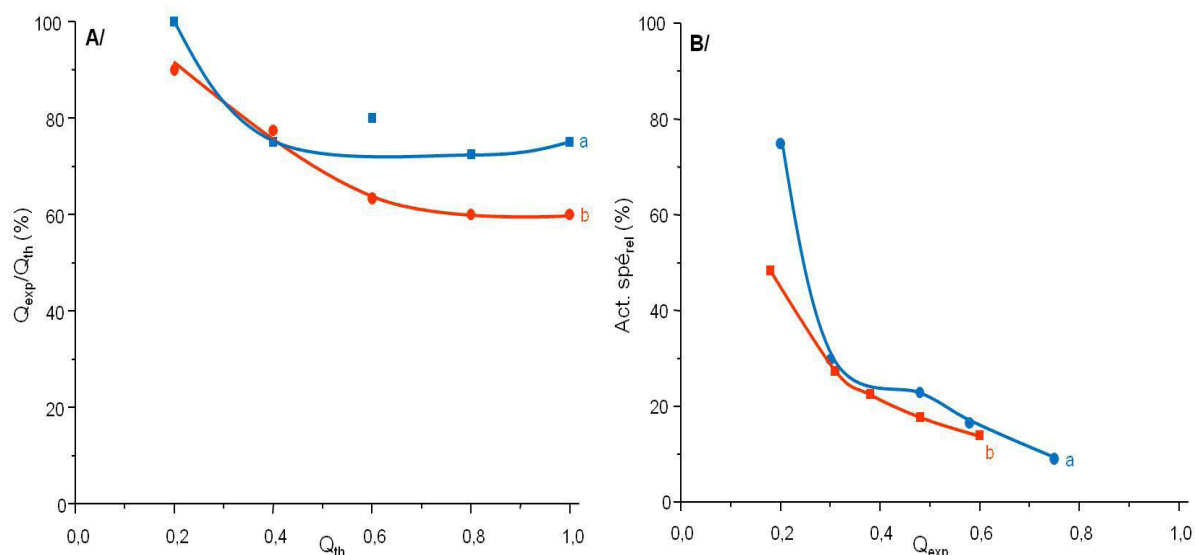


Figure III.19 : A/ Rendement de l'adsorption (Q_{exp}/Q_{th}) de la TK d'*E. coli* en fonction de Q_{th} selon l'argile B/ Act. spé relative en fonction de Q_{exp} a) Mg_2Al-NO_3 b) laponite (0,05 M MOPS pH 7,5, 3 h)

Dans le paragraphe III.2.3, nous avons décrit la formation d'oxyde-hydroxyde d'aluminium lors de la coprécipitation de l'HDL en présence de tampon Gly-Gly. Nous avons aussi étudié l'adsorption de l'apo-TK sur les oxydes-hydroxydes d'aluminium (de types Gibbsite). Une très faible quantité d'enzyme est immobilisée (15 %) et le biohybride ainsi formé n'a aucune activité catalytique.

III.4.1.4. Effet de la nature du tampon

Pour stabiliser l'activité de la TK, l'utilisation de solutions tampons est nécessaire. Nous avons donc comparé l'effet de la présence de différents tampons (MOPS et Gly-Gly) sur l'interaction entre la TK et l'HDL. Nous avons comparé les résultats obtenus en présence de tampons avec l'adsorption de la TK dans de l'eau pure (Figure III.20). En effet, nous avons vu précédemment que des interactions particulières pouvaient exister entre les anions du tampon et les HDL.

On remarque que la nature du milieu a un effet drastique sur les rendements d'adsorption, avec un rendement d'adsorption inférieur dans l'eau. L'emploi du Gly-Gly permet d'obtenir 100 % d'immobilisation quel que soit le rapport TK:HDL utilisé. Il y donc un effet bénéfique par rapport au MOPS (Figure III.20-A).

Les isothermes d'adsorption dans l'eau et le tampon MOPS sont de type S, cette forme représente un mécanisme d'adsorption coopérative, la première TK adsorbée améliore l'adsorption des enzymes suivantes. Par contre, celui avec le Gly-Gly est de type L (Figure III.20-B). Avec le tampon Gly-Gly, la saturation de la surface est atteinte à très faible

concentration d'équilibre ($0,06 \text{ mg.mL}^{-1}$) en raison des fortes interactions électrostatiques entre le tampon et l'HDL. La capacité d'adsorption peut être estimée à 1 mg de TK par mg de $\text{Mg}_2\text{Al-NO}_3$. Après le recouvrement complet de la surface de l'HDL ($C_e > 0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$), une adsorption supplémentaire de la TK (environ 20 % de la capacité d'adsorption) est observée. Cet excédent représente probablement une structure avec plusieurs couches de TK.

En ce qui concerne l'activité enzymatique, on remarque la perte significative d'activité dans l'eau (Figure III.20-C). Ceci confirme la nécessité d'utiliser une solution tamponnée pour effectuer l'immobilisation de la TK. Le tampon Gly-Gly conduit à la meilleure Act. spé_{rel} avec un maximum de 84 % pour un $Q_{th} = Q_{exp}(Q)$ de 0,2.

D'après l'étude décrite dans le paragraphe III.2.3 lors de la suspension du matériau $\text{Mg}_2\text{Al-NO}_3$ dans le tampon Gly-Gly, les anions nitrates sont échangés par des carbonates et des molécules de Gly-Gly s'insèrent entre les feuillets. Cette modification du matériau non observée avec le tampon MOPS, favorise l'adsorption de l'enzyme sur la surface hydroxylée et permet de la stabiliser. Nous utiliserons donc ce tampon pour la suite de ce travail et le biohybride alors obtenu par adsorption en présence de Gly-Gly pour $Q_{th} = 0,6$ est appelé $\text{TK@Mg}_2\text{Al-Gly-Gly}_{ads}$. C'est ce matériau qui sera caractérisé en diffraction des rayons X et par spectroscopie Infrarouge.

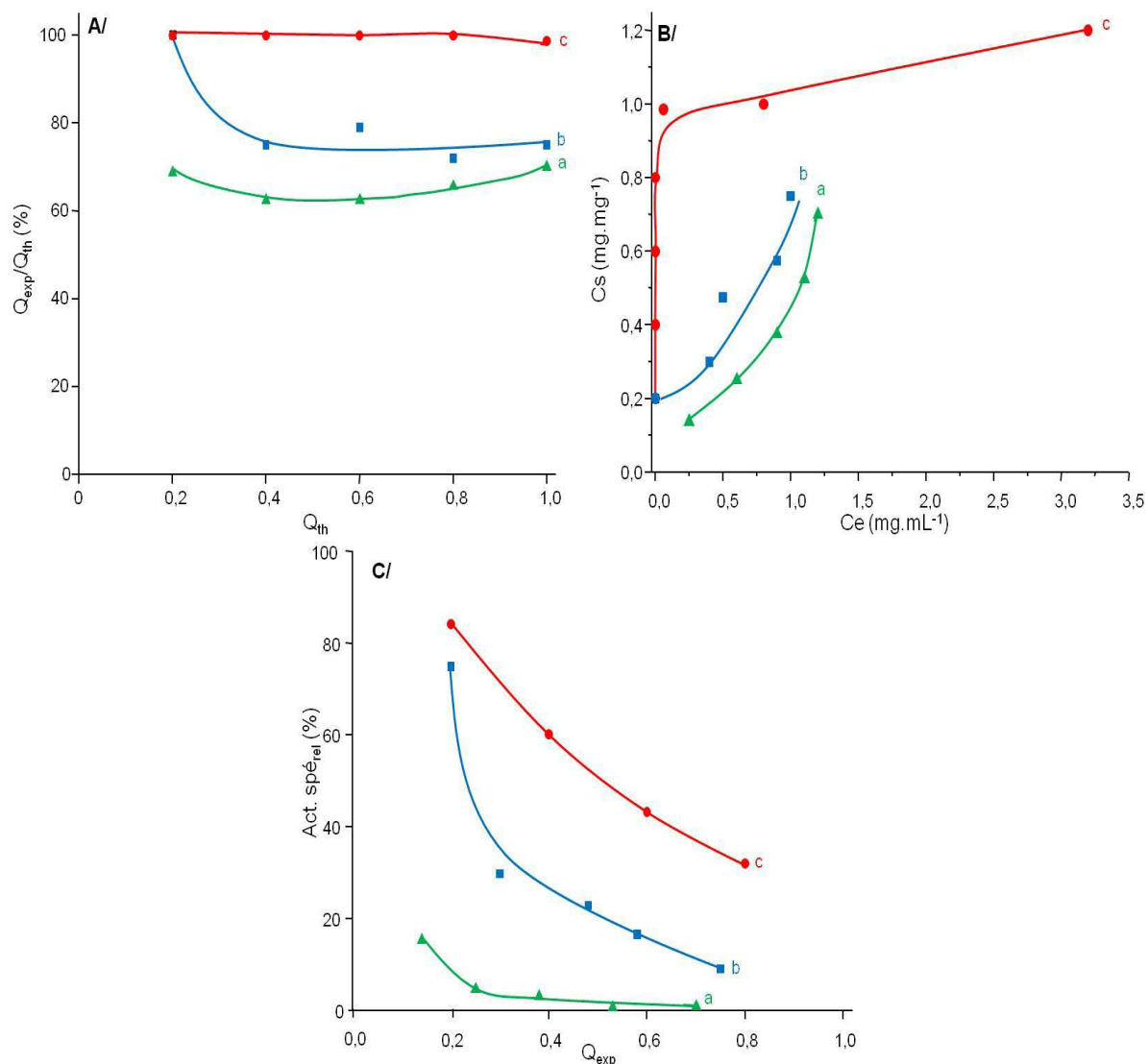


Figure III.20 : A/ Rendement de l'adsorption (Q_{exp}/Q_{th}) de la TK d'*E. coli* pure en fonction de Q_{th} selon la nature du milieu B/ Isothermes d'adsorption C/ Act. spé_{rel} en fonction de Q_{exp} a) H₂O b) 50 mM MOPS c) 100 mM Gly-Gly (Mg₂Al-NO₃, pH 7,5, 3 h)

III.4.1.5. Etude du potentiel Zêta des biomatériaux

Les HDL Mg₂Al-X avec X = NO₃⁻ ou Cl⁻ ont des potentiels Zêta de + 35 mV dans l'eau et + 25 mV dans les solutions tampons 50 mM de MOPS et 100 mM de Gly-Gly (pH 7,5). Quant aux HDL Zn₂Al-Cl ou Zn₂Al NO₃, ils ont des valeurs de + 15 mV dans les milieux tamponnés. Ces valeurs de potentiel Zêta ne sont pas dépendantes de la nature du tampon mais dépendent plutôt du pH. Par contre, les potentiels Zêta de l'apo-TK d'*E. coli* libre sont respectivement de - 25, - 16 et - 6 mV dans l'eau, 50 mM de MOPS et 100 mM de Gly-Gly (Tableau III.2).

Ces valeurs de charges opposées entre la TK et les HDL confirment la possibilité d'attractions coulombiennes entre l'enzyme et les feuillets d'HDL. Les HDL Zn₂Al-X ont une

charge positive plus faible que Mg₂Al-X, ce qui expliquerait la moindre affinité de la TK pour ces premiers matériaux. Par contre la variation de charges de la TK selon la nature du tampon (eau > MOPS > Gly-Gly) est à l'apposé de l'efficacité d'adsorption de Mg₂Al-NO₃ dans les différents milieux (Gly-Gly > MOPS > eau). C'est donc l'ensemble « TK-tampon » qui va s'adsorber sur les plaquettes d'HDL, mettant en jeu également les interactions spécifiques existant entre les HDL et l'eau, le MOPS ou le Gly-Gly.

Les valeurs du potentiel Zêta des biohybrides préparés par adsorption sont également données dans le Tableau III.2. Quel que soit le tampon, la valeur du potentiel Zêta du biohybride TK@Mg₂Al-HDL_{ads} a une valeur proche de celle de l'ensemble « TK-tampon » libre. Comme nous l'avons vu avec les isothermes d'adsorption, après le recouvrement complet de la surface de l'HDL (C_e > 0,1 mg.mL⁻¹), une adsorption supplémentaire de plusieurs couches de TK est observée.

Tableau III.2 : Potentiels Zêta des HDL, de la TK et des biohybrides dans différents milieux

	Potentiel Zêta (mV)		
	H ₂ O	50 mM MOPS	100 mM Gly-Gly
TK libre	- 25	- 16	- 6
Zn ₂ Al-Cl	-	+ 15	-
Zn ₂ Al-NO ₃	-	+ 14	-
Mg ₂ Al-Cl	-	+ 26	-
Mg ₂ Al-NO ₃	+ 35	+ 23	+ 27
TK@Zn ₂ Al-Cl _{ads}	-	- 13	-
TK@Zn ₂ Al-NO _{3ads}	-	- 12	-
TK@Mg ₂ Al-Cl _{ads}	-	- 15	-
TK@Mg ₂ Al-NO _{3ads}	- 12	- 16	- 4

III.4.1.6. Effet du conditionnement du matériau HDL utilisé pour l'adsorption

Après la synthèse de l'HDL Mg₂Al-NO₃, le matériau peut être conservé soit sous forme de suspension fraîche soit sous forme séché. Contrairement à la suspension fraîche, le séchage du matériau provoque une agrégation des particules d'HDL entre elles. La remise en suspension des particules peut s'avérer plus difficile. En effet, les tailles des particules remises en suspension restent plus importantes après séchage (290 nm) qu'avant (130 nm).

Pour l'adsorption de l'apo-TK d'*E. coli* (Figure III.21-A), nous n'observons aucunes différences entre les deux formes de conservation de l'HDL. Par contre, la suspension fraîche

d'HDL permet d'obtenir plus de 85 % d'Act. spé_{rel} pour des Q inférieur à 0,6 jusqu'à 100 % pour un Q de 0,2 (Figure III.21-B).

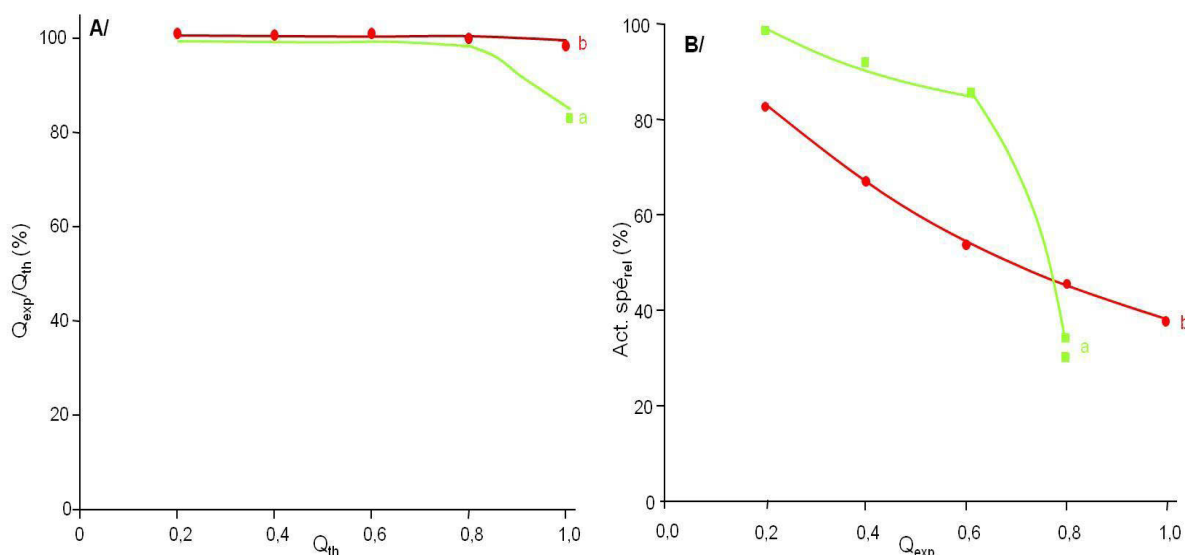


Figure III.21 : A/ Rendement de l'adsorption (Q_{exp}/Q_{th}) de la TK d'*E. coli* pure en fonction de Q_{th} selon B/ Act. spé relative en fonction de Q_{exp} a) fraction Mg_2Al-NO_3 fraîche b) fraction Mg_2Al-NO_3 séchée (0,1 M Gly-Gly, pH 7,5, 3 h)

Le Tableau III.3 reprend les données d'adsorption de l'apo-TK d'*E. coli* dans les conditions optimales, à savoir en utilisant une suspension fraîche d'HDL Mg_2Al-NO_3 dans 100 mM de tampon Gly-Gly à pH 7,5. Pour un rapport TK:HDL (Q_{th}) de 0,6, nous obtenons 100 % d'enzyme immobilisée et 83 % d'Act. spé_{rel} correspondant à une activité spécifique pour la TK d'*E. coli* immobilisée par adsorption de 11 U.mg^{-1} de biohybride TK@HDL. Nous pouvons comparer ce résultat à celui déjà obtenu avec TK de *S. cerevisiae*¹¹. Celle-ci montre qu'avec un Q_{th} de 0,38, le rendement d'immobilisation par adsorption d'un extrait brut de TK sur Mg_2Al-NO_3 est de 95 % avec 100 % d'Act. spé_{rel}. Cependant les activités spécifiques de ces deux enzymes sont très différentes, avec $4,5 \pm 1,1 \text{ U.mg}^{-1}$ pour la TK de *S. cerevisiae* et $35 \pm 2,3 \text{ U.mg}^{-1}$ pour la TK d'*E. coli*, ce qui conduit à une activité spécifique de seulement $1,2 \text{ U.mg}^{-1}$ de biohybride TK@HDL pour la TK de *S. cerevisiae* brute.

Tableau III.3 : Caractéristiques du biohybride TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{ads} (TK d'*E. coli* pure, suspension fraîche de Mg₂Al-NO₃, 0,1 M Gly-Gly, pH 7,5, 3 h)

Q _{th}	Q _{exp}	Q _{exp} /Q _{th} (%)	Act. spé _{rel} (%)	Act. spé _{TK imm} (U.mg ⁻¹)
0,2	0,2	100	100	6
0,4	0,4	100	87	9
0,6	0,6	100	83	11
0,8	0,8	100	33	5
1	0,8	79	35	7

III.4.2. Préparation des biohybrides TK@HDL_{cop} par coprécipitation

Dans une deuxième approche, nous avons étudié l'immobilisation de l'apo-TK d'*E. coli* pendant la coprécipitation *in situ* de l'HDL. Cette méthode a été optimisée dans notre laboratoire pour des protéines comme l'hémoglobine³¹ et pour différentes enzymes telles que la phosphatase alcaline²⁹, l'uréase³⁰, la fructose-6-phosphate aldolase³² et aussi la TK de *S. cerevisiae*¹¹. Les conditions expérimentales (pH, température, tampon et concentration des réactifs) peuvent être modulées. Cette méthode de synthèse permet généralement d'obtenir un biohybride avec un rendement d'immobilisation élevé, une dispersion homogène de l'enzyme encapsulée dans le matériau et une forte activité catalytique.

Pour cette étude, nous nous sommes basés sur les résultats précédents obtenus lors de l'étude de l'adsorption de la TK sur les HDL et aussi de l'étude réalisée sur la synthèse de l'HDL en présence de tampon Gly-Gly. L'interaction entre l'apo-TK d'*E. coli* et Mg₂Al-NO₃ semble particulièrement favorable, nous avons donc coprécipité un matériau Mg₂Al-NO₃ en présence de l'apo-TK solubilisée dans le tampon Gly-Gly. Nous espérons ainsi augmenter l'activité spécifique du biomatériau TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop}. L'influence de différents paramètres a été étudiée tels que le Q_{th} (0,2, 0,5 et 1), la concentration en Gly-Gly, le rapport Mg:Al (2 et 4) et l'immobilisation de l'holoenzyme plutôt que l'apoenzyme.

III.4.2.1. Effet du rapport TK:HDL (Q_{th})

Le biohybride TK@MgAl-Gly-Gly_{cop} a été synthétisé selon le protocole décrit dans le paragraphe III.2.1, en adaptant le réacteur à la faible quantité d'enzyme à immobiliser. Nous avons auparavant étudié la stabilité de l'apo-TK pendant 3 h à un pH de 9,0. En effet, cette durée et ce pH sont nécessaires pour la coprécipitation du matériau. Nous observons que 100 % de l'activité enzymatique est récupérée après les 3 h donc l'apo-TK ne se dénature pas à ce pH élevé.

Après avoir vérifié la stabilité de l'apo-TK, nous avons effectué la coprécipitation du biohybride TK@HDL_{cop} pour trois valeurs de rapports TK:HDL (Tableau III.4). 4, 10 ou 20 mg d'enzyme sont dissous dans 10 mL de tampon 100 mM Gly-Gly pH 7,5 à 4°C. Les sels sont ajoutés pendant 3 h et le pH est maintenu constant à 9,0 pendant tout le processus de précipitation. Les résultats donnés dans le tableau sont des moyennes obtenues avec au minimum deux expériences indépendantes. Nous observons qu'avec cette méthode d'immobilisation le meilleur résultat est obtenu pour un Q de 0,5 avec une légère augmentation de l'Act. spé_{TK imm} ($12,0 \pm 0,3 \text{ U.mg}^{-1}$) correspondant à un maximum d'Act. spé_{rel} (100 %).

Tableau III.4 : Caractéristiques des biohybrides TK@HDL_{cop} selon le Q_{th} (TK d'*E. coli* pure, Mg₂Al-NO₃, 0,1 M Gly-Gly, 3 h)

Q_{th}	Q_{exp}	Q_{exp}/Q_{th} (%)	Act. spé _{rel} (%)	Act. spé _{TK imm} (U.mg^{-1})
0,2	0,2	100	100	$6,2 \pm 0,3$
0,5	0,5	100	100	$12,0 \pm 0,3$
1	0,55	55	46	$8,9 \pm 0,2$

Pour éviter l'obtention du sous-produit (oxyde-hydroxyde l'aluminium) observée lors de la co-précipitation du Mg₂Al-Gly-Gly, nous avons augmenté le rapport théorique M^{II}:M^{III} de l'HDL de 2 à 4, mais ceci ne modifie ni la quantité d'enzyme immobilisée, ni l'Act. spé du biohybride.

III.4.2.2. Effet de la concentration en Gly-Gly

Par la suite, nous avons étudié l'influence de la concentration en tampon Gly-Gly pour Q_{th} de 0,5. Trois concentrations en tampon (10, 20 et 100 mM) ont été testées et comparées à l'eau (Tableau III.5). Dans tous les cas en présence de tampon, 100 % de l'apo-TK a été

immobilisée avec une Act. spé_{rel} de 100 % qui correspond à une activité spécifique de 12 U.mg⁻¹ de biohybride. De plus, nous confirmons que l'apo-TK a besoin d'un milieu tamponné pour être stabilisée.

Tableau III.5 : Caractéristiques des biohybrides TK@HDL_{cop} selon la concentration en Gly-Gly (TK d'*E. coli* pure, Mg₂Al-NO₃, Q_{th} = 0,5, 3 h)

[Gly-Gly] (mM)	Q _{exp}	Q _{exp} /Q _{th} (%)	Act. spé _{rel} (%)	Act. spé _{TK imm} (U.mg ⁻¹)
0	0,5	100	40	5 ± 0,4
10	0,5	100	100	12 ± 0,3
25	0,5	100	100	12 ± 0,2
100	0,5	100	100	12 ± 0,3

III.4.2.3. Influence de la nature de la TK

Tous les résultats obtenus précédemment ont été réalisés avec la TK sous forme d'apoenzyme c'est-à-dire en l'absence de cofacteur (ThDP). En effet, la TK d'*E. coli* purifiée est obtenue sous cette forme. L'immobilisation de la TK d'*E. coli* sous forme d'holoenzyme c'est-à-dire en présence de son cofacteur a également été étudié. Les résultats obtenus sont identiques à ceux concernant l'apoenzyme. Il est à souligner que nous obtenons une amélioration significative (d'un facteur 10) de l'activité spécifique de la TK d'*E. coli* immobilisée (12 U.mg⁻¹) par rapport aux résultats précédents obtenus lors de l'immobilisation de la TK de *S. cerevisiae* dont l'activité spécifique n'était que de 1,2 U.mg⁻¹.

III.4.3. Caractérisations physico-chimiques des biohybrides TK@HDL

Les différents biohybrides TK@HDL_{ads} et TK@HDL_{cop} ont été caractérisés par DRX, FTIR et ATG. Nous verrons plus particulièrement dans ce paragraphe les caractéristiques physico-chimiques des biohybrides conférant les meilleurs résultats en termes d'immobilisation et d'Act. spé : TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{ads} (Q_{th} = 0,6) et TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop} (Q_{th} = 0,5).

III.4.3.1. Effets des conditions de synthèse sur la composition chimique des matériaux biohybrides

L'analyse chimique des biohybrides TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{ads}, TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop} et TK@Mg₄Al-Gly-Gly_{cop} a été effectuée par ICP-AES (Tableau III.6). Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe III.2.3, les molécules de Gly-Gly dans le milieu d'adsorption et de coprécipitation sont responsables de la formation de l'hydroxyde d'aluminium. Cette réaction secondaire diminue le rendement la formation de l'HDL. La TK est également responsable de cet effet et l'augmente. En effet, les valeurs expérimentales du rapport Mg:Al restent inférieurs aux valeurs théoriques. Une solution pour palier à cet effet est d'utiliser une concentration plus faible en tampon Gly-Gly (25 mM) et d'augmenter le rapport Mg:Al à 4.

Tableau III.6 : Compositions chimiques des biohybrides déterminées par ICP-AES

Biohybrides	[Gly-Gly] (mM)	Rapport initial Mg:Al	Rapport expérimental Mg:Al
TK@Mg ₂ Al-Gly-Gly _{ads}	100	2,0	1,29
TK@Mg ₂ Al-Gly-Gly _{cop}	100	2,0	0,27
TK@Mg ₂ Al-Gly-Gly _{cop}	25	2,0	0,45
TK@Mg ₄ Al-Gly-Gly _{cop}	25	4,0	1,78

III.4.3.2. Caractérisations structurales des phases TK@HDL

Diffraction de rayons X

Les diffractogrammes de rayons X des matériaux biohybrides TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{ads}, TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop} et TK@Mg₄Al-Gly-Gly_{cop} sont représentés dans la Figure III.22. Ces diffractogrammes présentent des raies caractéristiques d'une structure lamellaire de type HDL. Par contre avec des raies de diffraction élargies, les phases coprécipitées semblent être plus désordonnées que les phases adsorbées. En effet, comme avec le Gly-Gly, la présence de l'enzyme favorise une amorphisation des phases coprécipitées. Cette amorphisation est retrouvée dans le cas d'autres enzymes immobilisées dans les HDL²⁹⁻³¹. Un élargissement des raies de diffraction et une diminution de l'intensité des raies (*00l*) confirment une diminution de la taille des particules selon la loi Laue-Scherrer accompagnée d'un désordre de la structure avec un effet turbostratique. En outre, compte tenu de la taille de la TK (90 Å)³³,

cette enzyme ne s'intercale pas entre les feuillets de l'HDL, puisque l'espacement interlamellaire reste le même que celui obtenu pour la phase $Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$ ($d = 10,6 \text{ \AA}$).

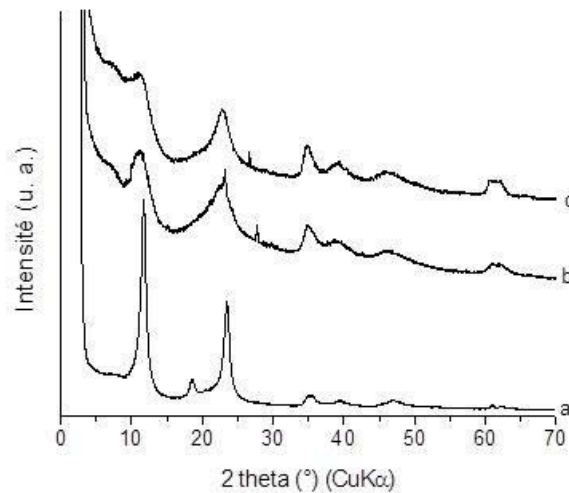


Figure III.22 : Diffractogramme de RX de a) $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{ads}$ b) $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$ c) $TK@Mg_4Al-Gly-Gly_{cop}$

Spectroscopie Infrarouge

La Figure III.23 montre les spectres FTIR des biohybrides : $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{ads}$ et $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$ et du biohybride $TK@Mg_4Al-Gly-Gly_{cop}$. Les bandes de vibration des biohybrides montrent une similitude avec le matériau $Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$. Nous observons principalement une diminution de la bande de vibration attribuée à Al-OH à 1070 cm^{-1} lorsque le rapport M^{II}/M^{III} augmente.

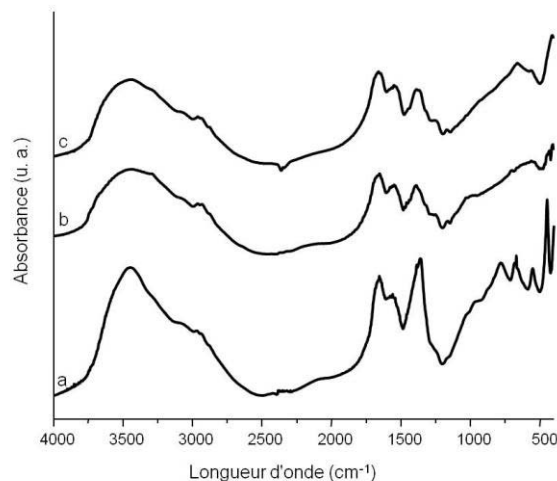


Figure III.23 : Spectre de FTIR de a) $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{ads}$ b) $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$ c) $TK@Mg_4Al-Gly-Gly_{cop}$

III.4.3.3. Stabilité thermique des matériaux biohybrides

L'analyse thermogravimétrique donne des informations sur le mécanisme de décomposition des biohybrides. Elle a été effectuée sur l'hybride servant de référence $Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$ et sur deux biohybrides : $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{ads}$ et $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$. Elle montre clairement des différences entre les biohybrides obtenus par adsorption et par coprécipitation au niveau des interactions entre l'enzyme et l'HDL. Tous les matériaux HDL étudiés subissent une décomposition thermique en plusieurs étapes comme le montrent les courbes de thermogravimétrie différentielles (DTG) (Figure III.24). Il s'agit de i) déshydratation qui correspond à la perte d'eau adsorbé à la surface des cristallites et intercalée entre les feuillets d'HDL, ii) la déshydroxylation qui induit à l'effondrement de la structure HDL et iii) la combustion de molécules organiques. Il est clair que $Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$ se décompose suivant ces trois étapes : la déshydratation à 174°C de l'eau fortement liée accompagnée éventuellement de la décomposition des anions nitrates, la décomposition des couches hydroxylées à 254°C et la décomposition exothermique des molécules du tampon Gly-Gly et des anions nitrates à 447°C.

L'adsorption et l'encapsulation de l'apo-TK d'*E. coli* dans les HDL conduit à une augmentation du taux d'hydratation, l'eau physisorbée se situant dans les mésopores ou les macropores du matériau. De plus, le procédé de coprécipitation augmente la quantité de molécules d'eau incorporées dans la structure, de 12 % contre 8 % pour la phase obtenue par adsorption.

La différence majeure entre le biohybride $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{ads}$ et le biohybride $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$ vient du maintien des molécules de Gly-Gly dans la phase adsorbée. La décomposition du Gly-Gly est mise en évidence dans l'hybride $Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$ à 447°C et dans le biohybride $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{ads}$ à 444°C. Cette étape de décomposition n'est pas observée avec la phase $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$. De plus, la décomposition de la TK s'effectue en deux étapes à 319°C et 489°C pour $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$ et 338°C et 497°C pour $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{ads}$. Manifestement, la coprécipitation conduit à une interface $TK@HDL$ étendue, avec un recouvrement complet de la surface de l'HDL par l'enzyme et un remplacement complet des molécules de Gly-Gly. Tandis que la surface du biohybride obtenu par adsorption conserve l'auto-agrégation des plaquettes HDL-Gly-Gly, le Gly-Gly et la TK coexistent dans la phase.

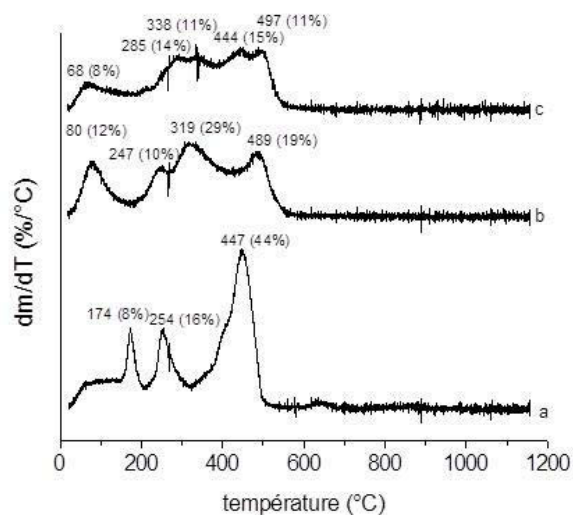


Figure III.24 : Thermogravimétrie différentielle (DTG) de a) $Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$ b) $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$ c) $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{ads}$

III.4.4. Stabilité des biohybrides $TK@HDL_{cop}$

L'étude de la stabilité des biohybrides $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{ads}$ et $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$ a été effectuée pendant une durée d'un mois. Nous avons étudié différents modes de conservation : suspension à 4°C, suspension congelée à -18°C et biohybride lyophilisé. Nous avons suivi à la fois le pourcentage d'enzyme lixiviée mais aussi l'évolution de l'activité spécifique au cours de temps (Figure III.25). Nous ne présenterons ici que les résultats obtenus avec le biohybride $TK@Mg_2Al-Gly-Gly_{cop}$. En effet, c'est ce biohybride que nous avons choisi d'utiliser pour la suite de ce travail car il donne la meilleure activité spécifique ($12 \pm 0,3 U.mg^{-1}$).

Pour une concentration en tampon Gly-Gly de 25mM, le stockage à 4°C conduit à un faible taux de lixiviation de l'enzyme (Figure III.25-A) et à une perte de 60% de l'Act. spé initiale après 30 jours (Figure III.25-B). La présence de la thiamine diphosphate (ThDP, 0,2 mM), cofacteur de la TK, dans la solution de stockage n'améliore pas ce résultat. Après lyophilisation, seulement 30 % de l'activité spécifique est retrouvée. Le stockage sous forme de suspension congelée conduit à une lixiviation de 17 % de l'enzyme après 1 mois.

Nous avons étudié l'influence de la concentration en tampon Gly-Gly sur ces différents modes de stockage. Lorsque celle-ci augmente à 100 mM, le taux de lixiviation d'enzyme augmente et la perte d'activité est accélérée (Figure III.26). Pour une concentration en tampon Gly-Gly de 10 mM, 40 % de l'Act. spé initiale est perdue dès une journée.

En conclusion, nous constatons que la conservation sous forme de suspension à 4°C pour une concentration en tampon Gly-Gly de 25mM s'avère être la plus adaptée.

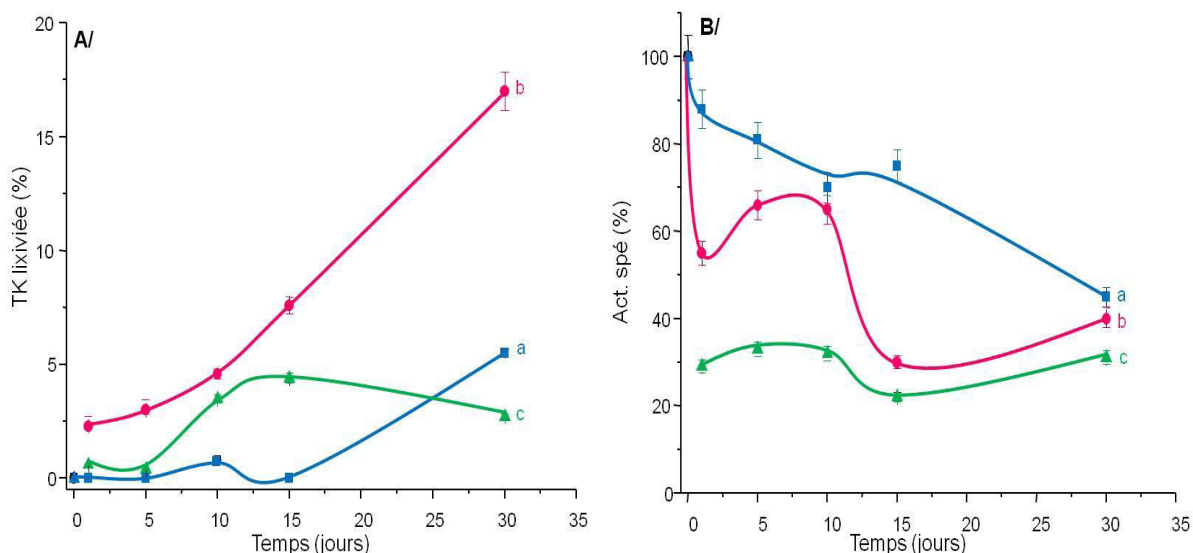


Figure III.25 : Caractéristique du biohybride TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop} dans Gly-Gly 25 mM conservé A/ relargage de la TK en fonction du temps B/ Act.spé.rel en fonction du temps a) sous forme d'une suspension à 4°C b) sous forme d'une suspension congelé à -18°C c) sous forme lyophilisé

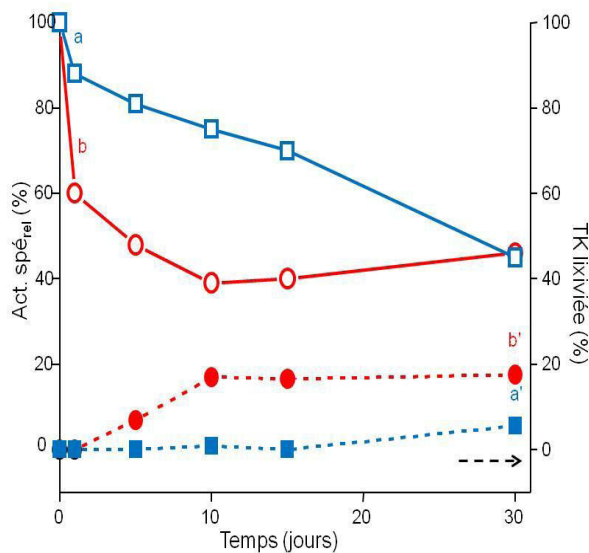
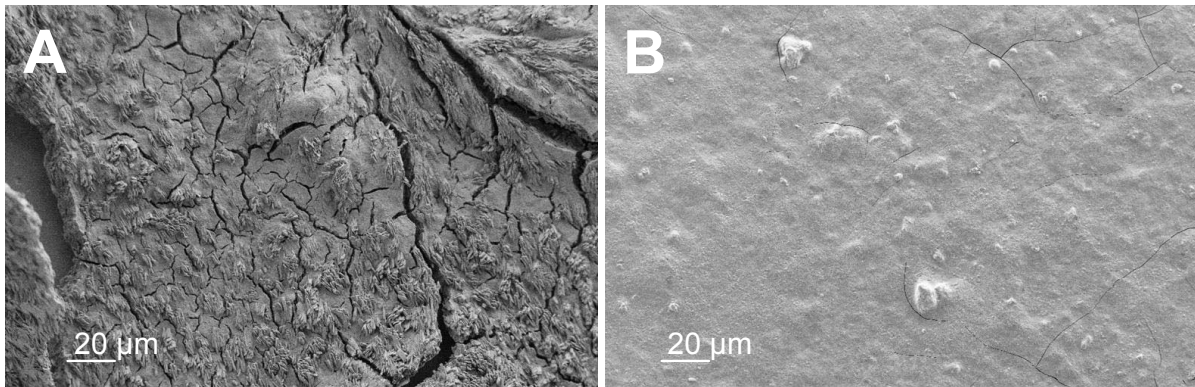


Figure III.26 : Caractéristique des biohybrides conservés sous forme d'une suspension à 4°C de TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop} dans a et a') 25 mM Gly-Gly b et b') 100 mM Gly-Gly

III.5. Préparation d'un film TK@HDL

Le but de ce travail est de réaliser un biocapteur avec la TK immobilisée à la surface d'une électrode. La première étape sur le plan technique pour cet objectif, consiste à réaliser des films déposés sur un support de carbone poli en utilisant une suspension de TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop} préparée et stockée sous forme de suspension à 4°C dans 100 mM et 25 mM de Gly-Gly. Une goutte de ces suspensions est déposée sur la surface du support et trois modes de séchage ont été envisagés : une nuit à 4°C, une heure sous vide et 2h30 à température ambiante.

Les clichés de microscopie électronique à balayage (MEB) montrent clairement qu'avec le biohybride TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop} en suspension dans 100 mM de Gly-Gly et séché une nuit à 4°C, le film comporte des fissures qui peuvent causer un relargage de l'enzyme (Figure III.27-A). Une concentration plus faible en tampon (25 mM) permet l'obtention d'un film homogène (Figure III.27-B).



**Figure III.27 : Image MEB des films des biohybrides TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop} dans Gly-Gly pH 7,5
A/ 100 mM B/ 25 mM (séchage 1 nuit à 4°C)**

L'activité enzymatique du film TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop} dans 25 mM de Gly-Gly a été déterminée par le test spectrophotométrique en présence du L-érythrose comme substrat donneur et du DR5P comme substrat accepteur. Le support est immergé dans une solution agitée contenant tous les réactifs et cofacteurs. Après l'immersion du support, on enregistre la variation de l'absorbance en fonction du temps. Les films séchés une nuit à 4°C ou une heure sous vide conduisent à une faible activité de la TK, seul le séchage à température ambiante a permis d'obtenir un film ayant une activité significative de la TK (Figure III.28).

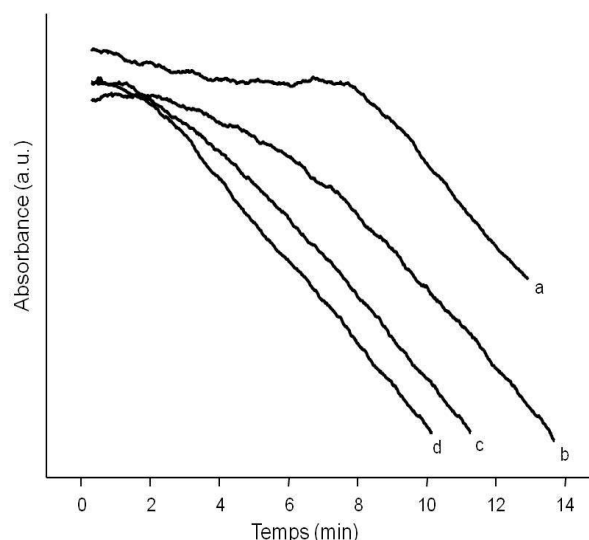


Figure III.28 : Activité enzymatique du film TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop} a) 2^{ème} utilisation b) 3^{ème} utilisation c) 4^{ème} utilisation d) 5^{ème} utilisation

Afin de réutiliser l'électrode, nous avons déterminé l'activité de la TK après plusieurs cycles (Figure III.28). Il est à souligner que lors de la première comme de la deuxième utilisation, un temps de latence est observé, celui-ci est probablement nécessaire pour la diffusion des substrats dans le film jusqu'au site actif de l'enzyme. Lors de la deuxième utilisation de l'électrode, nous mesurons une activité enzymatique plus faible que celle mesurée lors de la première utilisation (environ 50 %, Tableau III.7). Une hypothèse pourrait être le décrochage mécanique du biohybride ou d'une partie de la TK faiblement accrochée dans les HDL. Pour vérifier cela, l'électrode a été immergée dans le tampon seul et aucun décrochage du biohybride ou de la TK ne sont observés. La perte d'activité lors de la deuxième utilisation serait donc induite par la présence des substrats conduisant à une modification des charges de l'enzyme. Une hypothèse pourrait être qu'en l'absence de substrat, la TK est immobilisée sur les HDL par des interactions électrostatiques mettant en jeu, en fonction de l'orientation des TK sur l'HDL, des résidus chargés du site actif se situant à la surface de l'enzyme. En présence des substrats et cofacteurs, ces résidus sont sollicités pour stabiliser ces molécules dans le site actif. Il est alors possible qu'une partie des enzymes se décrochent dans la solution d'analyse car elles ne sont plus suffisamment adsorbées. La quantité d'enzyme décrochée n'a pas pu être mesurée, le milieu réactionnel étant trop dilué.

Tableau III.7 : Activité enzymatique du film TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop} après plusieurs cycles

Utilisations	Activité de la TK (U.mg ⁻¹ .cm ⁻²)
1 ^{ère}	5,2
2 ^{ème}	2,7
3 ^{ème}	2,6
4 ^{ème}	2,8
5 ^{ème}	2,7

Par contre, nous n'observons aucune perte d'activité de la TK après quatre cycles successifs d'utilisation de l'électrode, l'activité spécifique moyenne du film est de $2,70 \pm 0,06$ U.mg⁻¹.cm⁻² (Figure III.28). Enfin la reproductibilité pour trois films préparés indépendamment est de 96 %. Ce résultat signifie que nous avons un processus de préparation des films efficace.

III.6. Conclusion

L'immobilisation de l'apo-TK d'*E. coli* dans différents HDL a pu être effectuée selon deux méthodes, l'adsorption et la coprécipitation. La coprécipitation de la phase Mg₂Al-Gly-Gly en présence de TK d'*E. coli* dans 25 mM de Gly-Gly conduit à un biohybride ayant une activité spécifique de $12,1 \pm 0,3 \text{ U.mg}^{-1}$ ce qui correspond à une augmentation d'un facteur 10 par rapport à l'immobilisation d'un extrait brut de TK de *S. cerevisiae* par coprécipitation¹¹. Cette augmentation est due à une activité spécifique plus importante pour la TK d'*E. coli* et à une plus grande quantité d'enzyme immobilisée dans l'HDL.

Nous avons montré que la présence de Gly-Gly gêne la précipitation de l'HDL, mais le point positif est le remplacement de l'anion nitrate par le dipeptide qui induit la formation d'un réseau 3D plus hydrophile et flexible constitué de petites plaquettes d'HDL favorable à l'encapsulation de l'enzyme. Ainsi, le matériau biohybride TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop} donne une activité enzymatique reproductible, stable et élevée.

De plus, dans le but de développer un biocapteur comportant la TK immobilisée à la surface de l'électrode, des composés phosphorylés (D-F6P et ThDP) sont nécessaires pour déterminer l'activité de la TK. Nous nous sommes attachés à étudier leur adsorption possible sur les HDL. Les résultats indiquent que celle-ci est très limitée et ne perturbera pas la réaction enzymatique.

Enfin, afin de déposer le biohybride TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop} à la surface de l'électrode du biocapteur, un film a été réalisé montrant une structure homogène et conduisant à une activité significative de la TK ($2,70 \pm 0,06 \text{ U.mg}^{-1}.\text{cm}^{-2}$). Ce film pourra donc être utilisé pour permettre la détection d'inhibiteurs de la TK à l'aide d'un biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK.

Les travaux portant sur les conditions d'optimisation de l'immobilisation de la TK dans les HDL ont fait l'objet d'une publication donnée en annexes³⁴.

III.7. Références bibliographiques

- (1) Wang, Y.; Zhu, J.; Zhu, R.; Zhu, Z.; Lai, Z.; Chen, Z. Chitosan/Prussian Blue-based Biosensors. *Meas. Sci. Technol.* **2003**, *14*, 831.
- (2) Coche-Guerente, L.; Cosnier, S.; Innocent, C.; Mailley, P. Development of Amperometric Biosensors Based on the Immobilization of Enzymes in Polymer Films Electrogenerated from a Series of Amphiphilic Pyrrole Derivatives. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *311*, 23–30.
- (3) Brahim, S. I.; Maharajh, D.; Narinesingh, D.; Guiseppi-Elie, A. Design and Characterization of a Galactose Biosensor Using a Novel Polypyrrole-Hydrogel Composite Membrane. *Anal. Lett.* **2002**, *35*, 797–812.
- (4) Şenel, M.; Bozgeyik, İ.; Çevik, E.; Fatih Abas yan k, M. A Novel Amperometric Galactose Biosensor Based on Galactose oxidase-poly(N-glycidylpyrrole-co-pyrrole). *Synth. Met.* **2011**, *161*, 440–444.
- (5) Sung, W. J.; Bae, Y. H. Glucose Oxidase, Lactate Oxidase, and Galactose Oxidase Enzyme Electrode Based on Polypyrrole with polyanion/PEG/enzyme Conjugate Dopant. *Sensors Actuators B Chem.* **2006**, *114*, 164–169.
- (6) Ekinçi, E.; Paşahan, A. Poly (4-methoxyphenol) Film as a Galactose-sensing Material. *Eur. Polym. J.* **2004**, *40*, 1605–1608.
- (7) Lee, K. N.; Lee, Y.; Son, Y. Enhanced Sensitivity of a Galactose Biosensor Fabricated with a Bundle of Conducting Polymer Microtubules. *Electroanalysis* **2011**, *23*, 2125–2130.
- (8) Gülce, H.; Ataman, İ.; Gülce, A.; Y ld z, A. A New Amperometric Enzyme Electrode for Galactose Determination. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30*, 41–44.
- (9) Çevik, E.; Şenel, M.; Fatih Abas yan k, M. Construction of Biosensor for Determination of Galactose with Galactose Oxidase Immobilized on Polymeric Mediator Contains Ferrocene. *Curr. Appl. Phys.* **2010**, *10*, 1313–1316.
- (10) Tkac, J.; Whittaker, J. W.; Ruzgas, T. The Use of Single Walled Carbon Nanotubes Dispersed in a Chitosan Matrix for Preparation of a Galactose Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1820–1824.
- (11) Benaissi, K.; Hélaïne, V.; Prévot, V.; Forano, C.; Hecquet, L. Efficient Immobilization of Yeast Transketolase on Layered Double Hydroxides and Application for Ketose Synthesis. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1497–1509.
- (12) Costa, F. R.; Leuteritz, A.; Wagenknecht, U.; Auf der Landwehr, M.; Jehnichen, D.; Haeussler, L.; Heinrich, G. Alkyl Sulfonate Modified LDH: Effect of Alkyl Chain Length on Intercalation Behavior, Particle Morphology and Thermal Stability. *Appl. Clay Sci.* **2009**, *44*, 7–14.
- (13) Iyi, N.; Ebina, Y.; Sasaki, T. Synthesis and Characterization of Water-swallowable LDH (Layered Double Hydroxide) Hybrids Containing Sulfonate-type Intercalant. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 8085–8095.
- (14) Aisawa, S.; Sasaki, S.; Takahashi, S.; Hirahara, H.; Nakayama, H.; Narita, E. Intercalation of Amino Acids and Oligopeptides into Zn–Al Layered Double Hydroxide by Coprecipitation Reaction. *J. Phys. Chem. Solids* **2006**, *67*, 920–925.
- (15) Choy, J.-H.; Kwak, S.-Y.; Park, J.-S.; Jeong, Y.-J. Cellular Uptake Behavior of [γ -³²P] Labeled ATP–LDH Nanohybrids. *J. Mater. Chem.* **2001**, *11*, 1671–1674.
- (16) Baikousi, M.; Stamatis, A.; Louloudi, M.; Karakassides, M. A. Thiamine Pyrophosphate Intercalation in Layered Double Hydroxides (LDHs): An Active Bio-hybrid Catalyst for Pyruvate Decarboxylation. *Appl. Clay Sci.* **2013**, *75–76*, 126–133.

- (17) Jellicoe, T. C.; Fogg, A. M. Synthesis and Characterization of Layered Double Hydroxides Intercalated with Sugar Phosphates. *J. Phys. Chem. Solids* **2012**, *73*, 1496–1499.
- (18) Rives, V. *Layered Double Hydroxides: Present and Future*; Nova Science Publishers **2001**.
- (19) Leroux, F.; Gachon, J.; Besse, J. P. Biopolymer immobilization during the crystalline growth of layered double hydroxide. *J. Solid State Chem.* **2004**, *177*, 245–250.
- (20) Hibino, T.; Jones, W. New Approach to the Delamination of Layered Double Hydroxides. *J. Mater. Chem.* **2001**, *11*, 1321–1323.
- (21) Fischer, G.; Cao, X.; Cox, N.; Francis, M. The FT-IR Spectra of Glycine and Glycylglycine Zwitterions Isolated in Alkali Halide Matrices. *Chem. Phys.* **2005**, *313*, 39–49.
- (22) Ram, S. Infrared Spectral Study of Molecular Vibrations in Amorphous, Nanocrystalline and $\text{AlO}(\text{OH}) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ Bulk Crystals. *Infrared Phys. Technol.* **2001**, *42*, 547–560.
- (23) Remko, M.; Rode, B. M. Catalyzed Peptide Bond Formation in the Gas Phase. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 4667–4673.
- (24) Sigel, H.; Martin, R. B. Coordinating Properties of the Amide Bond. Stability and Structure of Metal Ion Complexes of Peptides and Related Ligands. *Chem. Rev.* **1982**, *82*, 385–426.
- (25) Iyi, N.; Ishihara, S.; Kaneko, Y.; Yamada, H. Swelling and Gel/Sol Formation of Perchlorate-Type Layered Double Hydroxides in Concentrated Aqueous Solutions of Amino Acid-Related Zwitterionic Compounds. *Langmuir* **2013**, *29*, 2562–2571.
- (26) Giles, C. H.; MacEwan, T. H.; Nakhwa, S. N.; Smith, D. Studies in Adsorption. A System of Classification of Solution Adsorption Isotherms, and Its Use in Diagnosis of Adsorption Mechanisms and in Measurement of Specific Surface Areas of Solids. *J. Chem. Soc. Resumed* **1960**, 3973–3993.
- (27) Prévot, V.; Mousty, C.; Forano, C. State of the Art in Biomolecules and Layered Double Hydroxide Assemblies. In *Advances in Chemistry Research*; Taylor J. C. **2012**, *17*, 35–84.
- (28) Mousty, C.; Prévot, V. Hybrid and Biohybrid Layered Double Hydroxides for Electrochemical Analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 3513–3523.
- (29) Geraud, E.; Prevot, V.; Forano, C.; Mousty, C. Spongy Gel-like Layered Double Hydroxide–alkaline Phosphatase Nanohybrid as a Biosensing Material. *Chem. Commun.* **2008**, 1554–1556.
- (30) Vial, S.; Prevot, V.; Leroux, F.; Forano, C. Immobilization of Urease in ZnAl Layered Double Hydroxides by Soft Chemistry Routes. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *107*, 190–201.
- (31) Charradi, K.; Forano, C.; Prevot, V.; Madern, D.; Ben Haj Amara, A.; Mousty, C. Characterization of Hemoglobin Immobilized in MgAl-Layered Double Hydroxides by the Coprecipitation Method. *Langmuir* **2010**, *26*, 9997–10004.
- (32) Guérard-Hélaine, C.; Légeret, B.; Fernandes, C.; Prévot, V.; Forano, C.; Lemaire, M. Efficient Immobilization of Fructose-6-phosphate Aldolase in Layered Double Hydroxide: Improved Stereoselective Synthesis of Sugar Analogues. *New J. Chem.* **2011**, *35*, 776–779.
- (33) Jahromi, R. R. F.; Morris, P.; Martinez-Torres, R. J.; Dalby, P. A. Structural Stability of *E. Coli* Transketolase to Temperature and pH Denaturation. *J. Biotechnol.* **2011**, *155*, 209–216.
- (34) Touisni, N.; Charmantray, F.; Helaine, V.; Forano, C.; Hecquet, L.; Mousty, C. Optimized Immobilization of Transketolase from *E. Coli* in MgAl-layered Double Hydroxides. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *112*, 452–459.

**CHAPITRE IV : BIOCAPTEUR
BI-ENZYMATIQUE GAO_x-TK**

IV.1. Introduction

La TK est impliquée dans plusieurs maladies sévères chez l'Homme telles que des maladies neurologiques, certains cancers, et le diabète. Les études actuellement décrites dans la littérature portent majoritairement sur le rôle de cette enzyme chez les patients atteints de cancers. Une augmentation de l'activité enzymatique de la TK étant observée chez les malades, de nombreuses molécules, analogues de substrats, ou du cofacteur, ont été conçues afin d'inhiber spécifiquement la TK. Il est donc intéressant de pouvoir mettre au point un test rapide et sensible permettant de cribler *in vitro* de nouveaux inhibiteurs de la TK. Les tests *in vitro* déjà décrits sont essentiellement basés sur une détection spectrophotométrique en présence d'une enzyme auxiliaire, et d'un cofacteur tel que le NADH. Le test électro-enzymatique décrit dans le chapitre II que nous avons mis au point pour la détection de l'activité des TKs d'*E. coli* et humaine libres en solution, est basé sur le couplage avec la galactose oxydase, offre une plus grande sensibilité. De plus, il est facile à mettre en œuvre, sensible et la réponse est rapide. Nous avons donc choisi d'adapter ce test pour la détection d'inhibiteurs de la TK. La co-immobilisation de la GAOx et de la TK sur la surface de l'électrode permettrait d'obtenir un test facile à mettre en œuvre, réutilisable et peu coûteux en enzyme.

Dans la littérature, l'étude de l'inhibition d'enzymes par des mesures électrochimiques est essentiellement appliquée à la détection de pesticides et de métaux lourds dans l'environnement^{1,2}. Par contre, peu d'articles décrivent l'inhibition d'enzymes pour une application médicale comme le criblage d'inhibiteurs^{3,4}.

Par exemple, un biocapteur à polyphénol oxydase (PPO) a été mis au point pour le criblage de nouveaux inhibiteurs du processus d'hyperpigmentation³. Il est connu que la PPO joue un rôle dans la biosynthèse de la mélanine. Les auteurs ont tout d'abord validé le mode de détection électrochimique avec des inhibiteurs connus de la mélanogenèse (acide ascorbique) et de la PPO (acide kojique, acide benzoïque et acide azélaïque) dans le but ensuite de cribler de nouveaux inhibiteurs. De même dans le cas de la maladie d'Alzheimer, le donepezil, un inhibiteur de la cholinestérase est utilisé pour le traitement de cette maladie⁴. Une étude de l'action inhibitrice du donepezil sur l'activité de l'acétylcholinestérase a été réalisée en voltammétrie.

Dans ce chapitre IV, nous présenterons les différentes étapes qui nous ont permis de développer un système ampérométrique bi-enzymatique GAOx-TK dans lequel les deux enzymes sont immobilisées à la surface de l'électrode pour détecter les inhibiteurs de la TK d'*E. coli*. Cette TK a été choisie comme modèle du fait de sa forte homologie avec la TK humaine car lors de l'étude de l'immobilisation de la TK dans les HDL, nous n'avions pas encore la TK humaine à notre disposition. Nous allons présenter la mise au point du biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK qui sera validé par la détermination de la constante de dissociation (K_D) du cofacteur de la TK d'*E. coli* immobilisée, le pyrophosphate de thiamine (ThDP). Enfin, nous appliquerons ce système à la détection d'inhibiteurs connus de la TK.

IV.2. Elaboration du biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK

Ce biocapteur ampérométrique est basé sur la co-immobilisation de GAOx et de la TK à la surface de l'électrode (Figure IV.1). Lors de cette étude nous avons utilisé la réaction sélectionnée dans le chapitre II faisant intervenir un des substrats donneurs physiologiques, le D-fructose-6-phosphate (D-F6P) et le glycolaldéhyde (GA), qui est le meilleur substrat accepteur non phosphorylé connu pour cette enzyme. Les mesures sont effectuées en chrono-ampérométrie à potentiel appliqué ($E_{app} = 0,6 \text{ V/Ag-AgCl}$) avec une électrode de travail en platine tournante. Comme pour la détection de la TK en solution, la mesure du signal ampérométrique est effectuée après l'ajout du D-F6P dans la solution d'analyse. Avant de terminer l'enregistrement du courant, la dihydroxyacétone (DHA) est ajoutée comme référence interne pour vérifier que le biocapteur à GAOx n'est pas saturé.

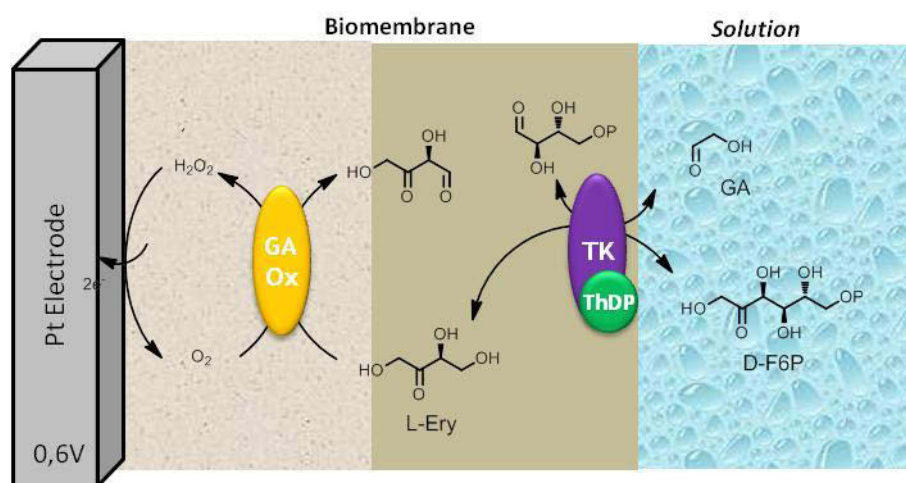


Figure IV.1 : Biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK

IV.2.1. Mise au point du biocapteur

Le biocapteur a été élaboré en bicouche avec une couche externe comportant la TK d'*E. coli* et une couche interne avec la GAOx. En effet, dans le chapitre II, nous avons montré que l'argile cationique, la laponite, fournit un excellent environnement biocompatible pour l'immobilisation de GAOx. D'autre part, dans le chapitre III, nous avons montré qu'il était possible de synthétiser un biohybride TK@HDL par la méthode de coprécipitation ayant une bonne activité enzymatique. Les bioélectrodes sont donc préparées en deux étapes. La première étape est la formation de la première couche GAOx@laponite (cf chapitre II). La deuxième étape est le dépôt sur la première couche, du biohybride TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop},

dont l'obtention a été décrite dans le chapitre III (Figure IV.2). Ce biohybride sera nommé TK@HDL dans la suite de ce chapitre.

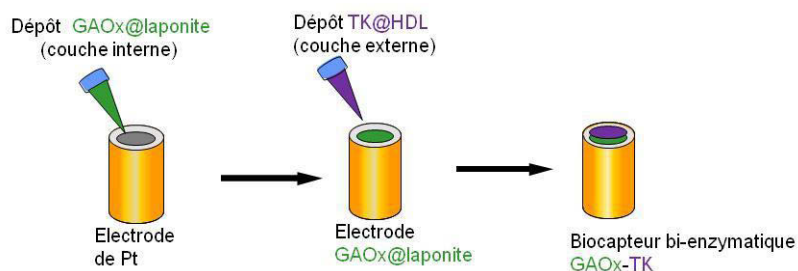


Figure IV.2 : Formation en bicouche du biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK

IV.2.1.1. Effet de la réticulation avec le glutaraldéhyde

Lors de l'élaboration du biocapteur ampérométrique à GAOx@laponite, une étape de réticulation chimique avec de la vapeur de glutaraldéhyde est nécessaire pour stabiliser la biomembrane⁵. Nous avons donc étudié l'effet de la réticulation chimique sur la réponse ampérométrique du biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK. Trois traitements ont été réalisés, la réticulation de la première couche GAOx@laponite, la réticulation avec les deux couches et sans réticulation chimique. Les résultats présentés dans le Tableau IV.1 sont des moyennes réalisées avec trois biocapteurs différents, chacun étant utilisés trois fois. A partir de ce tableau, plusieurs constatations peuvent être faites.

Premièrement, nous observons que lors de la première utilisation des biocapteurs, quel que soit le traitement appliqué, la réponse est toujours plus importante. Mais, les réponses ampérométriques obtenues sont plus bruitées et moins reproductibles que lors des utilisations suivantes, ce qui donne un écart type plus important sur les valeurs de courant. Ce fait est comparable aux observations faites par spectrophotométrie avec le film TK@HDL (*cf.* paragraphe III.5).

Deuxièmement, nous obtenons des courants plus importants pour les biocapteurs ayant subi soit la réticulation avec les deux couches soit aucune réticulation chimique. Dans le cas du biocapteur sans réticulation chimique, la réponse est plus importante et reproductible lors de la deuxième et la troisième utilisation. La stabilisation de la première couche GAOx@laponite par la réticulation chimique n'est donc pas nécessaire lorsqu'elle est recouverte pour une autre couche de biomatériaux en l'occurrence TK@HDL. Pour la suite des travaux, l'étape de réticulation chimique avec le glutaraldéhyde ne sera plus effectuée et les réponses en courant seront mesurées à partir de la deuxième utilisation.

Tableau IV.1 : Effet du glutaraldéhyde sur la réponse ampérométrique après l'ajout de 1 Mm de D-F6P (75 µg GAOx@laponite, 100 µg TK@HDL, 0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM ThDP, 2 mM GA, 1 mM D-F6P, E_{app} = 0,6 V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

Utilisation	Courant d'oxydation (nA)		
	Réticulation de la 1 ^{ère} couche	Réticulation de deux couches	Sans réticulation
Première	510 ± 51	548 ± 42	802 ± 46
Deuxième	255 ± 6	329 ± 5	350 ± 4
Troisième	267 ± 7	224 ± 6	363 ± 6

IV.2.1.2. Effet de la quantité de biohybride TK@HDL

La quantité de biohybride TK@HDL déposée sur la première couche GAOx@laponite est aussi un facteur important dans la préparation du biocapteur bi-enzymatique. La quantité de GAOx@laponite déposée à la surface de l'électrode de platine a été optimisée dans le chapitre II et sera donc fixée à 50:25 (µg:µg). Trois quantités de biohybride TK@HDL croissantes, à savoir 50, 75 et 100 µg ont été testées (17:33, 24:51 et 33:66 µg:µg) (Tableau IV.2). Une quantité de 100 µg de biohybride TK@HDL permet d'obtenir la réponse ampérométrique la plus élevée. Nous nous sommes limités à cette quantité de 100 µg car une augmentation trop importante de matière déposée sur l'électrode risquait de provoquer un décrochage mécanique de la couche.

Tableau IV.2 : Réponses ampérométriques avec différentes quantités de biohybride TK@HDL (75 µg GAOx@laponite, 0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM ThDP, 2 mM GA, 1 mM D-F6P, E_{app} = 0,6 V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

Quantité de TK@HDL (µg)	Courant d'oxydation (nA)
50	185 ± 5
75	217 ± 1
100	350 ± 2

En outre, un témoin a été préparé en remplaçant la couche de biohybride TK@HDL par une couche d'HDL Mg₂Al-Gly-Gly seul. Dans ce cas, après ajout du D-F6P, nous n'observons aucun signal. La matrice en l'absence de TK ne conduit donc pas à une interférence.

IV.2.2. Influence des constituants du milieu réactionnel

Les différentes étapes conduisant à l'élaboration du biocapteur ayant été optimisées, nous avons étudié la composition du milieu réactionnel.

IV.2.2.1. Effet de la nature du tampon

Lors de l'élaboration du biocapteur GAOx@laponite, nous avons observé que le tampon HEPES 50 mM à pH 7,0 permettait d'obtenir la meilleure sensibilité par rapport aux tampons phosphate et MOPS ; il avait donc été sélectionné pour effectuer des dosages avec cette enzyme (*cf.* paragraphe II.4.2.2). Il faut aussi rappeler que la GAOx est instable dans les tampons ayant un groupement amine, comme ceux fréquemment utilisés avec la TK, tel que le Gly-Gly et le TRIS⁶. De plus, le tampon HEPES est également un tampon utilisé avec la TK. Ce tampon a donc été conservé pour les mesures effectuées avec le biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK.

IV.2.2.2. Etude de la diffusion des substrats de la GAOx

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de la présence de la couche extérieure sur la réponse du biocapteur à GAOx en présence de trois substrats, le L-Ery, le GA et la DHA comme substrat de référence. Nous avons comparé les performances du biocapteur GAOx@laponite avec celles de deux biocapteurs en bicouche constitués soit par une couche externe Mg₂Al-Gly-Gly (100 µg), soit par une couche externe TK@HDL (100 µg) (Tableau IV.3). Il convient de noter que dans ce dernier cas, la TK n'est pas active car son substrat, le D-F6P, n'est pas présent. Les trois substrats de la GAOx testés sont bien détectés par la GAOx présente dans la couche intérieure. La présence de la couche externe d'HDL entrave la diffusion des substrats jusqu'à la GAOx. Par rapport à la couche d'HDL seule, la présence de la TK dans la couche d'HDL faciliterait même la diffusion des espèces grâce à une structure du matériau plus poreuse conduisant ainsi à une sensibilité et un courant maximum plus importants. Dans ce cas, une très légère baisse de sensibilité, en moyenne de 12 %, est observée par rapport au biocapteur GAOx@laponite ; par contre les domaines de linéarité restent quasiment inchangés pour les trois substrats. Le L-Ery qui sera formé par réaction catalysée par la TK dans la couche externe du biocapteur pourra donc être détecté par la GAOx sur une large gamme de concentrations.

Tableau IV.3 : Performances ampérométriques de différentes configurations du biocapteur GAOx@laponite pour le dosage du L-Ery, du GA et de la DHA (75 µg GAOx@laponite, 100 µg HDL, 100 µg TK@HDL, 0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, $E_{app} = 0,6$ V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

Configuration de l'électrode	Substrats	S (mA.M ⁻¹ .cm ⁻²)	I _{max} (µA.cm ⁻²)	DL (M)	R ² (n)
GAOx@laponite	DHA	237	155	5,0.10 ⁻⁷ - 2,9.10 ⁻⁴	0,999 (52)
GAOx@laponite-HDL	DHA	144	136	1,0.10 ⁻⁷ - 7,3.10 ⁻⁴	0,999 (38)
GAOx@laponite-TK@HDL	DHA	208	140	6,3.10 ⁻⁷ - 4,0.10 ⁻⁴	0,999 (56)
GAOx@laponite	L-Ery	55	165	1,0.10 ⁻⁶ - 1,5.10 ⁻³	0,999 (26)
GAOx@laponite-HDL	L-Ery	36	48	1,0.10 ⁻⁴ - 1,3.10 ⁻³	0,998 (12)
GAOx@laponite-TK@HDL	L-Ery	48	131	9,7.10 ⁻⁵ - 1,9.10 ⁻³	0,999 (18)
GAOx@laponite	GA	9	4,8	3,3.10 ⁻⁴ - 1,5.10 ⁻²	0,998 (20)
GAOx@laponite-HDL	GA	9	4,4	2,1.10 ⁻⁴ - 1,4.10 ⁻²	0,998 (19)
GAOx@laponite-TK@HDL	GA	6,5	4,6	2,2.10 ⁻⁴ - 1,8.10 ⁻²	0,998 (27)

IV.2.2.3. Influence de la concentration en substrats de la TK

Nous avons étudié l'influence des concentrations en GA et en D-F6P, substrats nécessaires à la réaction catalysée par la TK d'*E. coli* immobilisée dans la couche externe du biocapteur GAOx@laponite-TK@HDL.

Trois concentrations en GA ont été testées, 1, 2 et 5 mM. Avec la concentration la plus élevée (5 mM), nous observons un signal ampérométrique bruité et une passivation de l'électrode. Ce résultat est similaire à celui obtenu lors de la détection de l'activité de la TK non immobilisée en solution (*cf.* paragraphe II.4.3.3). L'intensité de la réponse après l'ajout du D-F6P étant cependant plus importante pour 2 mM de GA, nous avons donc choisi cette concentration (Tableau IV.4).

En ce qui concerne la concentration en D-F6P, nous avons testé trois concentrations 0,1, 1 et 5 mM. De 0,1 à 5 mM, la réponse ampérométrique augmente. Néanmoins avec 5 mM en D-F6P, le bruit de fond est également augmenté. La concentration en D-F6P la plus adaptée est donc de 1 mM (Tableau IV.4).

Tableau IV.4 : Réponse ampérométrique du biocapteur GAOx-TK selon les concentrations en GA et en D-F6P (75 µg GAOx@laponite, 100 µg TK@HDL, 0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM ThDP, E_{app} = 0,6 V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

[GA] (mM)	[D-F6P] (mM)	I _{an} (nA)
5	1	367 ± 6
2	1	350 ± 4
1	1	202 ± 5
2	5	414 ± 5
2	0,1	72 ± 3

De plus, nous observons après ajout du D-F6P, une réponse ampérométrique très rapide avec un t₉₀ de 36 s (Figure IV.3). Ce profil de réponse très rapide est très généralement observé dans le cas de l'immobilisation d'enzymes.

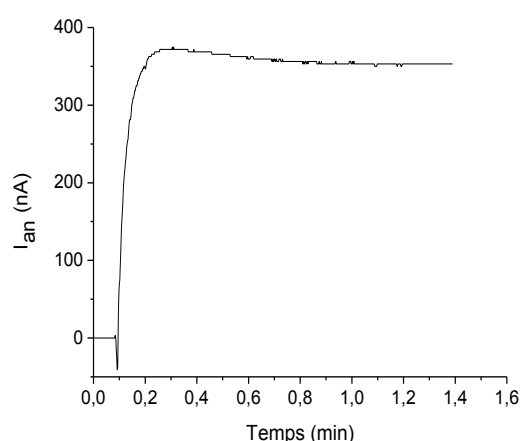


Figure IV.3 : Réponse ampérométrique du biocapteur GAOx-TK après l'ajout de 1 mM de D-F6P (75 µg GAOx@laponite, 100 µg TK@HDL, 0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM ThDP, 2 mM GA, E_{app} = 0,6 V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

IV.2.2.4. Effet de l'oxygène

L'oxygène est le cosubstrat de la GAOx, sa concentration dans le milieu réactionnel peut donc être un facteur limitant sur la réponse électro-enzymatique, notamment aux fortes concentrations en substrat. Cet effet pourrait être plus marqué par la présence d'une deuxième couche de biomatériau au-dessus de la couche GAOx@laponite, limitant ainsi la diffusion des molécules d'O₂ vers la GAOx. Nous avons donc vérifié si l'apport d'oxygène par bullage dans le milieu réactionnel était nécessaire dans nos conditions expérimentales. Avec ou sans saturation en oxygène du milieu réactionnel, nous n'observons aucune différence de réponse en courant après l'ajout de 1 mM de D-F6P. En effet, les concentrations en substrats de la TK sélectionnées conduisent à la formation de L-Ery avec une concentration équivalente se

situant dans la gamme de linéarité du biocapteur GAOx, l'apport d'oxygène s'avère donc inutile.

IV.2.2.5. Reproductibilité et stabilité du biocapteur dans le temps

La reproductibilité de la fabrication de ces biocapteurs bi-enzymatique GAOx-TK a été testée avec cinq électrodes différentes conduisant à une déviation standard relative (RSD) de 3,8 % pour l'ajout de 1 mM de D-F6P. Par ailleurs, la même électrode peut être utilisée au minimum cinq fois dans la journée de façon indépendante sans perte significative d'activité de la TK (RSD = 1,2 %).

Pour finaliser notre étude, nous avons étudié la stabilité dans le temps du biocapteur bi-enzymatique en suivant l'activité de la TK. Après une nuit de conservation du biocapteur à 4°C dans 50 mM de tampon HEPES à un pH de 7,0, 50 % de l'activité de la TK est maintenue. La présence des cofacteurs de la TK dans le tampon n'améliore que légèrement la stabilité conduisant à 60 % d'activité résiduelle. Si l'électrode est conservée une nuit à -18°C, il ne reste plus que 20 % d'activité. La congélation n'est donc pas favorable au maintien de l'activité enzymatique de la TK.

En conséquence, nous avons préféré préparer de nouvelles électrodes à chaque fois en les utilisant dans la journée. Rappelons que le biohybride TK@HDL en suspension à 4°C reste stable et pourra être utilisé plusieurs jours après sa fabrication.

IV.2.3. Bilan de l'élaboration du biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK

En résumé, cette étude a permis la mise au point d'un biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK en bicouche. Les meilleurs résultats sont obtenus avec une deuxième couche externe formée de 100 µg de TK@HDL, sans réticulation chimique par le glutaraldéhyde, un tampon HEPES non saturé en oxygène à une concentration de 50 mM à un pH de 7,0, et des concentrations de 2 mM en GA et de 1 mM en D-F6P. La reproductibilité des résultats a été testée sur cinq biocapteurs différents (RSD = 3,8 %). De plus, l'électrode peut être utilisée au moins cinq fois dans la journée de façon indépendante (RSD = 1,2 %).

IV.3. Détermination des activités inhibitrices d'analogues du cofacteur et des substrats de la TK d'*E. coli*

Le système bi-enzymatique étant optimisé, nous avons envisagé d'étudier l'inhibition de l'apo-TK d'*E. coli* (pour rappel l'apo-TK est l'enzyme sans son cofacteur, le ThDP) avec des inhibiteurs de la TK rapportés dans la littérature⁷⁻¹³ ainsi que d'autres composés ayant une analogie de structure avec ceux décrits dans la littérature. Le Tableau IV.6 reprend la liste des différentes molécules commerciales sélectionnées, il s'agit soit d'analogues du cofacteur : tels que la thiamine, la thiamine monophosphate, l'oxythiamine, la benfotiamine et le pyrophosphate soit des analogues de substrats tels que le D-arabinose-5-phosphate, le p-hydroxyphénylpyruvate et le bromopyruvate.

De manière générale, la mesure d'une activité inhibitrice d'une substance sur une enzyme immobilisée dans un biocapteur ampérométrique consiste en la quantification de la diminution du courant généré après l'ajout du substrat, le biocapteur ayant été au préalable en présence d'inhibiteur. Elle est mesurée en pourcentage d'inhibition correspondant au rapport entre la diminution de courant ($I-I_0$) et le courant sans d'inhibition (I_0), comme illustré dans la Figure IV.4 pour l'inhibition de la TK immobilisée avec le pyrophosphate.

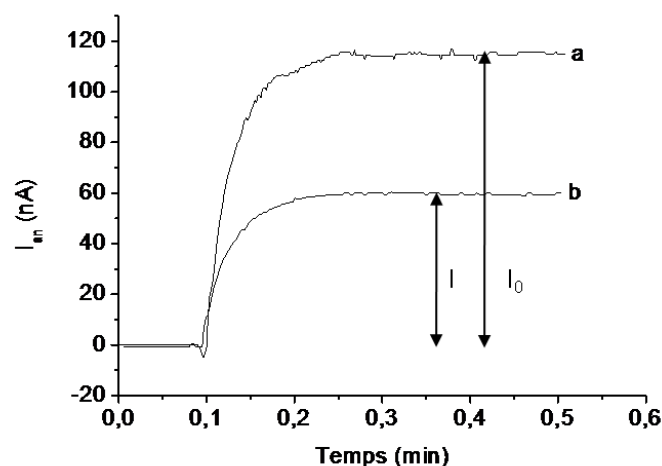
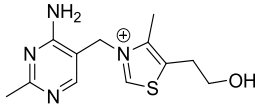
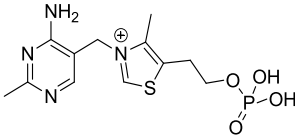
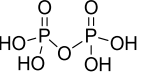
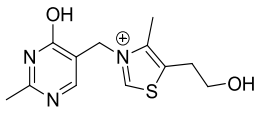
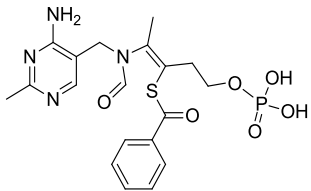
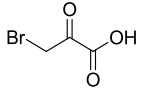
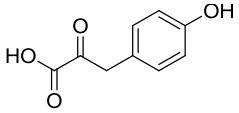
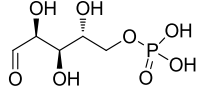


Figure IV.4 : Réponse ampérométrique du biocapteur GAOx-TK en a) l'absence d'inhibiteur b) présence de 50 µM de pyrophosphate (75 µg GAOx@laponite, 100 µg TK@HDL, 0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, 1 mM MgCl₂, 5 µM ThDP, 2 mM GA, $E_{app} = 0,6$ V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

Tableau IV.5 : K_i des molécules sélectionnées pour l'étude d'inhibition de la TK d'*E. coli* avec le biocapteur bi-enzymatique (pH 7,5 à température ambiante, ^aTK de *S. cerevisiae* ^bTK d'*E. coli* et ^cTK humaine)

Molécules sélectionnées	K_i (mM)	Références	
Thiamine 14		34 ^a et 6,8 ^c	7,11
Thiamine monophosphate 15		2 ^a	7
Pyrophosphate 17		0,28 ^a	7
Oxythiamine 18		1,4 ^a	10
Benfotiamine 19		-	
Bromopyruvate 20		-	
<i>p</i> -hydroxyphénylpyruvate 21		3 ^a	13
D-arabinose-5-phosphate 22		6 ^b	12

IV.3.1. Influence des inhibiteurs de la TK sur la GAOx

Avant d'étudier l'inhibition de la TK, nous devons nous assurer que les molécules sélectionnées n'étaient pas des inhibiteurs ou des substrats de la GAOx ce qui fausserait la réponse du biocapteur bi-enzymatique. Nous avons donc étudié l'activité inhibitrice des molécules sélectionnées vis-à-vis de la GAOx en utilisant deux de ses substrats, la DHA et le L-Ery (Tableau IV.6). Ce dernier est le produit formé par la réaction catalysée par la TK. Les concentrations de 5 μ M de DHA et 20 μ M de L-Ery ont été choisies pour les tests d'inhibitions car ces concentrations se situent dans le domaine de linéarité du biocapteur à

GAOx@laponite. La concentration en inhibiteur est fixée à 10 mM, sauf dans le cas de la thiamine **14**, de la thiamine monophosphate **15** et du ThDP **16**, où nous avons enregistré la courbe d'étalonnage complète jusqu'à 100 % d'inhibition (Figure IV.5) pour les raisons évoquées ci-après.

Tableau IV.6 : Inhibition de la réponse ampérométrique du biocapteur GAOx@laponite par différentes molécules à une concentration de 10 mM (0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, $E_{app} = 0,6$ V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

Inhibiteurs potentiels de la TK 10 mM	Substrats GAOx	
	20 μ M L-Ery % d'inhibition	5 μ M DHA % d'inhibition
Thiamine 14	30	47
Thiamine monophosphate 15	33	21
Thiamine diphosphate 16	47	51
Pyrophosphate 17	0	0
Oxythiamine 18	62	40
Benfotiamine 19	27	7
Bromopyruvate 20	0	0
<i>p</i> -hydroxyphénylpyruvate 21	0	0
d-arabinose-5-phosphate 22	21	0

La GAOx est une métalloenzyme à cuivre. Il a été rapporté que les composés contenant des fonctions amines, comme le tampon Gly-Gly, peuvent nuire à la stabilité de l'enzyme, probablement en raison de la complexation de l'atome de cuivre avec les fonctions amine du tampon⁶. Certaines molécules inhibitrices de la TK sélectionnées comportant une fonction amine telles que la thiamine **14**, la thiamine monophosphate **15** et même le ThDP **16** pourraient donc inhiber la GAOx. Nous n'avons rien trouvé à ce sujet dans la littérature.

Nous avons donc étudié plus en détail l'inhibition possible de ces molécules avec le biocapteur GAOx@laponite. La thiamine **14**, la thiamine monophosphate **15** et le ThDP **16** ont été testés avec le meilleur substrat de cette enzyme, la dihydroxyacétone (DHA) (Figure IV.5). Les concentrations de ces molécules conduisant à 50 % d'inhibition (CI50) sont respectivement de 10,7 ; 15,4 et 9,7 mM. Lors de l'étude de l'inhibition de la TK, il faudra donc se placer à des concentrations inférieures pour éviter l'inhibition de la GAOx, soit selon nos études, 0,25 mM pour la thiamine **14** et 7 mM pour la thiamine monophosphate **15**. Dans le cas du ThDP, les concentrations maximales que nous utilisons dans le test étant de 0,2 mM, cette concentration se situe bien en dessous de la CI50 pour la GAOx. Il est à noter que le pyrophosphate ne provoque pas d'inhibition de la GAOx.

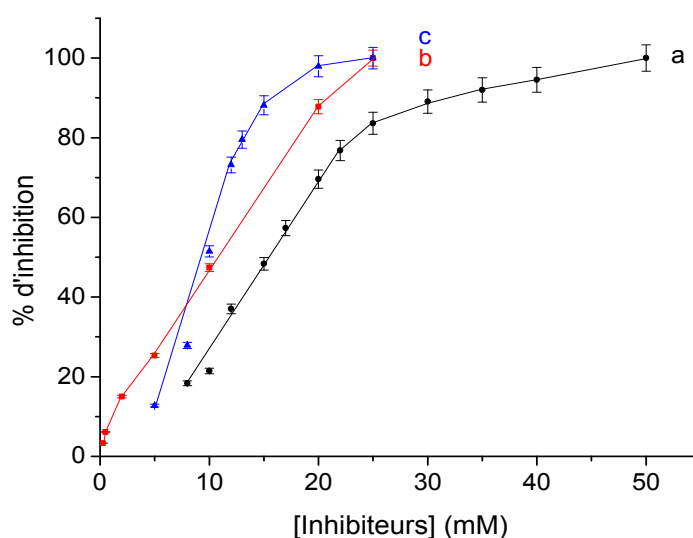


Figure IV.5 : Inhibition de la réponse ampérométrique du biocapteur GAOx@laponite par différentes molécules a) thiamine monophosphate **15** b) thiamine **14** c) ThDP **16** (0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, 3 ajouts de 5 μ M DHA, $E_{app} = 0,6$ V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

Le pourcentage d'inhibition de la GAOx dépend donc de la structure des molécules. Cependant, l'effet des fonctions amines sur la complexation de l'atome de cuivre n'est pas le seul facteur agissant sur l'inhibition de l'enzyme comme en témoigne le pourcentage d'inhibition plus élevé obtenu avec l'oxythiamine **18** (62 %). Une étude plus approfondie de l'inhibition de la GAOx avec d'autres molécules permettrait certainement de mieux comprendre ces résultats. Avec la benfotiamine **19**, des concentrations supérieures à 2 mM inhibent la GAOx.

Dans le cas des analogues des substrats de la TK, trois inhibiteurs ont été étudiés, le D-arabinose-5-phosphate **22**, analogue du substrat accepteur, le *p*-hydroxyphénylpyruvate **21** et le bromopyruvate **20**, analogues du substrat donneur. Le D-arabinose-5-phosphate **22** à 10 mM conduit à une inhibition de la GAOx de 21 % après l'ajout du L-Ery. En revanche, le bromopyruvate **20** n'est pas inhibiteur de la GAOx.

Quant au *p*-hydroxyphénylpyruvate **21** (HPP), cette molécule n'est pas un inhibiteur de la GAOx mais un substrat de celle-ci. De plus, il est oxydé à l'électrode de platine à + 0,6 V/Ag-AgCl comme le montre la droite d'étalonnage (courbe a de la Figure IV.6). Pour des concentrations supérieures à 2,5 mM, nous observons l'intervention de la GAOx sur le processus d'oxydation conduisant à une augmentation du courant par rapport à l'électrode nue.

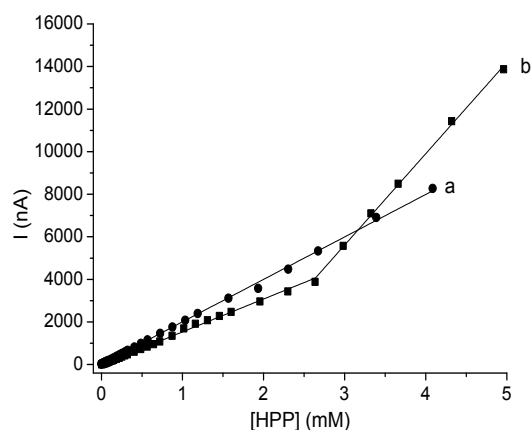


Figure IV.6 : Dosage du HPP 21 a) à l'électrode de platine b) avec le biocapteur GAOx@laponite (0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, $E_{app} = 0,6$ V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

Cette étude préliminaire de l'inhibition possible de la GAOx par les molécules choisies comme inhibiteurs de la TK, nous a permis d'écarter certains composés comme le HPP 21. Nous avons observé que le pyrophosphate 17 et le bromopyruvate 20 ne sont pas des inhibiteurs de la GAOx. Pour les autres molécules, analogues du ThDP, nous avons pu déterminer la concentration maximale permettant de tester l'inhibition de la TK, sans identifier d'inhibition de la GAOx dans les conditions de notre test.

IV.3.2. Détermination de la constante de dissociation du pyrophosphate de thiamine vis-à-vis de la TK immobilisée

En vue de la détection d'inhibiteur de la TK d'*E. coli* de type analogue du cofacteur, la thiamine diphosphate (ThDP), nous avons déterminé dans un premier temps la constante de dissociation apparente (K_{Dapp}) du ThDP, en utilisant le biocapteur décrit précédemment dans lequel l'apo-TK d'*E. coli* est co-immobilisée avec la GAOx à la surface de l'électrode. Le biocapteur est placé dans le milieu réactionnel contenant différentes concentrations de ThDP et la réponse du biocapteur est enregistrée après l'ajout de 1 mM de substrat, le D-F6P. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec une gamme de concentration comprise entre 1 et 200 μ M en ThDP (Figure IV.7-A). Un courant maximum (I_{max}) de 350 nA est obtenu pour une concentration supérieure à 50 μ M en ThDP.

Le K_{Dapp} a été évalué selon deux méthodes à partir de la courbe d'étalonnage du ThDP : la méthode de linéarisation de Lineweaver Burk (Figure IV.7-B) et la méthode de linéarisation d'Eadie Hofstee (Figure IV.7-C). Les valeurs de K_{Dapp} sont de 9 μ M à partir de la linéarisation de Lineweaver Burk et de 11,6 μ M à partir de la linéarisation d'Eadie Hofstee.

Le K_{Dapp} de la TK d'*E. coli* immobilisée est plus grande que celui déterminé avec la TK d'*E. coli* non immobilisée (Pour rappel : $K_D = 1 \mu\text{M}$, cf. paragraphe II.4.4). Cette augmentation de la valeur de K_D , généralement observée pour des enzymes immobilisées, est liée au coefficient de partage du ThDP entre la solution et la matrice HDL et/ou aux contraintes diffusionnelles dans la matrice.

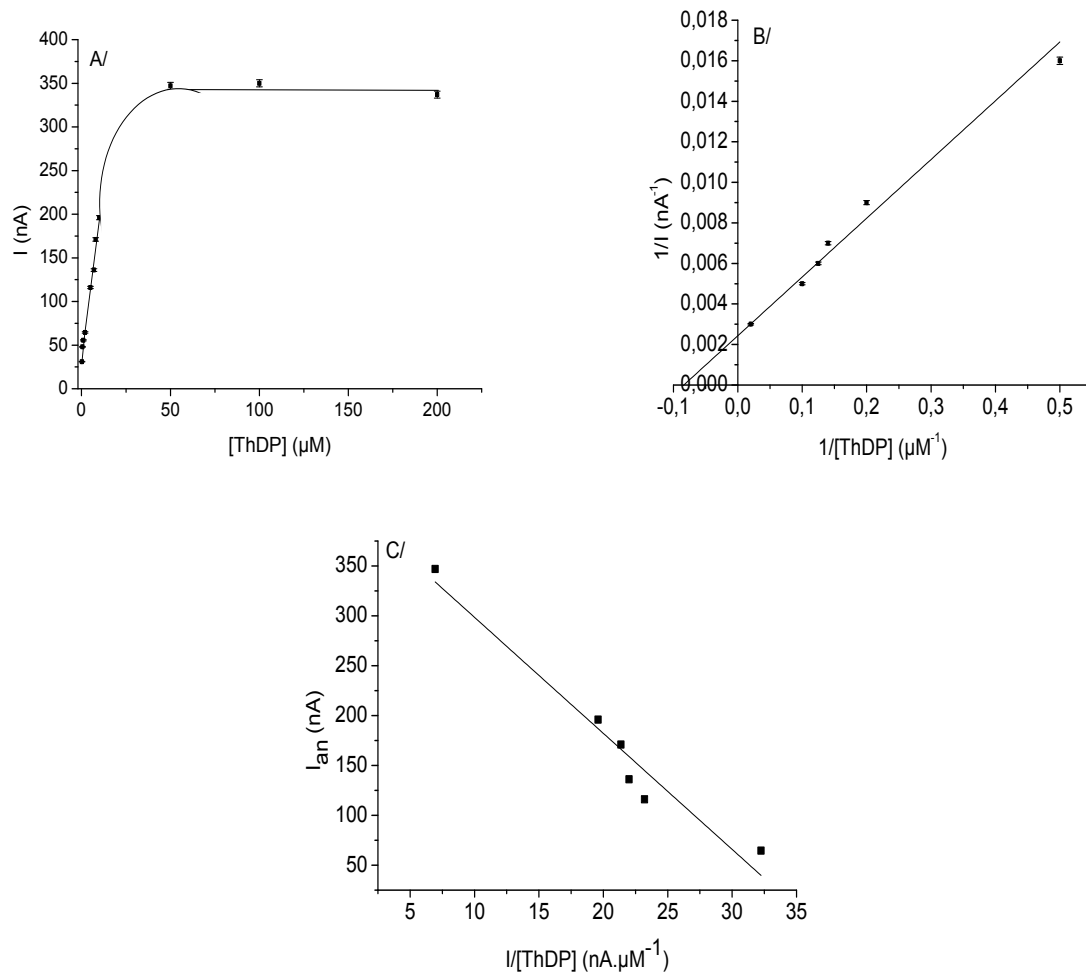


Figure IV.7 : A/ Courbe d'étalonnage du ThDP B/ linéarisation de Lineweaver Burk C/ linéarisation de Eadie-Hofstee (0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, 1 mM MgCl_2 , 2 mM GA, 1 mM D-F6P, $E_{\text{app}} = 0,6 \text{ V/Ag-AgCl}$, 500 $\text{tr} \cdot \text{min}^{-1}$)

IV.3.3. Mise en évidence de l'inhibition de la TK d'*E. coli* au sein du biocapteur bi-enzymatique

L'étude portant sur l'inhibition de la TK d'*E. coli* a été réalisée avec le biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK à la fois pour des molécules analogues du cofacteur ou analogues des substrats.

IV.3.3.1. Analogues du cofacteur de la TK

Pour tester les inhibiteurs analogues du cofacteur, le biocapteur GAOx-TK est tout d'abord immergé pendant une heure dans une solution placée sous agitation et contenant le cation divalent (Mg^{2+}), le cofacteur (1, 2 ou 5 μM de ThDP) et des concentrations croissantes d'inhibiteur. Ensuite l'électrode est transférée dans le milieu réactionnel ne contenant pas de ThDP ni d'inhibiteur mais du Mg^{2+} , et la variation de courant suivant l'ajout de D-F6P est enregistrée. La reproductibilité des résultats a été testée avec trois biocapteurs différents.

Effet du pyrophosphate sur la TK d'*E. coli*

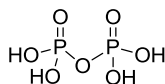


Figure IV.8 : Structure du pyrophosphate 17

Dans la littérature, l'inhibition compétitive de la TK de *S. cerevisiae* libre en solution par le pyrophosphate (Figure IV.8) est décrite, sa constante d'inhibition (K_I) est de 0,28 mM^7 . C'est le premier inhibiteur analogue du cofacteur que nous avons étudié. Celui-ci n'est pas inhibiteur de la GAOx comme montré précédemment et il n'interfère donc pas dans la réponse ampérométrique. La réponse en courant a été enregistrée pour différentes concentrations en inhibiteur : 0,5 ; 0,75 et 1 μM et en ThDP : 1, 2 et 5 μM . Nous avons calculé le K_I selon la méthode de linéarisation de Lineweaver Burk à partir des courbes d'étalonnage (Figure IV.9). Le K_I du pyrophosphate 17 avec la TK d'*E. coli* immobilisée est trouvé comme étant égal à 1 μM , une valeur largement inférieure à celle rapportée dans la littérature. Contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature pour la TK de *S. cerevisiae*⁷, nous obtenons une inhibition non compétitive pure avec un K_D pour le ThDP inchangé ($K_D = 1 \mu M$).

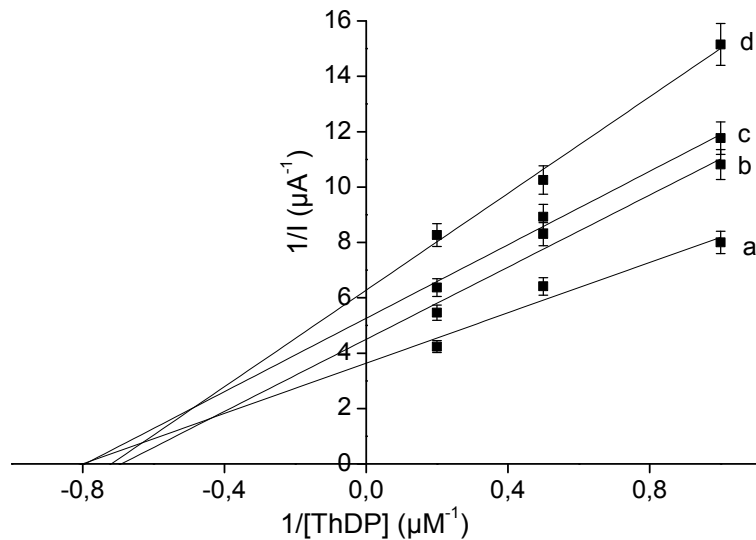


Figure IV.9 : Inhibition de l'apo-TK par le pyrophosphate avec le biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK
a) sans inhibiteur b) 0,5 µM c) 0,75 µM d) 1 µM (0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, 1 mM MgCl₂, 2 mM GA, 1 mM D-F6P, E_{app} = 0,6 V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

Deux hypothèses peuvent être avancées. Ce changement du type d'inhibition peut provenir de la source de TK ou bien de son immobilisation. Nous avons mis en évidence une inhibition compétitive de la TK d'*E. coli* libre avec le test spectrophotométrique (Figure IV.10). Ce même résultat est obtenu dans la littérature avec la TK de *S. cerevisiae*. La source de TK n'a donc aucune influence sur le type d'inhibition. L'immobilisation de la TK dans les HDL pourrait donc être responsable de ce changement de type d'inhibition. La même constatation a été rapportée pour l'inhibition par le cyanure de la PPO immobilisée dans une matrice HDL¹⁴. Rappelons que comme le cyanure, le pyrophosphate peut interagir avec les feuillettes HDL. De plus, la valeur de K_I du pyrophosphate **17** avec la TK immobilisée est inférieure à celle obtenue avec la TK libre (K_I = 85 µM). Il y donc probablement une combinaison entre l'inhibition de la TK immobilisée et l'accumulation de l'inhibiteur dans la matrice HDL.

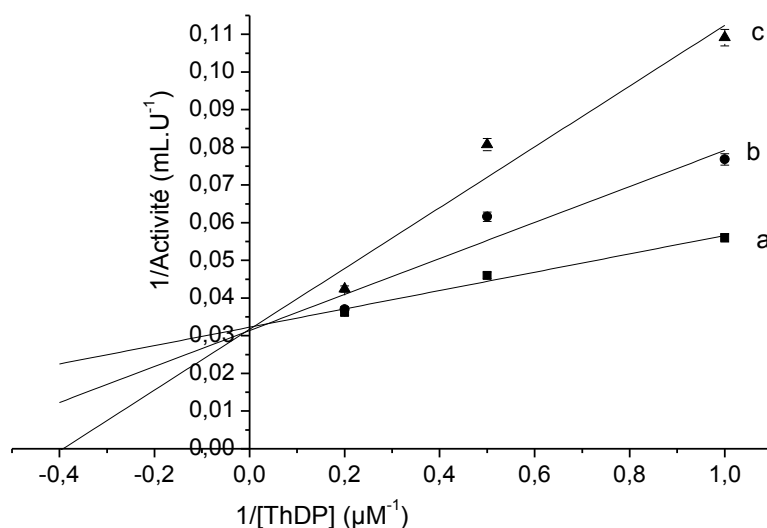


Figure IV.10 : Etude en spectrophotométrie de l'inhibition de l'apo-TK non immobilisée par le pyrophosphate **17** a) sans b) 40 μM c) 300 μM (0,1 M Gly-Gly pH 7,5, 25°C, 0,5 mM MgCl₂, 85 mM L-Ery, 8,9 mM D-R5P, 0,3 mM NADH, 2 U.mL⁻¹ TK, 25 U YADH)

Effets de la thiamine, la thiamine monophosphate et l'oxythiamine sur la TK d'*E. coli*

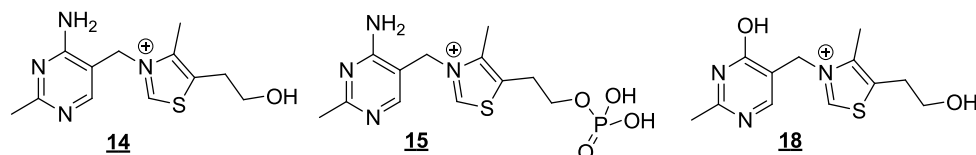
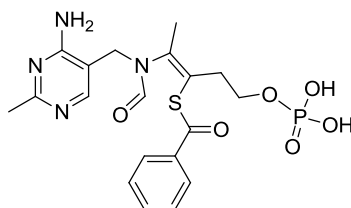


Figure IV.11 : Structure de la thiamine **14**, de la thiamine monophosphate **15** et de l'oxythiamine **18**

Dans la littérature, l'inhibition de la TK de *S. cerevisiae* par la thiamine **14**, la thiamine monophosphate **15** et l'oxythiamine **18** (Figure IV.11) a été étudiée *in vitro*, leurs constantes d'inhibition sont respectivement de 34, 2 et 1,4 mM^{7,10}. L'inhibition de la TK humaine par la thiamine **14** a également été rapportée avec un K_i de 6,8 mM¹¹.

Cependant à la vue des résultats de la littérature, ces valeurs de K_i sont inférieures dans le cas de la thiamine **14** ou proche dans le cas de la thiamine monophosphate **15** et de l'oxythiamine **18** des concentrations qui inhibent la GAOx. Nous avons tout de même étudié l'inhibition de la TK par ces composés avec des concentrations inférieures à celles où nous avons identifié une inhibition de la GAOx dans les conditions de notre test (< 0,25 mM pour la thiamine **14**, < 7 mM pour la thiamine monophosphate **15** et < 10 mM pour l'oxythiamine **18**). A ces concentrations, aucune inhibition de la TK n'est observée. Notre système ne permet donc pas la détection de ces inhibiteurs dont les K_i sont élevés.

Effet de la benfotiamine sur la TK d'*E. coli*Figure IV.12 : Structure de la benfotiamine **19**

Dans la littérature, la benfotiamine n'est pas décrite comme inhibiteur de la TK. L'effet de la benfotiamine **19** (Figure IV.12) sur l'activité de la TK humaine a été étudié uniquement *in vivo* dans des cellules de moelle osseuse. La TK est activée mais de façon indirecte *via* la glucokinase qui est responsable de la conversion du glucose en glucose-6-phosphate, activant ainsi la voie des pentoses phosphates dans laquelle intervient la TK^{8,9}.

Compte tenu de l'analogie de structure de la benfotiamine avec les inhibiteurs précédents, il nous a paru intéressant d'étudier *in vitro* l'effet de la benfotiamine **19** sur la TK d'*E. coli*. Nous observons un maximum de 45 % d'inhibition de l'activité de la TK car pour des concentrations en benfotiamine supérieures à 2 mM, la GAOx est également inhibée. La benfotiamine est donc un inhibiteur de la TK à une concentration de 0,1 mM.

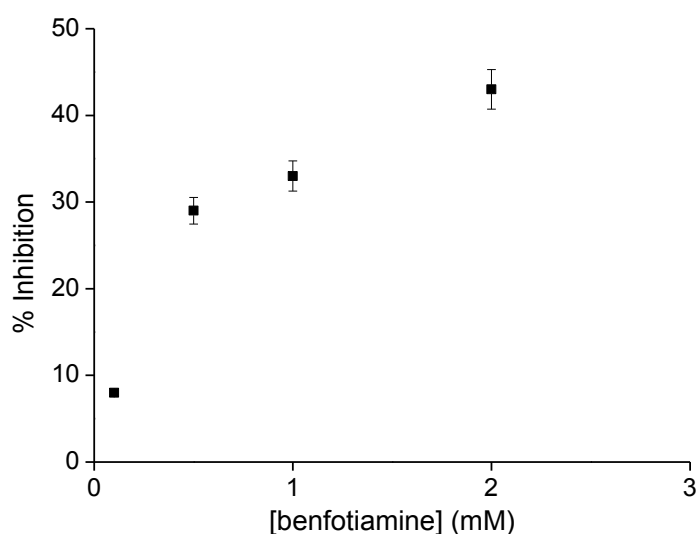


Figure IV.13 : Inhibition de la réponse ampérométrique du biocapteur GAOx-TK par la benfotiamine **19** (0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, 1 mM MgCl₂, 5 μM ThDP, 2 mM GA, 1 mM D-F6P, E_{app} = 0,6 V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

IV.3.3.2. Analogues des substrats de la TK

Pour les études réalisées en présence des inhibiteurs qui sont soit des analogues de substrats donneurs de la TK de type « céto », soit des analogues de substrats accepteurs de la TK de type « aldol », l'inhibiteur est ajouté dans le milieu réactionnel juste avant l'introduction de 1 mM de D-F6P. La reproductibilité des résultats a été testée sur deux biocapteurs différents.

Effet d'un analogue du substrat accepteur, le D-arabinose-5-phosphate sur la TK d'*E. coli*

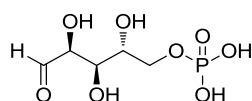


Figure IV.14 : Structure du D-A5P **22**

Le D-arabinose-5-phosphate **22** (D-A5P, Figure IV.14) est décrit comme un inhibiteur compétitif de la TK d'*E. coli* avec un K_I de 6 mM pour l'enzyme libre en solution¹². Avec notre système bi-enzymatique, nous avons pu tracer le pourcentage d'inhibition de la TK en fonction de la concentration en inhibiteur (Figure IV.15). La CI50 est de 2 mM.

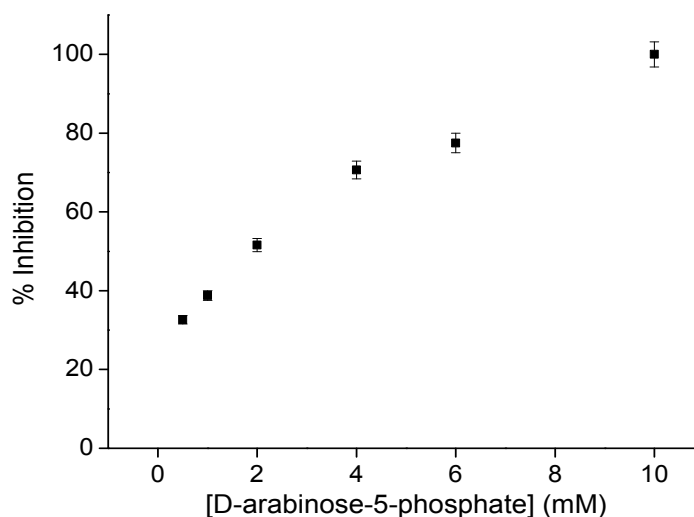
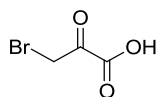


Figure IV.15 : Inhibition de la réponse ampérométrique du biocapteur GAOx-TK par le D-arabinose-5-phosphate **22** (0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM ThDP, 2 mM GA, 1 mM D-F6P, $E_{app} = 0,6$ V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

Effet d'un analogues du substrat donneur, le bromopyruvate sur la TK d'*E. coli*Figure IV.16 : Structure du bromopyruvate **20**

Dans la littérature, le bromopyruvate **20** est décrit comme substrat donneur de la TK de *S. cerevisiae*¹⁵. Cependant le bromopyruvate **20** est également décrit comme inhibiteur d'autres enzymes telles que la 2-céto-3-déoxy-6-phosphogluconique aldolase¹⁶ ou encore la pyruvate déshydrogénase¹⁷ qui est une enzyme dépendante du pyrophosphate de thiamine comme la TK.

Nous avons donc envisagé d'étudier l'influence du bromopyruvate **20** à différentes concentrations sur l'activité de la TK d'*E. coli* (Figure IV.17). Il apparaît que le bromopyruvate **20** est un inhibiteur de la TK d'*E. coli* pour une CI50 de 3 mM.

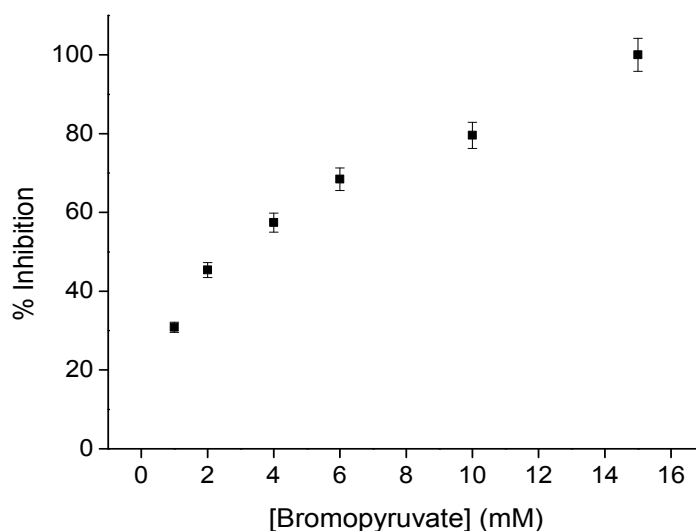


Figure IV.17 : Inhibition de la réponse ampérométrique du biocapteur GAOx-TK par le bromopyruvate **20** (0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM ThDP, 2 mM GA, 1 mM D-F6P, E_{app} = 0,6 V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

IV.4. Conclusion

L'immobilisation d'une deuxième couche TK@HDL sur une couche GAOx@laponite a permis d'obtenir un biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK qui est réutilisable dans la journée sans perte significative d'activité. De plus, cette deuxième couche externe TK@HDL n'affecte pas la diffusion des substrats vers la GAOx immobilisée dans la couche interne.

Ce biocapteur a tout d'abord été validé par la détermination du K_{Dapp} du ThDP. La valeur obtenue est du même ordre de grandeur que celle déterminée avec la TK d'*E. coli* non immobilisée ($K_D = 1 \mu\text{M}$, cf. paragraphe II.4.4). L'immobilisation de l'apo-TK d'*E. coli* dans les HDL sous forme de film à la surface de l'électrode n'affecte donc pas l'affinité de la TK pour son cofacteur.

Compte-tenu de ces résultats, différents types d'inhibiteurs tels que des analogues du cofacteur (le pyrophosphate **17** et la benfotiamine **19**), un analogue du substrat donneur (le bromopyruvate **20**) et un analogue du substrat accepteur (le D-arabinose-5-phosphate **22**) ont été testés et les résultats obtenus montrent que le biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK permet de déterminer les CI50 de différentes molécules, analogues du ThDP ou du substrat, pour la TK immobilisée à la surface de l'électrode (Tableau IV.7).

Tableau IV.7 : CI50 des inhibiteurs testés de la TK (0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, 1 mM MgCl₂, 5 μM ThDP, 2 mM GA, 1 mM D-F6P, E_{app} = 0,6 V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

Inhibiteurs de la TK	CI50 (mM)
Pyrophosphate 17	0,05
Benfotiamine 19	2
D-arabinose-5-phosphate 22	2
Bromopyruvate 20	3

Malgré les difficultés rencontrées, ces premiers résultats sont encourageants. L'utilisation d'un biocapteur ampérométrique pour la détection d'inhibiteurs de la TK, jamais envisagée jusqu'alors, est une méthode rapide et reproductible. Notre étude c'est limitée à certaines molécules commerciales qui ne sont pas de bons inhibiteurs de la TK d'*E. coli*. Elle devrait être étendue à d'autres molécules synthétisées ayant une bonne activité inhibitrice vis-à-vis de la TK. Il faut également veiller aux effets d'interférence dus à l'inhibition de l'enzyme auxiliaire, la GAOx et aussi à l'effet de la matrice HDL. Des mesures simultanées avec plusieurs électrodes en parallèle permettraient certainement d'envisager le criblage de nouveaux inhibiteurs.

IV.5. Références bibliographiques

- (1) Amine, A.; Mohammadi, H.; Bourais, I.; Palleschi, G. Enzyme Inhibition-based Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1405–1423.
- (2) Bachan Upadhyay, L. S.; Verma, N. Enzyme Inhibition Based Biosensors: A Review. *Anal. Lett.* **2013**, *46*, 225–241.
- (3) Sima, V. H.; Patris, S.; Aydogmus, Z.; Sarakbi, A.; Sandulescu, R.; Kauffmann, J.-M. Tyrosinase Immobilized Magnetic Nanobeads for the Amperometric Assay of Enzyme Inhibitors: Application to the Skin Whitening Agents. *Talanta* **2011**, *83*, 980–987.
- (4) Çevik, S.; Timur, S.; Anik, Ü. Biocentri-voltammetry for the Enzyme Assay: a Model Study. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 4299–4303.
- (5) Charmantray, F.; Touisni, N.; Hecquet, L.; Mousty, C. Amperometric Biosensor Based on Galactose Oxidase Immobilized in Clay Matrix. *Electroanalysis* **2013**, *25*, 630–635.
- (6) Petersen, A.; Steckhan, E. Continuous Indirect Electrochemical Regeneration of Galactose Oxidase. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2203–2208.
- (7) Kochetov, G. A.; Izotova, A. E.; Meshalkina, L. E. Inhibition of Transketolase by Analogues of the Coenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *43*, 1198–1203.
- (8) Babaei-Jadidi, R.; Karachalias, N.; Ahmed, N.; Battah, S.; Thornalley, P. J. Prevention of Incipient Diabetic Nephropathy by High-Dose Thiamine and Benfotiamine. *Diabetes* **2003**, *52*, 2110–2120.
- (9) Oh, S.-H.; Witek, R. P.; Bae, S.-H.; Darwiche, H.; Jung, Y.; Pi, L.; Brown, A.; Petersen, B. E. Detection of Transketolase in Bone Marrow-Derived Insulin-Producing Cells: Benfotiamine Enhances Insulin Synthesis and Glucose Metabolism. *Stem Cells Dev.* **2009**, *18*, 37–46.
- (10) Wood, T.; Fletcher, S. The Affinity Chromatography of Transketolase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzym.* **1978**, *527*, 249–255.
- (11) Thomas, A. A.; Le Huerou, Y.; De Meese, J.; Gunawardana, I.; Kaplan, T.; Romoff, T. T.; Gonzales, S. S.; Condroski, K.; Boyd, S. A.; Ballard, J.; et al. Synthesis, *in Vitro* and *in Vivo* Activity of Thiamine Antagonist Transketolase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2206–2210.
- (12) Sprenger, G. A.; Schörken, U.; Sprenger, G.; Sahm, H. Transketolase a of *Escherichia Coli* K12. *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 525–532.
- (13) Solovjeva, O. N.; Kochetov, G. A.; Golbik, R. Inhibition of transketolase by p-hydroxyphenylpyruvate. *FEBS Lett.* **1999**, *462*, 246–248.
- (14) Shan, D.; Mousty, C.; Cosnier, S. Subnanomolar Cyanide Detection at Polyphenol Oxidase/Clay Biosensors. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 178–183.
- (15) Esakova, O. A.; Meshalkina, L. E.; Kochetov, G. A.; Golbik, R. Halogenated Pyruvate Derivatives as Substrates of Transketolase from *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochem. Mosc.* **2009**, *74*, 1234–1238.
- (16) Meloche, H. P. Bromopyruvate Inactivation of 2-Keto-3-deoxy-6-phosphogluconic Aldolase. I. Kinetic Evidence for Active Site Specificity. *Biochemistry (Mosc.)* **1967**, *6*, 2273–2280.
- (17) Lowe, P. N.; Perham, R. N. Bromopyruvate as an Active-site-directed Inhibitor of the Pyruvate Dehydrogenase Multienzyme Complex from *Escherichia Coli*. *Biochemistry (Mosc.)* **1984**, *23*, 91–97.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le but de ces travaux était de développer un test alliant rapidité, sensibilité et faible coût avec pour objectifs d'une part la détection de l'activité de la TK libre en solution et d'autre part la détection d'inhibiteurs de cette enzyme. Nous avons choisi un mode de détection ampérométrique *via* un biocapteur qui combine ces avantages.

En ce qui concerne le premier objectif, la détection de l'activité de la TK libre en solution, deux biocapteurs ont été envisagés.

Le premier biocapteur, à polyphénol oxydase (PPO), nécessite l'intervention d'une protéine auxiliaire, la BSA, et la synthèse d'un substrat non physiologique de la TK, l'ester éthylique de la *N*-acétyl-*O*-(2*R*, 3*S*, 5-trihydroxy-4-oxopentyl)-*L*-tyrosine **1**. Malgré l'amplification du signal par le biocapteur, les réponses ampérométriques obtenues sont faibles ; en raison, d'une part, de la faible affinité du composé **1** vis-à-vis de la TK et, d'autre part, de la réaction de β -élimination, catalysée par la BSA, qui est limitante. De plus, un autre handicap de ce système est la synthèse du composé **1** qui n'est pas commercial.

Comme alternative, un deuxième biocapteur, à galactose oxydase (GAOx), a été mis au point par immobilisation de cette enzyme dans une argile cationique (la laponite). Ce biocapteur GAOx@laponite que nous avons élaboré est très performant. Il est au moins cinq fois plus sensible que les biocapteurs à GAOx déjà décrits dans la littérature. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication donnée en annexe. Avec ce nouveau biocapteur, la détection de l'activité de la TK a été effectuée en présence de substrats non synthétiques ayant une meilleure affinité pour la TK, le D-fructose-6-phosphate (D-F6P), substrat donneur physiologique et le glycolaldéhyde (GA), le meilleur substrat accepteur non phosphorylé connu pour cette enzyme. Avec ce biocapteur, les activités des TK d'*E. coli* et humaine libres en solution ont donc été déterminées *in vitro* de façon rapide et avec une sensibilité dix fois plus importante que les tests spectrophotométriques décrits à ce jour. De plus, le biocapteur n'influence pas l'affinité du cofacteur, le ThDP, pour la TK.

Le deuxième objectif était de détecter des inhibiteurs de la TK avec un système de détection réutilisable et peu coûteux en enzymes. Pour cela, un biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK a été élaboré dans lequel la GAOx et la TK d'*E. coli* sont co-immobilisées à la surface de l'électrode.

La première étape pour atteindre cet objectif a été l'immobilisation de la TK d'*E. coli* dans des matériaux inorganiques lamellaires, les Hydroxydes Doubles Lamellaires (HDL). Avant d'effectuer l'immobilisation de cette enzyme dans ces matériaux, les propriétés structurales et d'adsorption des HDL ont été étudiées en présence de tampon, dont la présence est nécessaire pour la stabilité de l'enzyme, et de composés phosphorylés impliqués dans à la

réaction enzymatique. La présence de tampon Gly-Gly conduit au remplacement des anions nitrates intercalés entre les feuillettes HDL par des ions carbonates et des molécules de dipeptide. L'interaction spécifique entre ces molécules de tampon et les plaquettes HDL conduit à la formation d'un réseau 3D hydrophile et flexible constitué de petites plaquettes d'HDL favorable à l'encapsulation de l'enzyme. L'adsorption de molécules phosphorylées tels que le cofacteur, le ThDP et le substrat donneur, le D-F6P est très limitée sur les phases HDL Mg₂Al-Gly-Gly.

Après avoir étudié les propriétés d'adsorption de la TK d'*E. coli* sur différentes matrices HDL et dans différents tampons, les conditions de préparation du biohybride TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop} ont été optimisées en utilisant la méthode de coprécipitation. Ce biohybride conduit à une activité spécifique reproductible et stable de la TK d'*E. coli* de $12,0 \pm 0,3 \text{ U.mg}^{-1}$, valeur qui est dix fois plus élevée que celle obtenue lors de travaux préliminaires d'immobilisation réalisés avec un extrait brut de TK de *S. cerevisiae*. De plus, une fois déposé à la surface d'une électrode sous forme de film homogène, ce biohybride maintient la TK d'*E. coli* active avec une activité spécifique de $2,70 \pm 0,06 \text{ U.mg}^{-1}.\text{cm}^{-2}$. Une partie de ces résultats obtenus ont fait l'objet d'une seconde publication donnée en annexe.

La deuxième étape a consisté en la mise au point du biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK en bicouche avec une couche interne constituée du biohybride GAOx@laponite et une couche externe constituée du biohybride TK@Mg₂Al-Gly-Gly_{cop}. Cette deuxième couche n'affecte pas la diffusion des substrats vers la GAOx immobilisée dans la couche interne. De plus, le biocapteur bi-enzymatique a été validé en déterminant le K_{Dapp} du ThDP qui est du même ordre de grandeur que celui déterminé avec la TK d'*E. coli* non immobilisée. L'immobilisation de l'apo-TK d'*E. coli* dans les HDL sous forme de film à la surface de l'électrode n'affecte donc pas l'affinité de la TK pour son cofacteur. Enfin, ce biocapteur GAOx-TK est réutilisable plusieurs fois dans la journée, sans perte significative d'activité.

Enfin, la dernière étape a été l'étude de l'inhibition de la TK par des analogues du cofacteur et des analogues de substrat. Notre étude s'est limitée à des molécules commerciales décrites comme inhibiteurs moyens de différentes sources de TKs. Une étape préliminaire a été l'étude de l'influence des inhibiteurs choisis sur l'enzyme auxiliaire, la GAOx. Cette étude nous a permis d'écartier un analogue de substrat décrit comme inhibiteur de la TK, le *p*-hydroxyphénylpyruvate, qui s'oxyde à l'électrode à 0,6 V et qui est substrat de la GAOx. Le D-arabinose-5-phosphate, analogue du substrat accepteur de la TK, et la thiamine, la thiamine monophosphate, l'oxythiamine et la benfotiamine, analogue du ThDP, inhibent la GAOx. Nous avons donc déterminé la concentration maximale pour chaque molécule

permettant de tester l'inhibition de la TK sans inhiber la GAOx. Le pyrophosphate et le bromopyruvate, analogue du substrat donneur de la TK, n'ont quant à eux aucun effet sur la GAOx.

Pour des concentrations qui n'inhibent pas la GAOx, aucune inhibition de la TK d'*E. coli* n'est détectée par la thiamine, la thiamine monophosphate, l'oxythiamine. Cependant, il est à souligner que ces molécules sont décrites dans la littérature comme de mauvais inhibiteurs de la TK. Nous avons en revanche obtenu des CI50 avec d'autres analogues du cofacteur (le pyrophosphate et la benfotiamine), et un analogue du substrat accepteur (le D-arabinose-5-phosphate). Un analogue du substrat donneur, le bromopyruvate, jamais proposé en tant qu'inhibiteur, conduit aussi à une inhibition de la TK. De plus, une étude plus approfondie avec le pyrophosphate, nous a permis d'obtenir une constante d'inhibition (K_I) de 1 μ M pour ce composé. Cependant, nous avons observé un effet de l'immobilisation de la TK sur le type d'inhibition par rapport à la TK non immobilisée.

Ce travail constitue une première approche de la détermination de l'activité des TKs d'*E. coli* et humaine et de la détection d'inhibiteurs de la TK d'*E. coli*, choisie comme modèle, avec un biocapteur ampérométrique. Cette méthode basée sur un mode de détection ampérométrique *via* un biocapteur est rapide, sensible et reproductible. De plus, l'utilisation de biocapteurs pour le suivi d'activité enzymatique ou l'inhibition d'enzyme pour une application médicale comme le criblage d'inhibiteurs est une stratégie originale car très peu d'exemples existent dans la littérature. Les perspectives de ces travaux sont nombreuses.

Nos travaux se sont limités à la détection de l'activité des TKs d'*E. coli* et humaine purifiées dans un milieu tamponné. Il faudrait poursuivre l'étude en présence de milieux plus complexes contenant la TK humaine tels que des fluides biologiques afin d'appliquer notre stratégie dans un but de diagnostic. En effet, la TK humaine est un marqueur de nombreuses maladies (cancers, diabète, maladies neurodégénératives). Dans ce cas, notre système ampérométrique basé sur la détection du peroxyde d'hydrogène à 0,6 V/Ag-AgCl devra être adapté. En effet, à ce potentiel d'oxydation assez élevé, les interférences liées aux molécules présentes dans les milieux biologiques pourraient être nombreuses. Une solution serait la diminution du potentiel pour la détection du peroxyde d'hydrogène grâce à un médiateur rédox, le Bleu de Prusse (BP). Nous avons effectué des études préliminaires avec des électrodes sérigraphiées modifiée au Bleu de Prusse gracieusement données par le Pr. Thierry Noguer (IMAGES) de l'Université de Perpignan sur lesquelles nous avons déposé, soit une couche de biohybride GAOx@laponite (50:25 μ g: μ g), soit une première couche GAOx@laponite et une deuxième couche de biohybride TK@HDL (33:66 μ g: μ g). Nous

avons pu détecter le L-érythrose (L-Ery) et la dihydroxyacétone (DHA) avec ces électrodes à un potentiel de -0,2 V/Ag-AgCl grâce à la réduction électrocatalytique du peroxyde d'hydrogène par le BP. A titre indicatif les performances de ces bioélectrodes sont données dans le Tableau matériel et méthodes. La détection du L-Ery ou du DHA est donc possible avec ce type de biocapteurs, néanmoins, ils devront être optimisés car les valeurs de sensibilités restent faibles.

De plus, la réaction catalysée par la TK que nous avons choisie est réversible, ce qui limite la formation du L-Ery. Pour optimiser les résultats obtenus, l'équilibre pourrait être déplacé vers la formation des produits à l'aide d'une enzyme prenant en charge le deuxième produit. Par exemple, le D-F6P, substrat donneur utilisé dans le test, pourra être remplacé par le D-xylulose-5-phosphate (D-X5P). En présence de GA, la TK catalyserait alors la formation de L-Ery et de D-glycéraldéhyde-3-phosphate (D-G3P). La triose phosphate isomérase (TPI) pourra être utilisée pour catalyser l'isomérisation du D-G3P en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) (Figure 1). La constante d'équilibre de cette réaction est largement en faveur de la formation du DHAP (96 %). L'équilibre de la réaction catalysée par la TK devrait être alors déplacé vers la formation des produits et la réponse à l'électrode accrue.

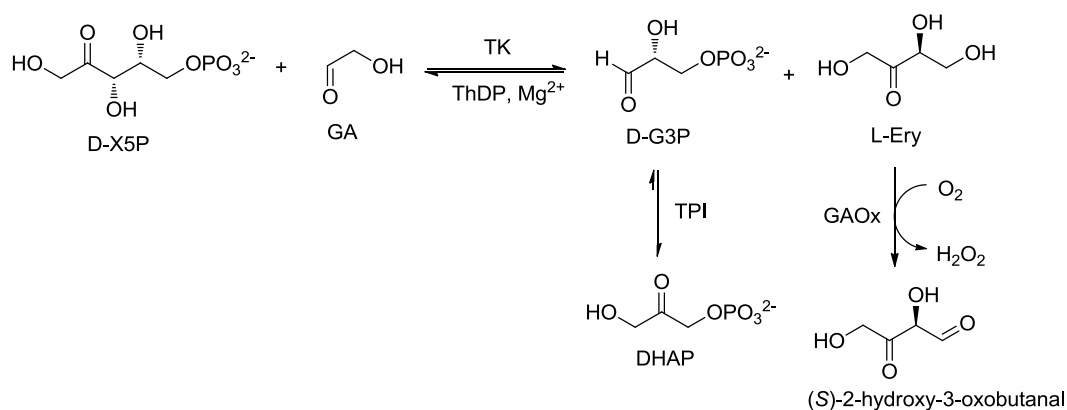


Figure 1 : Réactions catalysées par la TK à partir du D-X5P et du GA

Enfin, la poursuite de ce travail sur la détection d'inhibiteurs de la TK s'inscrit dans le projet ANR jeune chercheur TRANSBIOSCREEN dont le Dr. Franck Charmantray (ICCF) est le porteur. Ce projet sera réalisé à l'ICCF par les équipes SEESIB et MI en collaboration avec le Dr. Bastien Doumeche (ICBMS) de l'Université Claude Bernard de Lyon. La miniaturisation et l'automatisation du système est envisagée dans des microplaques 96 puits contenant des électrodes sérigraphiées. La co-immobilisation de la TK humaine et de la GAOx est envisagée dans des matériaux composites HDL@biopolymères, biocompatibles

pour ces deux enzymes ayant des points isoélectriques différents (Figure 2). La transduction se fera avec des électrodes modifiées au BP situées au fond des puits.

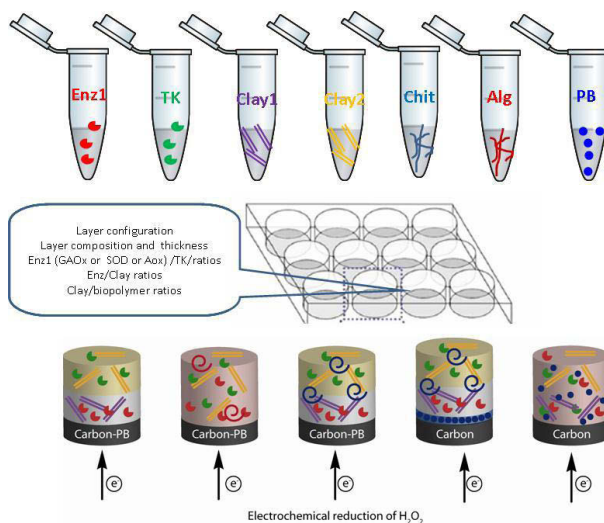


Figure 2 : Stratégies mises en place dans le projet ANR JCJC SVSE 5-2013 TRANSBIOSCREEN

La réussite de ce projet, dont ce travail de thèse a permis d'établir le cahier des charges, permettra d'un point de vue diagnostic, la détection de la TK humaine dans des fluides biologiques et d'un point de vue thérapeutique le criblage de nouveaux inhibiteurs de cette enzyme.

MATERIEL ET METHODES

A. Matériel

A. 1. Produits

Les produits (réactifs et tampons) sont commerciaux et proviennent de chez Sigma-Aldrich et Acros. Ils ont été utilisés sans purification préalable. Le réactif de Bradford est commercialisé par Bio-Rad et la résine Ni-NTA par Qiagen.

L'albumine de sérum bovin (BSA) provient de chez Sigma-Aldrich ou Acros. La galactose oxydase de *Dactylium dendroides* (GAOx, EC 1.1.3.9) à 76 U.mg^{-1} est achetée chez Worthington. La polyphénol oxydase (PPO, EC 1.14.18.1) à 3933 U.mg^{-1} , l'alcool déshydrogénase de levure de boulanger (ADH) à 331 U.mg^{-1} , la peroxydase de raifort (HRP, EC 1.11.1.7) à 59 U.mg^{-1} , la glucose-6-phosphate déshydrogénase de levure de boulanger (G6PDH) à 271 U.mg^{-1} , la phosphoglucose isomérase levure de boulanger (TPI) à 561 U.mg^{-1} proviennent de chez Sigma-Aldrich.

A. 2. Appareillage d'électrochimie

Les mesures de voltammétrie cyclique (VC), de voltammétrie à balayage linéaire (VL) et la chrono-ampérométrie ont été réalisées avec un potentiostat EA161 (eDAQ) relié à une cellule thermostatée à trois électrodes; une électrode de référence (Ag/AgCl), une électrode auxiliaire en platine et une électrode de travail de carbone vitreux ou en platine ($\Phi = 0,5 \text{ cm}$, $A = 0,196 \text{ cm}^2$).

A. 3. Techniques chromatographiques

L'avancement des réactions est suivi par analyse chromatographique sur couche mince (CCM) en utilisant des plaques d'aluminium recouverte de silice (Merck[®] DC Gel de silice 60F₂₅₄) et des systèmes d'éluants appropriés (dichloroéthane / méthanol ; acétate d'éthyle / cyclohexane). Les CCM sont révélées par exposition sous UV et par l'utilisation d'un révélateur spécifique, la vanilline.

Les produits sont généralement purifiés par colonne chromatographique en utilisant un gel de silice éclair (Merck[®] Gel de silice 40-63 μm) et un système d'éluant approprié (déterminé par CCM). La hauteur standard des colonnes réalisées est de l'ordre de 15 centimètres et le diamètre est choisi en fonction de la quantité de produit à purifier.

A. 4. Spectrophotométrie UV-Visible

Les activités enzymatiques des TKs libres, immobilisées ou sous forme de film et le dosage des protéines sont réalisés avec un spectrophotomètre UV-Visible Evolution 500 UV-Visible (Nicolet).

A. 5. Zétamètre

Les mesures de potentiel Zêta ont été effectuées avec le nanoZS Zetasizer instrument Malvern.

A. 6. Polarimètre

Les pouvoirs rotatoires sont déterminés avec un polarimètre Jasco DIP 370 à 25°C à la longueur d'onde de la raie D du sodium ($\lambda = 589$ nm). Les produits sont en solution, et la concentration est exprimée en gramme par décilitre.

A. 7. Analyse thermogravimétrique

Les thermogrammes ont été enregistrés avec un analyseur thermogravimétrique SETSYS Evolution TGA de SETARAM.

A. 8. Spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier

Les spectres d'adsorption Infrarouge ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre à transformée de Fourier Nicolet 5700 de Thermo Scientific dans une gamme de fréquences comprises entre 400 et 4000 cm^{-1} . Les échantillons sont conditionnés sous forme de pastilles constituées d'une masse d'environ 2 mg de poudre à analyser et de 200 mg de KBr.

A. 9. Diffraction des rayons X sur poudre

Les diagrammes de diffraction X ont été enregistrés sur un diffractomètre Philips X-Pert Pro équipé d'un monochromateur de graphite en utilisant des rayonnements $\text{CuK}\alpha$ avec $\lambda = 0,14415$ nm. Les diffractogrammes ont été réalisés dans un domaine angulaire en 2θ de 2 à 70° avec un incrément angulaire en $2\theta : 0,033^\circ$, et un temps d'intégration par comptage de 200 s. Les échantillons ont été préparés par sédimentation et séchage à 4°C sur plaque de verre ou de silicium.

A. 10. RMN

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés avec un spectromètre BRUKER AC 400 (400,13 MHz en ^1H et 100,13 MHz en ^{13}C). Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au solvant deutéré dans lequel le spectre a été réalisé. La numérotation des carbones et des protons des molécules ne correspond pas toujours à la nomenclature et est attribuée de façon arbitraire. Les abréviations utilisées pour décrire les signaux sont : s : singulet, d : doublet, dd : doublet dédoublé, dt : doublet détriplé, t : triplet, q : quadruplet, m : multiplet.

A. 11. Spectromètre de masse

Les spectres de masse haute résolution (HRMS) ont été réalisés sur un appareil de type Micromass Q-TOF micro Waters® équipé d'une source d'ionisation electrospray (ESI).

A. 12. LC/MS

Les analyses par LC/MS ont été effectuées sur un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC) Waters® Alliance® 2695 équipé d'un détecteur à photodiodes et couplé à un spectromètre de masse Micromass microQTOF, comportant une source electrospray de type Z-spray.

A. 13. Microscopie électronique à balayage

Les clichés de microscopie électronique à balayage (MEB) ont été enregistrés au centre Casimir à Aubière à l'aide d'un microscope supra Zeiss 55-VP avec une énergie d'électrons de 1,0 kV. La spectroscopie par dispersion en énergie des rayons X (EDX) a été effectuée avec une tension d'accélération de 15 kV avec le cuivre comme standard pour l'étalonnage.

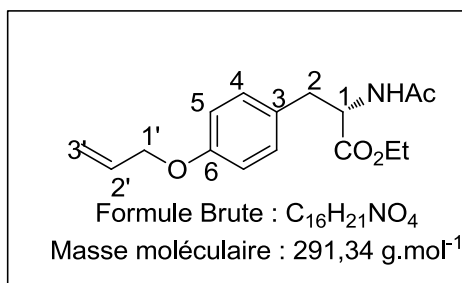
A. 14. Spectrométrie d'Émission Atomique Source Plasma à Couplage Inductif (ICP-AES)

La composition élémentaire des HDL a été effectuée au laboratoire Magmas et Volcans à Clermont-Ferrand dans le cadre du Centre Régional des Mesures Physiques (UBP-START) avec un spectromètre Jobin-Yvon ULTIMA C de HORIBA.

B. Méthodes

B. 1. Synthèses des composés organiques

Ester éthylique de la N-acétyl-O-(prop-2-enyl)-L-tyrosine 7



A 4,5 g de l'ester éthylique de la N-acétyl-L-tyrosine (**3**) (N-Ac-tyr-OEt) (18 mmol) dans 24 mL d'acétone sont ajoutés 2,74 g (19,8 mmol) de carbonate de potassium et 3,12 mL (36 mmol) de bromure d'allyle. Après l'addition, le milieu réactionnel est laissé 4 heures sous agitation à reflux de l'acétone. La réaction est suivie par CCM (AcOEt/Cyclohexane 7/3). Une fois la réaction achevée, le milieu réactionnel est évaporé sous vide, le résidu est alors repris dans 120 mL d'une solution NaOH 5 %/éther (1/1 v/v). L'extraction est réalisée avec quatre fois 40 mL d'éther. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ avant d'être évaporée sous pression réduite. Le composé est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 90%.

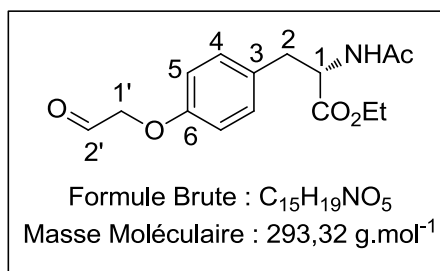
CCM : Rf (acétate d'éthyle / cyclohexane : 7/3) = 0,4 (vanilline)

$[\alpha]_D^{21}$: 21,1 (c = 1 ; MeOH)

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7,00 (d, $^3J_{H-H} = 6,6$ Hz, 2H, H_4), 6,82 (d, $^3J_{H-H} = 7,2$ Hz, 2H, H_5), 5,99 (m, 1H, $H_{2'}$), 5,40 (d, $^3J_{H-H} = 13,4$ Hz, 1H, H_2), 5,27 (d, $^3J_{H-H} = 13,4$ Hz, 1H, H_2), 4,81 (dt, $^3J_{H-H} = 6,8$ Hz, 1H, H_1), 4,5 (d, $^3J_{H-H} = 5$ Hz, 2H, $H_{1'}$), 4,16 (q, $^3J_{H-H} = 6,2$ Hz, 2H, CH_2 ester), 3,05 (m, 2H, H_2), 1,98 (s, 3H, CH_3 acétyle), 1,25 (t, $^3J_{H-H} = 6,8$ Hz, 3H, CH_3 ester).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 171,7 ($C=O$ ester), 169,6 ($C=O$ amide), 157,3 (C_6), 133,2 ($C_{2'}$), 130,3 (C_5), 128,4 (C_3), 117,4 ($C_{3'}$), 114,7 (C_4), 70,4 ($C_{1'}$), 61,3 (C_2), 53,3 (C_1), 36,2 (CH_2 ester), 23,1 (CH_3 acétyle), 14,1 (CH_3 ester).

HRMS m/z : $(M+Na)^+$ théorique : 314,1368 ; mesuré : 314,1362

Ester éthylique de la N-acétyl-O-(2-oxoéthyl)-L-tyrosine **6**

Dans un ballon bicol, 1,8 g du composé **7** (6,2 mmol) sont dissout dans 20 mL de dichlorométhane. O₃ est alors introduit à -78°C. La réaction est suivie par CCM (dichlorométhane/méthanol : 9/1). Une fois la réaction terminée, 0,76 mL (10,3 mmol) de sulfure de diméthyle sont ajoutés, la réaction est laissée sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol : 9/1). Le composé est obtenu sous forme d'une huile légèrement jaunâtre avec un rendement de 90 %.

CCM : Rf (dichlorométhane/méthanol : 9/1) = 0,36 (vanilline)

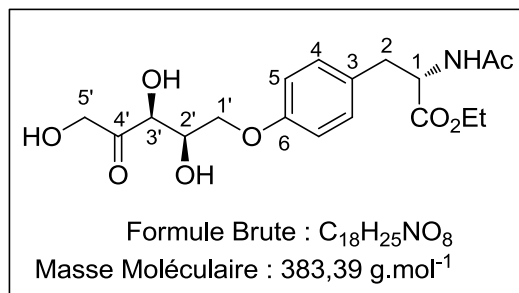
[α]_D²¹ : 7,4 (c = 1 ; MeOH)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 9,77 (s, 1H, H_{2'}), 7,14 (d, ³J_{H-H} = 6,6 Hz, 2H, H₄), 6,88 (d, ³J_{H-H} = 7,2 Hz, 2H, H₅), 4,75 (dt, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, 1H, H₁), 4,5 (d, ³J_{H-H} = 5 Hz, 2H, H_{1'}), 4,14 (q, ³J_{H-H} = 6,2 Hz, 2H, CH₂ ester), 3,07 (dd, ³J_{H-H} = 13,4 Hz, ³J_{H-H} = 5,4 Hz, 1H, H₂), 2,90 (dd, ³J_{H-H} = 13,2 Hz, ³J_{H-H} = 9,0 Hz, 1H, H₂), 1,93 (s, 3H, CH₃ acétyle), 1,22 (t, ³J_{H-H} = 6,8 Hz, 3H, CH₃ ester).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : 199,42 (C_{2'}), 171,97 (C=O amide), 170,64 (C=O ester), 157,23 (C₆), 130,43 (2C₅), 128,53 (C₃), 114,81 (2C₄), 70,67 (C_{1'}), 61,3 (CH₂ ester), 53,53 (C₁), 36,15 (C₂), 23,02 (CH₃ acétyle), 14,21 (CH₃ ester).

HRMS m/z : (M+Na)⁺ théorique : 316,1161 ; mesuré : 316,1150

Ester éthylique de la N-acétyl-O-(2R, 3S, 5-trihydroxy-4-oxopentyl)-L-tyrosine 1



A une solution du composé **6** (0,1 g, 0,34 mmol) dans 6,5 mL de tampon HEPES à 0,1 M, sont ajoutés 0,06 g (0,67 mmol) de DHA. Le pH est ajusté à 7,5 avec une solution de NaOH 0,1 M. 0,05 g (150 U) de FSA A129S dessalée de son tampon Gly-Gly par colonne PD-10 puis l'extrait enzymatique est ajouté au milieu réactionnel. Celui-ci est laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Après consommation totale du composé **6**, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite, puis 20 mL de méthanol sont ajoutés au milieu réactionnel avant centrifugation à 4000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est filtré, puis évaporé sous vide. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol : 9/1) et ensuite par extraction en phase solide (SPE) avec un support oasis® HLB (hydrophile lypophile en phase inverse). Le composé **4** est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 60 %.

CCM : R_f (dichlorométhane/méthanol : 9/1) = 0,29 (vanilline)

[α]_D²¹ : 9,25 (c = 1 ; MeOH)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 7,14 (d, ³J_{H-H} = 7,8 Hz, 2H, H₄), 6,90 (d, ³J_{H-H} = 8,0 Hz, 2H, H₅), 4,67-4,38 (m, 4H, H_{5'} et ester), 4,36-4,25 (m, 1H, H₁), 4,21-4,06 (m, 3H, H_{1'}, 2' et 3'), 4,04-3,95 (m, 1H, H_{1'}), 3,07 (dd, ³J_{H-H} = 13,7 Hz, ³J_{H-H} = 5,4 Hz, 2H, H₂), 2,90 (dd, ³J_{H-H} = 13,4 Hz, ³J_{H-H} = 8,9 Hz, 2H, H₂), 1,93 (s, 3H, CH₃ acétyle), 1,22 (t, ³J_{H-H} = 6,9 Hz, 3H, CH₃ ester).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : 213,58 (C_{4'}), 173,34 (C=O amide et C=O ester), 159,25 (C₆), 131,41 (C₅), 130,61 (C₃), 116,03 (C₄), 77,40 (C_{3'}), 71,91 (C_{2'}), 69,28 (C_{1'}), 68,11 (C_{5'}), 62,44 (CH₂ ester), 55,77 (C₁), 37,84 (C₂), 22,38 (CH₃ acétyle), 14,57 (CH₃ ester).

HRMS m/z : (M+Na)⁺ théorique : 406,1478 ; mesuré : 406,1488

B. 2. Synthèses des phases HDL

Synthèse par coprécipitation

Les HDL : Zn₂Al-Cl, Zn₂Al-NO₃, Zn₂Al-Alginate, Zn₂Al-MOPS, Mg₂Al-Cl, Mg₂Al-NO₃ et Ni₂Al-Cl, ont été synthétisés précédemment au laboratoire selon la méthode de coprécipitation.

Un mélange de solution aqueuse de sels de métaux divalents (Mg(NO₃)₂·2H₂O) et de sels de métaux trivalents (Al(NO₃)₃·9H₂O) avec un rapport molaire (R) M^{II}/M^{III} de 2 et une concentration totale de cations métalliques de 1 M, sont introduit à flux constant dans un réacteur contenant de l'eau déionisée. Le pH est fixé à 9 et est maintenu constant pendant la coprécipitation par additions simultanées d'une solution à 2 M de NaOH. La suspension est maintenue sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Le produit final est centrifugé et lavé un grand nombre de fois avec de l'eau déionisée et finalement séché à l'air à température ambiante. La synthèse est réalisée sous atmosphère d'azote afin d'éviter toutes contamination par le CO₂ atmosphérique.

Pour la phase Mg₂Al-Gly-Gly_{cop}, les conditions de coprécipitation sont identiques à celles décrites ci-dessus avec 0,1 M de Gly-Gly dans le réacteur de synthèse.

La phase Zn₂Al-MOPS a été synthétisée précédemment au laboratoire selon la méthode de coprécipitation (donnée non publié). Un mélange de solution aqueuse de sels de métaux divalents (ZnCl₂·2H₂O) et de sels de métaux trivalents (AlCl₃·9H₂O) avec un rapport molaire (R) M^{II}/M^{III} de 2, et une concentration totale de cations métalliques de 0,1 M, sont introduit à flux constant dans un réacteur contenant de le tampon MOPS. Le pH est fixé à 7,5 et est maintenu constant pendant la coprécipitation par additions simultanées d'une solution à 0,1 M de NaOH. La suspension est vieillie sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Le produit final est centrifugé et lavé un grand nombre de fois avec de l'eau déionisée et finalement séché à l'air à température ambiante. La synthèse est réalisée sous atmosphère d'azote afin d'éviter toutes contamination par le CO₂ atmosphérique.

Les biohybrides TK d'*E. coli*@HDL_{cop} sont préparés par la voie de coprécipitation comme décrit précédemment en présence de TK d'*E. coli* dans le réacteur de synthèse. La méthode a été adaptée pour la synthèse de petites quantités. Un mélange de solution aqueuse de Mg(NO₃)₂·2H₂O et de Al(NO₃)₃·9H₂O avec un rapport molaire (R) Mg²⁺/Al³⁺ de 2 ou 4 et une concentration totale de cations métalliques de 0,1 M, sont introduits à flux constant (0,015 mL.min⁻¹) dans un réacteur contenant 10 mL d'eau déionisée ou 0,1 à 0,01 M de

tampon Gly-Gly et 4, 10 ou 20 mg de TK d'*E. coli*. Les rapport TK/HDL (Q_{th}) sont fixés à 0,2 ; 0,5 et 1. Le pH est fixé à 9 et est maintenu constant pendant la coprécipitation par additions simultanées d'une solution à 0,1 M de NaOH. La réaction est agitée dans un bain glacé pendant 3 heures sous atmosphère d'azote. Le produit obtenu est centrifugé à 12000 g pendant 20 minutes et lavé trois fois.

Réactions d'échange de la phase Mg_2Al-NO_3 avec le tampon MOPS et Gly-Gly

35 mg de Mg_2Al-NO_3 sont mis en suspension (10 mg.mL^{-1}) pendant une nuit sous agitation à atmosphère ambiante dans 3,5 mL de tampon MOPS 0,05 M pH 7,5 ou de tampon Gly-Gly 0,1 M pH 7,5 ou encore pH 9. Le produit final est centrifugé à 12000 g pendant 20 minutes et lavé trois fois.

Adsorption de molécules phosphorylées sur Mg_2Al-NO_3

1 à 27,6 mg de ThDP (2 à 60 mM) ou 0,3 à 200 mg de D-F6P (1 à 658 mM) sont mis en contact avec 4 mg de Mg_2Al-NO_3 pendant 3 heures sous agitation sous air à 5°C dans 1 mL d'eau pure pH 6,5 ou dans du tampon Gly-Gly 0,1 M pH 7,5. Le produit final est centrifugé à 12000 g pendant 20 minutes et lavé trois fois.

Préparation des biohybrides TK d'*E. coli*@HDL par adsorption

L'adsorption de la TK d'*E. coli* sur l'HDL est effectuée en mélangeant l'enzyme et une suspension d'HDL. L'HDL est mis en suspension (10 mg.mL^{-1}) soit dans de l'eau pure soit dans du tampon MOPS 0,05 M pH 7,5 soit dans 1 mL de tampon Gly-Gly 0,1 M pH 7,5 et sous agitation pendant une nuit. Dans une solution de 1 mL, une quantité de TK d'*E. coli* (0,8 ; 1,6 ; 2,4 ; 3,2 et 4 mg) est ajoutée à 4 mg d'HDL en suspension (0,4 mL). Cette solution est mise sous agitation à 5°C pendant 3 heures sous air. Les rapports initiaux TK/HDL (Q_{th}) sont les rapports entre la quantité totale de protéines utilisées et la quantité d'HDL. Ces rapport sont fixés à 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1. Le produit obtenu est centrifugé à 12000 g pendant 20 minutes et lavé trois fois. La quantité de protéine immobilisée et par conséquent le rapport expérimental TK/HDL (Q_{exp}) correspond à la différence entre la quantité initiale de protéines et celles non immobilisées retrouvées dans les eaux de lavage. Cette quantité est déterminée par la méthode de Bradford décrite dans le paragraphe B. 3. 1.

Préparation du film TK@HDL

Avant la préparation du film, le disque de carbone vitreux ($\Phi = 0,5$ cm, $A = 0,196$ cm²) sur lequel est déposé le film est poli sur un feutre avec une suspension d'alumine (0,05 μ m), puis il est rincé dans un mélange 50/50 eau/éthanol dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes et séché à l'air comprimé. 100 μ g (20 μ L) d'une suspension de biohybride TK@Mg₂Al-Gly-Gly (5 mg.mL⁻¹) sont déposés sur un disque de carbone vitreux et séchés soit 2h30 à température ambiante, soit une nuit à 4°C, soit 1 heure sous vide. Le film est ensuite incubé dans 0,1 ou 0,025 M de tampon Gly-Gly.

B. 3. Techniques biochimiques**B. 3. 1. Production et purification des TKs**

Les TKs ont été obtenues dans le cadre de collaborations antérieures avec le Prof. G. Schneider (Université de Stockholm, Suède) pour la TK de *S. cerevisiae*, avec le Prof. W. D. Fessner (Université de Darmstadt, Allemagne) pour la TK d'*E. coli* et avec le Prof. G. Sprenger (Université de Stuttgart, Allemagne) pour la TK humaine.

Culture des cellules : service de microbiologie de l'ICCF

Tous les milieux de culture sont stérilisés en autoclave (20 minutes à 121°C) avant utilisation. Les solutions d'antibiotiques sont préparées dans l'eau distillée et stérilisées par filtration sur filtre 0,22 μ m. Les milieux gélosés sont obtenus par ajout d'Agar (Difco®) à une concentration de 15 g.L⁻¹. Les antibiotiques sont ajoutés aux concentrations suivantes : chloramphénicol : 25 mg.L⁻¹, kanamycine : 30 mg.L⁻¹ et ampicilline : 100 mg.L⁻¹.

Le milieu SC est constitué de : 6,7 g de Yeast Nitrogène Base, 5,04 g de (NH₄)₂SO₄, 20 mg de L-tryptophane, 20 mg de L-histidine, 20 mg de L-arginine, 20 mg de L-méthionine, 20 mg de L-thréonine, 30 mg de L-tyrosine, 30 mg de L-isoleucine, 30 mg de L-lysine, 50 mg de L-phénylalanine, 100 mg de L-glutamate, 150 mg de L-valine, 450 mg de L-sérine - H₂O distillée qsp 1 L.

Le milieu LB Difco® est constitué de : 10 g de triptone, 5 g d'extrait de levure, 10 g de NaCl - H₂O distillée qsp 1 L.

La souche H402(pTKL1) de *S. cerevisiae* est cultivée dans 10 mL de milieu SC à 30°C pendant 48 heures sous agitation. La production de TK est réalisée en milieu SC liquide dans des erlenmeyers de 500 mL contenant 100 mL de milieu SC et 1,5 mL de préculture. Le

milieu est incubé 40 heures à 30°C sous agitation. Les cellules sont recueillies après centrifugation à 2000 g pendant 5 minutes à 4°C et conservées à -20°C. Le rendement de la culture est d'environ 10 g de cellules (poids humide) par litre de culture.

Les souches BL21 (DE3) pET21 et BL21 (DE3) pET28 d'*E. coli* sont cultivées dans 100 mL de milieu LB Difco® à 37°C pendant 12 heures sous agitation (200 rpm). La production de TK est réalisée en milieu LB Difco® liquide dans des erlenmeyers de 500 mL contenant 200 mL de milieu LB et 4 mL de préculture sous agitation à 37°C. Lorsque les bactéries sont en phase exponentielle de croissance (densité optique proche de 0,9), l'induction par 0,5 mM d'IPTG est effectuée et le milieu est incubé 12 heures à 30°C sous agitation. Les bactéries sont recueillies après centrifugation à 7700 g pendant 15 minutes à 4°C, lavées deux fois dans le tampon de lyse (50 mM NaH₂PO₄ et 10 mM imidazole, pH 8) et conservées à -20°C. Le rendement de la culture est d'environ 4 g de cellules (poids humide) par litre de culture.

Broyage des cellules

Pour la TK de *S. cerevisiae*, 5 g de culot cellulaire sont mis en suspension dans 50 mL de tampon MOPS 0,05 M ou tampon Gly-Gly 0,1 M (pH 7,5). La lyse cellulaire est effectuée avec le désintégrateur de cellules (Cell Disruption Equipment) réglé à une pression de 2 kBar. Pour éliminer les débris cellulaires, le broyat est soumis à trois centrifugations successives à 4°C : 120 et 12000 g pendant 15 minutes et 27000 g pendant 20 minutes. Pour les TK_{6His} d'*E. coli* et humaine, 5 g de culot cellulaire sont mis en suspension dans 40 mL de tampon de lyse (50 mM NaH₂PO₄ et 10 mM imidazole, pH 8). La lyse cellulaire est effectuée par sonication à 4°C. Pour éliminer les débris cellulaires, le broyat est soumis à une centrifugation de 12000 g pendant 20 minutes à 4°C.

Purification

Pour la TK de *S. cerevisiae*, les extraits bruts sont semi-purifiés par chromatographie sur résine anionique Q-sépharose. Le filtrat est conservé à -18°C.

Pour les TK_{6His} d'*E. coli* et humaine, les extraits bruts obtenus après broyage sont incubés une heures à 4°C sous agitation avec 40 mL de résine Ni-NTA (nickel acide nitrilotriacétique) préalablement équilibrée avec du tampon de lyse. Le mélange est introduit dans une colonne. La fraction de protéines non adsorbées sur la résine est recueillie. Puis trois lavages successifs sont réalisés avec 40 mL de tampon de lavage (50 mM NaH₂PO₄ et 20 mM

imidazole, pH 8). Les TK_{6His} d'*E. coli* et humaine sont éluées avec 80 mL de tampon d'éluion (50 mM NaH₂PO₄ et 250 mM imidazole, pH 8). Le filtrat est ultrafiltré pour échanger le tampon avec 0,5 M de MOPS ou 0,1 mM de Gly-Gly (pH 7,5). Les filtrats sont conservés à -18°C.

Electrophorèse SDS-PAGE

Le gel de séparation à 10 % d'acrylamide est préparé à partir de 6,15 mL d'eau ; 3,75 mL de tampon Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 ; 4,95 mL d'acrylamide/bisacrylamide à 30 % ; 75 µL de laurylsulfate de sodium (SDS) à 20 % ; 75 µL de persulfate d'ammonium à 10 % et 150 µL de tétraméthyléthylènediamine (TEMED). Le gel de concentration à 4 % d'acrylamide est préparé à partir de 3,075 mL d'eau ; 1,25 mL de tampon Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 ; 67 mL d'acrylamide/bisacrylamide à 30 % ; 25 µL de SDS à 20 % ; 100 µL de persulfate d'ammonium à 10 % et 100 µL de TEMED.

20 µL d'échantillon sont mélangés à 5 µL de tampon d'échantillon (0,2 M de tampon Tris-HCl pH 6,8, 10 % w/v de SDS, 20 % v/v de Glycérol et 0,05 % w/v de bleu de bromophénol) Le mélange est incubé à 95°C pendant 10 minutes et est ensuite déposés sur le gel d'électrophorèse. Un marqueur de masse moléculaire connue (Broad Range, Biorad) est également déposé (8 µL).

La migration s'effectue dans un champ électrique de 20 mV dans un tampon d'électrophorèse (Tris Buffer Glycine/SDS-Bio-Rad).

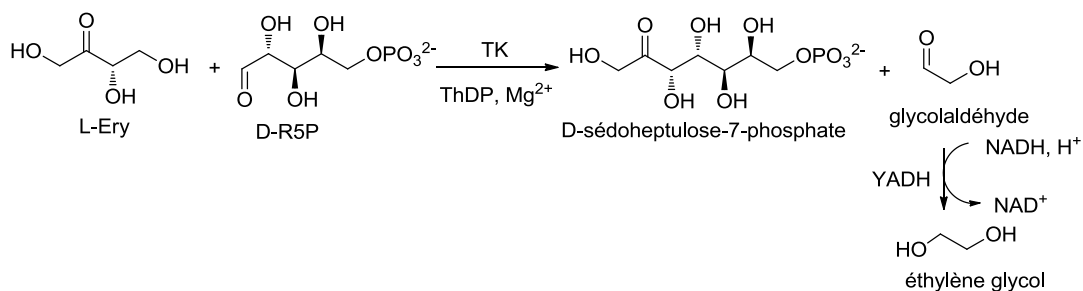
Le gel est coloré pendant une nuit à température ambiante dans une solution contenant 0,1 % de bleu de Coomassie (R-250, Sigma) ; 20 % de méthanol et 7 % d'acide acétique. Le gel est ensuite décoloré dans plusieurs bains d'une solution contenant 20 % de méthanol et 7 % d'acide acétique.

Dosage des protéines selon la méthode de Bradford

25 µL d'échantillon son additionnés à 225 µL de réactif de Bradford et incubés dans le noir pendant 10 minutes à 25°C. Une gamme étalon est réalisée avec des quantités connues de BSA de 10 à 100 µg.mL⁻¹. L'absorbance est mesurée à 590 et 450 nm et le rapport des deux valeurs varie de façon linéaire avec la concentration en protéine. La concentration en protéines dans les échantillons est exprimée en mg.mL⁻¹.

B. 3. 2. Tests d'activité enzymatique de la TK

Test spectrophotométrique pour la mesure de l'activité de la TK libre à 25 et 37°C



Dans une cuve de 1 ou 3 mL de spectrophotomètre sont introduits : 800 μL ou 2,4 mL de tampon Gly-Gly 0,1 M pH 7,5 ; 282 μM de NADH, H⁺ (10 mg.mL⁻¹, $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 20 ou 60 μL) ; 493 μM de MgCl₂ (10 mg.mL⁻¹, 10 ou 30 μL) ; 106 μM de ThDP (10 mg.mL⁻¹, 5 ou 15 μL) ; 85 mM de L-Ery (120 mg.mL⁻¹, 100 ou 300 μL) ; 8,9 mM de D-R5P (50 mg.mL⁻¹, 50 ou 150 μL) ; 25 U à 25°C et 250 U à 37°C d'alcool déshydrogénase de levure (YADH) et X μL de TK.

La diminution de l'absorbance est mesurée à 340 nm pendant 10 minutes. La pente $\Delta A/\Delta t$ mesurée correspond à la quantité de NADH, H⁺ consommée lors de la réduction du glycolaldéhyde par l'ADH. L'activité de la TK est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V_{\text{cuve}}}{V_{\text{TK}} \times \epsilon_{\text{NADH}}} \times 10^3$$

où l'activité est exprimée en U.mL⁻¹ (μmol de substrat formée.min⁻¹.mL⁻¹), Δt en minutes, V_{cuve} et V_{TK} en mL. La valeur du coefficient d'extinction molaire (ϵ_{NADH}) est 6220 M⁻¹.cm⁻¹.

Le L-érythrose n'est pas le substrat naturel de l'enzyme. Il a été établi que l'activité de la TK ne représente que 30 % de l'activité mesurée en présence de D-xylulose-5-phosphate (substrat physiologique) pour les TK de *S. cerevisiae* et d'*E. coli*.

Il est possible de déterminer l'activité spécifique de la TK selon l'équation suivante :

$$\text{Activité spécifique} = \frac{\text{Activité}}{[\text{protéines totales}]}$$

où l'activité spécifique est exprimée en U.mg⁻¹ de protéines, l'activité en U.mL⁻¹ et la concentration de protéines totales en mg.mL⁻¹.

Détermination de la constante de dissociation (K_D) du ThDP

Le ThDP est introduit à différentes concentrations dans les cuves de spectrophotomètre comportant le même milieu réactionnel que ci-dessus. L'activité de la TK est déterminée pour ces différentes concentrations en ThDP. Les valeurs obtenues permettent de tracer la courbe de Michaelis-Menten (Activité = $f([ThDP])$) et la représentation de Lineweaver-Burk ($1/Activité = f(1/[ThDP])$).

Détermination de la concentration en ThDP adsorbée dans les HDL

La concentration en ThDP dans les HDL est déterminée indirectement à partir de la mesure de la concentration dans les eaux de lavage du ThDP non adsorbé. Pour ce faire 15 μ L d'échantillon à doser sont introduit dans les cuves de spectrophotomètre comportant le même milieu réactionnel que ci-dessus. L'activité de la TK est alors déterminée. Une droite d'étalonnage a été préalablement établie avec des quantités connues en ThDP de 1 à 15 μ M. Les activités de la TK des échantillons à doser sont alors comparées à celles obtenues avec la droite d'étalonnage.

Test spectrophotométrique pour la mesure de l'activité de la TK immobilisée dans les argiles

L'activité enzymatique est déterminée à 340 nm. Le biohybride TK@HDL en suspension dans l'eau ou dans 0,1 M de Gly-Gly, ou dans 0,05 M de MOPS pH 7,5 (6-7 μ g), est ajouté dans la cuve de mesure de 3 mL dans les conditions identiques à celles décrites précédemment pour la TK libre. La mesure est effectuée sous agitation. L'activité enzymatique des biohybrides est comparée à celle obtenue pour une même quantité d'enzyme libre.

Test spectrophotométrique pour la mesure de l'activité de la TK sous forme de film TK@HDL

L'activité enzymatique de la TK sous forme de film TK@HDL est déterminée dans les mêmes conditions que celles décrites pour la TK libre. Dans ce cas, le support est directement immergé dans la cuve de 3 mL, sous agitation. Après chaque cycle, le film de TK@HDL a été soigneusement rincé avec 25 mM de tampon Gly-Gly.

B. 3. 3. Test d'activité enzymatique de la GAOx

Le mélange réactionnel est constitué de : 9 mL de tampon phosphate 0,05 M pH 7,0 ; 80 μ M de *o*-dianisidine (26 mg) ; 100 U de HRP et 10 U de GAOx.

Dans un puits d'une microplaque 96 puits sont introduits : 180 μ L de mélange réactionnel et 20 μ L d'alcool primaire (DHA, Galactose ou L-éry) (100 mM).

La vitesse initiale de formation de H₂O₂ a été suivie par l'oxydation de la *o*-dianisidine catalysée par la HRP à 460 nm.

B. 3. 4. Test d'activité enzymatique de la G6PDH et PGI

La concentration en D-F6P dans les HDL est déterminée par la mesure de la concentration dans les eaux de lavage du D-F6P non adsorbé.

Dans une cuve de 1 mL de spectrophotomètre sont introduits : 886,3 μ L de tampon Gly-Gly 0,1 M pH 7,5 ; 799 μ M de NADP⁺ (10 mg.mL⁻¹, 66,6 μ L) ; 8 U de G6PDH, 1 μ L de PGI et 20 μ L d'échantillon à doser. Une droite d'étalonnage a été préalablement établie avec des quantités connues en D-F6P de 6 à 100 μ g pour déterminer la quantité de D-F6P présente dans le milieu.

B. 4. Préparation des bioélectrodes

Avant la préparation des bioélectrodes, les électrodes de travail sont polies sur un feutre. Pour les électrodes de carbone vitreux nous utilisons une suspension d'alumine (0,05 μ m), puis elles sont rincées dans un mélange 50/50 eau/éthanol dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes et séchées à l'air comprimé. Une pâte de diamant (1 μ M) est utilisée pour le polissage des électrodes de platine. Dans ce cas, les électrodes sont rincées à l'acétone avant de passer 10 minutes dans une cuve à ultra-sons contenant de l'eau. Les électrodes sérigraphiées modifiée au Bleu de Prusse nous ont été gracieusement fournies par le Pr. Thierry Noguier (Institut de Modélisation et d'Analyse en Géo-Environnements et Santé, Université de Perpignan).

B. 4. 1. Biocapteurs à PPO

Une suspension d'HDL Mg_2Al-Cl , Zn_2Al-Cl ou $Zn_2Al-Alginate$ ($2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) placée sous agitation pendant une nuit est ajoutée à une solution de PPO dans l'eau ($2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) selon un rapport de 1:1. 50 μg de ce mélange PPO@HDL (25:25 $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) sont déposés sur une électrode de carbone vitreux, celle-ci est mise à sécher une nuit au réfrigérateur. L'électrode est ensuite mise en contact avec des vapeurs de glutaraldéhyde pendant 15 minutes pour réticuler les enzymes et le film est réhydraté pendant 15 minutes dans le tampon MOPS ou Gly-Gly à pH 7,5.

B. 4. 2. Biocapteurs à GAOx

Electrodes de platine

Une suspension de laponite ou d'HDL (Mg_2Al-NO_3) ($2,5$ ou 5 mg.mL^{-1}) placée sous agitation pendant une nuit est mélangée avec une solution aqueuse de GAOx ($2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) selon différents rapports enzyme/matrice inorganique (0,5, 1 et 2). 50, 75 ou 100 μg de ce mélange (25:25, 25:50, 50:25 et 50:50 $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) sont déposés sur une électrode de platine, celle-ci est mise à sécher une nuit au réfrigérateur. L'électrode est ensuite mise en contact avec des vapeurs de glutaraldéhyde pendant 15 minutes et le film est réhydraté pendant 15 minutes dans 50 mM de tampon phosphate ou HEPES ou MOPS à pH 7,0.

Electrodes sérigraphiées modifiée au Bleu de Prusse

Une suspension de laponite ($2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) placée sous agitation pendant une nuit est mélangée avec une solution aqueuse de GAOx ($2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) selon un rapport enzyme/laponite de 2. 75 μg de ce mélange (50:25 $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) sont déposés sur l'électrode. Elle est ensuite mise en contact avec des vapeurs de glutaraldéhyde pendant 15 minutes et le film obtenu est réhydraté pendant 15 minutes dans 50 mM de tampon phosphate HEPES à pH 7,0 avant utilisation.

B. 4. 3. Biocapteurs bi-enzymatique GAOx-TK

Electrodes de platine

Le biocapteur bi-enzymatique est élaboré en bicouche avec une couche externe contenant la TK d'*E. coli* et une couche interne la GAOx. Pour la couche interne, une suspension de laponite ($2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) placée sous agitation pendant une nuit est mélangée avec une solution aqueuse de GAOx ($2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) selon un rapport enzyme/laponite de 2. 75 μg de ce mélange (50:25 $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) sont déposés sur une électrode de platine ; celle-ci est mise à sécher une nuit au réfrigérateur. L'électrode est ensuite mise ou non en contact avec des vapeurs de glutaraldéhyde pendant 15 minutes. Pour la couche externe, 50 ou 75 ou 100 μg d'une suspension de TK@Mg₂Al-Gly-Gly avec un rapport enzyme/HDL de 0,5 (17:33, 24:51 et 33:66 $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) sont déposés sur la couche interne GAOx@laponite, celle-ci est mise à sécher 2h30 à température ambiante. L'électrode est ensuite mise ou non en contact avec des vapeurs de glutaraldéhyde pendant 15 minutes. Le film est réhydraté pendant 15 minutes dans 50 mM de tampon HEPES à pH 7,0.

Electrodes sérigraphiées modifiée au Bleu de Prusse

Le biocapteur bi-enzymatique est également élaboré en bicouche. Pour la couche interne, les conditions sont les même que celle présentées ci-dessus. Pour la couche externe TK@HDL, 100 μg d'une suspension de TK@Mg₂Al-Gly-Gly avec un rapport enzyme/HDL de 0,5 (33:66 $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) sont déposés sur la couche interne GAOx@laponite, celle-ci est mise à sécher 2h30 à température ambiante. Le film est ensuite réhydraté pendant 15 minutes dans 50 mM de tampon phosphate HEPES à pH 7,0.

B. 5. Mesures en électrochimie

Toutes les mesures en électrochimie sont effectuées au moins deux ou trois fois de façon indépendante.

Le comportement électrochimique de l'ester éthylique de la *N*-acétyl-L-tyrosine **3** (N-Ac-tyr-OEt **3**) et du composé **1** a été étudié en voltammétrie cyclique sur une électrode de carbone vitreux nue à une vitesse de balayage de 25 mV.s^{-1} dans une cellule à trois électrodes contenant 5 mL de tampon acide-3-(*N*-morpholino)propanesulfonique (MOPS) 0,05 M à pH 7,5 et 100 μM de N-Ac-tyr-OEt **3** ou du composé **1**.

B. 5. 1. Biocapteurs à PPO

Avec les biocapteurs à PPO@HDL, les courbes de chrono-ampérométrie sont enregistrées à un potentiel appliqué (E_{app}) de $-0,2$ V/Ag-AgCl avec une électrode de carbone vitreux modifiée tournant à 500 tr.min⁻¹ et après stabilisation du courant pendant 30 minutes dans la solution tampon (0,05 M MOPS ou 0,1 M Gly-Gly, pH 7,5) à 25°C, le réactif N-Ac-tyr-OEt **3** ou le composé **1** sont ajoutés dans la cellule avec une micropipette. La variation du courant en fonction du temps est enregistrée.

De même, le suivi de la transformation du composé **1** par la TK en solution au cours du temps a été réalisé en VC sur électrode de carbone vitreux nue et en chrono-ampérométrie à $-0,2$ V/Ag-AgCl ou en VL à intervalles régulier dans le temps, soit 1, 2, 3 et 24 heures en utilisant une électrode modifiée par un film de PPO@ZnAl-Alginate (25:25 µg:µg) à 25°C. Pour les mesures en VL, le milieu de mesure contient : 5 mL de tampon MOPS 0,05 M à pH 7,5 ; 2 mM de ThDP ; 3 mM de MgCl₂ ; 2 mg.mL⁻¹ d'albumine de sérum bovin (BSA) ; 100 µM de D-ribose-5-phosphate (D-R5P) ; 100 ou 500 µM du composé **1** et 1 ou 3 U.mL⁻¹ de TK de *S. cerevisiae* brute ou purifiée ou d'*E. coli* purifiée. Pour les mesures en chrono-ampérométrie, les conditions sont les suivantes : 5 mL de tampon MOPS 0,05 M pH 7,5 ; 2 mM de ThDP ; 3 mM de MgCl₂ ; 2 mg.mL⁻¹ de BSA ; 100 ou 1000 µM de D-R5P et 0 ou 5 ou 10 U.mL⁻¹ de TK *S. cerevisiae* brute ou purifiée d'*E. coli* purifiée, cinq additions successives de 2 µM de N-Ac-tyr-OEt **3** et cinq de 20 µM du composé **1** sont réalisées.

B. 5. 2. Biocapteurs à GAOx

Electrodes de platine

Différentes courbes d'étalonnage ont été établies avec les biocapteurs à GAOx. Dans ce cas, les courbes de chrono-ampérométrie sont enregistrées à un potentiel appliqué (E_{app}) de $0,6$ V/Ag-AgCl avec une électrode de platine modifiée tournante à 500 tr.min⁻¹ et après stabilisation du courant pendant 15 minutes dans la solution saturée en oxygène à 25°C. Dans une cellule électrochimique comportant 5 mL de tampon phosphate, HEPES ou MOPS 0,05 M pH 7,0 est ajouté des quantités croissantes d'une solution mère de dihydroxyacétone (DHA). Les droites d'étalonnage ont été établies avec les biocapteurs GAOx@Mg₂Al-NO₃ ou GAOx@laponite préparées avec différents rapports enzyme/matrice. Les déterminations du galactose, le L-érythrose (L-Ery), le glycolaldéhyde (GA) et l'hydroxypyruvate (HPA) ont été réalisées avec le biocapteur GAOx@laponite (50:25 µg:µg) dans le tampon HEPES, ainsi

que pour les interférents potentiels. Dans ce cas, une seule concentration d'interférent a été testée, à savoir 20 μM de raffinose, de lactose et de mélibiose, 1 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de ThDP et 5 mM de D-F6P.

Le biocapteur GAOx@laponite (50:25 $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) est utilisé pour la détection de l'activité des TKs en solution en chrono-ampérométrie à 0,6 V/Ag-AgCl. Les mesures sont effectuées à 25°C pour la TK d'*E. coli* et 37°C pour les TKs d'*E. coli* et humaine. Le milieu électrolytique contient 5 mL de tampon HEPES 0,05 M pH 7,0 ; 0,2 mM de ThDP ; 1 mM de MgCl_2 ; 1 mM de GA ; 1 mM de D-F6P ; 0,01 à 0,1 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de TK. Auparavant, l'effet de la concentration en GA (1, 2 ou 5 mM de GA) a été étudié avec 0,1 mM de D-F6P et 5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de TK d'*E. coli*. Pour l'effet de la concentration en D-F6P (0,1, 1 ou 5 mM de D-F6P), les conditions sont les suivantes 1 mM de GA et 0,1 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de TK d'*E. coli*. Toutes les autres conditions étant identiques. Après stabilisation du courant pendant 15 minutes, le D-F6P est ajouté dans le milieu grâce à une micropipette et la réponse en courant est enregistrée en fonction de temps. En fin de mesure, trois fois 5 μM de DHA sont ajoutés pour vérifier l'activité de la GAOx. Pour la détermination de la constante de dissociation (K_D) du ThDP avec la TK en solution, les conditions sont les suivantes : 5 mL de tampon HEPES 0,05 M pH 7,0 ; 1 mM de MgCl_2 ; 1 mM de GA ; 1 mM de D-F6P ; 0,1 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de TK d'*E. coli*. Dans ce cas, c'est le ThDP qui est introduit à la micropipette dans la cellule électrochimique et les courbes d'intensités de courant en fonction du temps sont tracées.

Le biocapteur GAOx@laponite (50:25 $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) est utilisé pour étudier l'influence des inhibiteurs de la TK sur la GAOx en chrono-ampérométrie à 0,6 V/Ag-AgCl. Le milieu électrolytique contient 5 mL de tampon HEPES 0,05 M pH 7,0. Pour l'effet de la thiamine, la thiamine monophosphate et le ThDP, après stabilisation du courant pendant 15 minutes, de 2 à 50 mM d'inhibiteurs et trois fois 5 μM de DHA sont ajoutés dans le milieu grâce à une micropipette et la réponse en courant est enregistrée en fonction de temps. Pour l'effet de la thiamine, la thiamine monophosphate, le ThDP, le pyrophosphate, l'oxythiamine, la benfotiamine, le bromopyruvate, le D-arabinose-5-phosphate et le *p*-hydroxyphénylpyruvate, après stabilisation du courant pendant 15 minutes, 10 mM d'inhibiteurs et trois fois 5 μM de DHA ou trois fois 20 μM de L-Ery sont ajoutés dans le milieu grâce à une micropipette et la réponse en courant est enregistrée en fonction de temps.

Electrodes sérigraphiées modifiée au Bleu de Prusse

Différentes courbes d'étalonnage ont été établies avec le biocapteur GAOx@laponite. Dans ce cas, les courbes de chrono-ampérométrie sont enregistrées à un potentiel appliqué (E_{app}) de $-0,2$ V/Ag-AgCl avec une électrode sérigraphiées modifiée. Après stabilisation du courant pendant 30 minutes, dans une solution comportant 5 mL de tampon HEPES 0,05 M pH 7,0 à 25°C sous agitation à 500 tr.min⁻¹, des quantités croissantes d'une solution mère de dihydroxyacétone (DHA) ou de L-érythrose (L-Ery) sont ajoutées (Tableau matériel et méthodes).

B. 5. 1. Biocapteurs bi-enzymatique GAOx-TK

Electrodes de platine

Les courbes de chrono-ampérométrie sont enregistrées à un potentiel appliqué (E_{app}) de $0,6$ V/Ag-AgCl avec une électrode de platine modifiée tournante à 500 tr.min⁻¹ et après stabilisation du courant pendant 15 minutes dans une solution de tampon HEPES 0,05 M pH 7,0 à 25°C.

Le biocapteur GAOx@laponite-TK@HDL est utilisé pour la détection d'inhibiteurs de la TK d'*E. coli* en chrono-ampérométrie à $0,6$ V/Ag-AgCl. Auparavant, les courbes d'étalonnage de la DHA, du GA et du L-Ery ont été établies dans 5 mL de tampon HEPES 0,05 M pH 7,0. Les effets des concentrations en GA (1, 2 ou 5 mM de GA) et en D-F6P (0,1, 1 ou 5 mM de D-F6P) ont été étudiés dans 5 mL de tampon HEPES 0,05 M pH 7,0 ; 0,2 mM de ThDP et 1 mM de MgCl₂.

Pour les inhibiteurs analogues du ThDP (le pyrophosphate, la thiamine, la thiamine monophosphate, la benfotiamine et l'oxythiamine), le biocapteur GAOx-TK est immergé pendant 1 heure dans une solution sous agitation contenant Mg²⁺, 1 ou 2 ou 5 μM de THDP et des concentrations variables en inhibiteurs. Le biocapteur est ensuite immergé dans 5 mL de tampon HEPES 0,05 M pH 7,0. Après stabilisation du courant pendant 15 minutes, 2 mM de GA et 1 mM de D-F6P sont ajoutés dans le milieu grâce à une micropipette et la réponse en courant est enregistrée en fonction de temps. En fin de mesure, trois fois 5 μM de DHA sont ajoutés pour vérifier l'activité de la GAOx.

Pour les inhibiteurs analogues des substrats (le D-arabinose-5-phosphate et le bromopyruvate), le milieu électrolytique contient 5 mL de tampon HEPES 0,05 M pH 7,0 ; 0,2 mM de ThDP ; 1 mM de MgCl₂. Après stabilisation du courant pendant 15 minutes, 2 mM

de GA, différentes concentrations en inhibiteurs et 1 mM de D-F6P sont ajoutés dans le milieu grâce à une micropipette et la réponse en courant est enregistrée en fonction de temps. En fin de mesure, trois fois 5 μ M de DHA sont ajoutés pour vérifier l'activité de la GAOx.

Electrodes sérigraphiées modifiée au Bleu de Prusse

Différentes courbes d'étalonnage ont été établies avec le biocapteur bi-enzymatique GAOx-TK. Dans ce cas, les courbes de chrono-ampérométrie sont enregistrées à un potentiel appliqué (E_{app}) de -0,2 V/Ag-AgCl avec une électrode sérigraphiée modifiée tournante à 500 tr.min⁻¹ Après stabilisation du courant pendant 30 minutes, dans une solution comportant 5 mL de tampon HEPES 0,05 M pH 7,0 à 25°C, des quantités croissantes d'une solution mère de dihydroxyacétone (DHA) ou de L-érythrulose (L-Ery) sont ajoutées (Tableau matériel et méthodes).

Tableau matériel et méthodes : Performances ampérométriques de différentes configurations de l'électrode modifiée au Bleu de Prusse pour le dosage du L-Ery et de la DHA (0,05 M HEPES pH 7,0, 25°C, E_{app} = -0,2 V/Ag-AgCl, 500 tr.min⁻¹)

Configuration de l'électrode	Substrats	S (mA.M ⁻¹ .cm ⁻²)	I _{max} (μ A.cm ⁻²)	DL (M)	R ² (n)
GAOx@laponite	DHA	22	44	$6,2.10^{-6} - 1,5.10^{-3}$	0,998 (26)
GAOx@laponite-TK@HDL	DHA	18	42	$2,5.10^{-6} - 1,2.10^{-3}$	0,999 (29)
GAOx@laponite	L-Ery	8	36	$3,5.10^{-4} - 3,7.10^{-3}$	0,998 (12)
GAOx@laponite-TK@HDL	L-Ery	3	33	$9,0.10^{-5} - 1,2.10^{-3}$	0,997 (10)

ANNEXES

Amperometric Biosensor Based on Galactose Oxidase Immobilized in Clay Matrix

Franck Charmantray,* Nadia Touisni, Laurence Hecquet, Christine Mousty*

Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, ICCF UMR-CNRS 6296, F-63000 Clermont-Ferrand, France

*e-mail: Franck.Charmantray@univ-bpclermont.fr; Christine.Mousty@univ-bpclermont.fr

Received: June 1, 2012

Accepted: July 20, 2012

Published online: October 2, 2012

Abstract

An amperometric galactose biosensor was developed by immobilizing galactose oxidase (GAOx) within a laponite clay film coated on a Pt electrode surface. The electrochemical assays were performed by potentiostating the GAOx/laponite bioelectrodes at +0.6 V vs. Ag/AgCl in order to oxidize the enzymatically generated hydrogen peroxide. The bioelectrochemical responses of the biosensors were optimized with regard to the buffer nature, the pH, and the GAOx/laponite ratios. Laponite provides a favorable environment to GAOx activity, since the optimized biosensor GAOx/laponite (50:25; $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) shows a great sensitivity and maximum current ($85 \text{ mA M}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ and $232 \mu\text{A cm}^{-2}$, respectively) over a linear galactose concentration range of 1.0×10^{-6} – 1.6×10^{-3} M. It is also stable at least for four weeks at 4 °C.

Keywords: Clay, Laponite, Amperometry, Biosensor, Galactose oxidase, Dihydroxyacetone, Galactose

DOI: 10.1002/elan.201200274

1 Introduction

Determination of galactose is important in food science, human nutrition, fermentation industry, and medicine. In humans, deficiency of one or more enzymes involved in galactose metabolism may lead to galactosemia, a disease that is characterized by a high rate of galactose in blood. Among the various analytical methods developed for the galactose content determination, biosensors remain attractive tools since they are usually not affected by color and turbidity of particulates [1].

One of the key steps in the fabrication of biosensors consists in the effective immobilization of biomolecules onto the transducer surface. The objectives are to find an immobilization method that maintains the enzyme activity, increases its stability, and provides accessibility towards the substrate. Hence, several electrochemical galactose biosensors have been reported on using organic synthetic polymers, such as polypyrrole, as host matrices for galactose oxidase (GAOx) immobilization [2–4]. Indeed among the procedures of biomolecule immobilization on transducer surface, the electrogenerated polymers are commonly employed to perform adsorption, entrapment, covalent or affinity binding of biomolecules [5].

Noticeably, the use of inorganic matrices, such as sol-gel silicates, clays and layered double hydroxides (LDH), is an alternative to organic polymers that are widely used for immobilizing biomolecules [6,7]. Compared to polymers, these inorganic matrices have many advantages, for

example high chemical inertness and biocompatibility, a tunable crystal lattice with adjustable crystal size and open pore structure and, low production costs. In particular 2D layered materials, including cationic clays and LDH, have been reported as efficient host matrices for proteins and enzymes. Indeed, characteristics of clay coatings, such as porosity and swelling properties, may induce an improvement in the activity and stability of the immobilized enzymes. Hence in previous works, we have used synthetic lamellar inorganic materials, i.e. laponite and LDH, for the immobilization of enzymes on electrode surface following an original and inexpensive strategy [6]. Laponite ($\text{Si}_8[\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.5}\text{H}_4\text{O}_{24}]^{0.7-}\text{Na}^{0.7+}$) is a layered aluminosilicates with cationic exchange capacity. Layered Double Hydroxides (LDH), also called anionic clays, are built on a stacking of positive layers $[\text{M}^{\text{II}}_{1-x}\text{M}^{\text{III}}(\text{OH})_2]^{x+}$, separated by interlamellar domains constituted of anions and water molecules $[\text{X}_{x/q}; n\text{H}_2\text{O}]^{x-}$. Various amperometric biosensors are described in the literature using these clay materials as host matrices for oxidases, namely glucose oxidase [8], polyphenol oxidase [9], lactate oxidase [10], xanthine oxidase [11,12] and cholesterol oxidase [13]. However, the use of clay matrices for GAOx immobilization was not described, so far. In the reported study, an electrochemical biosensor for galactose determination was developed, based on the immobilization of GAOx within laponite. The biosensor configuration was optimized for the determination of dihydroxyacetone (DHA) and galactose as a function of the buffer nature, the pH

and the GAOx/clay ratios. The analytical characteristics for galactose determination are compared with the reported data from the literature, showing that laponite makes an attractive alternative to the organic synthetic polymers as host matrix for GAOx immobilization.

2 Experimental

2.1 Reagents

Galactose oxidase (GAOx, EC 1.1.3.9) from *Dactylium dendroides* (76 U mg⁻¹), hydrogen-peroxide oxidoreductase (HRP, EC 1.11.1.7) from horseradish (59 U mg⁻¹), galactose, dihydroxyacetone (DHA), lactose, raffinose, melibiose, uric acid, glutaraldehyde solution 25% in water, 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS), 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), components of phosphate buffer (PBS) i.e. sodium phosphate monobasic and dibasic were purchased from Sigma. LDH Mg₂Al(OH)₆NO₃, denoted MgAl-NO₃, was synthesized by coprecipitation method [14]. Laponite was obtained from Rockwood Specialties, Inc. (Princeton, NJ). All other reagents were of analytical grade and used as received without further purification. All buffer solutions (PBS, HEPES and MOPS) were prepared in deionized distilled water.

2.2 Galactose Oxidase Enzymatic Assay

GAOx activity was assayed using a GAOx-HRP coupled assay. The reagent mix contained *o*-dianisidine (26 mg, 0.08 mmol), horseradish peroxidase HRP (100 units), (GAOx) (10 units) in 9 mL of 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.0. 180 μ L of reagent mix was placed in the well of a 96-well microtiter plate. The reaction was initiated by 20 μ L addition of the primary alcohols stock solutions assayed (100 mM). The initial rate of H₂O₂ formation was followed by monitoring the HRP-catalyzed oxidation of *o*-anisidine at 460 nm on a Safire² microplate reader (TECAN).

2.3 Electrochemical Experiments by Chronoamperometry

Electrochemical experiments were carried out with a potentiostat EA161 (EDAQ) connected to a thermostated cell (20 mL) with a three-electrode system. A saturated Ag/AgCl electrode was used as reference electrode and a Pt wire was used as counter electrode. The working electrode was a rotating disk Pt electrode ($\varnothing=0.5$ cm) polished with a diamond slurry paste (1 μ m) and rinsed with acetone and water. The steady-state chrono-amperograms (i_{im} vs. t) were recorded at 0.6 V/Ag/AgCl under a rotating speed of 500 rpm in air saturated 0.05 M buffer solutions. After baseline stabilization under applied potential, the substrate concentration was increased stepwise by adding with a micropipette fixed volumes of concentrated stock solution of analyte (DHA, galactose, and

other putative substrates) in 20 mL electrolyte solution. The current response was measured after its stabilization. The linear range of the calibration plots was fixed according to the best correlation coefficient (R^2); sensitivity was expressed as the slope of these plots. The detection limit (DL) was defined as a signal-to-noise ratio of 3 and the response time was determined as the time required to reach 95% of the current response. J_{max} corresponded to the pseudo-plateau observed in the calibration curves and it was related to the total amount of immobilized enzyme. The reported values corresponded to mean values of at least two independent measurements. A GAOx/laponite electrode was stored in HEPES buffer solution (pH 7.0) at 4 °C and was regularly assayed (every 3 days) to study its storage stability for one month. The biosensor response as a function of storage time corresponds to an average value of 5 measurements (5 μ M DHA).

2.4 Preparation of the GAOx/Clay Modified Electrodes

The clay bioelectrodes were prepared following the same protocol described elsewhere. LDH or laponite (5.0 mg mL⁻¹) colloid suspensions were dispersed overnight under stirring conditions in pure water. GAOx was dissolved in pure water with a concentration of 5 mg mL⁻¹. A defined amount of the aqueous mixtures (for instance, containing 50 μ g GAOx and 50 μ g clay) was spread on the surface of Pt electrode. The coating was dried in air at 4 °C overnight. The resulting electrode was then placed in saturated glutaraldehyde vapor for 15 min for the cross-linking of the membrane. Finally, the GAOx biomembranes were rehydrated for 15 min into 0.05 M buffer solutions.

3 Results and Discussion

3.1 Optimization of GAOx Biosensor

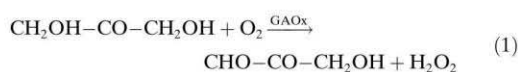
Galactose oxidase catalyzes the aerobic oxidation of galactose, and also a large number of primary alcohols with the concomitant production of aldehyde molecules and hydrogen peroxide. It should be noted that GAOx is able to oxidize dihydroxyacetone (DHA) very efficiently, even more efficiently than its natural substrate galactose. Indeed, oxidation activity toward DHA was 470% higher than that of galactose, as determined following the HRP coupled GAOx spectrophotometric assay (see Section 2). This relative velocity was determined for a fixed concentration of substrates (10 mM). It is highly compatible with the results from the literature, as the *relative velocities* of the galactose oxidase catalyzed DHA oxidation compared to galactose fall in the 179–600% range, usually [15–17]. DHA was therefore chosen in the present study as a reference substrate for the optimization of the biosensor configuration.

The electrochemical behavior of the different GAOx/clay electrodes was investigated through the electro-oxidation at the underlying Pt electrode of the enzymatically

Full Paper

F. Charmantray et al.

generated hydrogen peroxide at $E_{\text{app}}=0.6$ V using DHA as substrate following the reactions:



Calibration curves were therefore obtained by measuring the oxidation current of H_2O_2 under steady state condition (see Section 2).

A comparative study of the immobilization of GAOx onto different synthetic clays, cationic clay (laponite), and anionic clay (MgAl-NO_3), was realized in order to highlight the advantages of each kind of clay coatings as immobilization matrix. In order to compare both types of matrices, the same configuration in terms of deposited amount of matrix and enzyme/clay ratio was used (50:50; $\mu\text{g}:\mu\text{g}$). Buffer components may disturb interaction between enzyme and clays matrices, three different buffers (0.05 M PBS, HEPES, and MOPS), commonly used in enzyme assays, have been therefore tested at pH 7.0. Typical calibration curves obtained with both types of biosensors in HEPES are shown in Figure 1 and the analytical characteristics of these biosensors are given in Table 1. The comparison of the biosensor performances clearly indicates that laponite constitutes the best matrix for the construction of a GAOx biosensor. An important factor affecting the biosensor response concerns the diffusion of enzyme substrate and product through the immobilization matrix and hence the membrane permeability. Taking into account that LDH presents a higher permeability ($2 \times 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$) than laponite ($2 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$) [8,9], a better sensitivity was expected for the biosensor based on LDH matrix. It is effectively true for polyphenol oxidase biosensors [9] but not for GAOx. The maximum current density (J_{max}), which reflects the amount of immobilized enzyme exhibiting an electroenzymatic activity, is 2.5 higher within laponite; the sensitivity and the linear range are also significantly improved (Table 1). The permeability effect is not the exclusive factor; the amount of active immobilized enzyme must be also taken into account. Hence specific interaction between enzyme and

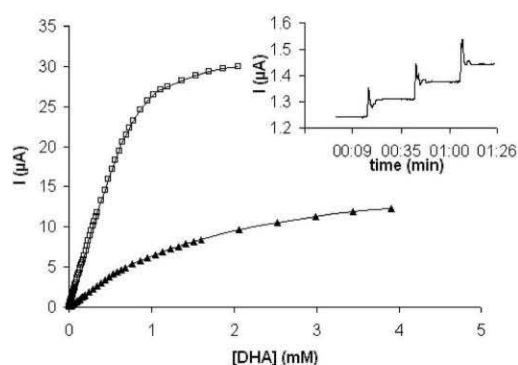


Fig. 1. Calibration curves for dihydroxyacetone (DHA) recorded at the a) GAOx/laponite electrode (\square) and b) GAOx/ MgAl-NO_3 (50:50; $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) electrodes (\blacktriangle). Other experimental conditions: HEPES pH 7.0; 50 mM, 25 °C. Inset: Steady-state anodic current-time responses of GAOx/laponite (50:50; $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) electrode for 2 μM DHA additions.

the host matrix must be also considered. GAOx has an isoelectric point of 12 [2], its overall positive charge at pH 7 should be favorable for strong interactions with negatively charged layers of laponite. Similarly, Kondaka et al. have shown that GAOx is strongly adsorbed on silica surface, which is also negatively charged at pH 7, with an enhanced enzyme activity compared to the free enzyme [18]. Laponite was therefore selected as immobilization matrix for GAOx.

Worthington GAOx has an optimum pH of 7.0. No significant deviation of activity was observed around this pH value when GAOx was immobilized, with a relative standard deviation (RSD) of 6% between pH 7 and 8 (data not shown). However the highest response was obtained in HEPES (Table 1), which was consequently used for further experiments at pH 7.0.

Proportion between enzyme and clay is of great importance for biosensor preparation. So the effect of GAOx and laponite (weight/weight) ratio was studied (Table 2). The sensitivity and J_{max} increase with the GAOx/laponite ratio from 0.50 to 1 or 2. Both biocoatings (50:50; $\mu\text{g}:\mu\text{g}$)

Table 1. Amperometric performances of GAOx/laponite vs. GAOx/ MgAl-NO_3 biosensors for dihydroxyacetone (DHA) determination ($E_{\text{app}}+0.6$ V in 0.05 M buffer pH 7.0 at 25 °C). Experiments were done in duplicate.

Coating composition	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	RSD (%)	Sensitivity ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	RSD (%)	LR (M)	R^2 (n)
GAOx/Laponite						
50:50 ($\mu\text{g}:\mu\text{g}$)						
PBS	176	<1	195	<1	5.0×10^{-7} – 4.8×10^{-4}	0.9999 (56)
MOPS	140	5	180	2	5.0×10^{-7} – 4.3×10^{-4}	0.9999 (56)
HEPES	178	3	224	4	5.0×10^{-7} – 3.0×10^{-4}	0.9999 (53)
GAOx/ MgAl-NO_3						
50:50 ($\mu\text{g}:\mu\text{g}$)						
PBS	69	13	21	1	2.0×10^{-5} – 6.8×10^{-4}	0.9990 (19)
MOPS	62	<1	38	9	2.0×10^{-5} – 3.9×10^{-4}	0.9993 (13)
HEPES	72	4	38	11	2.0×10^{-6} – 6.1×10^{-4}	0.9995 (40)

Table 2. Amperometric performances of GAOx/laponite for DHA determination with different biosensor configurations ($E_{app} + 0.6$ V in 0.05 M HEPES pH 7.0 at 25°).

Coating composition ($\mu\text{g}:\mu\text{g}$)	J_{max} ($\mu\text{A cm}^{-2}$)	RSD (%)	Sensitivity ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	RSD (%)	LR (M)	R^2 (n)
25:25	121	6 [a]	140	5 [a]	5.0×10^{-7} – 1.9×10^{-4}	0.9997 (45)
50:50	178	3 [a]	224	4 [a]	5.0×10^{-7} – 3.0×10^{-4}	0.9999 (53)
25:50	88	7 [a]	83	3 [a]	3.4×10^{-6} – 2.1×10^{-4}	0.9996 (42)
50:25	155	10 [b]	237	4 [b]	5.0×10^{-7} – 2.9×10^{-4}	0.9999 (52)

[a] Experiments were done in duplicate. [b] Five independent measurements.

and (50:25; $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) exhibit almost the same satisfactory performance but the later film was more stable. This configuration was used for further experiments. Inset of Fig. 1 illustrates reproducible and well-defined stationary currents reached after successive additions of 2 μM DHA, with response time around 6 s (t_{95}). Ten consecutive additions of 5 μM DHA yielded reproducible stationary currents with a relative standard deviation (RSD) of 4%. It should be noted that we even observed an amplifying effect of the response to the electrode for the first four additions (mean + 30%). We attribute this to the rehydration of the biomembrane that is completed after this time, only. Reproducibility of the biomembrane fabrication process was tested using five different modified electrodes constructed by the same procedure with the optimum GAOx/laponite ratio (50:25; $\mu\text{g}:\mu\text{g}$). From the calibration plots of DHA, in the 5.0×10^{-7} to 2.9×10^{-4} M linear range, the sensitivity and J_{max} are $237 \pm 8 \text{ mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$ and $155 \pm 15 \mu\text{A cm}^{-2}$, respectively. The detection limit was measured for a signal to noise ratio of 3 and it corresponds to 0.25 μM . This biosensor performance for DHA determination can be compared to that reported for another bi-enzymatic biosensor (GAOx and HRP) using ferrocene as mediator. This later mediator-based electrode has worse detection limit (0.8 μM) and sensitivity ($24 \text{ mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$) over 2–550 μM DHA concentration range [17]. This indicates an efficient and reproducible immobilization process of GAOx within la-

ponite, although the procedure used was a non-automatic handmade process.

We have analyzed the stability of the bioelectrodes with the storage time. The GAOx/laponite modified electrode kept at 4 °C in HEPES buffer pH 7.0 was shown to retain 75% of its initial activity after one month.

3.2 Quantification of Galactose and Other Galactosides Conjugates

After optimizing the biosensor system, the determination of other substrates, which could be oxidized by GAOx was studied. Indeed, GAOx enzyme displays a relatively wide spectrum of activity for several galactose-containing saccharides such as lactose, raffinose and melibiose. Figure 2 shows the normalized response of GAOx/laponite biosensor to the different sugars tested vs. galactose (100%) as the reference. The activities for DHA, lactose, raffinose and melibiose, measured at 20 μM , were 278, 19, 61 and 89%, respectively. The relative activity of GAOx for these substrates was similar to that reported in the literature [19], laponite matrix did not induce any sugar selectivity.

The calibration curve of galactose was established under the optimum conditions (Figure 3). Interestingly the biosensor performances reveal extremely promising since galactose was assayed with very high sensitivity ($85 \text{ mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$) over a wide linear range of 1.0×10^{-6} –

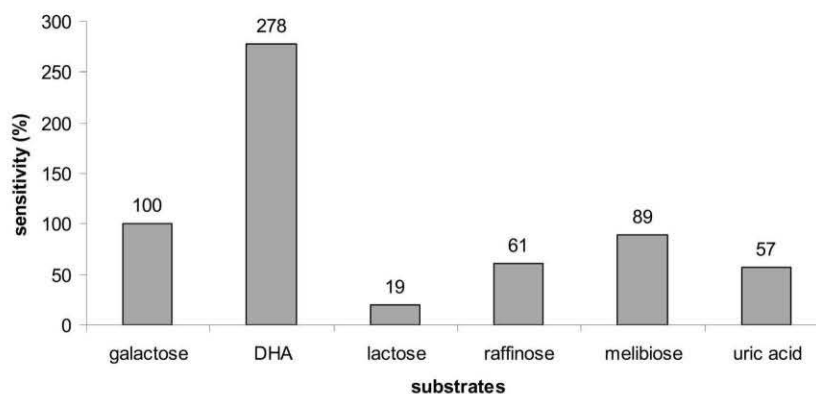


Fig. 2. Relative response of the GAOx/laponite (25:50; $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) biosensors for different substrates. Mean response of 5 injections of substrate at 20 μM . Other experimental conditions: HEPES pH 7.0; 50 mM, 25°.

Table 3. Amperometric performances of GAOx/laponite (25:50; $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) biosensor vs. other biosensors from the literature: galactose biosensing. **Abbreviations:** DL: detection limit determined for S/N ratio=3; ITO: Indium tin oxide; PEG: poly(ethylene glycol); PEP: poly(*N*-glycidylpyrrole-*co*-pyrrole); PEDOT: poly(3,4-ethylene-3,4-dioxythiophene); PGMA-VFc: poly (glycidyl methacrylate-*co*-vinylferrocene); PHEMA: poly(2-hydroxyethyl methacrylate); PMP: poly (4-methoxyphenol); PPy: polypyrrole; PPy-ammonium: polypyrrole-alkylammonium; PVFc: polyvinylferrocene; SWNT: single-walled carbon nanotubes. E_{app} : V/Ag/AgCl.

Matrix	Electrode	DL (μM)	Sensitivity ($\text{mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$)	LR (M)	Ref.
Laponite	Pt ($E_{\text{app}} = +0.6 \text{ V}$)	1.0	85	1.0×10^{-6} – 1.6×10^{-3}	This work
PPy/PEG	Pt ($E_{\text{app}} = +0.4 \text{ V}$)	–	0.106	0 – 2.4×10^{-2}	[24]
PPy-ammonium	Pt ($E_{\text{app}} = +0.5 \text{ V}$)	–	3.5–14.7	5.0×10^{-7} – 2×10^{-3}	[2]
PPy-PHEMA	Pt ($E_{\text{app}} = +0.7 \text{ V}$)	25	–	5.0×10^{-5} – 1.0×10^{-2}	[4]
PMP	Pt ($E_{\text{app}} = +0.6 \text{ V}$)	–	0.162	2.0×10^{-3} – 1.6×10^{-3}	[25]
PVFc	Pt ($E_{\text{app}} = +0.7 \text{ V}$)	–	~ 2 – 2.2 (25°C) ~ 3.7 (35°C)	1.0×10^{-3} – 4×10^{-2}	[26]
PEP	Au ($E_{\text{app}} = +0.7 \text{ V}$)	25	1.75	2.0×10^{-3} – 1.6×10^{-3}	[3]
PGMA-VFc	Pt ($E_{\text{app}} = +0.35 \text{ V}$)	100	0.023	2.0×10^{-3} – 2.0×10^{-2}	[27]
PEDOT	ITO ($E_{\text{app}} = +0.6 \text{ V}$)	10	6.4	0 – 1.0×10^{-3}	[28]
Chitosan	Prussian Blue	60	1.6	1×10^{-4} – 1×10^{-2}	[21]
Chitosan/SWNT	Glassy carbon ($E_{\text{app}} = -0.4 \text{ V/SCE}$)	25	16	-2×10^{-2}	[23]

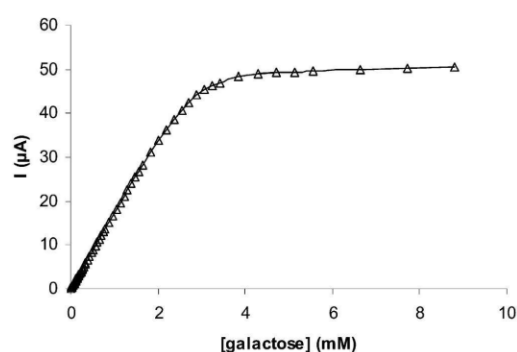


Fig. 3. Calibration curves for galactose recorded at the GAOx/laponite (25:50; $\mu\text{g}:\mu\text{g}$) electrode. Other experimental conditions: HEPES pH 7.0; 50 mM, 25° .

$1.6 \times 10^{-3} \text{ M}$. Moreover, the detection limit for galactose was as low as $1 \mu\text{M}$ and the response time is very fast (t_{95} around 5 s). The effect of an interferent, uric acid, on the steady-state amperometric current of the biosensor to galactose was also investigated (Figure 2). Its relative response is close to that of the different GAOx substrates studied. Indeed as previously reported for glucose oxidase/laponite biosensors, interfering species, such as uric acid, can be oxidized at the high polarizing voltage needed for H_2O_2 detection [20]. This drawback could be overcome, by using either an upper membrane layer of nafion [20] or with a mediated detection at lower applied potential using redox mediators [6,21,22]. We are currently testing this last solution replacing Pt electrode by an underlying Prussian blue modified electrode.

As depicted in Table 3, GAOx/laponite modified electrode reveals to be extremely sensitive in comparison to other GAOx biosensors described in the literature. It should be noted that the use of clay as immobilization matrix considerably improved the GAOx biosensor per-

formance compared to organic polymers. For instance, the limit of detection is hence 1 to 3 orders of magnitude lower than those reported in the literature for galactose biosensors based on the immobilization of GAOx in synthetic organic polymers (Table 3). The same feature was previously observed for glucose oxidase [8]. The best sensitivity was reported for a GAOx/chitosan/SWNT biomembrane [23], with a value of $16 \text{ mA M}^{-1} \text{cm}^{-2}$, which remains 5 times lower than that found in the present work.

4 Conclusions

This study is another example that illustrates the laponite clay provides an excellent biocompatible microenvironment for the immobilization of oxidases, such as GAOx. Presumably, both the high cation exchange capacity of laponite on the one hand, and the relative high isoelectric point of GAOx on the other hand may have contributed to an efficient enzyme immobilization. Hence, the laponite modified GAOx electrode revealed a very useful and efficient amperometric biosensor for the determination of galactose and dihydroxyacetone. Besides being highly sensitive and reproducible, it is also easily prepared, and keeps a good catalytic activity over one month after preparation. It is expected that the attractive potentialities offered by GAOx/laponite biomembrane will be exploited for the development of coupled multienzymatic biosensors.

References

- [1] S. Shleev, J. Tkac, A. Christenson, T. Ruzgas, A. I. Yaropolov, J. W. Whittaker, L. Gorton, *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2517.
- [2] L. Coche-Guerente, S. Cosnier, C. Innocent, P. Mailley, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *311*, 23.

- [3] M. Senel, I. Bozgeyik, E. Cevik, M. F. Abasiyanik, *Synth. Met.* **2011**, *161*, 440.
- [4] S. I. Brahim, D. Maharajh, D. Narinesingh, A. Guiseppi-Elie, *Anal. Lett.* **2002**, *35*, 797.
- [5] S. Cosnier, *Anal. Lett.* **2007**, *40*, 1260.
- [6] C. Mousty, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 315.
- [7] V. B. Kandimalla, V. S. Tripathi, H. Ju, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2006**, *36*, 73.
- [8] S. Cosnier, C. Mousty, C. Gondran, A. Lepellec, *Mater. Sci. Eng.* **2006**, *26*, 442.
- [9] D. Shan, S. Cosnier, C. Mousty, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3872.
- [10] V. Paz Zanini, B. López de Mishima, P. Labbé, V. Solís, *Electroanalysis* **2010**, *22*, 946.
- [11] D. Shan, Y. Wang, M. Zhu, H. Xue, S. Cosnier, C. Wang, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1171.
- [12] D. Shan, Y.-N. Wang, H. Xue, S. Cosnier, S.-N. Ding, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 3556.
- [13] J. L. Besombes, S. Cosnier, P. Labbe, G. Reverdy, *Anal. Chim. Acta* **1995**, *317*, 275.
- [14] A. De Roy, C. Forano, J. P. Besse, in *Layered Double Hydroxides: Synthesis and Postsynthesis Modification* (Ed: V. Rives), Nova Sciences, New York **2006**, p. 1.
- [15] E. E. Szabo, N. Adanyi, M. Varadi, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 1051.
- [16] D. Schumacher, J. Vogel, U. Lerche, *Biosens. Bioelectron.* **1994**, *9*, 85.
- [17] J. Tkáč, M. Navrátil, E. Šturdík, P. Gemeiner, *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 383.
- [18] L. Kondakova, V. Yanishpolskii, V. Tertykh, T. Y. Buglova, *Anal. Sci.* **2007**, *23*, 97.
- [19] E. E. Szabo, N. Adanyi, M. Varadi, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 1051.
- [20] S. Poyard, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, S. Cosnier, P. Labbé, *Anal. Chim. Acta* **1998**, *364*, 165.
- [21] Y. T. Wang, J. Z. Zhu, R. J. Zhu, Z. Q. Zhu, Z. S. Lai, Z. Y. Chen, *Measure. Sci. Technol.* **2003**, *14*, 831.
- [22] K. Charradi, C. Gondran, A. B. H. Amara, V. Prevot, C. Mousty, *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 4237.
- [23] J. Tkac, J. W. Whittaker, T. Ruzgas, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1820.
- [24] W. J. Sung, Y. H. Bae, *Sens. Actuators B* **2006**, *114*, 164.
- [25] E. Ekinici, A. Paşahan, *Eur. Polym. J.* **2004**, *40*, 1605.
- [26] H. Gulce, I. Ataman, A. Gulce, A. Yildiz, *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30*, 41.
- [27] E. Çevik, M. Senel, M. F. Abasiyanik, *Curr. Appl. Phys.* **2010**, *10*, 1313.
- [28] K. N. Lee, Y. Lee, Y. Son, *Electroanalysis* **2011**, *23*, 2125.



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Optimized immobilization of transketolase from *E. coli* in MgAl-layered double hydroxides



Nadia Tousni, Franck Charmantray, Virgil Helaine, Claude Forano, Laurence Hecquet*, Christine Mousty*

Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, ICCF UMR-CNRS 6296, F-63000 Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2013

Accepted 8 July 2013

Available online 19 July 2013

Keywords:

Layered double hydroxides

Transketolase from *E. coli*

Enzyme immobilization

Biohybrids

ABSTRACT

Immobilization of TK from *Escherichia coli* (TKec) on MgAl-NO₃ layered double hydroxides (LDH) was carried out by two processes: adsorption and coprecipitation. As a comparison, the adsorption method was realized either at pH 7.5 in buffered solutions (MOPS and Gly-Gly) or in pure water. For the coprecipitation method, the formation of the inorganic LDH support was realized directly in the presence of TKec solubilized in Gly-Gly. The prepared biohybrids, called respectively TKec@LDH_{ads} and TKec@LDH_{cop}, were characterized by powder X-ray diffraction, FTIR spectroscopy in comparison with TKec free reference products, i.e. MgAl-NO₃, MgAl-Gly-Gly. The enzymatic activities of the various TKec@LDH biohybrids as well as their stabilities over time were investigated by UV–vis assay. A maximum of activity (12 U/mg of solid) was reached for TKec@MgAl-Gly-Gly biohybrid prepared by coprecipitation. Finally, thin films were prepared through a one-step deposition on a polished support. The enzymatic activity of the resulting TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} film was tested over four recycling processes with a reproducible activity of 2.7 U/mg cm².

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Biomolecules immobilization, i.e enzymes or proteins, is a crucial step for biotechnological approaches such as biosensor and biocatalyst developments. Many processes have been described to achieve immobilization of enzymes onto or within a suitable support, each of them presenting their own advantages and drawbacks. The requirements include high density of biomolecules, high activity, long term stability, and good substrate accessibility. The most appropriate process depends strongly on the nature of both the support and the considered enzyme. Typical methods to immobilize enzymes onto organic polymers or inorganic materials are physical adsorption, covalent bonding, entrapment or microencapsulation.

In our laboratory, we are interested in the immobilization of transketolase (TK EC 2.2.1.1) for biocatalysis applications and for biosensor development as well. In cell metabolism, transketolase (TK) is the most critical enzyme of the non-oxidative branch of the pentose phosphate pathway (PPP). *In vivo*, TK catalyses the interconversion of sugars by transferring a two-carbon ketol unit from a ketose donor substrate to an aldose acceptor substrate using thiamine pyrophosphate (ThDP) and Mg²⁺ as cofactors. TK leads in particular to the biosynthesis of D-ribose-5-phosphate (D-R-5-P) required for nucleic acid synthesis. Besides, numerous studies have proposed human TK as an investigation, prevention and therapy tool for cancer [1,2], neurodegenerative diseases (Alzheimer) [3] and diabetes [3,4]. In this

context, we developed a concept of *in vitro* TK activity profiling using a tyrosinase biosensor [5].

TK is also a prominent biocatalyst in stereospecific carbon–carbon synthesis with potential industrial application of pharmaceuticals, agrochemicals and fine chemicals [6–11]. For synthetic applications, yeast [12], *Escherichia coli* [13], or *Geobacillus stearothermophilus* [14] TK-catalyzed reactions become irreversible using hydroxypyruvate as donor which is decarboxylated leading to the release of carbon dioxide.

In 1978, immobilization of TK from baker's yeast was reported for the first time using a covalent bonding to sepharose [15]. Then transketolase has also been immobilized by covalent bonding on commercial resin beads, namely Eupergit-C a epoxyactivated polymethylacrylamide support, Amberlite XAD-7 an acrylic resin which was activated by glutaraldehyde [16,17] and nylon using 1,3-dicyclohexylcarbodiimide as cross-linker agent [18]. More recently, variants of the wild type TK engineered with a his₆-tag were reversibly immobilized *via* Ni-NTA linkage to surface-derivatized in a fused-silica capillary [19,20]. Transketolase was also immobilized by encapsulation in cross-linked polyacrylamide gels, as described in 1986 by Reimer et al. [21]. Recently, we investigated the efficiency of inorganic materials, i.e. layered double hydroxides (LDH), as a suitable support for the immobilization of TK from *Saccharomyces cerevisiae* [22]. Indeed, thanks to LDH intrinsic properties such as adsorption behavior, anionic exchange capacities and good biocompatibility, many processes starting from pristine LDH precursors have already been described to access to enzyme-LDH biohybrids [23,24]. LDH are synthetic materials with positively

* Corresponding authors. Tel.: +33 473407598.

E-mail addresses: Laurence.Hecquet@univ-bpclermont.fr (L. Hecquet), Christine.Mousty@univ-bpclermont.fr (C. Mousty).

charged brucite-like layers of mixed metal hydroxides with a general formula $[M_{1-x}^{2+}M_x^{3+}(\text{OH})_2]^{x+}[(A^{n-})_{x/m}y\text{H}_2\text{O}]$ (abbreviated as $M^{2+}_{(1-x)/x}M^{3+}_x-A$). The nature of metal cations in the LDH layers changes the physical properties of the material, for instance their specific buffering properties due to their surface basicity or their charge density. It should be noted that intercalated anions do not influence the acid–base properties of the LDH but they may modify their exchange properties or the morphology of the LDH platelets, and consequently induce different adsorption properties.

In this study, TK immobilization was optimized with regard to source and TK purity, immobilization process and buffer nature. Different microbial TK are available in our laboratory. TK from *S. cerevisiae* was obtained as a crude extract from a recombinant strain in which TK was overexpressed, its specific activity was quite low (4.5 U/mg protein). Hence the specific activity of TK@LDH biohybrid was only 1.2 U/mg biohybrid [22]. Purified TK from *E. coli* (TKec) was chosen because of higher specific activity (about 35 U/mg protein). Concerning LDH, MgAl-LDH appears to favor interaction with proteins [25]. MgAl-NO₃ LDH was therefore chosen for this study because of its high tendency to disperse in water and to display, consequently, high surface properties. Immobilization processes were carried out through adsorption and coprecipitation, in buffered solutions. The as-prepared biohybrids were characterized by powder X-ray diffraction, FTIR spectroscopy. The enzymatic activities and the stabilities over time of the different TKec@LDH biohybrids prepared were investigated by UV–vis assays.

2. Experimental

2.1. Products

Bradford reagent was obtained from Bio-Rad and Ni-NTA resin from Qiagen. Buffer components, 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) and glycyl-glycine (Gly-Gly), were purchased from Sigma. Other chemicals enzymes and protein (bovine serum albumin, BSA) were purchased from Aldrich or Acros with a reagent grade and were used without further purification. All solutions were prepared in deionized distilled water.

2.2. Instrumentation

Powder X-ray diffraction patterns were recorded on a Philips X-Pert Pro diffractometer equipped with a graphite monochromator using Cu K α radiation ($\lambda = 0.15415$ nm). Patterns were recorded over 2.0–70.0 2θ range in steps of 0.033° with a counting time per step of 200 s. Thermal analysis were recorded Setaram Instrumentation SETSYS Evolution TGA. Infrared spectra (FTIR) were recorded in transmission mode using the KBr pellet technique with a Nicolet 5700 spectrometer from Thermo Scientific. UV–vis absorbance was measured using an Evolution 500 UV–visible spectrophotometer (Nicolet). Scanning electron micrographs (SEM) were recorded on a Zeiss supra 55-VP microscope working at electron energy of 1.0 kV. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) was performed using the same apparatus with an acceleration voltage of 15 kV and Cu as a calibration standard. Zeta potentials were measured with a Zetasizer nanoZS Malvern instrument. Elemental compositions of LDH were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) with a HORIBA Jobin Yvon ULTIMA C spectrometer. LDH samples were solubilized using concentrated nitric acid and the solutions were diluted to be in a 0–100 ppm analysis range for each cation.

2.3. Procedures

2.3.1. Transketolase production

N-terminal His₆-tagged *E. coli* transketolase A (tktA gene) was expressed from *E. coli* BL21 (DE3) PET21 recombinant strain. Extraction of transketolase (TKec) was conducted from cell pellets obtained after centrifugation. Cell paste was resuspended in lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄ and 10 mM imidazole, pH 8) and cell lysis was performed by ultrasonication at 4 °C, under stirring. TKec was purified from the cell-free extract using a Ni-NTA resin. TKec was eluted by 250 mM imidazole, and then ultrafiltrated for buffer exchange with 100 mM Gly-Gly buffer, pH 7.5, to obtain TKec on its apoenzyme form (apo-TKec), at 4 °C. Purified apo-TKec was then stored at –18 °C in solution.

2.3.2. Synthesis of pristine LDH

Layered double hydroxides, Mg₂Al(OH)₆NO₃·nH₂O (MgAl-NO₃), was prepared by the coprecipitation method following the procedure already published [26]. Typically, a mixed aqueous solution of Mg(NO₃)₂·6H₂O and Al(NO₃)₃·9H₂O, with a Mg²⁺/Al³⁺ molar ratio $r = 2$, and a total 1 M concentration of metallic cations, was introduced with a constant flow into a reactor. The pH was maintained at a value of 9.0 during all coprecipitation by the simultaneous addition of a 2 M NaOH solution. The suspension was aged under stirring for 24 h at room temperature. The final product was centrifuged and washed several times with deionized water and finally dried in air at room temperature for physical characterization. All experiments were carried out under a stream of N₂ to avoid any contamination by atmospheric CO₂.

2.3.3. Synthesis of TK@LDH biohybrids

Adsorption of TKec on MgAl-NO₃ was carried out by mixing the enzyme and LDH suspensions. LDH suspension (10 mg mL⁻¹) was prepared either in pure water or 50 mM MOPS or 100 mM Gly-Gly buffer solutions at pH 7.5 and left under stirring overnight. Solutions (1 mL) containing 4 mg of LDH suspension and various amounts of TKec were left under stirring at 5 °C for 3 h. TKec/LDH ratio (weight/weight) were fixed at $Q_{th} = 0.2, 0.4, 0.6, 0.8$ and 1.0. The suspensions thus obtained were centrifuged at 10,000 rpm for 20 min and washed three times with buffer. The as-prepared phases are labeled TKec@MgAl-LDH_{ads}. The amount of adsorbed protein and, consequently the resulting TKec/LDH ratio (Q_{ex}), was calculated as a difference between the initial TKec amount in solution and in the supernatant. This latter was determined using Bradford assay (*vide infra*).

The adsorption isotherms can be obtained by plotting the amount of adsorbed TKec (C_s , w/w) vs. the equilibrium concentration in the solution (C_e , mg mL⁻¹) where

$$C_s = \frac{(C_i - C_e)V}{m}$$

with C_i and C_e (mg mL⁻¹) the initial and the equilibrium TKec concentrations in solution and in supernatant, respectively; V (mL) represents the volume of the suspensions; and m (mg) is the weight of the adsorbent.

TKec@LDH_{cop} biohybrids were also prepared by the coprecipitation route as described before in the presence of TKec by adapting the method for small quantities of materials. A mixed aqueous solution of Mg(NO₃)₂·6H₂O and Al(NO₃)₃·9H₂O (Mg²⁺:Al³⁺ molar ratio $r = 2$ and 4) and 0.1 M total molar concentration of metallic cations was added at a constant flow rate of 0.015 mL min⁻¹ to 10 mL of 0.1 or 0.025 M Gly-Gly buffer (pH 9.0) solution containing 4–20 mg of TKec. The TKec/LDH amount (w/w) was fixed at $Q_{th} = 0.2, 0.5$ and 1 for a theoretical amount (30 mg) of coprecipitated biohybrid. The pH of the solution was kept constant at 9.0 during the coprecipitation by the simultaneous addition of a 0.1 M NaOH solution. The reaction was left under stirring on ice bath for 3 h and under N₂ pressure to avoid any

possible contamination by atmospheric CO₂. The as-prepared material was recovered by centrifugation. This biohybrid phase was labeled TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop}. In this case, the immobilization yield was also determined by Bradford assay. A reference product MgAl-Gly-Gly_{cop} was prepared under the same conditions but without enzyme in the buffer solution (0.1 M Gly-Gly). These as-prepared biohybrids were stored at 4 °C in buffer solutions (5 mg mL⁻¹) over a period of one month, and the residual activity was determined weekly by UV spectroscopy (*vide infra*).

2.3.4. Biohybrid coating on solid support

Thin films of 100 μg TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} were prepared on a disk of glassy carbon ($\phi = 0.5$ cm, $A = 0.196$ cm²). Before use, the carbon surface was polished with alumina slurry (0.05 μm), cleaned in an ultrasonic bath in water and ethanol mixture (50:50) and rinsed with water. The film was prepared by dropping 20 μL of a suspension of biohybrid (5 mg mL⁻¹) on the carbon surface and the coating was dried at room temperature for 2 h and a half. Afterwards, the films were incubated in buffer solution for 15 min to rehydrate the biofilm. Enzyme leaching into this swelling solution was determined by Bradford assay and the activity of the immobilized enzyme was determined by UV spectroscopy as described below.

2.3.5. Protein assays

Protein concentration was determined using Bradford assay [27]. Aliquots of TKec extracts (25 μL) were added to the Bradford reagent (225 μL) and incubated in the dark for 10 min at 25 °C. The concentration of protein in the samples was determined using a standard curve using BSA at concentrations ranging from 10 to 100 μg mL⁻¹. Absorbance was measured at 590 nm and 450 nm and the ratio of both values varied linearly with protein concentration. The protein concentration in the samples was expressed in mg mL⁻¹.

2.3.6. Enzymatic activity

Enzymatic activity of free TKec, was determined by a spectrophotometric assay at 340 nm in Gly-Gly buffer (100 mM, pH 7.5, 800 μL) with thiamine pyrophosphate (ThDP) (106 μM, 10 mg mL⁻¹, 5 μL) and MgCl₂ (493 μM, 10 mg mL⁻¹, 10 μL) using L-erythrulose (85 mM, 120 mg mL⁻¹, 100 μL) as donor substrate and D-ribose-5-phosphate (D-R-5-P) (8.9 mM, 50 mg mL⁻¹, 50 μL) as acceptor substrate leading to D-sedoheptulose-7-phosphate (D-S-7-P) and glycolaldehyde (GA) as the products [28]. The GA formed was reduced by yeast alcohol dehydrogenase (25 units) to glycol in the presence of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (282 μM, 10 mg mL⁻¹, 10 μL, value $\epsilon_{340} = 6220$ M⁻¹ cm⁻¹). The TK activity was obtained by following the formation of glycolaldehyde (GA) spectrophotometrically at 340 nm via consumption of NADH in the coupled enzymatic reaction with yeast alcohol dehydrogenase. The TK activity was defined as the rate of formation GA and expressed in U mL⁻¹ (μmol min⁻¹ mL⁻¹). Specific activity was expressed as units of enzyme activity per mg of protein: U mg⁻¹ (μmol min⁻¹ mg⁻¹).

Enzymatic activity of immobilized TKec in biohybrids was also determined by spectrophotometry at 340 nm. Colloidal suspensions in 100 mM Gly-Gly of the as-prepared biohybrids (6–7 μg) were mixed in 100 mM Gly-Gly in a UV-vis cuvette (3 mL) with the others components and maintained under stirring during the UV-vis measurement. The enzymatic activity of biohybrids was compared to that obtained for the same amount of free TKec. Finally, the enzymatic activity of TKec immobilized in a thin film was determined by the same procedure as described for the TKec-LDH biohybrids. In this case the solid support was directly immersed into a 3 mL cell containing the reaction assay mixture, under stirring.

3. Results and discussion

3.1. Preparation of TKec@LDH biohybrids

Immobilization of TKec on Mg₂Al-NO₃ LDH matrix was carried out by two processes: adsorption and coprecipitation. The as-prepared biohybrids are called TK@LDH_{ads} and TK@LDH_{cop}, respectively. The initial M^{II}:M^{III} ratio was fixed at 2 in order to have the highest charge density of the layers, the exchange capacity being 3.6 mequiv./g for Mg₂Al-NO₃.

3.1.1. Adsorption

Considering the isoelectric point of TKec (IP = 6.3) [29], electrostatic interactions with the positively charged layers of LDH should be favorable at the optimum pH value of this enzyme (7.5). Indeed at this pH, the enzyme displays an overall negative charge. The adsorption process was therefore realized at pH 7.5 in buffered solutions (MOPS or Gly-Gly) and also in pure water as a comparison. Zeta potentials of TKec are -25, -16 and -6 mV in water, 0.050 M MOPS and 0.100 M Gly-Gly, respectively; whereas Mg₂Al-NO₃ shows higher zeta potentials, +35 mV in water and +25 mV in similar buffered solutions (pH 7.5). This latter value was not dependent on the buffer nature but rather on the pH values. These opposite charge values confirm the possibility to have Coulombic attractions between the enzyme and the LDH layers.

To determine the adsorption capacities of Mg₂Al-NO₃ LDH, the adsorption isotherms were established using LDH suspensions (4 mg mL⁻¹), the ratio TKec:LDH (Q_{th}) varying from 0.2 to 1. The amount of immobilized protein (Q_{ex}) was quantified using Bradford assay in the supernatant. As shown in Fig. 1A, the adsorption medium has a drastic effect on the adsorption yields (Q_{ex}/Q_{th} , %). The adsorption was systematically lower in water than in buffer solutions. In MOPS, a maximum immobilization capacity (100%) was only obtained at $Q_{th} = 0.2$, whereas in Gly-Gly, 100% of adsorption was yielded over a wide TKec concentration range $Q_{ex} \leq 0.8$. Under this latter buffer condition, the zeta potential of the TKec@MgAl-LDH_{ads} ($Q_{th} = 0.6$) biohybrid LDH was -4 mV a value very close to that measured for free TKec (-6 mV). These similarities evidence a full coverage of the LDH nanoplatelets by TKec.

The adsorption isotherm of TKec by Mg₂Al-NO₃ in 100 mM Glygly buffer (Fig. 1B) displays a L-type shape according to Giles' classification [30], typical of a high affinity between adsorbate and adsorbant, i.e. TKec and the MgAl-LDH platelet surface. The surface saturation is reached at very low equilibrium concentration (0.06 mg/mL) due to the strong electrostatic interactions between both partners as discussed above. Adsorption capacity can be estimated from the graph to be 1 mg of TKec per mg of MgAl-NO₃. After the full coverage of LDH surface ($C_e > 0.1$ mg/mL), an additional TKec adsorption of about 20% of the adsorption capacity is observed. This excess probably accounts for a multilayering of TKec. Surprisingly, in H₂O or 50 mM MOPS buffer, the behavior of Mg₂Al-NO₃ toward TKec adsorption is very different. Indeed, it displays a S-shape which accounts for a cooperative adsorption mechanism, the first adsorbed protein enhance adsorption of the subsequent ones. The surface saturation by TKec was not reached in the working conditions. Obviously, Gly-Gly molecules favor the adsorption of TKec onto the hydroxylated surface.

3.1.2. Coprecipitation

Since the interaction between TKec and MgAl-NO₃ appears to be particularly favorable, the immobilization of TKec was also realized by the *in situ* coprecipitation route in order to increase the amount of enzyme embedded in the LDH matrix. With this method, optimized in our laboratory for different enzymes [31–34], the formation of the inorganic LDH support is realized directly in the presence of TKec solubilized in Gly-Gly. Indeed, this "Soft Chemistry" route requiring mild conditions is a very tunable process for the immobilization of

Table 1
Chemical compositions of LDH biohybrids determined by ICP-AES.

Material (Mg:Al theor ratio)	Preparation method	[Gly-Gly] (mM)	Mg:Al exp ratio
MgAl-NO ₃ (2:1)	Coprecipitation	0	2.0
MgAl-Gly-Gly (2:1) pH 7.5	Exchange	100	1.5
MgAl-Gly-Gly (2:1) pH 9.0	Exchange	100	1.8
MgAl-Gly-Gly _{cop} (2:1)	Coprecipitation	100	0.72
TK@MgAl-Gly-Gly _{ads} (2:1)	Adsorption	100	1.3
TK@MgAl-Gly-Gly _{cop} (2:1)	Coprecipitation	100	0.27
		25	0.45
TK@MgAl-Gly-Gly _{cop} (4:1)		25	1.78

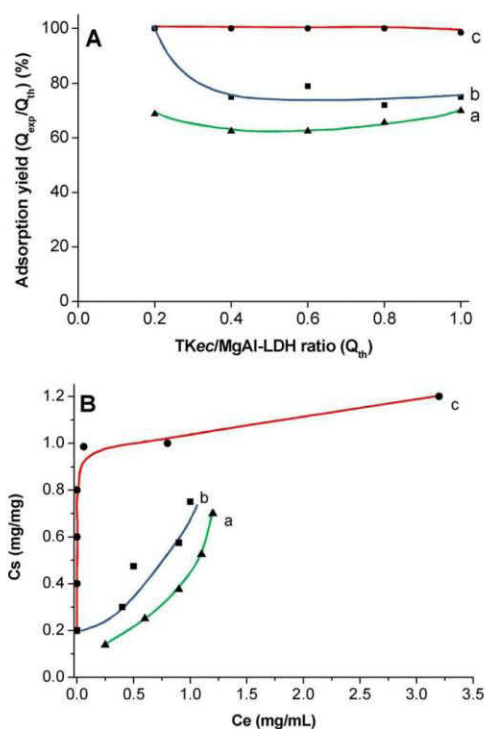


Fig. 1. (A) Adsorption yield (Q_{ex}/Q_{th}) as a function of TKec:LDH ratio (Q_{th}) and (B) adsorption isotherms of TKec on Mg₂Al-NO₃ in H₂O (a), 50 mM MOPS (b), and 100 mM Gly-Gly (c).

enzymes. Since the experimental conditions (pH, temperature, buffer, solvent, and reagents concentrations) can be modulated, this method of synthesis generally allows achieving a high immobilization yield, a homogeneous dispersion of the enzyme within the solid phase and a high catalytic activity.

TK@MgAl-LDH_{cop} biohybrid was prepared by the coprecipitation method at pH = 9.0 for different TKec/LDH ratio (Q_{th} = 0.2, 0.5 and 1, w/w). As TKec was introduced in this basic medium, we previously checked that TKec was not denatured at this high pH value. Indeed 100% of enzymatic activity was recovered after storing this enzyme at pH 9.0 for 3 h, time required to perform the synthesis. The acid-base constants are $PK_1 = 3.14$ and $pK_2 = 8.25$ for Gly-Gly [35]. Therefore it exists as amphoteric ions ($H_2NCH_2C(=O)NH^+CH_2COO^-$) form in the pH range 8–9. Two buffer concentrations were tested (0.1 and 0.025 M Gly-Gly). In all cases, 100% of the protein was embedded

within the inorganic framework.

3.2. Physical characterization of TKec@LDH biohybrids

TK@LDH biohybrids were characterized in comparison with reference products, namely MgAl-NO₃, MgAl-MOPS, MgAl-Gly-Gly. Indeed, since the buffers (MOPS and Gly-Gly) used in these experiments were mainly in their anionic form and may be intercalated in the LDH structure, preparation of LDH-buffers (MgAl-MOPS and MgAl-Gly-Gly) were performed either by anion exchange reaction or coprecipitation. These reference materials added to MgAl-NO₃ LDH were fully characterized.

3.2.1. LDH-buffers

Typical PXRD patterns of MgAl-NO₃ LDH materials display three distinct regions: (i) the low angle region ($2\theta < 30^\circ$) containing the basal reflections $0\ 0\ l$ in which positions depend on the size of the intercalated anion; (ii) the mid- 2θ region ($30^\circ < 2\theta < 50^\circ$) containing the $h\ 0\ l$ and $0\ k\ l$ reflections which positions are strongly affected by structural disorders and (iii) the high angle region ($2\theta > 60^\circ$) containing the $h\ k\ 0$ and $h\ k\ l$ reflections characteristic of the ordering inside the metal hydroxide layers (Fig. 2A). Since our samples were prepared by sedimentation of LDH suspensions on a glass slide, a preferential orientation of the LDH platelets parallel to the support may produce a decrease of the $h\ k\ 0$ and $h\ k\ l$ lines intensity. The averaged interlamellar distance ($d = 8.7\ \text{\AA}$) is consistent with the presence of nitrate intercalated anion [26]. As shown in the FTIR spectra, NO₃⁻ gives a very strong adsorption peak at $1384\ \text{cm}^{-1}$ (Fig. 2B).

When MgAl-NO₃ was stirred overnight in MOPS solution in air saturated atmosphere, one can notice on the XRD pattern of the recovered solid a broadening of the $0\ 0\ l$ peaks associated to a shift toward higher 2θ angle compared to the pristine LDH (Fig. 2). The corresponding decrease of the interlamellar distance d from $8.7\ \text{\AA}$ to $7.7\ \text{\AA}$ for the MgAl-MOPS phase is consistent with an exchange reaction of nitrate by carbonate anions in the interlamellar domain. Surprisingly, the sulfonate anion ($O(CH_2-CH_2)_2N(CH_2)_3-SO_3^-$) was not intercalated in between the LDH layers. Moreover, the presence of small peaks situated at 1200 , 1040 and $680\ \text{cm}^{-1}$ on the FTIR spectra suggests that adsorption of MOPS molecules only occurs at the LDH platelets (Fig. 2B).

When MgAl-NO₃ was stirred in Gly-Gly buffer at pH 7.5 or 9, a splitting of $0\ 0\ l$ peaks could be observed on XRD patterns of the resulting solids, suggesting a progressive exchange of nitrate anions by carbonate (Fig. 3A). This exchange reaction becomes more efficient when the pH increases. Under the coprecipitation conditions, the PXRD pattern of MgAl-Gly-Gly_{cop} shows diffraction peaks ($0\ 0\ l$) corresponding to a carbonated phase ($d = 7.5\ \text{\AA}$). Contamination by carbonate may occur during the washing steps because the high pH value of the solution (pH 9) allows easy atmospheric CO₂ adsorption. However a small additional peak at 8.3° suggests the presence of another phase corresponding to a d spacing of $10.6\ \text{\AA}$, which can be related to the possible intercalation of some Gly-Gly zwitterions (Fig. 3A). The coprecipitation of glycine (Gly) and Gly-Gly with ZnAl and

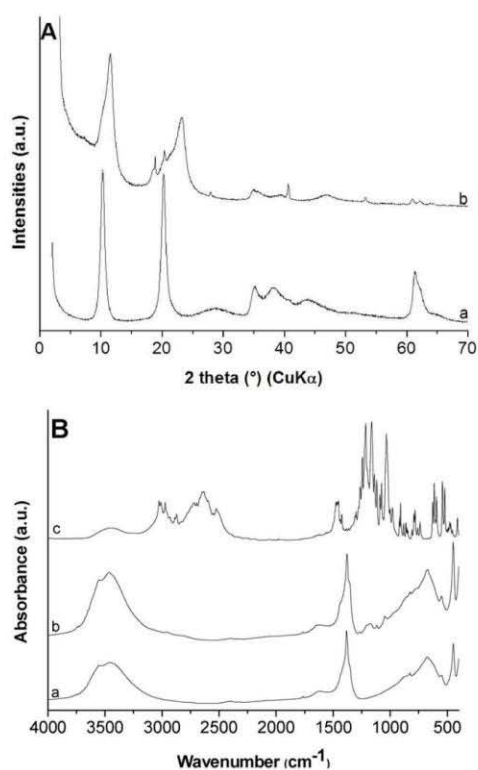


Fig. 2. (A) X-ray diffraction patterns of Mg₂Al-NO₃ (a) and MgAl-MOPS (b). (B) FTIR spectra of Mg₂Al-NO₃ (a), MgAl-MOPS (b) and MOPS (c).

MgAl LDH was already reported in the literature [36,37]. The corresponding XRD patterns and FTIR spectra suggest the co-intercalation of nitrate or carbonate with around 15% of peptide molecules. According to the basal spacing of the Gly and Gly-Gly-LDH phases, ($d_{003} = 8.1-8.8 \text{ \AA}$), these guest molecules were oriented horizontal to the LDH layers. The greater basal spacing observed for MgAl-Gly-Gly_{cop} may account for a higher degree of disorder in between the LDH plane under the coprecipitation conditions.

FTIR spectra, in the 2000–400 cm⁻¹ wavenumber range, of Mg₂Al-NO₃ and Mg₂Al-NO₃ stirred overnight in Gly-Gly pH 9.0 or 7.5 (noted MgAl-Gly-Gly_{ex}) and the coprecipitated phase MgAl-Gly-Gly_{cop} are compared with Gly-Gly spectra in Fig. 3B. The presence of Gly-Gly molecules in these LDH phases is confirmed by additional bands at 2900 cm⁻¹ (ν_s CH₂, data not shown) and between 1600 and 1300 cm⁻¹. The peaks at 1400 cm⁻¹ and 1600 cm⁻¹ can be attributed to carboxylate CO₂⁻ (ν_s and ν_a) [38], although carbonate contamination (1365 cm⁻¹) appears in the same region [36,38]. On the other hand for the MgAl-Gly-Gly phases, the sharp peak corresponding to the ν NO band (1384 cm⁻¹) of nitrate anions decreases progressively as the pH increases. The systematic replacement of intercalated anions (nitrate and chloride) by carbonate and/or Gly-Gly explains why we did not observe any difference for the adsorption of TKec on MgAl-LDH whatever the intercalated anion (data not shown). Moreover for both types of MgAl-Gly-Gly samples, δ MOH (675 cm⁻¹) and δ OMO (447 cm⁻¹) vibration bands are strongly enlarged, probably due to the loss of structural cohesion of the layer stacking and rigidity of the layers in the presence of dipeptide molecules. This data confirms the

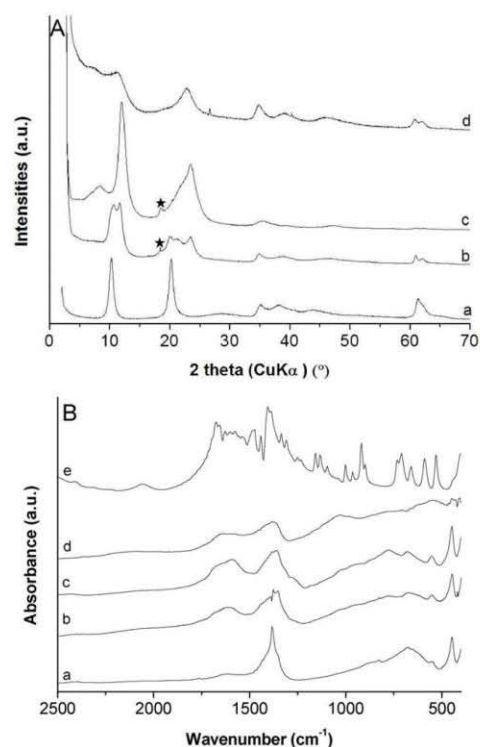


Fig. 3. (A) X-ray diffraction patterns of Mg₂Al-NO₃ (a), MgAl-Gly-Gly pH 7.5 (b), MgAl-Gly-Gly pH 9.0 (c) and MgAl-Gly-Gly_{cop} (d), (* by-product). (B) FTIR spectra of Mg₂Al-NO₃ (a), MgAl-Gly-Gly pH 7.5 (b), MgAl-Gly-Gly pH 9.0 (c), MgAl-Gly-Gly_{cop} (d), and Gly-Gly (e).

effect of Gly-Gly on the amorphization of the LDH layered structure.

ICP-AES chemical analysis gives an experimental Mg:Al ratio for the pristine material Mg₂Al-NO₃ equals to the theoretical value (2.0). For MgAl-Gly-Gly_{cop} sample, there is a discrepancy between initial and experimental Mg:Al ratio (Table 1). Hibino and Jones underlined also that Mg:Al ratios for the precipitated MgAl-Gly are lower than in the initial solutions [37]. It should be noted that in this case, the molar amount of glycine in solution was twice higher than that of the nitrate. In our experimental conditions, this ratio was 14 when MgAl-Gly-Gly_{cop} was coprecipitated in 0.1 M Gly-Gly due to necessary buffering conditions with TKec. It is known that peptides and, in particular glycylglycine dipeptide, can be effective ligands for a variety of metal ions such as Zn²⁺ and Mg²⁺ [39,40]. This complexation reaction may probably be favored by the high concentration of Gly-Gly in the reaction medium leading to a decrease in the co-precipitation yield of the MgAl-LDH phases. The same hypothesis was recently proposed Iyi et al. when delaminated MgAl-ClO₄ phase were formed in concentrated aqueous solution of zwitterionic compounds, namely 1 M Gly-Gly [41]. In both cases, DRX patterns showed an extra reflection at 18.5° (Fig. 3A). This peak becomes more noticeable with aged suspensions. Consequently the decrease of Mg:Al ratio promotes the formation of enriched Al oxide hydroxide by-product. This hypothesis is confirmed by vibrational spectroscopies. Indeed the presence in the FTIR spectra of a peak at 1070 cm⁻¹ may be assigned to the bending of Al-OH (Fig. 3B) [42].

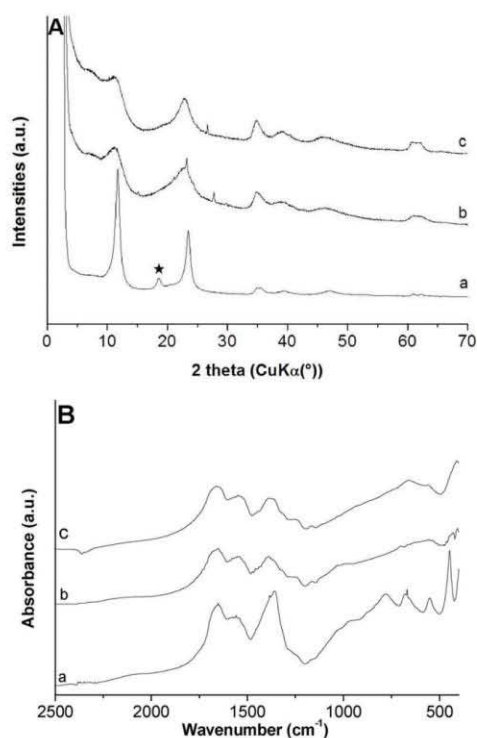


Fig. 4. (A) X-ray diffraction patterns of TKec@MgAl-Gly-Gly_{ads} pH 7.5 (a), TKec@Mg₄Al-Gly-Gly_{cop} (b) and TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} (c). (B) FTIR spectra of TKec@MgAl-Gly-Gly_{ads} pH 7.5 (a), TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} (Mg:Al = 2) (b) and TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} (Mg:Al = 4) (c).

3.2.2. TK@LDH biohybrids

PXRD patterns of TKec@MgAl-Gly-Gly_{ads} and TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} are shown in Fig. 4. With enlarged diffraction lines, coprecipitated phases seem to be more disordered than the adsorbed one. However, in all cases the PXRD patterns of TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} display characteristic diffraction peaks confirming the formation of a LDH lamellar structure by the *in situ* coprecipitation method (Fig. 4). As with Gly-Gly, the presence of TKec promotes an amorphization of coprecipitated phases. Indeed as previously observed with many other enzymes immobilized in LDH biohybrids [31–33], both a decrease of the (0 0 l) diffraction line intensities and an enlargement of the diffraction lines confirm a reduction of the particle size according to the Laue-Scherrer law along with a greater disorder of the structure with a net turbostratic effect. Moreover, considering the size of TKec (9 nm) [43], no intercalation of enzymes occurs between the LDH layers, since the d spacing remains the same than that obtained for the MgAl-Gly-Gly_{cop} phase. In the present cases, the presence of Gly-Gly and TKec in the coprecipitation medium was also responsible of the side reaction that subsequently hinders the LDH formation. Indeed, the experimental Mg:Al ratio remains below the theoretical value but this effect can be limited using a lower Gly-Gly concentration (0.025 M) or by increasing the Mg:Al ratio to 4 in the initial solution (Table 1).

FTIR spectra of TKec based biohybrids display vibration bands of both TKec and LDH frameworks in the 1800–1200 cm⁻¹ and 1200–400 cm⁻¹ domains respectively. The FTIR feature of the encapsulated

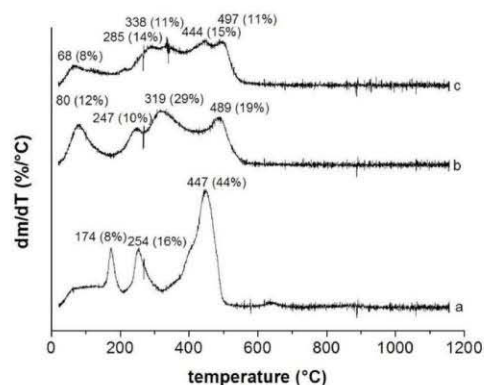


Fig. 5. Differential thermal gravimetry analysis (DTG) of (a) MgAl-Gly-Gly_{cop}, (b) TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} (Mg:Al = 2), (c) TKec@MgAl-Gly-Gly_{ads} pH 7.5.

TKec enzyme is characteristic of the amide I (ν_{C=O}) and amide II (ν_{N-H} and ν_{N-C}) bands. The lattice vibrations bands are very similar to that obtained for MgAl-Gly-Gly_{cop} (Fig. 4B), however the vibration band at 1070 cm⁻¹ attributed to Al-OH diminishes as Mg:Al ratio in the initial concentration increases. Even though a Al enriched-subphase is present in the samples, we have verified that TKec is not adsorbed on Al(OH)₃.

Thermogravimetric analysis gives information about the mechanism of decomposition of the hybrid and biohybrid LDH materials. It evidences clearly the different TKec-LDH interactions between the adsorbed and coprecipitated materials. All materials undergo a multi-step decomposition following the successive thermal events: (1) dehydration, (2) dehydroxylation, (3) organic molecule combustion (Fig. 5). Clearly, MgAl-Gly-Gly_{cop} decomposes in 3 events: the dehydration of energetically bounded water molecules at high temperature (or the decomposition of the nitrate anions (174 °C), the decomposition of the hydroxylated layers at 254 °C and the exothermic decomposition of Gly-Gly buffer molecule plus NO₃⁻ anions at 447 °C. Adsorption and encapsulation of TKec lead to an increase of the hydration rate, physically sorbed water molecules being located in meso- or macropores, generated by the presence of the protein. Obviously, the coprecipitation method increases the amount of water molecules embedded in the structure, 12% against 8% for the adsorbed phase. The major difference between TKec@MgAl-Gly-Gly_{ads} and TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} comes from the remaining of Gly-Gly molecules in the adsorbed sample. Gly-Gly decomposition event is evidenced in both MgAl-Gly-Gly_{cop} and TKec@MgAl-Gly-Gly_{ads} materials at 447 °C and 444 °C, respectively. TKec decomposes in 2 steps, at 319 °C (338 °C) and 489 °C (497 °C) for TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} (TKec@MgAl-Gly-Gly_{ads}). Obviously, the coprecipitation leads to an extended TK-LDH interface, with a complete coverage of the LDH surface by the enzyme and a full replacement of the Gly-Gly molecules, while the surface adsorption process maintains part of the self-aggregation of LDH-Gly-Gly platelets, both Gly-Gly and TKec coexisting in the phase as shown on the thermogram.

3.3. Activity of TKec@LDH biohybrids

3.3.1. Enzymatic activity of biohybrid suspensions

For the determination of enzymatic activity of immobilized TKec, L-erythrulose was used as the donor substrate since D-xylulose-5-phosphate, the natural donor substrate of TK, was commercially unavailable. To note, L-erythrulose displays 30% of the activity of D-xylulose-5-phosphate. Initial velocity of the reaction was determined

Table 2
Specific activity of TKec@LDH biohybrids determined in 100 mM Gly-Gly.

Biohybrid	TKec/LDH ratio (Q_{th})	Immobilization yield ($Q_{ex}/Q_{th,ex}$)	Activity _{rel} (%)	Activity (U/mg biohybrid)
TKec@MgAl-Gly-Gly _{ads}	0.2	100	84	5
	0.6	100	45	6
	1	98	37	7
TKec@MgAl-Gly-Gly _{cop} ^a	0.2	100	100	6
	0.5	100	100	12
	1	55	46	9

^a The same activity was obtained in 25 mM Gly-Gly.

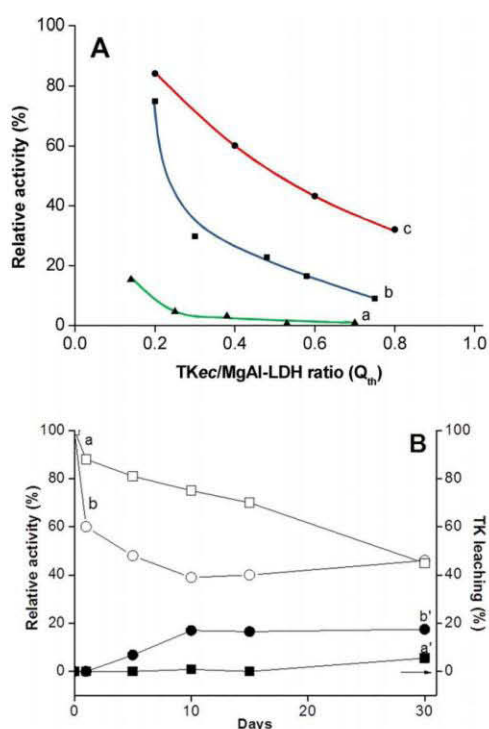


Fig. 6. (A) Relative activity (%) of TKec@MgAl-LDH_{ads} as function of as a function of TKec: LDH ratio (Q_{ex}) in water (a), in 50 mM MOPS (b) and 100 mM Gly-Gly (c). (B) Storage stability of TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} suspensions in 100 (a) and 25 mM Gly-Gly (b) at 4 °C.

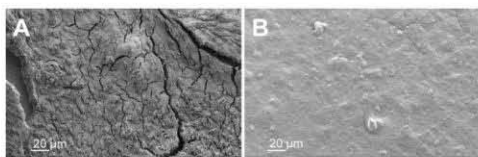
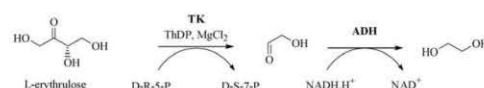


Fig. 7. SEM images of films of TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} prepared in 100 (a) and 25 (b) mM Gly-Gly.

following glycolaldehyde formation as a function of time by spectroscopy at 340 nm, with a coupled enzymatic reaction using yeast alcohol dehydrogenase (ADH) and NADH, according to the following

scheme.



The enzymatic activity of TKec@LDH biohybrids (U/mg of solid) was compared to that obtained for the same amount of free TKec (U/mg of protein), defined as a relative activity (%). Specific activity of free purified TKec was around 35 U/mg in 100 mM Gly-Gly. As shown in Fig. 6A for the adsorbed TKec@MgAl-LDH_{ads} phase, the relative activity decreases with the Enz:LDH ratio (Q_{ex}) with a maximal value for $Q_{ex} = 0.2$ for which 100% of enzyme was immobilized ($Q_{ex} = Q_{th}$). Furthermore, the enzymatic activity depends on the buffer medium used. As observed for free TKec, a drastic decrease of activity was observed in water, and the activity of biohybrids was higher in Gly-Gly than in MOPS (Fig. 6A). The absolute activities obtained with three ratio TKec@MgAl-LDH_{ads} biohybrids are given in Table 2 and compared to those obtained for TKec@MgAl-LDH_{cop}. A maximum activity of 12 U/mg of solid was obtained for TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} ($Q_{th} = 0.5$). This consists to a significant enhancement of the performance if we compare this specific activity to our previous result obtained with TK from *S. cerevisiae* immobilized on LDH (1.2 U/mg solid) [22].

The enzymatic activity of suspensions of TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} in Gly-Gly 100 and 25 mM at 4 °C was evaluated for one month. Enzymatic activity of the biohybrids was tested weekly. 40% of their initial activity was recovered after 30 days. The results were similar with or without ThDP in the storage medium. However the decrease in activity is faster when the buffer concentration is higher, probably due to enzyme leaching in this case, as shown in Fig. 6B. This suspension, when stored at 4 °C, remained ready for further uses.

3.3.2. Enzymatic activity of biohybrid films

In order to test the suitability of those biomaterials as stationary phase in microfluidic reactor or for biosensor development, thin films were prepared using TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} through a one-step deposition on a polished support. SEM images show that a homogeneous film was obtained using a suspension in 25 mM Gly-Gly (Fig. 7). However cracks are clearly observed when 100 mM Gly-Gly suspension was used which caused enzyme leaching in this latter case. It is not the case for the former buffer concentration. Enzymatic activity of TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} film was tested over a recycling process by soaking it into a stirred reactive medium. The initial rate of the reaction was recorded at 340 nm as described for the suspensions. For the first use a lack-time was observed, probably due to limitation of substrate diffusion within the film. After each cycle, the TKec@MgAl-Gly-Gly_{cop} film was carefully rinsed with 25 mM Gly-Gly. Four successive cycles can be performed without any loss of activity (2.7 ± 0.06 U/mg cm²). Finally a reproducibility of 4% for three films prepared independently was obtained. This indicates, in particular, an efficient film preparation process, although the procedure used was a non-automatic but a handmade process.

4. Conclusion

All these results show the efficient immobilization of TKec on MgAl-LDH by the coprecipitation method. The presence of Gly-Gly can hinder the precipitation of LDH. However the positive point is the replacement of nitrate by dipeptide inducing the formation of a hydrophilic flexible 3D network of small LDH platelets around the enzymes. Thus, the resulting biohybrid material depicts a stable, reproducible and high enzymatic activity for immobilized TK interesting as a stationary phase in microfluidic reactor or for biosensor development.

Acknowledgements

We would like to thank Professor W.-D. Fessner (TU Darmstadt, Dept of Organic Chemistry & Biochemistry, Germany) for the gift of *E. coli* BL21 (DE3) PET21 recombinant strain. Nadia Touisni would like to thank Region Auvergne and CNRS for her PhD fellowship and Martine Sancelme, Joël Cellier for their technical assistance.

References

- [1] B. Comin-Anduix, J. Boren, S. Martinez, C. Moro, J.J. Centelles, N. Trebukhina, N. Petushok, W.N. Lee, L.G. Boros, M. Cascante, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 4177.
- [2] M.X. Du, J. Sim, L. Fang, Z. Yin, S. Koh, J. Stratton, J. Pons, J.J. Wang, B. Carte, *J. Biomol. Screen.* 9 (2004) 427.
- [3] J. Zhao, C.-J. Zhong, *Neurosci. Bull.* 25 (2009) 94.
- [4] P.J. Thornalley, I. Jahan, R. Ng, *J. Biochem.* 129 (2001) 543.
- [5] M.S.P. Lopez, F. Charmantray, V. Helaine, L. Hecquet, C. Mousty, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 139.
- [6] M. Brovetto, D. Gamenara, P. Saenz Méndez, G.A. Seoane, *Chem. Rev.* 111 (2011) 4346.
- [7] N.J. Turner, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11 (2000) 527.
- [8] F. Charmantray, P. Dellis, V. Helaine, S. Samreth, L. Hecquet, *Eur. J. Org. Chem.* (2006) 5526.
- [9] C.U. Ingram, M. Bommer, M.E.B. Smith, P.A. Dalby, J.M. Ward, H.C. Hailes, G.J. Lye, *Biotechnol. Bioeng.* 96 (2007) 559.
- [10] O.N. Slovejeva, G.A. Kochetov, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 54 (2008) 90.
- [11] F. Charmantray, V. Helaine, B. Legeret, L. Hecquet, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 57 (2009) 6.
- [12] Y. Lindqvist, G. Schneider, U. Ermler, M. Sundström, *EMBO J.* 11 (1992) 2373.
- [13] G.A. Sprenger, U. Scorken, G. Sprenger, H. Sahn, *Eur. J. Biochem.* 230 (1995) 525.
- [14] J. Abdoul Zabar, I. Sorel, F. Charmantray, V. Helaine, T. Devamani, D.Y. de Berardinis, V.D. Louis, P. Marlière, W.-D. Fessner, L. Hecquet, *Adv. Synth. Catal.* 355 (2013) 116.
- [15] G.A. Kochetov, O.N. Solovieva, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84 (1978) 515.
- [16] S. Brocklebank, J.M. Woodley, M.D. Lilly, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 7 (1999) 223.
- [17] S.P. Brocklebank, R.K. Mitra, J.M. Woodley, M.D. Lilly, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 799 (1996) 729.
- [18] S. Bhattacharya, M. Schiavone, J. Gomes, S.K. Bhattacharya, *J. Biotechnol.* 111 (2004) 203.
- [19] S. Matosevic, G.J. Lye, F. Baganz, *Biotechnol. Progr.* 26 (2010) 118.
- [20] S. Matosevic, G.J. Lye, F. Baganz, *J. Biotechnol.* 155 (2011) 320.
- [21] L.M. Reimer, D.L. Conley, D.L. Pompliano, J.W. Frost, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 8010.
- [22] K. Benaïssi, V. Helaine, V. Prevot, C. Forano, L. Hecquet, *Adv. Synth. Catal.* 353 (2011) 1497.
- [23] C. Forano, S. Vial, C. Mousty, *Curr. Nanosci.* 2 (2006) 283.
- [24] C. Mousty, V. Prevot, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 43513.
- [25] C. Mousty, O. Kaftan, V. Prevot, C. Forano, *Sens. Actuators B.* 133 (2008) 442.
- [26] V. Rives, *Layered Double Hydroxides: Present and Future*, New York, Nova Science, 2001.
- [27] T. Zor, Z. Selinger, *Anal. Biochem.* 236 (1996) 302.
- [28] L. Hecquet, J. Bolte, C. Demuynck, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57 (1993) 2174.
- [29] G. website, <http://old.genedb.org/genedb/>.
- [30] C.H. Giles, T.H. Macewan, D. Smith, *J. Chem. Phys.* (1960) 3973.
- [31] S. Vial, V. Prevot, F. Leroux, C. Forano, *Micropor. Mesopor. Mater.* 107 (2008) 190.
- [32] E. Geraud, V. Prevot, C. Forano, C. Mousty, *Chem. Commun.* 13 (2008) 1554.
- [33] K. Charradi, C. Forano, V. Prevot, D. Madern, A. Ben Haj Amara, C. Mousty, *Langmuir.* 26 (2010) 9997.
- [34] C. Guérard-Hélaine, B. Légeret, C. Fernandes, V. Prévot, C. Forano, M. Lemaire, *New J. Chem.* 35 (2011) 779.
- [35] J.S. Blanchard, *Methods Enzymol.* 104 (1984) 404.
- [36] S. Aisawa, S. Sasaki, S. Takahashi, H. Hirahara, H. Nakayama, E. Narita, *J. Phys. Chem. Solids.* 67 (2006) 920.
- [37] T. Hibino, W. Jones, *J. Mater. Chem.* 11 (2001) 1321.
- [38] G. Fischer, X. Cao, N. Cox, M. Francis, *Chem. Phys.* 313 (2005) 39.
- [39] M. Remko, B.M. Rode, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3 (2001) 4667.
- [40] H. Sigel, R.B. Martin, *Chem. Rev.* 82 (1982) 385.
- [41] N. Iyi, S. Ishihara, Y. Kaneko, H. Yamada, *Langmuir.* 29 (2013) 2562.
- [42] S. Ram, *Infrared Phys. Technol.* 42 (2001) 547.
- [43] R.R.F. Jahromi, P. Morris, R.J. Martinez-Torres, P.A. Dalby, *J. Biotechnol.* 155 (2011) 209.

Résumé

Depuis peu, des travaux ont montré que chez l'Homme, la transcétolase (TK, EC 2.2.1.1.) dont le cofacteur est la thiamine diphosphate (forme active de la vitamine B1), est une enzyme impliquée dans de nombreuses maladies telles que, le diabète, certains cancers, ou encore des maladies neurologiques, comme le syndrome de Wernicke-Korsakoff et la maladie d'Alzheimer. Pour des applications thérapeutiques, des inhibiteurs spécifiques de cette enzyme sont actuellement conçus et synthétisés dans les milieux académiques et industriels.

Afin de déterminer l'activité de la TK (dans un but de diagnostic) d'une part, et de détecter des inhibiteurs potentiels de cette enzyme (dans un but thérapeutique) d'autre part, il est nécessaire de disposer de tests alliant rapidité, sensibilité et faible coût. Nous avons envisagé d'utiliser des biocapteurs ampérométriques qui combinent l'ensemble de ces avantages, et qui, de plus, n'ont jamais été mis en oeuvre avec la TK.

Pour la détermination de l'activité des TK d'*E. coli* et humaine libres en solution, nous avons tout d'abord élaboré un premier biocapteur à galactose oxydase (GAOx, EC 1.1.3.9), dans lequel cette enzyme est immobilisée sur la laponite. Puis, dans le but de détecter des inhibiteurs de la TK, avec un système réutilisable, nous avons développé un biocapteur à GAOx-TK d'*E. coli*, les deux enzymes étant co-immobilisées à la surface de l'électrode. Pour cela la TK a été immobilisée dans des Hydroxydes Doubles Lamellaires (HDL). Ce biocapteur bicouche et bi-enzymatique GAOx-TK, nous a permis d'évaluer l'effet d'inhibiteurs, tels que différents analogues du cofacteur et de substrats pris comme modèles.

Mots clés : Biocapteurs ampérométriques, transcétolase, thiamine diphosphate, galactose oxydase, inhibiteurs, immobilisation d'enzymes, Hydroxydes Doubles Lamellaires (HDL).

Abstract

Some recent studies have shown that human transketolase (TK, EC 2.2.1.1.), which thiamine diphosphate (active form of vitamin B1) is the cofactor, is involved in numerous disease such as diabete, some cancers and neurodegenerative diseases as Alzheimer's disease and Wernicke-Korsakoff syndrome. For therapeutic purposes, TK inhibitors have been designed and synthesized in both academic and industrial fields.

To determine TK activity (diagnostic) on the one hand, and to detect potential inhibitors of this enzyme (therapeutic) on the other hand, it is necessary to develop fast, sensitive and low cost assays. In this context, we designed some original amperometric biosensors that combine these advantages and were never studied with TK from now.

We performed a first galactose oxidase (GAOx, EC 1.1.3.9) biosensor for *E. coli* and human TK activities detection. For that purpose, GAOx was immobilized on laponite matrix. Then, we designed a GAOx-TK biosensor by co-immobilization of GAOX and TK on the electrode surface that enabled the detection TK inhibitors with a reusable system. Thence, TK was immobilized in Layered Double Hydroxides (HDL). This bilayer and bi-enzymic biosensors, allowed us to determine the inhibitor potencies of several cofactors and substrates analogues as model compounds.

Keywords: Amperometric biosensor, transketolase, thiamine diphosphate, galactose oxidase, inhibitors, enzyme immobilization, Layered Double Hydroxides (LDH)