



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **9 novembre 2018**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **AYMARD Chloé**

Titre de la thèse : « *Nouvelles méthodes électrochimiques pour le criblage d'inhibiteurs de transcétolases* »



Résumé

Cette thèse a pour objectif de développer une méthode électrochimique permettant de cribler à haut débit des inhibiteurs d'enzymes. Pour cela, une enzyme cible a été sélectionnée pour son intérêt thérapeutique, la transcétolase (TK) : elle est impliquée dans de nombreuses pathologies (cancer, maladies neurodégénératives, diabète...) et dans la survie de certains parasites pathogènes. Afin de mesurer l'activité de la TK, deux systèmes rapporteurs ont été développés, à l'aide de plaques de criblage électrochimique (PCE) constituées de 96 électrodes indépendantes.

Le premier système rapporteur repose sur un système bienzymatique nécessitant l'intervention d'une enzyme auxiliaire, la galactose oxydase (GAOx) sous forme libre ou immobilisée dans la laponite. Cette enzyme est capable d'oxyder les produits de réaction de la TK et de produire du peroxyde d'hydrogène. Le format 96 des PCE a permis d'optimiser rapidement la détection électrochimique par ampérométrie pulsée par intermittence (IPA) d'activité oxydase et seulement 10 minutes sont nécessaires pour réaliser 96 mesures simultanées. Parallèlement, afin d'exploiter au maximum le système à 96 électrodes, cette détection d'activité oxydase a également été réalisée, en 10 minutes par électrochimiluminescence. Cette méthode offre l'avantage d'être plus sensible et moins variable que par IPA, mais limite l'utilisation de matrice d'immobilisation d'enzymes. La GAOx a ensuite été utilisée pour mesurer l'activité TK, cependant, les conditions réactionnelles n'étant pas optimales en présence du système bienzymatique (TK-GAOx), des temps d'incubation longs sont nécessaires et sont peu adaptées au criblage d'inhibiteurs de la TK.

Un second système rapporteur ne nécessitant plus d'enzyme auxiliaire et faisant intervenir uniquement un seul substrat de la TK a été optimisé. Ce système repose sur l'oxydation de l'intermédiaire réactionnel formé par la fixation du cofacteur (la thiamine pyrophosphate) et du substrat sur l'enzyme par le ferricyanure. Cette méthode permet de mesurer 96 activités TK en seulement 7 minutes et a aisément été utilisée pour cribler une bibliothèque de molécules. Le criblage de 1360 molécules a permis d'identifier un nouvel inhibiteur de cet enzyme, présentant une CI_{50} de 63 μM . Le système électrochimique a également été utilisé pour déterminer le mécanisme d'inhibition (non compétitive pure partielle) et la constante d'inhibition associée (3,4 μM). Ces résultats sont inédits dans le domaine de l'électrochimie et offrent un large éventail d'applications que ce soit pour le criblage d'activité enzymatiques ou d'inhibiteurs d'enzymes.