



Nouvelles stratégies d'amplification moléculaire d'un signal basées sur l'activation de dérivés pro-quinoniques : de l'activation d'un catalyseur biomoléculaire au déclenchement d'une réaction auto-catalytique

Charlie Rabin

► To cite this version:

Charlie Rabin. Nouvelles stratégies d'amplification moléculaire d'un signal basées sur l'activation de dérivés pro-quinoniques : de l'activation d'un catalyseur biomoléculaire au déclenchement d'une réaction auto-catalytique. Autre. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017US-PCC079 . tel-01952830

HAL Id: tel-01952830

<https://theses.hal.science/tel-01952830>

Submitted on 12 Dec 2018

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.

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE SORBONNE PARIS CITE
PREPAREE A L'UNIVERSITE PARIS DIDEROT**

Ecole doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris-Centre (ED 388)

Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire

**Nouvelles stratégies d'amplification moléculaire d'un signal
basées sur l'activation de dérivés pro-quinoniques :
*De l'activation d'un catalyseur biomoléculaire
au déclenchement d'une réaction auto-catalytique***

Par Charlie RABIN

THESE DE DOCTORAT DE CHIMIE

Dirigée par Benoît LIMOGES

DR CNRS, Université Paris Diderot

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 09 Octobre 2017

Président du jury :	Ludovic Jullien	Professeur, Ecole Normale Supérieure, Paris
Rapporteurs :	Nicolas Pluméré	Professeur, Université de Ruhr, Bochum, Allemagne
	Karine Reybier	MCF, Université Paul Sabatier, Toulouse
Examineurs :	Elisabeth Davioud-Charvet	DR CNRS, ECPM, Strasbourg
	Ludovic Jullien	Professeur, Ecole Normale Supérieure, Paris
Invités :	François Mavré	MCF, Université Paris Diderot, Paris
	Mathieu Branca	MCF, Université Paris Diderot, Paris

Nouvelles stratégies d'amplification moléculaire d'un signal basées sur l'activation de dérivés pro-quinoniques : de l'activation d'un catalyseur biomoléculaire au déclenchement d'une réaction auto-catalytique

Résumé

Généralement, diagnostiquer une pathologie donnée à un stade de développement précoce favorise le pronostic vital du patient atteint. Une telle performance nécessite de détecter des marqueurs présents à des seuils de concentrations bas dans des fluides biologiques souvent complexes. Pour détecter ces concentrations extrêmement faibles en analyte donné, la stratégie employée au cours de ce travail est l'amplification moléculaire du signal. Pour cela, différentes approches sont possibles (i) amplifier le signal issu de l'évènement de reconnaissance cible/sonde, (ii et iii) amplifier le signal par régénération ou réplication de la cible. Les stratégies conçues au cours de ce travail de thèse se focalisent principalement sur la détection de petites molécules, telles que l'eau oxygénée ou encore l'anion fluorure, mais avec à terme l'idée de les étendre à la détection indirecte de biomarqueurs ou protéines d'intérêts. La première partie de cette thèse se focalise sur l'amplification moléculaire d'un signal par une catalyse allostérique en utilisant la réaction de reconstitution d'une *apo*enzyme donnée avec son cofacteur tandis que la seconde partie de cette thèse repose sur la mise en place de systèmes d'amplification catalytique et auto-catalytique pour la détection d'H₂O₂, grâce à des dérivés pro-quinoniques porteurs de groupement acide/ester boronique. La distinction entre les systèmes catalytique et auto-catalytique se fait selon qu'H₂O₂ est régénéré ou amplifié au cours de la réaction.

Mots clefs : Amplification moléculaire ; Reconstitution enzymatique ; Activation d'un biocatalyseur ; Auto-catalyse ; Cinétique ; Chimie analytique

New strategies for molecular amplification of a signal based on the activation of pro-quinonic derivatives : from the activation of a biomolecular catalyst to the trigger of an auto-catalytic reaction

Abstract

Generally, diagnosing a given pathology at an early stage of development promotes the patient's prognosis. Such a performance requires the detection of specific markers which are present in complex biological fluids at low concentration level. To detect these extremely low analyte concentrations, the strategy employed in this work is the molecular amplification of the signal. To this end, different approaches are possible (i) amplifying the signal resulting from the target / probe recognition event, (ii and iii) amplifying the signal by regeneration or replication of the target. The strategies conceived during this thesis work mainly focus on the detection of small molecules, such as hydrogen peroxide or fluoride anion, but with the idea of extending them to the indirect detection of biomarkers or proteins of interest. The first part of this thesis focuses on the molecular amplification of a signal by allosteric catalysis using the reconstitution reaction of a given *apo*enzyme with its cofactor. The second part of this thesis is based on the implementation of catalytic and auto-catalytic amplification systems for the detection of H₂O₂, thanks to pro-quinonic derivatives bearing boronic acid/ester group. The distinction between catalytic and auto-catalytic systems is based on whether H₂O₂ is regenerated or amplified during the reaction.

Keywords : Molecular amplification ; Enzymatic reconstitution ; Biocatalyst activation ; Auto-catalysis ; Kinetic ; Analytical chemistry

« Savoir vouloir, c'est pouvoir »,

Marie Marvingt

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont aux membres du jury qui ont accepté de lire mon manuscrit et d'évaluer mon travail, les rapporteurs **Karine REYBIER** et **Nicolas PLUMERE** et les examinateurs **Elisabeth DAVIOUD-CHARVET** et **Ludovic JULLIEN**.

Je remercie **Elodie ANXOLABEHERE**, directrice du LEM, pour son soutien continu au cours de ces trois ans, pour son intérêt et son sens de l'écoute.

Je remercie **Benoit LIMOGES**, mon directeur de thèse, d'avoir été présent tout au long de ma thèse et particulièrement ces derniers mois pour m'aider à donner le meilleur de moi-même et à fournir un travail rigoureux avec une vraie démarche scientifique.

Je remercie **Mathieu**, qui m'a pris sous son aile en chimie organique et a été très présent à mon arrivée au laboratoire, ce qui m'a évité de faire des montages improbables. Merci d'avoir été autant optimiste sur toutes les synthèses et de m'avoir empêché de baisser les bras. Tu avais raison, les résultats arrivent toujours en dernière année de thèse !

Je remercie **François** pour tout ce qu'il m'a apporté au cours de ces trois ans. Nous avons passées de longs après-midis à *tenter* de comprendre les mécanismes de reconstitution de la PQQ-sGDH d'après mes fichiers *Excel* à rallonge. Merci pour tous ces maux de tête et pour tous ces fous-rires de fatigue. Je suis contente que tu aies pensé à moi pour les TDs de ton UE. Merci aussi de m'avoir aidée à organiser mes idées ces derniers temps, j'en avais vraiment besoin. Merci encore pour Austin.

Je remercie aussi les stagiaires qui ont contribué à ce travail : **Solal, Matthieu, Sarah** et **Marielle**.

Au cours de mes trois ans de thèse j'ai rencontré beaucoup de personnes différentes, des gens de passages, et des incontournables. Mes remerciements vont à toutes ces personnes, un peu dans le désordre.

J'ai débuté les enseignements avant de commencer mon travail de recherche, et je tiens tout d'abord à remercier **Christine CORDIER** et **Alain SNOBBERT**, qui m'ont fait confiance dès le début pour assurer les enseignements de la LiPAC, et avec qui j'ai passé d'agréables moments. Merci à **Delphine**, qui a pris la suite d'**Alain** et qui m'a laissée donner un premier cours de thermodynamique (avec ses notes à l'appui). Merci à mes collègues de TPs, **Christophe BOISSARD** et **Fridolin KWABIA**, qui m'ont fait découvrir l'enseignement de deux façons très différentes, l'une mêlant rigueur et douceur et l'autre enthousiasme et dynamisme. Mention spéciale pour **Angie** qui avec son bagou arrive à rendre la chimie organique *cool*. Et enfin, merci aux techniciennes de l'ancien service de TP, **Hadja**, **Malika** et **Sarah**, qui ont toujours été là pour rassurer les jeunes moniteurs et sans qui les TPs n'auraient pas été aussi joyeux.

Merci aussi à **Nicolas Joly** pour m'avoir donné accès au lecteur UV-vis de microplaque à 96 puits, sans quoi il n'y aurait pas eu de troisième chapitre à cette thèse !

Merci à tous les membres du Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire pour ces trois ans en leur compagnie, et en particulier merci à **Bernd** de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire avec une grande gentillesse, à **Agnès** pour sa nature franche et pour son intérêt, ainsi qu'à **Julien** pour sa bonne humeur communicative mais surtout pour son aide avec les spectro et autres machines qui ne marchent pas/jamais.

Au LEM, le monde tourne autour de trois personnes indispensables : **Sihem**, **Julie** et **Daniel**. **Sihem** ... que dire ?! Madame Alzheimer #Gertrude, tu m'as appelée par tous les prénoms possibles et imaginables depuis trois ans, heureusement depuis quelques temps tu as réussi à stabiliser le « *ma petite Chaaaaarlie* ». **Sihem**, tu es vraiment la maman des doctorants du laboratoire et sans toi cette aventure aurait été moins belle. Merci pour les petits gâteaux faits-maison *Elsa*, les sourires, les bonbons, les dattes et les remontées de moral dans ton bureau !! Et surtout merci de m'avoir transmis la technique pour être une vraie TEFAL. **Julie**, qui est vraiment indispensable et qui répond toujours avec le sourire à mes SOS #vivel'adminsitation ! Grâce à toi, les blagues de **Daniel** sont plus faciles à apprécier/supporter. **Daniel**, le maître du double des clés qui plus d'une fois m'a sortie d'une situation désespérée, le *MacGyver* qui répare les machines plus vite que son ombre et le père

Noël qui distribue les commandes. Que de bons moments et de bons repas avec toi, j'espère que tu iras bientôt en Islande.

Je tiens aussi à remercier **Jeanne** qui m'a beaucoup chouchoutée/intégrée pendant ma première année, qui m'a fournie un nombre appréciable de citrons et qui m'a donné LA méthode pour attraper *sans bouger* le bouquet de la mariée.

Faire une thèse au LEM, c'est aussi faire partie du fameux groupe de thésards qui ne cesse d'augmenter chaque année. Bien qu'étant la seule thésarde de la promotion 14/17 du LEM, j'ai connu bien des doctorants et futurs docteurs. La première rencontre remonte à **Mathilde**, qui a été l'exemple à suivre au cours de ma thèse, entre bonne humeur, chaleur et générosité, c'est une personne vraiment unique qui n'hésite pas à se lever tôt pour venir lancer de manips ! #laviethésarde. Ensuite, il y a eu **Cécilia**, ma *best* du labo, mon rayon de soleil et aussi une sacrée boule de nerf. Que de fous rires et d'après-midi contre-productifs pendant ta rédaction. Le bureau a été vraiment vide quand tu es partie, heureusement que *whatsapp* existe ! **Domin**, le meilleur (et seul) Napolitain que je connaisse, adorable, *fashion* et complètement *chocolat-addict*. J'ai toujours ton post-it « See you next week ! » et j'espère qu'on se reverra un jour mon ami. **Chloé** qui est passée du statut de SUPER STAGIAIRE #synthèsedeverniscorail à apprentie couturière/*designer* dans mon salon les samedis après-midi. **Chloé**, tu es la dernière personne à m'avoir vue avant mes fiançailles surprises et ta présence au mariage est *mendatory* ! Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Parlons maintenant des copains de bureau. Cette dernière année, ou plutôt ces derniers mois ont été assez chargés pour moi et grâce à vous j'ai quand même gardé des moments pour rire, pour décompresser, manger des cochonneries et boire de la bière. Je ne vous remercie pas pour tous les débats sur les présidentiels quand j'étais en pleine rédaction. **Khalil**, le jeune papa qui ne sait PAS faire de blague, ou plutôt qui ne comprends pas le concept de chute. Toujours très pimpant et souriant, il reste le roi des bons plans du bureau et un allié dans toutes les situations ! Merci de t'être proposé pour financer mon mariage, je ne l'oublierai pas ! **Claudio**, *l'espagnol/italien* qui vient de Turin, qui lui a un sens de l'humour à toute épreuve et qui a contribué fortement aux fous rires du bureau. Récemment devenu un lanceur de couteau, il sait faire de très bon *tiramisu* #cliché et fait partie de la team *Prosecco*. **Yee-Seul**, l'atout douceur/mignon du bureau. Toujours malade, comme moi, et avec qui j'ai monté le projet *Bamboo Bike*. Continue à ne pas te laisser faire par le bébé du labo ! #girlpower. **Martin**, connu sous le surnom de PUR SUCRE, un mec très drôle « en vrai ». Heureusement que tu es venu dans notre bureau, d'une part on a discuté de beaucoup de sujets intéressants #anti-complotistes, et d'autre part c'est bon pour la diversité #extra-terrestre !! **Heng**, I thank you

for feeding me during my thesis, you are a particularly nice cooker. I wish you the best, you are a really nice person and a humble one. You deserve your success. **Etienne**, futur papa, avec qui j'ai eu beaucoup de bonnes conversations. Tu as une façon de penser rafraîchissante et pour le coup tu m'as vraiment donnée envie de faire le transsibérien. **Célia**, qui, comme moi, croit encore au mariage et aux familles avec enfants !! Avec qui je partage tellement de choses #tueslaverionkabyledemavie, et même un *evijf particulier* ! J'espère que tout ira bien pour toi, comme c'est aujourd'hui le cas pour moi. Je te souhaite un beau mariage !! **Min, Cheng** and **Hussein**, even if we did not have the time to really know each other, I thank you for your happiness and I wish you the best for the next. **Jérémy**, mon coup de cœur de cette année, qui a pris la grosse tête depuis qu'il est en charge de mon cadeau de thèse. #Vat'acheterunenouvellepairedepompe FRERE, tes chevilles sont trop énormes. Bon mise à part que tu m'énerves souvent, que ton langage est on ne peut moins châtié, que tu as une capacité à me rendre chèvre et à jeter les objets partout (même dans la rue #pauvrepeluche), j'ai passé de super moments avec toi. Je suis contente que tu ne sois plus malade (quoiqu'on ne sait jamais avec toi...). Entre le fameux cours de *biking*/boite de nuit et les discussions/conseils modes/ alcools/soirées/ciné t'es au top. Non tu n'es pas le souffre-douleur du bureau, tu es indispensable à la bonne humeur mais entièrement responsable du bordel qui y règne ! Heureusement que les écouteurs existent... BISOUS BISOUS

A **Geordie**, la clé maîtresse de ma thèse, mon super binôme de labo, aussi connu sous le nom de GEO-GEO la balance. Grace à toi, je ne me suis pas jetée du haut du 6^{ème} étage à chaque fois que mes synthèses échouaient. Je ne te dis pas merci pour m'avoir fait remarquer un jour qu'il y avait presque autant de « FAILED » dans mon cahier de labo que de manips #pascool. En vrai, maintenant la réussite du projet PQQ repose sur tes épaules #onyarriveraunjour. Merci pour ta bonne humeur, pour tes bons goûts musicaux, pour toutes les discussions et les moments qu'on a partagé en 674. Tu sais que j'ai été trop contente de passer à des manips qui marchent en laissant de côté la chimie organique, mais ça aurait été encore mieux si tu avais décidé de faire de la spectro avec moi au 7^{ème} ! Heureusement qu'il y avait les pauses repas et les soirées bières !!!

Merci aux copains de thèse d'avoir été là, #thésardsde3^{ème}année, **Annette, Alexandra** et **Alexis**. Tous les trois nous nous sommes tellement amusés à faire les nombreux dossiers pour pouvoir avoir le droit de soutenir, que je regrette PRESQUE que ce soit fini. **Alexis**, on a vraiment passé de bons moments ensemble, de bon repas, de super conseils de l'UFR, des journées de formations déprimantes mais surtout nous avons eu un nombre incalculable de conversations où on refaisait le monde ! Si je crée mon laboratoire top secret, je ferai appel à

toi ! Merci encore d'avoir été là les jours de craquage et de déprime, heureusement que tu es toujours disponible !

Pour finir sur l'université, je remercie toutes les équipes de ces trois années : la fameuse TEAM CHOCOLATE (**Cécilia**, **Amélie** et **Domin**) qui a su gravir les montagnes de boue et surmonter les différentes épreuves de la MUDDAY 2015 ; la TEAM DIGBY (**Lisa**, **Eloi**, **Christelle**) qui a *failli* gagner le challenge du CBA et qui a été hyper bien classée pour la version mondiale du *Capsim Challenge*, jeunes entrepreneurs la vie est à nous ! La TEAM des NANAS (**Cécilia**, **Chloé** et **Sylvie**) qui ont enrichi ma vie de thésarde de paillettes ; et la TEAM Kdi (**Arnaud** et **Léa**) pour avoir surmonté toutes les galères que peut rencontrer une asso.

Merci aussi à mes copains du Master, **Ambroise**, **Lionel** et **Vincent**, que je vois uniquement autour d'une bière au *Frog*. Merci pour toutes les soirées fromages/ jeux de sociétés/cinémas au grenier/BBQ/*Fajitas*. Merci d'être vous et d'être là ! **Lionel**, même si les Toulousains et les Réunionnaises sont intrinsèquement opposés, je t'aime bien ! **Ambroise**, j'ai adoré découvrir le monde des reconstitutions historiques avec toi, et surtout de porter ton super casque de guerrier (qui m'a fait perdre au moins 10 centimètres) ! **Vincent**, c'est toujours un plaisir de partager mes lectures avec toi, merci de m'avoir fait découvrir « *Benvenuto Gesufal* » et de m'avoir permis d'être ton amie ! Vous êtes extraordinaires les gars et j'espère vous voir à la Réunion l'année prochaine !

Merci à mes meilleures copains et copines pour leurs temps cette année ! **Camille**, tu me fais un bien fou à chaque fois que je te vois, même si c'est toujours très bref ! **Audrey**, sans toi la vie est trop ennuyante/nulle/triste ! Je te conseille de prendre ton billet d'avion pour Austin *darling*, je t'y prépare une *chambre d'Audrey*. Les filles, un jour on y arrivera ! Une pensée aussi pour **Marine** avec qui j'adore manger des américains bouchons #lesgrossesmorphales. Merci à **Marie**, la fille toujours au top qui a de l'énergie à revendre et qui mise tout sur la POSITIVITE ! Merci d'avoir cru en moi **Fourmiz** ! Merci au grand alpiniste **Thomas HELARD** pour les matinées d'escalades à MURMUR et pour les moments qu'on a passé en Islande #meilleurvoyagedemavie. Merci à **John et Deena**, pour cette semaine de vacance dans un cocon et pour avoir largement contribué à maintenir ma santé mentale au cours de ces derniers mois #soiréesfilms #cinémaenpleinair #repas #beaucoupdeverres.

RERMERCIEMENTS

Et enfin milles merci à ma famille. A mes parents **Marie-Andrée** et **Pascal** pour leur soutien permanent et pour les nombreux colissimos de nourriture et *d'eau* de La Réunion pour me remonter le moral. A **Océane**, ma sœur adorée avec qui je passe des weekends entiers au téléphone et qui est venue me *rebooster* juste avant la période de rédaction. Heureusement que tu étais là cette année, et que tu gères mon mariage, mon evjf et mon gateau de mariage ! Merci pour la *villa Laurina*, sans ta motivation on n'aurait pas eu un lieu aussi dingue pour le mariage et merci de t'occuper de Handi le temps que je sois à Austin ! A **Manon**, la petite teigne qui me fait trop rire et avec qui j'adore passer mes vacances #séries#drama#nuitsblanches#sandwichaufromage#attaquedepapillon. A mes beaux-parents, **Sophie** et **JF** qui ont été très présents cette année et qui m'accueille toujours avec le sourire et parfois des chocolats. Sans vous tous cette année aurait été très dure !

Et pour finir merci au plus grand de tous, mon **Nico**, qui m'a supportée cette année et qui accepte toujours avec sourire de s'occuper de moi #c'estmoilaprincesse. Merci de ne pas trop t'énerver quand je boude, de commander des pizzas quand je meurs de faim, de m'acheter des robes quand je me sens affreuse, de me remontrer toujours les mêmes prises de JJB #unjourjeseraistropforte. Merci d'être là tous simplement et d'accepter de tout lâcher pour me suivre au bout du monde ! Promis on partira dans l'espace tous les deux #ilsuffitdecréernotrevaisseau. Tu es vraiment le garçon le plus gentil du monde, je t'aime.

A tous ceux que j'ai oubliés, c'est dommage ☺

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac ₂ O	Anhydride acétique
Ac-Glycine	Glycine Acétylée
ACN	Acétonitrile
AcOH	Acide acétique
ADDL	<i>Amyloid-β-Derived Diffusible Ligands</i>
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
<i>apo</i> -sGDH	<i>apo</i> -Glucose DésHydrogénase soluble
BAI	Bras espaceur Auto-Immolaant (<i>Self Immolative Spacer</i>)
Bn	Benzyl
BSA	Albumine sérique bovine
CAN	Nitrate de cérium et d'ammonium
cat.	Quantité catalytique
conc.	Concentré
cTnI	Troponine I cardiaque
DAST	<i>DiethylAminoSulfur Trifluoride</i>
DBU	1,8-diazabicycloundec-7-ène
DBN	1,5-diazabicyclonon-5-ène
DCM	DiChloroMéthane
DCPIP	DiChloroPhénolIndoPhénol
DCR	Réaction dendritique en chaîne

DFT	Théorie de la fonctionnelle de densité
DI	Diaphorase
DMF	N,N-DiMéthylFormamide
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
EATR	<i>Enzyme Assisted Target Recycling</i>
EDTA	Ethylène Diamine TétraAcétique
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
éq.	Equivalent
EtOH	Ethanol
EXPAR	<i>Exponential Amplification Reaction</i>
FeTPPF ₂₀	Porphyrine de Fer
FMN	Flavine MonoNucléotide
GD	Groupe Déclencheur
GDH	Glucose DésHydrogénase
GOx	Glucose Oxydase
GPC	Groupe Protecteur Clivable
hCG	Gonadotrophine chorionique humaine
HDA	<i>Helicase Dependant Amplification</i>
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
<i>holo</i> -sGDH	<i>holo</i> -Glucose DésHydrogénase soluble
<i>holo</i> -sGDH ^{1/2}	<i>holo</i> -sGDH à demi-reconstituée
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
HRP	Peroxydase du raifort
iMDA	<i>improved Multiple Displacement Amplification</i>
KHMDS	<i>Potassium bis(trimethylsilyl)amide</i>

LAH	Hydruure d'aluminium et de lithium
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal AMPlification</i>
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MeOH	Méthanol
NADH/NAD ⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NaOMe	Méthanolate de sodium
NASBA	<i>Nucleic Acid Sequence-Based Amplification</i>
nd	Non déterminé
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PMS	Phénazine méthosulfate
POC	<i>Point of care</i>
PQQ	PyrroloQuinoléine Quinone
PQQH ₂	PQQ réduit
PQQ-sGDH	PQQ-dépendante glucose déshydrogénase
pro-PQQ	Précurseur de PQQ
pro-QH ₂	Précurseur d'hydroquinone
PSA	Antigène spécifique prostatique
p-TSOH	Acide <i>para</i> -toluène sulfonique
Q	Quinone
QH ₂	Hydroquinone
Q ^{•-}	Semiquinone
Ra-Ni	Catalyseur Nickel de Raney
RCA	<i>Rolling Circle Amplification</i>
RMN (¹ H ou ¹⁹ F)	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton ou du fluor

ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SAAC	<i>Signal Amplification by Allosteric Catalysis</i>
SDA	<i>Strand Displacement Amplification</i>
SEAr	Substitution Electrophile Aromatique
SET	<i>Single Electron Transfer</i>
SiMoA	<i>Single Molecule Array</i>
SMART	<i>Switch Mechanism At the 5' end of RNA Templates</i>
SOD	Superoxyde dismutase
SOx	Sarcosine Oxydase
SPIA	<i>Single Primer Isothermal Amplification</i>
TA	Température Ambiante
TBAF	Fluorure de <i>tétra</i> -n-butylammonium
TBDMS	Ether de <i>Tert</i> -ButylDiMéthylSilyle
TCEP	Tris-(2-carboxyéthyl)-phosphine
THF	<i>Tétra</i> HydroFurane
TNF- α	Facteur- α de nécrose tumorale
UOx	Acide urique oxydase
UV-vis	Spectroscopie UV-visible
1,4-bis-DBN	1,4-bis(4,4,5,5- <i>tétraméthyl</i> -1,3,2-DioxaBorolan-2-yl) Naphthalène
1,4-NQ	1,4-NaphthoQuinone
1,4-NQH ₂	1,4-naphthohydroquinone
2CDCR	CDR à 2 composés
4-DBN	4-(4,4,5,5- <i>tétraméthyl</i> -1,3,2-DioxaBorolan-2-yl) Naphthalèn-1-ol

4-sis-DBN	4-((4-(4,4,5,5- <i>tétraméthyl</i> -1,3,2-dioxaborolan-2-yl) benzyl)oxy)naphthalen-1-ol
2,6-diMe-4-DBP	2,6-diMéthyl-4-(4,4,5,5- <i>tétraméthyl</i> -1,3,2-Dioxa Borolan-2-yl)Phénol

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	i
Introduction générale	1
1 Stratégies d'amplification pour la détection de cibles d'intérêts biologiques.....	5
1.1 Généralités sur les stratégies d'amplification	7
1.1.1 Consommation de la cible.....	7
1.1.2 Régénération de la cible.....	9
1.1.3 Amplification de la cible.....	10
1.2 Stratégies d'amplification pour la détection d'acides nucléiques	11
1.2.1 Exemples avec consommation de la cible	11
1.2.2 Exemple de régénération de la cible assistée par une enzyme, la méthode EATR	13
1.2.3 Exemples d'amplification de la cible	14
1.3 Stratégies d'amplification pour la détection de protéines	17
1.3.1 Exemples de stratégies de détection immunologique avec amplification du signal	18
1.3.2 Exemple de stratégie de détection impliquant une régénération de la cible	23
1.4 Stratégies d'amplification moléculaire d'un signal pour la détection de petites molécules	24
1.4.1 Exemples de stratégies de détection de petites molécules réactives avec amplification du signal et consommation de la cible.....	26
1.4.2 Exemples de régénération de la cible	28

1.4.3	Exemples de stratégies de détection de petites molécules avec amplification moléculaire auto-catalytique.....	30
2	Synthèse et caractérisation de dérivés de PQQ pour l'activation sélective d'une <i>apo</i>-glucose-déshydrogénase	39
2.1	Stratégie d'amplification du signal basée sur une reconstitution enzymatique.	39
2.1.1	Principe	39
2.1.2	PQQ/ <i>apo</i> -sGDH : un couple cofacteur/ <i>apo</i> enzyme idéal pour les stratégies de reconstitution du biocatalyseur.....	41
2.1.3	Synthèses de la pyrroloquinoléine quinone	47
2.2	Développement de la synthèse de dérivés du PQQ portant une fonction catéchol protégée	54
2.2.1	Design du pro-PQQ et cahier des charges	54
2.2.2	Voie A	58
2.2.3	Voie B	61
2.2.4	Voie C	63
2.2.5	Conclusion et perspective	68
2.3	Etude d'un groupement protecteur particulier combinant auto-immolation et auto-catalyse	69
2.3.1	Introduction sur les bras espaceurs silylés	69
2.3.2	Synthèse des groupes auto-immolants	70
2.3.3	Analyse de la sonde synthétisée.....	70
2.3.4	Conclusion.....	75
2.4	Etudes spectroscopiques de la reconstitution de l'<i>apo</i>-sGDH : du cofacteur naturel aux dérivés synthétiques	75
2.4.1	Reconstitution de l' <i>apo</i> -sGDH avec son cofacteur, le PQQ.....	76
2.4.2	Présentation des dérivés synthétiques étudiés.....	87
2.4.3	Détermination du K_d des analogues <i>via</i> la mesure d'un changement conformationnel par fluorescence.....	88

2.4.4	Détermination du K_d des analogues <i>via</i> une expérience de compétition	93
2.4.5	Conclusion.....	96
3	Nouvelles stratégies d'amplification moléculaire basées sur l'auto-oxydation d'une hydroquinone : amplifications catalytique et auto-catalytique	97
3.1	Introduction.....	97
3.1.1	Détection d'eau oxygénée basée sur l'auto-oxydation d'une hydroquinone et une amplification catalytique	98
3.1.2	Détection d'eau oxygénée basée sur l'auto-oxydation d'une hydroquinone et une amplification auto-catalytique	99
3.1.3	Auto-oxydation des hydroquinones et formation <i>in situ</i> d'eau oxygénée.....	101
3.1.4	Objectifs du travail et cahier des charges.....	104
3.2	Détection de l'eau oxygénée <i>via</i> la déprotection catalytique d'un dérivé ester boronique de benzo- ou naphtho-hydroquinone	108
3.2.1	Dérivé monoester boronique de la 1,4-naphthohydroquinone.....	108
3.2.2	Stratégie 1 : double protection de la 1,4-naphthohydroquinone	120
3.2.3	Stratégie 2 : monoprotection de la 1,4-naphthohydroquinone par un groupement benzyl ester boronique capable de s'auto-immoler en présence d' H_2O_2	130
3.2.4	Stratégie 3 : utilisation d'une 1,4-benzohydroquinone monoprotégée par un ester boronique.....	135
3.2.5	Conclusion sur les schémas catalytiques	142
3.3	Détection d'eau oxygénée <i>via</i> une réaction d'amplification moléculaire auto-catalytique	143
3.3.1	Système auto-catalytique et sonde 1,4-bis-DBN	146
3.3.2	Système auto-catalytique et sonde 4-sis-DBN	157
3.3.3	Système auto-catalytique et sonde 2,6-diMe-4-DBP	164
3.3.4	Conclusion sur les systèmes auto-catalytiques	170
3.4	Détection auto-catalytique de quinones à l'aide de la molécule pro-QH₂ 1,4-bis-DBN	171

3.4.1 Exemple analytique de détection de quinones, la 1,4-naphtoquinone et la 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone	172
3.4.2 Mise en œuvre d'un système entier pour le classement de quinones selon leur efficacité de production d'H ₂ O ₂	174
3.5 Conclusion et perspective	179
Conclusion générale	181
ANNEXE 1 Réactivité et synthèse des acides et esters boroniques.....	185
A1.1 Définition des acides ou esters boroniques.....	185
A1.2 Synthèse des acides ou esters boroniques	186
A1.3 Mécanisme de la déprotection oxydative des acides ou esters boroniques par H ₂ O ₂	187
A1.4 Stabilité des acides ou esters boroniques en milieu aqueux	188
A1.4.1 L'hydrolyse de l'ester pinacol	188
A1.4.2 La déprotection oxydative de l'acide boronique en présence d'O ₂	189
A1.4.3 La protodéboronation	190
ANNEXE 2 Partie expérimentale.....	191
A2.1 La synthèse organique	191
A2.1.1 Procédures générales.....	191
A2.1.2 Voie A	191
A2.1.3 Voie B	193
A2.1.4 Voie C	194
A2.1.5 Synthèse du groupe auto-immolant.....	196
A2.1.6 Synthèse des analogues de PQQ.....	199
A2.1.7 Synthèse de pro-QH ₂	205
A2.2 La biochimie	206
A2.2.1 Procédure générale.....	206
A2.2.2 Reconstitution de l' <i>apo</i> -sGDH avec son cofacteur PQQ.....	207
A2.2.3 Détermination du facteur δ	207

A2.2.4	Suivi d'un changement conformationnel de l' <i>apo</i> -sGDH <i>via</i> la fluorimétrie	207
A2.2.5	Expérience de compétition entre PQQ et analogue	208
A2.2.6	Détection d'H ₂ O ₂ <i>via</i> la déprotection catalytique d'un dérivé ester boronique..	208
A2.2.7	Détection d'H ₂ O ₂ <i>via</i> la déprotection auto-catalytique d'un dérivé ester boronique.....	209
A2.2.8	Détection auto-catalytique de quinones.....	210
Références.....		213

INTRODUCTION GENERALE

Pendant longtemps, l'espérance de vie à la naissance a reflété l'amélioration du mode de vie d'une population. Plus un individu pouvait vivre longtemps et plus son niveau de vie était bon. Cet indicateur témoignait notamment de l'hygiène de vie, de l'accès aux soins et des conditions de travail d'un individu. Or, de nos jours dans les pays développés, cet indicateur ne reflète plus vraiment la qualité de vie d'une population puisqu'étant lié au seul critère de longévité d'un individu il ne permet pas de distinguer les années de vies passées en bonne santé des années de maladie incapacitante (physique ou mentale).

L'espérance de vie sans incapacité est un nouvel indicateur qui permet de visualiser l'espérance dite de santé d'une population. Il révèle en 2014, une espérance de santé au sein de l'Union Européenne d'en moyenne 62 ans (61,4 ans pour les hommes contre 61,8 ans pour les femmes), ce qui représente moins de 80 % de l'espérance de vie totale (79 % et 74 % respectivement)¹. Ces valeurs mettent en avant une forte corrélation entre le vieillissement d'un individu et la survenance de pathologies, principalement sous la forme de cancers ou de maladies neurodégénératives.

En vue d'améliorer l'espérance de santé d'une population, il est important de pouvoir diagnostiquer une affliction à son stade de développement le plus précoce. Cet état est caractéristique d'une très faible concentration en biomarqueurs spécifiques dans l'organisme, or les outils de diagnostics actuels ne permettent pas d'atteindre ces concentrations ultimes. Dans le cas du cancer par exemple, la concentration résiduelle de biomarqueurs protéiques comme le facteur- α de nécrose tumorale (TNF α) est de l'ordre du femtomolaire, ce qui est de trois ordres de grandeurs inférieures à la limite de détection actuelle². Pour ce qui est des maladies cardiovasculaires, comme la nécrose cardiaque, c'est la troponine I cardiaque (cTnI) qui est mesurée. Habituellement de l'ordre du femtomolaire chez un individu sain, elle augmente rapidement après un infarctus du myocarde aigu. Il est ainsi maintenant reconnu qu'une faible élévation du niveau de cTnI chez un patient sain est un bon indicateur pour la survenance d'un évènement cardiovasculaire^{3,4}. Un outil de diagnostic approprié, abordable et facile d'utilisation serait d'une grande utilité pour identifier les patients à risque. Un autre exemple concerne la maladie d'Alzheimer pour laquelle la détection des biomarqueurs spécifiques, comme les ligands

diffus dérivés des plaques d'amyloïdes- β (peptides ADDL selon *amyloid- β -derived diffusible ligands*), est aujourd'hui effectuée en *post-mortem* par biopsie du cerveau. Or des études ont montré que les peptides ADDL sont aussi présents dans le liquide céphalo-rachidien et dans le sang à des concentrations extrêmement faibles (sub-femtomolaire)⁵⁻⁸.

L'idée est donc de mettre à disposition de la population des outils de diagnostics pour ce type de pathologies, qui soient rapides, fiables et peu coûteux afin qu'ils soient utilisés en tant que test de routine. Généralement, ces dispositifs sont dits « au chevet du patient » ou « au point d'intervention » (POC d'après l'anglais *point of care*).

Par ailleurs, ces outils permettent aussi de suivre l'évolution d'une pathologie après traitement ou chirurgie. C'est le cas du cancer de la prostate, où l'antigène spécifique prostatique (PSA d'après l'anglais *prostate specific antigen*) est fortement exprimé chez le patient. Après prostatectomie la concentration en PSA chute drastiquement⁹ jusqu'à atteindre des niveaux indétectables par les techniques actuelles (< 4 pM). Les patients sont alors étiquetés du « statut indétectable » et seule une augmentation de la concentration au-delà de 4 pM signifie clairement une récurrence du cancer. Or il a été montré que la détection d'un très faible niveau de PSA (< 200 fM) permettait de prédire la totale rémission d'un cancer⁹.

Cette thèse s'inscrit dans le contexte du développement d'outils de diagnostics POC robustes et ultrasensibles afin de pouvoir réaliser des tests de dépistage de ces maladies liées à l'âge. L'outil de diagnostic POC doit pour cela respecter plusieurs critères. Il doit d'abord être très sensible afin de détecter des seuils de concentrations les plus bas possible, mais aussi sélectif afin de détecter la cible au sein d'une matrice biologique complexe (*i.e.* salive, larme, urine, sueur ou sang) et enfin versatile (c'est-à-dire qu'il doit pouvoir s'appliquer autant à la détection de petites molécules d'intérêts qu'à des biomarqueurs ou des protéines d'intérêts).

Les stratégies conçues au cours de ce travail de thèse se focalisent principalement sur la détection de petites molécules, telles que l'eau oxygénée ou encore l'anion fluorure, mais avec à terme l'idée de les étendre à la détection indirecte de biomarqueurs ou protéines d'intérêts. Cette thèse débute par un état de l'art sur les systèmes de détection de biomolécules telles que des acides nucléiques, protéines et autres molécules d'intérêt biologique, dans lequel nous avons choisi d'introduire un classement selon trois principaux modes d'amplification du signal. Ceux-ci se différencient selon la nature de l'amplification moléculaire exploitée, c'est-à-dire soit par l'amplification moléculaire d'un signal induite par la mise en place d'un événement de reconnaissance entre la cible à détecter et son récepteur, soit par la régénération de la cible jouant alors un rôle d'amplificateur

catalytique, ou soit encore par l'amplification de la cible elle-même. Au cours de ce travail de thèse, nous avons exploré deux stratégies distinctes pour amplifier un signal, la première se base sur l'évènement de reconnaissance cible/récepteur *via* la reconstitution d'une *apo*enzyme avec son cofacteur redox, tandis que la seconde exploite la production d' H_2O_2 par des naphtho- ou benzo-quinones *via* une réaction d'auto-oxydation en présence d'oxygène moléculaire afin soit de régénérer la cible soit de la répliquer.

Le chapitre 2 rassemble les travaux effectués sur la première stratégie faisant intervenir une reconstitution enzymatique. Elle consiste tout d'abord en un clivage spécifique d'une sonde pro-cofacteur (précurseur synthétique du cofacteur quinonique d'une *apo*enzyme donnée) par la cible à détecter (H_2O_2 ou F^-). Suite à cette réaction, le cofacteur est libéré dans le milieu et peut dès lors reconstituer l'enzyme et l'activer, ce qui permet *in fine* d'obtenir un signal mesurable de l'activité enzymatique.

Le chapitre 3 quant à lui regroupe les travaux sur le thème de la régénération/amplification d' H_2O_2 par un système quinonique particulier. Brièvement, une sonde pro-quinonique porteuse d'un ou plusieurs groupements acide ou ester boronique est déprotégée par H_2O_2 (déprotection oxydante), ce qui permet la génération d'une hydroquinone QH_2 en solution. Celle-ci s'auto-oxyde en présence d'oxygène moléculaire et forme *in fine* une quinone Q et d'un équivalent d' H_2O_2 . Ce système permet d'amplifier le signal par régénération de la cible H_2O_2 . D'autre part, il a aussi été décliné en version d'amplification auto-catalytique grâce à l'ajout d'une enzyme réductase dans le milieu. En réduisant la quinone Q en QH_2 , cette enzyme permet de cycliser en permanence les formes oxydées et réduites de la quinone (Q/QH_2) et d'amplifier H_2O_2 de façon exponentielle au cours du temps.

Enfin le manuscrit se termine par une conclusion générale sur les différentes stratégies abordées et des perspectives pour la suite de ces travaux.

CHAPITRE 1

STRATEGIES D'AMPLIFICATION POUR LA DETECTION DE CIBLES D'INTERETS BIOLOGIQUES

Le diagnostic clinique moléculaire repose le plus souvent sur la détection d'une molécule spécifique, souvent dénommée biomarqueur, dont le niveau de concentration dans un fluide biologique donné, ou voire même sa simple présence, permet tout aussi bien de différencier un individu sain d'un individu malade que d'évaluer la progression de la maladie. Généralement, les maladies évoluent en divers stades de dangerosité selon le temps « d'incubation » du patient, c'est-à-dire le temps d'attente entre le moment où le patient entame sa maladie et celui de l'émission du diagnostic. Plus ce temps de détection est court, soit précoce en fonction de l'évolution de la pathologie, et plus le corps médical peut prédire un pronostic vital positif au patient. En effet, l'efficacité d'un traitement tient autant à une prise en charge rapide, qu'à une posologie adaptée (pour freiner au plus tôt l'évolution de la maladie mais aussi limiter les effets secondaires) et qu'à un suivi précis permettant de vérifier l'état du patient pendant et après le traitement (contrôle de la récurrence).

Les outils de diagnostic sont généralement centralisés au niveau des laboratoires d'analyse, ce qui provoque un délai dans l'émission du diagnostic mais aussi des coûts supplémentaires pour le patient. Ainsi, le principal moteur du développement de ces outils de diagnostic biologique est de pouvoir fournir aux médecins la possibilité de pratiquer rapidement et facilement une médecine dite « au chevet du patient »¹⁰. Parmi les exemples déjà entrés dans la vie courante, nous pouvons citer le test immuno-chromatographique sur bandelette, typique des tests de grossesse, qui révèle la présence ou l'absence dans les urines de l'hormone gonadotrophine chorionique humaine (hCG) sécrétée par l'embryon, mais aussi les nombreux lecteurs de glycémie à disposition des patients diabétiques, qui mesurent en temps réel l'évolution du taux de sucre dans le sang. En plus d'être rapide et portable, ce type de tests doit pouvoir être à la fois pratique, c'est-à-dire facile à mettre en œuvre, peu invasif (se limitant à des fluides biologiques facilement accessibles comme la salive, la sueur ou encore les larmes), peu coûteux et robuste mais aussi sélectif, sensible, fiable, reproductible et si possible versatile. La sélectivité d'un test de diagnostic

biomédical tient en la capacité à détecter spécifiquement un biomarqueur donné au sein d'un fluide biologique complexe (sang, salive, larme, sueur, liquide céphalo- rachidien...) contenant de nombreuses autres molécules, potentiellement capables d'interférer. La sensibilité d'un test quant à elle repose sur la capacité à détecter dans un échantillon donné des concentrations ou variations de concentration en analyte d'intérêt suffisamment faibles. Ce paramètre est important pour les diagnostics précoces car il permet surtout d'avoir accès à des fluides biologiques accessibles, dont la ponction est peu invasive, où les concentrations en analyte d'intérêt sont particulièrement faibles (c'est notamment le cas de la salive et de la sueur). Pour ce qui concerne la versatilité d'un test de diagnostic, celle-ci repose sur la capacité d'une technologie analytique donnée à pouvoir être déclinée facilement pour détecter des molécules de nature très différente (acides nucléiques, protéines, molécules organiques ou inorganiques de bas poids moléculaire, ions) par un protocole standardisé.

De manière générale, il est très difficile dans un échantillon complexe de détecter directement une cible de par ses caractéristiques physico-chimiques propres, lesquelles sont généralement indifférenciables de celles des autres molécules présentes dans l'échantillon. La stratégie globalement répandue consiste à tirer parti d'une molécule sonde ou d'un marqueur dont les caractéristiques physico-chimiques propres permettent de révéler indirectement la présence de la molécule cible par un moyen de reconnaissance ou d'interaction spécifique avec celle-ci. Si la sélectivité est principalement liée à la nature des interactions ou de la reconnaissance cible/sonde, la sensibilité dépend quant à elle de la capacité à traduire cet événement en un signal facilement mesurable et exploitable. Pour ce faire, différentes stratégies d'amplification du signal peuvent être mises en place, celles-ci pouvant se situer soit au niveau du mode de détection à proprement parler et de son instrumentation associée, soit au niveau moléculaire ou biomoléculaire, *via* la mise en œuvre de marqueurs ou molécules sondes capables d'induire des réactions d'amplifications moléculaires. Ce travail de thèse s'inscrit dans le contexte des amplifications moléculaires d'un signal basées sur la synthèse et l'étude de molécules sondes particulières, à l'origine de l'amplification. Dans ce but, nous allons tout d'abord présenter les différents types de stratégies d'amplification que nous souhaitons aborder, puis nous décrirons des exemples tirés de la littérature illustrant ces concepts.

1.1 Généralités sur les stratégies d'amplification

Afin de tenter de décrire d'une manière générale et synthétique les différentes stratégies d'amplification qui ont été jusqu'alors développées, nous allons dans cette section considérer une cible à détecter **X** et une sonde ou récepteur **A**, spécifique de la cible **X**. Pour se rapprocher au plus près des travaux réalisés dans cette thèse, nous avons choisi de présenter les différentes stratégies d'amplification selon trois cas de figure, considérant l'état de la cible **X**. Lors de sa réaction avec la sonde **A**, la cible **X** peut être soit consommée, régénérée, ou encore amplifiée (répliquée).

1.1.1 Consommation de la cible

1.1.1.1 Sans amplification du signal

Considérons d'abord la réaction entre **X** et **A** comme une simple réaction réversible, sans amplification, telle que présentée sur la FIGURE 1.1 :

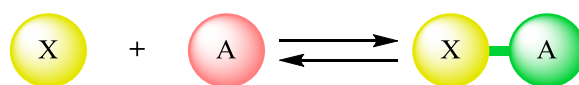


FIGURE 1. 1 Modèle pour la consommation de la cible sans amplification

Dans le cas où la réaction entre **X** et **A** conduit à une modification des propriétés physicochimiques du récepteur **A** ou de la cible **X**, la détection de la réaction, c'est-à-dire le suivi de l'apparition de la molécule formée **X-A**, se fait par lecture directe d'une variation de signal (par exemple par spectroscopie UV-vis, fluorimétrie ou encore électrochimie). Dans ce cas simple, aucune amplification à proprement parler n'est mise en œuvre, à savoir que la quantité de **X-A** à détecter est équivalente, au maximum, à la quantité de cible **X** initialement présente en solution.

1.1.1.2 Avec amplification du signal

En complément du précédent concept, la molécule **X-A** nouvellement formée peut dans certains cas avoir une réactivité propre lui permettant ainsi de transformer un substrat **S** (ajouté en large excès par rapport à **X**) en un produit **P** (FIGURE 1.2).

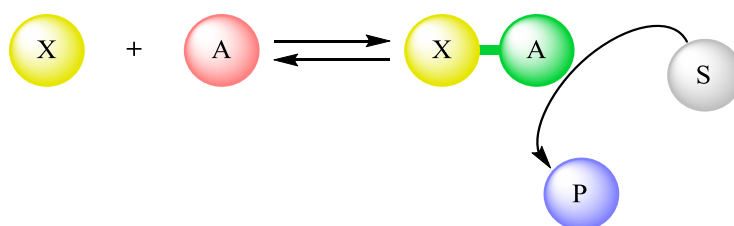


FIGURE 1. 2 Modèle pour la consommation de la cible avec amplification

Dans ce cas, la détection peut se faire par le suivi de la disparition de **S** ou de l'apparition de **P**, si ceux-ci ont des caractéristiques physico-chimiques particulières. Par exemple, **P** (ou **S**) peut être un colorant, un fluorophore, ou même une molécule électroactive. Dans un but de simplification, nous considérerons par défaut dans la suite que **P** est la molécule qui permet de suivre la réaction.

Dans la réaction présentée FIGURE 1.2, la molécule **X-A** est conservée lors de la transformation de **S** en **P**, jouant ainsi un rôle de catalyseur. Ceci implique que pour la formation d'une seule molécule **X-A**, de nombreuses molécules **S** et **P** sont respectivement consommées et produites. Après un temps de réaction donné, la quantité de produit **P** accumulé est bien supérieure à la quantité de cible **X** initialement présente en solution. Cette stratégie de détection correspond à la forme la plus simple et la plus classique d'amplification moléculaire d'un signal. Cette amplification est linéaire en fonction du temps et son facteur d'amplification directement relié au rapport entre la concentration en produit **P** accumulé et la concentration initiale en **X**. Ce facteur dépend de la vitesse de la réaction catalytique, mais aussi du temps de réaction.

Dans certains cas, il n'y a qu'une faible différence de réactivité entre la sonde **A** et la molécule formée **X-A** (voire même aucune différence), c'est-à-dire que **A** (généralement ajouté en excès) est tout aussi capable de réagir avec **S** que **X-A** (FIGURE 1.3). Il est alors nécessaire d'inclure une étape de séparation physique entre la fraction liée **X-A** et la fraction libre **A** pour de nombreux systèmes, afin de ne suivre que le signal issu de la réaction entre **X** et **A** (**X-A**).

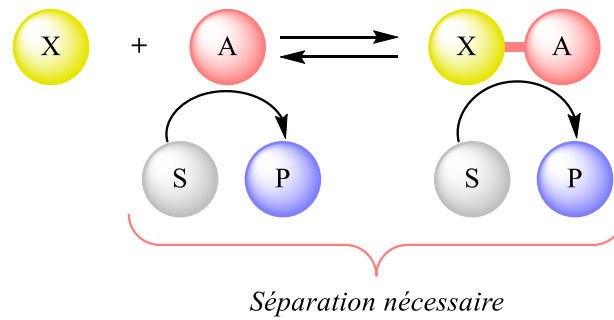


FIGURE 1. 3 Modèle pour la consommation de la cible avec amplification et étape de séparation

Ce type de procédure de séparation est typique des tests immunologiques sur phase solide, que nous présenterons par la suite.

1.1.2 Régénération de la cible

Considérons maintenant que la cible **X** n'est plus consommée au cours de sa réaction avec la sonde **A**, mais qu'elle permet au contraire de convertir la sonde **A**, présente en excès, en un produit **P** détectable. La réaction globale de ce processus est présentée **FIGURE 1.4**.

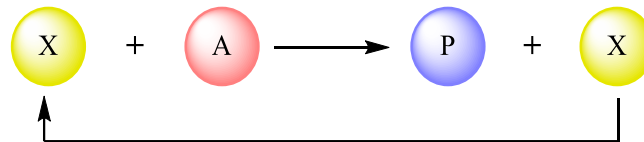


FIGURE 1. 4 Modèle pour la régénération de la cible

Dans cette configuration, la cible **X** est simplement un catalyseur de la transformation de la sonde **A** en un produit **P**. Ainsi, à partir d'une quantité initiale de cible **X** en solution, une quantité bien plus grande de **P** à détecter est accumulée. De nouveau, cette amplification est linéaire en fonction du temps et son facteur d'amplification dépend de la vitesse de la réaction catalytique et du temps de réaction.

1.1.3 Amplification de la cible

Considérons cette fois, que la réaction entre la cible **X** et la sonde **A** en excès permette de produire **n** molécules **X** (avec $n > 1$) en concomitance avec un produit détectable **P**. La réaction globale d'un tel processus est présentée FIGURE 1.5.

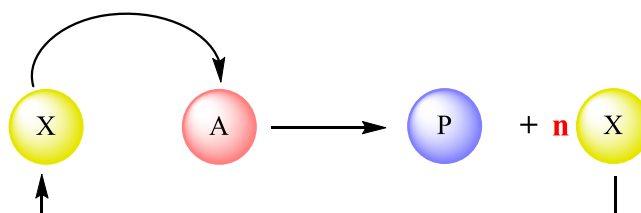


FIGURE 1. 5 Modèle pour l'amplification de la cible

Ce schéma réactionnel est typique d'une réaction auto-catalytique, laquelle repose sur la capacité d'un composé à catalyser sa propre formation (ce que fait ici la cible **X**). En 1890, Ostwald¹¹⁻¹³ définit l'auto-catalyse comme un processus dont la vitesse s'accélère avec le temps. L'accumulation de **P** n'est plus linéaire dans ce cas mais de nature exponentielle, caractérisée par une phase de latence. Cette dernière correspond au temps nécessaire à ce qu'une quantité suffisante de molécules **P** ait été produite pour être détectable avec un mode de détection donné. Ce temps de latence peut-être d'ailleurs utilisé comme un paramètre analytique puisque directement corrélé à la concentration initiale en **X**.

Ce type d'amplification moléculaire est particulièrement efficace puisque le facteur d'amplification dans ce cas est une fonction exponentielle du temps. C'est d'ailleurs la stratégie la plus couramment employée pour détecter l'ADN jusqu'à quelques copies dans quelques dizaines de microlitres. La capacité naturelle des bactéries à croître par duplication sur un milieu adapté (c'est-à-dire grâce à la réplication de son ADN) est aussi utilisée pour dénombrer *in fine* à l'œil nu le nombre de bactéries présentes initialement dans un échantillon donné.

Voyons maintenant quelques exemples de mise en œuvre de ces stratégies pour des cibles biologiques de différentes natures telles que des acides nucléiques, des protéines, des ions ou petites molécules.

1.2 Stratégies d'amplification pour la détection d'acides nucléiques

La détection d'acides nucléiques est couramment employée pour déterminer la présence de nombreux agents pathogènes (virus, bactéries, champignons, *etc.*) dans des échantillons biologiques donnés. Les trois stratégies de détection précédemment décrites que sont l'amplification par consommation de la cible, par sa régénération ou par sa réplication ont toutes été mises à profit pour détecter des acides nucléiques. Le point commun caractérisant ces différentes méthodes est que la sonde **A** est systématiquement un brin oligonucléotidique de séquence complémentaire à celui de la séquence d'acide nucléique cible **X**. La sonde oligonucléotidique **A** est d'ailleurs le récepteur naturel qui permet de détecter avec une grande spécificité le brin oligonucléotidique cible par hybridation complémentaire¹⁴ et formation d'une double hélice. Par ailleurs, le fait d'avoir à disposition toute une machinerie biomoléculaire telle que les polymérases (enzymes capables de répliquer un brin d'ADN complémentaire par polymérisation en chaîne), les endo- ou exo- nucléases (enzymes capables de couper sélectivement un double brin à un site de coupure donné) ou encore les ligases (enzymes capables de catalyser la jonction entre deux séquences d'acides nucléiques) est particulièrement propice à l'élaboration de stratégies d'amplification très variées et efficaces.

1.2.1 Exemples avec consommation de la cible

1.2.1.1 Stratégies sans amplification du signal *via* l'utilisation de balises moléculaires fluorescentes

Les balises moléculaires¹⁵ (ou *molecular beacons*) sont des sondes d'hybridation oligonucléotidiques généralement structurées en épingle à cheveux (ou *hairpin*), avec en extrémité 3' ou 5' un marqueur fluorophore dont la fluorescence est quenchée par la proximité d'un groupement quencheur en position opposée 5' ou 3' (FIGURE 1.6).

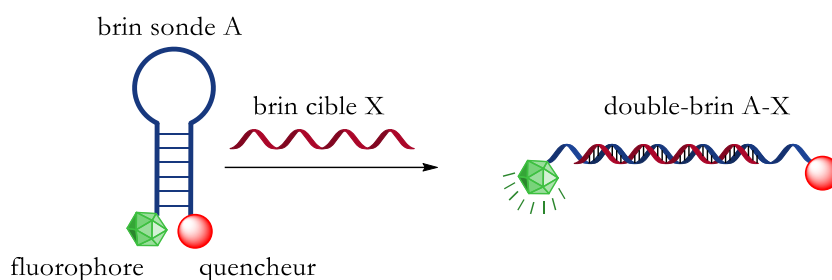


FIGURE 1. 6 Mode d'action d'une balise moléculaire, adaptée selon les travaux du groupe de Tyagi et Kramer¹⁵

En présence d'un brin d'acide nucléique cible **X**, l'hybridation de celui-ci à la séquence complémentaire **A** de la balise moléculaire permet alors de restaurer la fluorescence du fluorophore *via* la séparation spatiale du quencheur à travers l'hybridation. Il suffit de mesurer l'augmentation de la fluorescence produite en phase homogène pour ainsi détecter l'acide nucléique cible **X**. Comme décrit dans la section 1.1.1.1, le nombre de fluorophores activés **X-A** est directement proportionnel à la quantité de cible **X** initialement présente. Pour ce type de système, la limite de détection est corrélée à la capacité à détecter sensiblement le fluorophore, ou plus exactement l'augmentation de fluorescence qui résulte de la séparation spatiale du couple quencheur/fluorophore, ce qui se fait classiquement à l'échelle du nanomolaire.

1.2.1.2 Stratégies avec amplification du signal *via* l'activation/désactivation d'une enzyme (biocatalyseur)

L'activation/désactivation d'une enzyme est directement corrélée à la présence ou l'absence de son centre prosthétique. Dans l'exemple proposé, l'équipe de Décout¹⁶ allie la désactivation d'une flavine réductase à la détection d'une séquence cible d'acide nucléique **X**. Pour cela, un brin sonde d'acide nucléique **A** a été greffé sur le cofacteur flavinique de l'enzyme. En absence de cible **X** l'enzyme possède une activité flavine réductase, c'est-à-dire qu'elle catalyse la transformation du substrat NADH en NAD⁺ en présence d'oxygène moléculaire.

Dans ce système, en présence de la cible **X**, le duplex **X-A** se forme par hybridation du brin oligonucléotidique cible avec le brin complémentaire **A** provoquant ainsi par compétition la dissociation du cofacteur flavinique de la poche enzymatique, ce qui a pour effet de désactiver l'enzyme (FIGURE 1.7). Il suffit alors de mesurer la perte d'activité du catalyseur enzymatique *via* une détection spectrophotométrique du NADH pour remonter à la concentration en oligonucléotide cible.

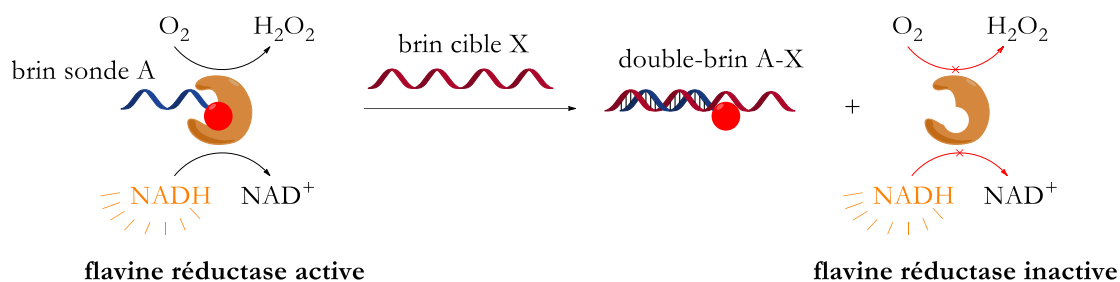


FIGURE 1. 7 Amplification du signal par la dénaturation d'une enzyme, selon l'équipe de Décout¹⁶

Grâce à cette méthode, l'équipe de Décout a pu détecter jusqu'à 50 nM d'une séquence cible **X** après 2 heures de réaction enzymatique. Une limite de détection, qui malgré l'amplification catalytique du signal, reste moins bonne en termes de performance analytique que celle généralement atteinte avec l'aide des balises moléculaires présentées précédemment (section 1.2.1.1). Selon nous, le fait que le NADH soit un moins bon fluorophore que ceux typiquement utilisés dans les balises moléculaires, c'est-à-dire que son rendement de fluorescence est moindre, explique en partie cette performance mitigée par rapport à une approche sans amplification telle qu'avec les balises moléculaires.

1.2.2 Exemple de régénération de la cible assistée par une enzyme, la méthode EATR

Nous allons maintenant présenter un système dans lequel la séquence cible **X** joue le rôle de catalyseur, et est donc régénérée au cours de la réaction, comme cela a été présenté dans la section 1.1.2. La méthode EATR, ou recyclage de la cible assistée par une enzyme (en anglais *enzyme assisted target recycling*), a été développée pour la première fois par le groupe de Plaxco en 2010¹⁷. L'approche combine l'utilisation de balises moléculaires à la capacité d'une exonucléase, l'exonucléase III, à hydrolyser spécifiquement base après base le brin complémentaire d'une séquence d'ADN hybridée sous forme d'une double hélice, permettant ainsi de recycler le brin cible **X** tout au long de la réaction et de générer par là même un signal fluorescent (FIGURE 1.8).

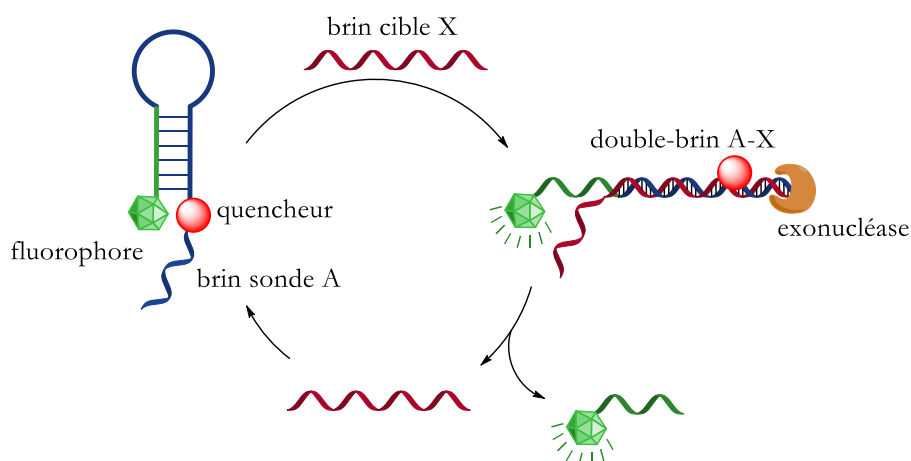


FIGURE 1. 8 Schéma de l'EATR

Pour que ce système puisse fonctionner, il est essentiel que l'exonucléase III n'hydrolyse pas la partie double brin de la balise moléculaire. Cela est rendu possible en introduisant une chaîne pendante à l'extrémité 3' de l'*hairpin*, empêchant ainsi l'exonucléase III de réagir (l'exonucléase III ne peut digérer que les doubles brins d'ADN à bouts francs). Ce n'est qu'en présence du brin cible **X** qu'un bout franc est formé par hybridation à l'extrémité 3'. Après digestion complète de la balise, d'une part la cible **X**, restée intacte au cours du processus, s'engage dans une nouvelle hybridation avec une nouvelle balise, et d'autre part le fluorophore est séparé spatialement du quencheur. La détection de la cible **X** est donc suivie grâce à l'augmentation de la fluorescence de la solution. Cette stratégie permet une amplification linéaire du signal au cours du temps, améliorant ainsi les performances analytiques par rapport à une balise moléculaire seule. Ainsi, après 2 heures d'incubation à 37 °C, un seuil de détection de l'ordre du picomolaire peut être obtenu. D'autre part, les auteurs ont même montré que si l'incubation de la solution était faite à 4 °C pendant au moins 24 heures, une détection jusqu'à 20 aM était possible. Ce gain en sensibilité est dû, selon les auteurs, à la suppression quasi-totale à faible température de l'activité résiduelle de l'exonucléase III vis-à-vis des balises moléculaires.

1.2.3 Exemples d'amplification de la cible

1.2.3.1 La réaction de polymérisation en chaîne, PCR

En 1986, Kary Mullis décrit une méthode qui permet de cibler un fragment spécifique d'un génome et de l'amplifier enzymatiquement par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR d'après l'anglais *polymerase chain reaction*)¹⁸. Cette méthode extrêmement sensible, qui permet de détecter spécifiquement un ADN jusqu'à hauteur d'une copie dans un échantillon de 20 µL, a

révolutionné le domaine de la biologie moléculaire et de la détection d'acides nucléiques. Mullis a d'ailleurs reçu le prix Nobel de chimie en 1993 pour cette invention¹⁹.

Un cycle de PCR correspond à une succession de cycles thermiques (FIGURE 1.9) permettant successivement de dénaturer l'ADN double-brin à 95 °C (séparation de l'ADN en deux brins simples), puis d'hybrider les amorces sens et anti-sens au deux brins simples à 50 °C, et ensuite de recopier chacun des brins complémentaires à 72 °C à l'aide d'une ADN polymérase thermostable, utilisant les amorces hybridées comme point de départ pour la polymérisation en chaîne de l'ADN.

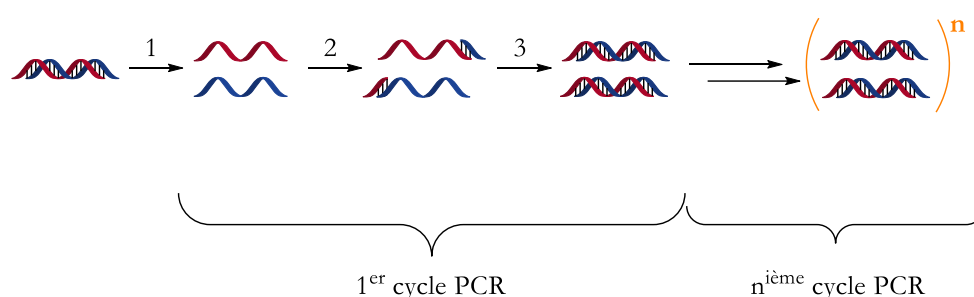


FIGURE 1. 9 Cycle de PCR : (1) Dénaturation des brins 95 °C (2) Hybridation des amorces à 50 °C (3) Elongation par l'ADN polymérase à 72 °C

A chaque cycle de PCR, la séquence d'ADN double brin cible est ainsi répliquée en deux exemplaires identiques, doublant la concentration de cible à chaque cycle. Après n cycles de PCR on obtient une loi d'amplification en 2^n copies de la cible. La variation de la quantité d'ADN peut ainsi être estimée en fin de réaction ou même suivie en temps réel à l'aide de sondes fluorescentes²⁰ ou redox²¹. Grâce à la très grande spécificité de la réaction PCR, à son caractère d'amplification auto-catalytique, et à une cinétique enzymatique de polymérisation en chaîne particulièrement efficace, il est possible d'atteindre des performances analytiques ultimes jusqu'à une copie d'une séquence d'acides nucléiques dans quelques dizaines de microlitres.

Afin de s'affranchir des cycles de températures inhérents à la PCR, au cours de ces dernières années, de nombreuses autres méthodes d'amplification auto-catalytique d'acides nucléiques ont vu le jour (NASBA, SMART, SDA, RCA, LAMP, iMDA, HDA, SPIA, EXPAR)^{22,23} à travers des stratégies d'amplifications dites isothermes de l'ADN. Parmi les nombreux exemples décrits dans la littérature, nous avons choisi de décrire plus spécifiquement la technique EXPAR.

1.2.3.2 La réaction d'amplification exponentielle, EXPAR

La réaction d'amplification exponentielle, EXPAR (selon l'anglais *exponential amplification reaction*), permet comme son nom l'indique d'obtenir une accumulation exponentielle de la séquence cible **X** avec un facteur d'amplification de 10^6 à 10^8 en moins de 30 minutes²³. Elle se base sur l'utilisation d'une sonde oligonucléotidique particulière, possédant deux séquences complémentaires **A** de la cible **X** reliées par le site de reconnaissance **n** (*nicking site*) d'une endonucléase (FIGURE 1.10).

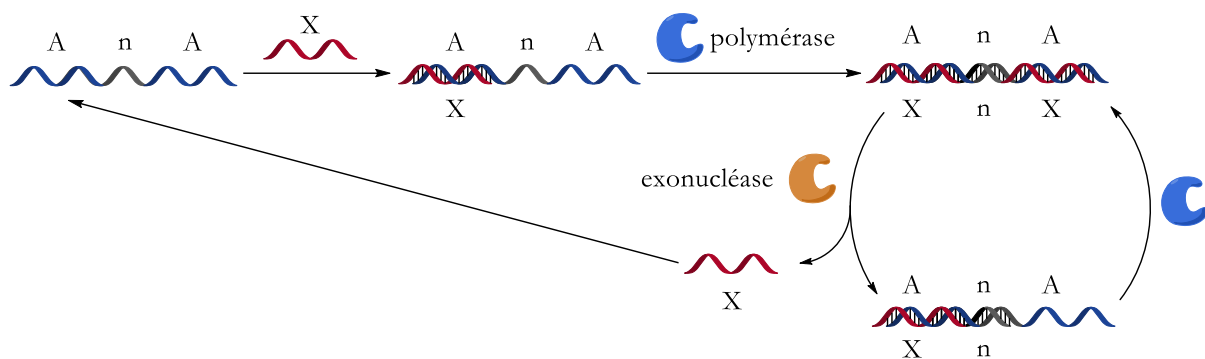


FIGURE 1. 10 Technique EXPAR^{22,24}

L'amplification exponentielle telle que schématisée FIGURE 1.10 se fait en plusieurs étapes :

- la cible **X** s'hybride à la sonde **AnA** pour former un pro-duplex **X-AnA**.
- la polymérase, en présence de nucléotides triphosphorylés, allonge la cible **X** hybridée pour former *in fine* le duplex **XnX-AnA**.
- l'endonucléase se fixe spécifiquement sur le site **n** double brin et clive le duplex **XnX-AnA** libérant à la fois une cible **X** et un duplex **Xn-AnA**.
- la cible **X** libérée s'hybride de nouveau avec une sonde **AnA**.
- le duplex **Xn-AnA** est disponible pour un nouveau cycle catalytique de génération de la cible **X** (élongation, coupure et relargage).

La combinaison de ces deux cycles réactionnels permet d'obtenir une réaction auto-catalytique autorisant l'amplification exponentielle de la cible **X**. Comme pour la PCR, l'accumulation d'ADN peut être mesurée *in situ* en temps réel à l'aide d'une sonde fluorescente ou rédox.

1.3 Stratégies d'amplification pour la détection de protéines

Les stratégies très performantes développées pour la détection d'acides nucléiques ne sont malheureusement pas transposables à la détection de protéines. La principale raison de cette impossibilité réside dans le fait que la réplication d'une protéine est un processus bien trop complexe pour être réalisée par un simple système enzymatique. C'est aussi la raison pour laquelle ce sont principalement des stratégies d'amplification du signal et non pas de la cible qui sont employées pour détecter des protéines.

Le système immunitaire fournit en revanche un récepteur versatile de choix, à savoir les anticorps, pour spécifiquement reconnaître à façon une très grande variété de protéines et même d'autres molécules ou biomolécules (telles que des drogues, hormones, bactéries, virus, *etc.*). L'interaction hautement spécifique anticorps-antigène assure ainsi la sélectivité du système. C'est en associant l'anticorps ou l'antigène à différents types de marqueurs que les chercheurs ont imaginé des systèmes analytiques où le signal mesurable est directement relié à l'interaction de reconnaissance immunologique. De nombreux formats d'immunodosages ont été imaginés et bien qu'il soit possible dans certains cas d'opérer directement en phase homogène, bon nombre de systèmes nécessitent une étape de séparation physique entre les anticorps ou antigènes marqués n'ayant pas réagis et les complexes immuns formés. Un exemple typique d'immunodosage avec marqueur fluorescent est présenté de façon schématique **FIGURE 1.11**, dans lequel la détection nécessite une séparation des fractions liées et libres.

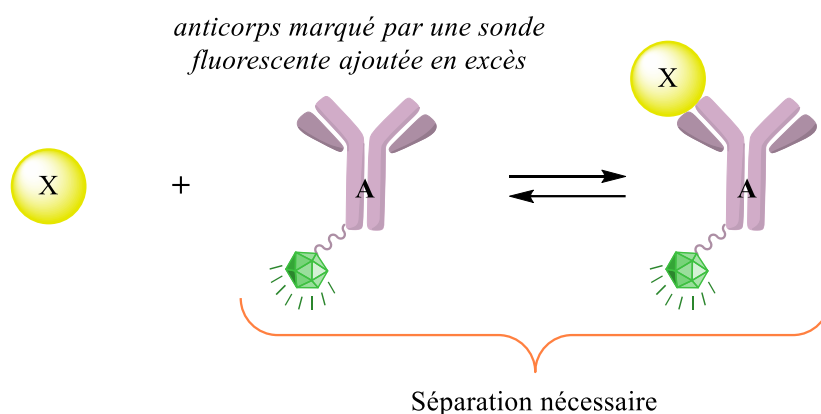


FIGURE 1.11 Etape de séparation entre anticorps libres et ceux engagés dans un complexe immun

1.3.1 Exemples de stratégies de détection immunologique avec amplification du signal

1.3.1.1 Techniques ELISA et ELISA digitale

Les techniques d'immunodosages dites ELISA (ou *enzyme linked immusorbent assay*) reposent d'une part sur l'utilisation d'une phase solide sur laquelle sont immobilisés les anticorps et d'autre part s'appuient sur des marqueurs enzymatiques dont on exploite les propriétés catalytiques pour amplifier un signal généralement colorimétrique ou fluorescent. La FIGURE 1.12 décrit les différentes étapes de ce test allant de la capture de la cible à sa révélation par l'apparition d'un signal optiquement mesurable.

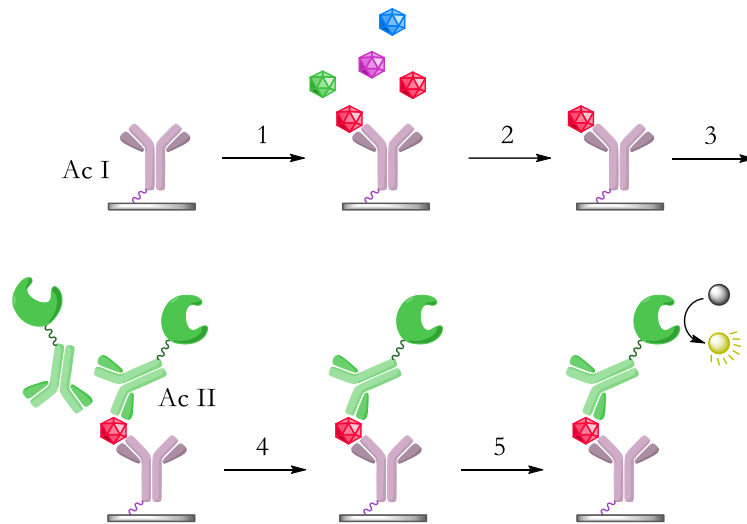


FIGURE 1. 12 Technique ELISA classique : combinaison d'un immunodosage sandwich et d'une détection colorimétrique du signal. (1) Introduction de l'échantillon à tester et capture de la cible par des anticorps primaires (Ac I) immobilisés sur une phase solide (paroi d'un micro-puit, surface d'une membrane, billes magnétiques, *etc.*). (2) Etape de lavage pour ne garder que les Ac I, avec ou sans cible, attachés à la phase solide. (3) Introduction d'anticorps secondaires marqués par une enzyme (Ac II) et liaison à la cible. (4) Etape de lavage pour séparer l'excès d'Ac II qui n'a pas réagi avec la cible. (5) Introduction du substrat enzymatique et accumulation du produit enzymatique coloré ou fluorescent avant détection.

La sensibilité d'un immunodosage ELISA dépend globalement de trois critères :

- la constante d'affinité des anticorps, laquelle doit être la plus grande possible vis-à-vis de la cible afin de maximiser son taux de capture. Généralement, la constante d'affinité des anticorps vis-à-vis de leur cible se situe entre 10^{-6} et 10^{-12} M^{-1} .

- l'efficacité catalytique de l'enzyme ou plus exactement son *turnover* qui correspond au nombre de molécules de produit formées par seconde. Celle-ci doit être élevée et est usuellement de l'ordre de 100 à 1000 s⁻¹.
- la capacité à détecter sensiblement le produit de la réaction enzymatique, laquelle dépend de la nature de la molécule produite. Si le produit émet de la fluorescence, il est efficacement détecté pour des concentrations de l'ordre de 0,1 à 1 nM, et s'il est électroactif cela se situe entre 1 et 10 nM.

En routine, ces tests permettent d'atteindre des limites de détection de l'ordre du picomolaire en cible. Or, comme nous l'avons mentionné dans l'introduction générale, c'est parfois insuffisant pour détecter certains biomarqueurs^{10,25}. C'est aussi la raison pour laquelle récemment de nouvelles stratégies de détection ELISA dite digitalisées ont été proposées. Ce nouveau concept proposé pour la première fois par le groupe de Walt² a été publié en 2010. Le principe est reporté sur la FIGURE 1.13.

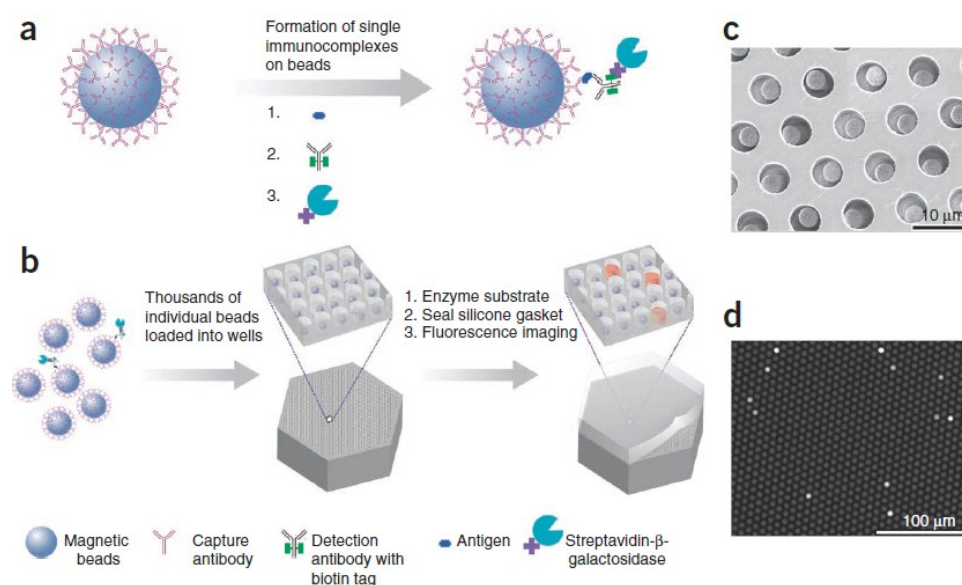


FIGURE 1. 13 Technique ELISA, figure extraite de l'article du groupe de Walt². (a) Capture des cibles protéiques par un immunodosage sandwich de type ELISA. (b) Chargement des billes magnétiques dans les puits de 50 μL pour l'isolation et la détection d'une molécule unique (c) Image MEB (microscopie électronique à balayage) d'une section de la plateforme (d) Résultat typique obtenu par fluorimétrie.

Il repose sur la digitalisation de la mesure d'un ELISA. Pour cela, un immunodosage de type sandwich ayant pour phase solide des microbilles magnétiques (*bead-based ELISA*) est couplé à une plateforme possédant un réseau de plusieurs dizaines de milliers de puits micrométriques, de

50 fL en volume, reliés chacun à une fibre optique qui permet une mesure individuelle de chaque puits. L'idée maitresse dans cette stratégie analytique est que le volume dans lequel le produit du marqueur enzymatique s'accumule est si faible que la détection de l'activité d'une seule enzyme est rendue possible. De plus, ces puits sont conçus afin qu'une seule bille puisse s'y insérer. A concentration très faible en protéines, la distribution statistique selon la loi de Poisson induit la présence d'au maximum un évènement de reconnaissance (*i.e.* 0 ou 1) par bille et donc par puits. Ainsi, il suffit de compter les puits qui « s'allument » en fluorescence pour déterminer la quantité absolue de protéine cible initiale. Cette méthode, nommée ELISA digitale, a été appliquée avec succès à des échantillons biologiques cliniques et a, par exemple, permis la détection de PSA jusqu'à 200 aM, ce qui correspond à un gain d'un facteur 1000 à 10000 en sensibilité par rapport à un ELISA classique. Elle est aujourd'hui commercialisée par la société Quanterix (sous l'acronyme de SiMoA d'après l'anglais *single molecule array*), qui a récemment signé un partenariat stratégique avec Biomérieux pour développer des kits.

1.3.1.2 Immuno-PCR

Le principe de l'immuno-PCR²⁶ consiste en la combinaison d'un immunodosage classique de type sandwich sur phase solide à l'amplification par PCR d'une séquence oligonucléotidique jouant le rôle d'un marqueur spécifique amplifiable (FIGURE 1.14).

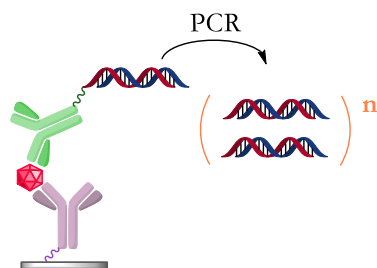


FIGURE 1. 14 Immuno-PCR, avec n le nombre de cycle PCR

Il s'agit ici de tirer parti du pouvoir amplificateur auto-catalytique de la PCR. Avec cette stratégie, potentiellement un seul évènement de reconnaissance est détectable puisque la PCR permet la détection d'une seule copie d'acide nucléique. Grâce à cette méthode la limite de détection d'un ELISA classique a pu être abaissée de 5 ordres de grandeur²⁷. Cependant, cette grande performance reste limitée par la complexité et le coût du procédé, nécessitant de nombreuses étapes incluant la PCR et le coût non-négligeable de ses réactifs, ce qui a pour effet de freiner

grandement l'implantation de cette technique sur le marché des outils de diagnostics biomédicaux.

1.3.1.3 Codes-barres biologiques (ou *bio-barcode assays*)

Le groupe de Mirkin a aussi développé un immunodosage de type sandwich différent de la technique ELISA⁹ (FIGURE 1.15), pour lequel la clé du dispositif est l'utilisation de nanoparticules d'or portant de courtes séquences oligonucléotidiques, les code-barres biologiques, en tant que marqueurs de l'anticorps secondaire.

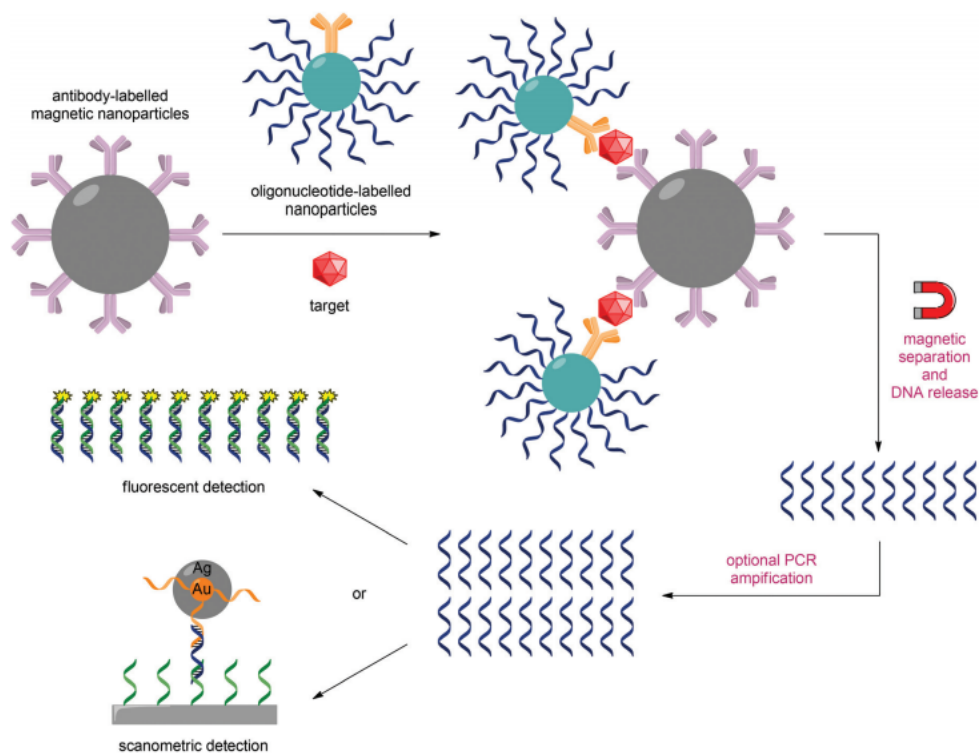


FIGURE 1. 15 Bio-barcode Assay développé par le groupe de Mirkin, figure extraite de la revue de Frost²⁸

Dans cette approche, la cible est d'abord capturée en sandwich entre un anticorps primaire porté par une bille magnétique et un anticorps secondaire greffé sur une nanoparticule portant les codes-barres biologiques. Après une étape de séparation magnétique, les codes-barres biologiques sont libérés dans le milieu par dissociation/dénaturation thermique ou chimique. L'amplification du signal vient du fait que chaque marqueur nanoparticulaire est capable de libérer plusieurs centaines d'un même brin d'ADN par évènement de reconnaissance. A ce stade deux stratégies de détection des brins d'ADN ainsi libérés peuvent être utilisées, après une éventuelle étape d'amplification de ces derniers par PCR. Une première possibilité consiste en une détection après

hybridation par scanométrie sur phase solide²⁹ et une deuxième possibilité repose sur une détection par fluorescence en introduisant des balises moléculaires³⁰. Bien que séduisante et efficace (autorisant une détection de la PSA jusqu'à 0,5 aM), cette technique reste très complexe et coûteuse, et à l'image de l'immuno-PCR, ne peut que difficilement s'implanter en tant qu'outil de routine dans les laboratoires d'analyse.

1.3.1.4 Stratégie d'amplification du signal impliquant l'activation d'un biocatalyseur

Le dernier exemple d'amplification du signal qu'il est intéressant de reporter ici, car proche de l'une des stratégies envisagées dans cette thèse (*cf* **Chapitre 2**), porte sur la mise en œuvre d'une stratégie de suramplification du signal *via* le couplage en cascade de plusieurs modes d'amplification afin de décupler les performances analytiques des immunodosages sandwich sur phase solide.

Parmi les divers exemples de systèmes d'amplification en cascade décrits dans la littérature, celui développé par le groupe de Meyerhof se révèle particulièrement intéressant. Le schéma de principe est reporté **FIGURE 1.16**. Il repose sur d'un côté l'utilisation d'anticorps secondaires marqués par des objets moléculaires dans lesquels des milliers de molécules de cofacteur PQQ sont isolées par encapsulation (sous forme de billes polymériques ou de liposomes^{31–33}) et de l'autre sur la reconstitution/réactivation d'une *apo*-glucose déshydrogénase présente en solution suite à la libération de ses cofacteurs par hydrolyse des capsules (par ajout d'un solvant ou de détergent).

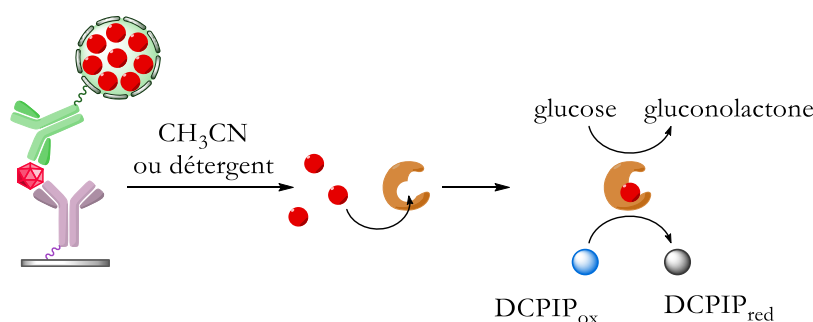


FIGURE 1. 16 Reconstitution de l'*apo*-sGDH pour la détection de la CRP

L'activité de la glucose déshydrogénase ainsi restaurée est suivie optiquement en fonction de la réduction des médiateurs rédox colorés. La PQQ-sGDH oxyde le glucose en gluconolactone et se réoxyde à l'aide d'un accepteur d'électron intensément coloré, le diclorophénolindophénol (DCPIP), qui est réduit en un produit incolore.

Cette stratégie d'amplification du signal s'avère particulièrement intéressante car elle combine plusieurs stades d'amplifications moléculaires démultipliant ainsi la sensibilité de la méthode. Meyerhoff et ses collaborateurs démontrent la possibilité de détecter une cible protéique telle que la protéine C réactive (CRP) jusqu'à des seuils de concentrations picomolaires. L'approche reste cependant affectée par la nécessité d'ajouter un solvant organique (ou un détergent), qui peut affecter à la fois la reconstitution de l'enzyme et sa réactivité.

1.3.2 Exemple de stratégie de détection impliquant une régénération de la cible

Même si la plupart des systèmes de détection de protéines sont basés sur des stratégies d'amplification du signal, il existe néanmoins quelques rares exemples associés à une stratégie d'amplification impliquant une régénération ou un recyclage de la cible protéique.

Le groupe de Willner a par exemple transposé en 2012 la méthode EATR (section 1.2.2) à la détection de la protéine thrombine³⁴ (FIGURE 1.17).

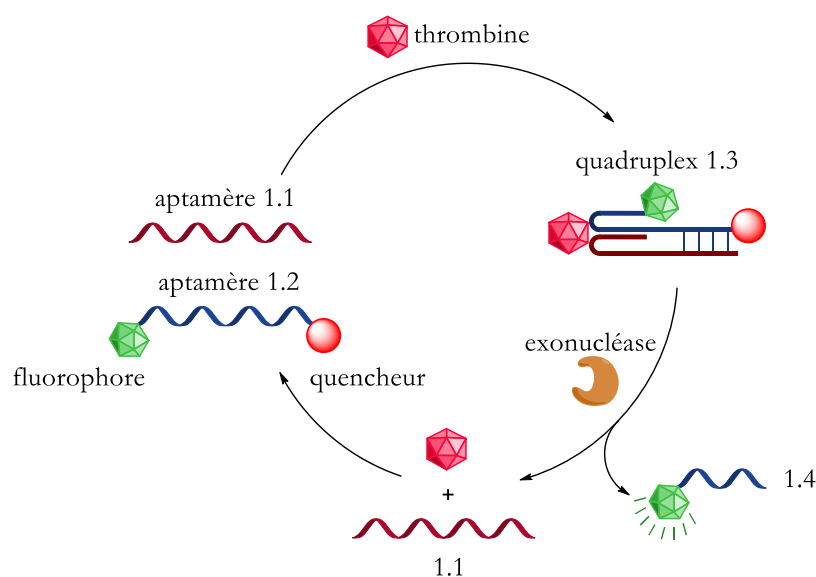


FIGURE 1. 17 Détection de la thrombine par recyclage de la cible

La méthode repose sur l'utilisation de deux courtes séquences d'aptamères (**1.1** et **1.2** sur la FIGURE 1.17) capables de se complexer spécifiquement à la thrombine en formant une structure de type quadruplex (**1.3** sur la figure). Le brin aptamère **1.2** est conçu de manière à être fonctionnalisé par un fluorophore et un quencheur respectivement à ses extrémités 5' et 3'. La faible distance qui sépare le couple fluorophore/quencheur dans la conformation relâchée de

l'aptamère **1.2** induit une extinction de la fluorescence du fluorophore par le quencheur. Une fois la thrombine en solution, la formation du complexe ternaire associant les deux sous-unités aptamères à la protéine s'effectue. En particulier, une région duplex apparaît, consistant en 4 paires de bases complémentaires formant un bout franc. Celle-ci est alors spécifiquement reconnue par l'exonucléase III qui digère alors les 4 nucléotides à partir de l'extrémité 3' de l'aptamère **1.2**, ce qui permet à la fois de libérer le quencheur et la thrombine en solution, et par là même d'autoriser une exaltation de la fluorescence du fluorophore. La thrombine libre quant à elle peut à nouveau interagir avec le réservoir d'aptamères **1.1** et **1.2** pour former le quadruplex **1.3** et ainsi enclencher une boucle d'amplification du signal.

Grace à cette méthode, une limite de détection en thrombine de 89 pM a pu être démontrée³⁴.

1.4 Stratégies d'amplification moléculaire d'un signal pour la détection de petites molécules

Alors que la PCR pour la détection des acides nucléiques et les immunodosages pour la détection des protéines sont des méthodes très courantes et relativement universelles, il n'existe en revanche pas de méthode équivalente pour détecter dans des fluides biologiques de petites molécules d'intérêts comme des ions, des petites molécules réactives (H_2O_2 , NO, H_2S , ONOO^- , OH $^-$, *etc.*), ou encore d'autres petites molécules d'intérêts biologiques (quinone, NADH, glucose, *etc.*). Ces analytes sont généralement de taille trop petite pour fournir en immunoanalyse des anticorps d'affinité et de spécificité suffisamment élevées. Si l'on souhaite détecter sélectivement et spécifiquement ces molécules dans des milieux biologiques complexes, il est donc nécessaire de développer des réactifs spécifiques capables de réagir/interagir spécifiquement avec ces analytes pour révéler leur présence. C'est ainsi qu'au cours de ces dernières années, l'émergence du concept de chémosenseur s'est très largement développé.

Deux grandes familles de chémosenseur existent, selon que la sonde choisie joue le rôle de récepteur supramoléculaire³⁵⁻³⁷ pour la cible dans un schéma de type hôte/invité (d'après l'anglais *host/guest*) (FIGURE 1.18) ou que la cible réagisse spécifiquement avec la sonde pour la transformer en un produit aux propriétés physiques différentes (FIGURE 1.19). Dans le second cas, la réaction de reconnaissance entre la cible et son récepteur correspond à l'attaque de la cible sur un groupement protecteur clivable (GPC) porté par la sonde **A**, ce qui entraîne la formation d'une nouvelle espèce capable de produire un signal mesurable (FIGURE 1.19, CAS A). Pour corréler le clivage du GPC à l'apparition d'une espèce aux propriétés mesurables, il est parfois

nécessaire d'avoir recours à un bras espaceur auto-immolant (BAI), (ou SIS d'après l'anglais *self-immolative spacer*) (FIGURE 1.21, CAS B). En principe, les espaceurs auto-immolants sont des assemblages covalents qui créent un lien physique entre un groupe partant et un groupe déclencheur masqué qui subira une déprotection sélective³⁸. La plupart de ces molécules d'intérêts contiennent un noyau aromatique portant un groupe mésomère donneur protégé, afin qu'il ne puisse pas déclencher seul le processus électronique de délocalisation.

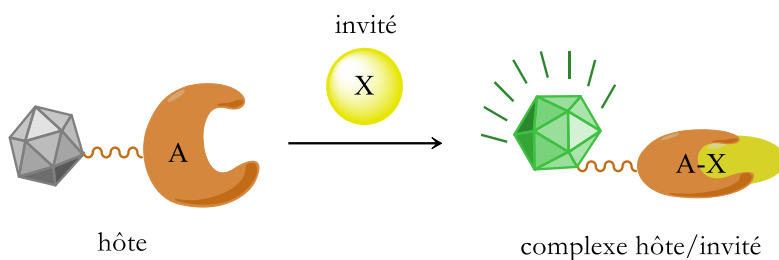
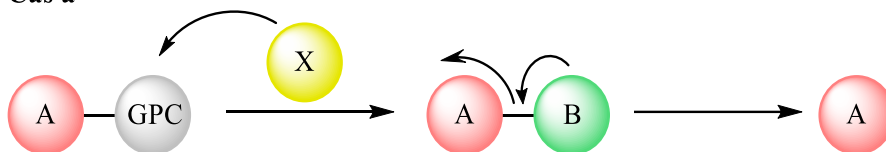


FIGURE 1. 18 Schéma de l'approche hôte/invité pour la détection moléculaire

Cas a



Cas b

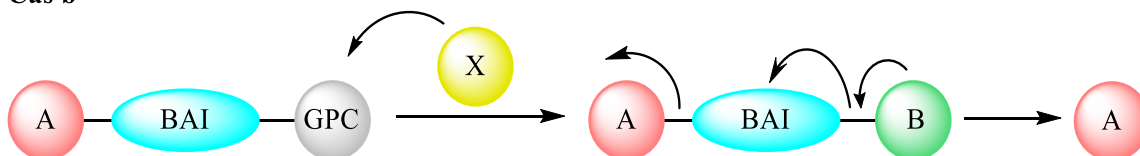


FIGURE 1. 19 En haut : cas simple **A** avec un GPC (groupement protecteur clivable) directement lié à la sonde **A**, et en bas : cas **B** avec un GPC séparé de la sonde **A** par un BAI (bras espaceur auto-immolant).

La littérature, abondante dans ce domaine, témoigne de l'originalité du chimiste pour révéler ces interactions supramoléculaires ou cette réactivité *via* des stratégies d'amplification moléculaires^{28,35,36,39,40}.

1.4.1 Exemples de stratégies de détection de petites molécules réactives avec amplification du signal et consommation de la cible

1.4.1.1 Catalyse allostérique

Dans la section 1.1.1.2, nous avons présenté schématiquement une amplification du signal par consommation de la sonde basée sur la différence de réactivité qu'il peut exister entre les réactifs, la cible **X** et la sonde **A**, et le complexe produit **X-A**, de telle sorte que le complexe **X-A** soit capable de transformer un substrat **S** en un produit **B** alors que ni **X** ni **A** n'en sont capables par eux-mêmes. Un exemple concret de ce type d'amplification est celui de l'amplification du signal par catalyse allostérique (SAAC d'après l'anglais *supramolecular assisted allosteric catalysis*), un concept pour lequel Zhu et Anslyn ont publié une mini-revue³⁶. Selon eux, la stratégie SAAC mime les processus de signalisation biologique, pour lesquels un événement de reconnaissance moléculaire, issu d'un stimulus extérieur sur un récepteur protéique, est allostériquement transduit en une information chimique catalytiquement amplifiée. Le groupe de Mirkin a d'ailleurs utilisé un système d'allostérie catalytique supramoléculaire pour la détection d'ions chlorures⁴¹ dont le principe est schématisé **FIGURE 1.20**.

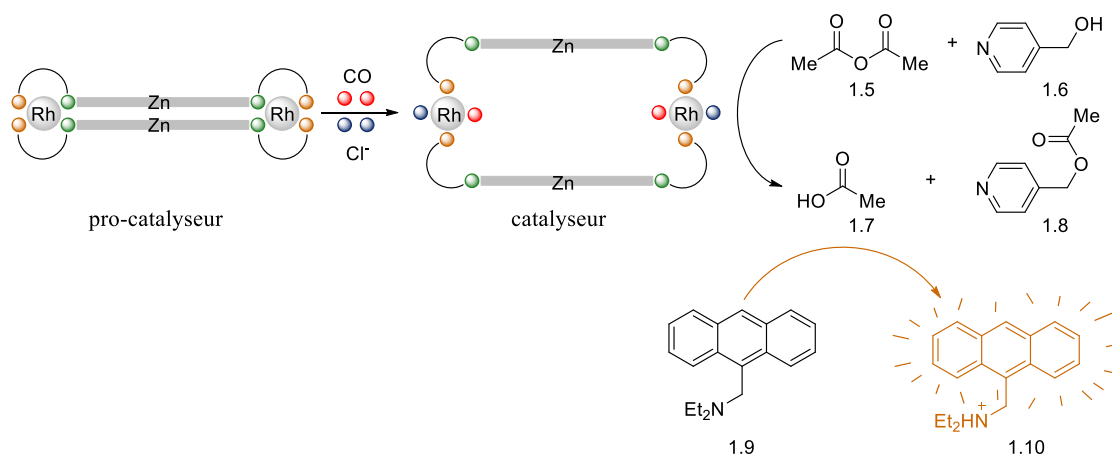


FIGURE 1.20 SAAC pour la détection d'ion chlorure⁴¹

Dans cet exemple, l'amplification repose sur l'utilisation d'un dimère $[Zn'salen]^{2+}$, (représenté par le **catalyseur** sur la **FIGURE 1.20**) qui est capable de catalyser l'acétylation du 4-pyridil carbinol **1.6** en présence de monoxyde de carbone et d'ions chlorures. Ce système se base sur la modification de la conformation du dimère, selon la présence ou l'absence d'effecteurs allostériques, qui influe fortement sur sa réactivité. En absence des effecteurs allostériques que

sont CO et Cl⁻, le catalyseur adopte une conformation « fermée » (*pro-catalyseur* sur la FIGURE 1.20) qui l'empêche de catalyser la réaction de transfert d'acétyle. Par contre, lorsque celui-ci est en présence de CO et Cl⁻, il prend une conformation « ouverte » et devient alors capable de catalyser la réaction. Lors de cette réaction d'acétylation, l'acide acétique **1.7** est produit, ce qui a pour effet de diminuer le pH du milieu. Ainsi, en utilisant un fluorophore **1.10** sensible au pH, les auteurs détectent 800 nM d'ions Cl⁻ en 6 heures.

1.4.1.2 Activation d'un biocatalyseur par reconstitution

Nous avons vu précédemment dans la section 1.3.1.4, concernant la détection de protéines, que le groupe de Meyerhoff a mis en place une stratégie d'amplification du signal basée sur la reconstitution d'un biocatalyseur, à savoir une *apo*-sGDH. Ce type d'approche a également été exploité par Pavlov en 2010 pour détecter de petites molécules telles que l'eau oxygénée⁴². Le principe est rappelé FIGURE 1.21.

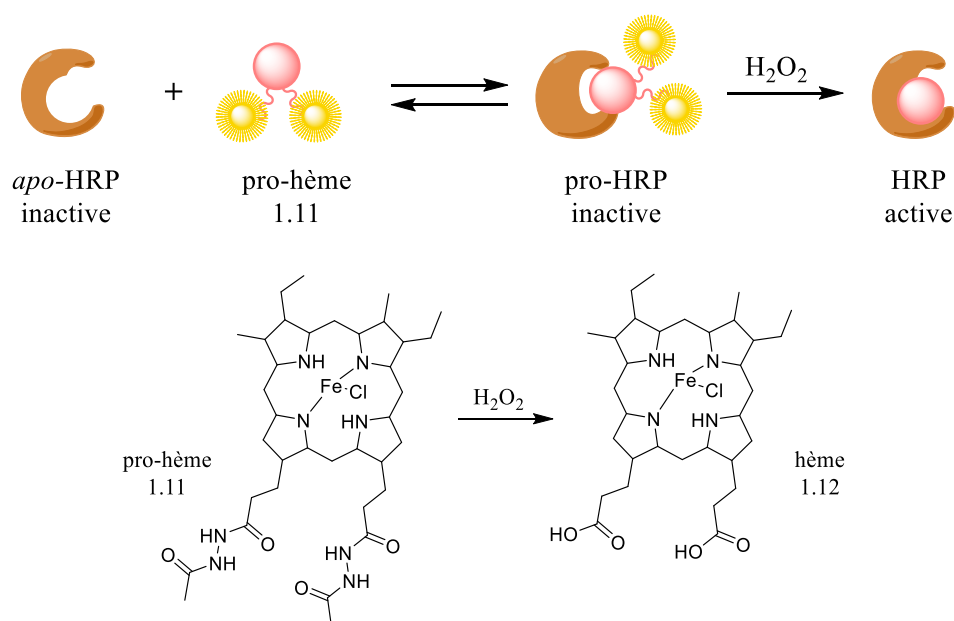


FIGURE 1. 21 Mécanisme proposé par le groupe de Pavlov⁴² pour la reconstitution oxydative de l'*apo*-HRP avec l'hème **1.12**

Comme Pavlov cherchait à détecter la cible H₂O₂, il a chimiquement modifié l'hème de la peroxydase du raifort (HRP) en y insérant des groupements protecteurs clivables acétylhydrazine, pour former le pro-hème **1.11**. Ce composé **1.11** ne peut réagir avec l'*apo*-HRP, ni même s'insérer complètement dans la poche enzymatique pour la réactiver car ses groupements hydroxyles sont masqués par les groupes acétylhydrazine, très stables en solution aqueuse.

Lorsque la molécule **1.11** est en présence d' H_2O_2 , elle est rapidement convertie en hème **1.12**, qui s'insère facilement dans la poche de l'*apo*-HRP et la réactive. Après quelques minutes d'incubation, l'activité de cette enzyme reconstituée est détectable par spectroscopie UV-vis en présence du co-substrat chromogène *tétra*-méthylbenzidine (TMB). La limite de détection obtenue *via* cette méthode est de 50 nM.

D'autre part, si l'on compare conceptuellement les schémas réactionnels des **FIGURE 1.20** et **1.21**, ils s'avèrent très similaires, ne se différenciant que par une étape supplémentaire puisque la cible ne permet pas directement l'activation du catalyseur HRP mais transforme d'abord la sonde **1.11** en un produit **1.12**, lequel alors active le biocatalyseur. Cette stratégie proposée par Pavlov et son groupe est d'ailleurs assez proche de celle qui va être développée dans le **chapitre 2** de cette thèse.

1.4.2 Exemples de régénération de la cible

1.4.2.1 Détection *via* l'approche aptamère

Dans la section **1.3.2**, nous avons présenté la détection de la thrombine *via* une déclinaison de la méthode EATR par le groupe de Willner. Or, ce groupe a aussi étendu ce concept à la détection de petites molécules comme la cocaïne³⁴ (**FIGURE 1.22**).

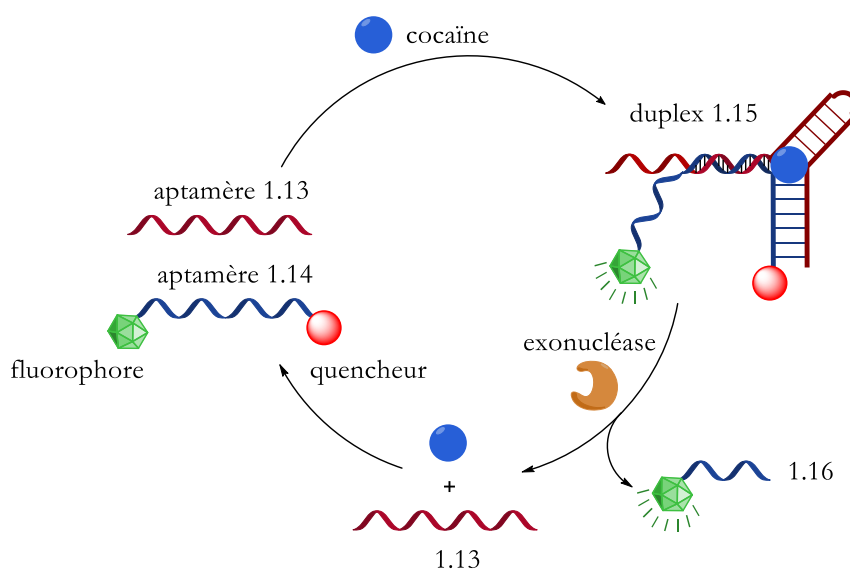


FIGURE 1. 22 Détection de la cocaïne selon le groupe de Willner

Encore une fois, la méthode du groupe de Willner se base sur l'utilisation de deux aptamères spécifiques, ici anti-cocaïne, **1.13** et **1.14**, qui sont capables de se complexer à la cocaïne pour former le duplex **1.15**. Comme précédemment l'un des aptamères porte un fluorophore et un quencheur à ses extrémités 5' et 3' respectivement. De nouveau lorsque le duplex cocaïne-aptamères se forme, il est rapidement reconnu par l'exonucléase III puis digéré au niveau de son bout franc 3', libérant alors dans le milieu le quencheur et la cocaïne. D'un côté, l'éloignement du couple fluorophore/quencheur permet d'obtenir un signal détectable par fluorescence, et de l'autre la cible est régénérée et peut à nouveau entamer un cycle catalytique. Cette fois-ci les auteurs indiquent une limite de détection de l'ordre 50 nM en cocaïne après 15 minutes de réaction.

1.4.2.2 Détection *via* l'auto-oxydation d'une hydroquinone

Un autre exemple de système d'amplification par régénération de la cible a été décrit par le groupe de Shabat⁴³, dans lequel il s'agit de détecter H_2O_2 . Pour cela, les auteurs font intervenir la déprotection spécifique d'un groupement protecteur clivable ester boronique sous l'action oxydante d' H_2O_2 , formant ainsi une hydroquinone qui immédiatement s'auto-oxyde en présence d' O_2 tout en régénérant un équivalent d' H_2O_2 (FIGURE 1.23).

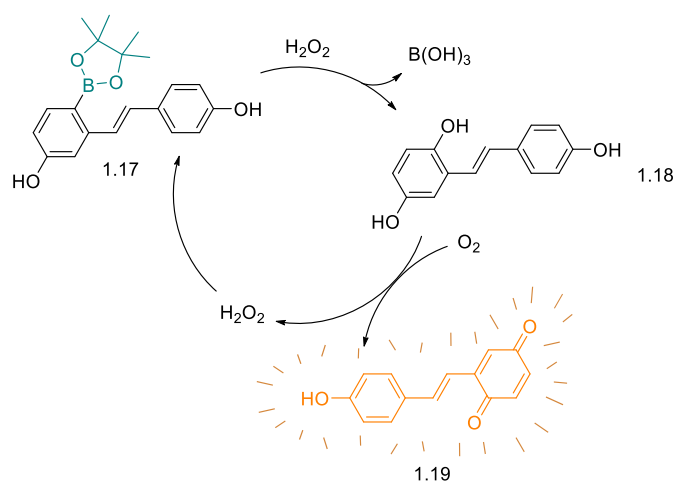


FIGURE 1. 23 Détection d' H_2O_2 selon le groupe de Shabat

Nous détaillerons ce système dans le **chapitre 3** de cette thèse puisque celui-ci a directement inspiré certaines des stratégies qui y sont développées.

1.4.3 Exemples de stratégies de détection de petites molécules avec amplification moléculaire auto-catalytique

1.4.3.1 Auto-catalyse allostérique

L'exemple de la SAAC développé par le groupe de Mirkin (FIGURE 1.20 section 1.4.1.1) a été adapté pour la détection de l'acétate. En effet, les auteurs ont observé que cet alcoolate, qui est un produit secondaire de la réaction d'acétylation, pouvait se lier à un site allostérique du pro-catalyseur et induire le réarrangement conformationnel nécessaire à l'activation du catalyseur. Ainsi, en présence d'acétate de *tétra*-butylammonium (TBAA) et sous atmosphère de monoxyde de carbone, l'acétate active la catalyse de sa propre formation selon le schéma de la FIGURE 1.24. Cette réaction est typique d'une réaction d'auto-catalyse, puisqu'à partir de la fixation d'un acétate sur le pro-catalyseur plusieurs acétates vont pouvoir être formés. Les auteurs montrent qu'il est possible de détecter 20 μM d'acétate en quelques heures *via* cette méthode.

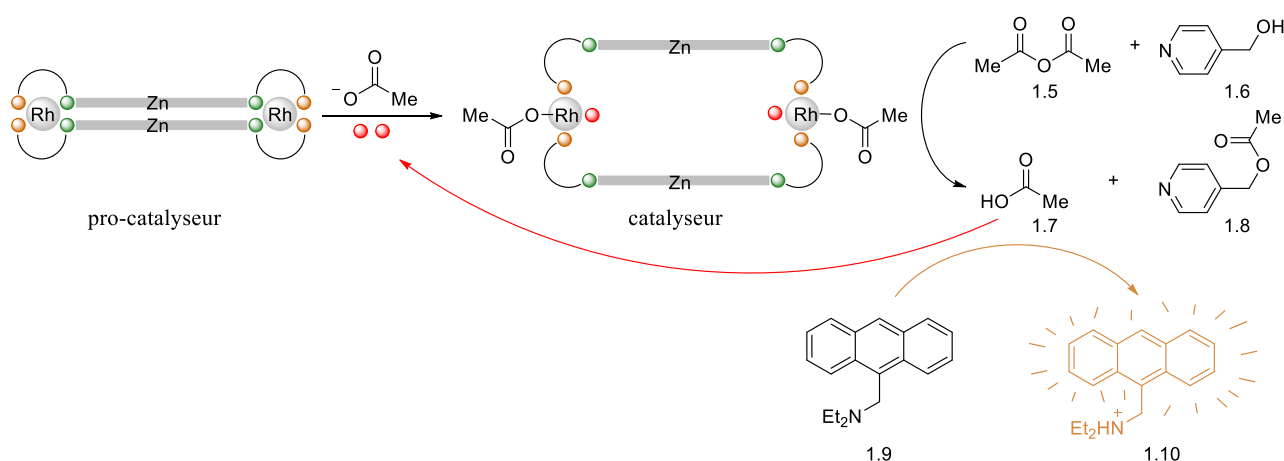


FIGURE 1. 24 SAAC pour la détection d'acétate

1.4.3.2 Amplification par auto-immolation dendritique

Au cours des dix dernières années, le concept d'amplification moléculaire du signal par auto-immolation a émergé dans la littérature. Shabat *et al.*, le qualifient également de réaction de dégradation dendritique en chaîne (DCR ou *dendritic chain reaction*)⁴⁰. Un dendrimère est un assemblage arborescent fait de plusieurs groupes fonctionnels identiques rattachés à un même noyau central. Le groupe de Shabat a été le premier à exploiter des chémosenseurs dendritiques

capables de libérer par un processus d'auto-immolation en chaîne plusieurs équivalents d'un même groupe partant sous l'action d'un effecteur donné (FIGURE 1.25).

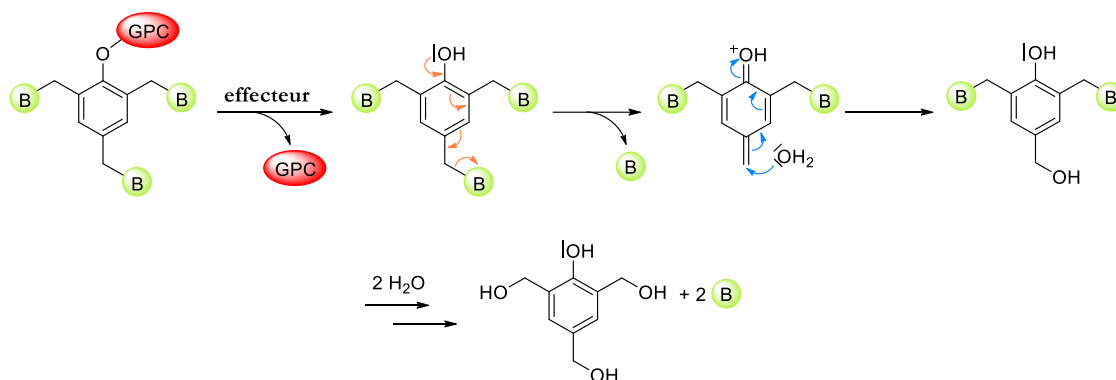


FIGURE 1. 25 Principe de l'auto-immolation

Lorsque le groupe partant est de même nature que l'effecteur, on a alors affaire à un schéma réactionnel auto-catalytique de déprotection en chaîne, lequel peut alors être mis à profit dans des applications analytiques.

1.4.3.2.1 Auto-immolation pour la détection d'ions fluorures, exemple de Shabat *et al.*

L'un des premiers exemples d'auto-immolation auto-catalytique à avoir été décrit est celui développé en 2011 par le groupe de Shabat⁴⁴ pour la détection sélective d'ions F^- comme indiqué FIGURE 1.26.

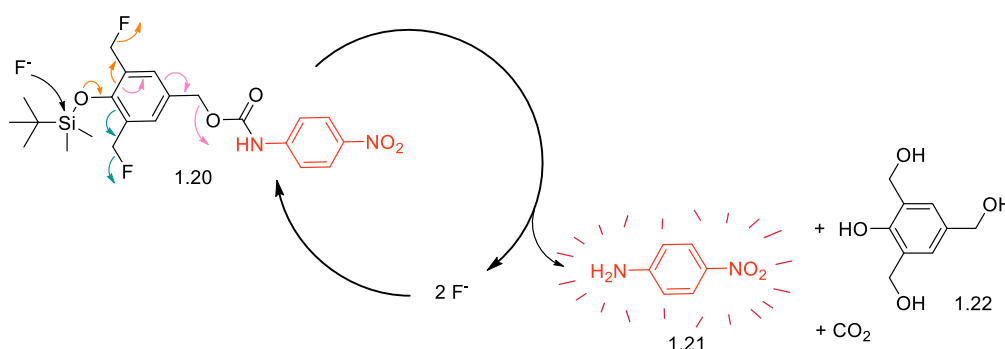


FIGURE 1. 26 Détection de F^- par auto-immolation et auto-catalyse⁴⁴

Pour cela le groupe de Shabat a synthétisé la sonde chémosensible **1.20**, laquelle se dégrade par auto-immolation sous l'action d'un ion fluorure. L'auto-immolation de cette molécule conduit à libération dans le milieu réactionnel de 2 équivalents de F^- et d'un colorant, la *para*-nitroaniline

1.21 permettant de suivre la réaction par spectroscopie UV-vis. Cette technique permet de détecter 2 μM de F^- (soit 0,004 équivalent) après plus de 10 heures de réaction avec la sonde **1.20** et avec des cinétiques de variation d'absorbance avec le temps qui sont caractéristiques d'une amplification auto-catalytique (FIGURE 1.27).

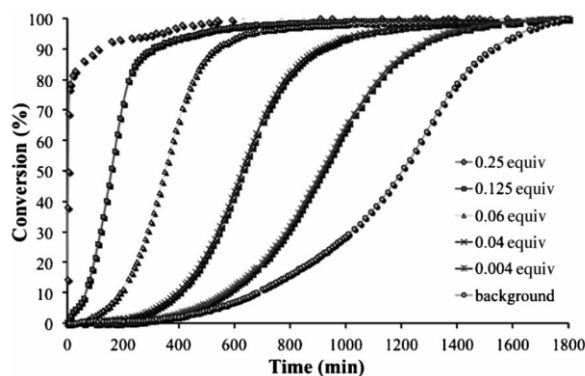


FIGURE 1. 27 Libération de la *para*-nitroaniline **1.21** par la sonde **1.20** (500 μM) dans un mélange ACN/DMSO (1:1) après l'addition de TBAF. Le suivi de la réaction a été effectué par spectroscopie UV-vis à 400 nm durant 1800 heures. Figure extraite de l'article de Shabat *et al.*⁴⁴

Malgré l'amplification auto-catalytique, la limite de détection n'est pas très bonne en raison d'une limitation par l'instabilité intrinsèque de la sonde chémosensible, qui en se dégradant, induit par auto-immolation spontanée au cours du temps un signal amplifié non-spécifique.

1.4.3.2.2 Auto-immolation pour la détection d'ions fluorures, exemple d'Anslyn *et al.*

Le groupe d'Anslyn a lui aussi utilisé une stratégie d'amplification moléculaire similaire pour détecter des ions F^- par spectroscopie de fluorescence, dont le schéma de principe est reporté FIGURE 1.28. Dans cette approche, la production auto-catalytique de fluorures est réalisée de manière indirecte *via* un fluorure de benzoyl jouant le rôle de source latente de F^- .

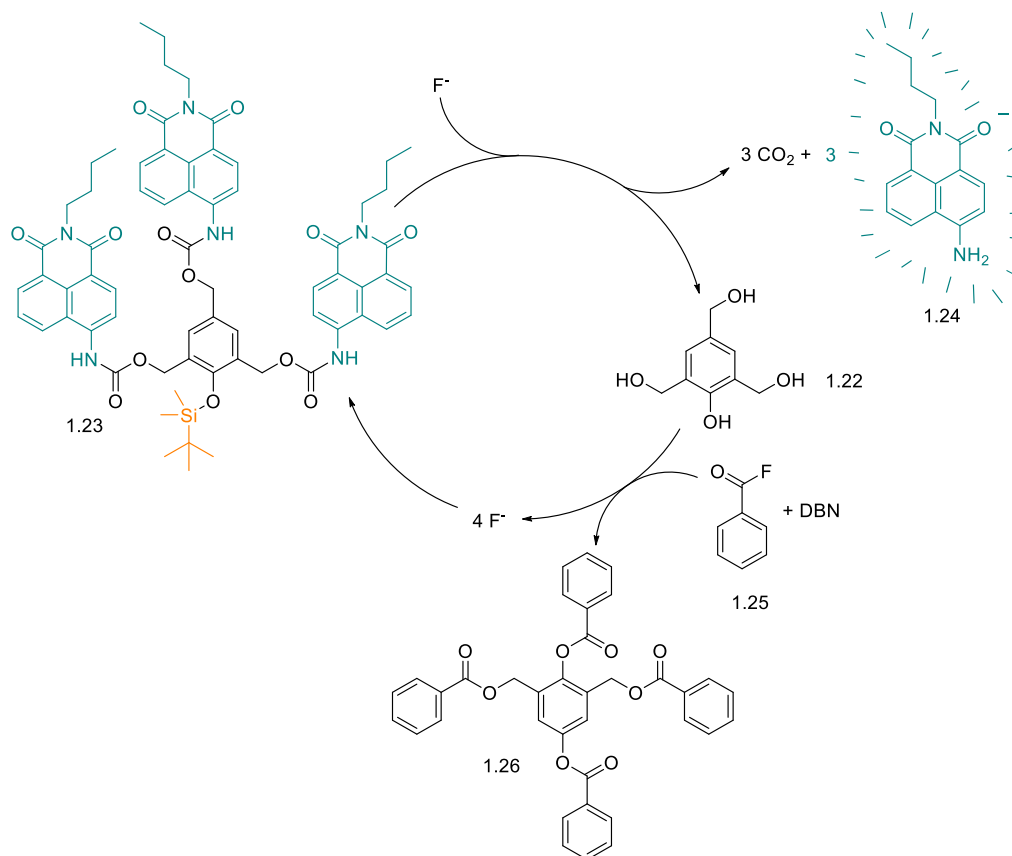


FIGURE 1. 28 Détection de F^- par auto-immolation et auto-catalyse, selon le groupe d'Anslyn⁴⁵

Ce système se différencie du précédent proposé par le groupe de Shabat de par le fait que la molécule sonde chémosensible **1.23** porte, en plus de son groupement protecteur clivable silylé, trois fluorophores 4-amino-1,8-naphthalimide **1.24**. En présence de F^- , la sonde **1.23** se dégrade par auto-immolation et libère donc directement trois équivalents de fluorophores ainsi que son centre quinone méthide. Celui-ci réagit alors avec l'eau présente dans le milieu réactionnel pour former le 2,4,6-hydroxyméthyl phenolate **1.22**. L'originalité de l'approche tient au fait que cette molécule **1.22** réagit avec le réservoir de fluorure de benzoyl **1.25** en présence de DBN pour générer plusieurs équivalents de F^- . Ces ions fluorures entrent de nouveau dans ce cycle auto-catalytique en initiant la dégradation par auto-immolation de la sonde **1.23**. Il est possible de détecter jusqu'à $0,4 \mu M$ de F^- (soit 0,02 équivalent) en 160 minutes à partir de $20 \mu M$ de sonde **1.23**, $4 \mu M$ de DBN et $200 \mu M$ de fluorure de benzoyl **1.25**.

1.4.3.3 Double dégradation dendritique en chaîne, la méthode 2CDCR

Le groupe de Shabat a aussi développé en 2010⁴⁶, la méthode 2CDCR (ou *2 components dendritic chain reaction*) afin d'améliorer la limite de détection des systèmes simples de DCR. Telle que

représentée **FIGURE 1.29**, la 2CDCR consiste en l'utilisation conjointe de deux sondes chémosensibles, l'une dendrimérique servant principalement à l'amplification de la cible, et l'autre simplement auto-immolante permettant la détection du signal.

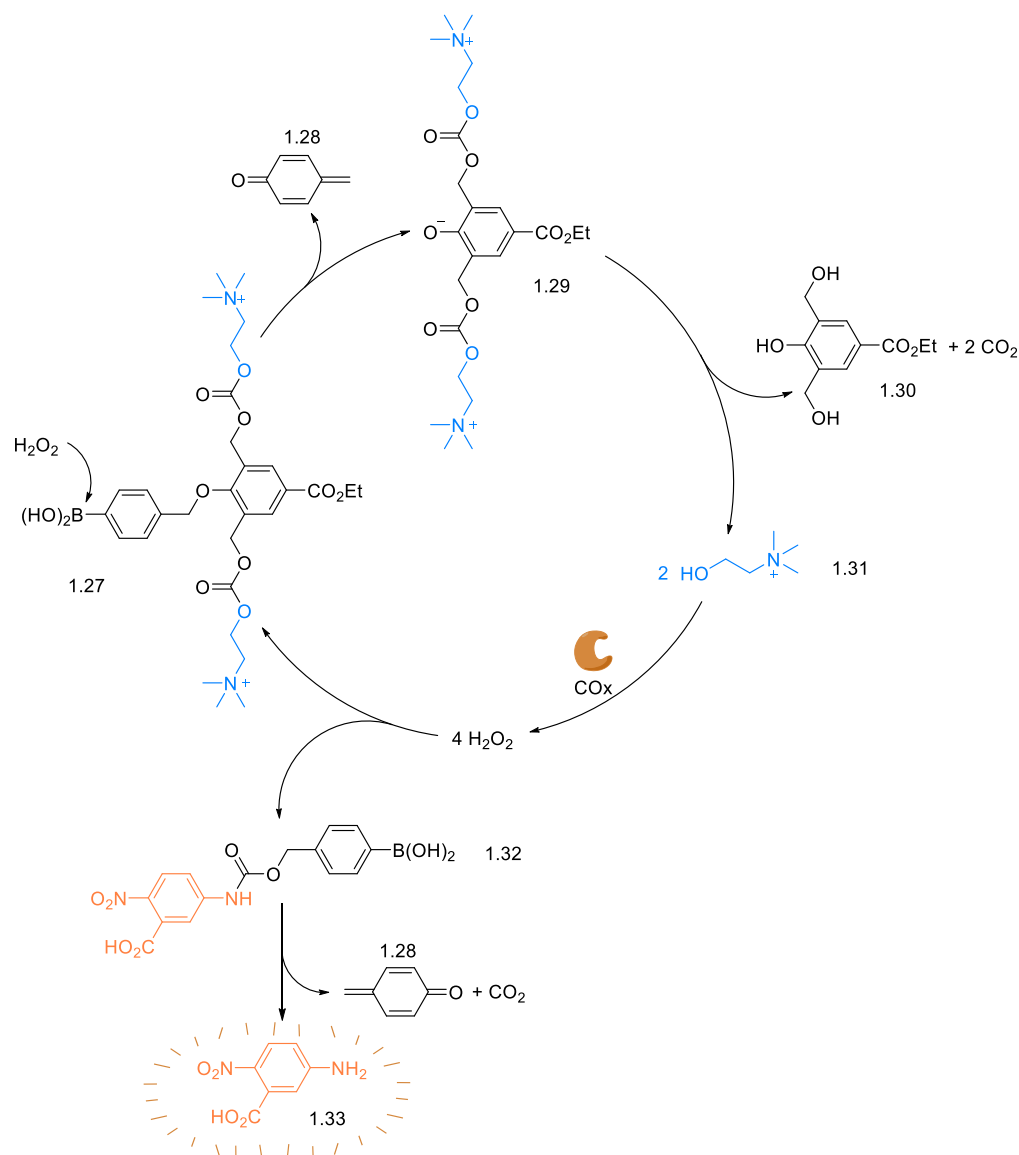


FIGURE 1. 29 Méthode 2CDCR pour la détection d' H_2O_2 , selon le groupe de Shabat⁴⁶

Chacune des sondes chémosensibles **1.27** et **1.32** porte un groupement protecteur acide boronique, capable de réagir spécifiquement avec H_2O_2 . Sous l'action oxydante d' H_2O_2 , la sonde **1.27** se transforme en un dérivé phénolate qui par auto-immolation en chaîne conduit ensuite à la libération de 2 équivalents de choline **1.31**. Ces 2 équivalents de choline libérés en solution sont ensuite oxydés par la choline estérase, laquelle en présence d' O_2 les convertie alors en

4 équivalents d' H_2O_2 . L' H_2O_2 généré peut à la fois réagir de nouveau avec la cible **1.27**, contribuant ainsi à un processus auto-catalytique, soit réagir sur la sonde **1.32**, laquelle par un même processus de réaction avec H_2O_2 et d'auto-immolation permet de générer 1 équivalent de colorant *para*-nitroaniline **1.33**, ce qui permet de suivre par spectroscopie UV-vis l'évolution de la réaction. Dans son article, le groupe de Shabat compare les cinétiques de désassemblage pour un système fonctionnant selon un schéma réactionnel DCR par rapport à un schéma 2CDCR, et il montre qu'un système 2CDCR présente une plus grande modularité et une flexibilité comparée à un système DCR. Les auteurs montrent en effet que l'on peut améliorer le signal en jouant sur :

- la nature de la sonde **1.32** à l'origine de l'apparition du signal, celle-ci pouvant être tout aussi bien colorée que fluorescente.
- le ratio de concentration entre les deux sondes, lequel permet de contrôler la vitesse de l'amplification.

Comme pour les exemples précédents d'amplification auto-catalytique par auto-immolation en chaîne, l'approche reste limitée par une amplification non-spécifique en l'absence de la cible H_2O_2 , mais aussi par la lenteur du processus auto-catalytique. Les auteurs insistent toutefois sur le fait qu'en découplant la sonde associée à l'amplification auto-catalytique de celle associée à la génération du signal, il est plus aisé d'aboutir à des sondes chémosensibles synthétiques stables (FIGURE 1.30).

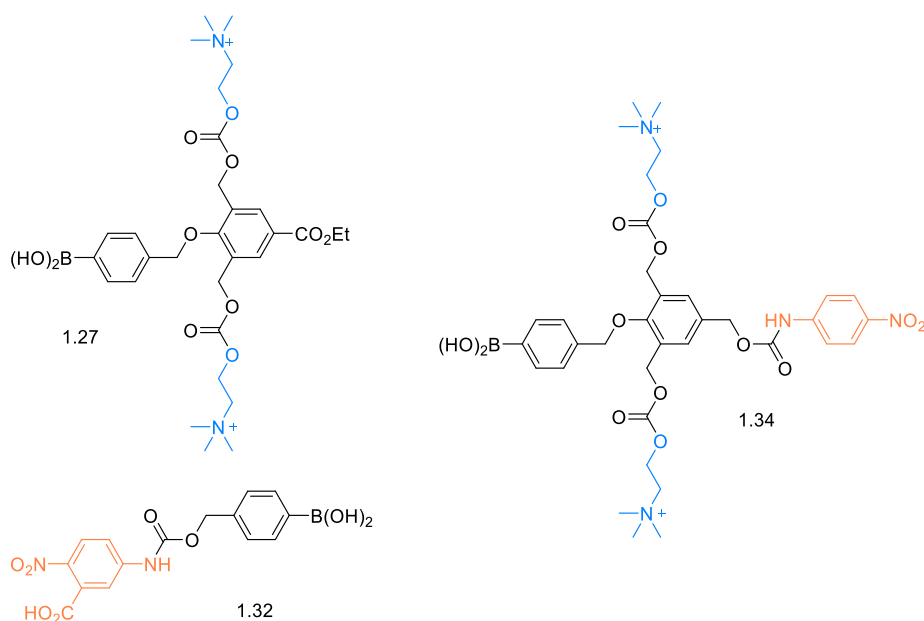


FIGURE 1. 30 Design des sondes pour un système 2CDCR (1.27 et 1.32) ou DCR (1.34)

1.4.3.4 Détection indirecte d'une cible par un processus auto-catalytique dont le mode de détection est la dissolution d'un hydrogel

Finalement, le dernier exemple qu'il apparaît intéressant de présenter, en raison de l'utilisation d'un processus d'amplification auto-catalytique d'eau oxygénée pour détecter indirectement une cible, correspond à une stratégie versatile de détection à l'œil nu de molécules d'intérêts biologiques telles que l'acide urique, le glucose, la choline, ou encore la sarcosine. Le schéma de principe est représenté **FIGURE 1.31**.

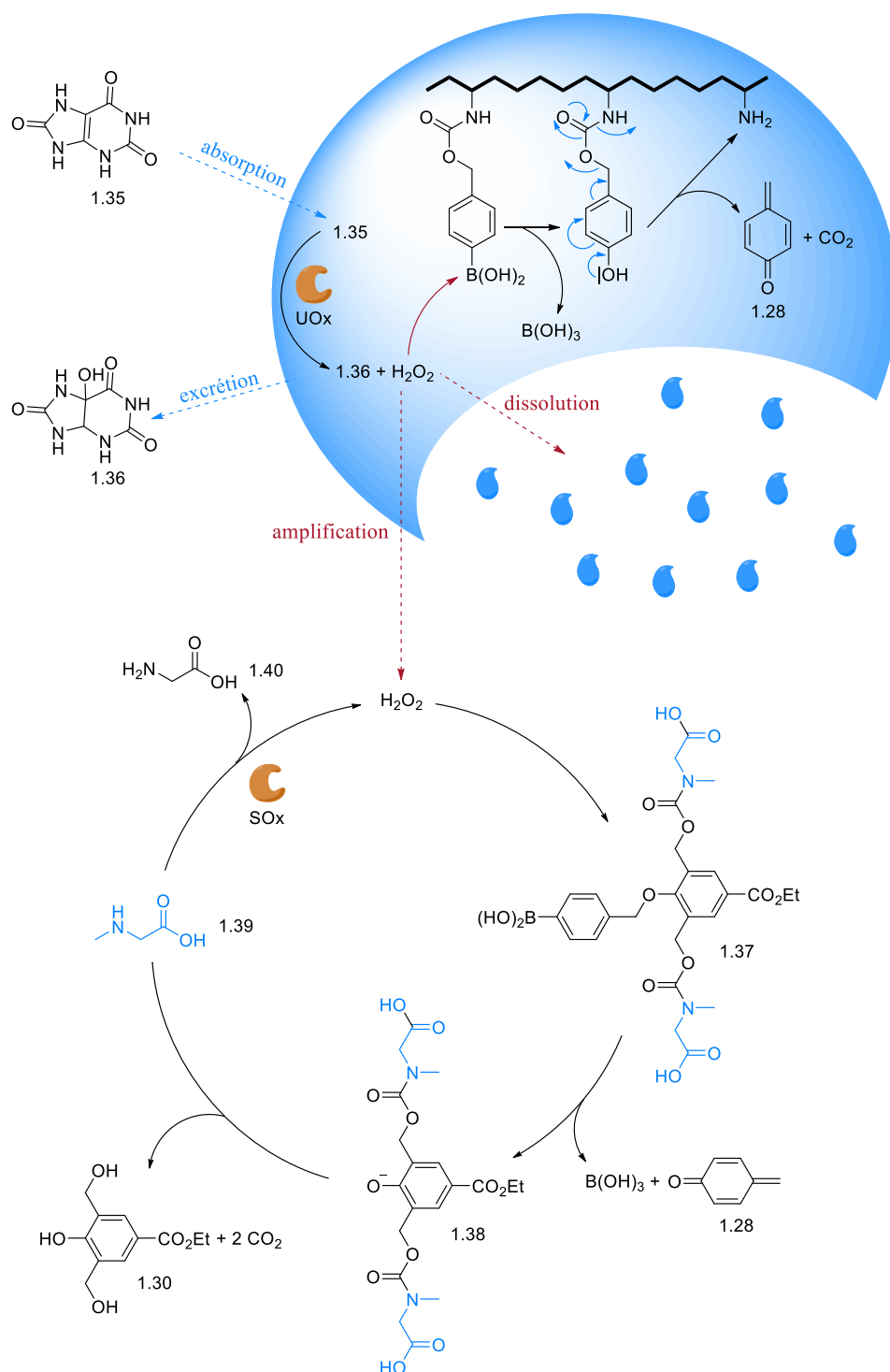


FIGURE 1. 31 Combinaison de la méthode aptamère, de l'auto-immolation et d'hydrogel pour la détection d'acide urique^{47,48}

Il repose sur l'exploitation d'un hydrogel sélectif de l'eau oxygénée, intégrant dans sa structure interne des acides arylboroniques, ainsi que deux enzymes oxydases, l'une spécifique de l'analyte ciblé et l'autre capable d'induire une amplification auto-catalytique en présence d'une molécule sonde dendrimérique chémosélective d'H₂O₂^{47,48}.

L'hydrogel ainsi constitué est mis en contact d'une solution aqueuse contenant l'analyte (ici de l'acide urique), lequel par diffusion dans la matrice polymérique va alors enclencher un ensemble de réactions qui va conduire à l'amplification auto-catalytique de la génération d' H_2O_2 . En effet, dans un premier temps, l'analyte est oxydé spécifiquement par l'oxydase qui le cible (ici l'acide urique oxydase, UOx) ce qui génère de l'eau oxygénée. Cette eau oxygénée produite attaque alors la sonde dendrimérique **1.37** porteuse d'un acide boronique, qui en s'auto-immolant libère deux équivalents de sarcosine **1.39**. Les molécules de sarcosine sont alors oxydées par la deuxième oxydase, la sarcosine oxydase (SOx), qui à son tour produit H_2O_2 pour enclencher une amplification auto-catalytique.

H_2O_2 peut alors soit entamer un nouveau cycle d'amplification, en clivant d'autres sondes dendrimériques **1.37**, soit dissoudre l'hydrogel par conversion de la chaîne poly-arylboronique plus ou moins hydrophobe en une chaîne poly-aminée très hydrophile, et cela de manière accélérée avec le temps. Le signal obtenu est donc celui visuel de la dissolution de l'hydrogel (FIGURE 1.32 DE GAUCHE) que l'on peut tout simplement détecter à l'œil nu.

Grâce au grand nombre d'oxydases disponibles, capables de générer H_2O_2 , ce système peut s'adapter à la détection de multiples autres cibles en remplaçant simplement la UOx par d'autres oxydases telles que la GOx pour détecter le glucose, la SOx pour la sarcosine, ou encore la COx pour la choline⁴⁷ (FIGURE 1.32).

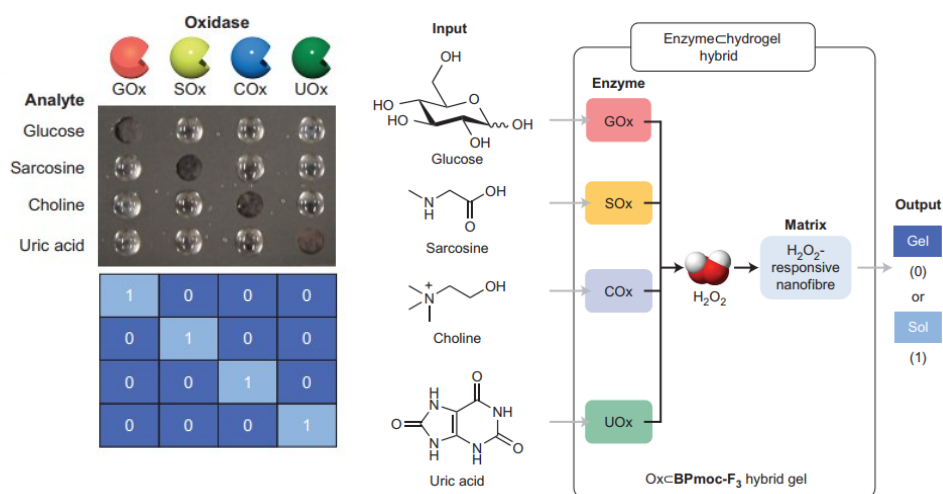


FIGURE 1. 32 A gauche : résultats de l'analyse visible *in fine* à l'œil nu *via* la dissolution de l'hydrogel, et à droite : schéma du système selon le couple analyte/oxydase choisi. Figures extraites de l'article du groupe de Hamachi⁴⁷.

CHAPITRE 2

SYNTHÈSE ET CARACTÉRISATION DE DÉRIVÉS DE PQQ POUR L'ACTIVATION SÉLECTIVE D'UNE APO-GLUCOSE- DESHYDROGENASE

2.1 Stratégie d'amplification du signal basée sur une reconstitution enzymatique

2.1.1 Principe

Dans cette première partie de mon travail de thèse, l'objectif a été d'élaborer une nouvelle stratégie analytique reposant sur une amplification moléculaire originale du signal mettant en jeu l'activation sélective d'une *apoenzyme* afin de pouvoir détecter sensiblement et sélectivement de petites molécules cibles réactives telles que F^- ou H_2O_2 . Le principe de la méthode est décrit **FIGURE 2.1**. Il repose sur l'activation d'une molécule sonde pro-cofacteur, *via* une réaction avec la molécule cible réactive (F^- ou H_2O_2), induisant alors la libération du cofacteur actif de l'enzyme, lequel ensuite active l'*apoenzyme* *via* son insertion dans la poche enzymatique. Une fois reconstituée, l'activité de la *holoenzyme* reconstituée peut alors être détectée en présence de son substrat et co-substrat par une technique analytique appropriée, c'est-à-dire soit par spectroscopie UV-vis ou fluorimétrie en présence d'un co-substrat chromogène ou fluorogène, ou encore soit par voie électrochimique en présence d'un co-substrat redox.

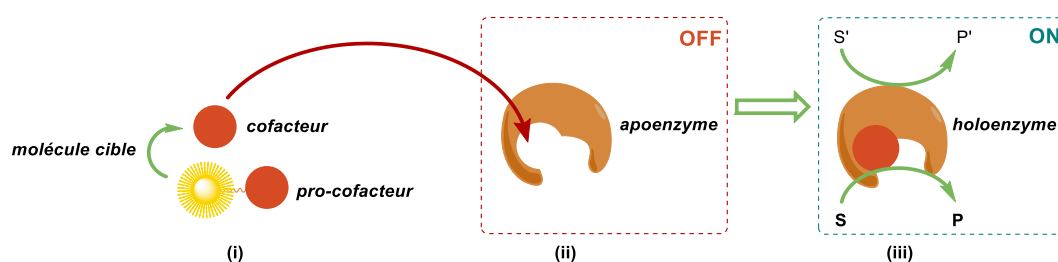


FIGURE 2. 1 Schéma de l'amplification du signal mesuré par spectroscopie UV-vis : (i) réaction entre la molécule cible et la sonde « pro-cofacteur » libérant le cofacteur, (ii) reconstitution de l'apoenzyme en solution, (iii) activation de l'enzyme et suivi *in situ* de son activité par une technique analytique appropriée en présence du substrat S et d'un co-substrat S' de l'enzyme.

Cette stratégie d'amplification du signal peut être appliquée à la détection indirecte d'une grande variété d'autres analytes cibles si on l'associe à un immunodosage enzymatique dans lequel l'enzyme produit une petite molécule réactive (ou effecteur). Dans ce cas, nous aurons le schéma de principe global de la **FIGURE 2.2** représenté ici à titre illustratif dans le cadre d'un immunodosage sandwich de type ELISA sur billes magnétiques.

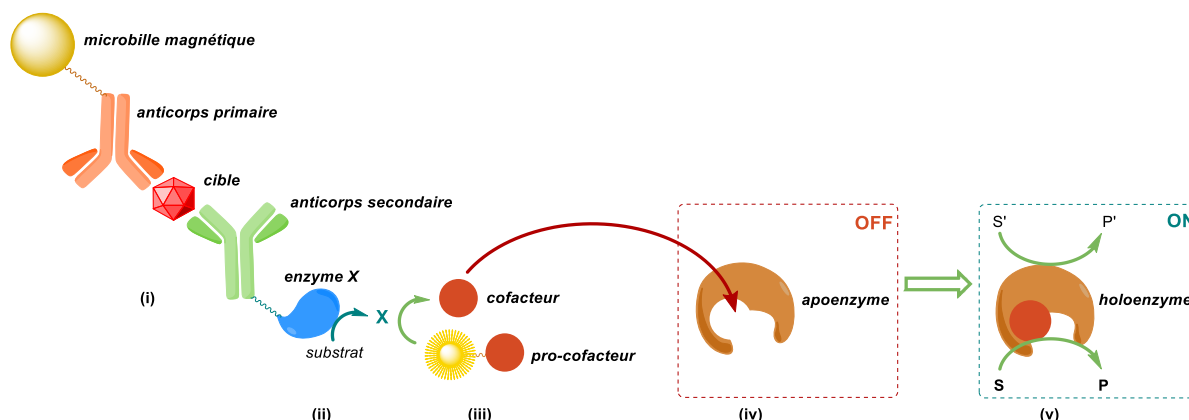


FIGURE 2. 2 Schéma de principe général : (i) reconnaissance et immobilisation de la cible par un immunodosage sandwich de type ELISA, (ii) libération de X (F^- ou H_2O_2) par l'enzyme X, (iii) réaction entre X et le pro-cofacteur et libération du cofacteur, (iv) reconstitution de l'apoenzyme immobilisée à la surface d'une électrode, et (v) activation de l'enzyme et détection par une technique analytique appropriée.

Les candidats marqueurs enzymatiques capables de produire de manière efficace F^- ou H_2O_2 sont par exemple la peroxydase du raifort (HRP) connue pour produire des ions fluorures à partir d'un accepteur d'électrons tel que la *para*-fluoroaniline, ou la glucose oxydase (GOx) qui elle produit de l'eau oxygénée à partir de l'oxygène moléculaire et l'oxydation catalytique du glucose. Ce sont

toutes deux des marqueurs enzymatiques très populaires dans les immunodosages enzymatiques (turnovers $> 500 \text{ s}^{-1}$).

Comme nous allons le voir par la suite, pour satisfaire à ce concept d'amplification moléculaire, nous avons choisi le système pyrroloquinoline quinone/*apo*-D-glucose déshydrogénase (PQQ/*apo*-sGDH) avec l'idée de se baser sur la reconstitution de cette enzyme *via* l'activation d'analogues inactifs du cofacteur PQQ.

2.1.2 PQQ/*apo*-sGDH : un couple cofacteur/*apo*enzyme idéal pour les stratégies de reconstitution du biocatalyseur

2.1.2.1 Structure et mécanisme de la PQQ-dépendante glucose déshydrogénase

La PQQ-dépendante glucose déshydrogénase (PQQ-GDH) est une enzyme qui catalyse *via* son centre redox actif PQQ l'oxydation du glucose et d'autres aldoses en aldono- δ -lactones et de manière concomitante la réduction d'accepteurs d'électrons. Il existe deux formes de PQQ-GDH, une forme membranaire largement distribuée au niveau des parois des bactéries à gram négatif et qui participe activement à la croissance des cellules puisque impliquée dans la chaîne respiratoire, et une forme soluble qui se retrouve dans le péricytoplasme d'*Acinetobacter calcoaceticus* et dont le rôle n'est pas encore élucidé⁴⁹. C'est cette dernière que nous avons utilisée.

La structure cristallographique de la PQQ-sGDH a été élucidée par diffraction aux rayons X (FIGURE 2.3)^{50,51}. C'est un homo-dimère composée de deux sous-unités identiques de 50 kDa possédant une structure tertiaire formée de 6 feuillets β autour d'un pseudo-axe de symétrie central selon une configuration toroïdale, chaque feuillet β étant formé de 4 brins β antiparallèles. Les monomères possèdent chacun une cavité accueillant le centre prosthétique PQQ *via* un ensemble d'interactions non-covalentes de type liaisons hydrogènes mais aussi électrostatiques avec un ion calcium présent à proximité du site de fixation du PQQ. Cet ion calcium a une importance cruciale pour non seulement l'affinité et la stabilité du PQQ au sein de la protéine mais aussi dans l'activation du PQQ. Quatre autres ions calcium interviennent dans la dimérisation de l'enzyme en rigidifiant la boucle qui constitue la majeure partie de l'interface des deux sous-unités⁵².

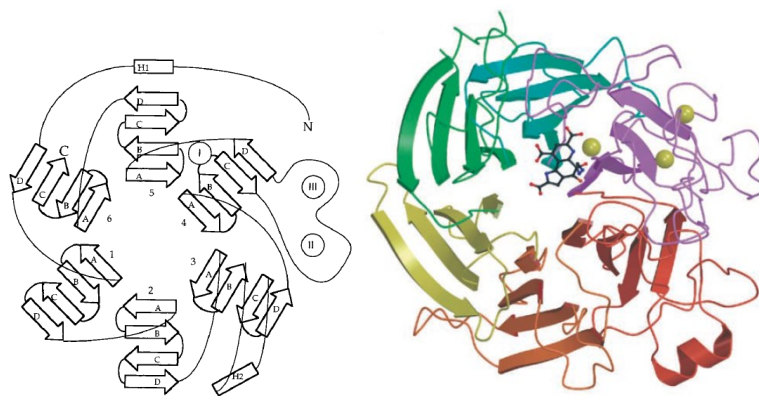
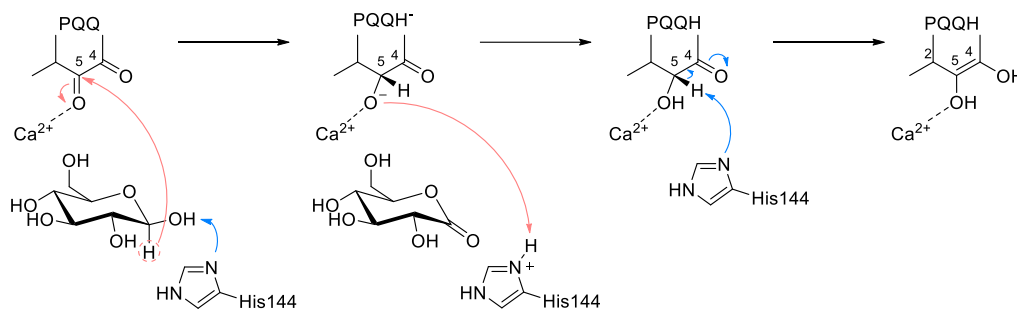


FIGURE 2.3 A gauche : Diagramme topologique de la structure secondaire des éléments d'un monomère de la PQQ-sGDH : le repliement en β -propeller. Les brins β sont représentés sous forme de flèche, les hélices α de rectangle et les ions calcium de cercle. Figure extraite de l'article du groupe de Duine⁵⁰.

A droite : structure cristallographique aux rayons-X d'un monomère de la PQQ-sGDH, diagramme en ruban d'un monomère où les feuillets β sont représentés de différentes couleurs, le cofacteur PQQ en représentation bâton et les ions calciums en sphères jaunes. Figure extraite de l'article du groupe d'Oubrie⁵³.

La PQQ-sGDH a la particularité de catalyser l'oxydation du glucose de façon très efficace avec un turnover k_{cat} de 1500 s^{-1} et une efficacité catalytique k_{cat}/K_M de $2,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (K_M étant la constante de Michaelis-Menten)⁵⁴. Une caractérisation détaillée des paramètres cinétiques du mécanisme relativement complexe de la PQQ-sGDH a été publiée en 2011 par notre laboratoire⁵⁵. Cela comprend notamment la détermination des paramètres cinétiques d'inhibition de l'enzyme par son substrat, le glucose, à partir d'un certain seuil de concentration, ainsi que les aspects cinétiques de coopérativité avec l'augmentation de la concentration en substrat⁵⁶.

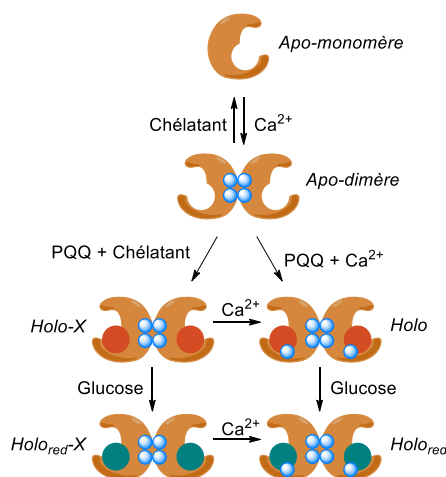
L'oxydation du glucose par le PQQ dans sa poche enzymatique procède par transfert d'hydrure (FIGURE 2.4). Celui-ci est facilité par la présence de l'histidine 144 à proximité du site actif, indispensable à la réactivité.

FIGURE 2. 4 Mécanisme de transfert d'hydrure selon le groupe de Bruice⁵⁷

2.1.2.2 Reconstitution et réactivation de l'enzyme

Les conditions de reconstitution de l'*apo*-sGDH ont été établies par le groupe de Duine et d'Olsthoorn en 1996. Celle-ci se fait dans un tampon tris à pH neutre en présence de 3 mM de chlorure de calcium. Comme cela a été indiqué précédemment, le calcium est indispensable à la reconstitution et à l'activation de l'enzyme.

Le groupe de Duine a considérablement contribué à la compréhension du rôle des ions calcium lors des expériences de reconstitution, notamment en proposant le schéma réactionnel de la FIGURE 2.5. Il a d'ailleurs montré que sans calcium l'enzyme dimérisée n'était pas stable et qu'ainsi le PQQ lié avait tendance à se dissocier de façon très rapide⁵⁸.

FIGURE 2. 5 Représentation simplifiée de la reconstitution de l'*apo*-sGDH selon Duine⁵²

La dimérisation de l'enzyme est également essentielle à la stabilité du PQQ dans son site de fixation. Le cofacteur ne se lie en effet qu'à la forme dimérique de la PQQ-sGDH, laquelle ne peut être réalisée que lorsque les 4 ions calcium (2 par monomère) se lient à la boucle 4CD

permettant sa rigidification et ainsi la liaison des deux interfaces. Une fois fixé en présence des calciums, le PQQ est difficilement dissociable de l'enzyme. Par exemple, l'utilisation de chélatant est inefficace ce qui implique que les ions calciums sont inaccessibles de par la présence du PQQ et seule la dénaturation de l'enzyme permet de libérer le PQQ en solution (par acidification, traitement thermique, ou en présence d'un agent chaotropique). Ainsi, il y a un effet synergique entre le PQQ et les ions calciums qui permettent de stabiliser la structure dimérique de l'enzyme.

Le site de fixation du calcium activateur de l'enzyme a été déterminé grâce à la cristallographie aux rayons X de la PQQ-sGDH⁵⁰. Celui-ci est hexa-coordonné. Le calcium est lié à une molécule d'eau, deux résidus de l'enzyme (Gly247 et Pro 248) ainsi qu'à trois groupes fonctionnels du PQQ (l'azote de la pyridine, l'oxygène d'un des carboxylates et l'oxygène du carbonyle C5). Cette coordination participe fortement à la polarisation de la liaison C=O portée par le C5, favorisant ainsi les attaques nucléophiles au niveau C5 (FIGURE 2.4).

Lorsque le calcium n'est pas présent, l'enzyme dite *holo-X* en présence de PQQ (FIGURE 2.5) est très peu active et n'oxyde pas efficacement le glucose en gluconolactone. En revanche, dès l'ajout de calcium la réactivité de l'enzyme est totalement restituée.

Concernant les modifications structurales entre *apo*- et *holo*-sGDH, il est à noter que la forme *apo* a une conformation relâchée par rapport à la forme *holo*. Ce fait est d'ailleurs corroboré par la résistance de cette dernière à la protéolyse par la chymotrypsine. Dans le même ordre d'idée, la fluorescence de l'*apo*enzyme est éteinte dès l'addition de PQQ⁴⁹ dû à un changement de conformation de l'enzyme. Enfin, le PQQ n'absorbe pas aux mêmes longueurs d'ondes qu'il soit dans la poche de l'enzyme ou bien libre en solution⁴⁹.

2.1.2.3 Critères de choix du système PQQ/*apo*-sGDH pour le concept d'amplification moléculaire

Le choix du système PQQ/*apo*-sGDH pour le développement de la stratégie d'amplification du signal envisagée est guidé par ses caractéristiques relativement idéales, à savoir :

- la reconstitution de cette quinoprotéine est spontanée et rapide,^{49,52,59,60}
- l'enzyme a une grande efficacité catalytique, elle n'est pas réactive vis-à-vis de l'oxygène dissous et fonctionne avec une large gamme d'accepteurs d'électrons artificiels,
- la réaction de liaison des deux partenaires est contrôlée par la haute constante d'affinité du PQQ pour le site actif de l'*apo*enzyme,

- la forme *apo* de l'enzyme peut être facilement produite par une *Escherichia coli* porteuse d'un plasmide recombinant, permettant l'expression du gène *gdbB* codant pour l'*apo*-sGDH (sachant qu'*Escherichia coli* ne produit pas de PQQ),
- l'*apoenzyme* est très stable et facile à purifier.

Dans cette approche, il y a un avantage à remplacer le suivi que l'on peut faire par mesure d'absorbance (par exemple en suivant la décoloration du DCPIP, voir **section 1.3.1.4** **FIGURE 1.16**) par une mesure électrochimique. Des travaux précédents au laboratoire⁶⁰ ont mis en avant une méthode électrochimique pour mesurer l'activité de l'enzyme permettant de suivre la reconstitution de l'*apo*-sGDH à de faibles concentrations en PQQ. La méthode se base sur la reconstitution hétérogène de l'*apo*-sGDH immobilisée en surface d'une électrode par un PQQ libre en solution (**FIGURE 2.6**).

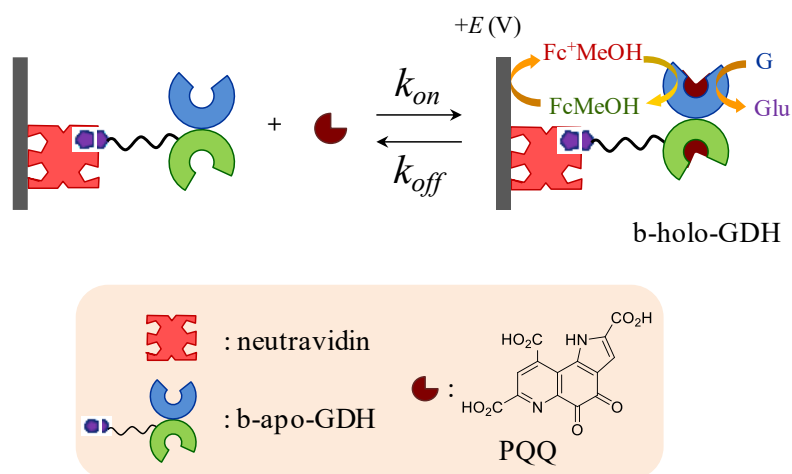


FIGURE 2. 6 Détection électrochimique de la reconstitution hétérogène d'un biocatalyseur. Figure extraite de l'article du groupe de Limoges⁶⁰.

Il a notamment été montré que l'*apo*-sGDH pouvait être immobilisée sur la surface de l'électrode *via* une interaction avidine/biotine comme le montre la **FIGURE 2.6**, tout en préservant sa structure native et sa capacité à se reconstituer à partir du PQQ en solution sous une forme aussi active qu'en phase homogène. Le fait de confiner l'*apoenzyme* à la surface de l'électrode permet d'avoir accès à une mesure directe et instantanée de l'activité enzymatique résultant de la reconstitution de l'enzyme. Cette mesure peut d'ailleurs être réalisée *in situ*, c'est-à-dire dans la solution de reconstitution de l'enzyme. Il suffit pour cela d'ajouter à la solution de reconstitution le substrat glucose et un médiateur rédox tel que le ferrocène méthanol (**FIGURE 2.6**) et de mesurer le courant catalytique résultant par voltammétrie cyclique (**FIGURE 2.7**) ou chronoampérométrie. Par rapport à une mesure d'activité en phase homogène par spectroscopie UV-vis, cette approche de mesure électrochimique en phase hétérogène a le mérite

d'être plus sensible car elle tire parti d'une concentration locale du biocatalyseur élevée, à proximité même du détecteur, c'est-à-dire de l'électrode.

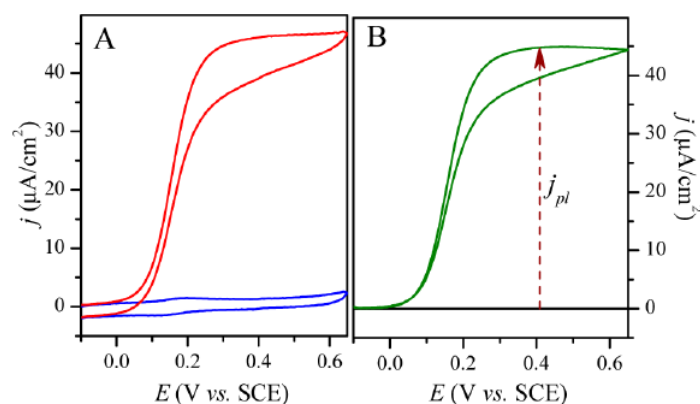


FIGURE 2. 7 A gauche : Voltamogramme ($v = 0.1$ V/s) d'une électrode de carbone modifiée à la neutravidine (en rouge) et électrode de carbone modifiée par l'albumine sérique bovine (BSA d'après *bovin serum albumin*) (en bleu suite à une pré-incubation avec une solution de *holo*-sGDH à 0.1 μ M durant 2 heures puis immergée dans un tampon Tris (100 mM à pH 7,5) contenant 3 μ M de FcMeOH et 3 mM de glucose. Figure extraite de l'article de Limoges et coll.⁶⁰.

A droite : réponse catalytique pure résultant de la soustraction du voltamogramme rouge à un voltamogramme enregistré en absence de glucose (mais en présence de médiateur). Figure extraite de l'article de Limoges et coll.⁶⁰.

Cette méthodologie électroanalytique permet d'atteindre un seuil de concentration en PQQ de l'ordre du picomolaire. Cette performance surpasse de plusieurs ordres de grandeur celle d'une détection électrochimique directe du PQQ (c'est-à-dire sans amplification enzymatique). Elle s'avère également de 1 à 2 ordres de grandeur plus performante en termes de limite de détection que par reconstitutions en phase homogène avec détection par spectroscopie UV-vis.

Comme énoncé auparavant, on peut donc anticiper que le couplage de ce système avec la libération du cofacteur à partir d'un pro-PQQ tel qu'il est proposé de le faire doit permettre d'atteindre indirectement des concentrations de cible réactive (F^- ou H_2O_2) très faibles, de l'ordre du picomolaire. Cette stratégie a d'ailleurs pour ambition de tirer pleinement parti des propriétés attrayantes des méthodes électrochimiques dont leur facilité à être intégrés dans des dispositifs miniaturisés, leur bonne sensibilité, leur faible coût instrumental, et la possibilité de réaliser des mesures dans des solutions et containers non-transparents. D'un autre côté, l'utilisation de cette méthode électroanalytique permet de prédire pour un marqueur enzymatique primaire (type HRP ou GOx) ayant un turnover de 500 s^{-1} et après une heure de réaction enzymatique, une limite de

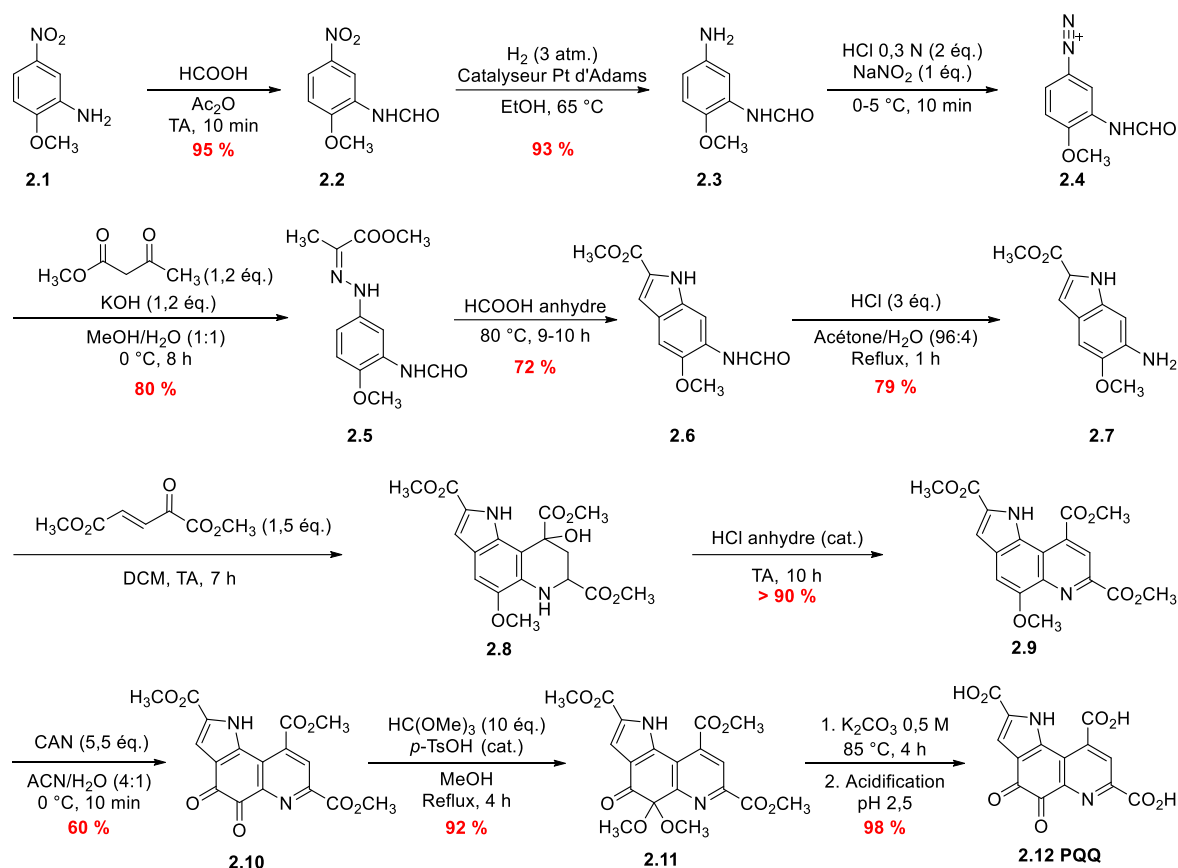
détection en marqueur aussi faible que 10^{-18} M. Cela correspond à un gain en sensibilité proche de 10^6 par rapport à un immunodosage sandwich classique de type ELISA. En outre, la possibilité de confiner à terme le système d'amplification moléculaire dans des cellules électrochimiques de petits volumes (c'est-à-dire dans quelques microlitres de solution avec un grand rapport surface d'électrode/volume de solution) offrirait théoriquement un gain supplémentaire d'amplification du signal électrochimique.

Afin de mettre en place ces stratégies, il faut tout d'abord être en mesure de proposer puis de synthétiser une forme inactive du PQQ (ou pro-PQQ). Pour cela, il faut modifier chimiquement la molécule PQQ de manière à ce qu'elle ne puisse plus conduire à une reconstitution/réactivation de l'*apo*-sGDH, mais aussi de telle sorte à ce qu'elle puisse être aisément convertie en PQQ par réaction avec une espèce telle que F^- ou H_2O_2 . Avant de décrire les différentes molécules pro-PQQ que nous avons imaginées pour satisfaire au concept d'amplification moléculaire proposé, nous allons commencer d'abord par décrire sous forme de revue les différentes stratégies de synthèse totale du PQQ qui ont été jusqu'ici publiées dans la littérature. Il est en effet important de les avoir en tête car bon nombre des molécules pro-PQQ que nous avons cherché à synthétiser nécessitent de partir de précurseurs très amonts.

2.1.3 Synthèses de la pyrroloquinoléine quinone

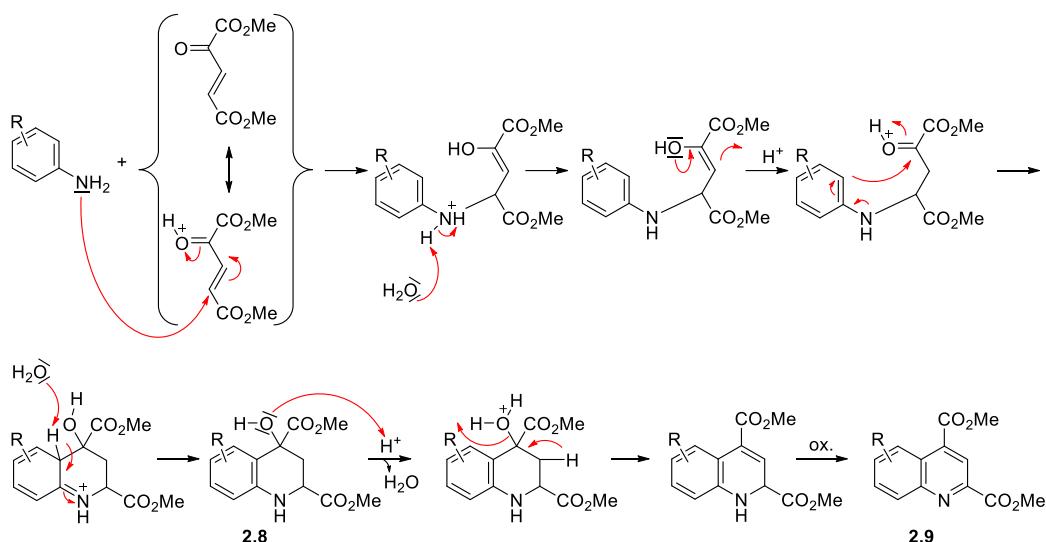
2.1.3.1 Synthèse selon Corey et Tramontano (1981) (20%)

La synthèse de Corey et Tramontano (FIGURE 2.8) est la procédure la plus répandue pour synthétiser chimiquement le PQQ. Elle permet d'ailleurs d'avoir accès à ce composé d'intérêt pour un coût raisonnable⁶¹.

FIGURE 2. 8 Synthèse du PQQ selon Corey et Tramontano⁶¹

En 1981, Corey et Tramontano proposent cette synthèse totale de la quinone en 11 étapes en partant d'une nitroaniline commerciale **2.1** pour un rendement total de 20 % (50 mg). Cette procédure se divise en 4 grandes parties : la formation de l'indole **2.7**, l'ajout du troisième cycle au composé *via* l'annélation de Doebner von Miller, l'oxydation pour former le centre quinone, et enfin l'ultime étape d'hydrolyse des esters.

Plus en détail, la 2-méthoxy-5-nitroaniline **2.1** est formylée pour donner **2.2** puis réduite en **2.3** par hydrogénation à l'aide du catalyseur au platine d'Adams, avant d'être convertie en sels de diazonium **2.4** selon la procédure standard. La condensation du sel de diazonium sur le méthyl α -méthylacétoacétate en présence de base permet de former l'aryl hydrazone **2.5**, précurseur direct de l'indole **2.6**. Il suffit ensuite de procéder à la déprotection du groupement formylé afin d'avoir accès à un amino-indole **2.7**, lequel permet l'ajout du troisième cycle sur le composé selon la méthode d'annélation de Doebner von Miller décrite dans la figure ci-dessous (FIGURE 2.9).

FIGURE 2. 9 Mécanisme supposé de l'annélation de Doebner von Miller⁶²

Le mécanisme de l'annélation se divise en deux étapes. La première consiste en l'addition 1,4 de l'aniline sur le carbone en β de la cétone du diméthyle oxoglutaconate suivi de la cyclisation du produit pour former le pipéridinole **2.8**, tandis que la seconde étape nécessite un catalyseur acide ($\text{HCl}_{(g)}$) afin de déshydrater puis aromatiser le composé avant qu'il ne s'oxyde à l'air pour former l'espèce tricyclique **2.9**. Toutefois, la sensibilité de cette étape d'oxydation peut conduire à une formation incomplète du composé, c'est pourquoi Martin et coll. ont proposé de l'améliorer en ajoutant de l'acétate de cuivre (II)⁶³.

Enfin, c'est grâce au CAN (Cerium Ammonium Nitrate), un agent oxydant efficace pour convertir les catéchols en quinones, que l'oxydation du groupement méthoxy se fait, générant le cœur quinonique du PQQ **2.10**.

La dernière étape de la synthèse de Corey et Tramontano est la plus délicate et a été l'objet de plusieurs études afin de pouvoir transformer le PQQ-triester **2.10** en PQQ **2.12**. Selon Corey, les bases sont proscrites pour la déprotection car la fonction *ortho*-quinone y est extrêmement sensible. D'autre part l'hydrolyse acide s'avère inefficace pour cliver les trois esters. Ainsi, c'est par le passage à un composé monoacétal **2.11** puis à l'adjonction de carbonate de potassium à reflux suivi d'une acidification à pH 2,5 que le PQQ sera obtenu par précipitation.

Cette dernière étape a fait l'objet d'une amélioration par le groupe de Martin⁶³, décrite FIGURE 2.10, et d'un dépôt de brevet⁶⁴ par l'équipe Kempf-Gopal-Stalzer en 2006. En 1993, Martin a amélioré la synthèse de Corey et Tramontano et tout particulièrement la dernière étape de déprotection afin de pouvoir l'appliquer à plus grande échelle.

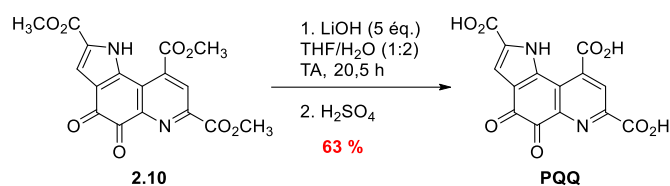


FIGURE 2. 10 Amélioration de la réaction de déprotection par le groupe de Martin⁶³

Pour cela il procède d'abord à une saponification longue à la lithine à température ambiante puis à la formation d'un sel sodé du PQQ par l'ajout de NaCl. Ensuite par un échange de contre ion (en ajoutant du CsCl) il forme le sel de Césium du PQQ. Ce sel sera dissous dans de l'acide sulfurique concentré et donnera le PQQ par recristallisation. Le rendement de cette étape (63 %) est inférieur à celui de Corey (90 % sur les deux étapes) mais permet d'avoir accès plus facilement au composé. Le brevet déposé en 2006, lui se focalise sur cette dernière étape en réduisant les deux procédures de traitement du groupe de Martin (dues à l'utilisation de deux sels différents : sodium et césium) en ne formant qu'un sel de potassium du PQQ (qui sera ensuite dissous dans H₂SO₄ pour la recristallisation à froid de la quinone). Ce brevet permet de synthétiser le PQQ à l'échelle de la dizaine de grammes, en simplifiant la démarche (par l'utilisation d'un seul sel) et en améliorant grandement la pureté du produit final (98 %) et le rendement de la dernière étape (71.6% après purification).

Le PQQ étant une molécule très attractive, différentes voies de synthèse annexes à celle de Corey et Tramontano ont été par la suite développées (**FIGURE 2.11**). Elles diffèrent essentiellement sur la manière de construire/synthétiser l'indole, mais la suite de la synthèse suit les procédures usuelles développées initialement par Corey et Tramontano (annélation de Doebner von Miller, oxydation et déprotection).

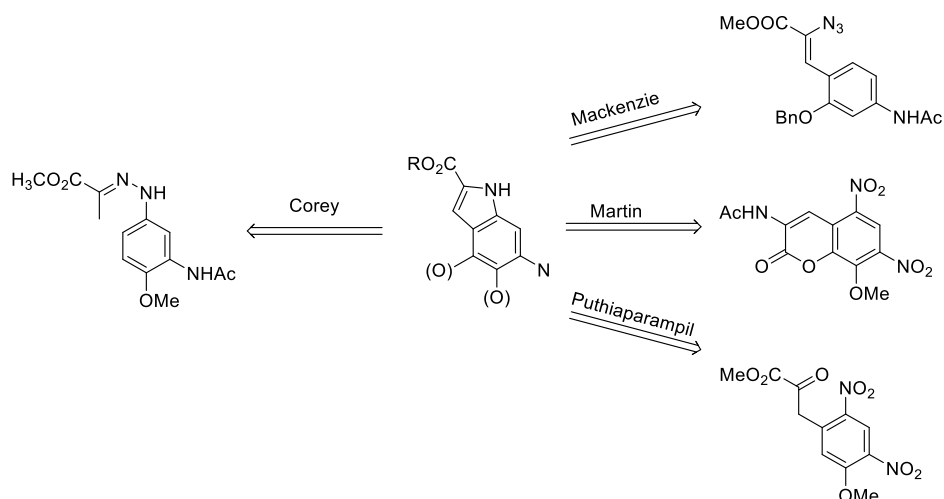
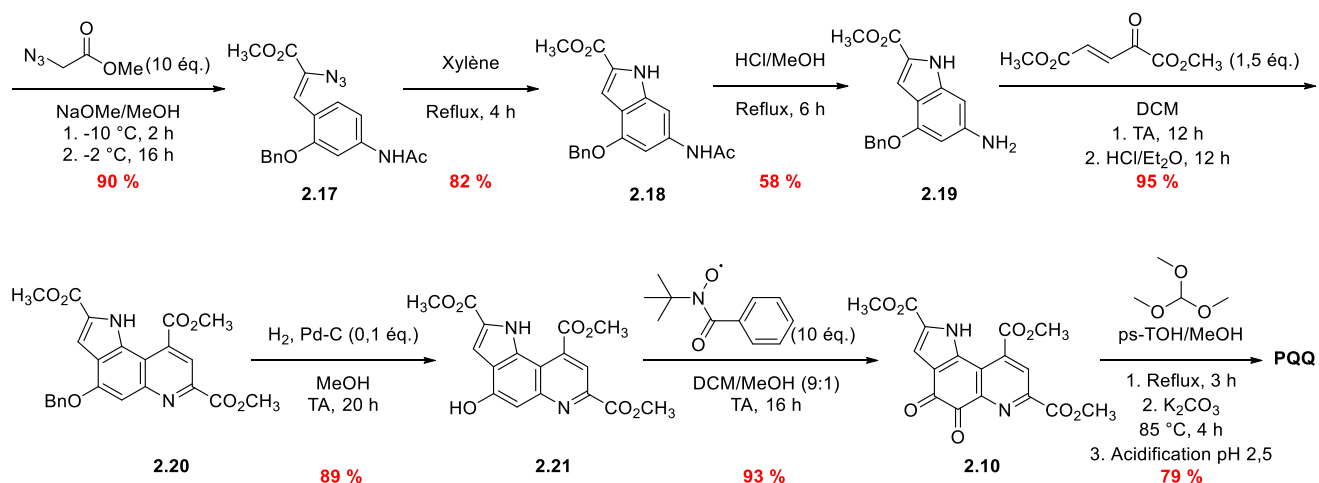


FIGURE 2. 11 Description des différentes voies de synthèse du PQQ

2.1.3.2 Synthèse selon Mackenzie et coll. (1986) (20 %)

La synthèse développée par le groupe de Mackenzie^{65,66} en 1986 diffère de celle de Corey par l'utilisation au départ d'un dérivé **2.13** de l'acide salicylique (FIGURE 2.12). Celui-ci est converti en indole **2.18** en 8 étapes pour un rendement de 56 %.

FIGURE 2. 12 Synthèse du PQQ selon le groupe de Mackenzie⁶⁵

L'acide salicylique est tout d'abord estérifié, puis N-acétylé en **2.14**, avant d'être O-benzylé pour conduire à **2.15**. L'ester du composé est réduit en alcool par LAH avant d'être réoxydé par le permanganate de baryum en aldéhyde **2.16**. Sa condensation sur le méthyl azidoacétate donne un azidocinnamate qui est cyclisé en indole **2.18** après reflux dans le xylène durant plusieurs heures. Les étapes suivantes sont similaires à celle de la synthèse de Corey (déprotection de l'amine puis annélation de Doebner von Miller). Toutefois, le CAN étant incapable d'oxyder directement le composé benzylé **2.20** en quinone **2.10**, il a été nécessaire de d'abord débenzyler le composé *via* une hydrogénation catalytique avant de l'oxyder par le *tert*-butyl nitroxyde de benzoyl. Enfin le triester **2.10** est converti en PQQ selon la procédure de Corey et Tramontano.

Le rendement total (20 %) de cette variante de la synthèse du PQQ est comparable à celui obtenu par Corey et Tramontano.

2.1.3.3 Synthèse selon Martin et coll. (1993) (15 %)

Dans un autre exemple publié en 1993, le groupe de Martin⁶⁷ synthétise l'indole d'intérêt **2.27** en passant par la chimie des coumarines (FIGURE 2.13).

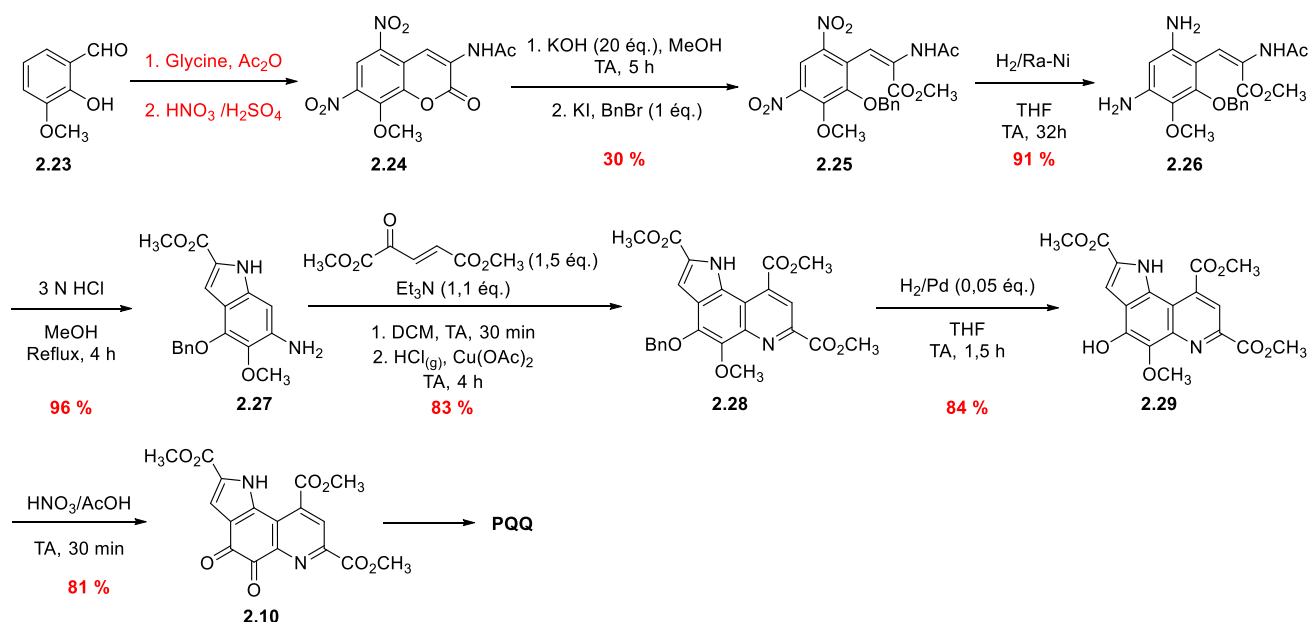


FIGURE 2.13 Synthèse du PQQ selon le groupe de Martin⁶⁷

La première étape consiste à former la coumarine *via* la condensation d'une glycine acétylée (selon le mécanisme de Knoevenagel) sur le benzaldéhyde suivie de l'addition nucléophile du groupement hydroxyle du composé de départ **2.23** sur la cétone de la glycine. La seconde étape consiste à dinitrer la coumarine formée afin d'avoir le composé **2.24**. L'utilisation d'une base permet d'ouvrir la coumarine et d'obtenir un bras acétamide qui participe ensuite à la formation de l'indole. La fonction OH est protégée par un groupe benzyl et les groupes nitro sont réduits en amine par hydrogénation catalytique au nickel de Raney afin d'avoir le précurseur direct de l'indole d'intérêt. L'indole **2.27** est ainsi obtenu par une cyclisation extrêmement efficace (93 % de rendement). Enfin, la suite de la synthèse correspond à l'annélation de Doebner von Miller utilisée par Corey et Tramonatano, et reproduit la débenzylation de Mackenzie et coll. avant de procéder à l'oxydation pour avoir la quinone **2.10**. La dernière étape reste celle de l'hydrolyse des esters développée précédemment par le groupe de Martin lui-même.

2.1.3.4 Synthèse selon Puthiamparmpil et coll. (brevet 2014) (20 %)

La méthode la plus rapide pour la synthèse du PQQ a été brevetée en 2014⁶⁸ par le groupe de Puthiamparmpil. Elle ne nécessite que 7 étapes, pour un rendement global de 20 % (FIGURE 2.14).

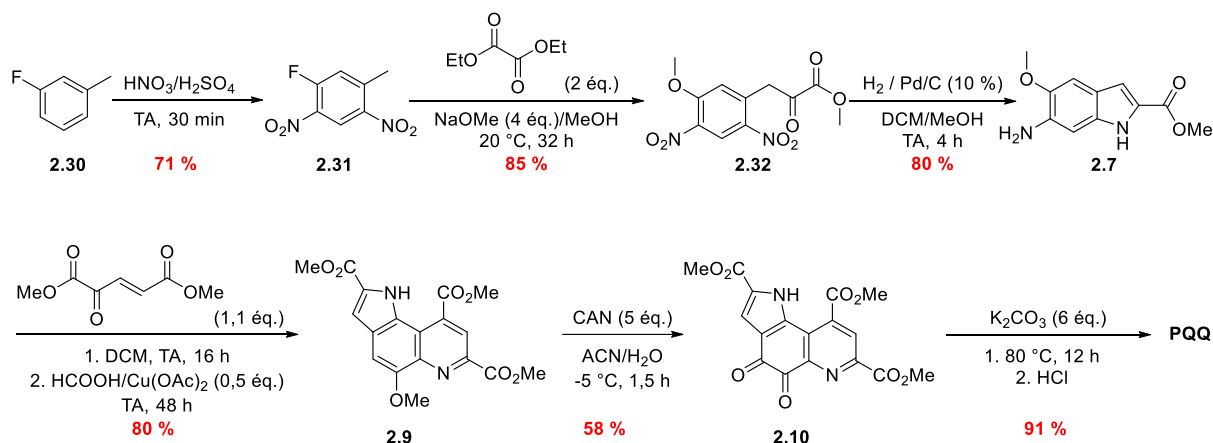


FIGURE 2. 14 Synthèse du PQQ d'après un brevet de Puthiamparmpil et coll.⁶⁸

Cette fois-ci, la molécule de départ est le 2-méthyl fluorobenzène **2.30** qui sera dinitré puis converti en **2.32** par l'addition d'un bras diéthyle oxalate conjointement à la substitution du fluor par un groupe méthoxy. La réduction des nitro par hydrogénation catalytique permet de former l'indole **2.7**. Finalement, les étapes suivantes correspondent à celle de Corey (annélation de

Doebner von Miller et oxydation au CAN). Dans cette synthèse, l'hydrolyse se fait grâce à une solution concentrée de carbonate de potassium à reflux pendant un temps long, suivi par une simple acidification à pH 2,0 pour faire précipiter le PQQ.

2.2 Développement de la synthèse de dérivés du PQQ portant une fonction catéchol protégée

2.2.1 Design du pro-PQQ et cahier des charges

Le point clef dans la stratégie d'amplification du signal que nous proposons est le design par ingénierie moléculaire de molécules pro-PQQ qui par réaction avec une petite molécule cible doivent permettre de générer la forme active du PQQ afin que ce dernier puisse spécifiquement reconstituer et activer la PQQ-sGDH. Pour cela, nous envisageons trois différentes stratégies de dérivatisation du PQQ, comme indiquées FIGURE 2.15.

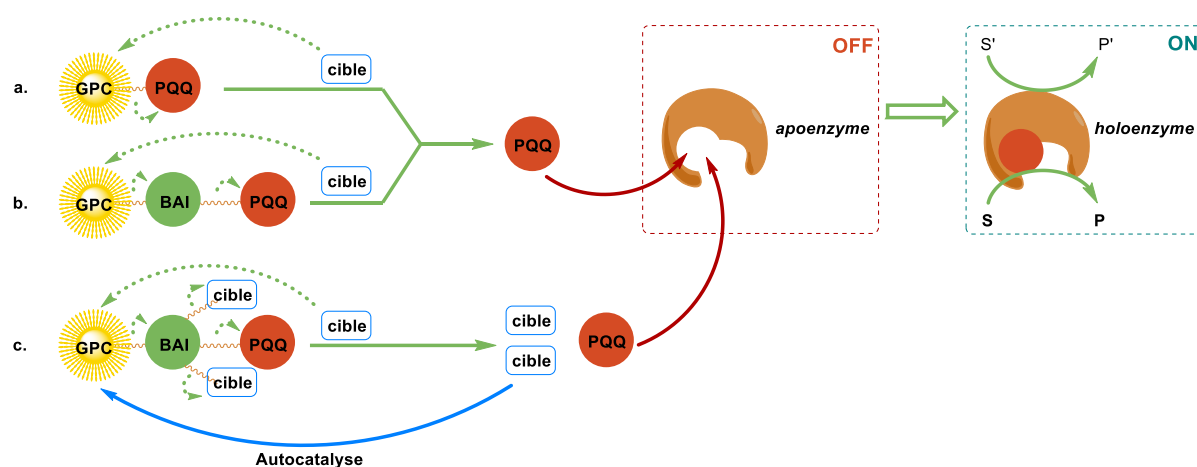


FIGURE 2. 15 Description de la génération du PQQ selon le clivage de différentes molécules pro-PQQ par la cible (ou effecteur). **Cas a** : le PQQ est directement lié au groupement protecteur clivable déclencheur (GPC). **Cas b** : le PQQ est lié au groupement protecteur clivable par l'intermédiaire d'un bras espaceur auto-immolant (BAI). **Cas c** : Le PQQ est lié à un bras espaceur auto-immolant qui est lié à la fois au groupement protecteur clivable ainsi qu'à deux groupes cibles libérables.

Dans le premier cas (**cas a**), le cofacteur PQQ est rendu inactif directement par un groupement protecteur clivable (GPC). Dans le second cas (**cas b**), un bras espaceur auto-immolant (BAI) est inséré entre le groupement protecteur clivable et le cofacteur. Concernant le dernier cas (**cas c**),

un bras espaceur auto-immolant est fonctionnalisé de façon à porter deux groupes fonctionnels capables de relarguer en tout 2 équivalents de la cible réactive (ou effecteur) en même temps que le PQQ, autorisant ainsi une sur-amplification du signal par un processus auto-catalytique de libération du PQQ. Dans chacun des cas, il est nécessaire de bien réfléchir au design du pro-PQQ et à la manière d'y accéder car il doit respecter un cahier des charges strict si on veut pouvoir l'utiliser dans le contexte tel que proposé d'amplification moléculaire par activation de la PQQ-sGDH.

Le PQQ est une molécule aromatique polycyclique et polyfonctionnelle, comportant notamment trois acides carboxyliques, une fonction pyrrole et un centre redox actif *ortho*-quinone (FIGURE 2.16).

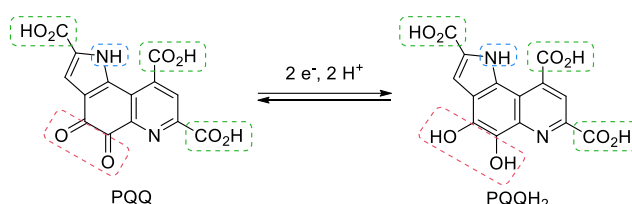


FIGURE 2. 16 Groupes fonctionnels de la pyrroloquinoléine quinone, sous ses formes oxydée (PQQ) et réduite (PQQH₂)

De nombreuses solutions peuvent donc être imaginées pour introduire un groupement protecteur clivable. Cependant, plusieurs critères dans la synthèse du pro-PQQ doivent être respectés :

- le premier est de s'assurer qu'aucune trace de PQQ libre (non protégé) ne puisse être présente dans le produit final, puisqu'en effet des traces de l'ordre du picomolaire en PQQ sont potentiellement détectables par reconstitution de l'*apo*-sGDH⁶⁰. En pratique, cela se traduit par la nécessité de s'appuyer sur une stratégie de synthèse totale d'un précurseur du PQQ et non pas sur la fonctionnalisation directe du PQQ, laquelle peut conduire à la conservation de traces résiduelles de PQQ n'ayant pas réagi.
- le second point à considérer est que la modification chimique du PQQ soit telle que sa version pro-PQQ ne soit presque plus ou plus du tout affine pour le site *apo* de l'enzyme, mais aussi d'interdire toute restitution d'activité enzymatique à partir de l'*apo*-sGDH présente en solution. Ce second critère est primordial puisqu'il est la clé du passage d'un système enzymatique OFF à un système ON. Pour respecter à coup sûr cette dernière

condition, la fonctionnalisation du centre quinonique a été notre priorité car offrant la possibilité d'éteindre toute activité redox du PQQ une fois fonctionnalisé par un groupement protecteur.

- le troisième point à ne pas négliger est que le groupement protecteur soit facilement et rapidement clivable par un effecteur.
- le quatrième point est qu'il faut s'assurer que l'analogue synthétisé soit soluble dans les conditions permettant la reconstitution enzymatique de l'enzyme (*i.e.* tampon Tris de 0,1 M à pH 7,4 contenant 3 mM de Ca^{2+}), et suffisamment stable et robuste pour résister à une hydrolyse ou activation spontanée qui conduirait à un relargage prématuré du PQQ. En effet, si le pro-PQQ se convertit en l'absence de l'effecteur au cours du temps, cela génèrera un signal dit «faux-positif» qui induira en erreur l'expérimentateur sur la détection réelle du composé cible et limitera les performances analytiques.

La FIGURE 2.17 présente les différentes molécules pro-PQQ que nous avons pensé intéressant de synthétiser.

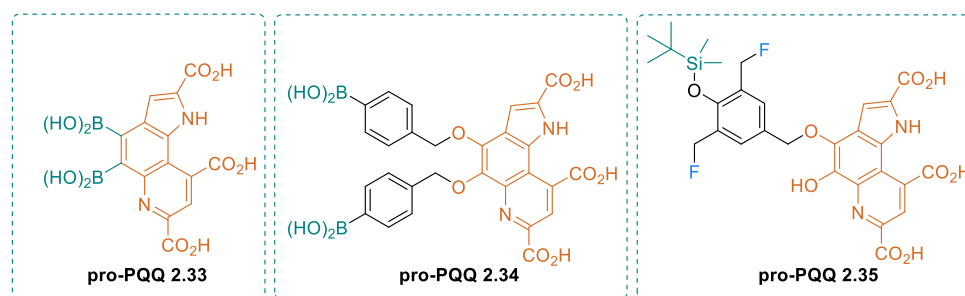
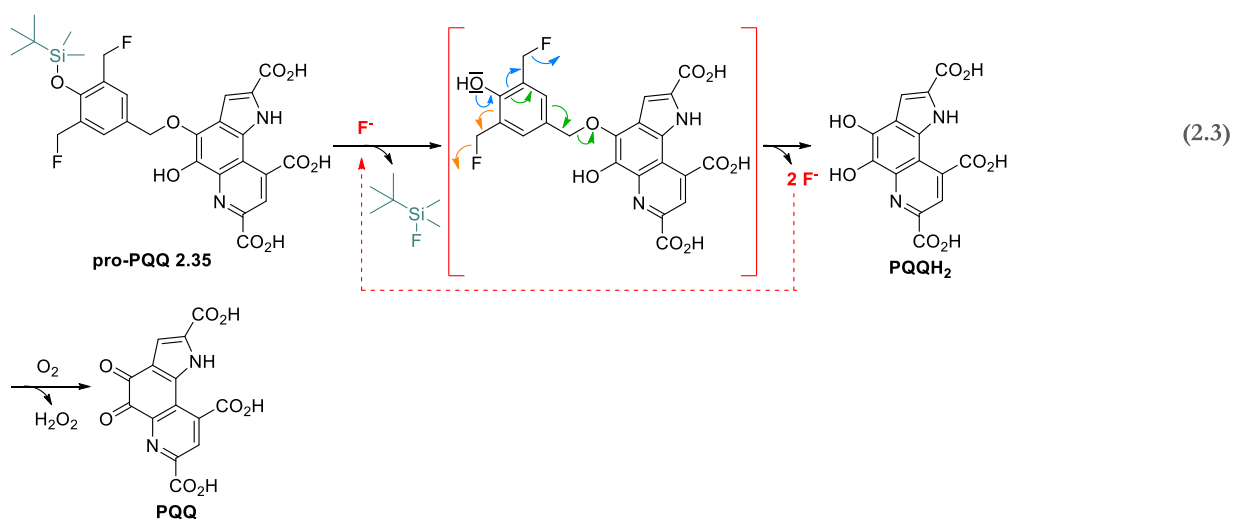
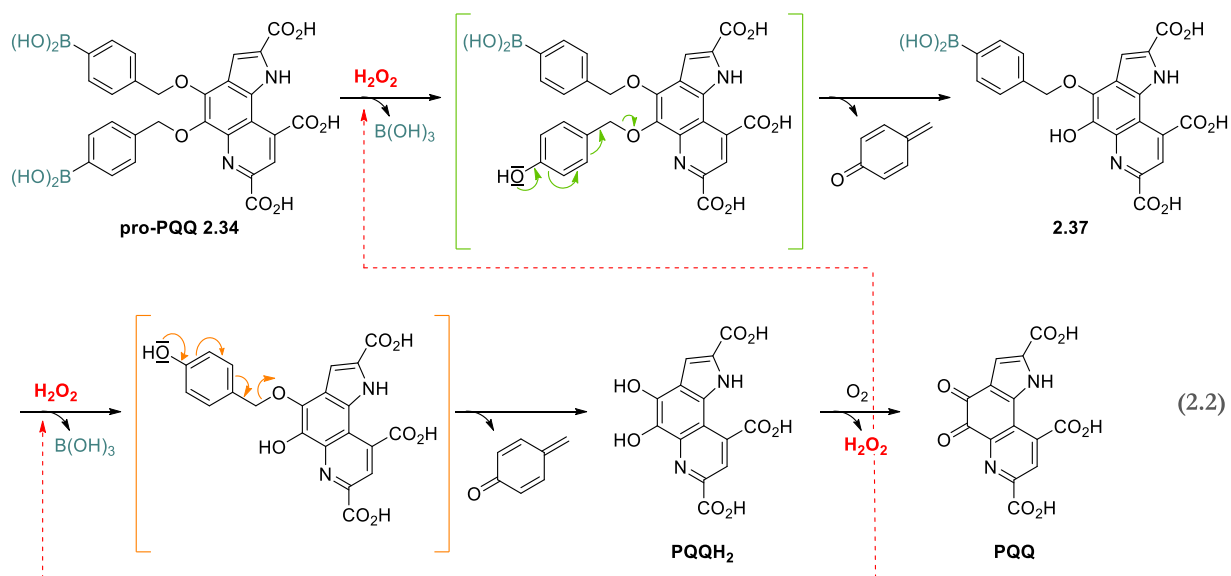
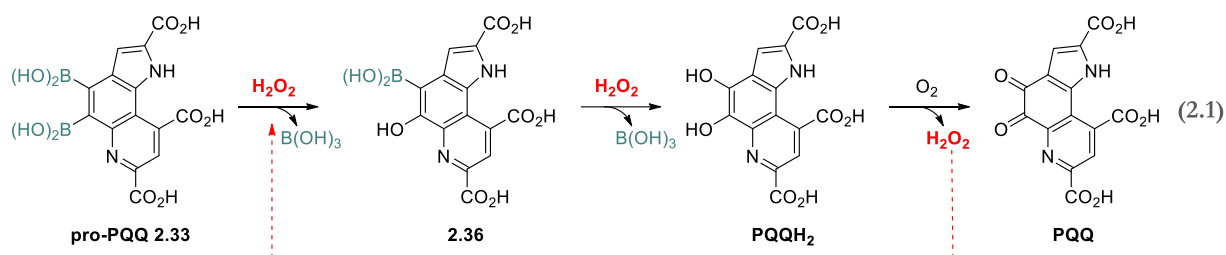


FIGURE 2. 17 Présentation des trois pro-PQQ d'intérêt

Les deux premiers composés reposent sur des groupements protecteurs activables de type esters boroniques (en vert sur la figure) capables d'être clivés par une réaction de déprotection oxydative avec H_2O_2 , tandis que la troisième molécule pro-PQQ consiste en un groupement protecteur *tert*-butyldiméthylsilyl activable en présence d'ions fluorures. Pour l'ensemble des molécules, la fonction redox du motif quinonique est désactivée en neutralisant l'une ou les deux fonctions hydroxyles. Ces trois molécules pro-PQQ sont associées chacune à l'une des trois stratégies de dérivation du PQQ présentées FIGURE 2.15. Cela équivaut à écrire pour chaque composé les trois schémas réactionnels de déprotection suivants *via* l'action d' H_2O_2 ou F^- :



Dans des conditions sous-stœchiométriques en H₂O₂, il apparaît que si l'intermédiaire mono-acide boronique (**2.36** ou **2.37**) est stable, il sera impossible de générer la molécule finale PQQ puisqu'un second équivalent d'H₂O₂ est nécessaire à sa déprotection. Or, comme nous le verrons

plus tard dans le dernier chapitre de ce manuscrit, il s'avère que les dérivés naphthyls mono-esters boroniques porteurs d'un groupement OH en *para* ne sont pas stables et donc par extrapolation, nous espérons que ce soit également le cas avec ces intermédiaires.

Dans la partie qui suit, les différentes stratégies de préparation des composés **2.34** et **2.35** sont présentées. Elles s'inspirent des différentes synthèses totales du PQQ selon Corey et Tramontano, Martin et coll. ou encore le groupe de Mackenzie. La synthèse du pro-PQQ **2.33** a été explorée par un autre chercheur du laboratoire, mais reste malheureusement sans succès. Elle ne sera donc pas décrite dans ce manuscrit. Afin de mettre au point nos différentes stratégies de synthèse totale des dérivés PQQ protégés sans avoir à gérer la synthèse des groupes protecteurs envisagés, nous avons choisi de commencer par la synthèse du dérivé pro-PQQ **2.38**, reporté **FIGURE 2.18**, dont la fonction catéchol est protégée par un pont méthylène. Cette protection par un pont méthylène est suffisamment robuste pour résister aux différentes étapes de la synthèse car uniquement clivable en milieu acide à reflux⁶⁹.

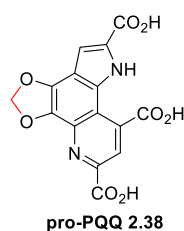


FIGURE 2. 18 Modèle de pro-PQQ : la fonction catéchol est protégée par un pont méthylène

Pour la synthèse du composé **2.38**, trois voies de synthèse ont été explorées, comme nous allons maintenant le voir.

2.2.2 Voie A

La première voie de synthèse envisagée pour préparer le composé **2.38** nous est apparue d'autant plus attractive que sur le papier, elle permet d'aller au dérivé souhaité en 7 étapes à partir du 2,3-dihydroxybenzaldéhyde **2.39** (**FIGURE 2.19**). L'originalité de cette approche tient à la présence dès le départ d'une fonction catéchol. Invariablement, les différentes synthèses totales du PQQ qui ont été décrites jusqu'alors nécessitent l'introduction du motif quinone *via* une étape d'oxydation mise en œuvre ultérieurement à la formation du composé tricyclique. En introduisant

la fonction catéchol dès le départ, il est alors assez facile de commencer par sa protection, et ainsi éviter le passage par une fonction *ortho*-quinone difficilement protégeable, pour être sûr d'exclure *in fine* toute trace de PQQ libre.

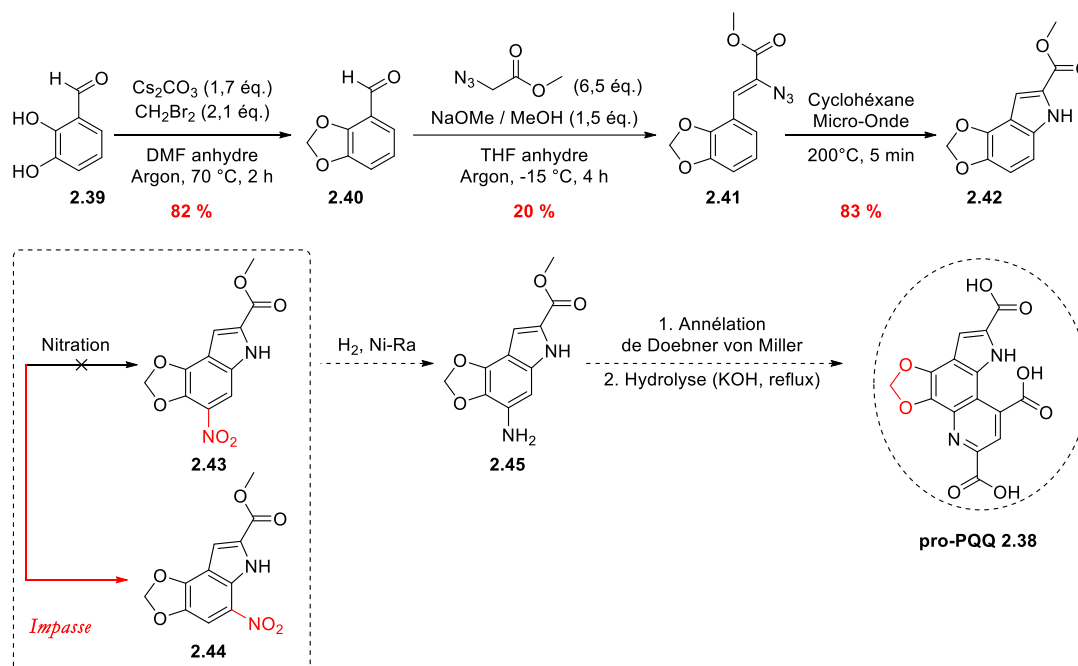


FIGURE 2. 19 Voie de synthèse A

La stratégie de synthèse démarre ainsi par la protection dès la première étape du catéchol selon la procédure du groupe de Morin⁷⁰ par réaction avec le dibromométhane en présence de carbonate de césium. Le rendement obtenu est de 82 % (un peu plus élevé que celui de 78 % reporté dans la littérature).

La seconde étape reprend la méthode de formation de l'indole selon Mackenzie et coll. dans laquelle le benzaldéhyde est condensé sur le méthyl azidoacétate pour former un azidocinnamate **2.41**, que l'on cyclise ensuite en indole **2.42** par une étape de thermolyse. La condensation du benzaldéhyde a un rendement très faible de l'ordre de 20 % puisque la majorité du produit de la réaction reste sous la forme hydratée d'azidocinnamate⁷¹. Par la suite, la thermolyse a été effectuée à l'aide d'un micro-onde qui permet d'atteindre de très haute température en un laps de temps très court sous pression contrôlée. Le composé **2.41** est transformé en indole **2.42**, avec un grand degré de pureté, par chauffage à 200 °C dans du cyclohexane pendant 5 minutes. Le rendement obtenu de 83 % est d'ailleurs supérieur à celui de 65 % obtenu par reflux dans le xylène pendant 4 heures, lequel ensuite nécessitait une étape de purification sur colonne chromatographique.

Une fois l'indole obtenu, il est nécessaire de mono-nitrer en *ortho* du catéchol afin de pouvoir procéder ensuite à l'annélation de Doebner von Miller. En effet, une hydrogénation catalytique au nickel de Raney permet de convertir le nitro **2.43** en aniline **2.44**, composé nécessaire à l'annélation selon le procédé de Corey et Tramontano pour introduire le troisième cycle sur la molécule. Enfin la déprotection par une base forte comme KOH à reflux doit permettre la déprotection du pont méthylène protégeant le catéchol.

Malheureusement, l'étape de nitration s'est révélée être une impasse puisqu'elle conduit inévitablement à la formation de l'isomère **2.44**, nitré en position 7. Ce problème de régiosélectivité de la réaction a été un réel frein pour la suite de la synthèse puisque la position du nitro dirige la réaction d'annélation. Dans ce cas, c'est un isomère non-souhaité du PQQ qui serait obtenu. Les différentes conditions testées afin de sélectivement nitrer la molécule sont décrites dans le tableau ci-dessous (TABLEAU 2.1).

TABLEAU 2. 1 Conditions de synthèse pour obtenir le composé nitré **2.43**,
nd = produit non déterminé

Agent nitrant	Quantité	Solvant	Température	Durée	Produit (qualitatif)
Bi ^{III} (NO ₃) ₃	1,5 éq.	Acétone	25 °C		Pas de réaction
			50 °C	12 h	2.44
			85 °C		2.44
Fe ^{III} (NO ₃) ₃	1 éq.	Acétone	-30 °C		Pas de réaction
			0 °C	30 min	nd
			25 °C		2.44
Fe ^{III} (NO ₃) ₃	1,5 éq.	Acétone	25 °C	2h	2.44
			40 °C	12 h	2.44

Tout d'abord, le nitrate de bismuth a été utilisé et comme il ne réagit pas sur l'indole à température ambiante, la réaction a été répétée à de plus hautes températures, 50 et 85 °C. Seulement, la réaction de nitration résulte en la formation du mauvais isomère **2.44** dans les deux cas. Enfin, le nitrate de fer a été employé et celui-ci réagit bien à température ambiante mais donne aussi le mauvais isomère. Afin de vérifier que la formation de l'isomère souhaité n'est pas

possible à plus basse température l'expérience a été répétée à -30 °C ainsi qu'à 0 °C. Dans le premier cas, il n'y a pas de réaction, les réactifs restant totalement inchangés dans ces conditions. Dans le second cas, beaucoup de produits secondaires ont été détectés par chromatographie sur couche mince, mais aucun d'entre eux ne présentait la tache caractéristique de couleur jaune du groupement nitro. La nitration est donc inopérante à basse température avec cet agent nitrant. Finalement, même en introduisant un excès de nitrate de fer et en chauffant la réaction pendant 12 heures, il n'a pas été possible d'isoler le bon isomère, ni même la molécule dinitrée, ce qui implique que la position 6 est extrêmement peu favorable à la nitration dans ces conditions.

Afin d'obtenir le bon isomère, une modification des groupes protecteurs du catéchol aurait été nécessaire, mais le mauvais rendement et la difficulté de l'étape **2.40** → **2.41** (étape 2) nous a finalement poussé à explorer d'autres voies.

2.2.3 Voie B

C'est en s'inspirant de la synthèse proposée par Martin et coll. faisant intervenir des coumarines que la stratégie suivante a été explorée (FIGURE 2.20).

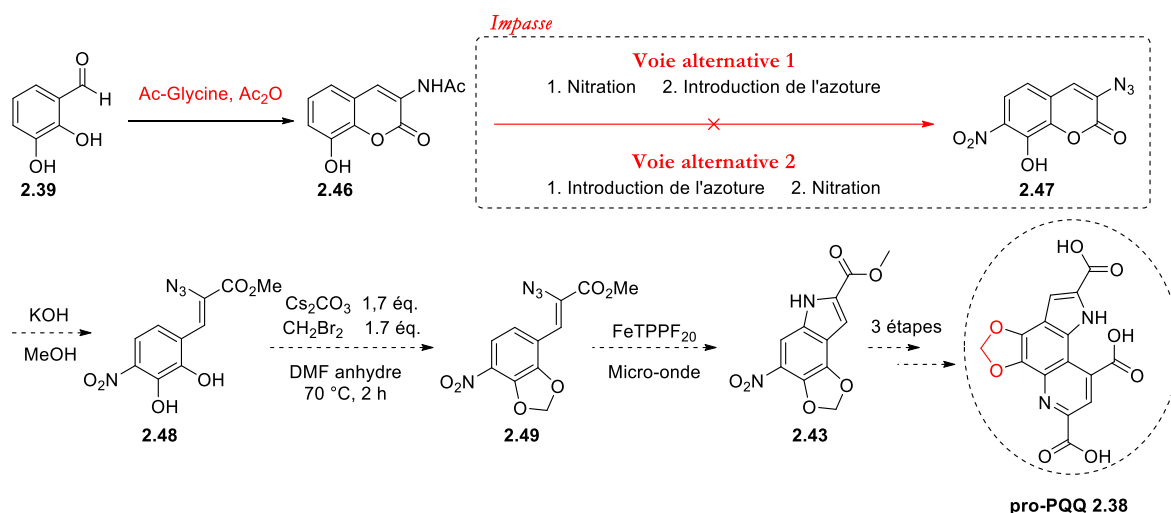


FIGURE 2. 20 Voie de synthèse B

La première étape consiste en la formation d'une coumarine. Cette étape est semblable à la procédure employée par Martin et coll. sauf que le composé de départ est différent (2,3-dihydroxybenzaldéhyde **2.39** au lieu du 2-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde **2.23**). La coumarine **2.46** doit être ensuite mono-nitrée et un azoture doit remplacer le groupement N-acétyl pour former *in fine* le composé **2.47**, pour avoir accès à l'indole d'intérêt en 3 étapes, celles-

ci consistant en d'abord l'ouverture de la coumarine par une base forte, puis la protection du catéchol ainsi formé par un pont méthylène, et enfin l'indolisation du composé catalysée par une porphyrine de fer ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{TPPF}_{20}$). La procédure d'indolisation est différente de celle du groupe de Martin puisque l'azoture remplace le groupement N-acétylé. Dans ce cas, comme dans le cas de la synthèse de Mackenzie, c'est l'azoture qui doit permettre d'obtenir l'indole.

Une fois l'indole formé, il devient possible d'accéder à l'analogue du PQQ en trois étapes, c'est-à-dire réduction du nitro, annélation de Doebner von Miller et hydrolyse des esters.

La difficulté que nous avons rencontrée avec cette voie de synthèse démarre dès la tentative d'obtention du composé **2.47** et ce malgré les deux voies alternatives de synthèse que nous avons testées, à savoir la nitration qui précède l'introduction de l'azoture (**voie alternative 1**), ou inversement (**voie alternative 2**).

La voie alternative 1 (**FIGURE 2.21**) vise une première possibilité pour laquelle la nitration de la coumarine en *ortho* se fait plutôt très bien (85 % de rendement) à partir de nitrate de fer en 30 minutes à température ambiante. Les choses se compliquent au moment d'introduire l'azoture puisque même en réalisant de manière séquentielle chacune des étapes d'introduction de l'azoture il n'a pas été possible d'obtenir le composé **2.47**. La déprotection de l'acétyl *via* une hydrolyse acide est efficace (95 % de rendement) mais la formation du sel de diazonium et sa substitution nucléophile par l'azoture sont inopérantes. La présence d'un phénol non protégé ou d'un groupe nitro sont sans doute néfastes à la formation du sel de diazonium.

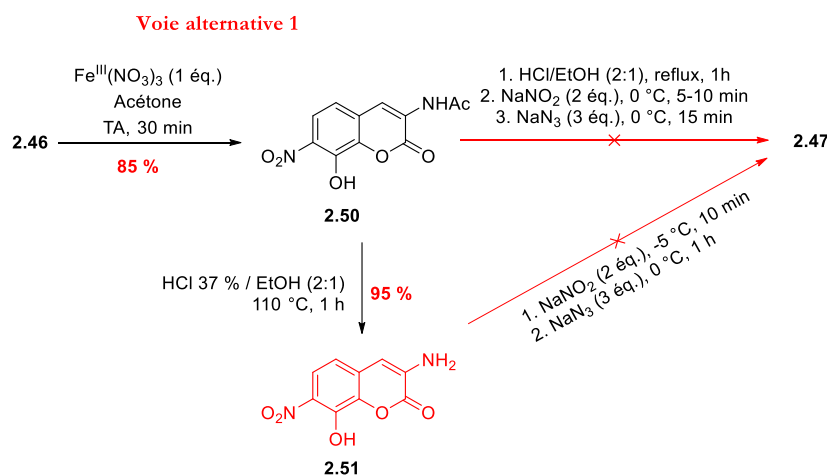


FIGURE 2. 21 Voie alternative 1 pour la synthèse de **2.47**: la nitration est suivie de l'introduction de l'azoture

La voie alternative 2 (FIGURE 2.22) procède *via* l'inversion des étapes de nitration et d'introduction de l'azoture. Cette fois-ci l'azoture est introduit avec un rendement de 56 %, puis la nitration est effectuée. La nitration du composé **2.52** conduit malheureusement à un mélange de produits nitrés difficilement séparables dont le nitro en *ortho* **2.47** (produit souhaité) et celui en *para* **2.53**, ainsi que le dérivé dinitro **2.54**. Malgré l'utilisation de nitrate de fer dans les mêmes conditions que la voie 1 (1 équivalent, 30 minutes à température ambiante) ou même de nitrate de bismuth qui est moins réactif à température ambiante, il n'a pas été possible d'obtenir une seule espèce nitrée. Un autre problème auquel nous avons été confrontés est celui de la tendance des coumarines à se dégrader à la lumière et sur la silice des colonnes chromatographiques.

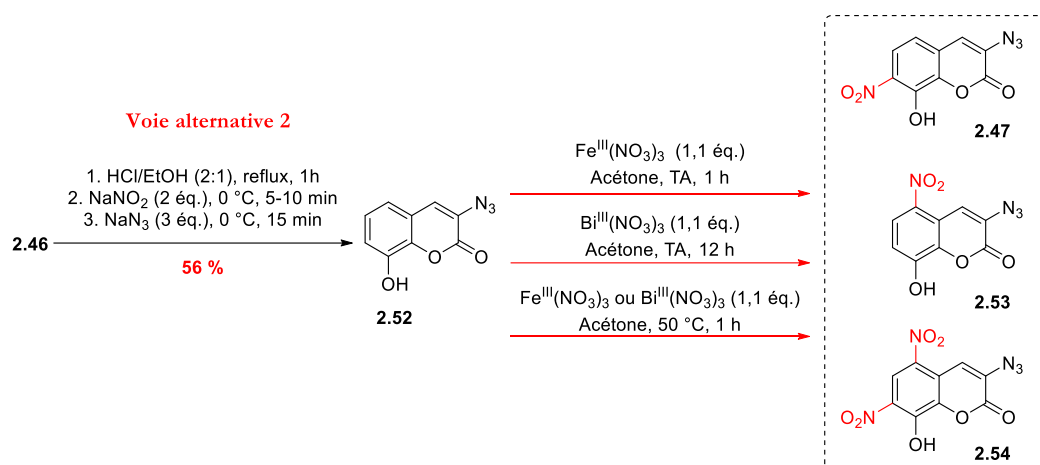


FIGURE 2. 22 Voie alternative 2 pour la synthèse de **2.47**: l'introduction de l'azoture est suivie de la nitration

L'impossibilité d'obtenir une coumarine présentant à la fois le nitro en *ortho* et l'azoture, et la faible stabilité de ces dérivés coumarines sur colonne, nous ont conduit à ne pas poursuivre cette voie de synthèse.

2.2.4 Voie C

La troisième voie de synthèse du composé **2.38** est représentée FIGURE 2.23.

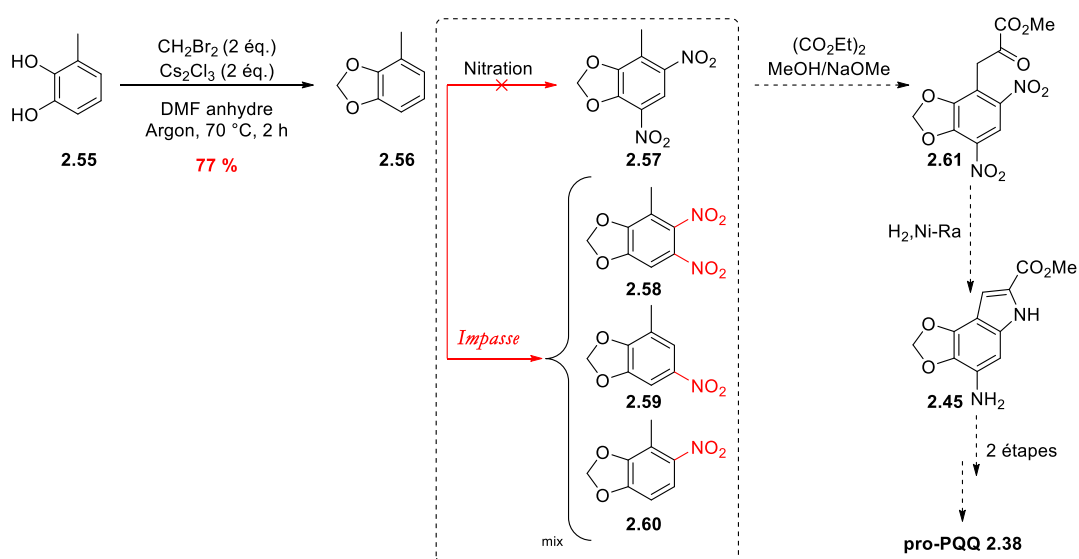


FIGURE 2. 23 Voie de synthèse C1

Le réactif de départ est le 3-méthylcatéchol, qui doit d'abord être protégé par le pont méthylène avant d'être dinitré. L'indole est ensuite formé en suivant la procédure développée par Puthiaram et coll. dans leur brevet, laquelle consiste en l'addition d'un bras diéthyle oxalate puis la réduction des groupements nitro par hydrogénation catalytique produisant alors la fermeture du cycle. L'indole **2.45** formé est ensuite converti en le dérivé souhaité du PQQ **2.38** en 2 étapes (annélation de Doebner von Miller et hydrolyse des esters).

Comme le montre la FIGURE 2.24, le principal inconvénient de cette méthode est qu'il n'est pas possible d'avoir un accès direct à l'intermédiaire dinitré souhaité puisque la nitration en *para* du méthyl n'est pas favorable. Plusieurs procédures ont été tentées sans succès puisqu'à chaque fois nous avons pu vérifier que la nitration se fait uniquement en *ortho* ou en *méta* du méthyl (TABLEAU 2.2).

TABLEAU 2. 2 Conditions de synthèse pour obtenir le composé nitré **2.57**

Nitrate	Quantité	Solvant	Température	Temps	Produit (qualitatif)
$\text{Bi}^{\text{III}}(\text{NO}_3)_3$	2,2 éq.	Acétone	25 °C	2 h	Mono : 2.59 ; 2.60
			50 °C		Di : 2.58
$\text{Fe}^{\text{III}}(\text{NO}_3)_3$	2,2 éq.	Acétone	25 °C	2 h	Mono : 2.59 ; 2.60
			50 °C		Di : 2.58
HNO_3	69 %	H_2SO_4	7-10 °C	2 h	2.58 ; 2.59 ; 2.60
	69 %		-5 °C	5 min	2.58 ; 2.59 ; 2.60
	100 %		-5 °C	10 min	Di : 2.58
				5 min	Di : 2.58

Comme aucune procédure n'a permis d'obtenir l'espèce dinitrée souhaitée (nitrate de fer, de bismuth ou même acide nitrique), la question du mécanisme de la nitration du méthylcatéchol s'est posée. En effet, en considérant simplement les effets électroniques, une nitration en *ortho/para* du méthyl était attendue (FIGURE 2.24).

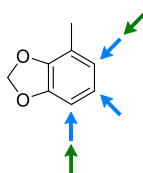
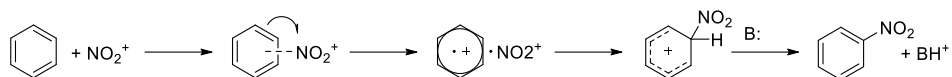


FIGURE 2. 24 Effets des groupements du composé **2.56** sur la direction de la nitration (en vert : effet du méthyl, en bleu : effet des oxygènes)

Il s'avère que le mécanisme de nitration de composés aromatiques riches en électrons comme **2.56** est différent d'une substitution électrophile aromatique (SEAr) classique. Des analyses DFT⁷² révèlent la possibilité d'un mécanisme dirigé par un transfert d'un seul électron (SET) formant des espèces radicalaires, et dont la régiosélectivité de l'attaque dépendra de la symétrie de la HOMO du composé aromatique (FIGURE 2.25).

FIGURE 2. 25 Mécanisme radicalaire de la nitration⁷²

Dans le cas de la nitration du méthyl catéchol, la symétrie de la HOMO favorise les attaques radicalaires en position *ortho* et *méta* du méthyl.

Ayant identifié le problème, il devient alors envisageable de le contourner (FIGURE 2.26). Pour cela, nous avons envisagé d'acétyler le catéchol, afin de permettre de passer du mécanisme radicalaire à celui plus courant de la SEAr et d'orienter ainsi la nitration en *ortho/para* du méthyl⁷³. Après désacétylation du dérivé **2.63**, le catéchol dinitré peut alors être protégé par le pont méthylène.

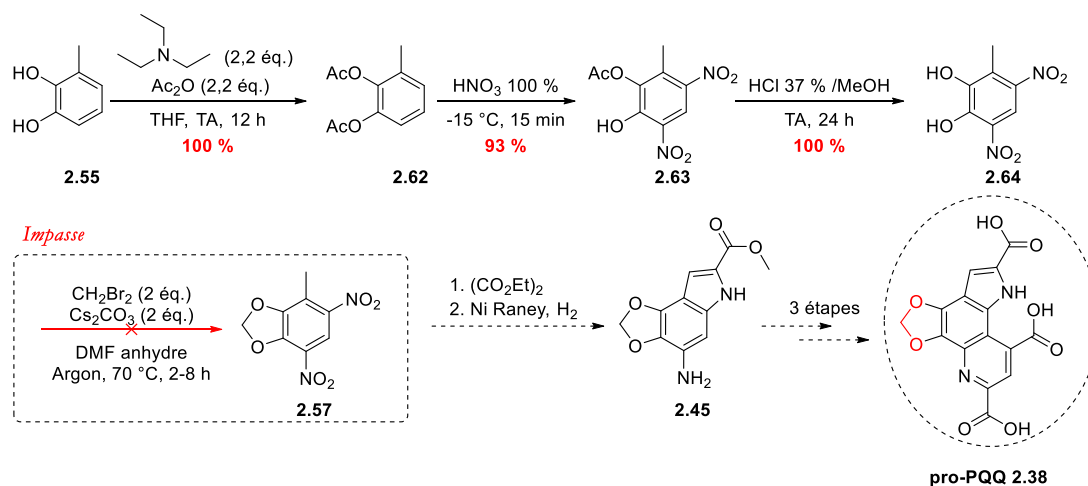


FIGURE 2. 26 Voie de synthèse C2

Grâce à cette procédure, l'espèce dinitrée **2.64** souhaitée a pu être obtenue avec un rendement global de 93 %. L'étape suivante de protection du catéchol par le pont méthylène n'a malheureusement pas été possible. Après de nombreux essais qui se sont révélés tout aussi infructueux, l'introduction d'autres groupements protecteurs tels que l'éthoxyméthyl, le benzyle et le *para*-bromobenzyle (FIGURE 2.27) a été essayée.

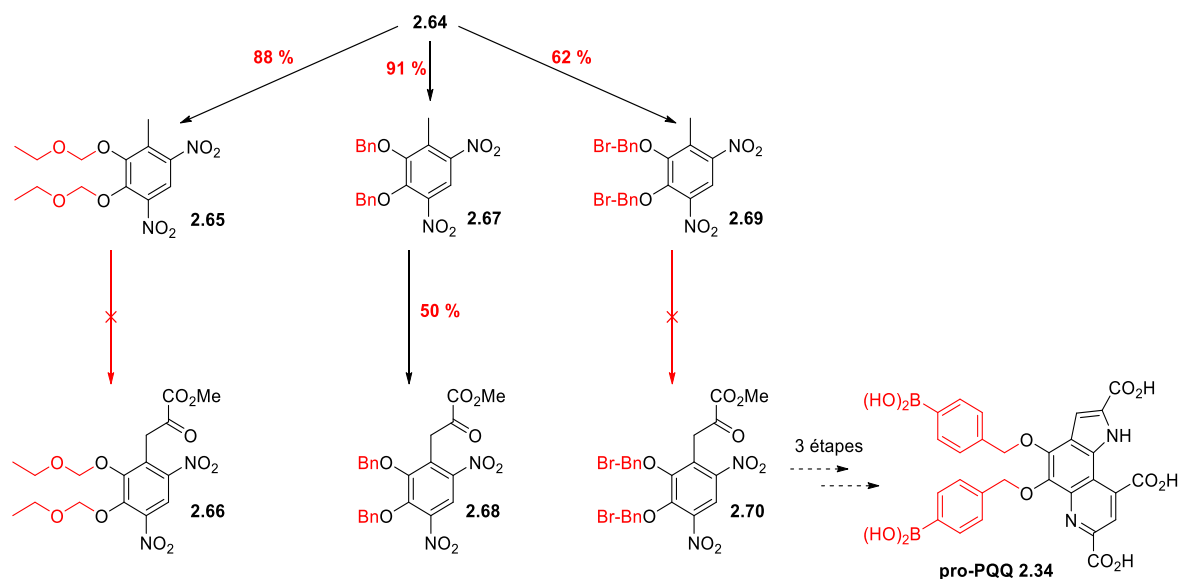


FIGURE 2. 27 Introduction d'autres groupements protecteurs

Dans les trois cas, il a été possible de protéger le catéchol. Toutefois, concernant le composé **2.65**, sa faible stabilité n'a pas permis l'insertion du bras diéthyle oxalate nécessaire à la formation de l'indole. En fait, l'utilisation de la base provoque la déprotection systématique des bras éthoxyméthyl au détriment de la formation du composé souhaité.

En revanche, dans le cas du composé dibenzyle, l'insertion des bras a pu être réalisée facilement à l'aide de DBU comme base. La synthèse du dérivé *pro-PQQ* **2.34** porteur d'un benzène « activable » a alors été envisagée. Le groupement protecteur prend alors la forme d'un bras auto-immolant (benzyle) porteur d'un groupe déclencheur (acide boronique). Ainsi, la procédure permettant d'obtenir la molécule dibenzylée **2.67** est reproduite avec cette fois-ci l'introduction du *para*-bromobenzyle. L'addition se fait avec un rendement de 62 % et permet d'obtenir la molécule **2.69**. Mais contre toute attente, l'introduction du bras diéthyle oxalate n'a pu se faire. La réaction est sans doute limitée par la présence des deux bromes, tous deux électroattracteurs. Ces derniers semblent en effet déstabiliser fortement la molécule en présence de base, conduisant invariablement au produit débenzylé. Une nouvelle fois, la voie de synthèse explorée a été entravée par la réactivité singulière des intermédiaires synthétisés. Une solution serait d'utiliser un autre bras espaceur auto-immolant (FIGURE 2.28) ainsi l'effet électroattracteur du brome serait limité par l'effet donneur du méthoxy et il devrait être possible d'obtenir le produit **2.71**.

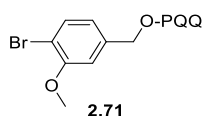


FIGURE 2. 28 Nouveau système de protection du PQQ

2.2.5 Conclusion et perspective

Bien que de nombreux efforts de synthèse aient été fournis, aucun dérivé pro-PQQ n'a pu être isolé pour le moment. Cependant ces efforts ont permis de mieux comprendre les réactivités spécifiques des dérivés intermédiaires et d'affiner de nouvelles stratégies de synthèse de dérivés pro-PQQ. Parmi les autres voies envisageables, une synthèse faisant intervenir les coumarines (mimant celle de Martin et coll.) est en cours d'étude au laboratoire afin d'obtenir le dérivé benzylboronique du PQQ (FIGURE 2.29).

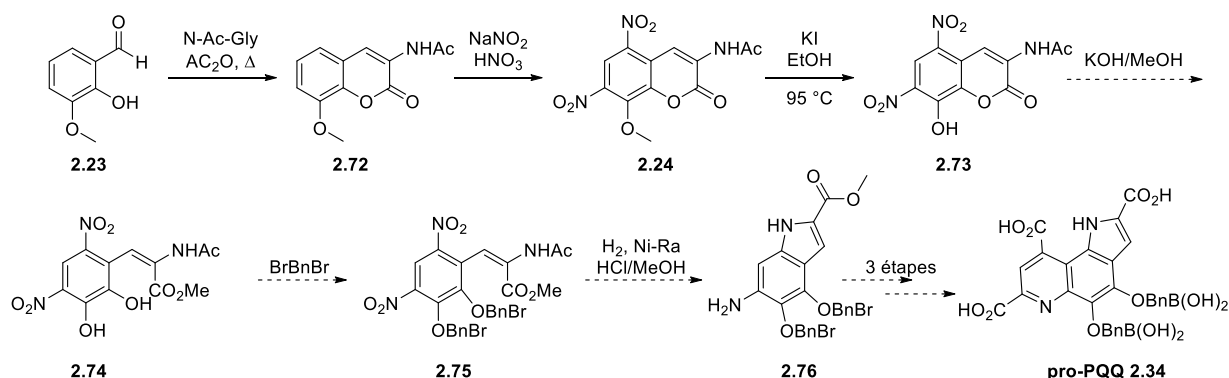


FIGURE 2. 29 Voie de synthèse annexe

Les premières étapes étant similaires à celles de Martin, la difficulté dans cette stratégie de synthèse pourrait être au moment de l'insertion des groupements protecteurs et de la formation de l'indole d'intérêt, une étape clé dans la synthèse de dérivés pro-PQQ.

2.3 Etude d'un groupement protecteur particulier combinant auto-immolation et auto-catalyse

2.3.1 Introduction sur les bras espaceurs silylés

La troisième molécule pro-PQQ que nous avons envisagé de protéger est spécifique des ions fluorures (FIGURE 2.30). Elle repose sur un groupement protecteur clivable *tert*-butyldiméthylsilyl combiné à un bras espaceur, qui permet de libérer 1 équivalent de PQQ et 2 équivalents de F⁻ lors de sa dégradation par auto-immolation (*cf* réaction 2.3 page 57)

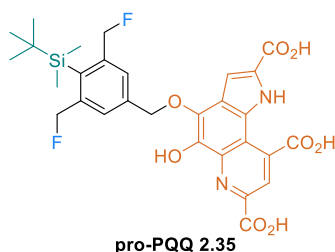


FIGURE 2. 30 Pro-PQQ 2.35 porteur d'un bras espaceur auto-immolant fonctionnalisé par deux fluors et un groupe protecteur clivable silylé.

Compte tenu des difficultés à synthétiser une molécule pro-PQQ, il nous a paru primordial de tester d'abord des modèles simples de groupes protecteurs auto-immolants avant de tenter de les associer au PQQ. Nous avons décidé d'évaluer dans un premier temps un groupe protecteur auto-immolant sensible aux ions fluors et capable d'amplifier la détection d'ions fluorures par une réaction de déprotection auto-catalytique. Pour cela, la molécule modèle **2.77** (FIGURE 2.31) a été synthétisée et la cinétique de libération de ses groupes partants sous l'action d'ions fluorures évaluée.

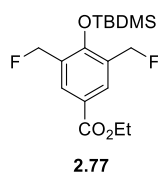


FIGURE 2. 31 Molécule modèle pour le bras auto-immolant du pro-PQQ

2.3.2 Synthèse des groupes auto-immolants

La synthèse du composé **2.77** est décrite FIGURE 2.32. Elle nécessite 4 étapes pour un rendement global de 14 %.

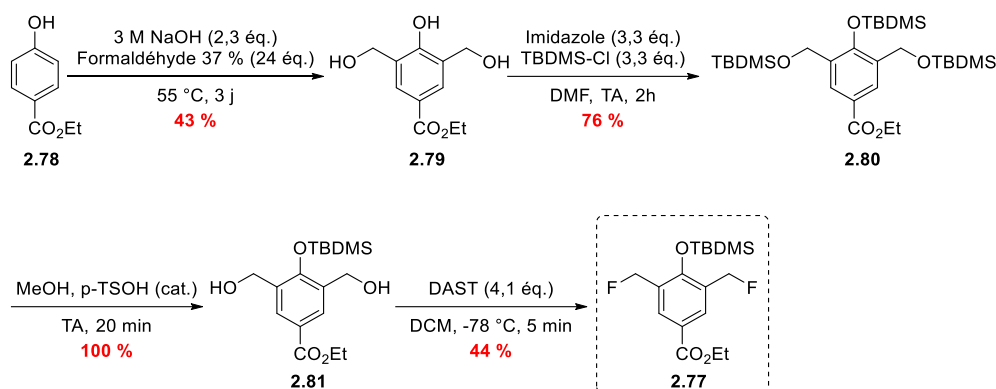


FIGURE 2. 32 Synthèse de la molécule modèle **2.77**

La première étape⁷⁴ permet l'insertion de deux bras hydroxyméthyl sur l'éthyl 4-hydroxybenzoate **2.78**. Cette étape a un faible rendement puisque le produit **2.79** est obtenu par recristallisation et que le formaldéhyde a tendance à se polymériser en une substance très élastique limitant la recristallisation du produit. La seconde étape est la protection des trois hydroxyles par des groupes silylés. Il suffit alors de déprotéger sélectivement les bras hydroxyméthyl en milieu légèrement acide à température ambiante puis de fluorer le composé **2.81** obtenu avec l'agent fluorant DAST.

La synthèse de ce composé est assez simple mais la dernière étape a été problématique puisqu'il a été difficile de la répéter en obtenant les mêmes rendements et surtout des précautions particulières (conservation sous argon, à -20 °C, en absence de lumière) ont dûes être mises en œuvre afin de conserver intact le composé qui a tendance à s'auto-dégrader facilement.

2.3.3 Analyse de la sonde synthétisée

La cinétique de la réaction de la sonde fluorée avec les ions fluorures a été étudiée par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du fluor (¹H RMN et ¹⁹F RMN) dans des conditions semblables à celles utilisées par Shabat et coll. (cf FIGURE 1.26 page 31). Pour cela, la sonde **2.77**, compte tenu de sa faible hydrosolubilité, est dissoute (3,5 mM) dans un mélange deutéré ACN/DMSO (1:1) en présence de 0,006 équivalent de TBAF comme source de

fluor. La solution est ensuite analysée en fonction du temps par ^1H RMN et ^{19}F RMN. Les résultats obtenus sont présentés **FIGURE 2.33**.

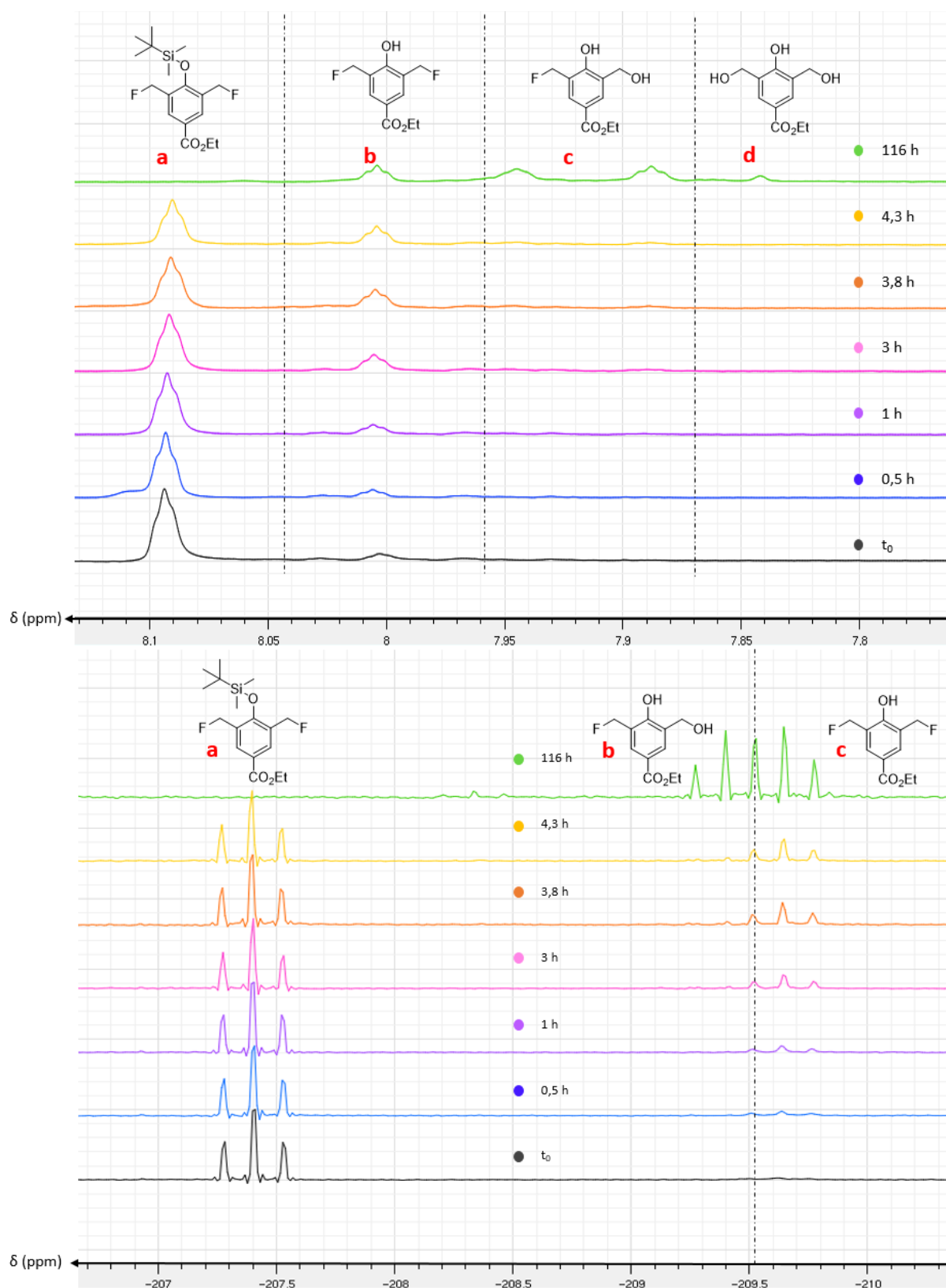


FIGURE 2. 33 Evolution temporelle à température ambiante des spectres ^1H RMN, 32 scans, (en haut) et ^{19}F RMN, 128 scans, (en bas) de la sonde 2.77 (3,5 mM) en présence de 0,006 équivalent de TBAF (20 μM) dans un mélange $\text{ACN}_d/\text{DMSO}_d$ en 1:1 (600 μL).

Dans les conditions de l'expérience (*i.e.* ACN_d/DMSO_d) le désassemblage du composé est très lent. Grâce à cette cinétique lente, nous avons pu identifier par RMN les différentes espèces **(a)**, **(b)**, **(c)** et **(d)** formées au cours de l'expérience par corrélation croisée des informations en RMN du proton et du fluor.

A t_0 , le spectre initial de la molécule **(a)** en absence de TBAF présente les pics caractéristiques attendus en RMN du proton, c'est-à-dire :

- un triplet à 8,09 ppm, de couplage $^4J_{\text{H-F}} = 1,6$ Hz, intégrant pour deux protons et correspondant aux deux protons aromatiques équivalents compte tenu de la symétrie de la molécule.
- un doublet à 5,48 ppm intégrant pour 4 protons correspondant aux protons des bras CH₂F (la présence des fluors est vérifiée par un couplage $^2J_{\text{H-F}}$ de 47,2 Hz).
- deux singulets à 1,05 et 0,24 ppm intégrant respectivement pour 9 et 6 protons, correspondant aux 5 méthyles du groupement protecteur TBDMS.

Il est intéressant de noter qu'une autre espèce est présente en solution dès le départ à une faible concentration. Elle se caractérise par un triplet à 8,00 ppm, de couplage $^4J_{\text{H-F}} = 1,6$ Hz, correspondant aux protons aromatiques, et un doublet à 5,53 ppm, de couplage $^2J_{\text{H-F}} = 47,2$ Hz, correspondant aux protons des bras CH₂F. Nous l'avons attribué à l'espèce **(b)** qui se forme par hydrolyse du groupement silylé (les solvants ACN et DMSO deutérés autorisent la coupure hydrolytique car ils ne sont pas anhydres), ce qui n'affecte pas la symétrie de la molécule mais provoque en RMN un léger changement dans les déplacements chimiques.

Ce résultat permet en partie de comprendre l'instabilité du composé **2.77** qui, s'il contient dès le départ des traces de l'intermédiaire déprotégé (pouvant résulter de la présence d'ions fluorures lors de l'utilisation du DAST), se dégrade *via* l'hydrolyse causée par l'humidité de l'air et le processus d'auto-immolation, alors que ce même composé reste stable sous atmosphère inerte (argon). En effet, ce sont bien les molécules d'eau, par leur caractère nucléophile, qui vont poursuivre le mécanisme d'immolation suite à la libération du premier groupe partant⁷⁵ comme représenté FIGURE 2.34.

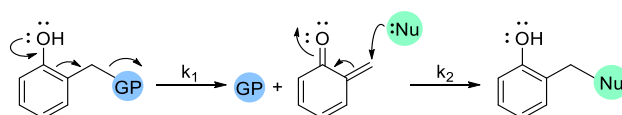


FIGURE 2. 34 Rôle des molécules d'eau dans le mécanisme d'immolation⁷⁵

En accord avec la présence des deux groupes CH_2F équivalents sur la molécule **(a)**, la RMN du fluor du composé initial montre un triplet à -207,40 ppm, et comme précédemment en RMN du proton des traces du composé **(b)** sont détectées *via* la présence d'un second triplet à -209,67 ppm.

Dès l'ajout d'ions fluorures, le composé **(a)** se décompose en **(b)**, comme l'indique l'évolution en RMN du proton et du fluor, des ratios entre les triplets à 8,19 et 8,00 des protons aromatiques d'une part et les triplets des fluors à -207,40 et -209,67 ppm d'autre part, lesquels avec le temps s'inversent progressivement. La vitesse de clivage de la liaison Si-O est lente dans les conditions sélectionnées (plusieurs jours ont été nécessaires pour que le clivage soit total). Cela peut s'expliquer par le fait que peu de fluorures ont été ajoutés dans le tube RMN (0,006 équivalent) et que l'eau nécessaire au bon déroulement du mécanisme d'auto-immolation ne provient que des faibles quantités initialement présentes dans les solvants deutérés et dans l'air.

Après plusieurs jours (116 h), le composé **(a)** a totalement disparu (les pics à 8,09 ppm en ^1H RMN et à -207,40 ppm en ^{19}F RMN ne sont plus présents) et un mélange de trois espèces clairement indentifiables en RMN est obtenu. Celles-ci correspondent aux composés suivants :

- le composé **(b)** déjà identifié (8,00 ppm et -209,67 ppm en ^1H RMN et ^{19}F RMN respectivement).
- le composé **(c)** possédant un seul bras fluoré et dont les protons aromatiques ne sont plus équivalents, conduisant à un singulet à 7,94 ppm et un triplet à 7,89 ppm. En RMN du fluor, ce composé **(c)** se distingue du **(b)** par un déplacement chimique à -209,40 ppm.
- le composé **(d)** qui quant à lui retrouve une symétrie grâce au remplacement du dernier fluor par un hydroxyle. Ainsi les protons aromatiques redeviennent équivalents et sont détectés sous la forme d'un triplet à 7,84 ppm. En RMN du fluor par contre le composé n'est plus détectable puisqu'il ne possède plus d'atome de fluor.

L'expérience n'a pas été menée suffisamment longtemps pour voir la complète conversion en produit final **(d)**. Ce qu'il faut retenir c'est que l'on observe bien une conversion de **(a)** en **(d)** mais avec une cinétique particulièrement lente dans les conditions testées et que la présence dès le départ de traces de **(b)** est problématique puisqu'elle initie le processus sans avoir besoin d'ion fluorure externe.

2.3.4 Conclusion

En conclusion de cette partie, nous avons pu synthétiser facilement la petite sonde à F^- **2.77**, selon une procédure inspirée de celle du groupe de Shabat⁴⁴, et nous avons évalué à l'aide de la spectroscopie RMN du proton et du fluor sa cinétique d'auto-immolation dans les mêmes conditions que Shabat et coll. ($ACN_d/DMSO_d$ 1 : 1). Cette étude nous a permis d'identifier un problème important relatif au bon fonctionnement du système, à savoir que la stabilité du groupement *tert*-butyldiméthylsilyl est très mauvaise dans ces conditions.

Tout d'abord, il faut noter que pour conserver intacte la sonde **2.77** après sa synthèse, nous devons procéder à son stockage immédiat sous argon à froid, et ce afin d'éviter sa décomposition à l'air. Ensuite, lors de l'expérience de suivi RMN, nous avons remarqué la présence dès le départ en solution de l'espèce intermédiaire (**b**), c'est-à-dire l'espèce dont le groupement silyl a été déprotégé. Deux hypothèses ont alors été envisagées, soit il reste des traces d'ions fluorures dans la solution de **2.77** après sa synthèse et sa purification, soit les traces d'eau présentes dans les solvants deutérés et dans l'air sont suffisantes pour débiter l'hydrolyse du groupement silyl en l'absence de fluor.

Finalement, la cinétique même d'auto-immolation de la sonde **2.77** est lente dans nos conditions, puisque nous devons attendre plusieurs jours pour que les 3,5 mM de sonde aient terminé de s'auto-immoler pour libérer les deux équivalents d'ions fluorures en présence de 20 μM de F^- . Toutefois, elle semble être meilleure que celle reportée par le groupe de Shabat puisqu'en présence de 500 μM de sonde, seulement 2 μM de F^- sont détectés après 800 heures de réaction.

Au regard des difficultés rencontrées avec cette sonde modèle **2.77** et de la lenteur de la réaction d'auto-immolation en présence d'ions fluorures, cette étude nous a finalement conduit à remettre en cause l'intérêt de synthétiser la molécule *pro-PQQ* **2.35** et donc à ne pas poursuivre la synthèse de cette dernière.

2.4 Etudes spectroscopiques de la reconstitution de l'*apo*-sGDH : du cofacteur naturel aux dérivés synthétiques

Bien qu'à ce jour aucune des molécules *pro-PQQ* envisagées n'ait pu être synthétisée, nous avons, parallèlement aux efforts de synthèse, cherché à examiner pour un certain nombre d'analogues de PQQ issus des synthèses dans quelle mesure l'affinité et l'activité de ces derniers

pouvaient être modifiées vis-à-vis de la reconstitution de l'enzyme PQQ-sGDH. Pour cela, nous avons commencé par la mise au point d'une méthodologie expérimentale nous permettant d'estimer l'affinité d'analogues de PQQ pour la poche enzymatique de l'*apo*-sGDH. Nous allons ici présenter cette méthodologie d'abord dans le cas de la reconstitution de l'enzyme avec la forme native du PQQ, puis ensuite vis-à-vis de certains analogues de PQQ.

2.4.1 Reconstitution de l'*apo*-sGDH avec son cofacteur, le PQQ

Afin de caractériser d'une manière simple et rapide le processus de reconstitution enzymatique de la PQQ-sGDH, nous avons envisagé de le faire *via* un suivi de l'activité enzymatique en phase homogène par spectroscopie UV-vis dans des conditions de *turnover* (c'est-à-dire dans des conditions de catalyse stationnaire). L'approche consiste à suivre dans des conditions de concentration catalytique en enzyme, la décoloration du co-substrat DCPIP ajouté en excès dans la solution en présence également d'un excès de substrat glucose et aussi d'une forte quantité du composé redox phénazine méthosulfate (PMS). Ce dernier a pour objet de faciliter par médiation redox le transfert d'électrons entre l'accepteur coloré DCPIP et la forme réduite de l'enzyme (FIGURE 2.35).

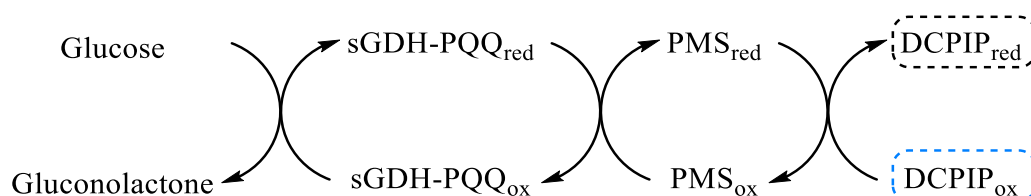


FIGURE 2. 35 Dosage de la reconstitution de la PQQ-sGDH avec le dichlorophénolindophénol (DCPIP) en tant qu'indicateur coloré et la phénazine méthosulfate (PMS) en tant que médiateur redox.

Afin de titrer l'affinité du PQQ pour l'*apo*-sGDH, 50 μ M d'*apo*enzyme (dimère) sont incubés avec diverses concentrations en cofacteur PQQ (de 10 pM à 1 nM) dans un tampon de reconstitution (100 mM de tampon Tris pH 7,4 avec 3 mM de calcium) durant une heure à température ambiante (ce temps relativement long d'incubation est nécessaire pour atteindre l'état d'équilibre à des concentrations subnanomolaires). Après incubation, l'activité enzymatique résultante est déterminée *via* l'ajout des 2 accepteurs d'électrons PMS et DCPIP et du substrat glucose (le suivi de l'activité enzymatique est aisé puisqu'il suffit de déterminer les vitesses initiales de décoloration du DCPIP). Les activités obtenues sont alors normalisées par rapport à l'activité d'une enzyme PQQ-sGDH complètement reconstituée ce qui permet de traduire celle-ci en concentration de

holo-sGDH reconstituée (exprimée en concentration de sous-unités actives). La courbe de titrage obtenue est présentée **FIGURE 2.36** en fonction du logarithme décimal de la concentration initiale en PQQ (chaque donnée représente la moyenne de deux expériences de reconstitution).

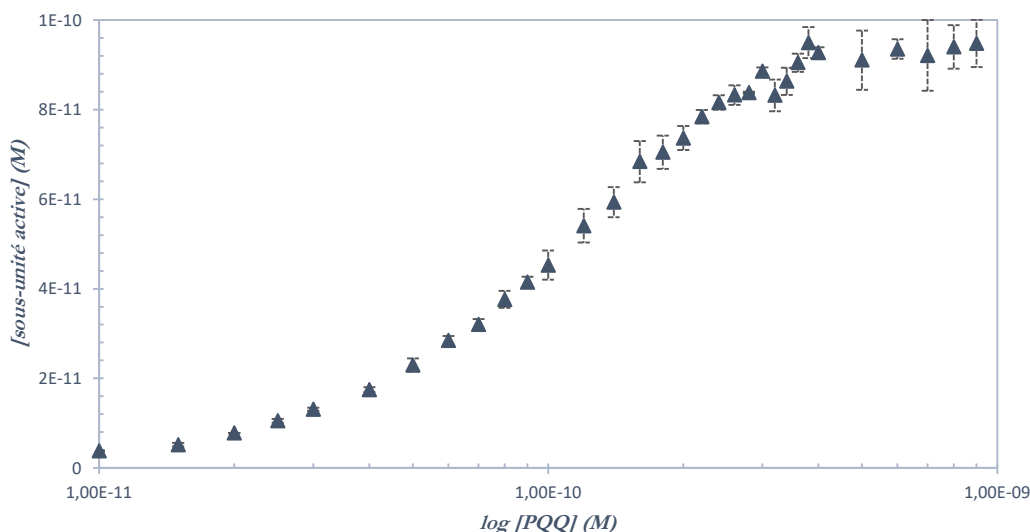


FIGURE 2. 36 Courbe de titrage exprimée en sous-unité active de la PQQ-sGDH en fonction du logarithme décimal de la concentration initiale de cofacteur PQQ. La courbe est obtenue après normalisation des activités obtenues à température ambiante pour 50 pM d'*apo*-sGDH dimérique, x M de PQQ, 50 μ M de DCPIP, 1 mM de PMS et 5 mM de glucose, dans un tampon de reconstitution (0,1 M de Tris à pH 7,4 contenant 3 mM de CaCl_2 et 0,1% de Triton X-100).

Aux plus fortes concentrations en PQQ testées la courbe de titrage atteint un plateau de saturation qui correspond à la reconstitution totale des 50 pM de dimère d'*apo*enzyme (ou 100 pM de sous-unité). En répétant ces expériences, il apparaît clairement que la reconstitution se fait de manière reproductible, en particulier pour les faibles concentrations en cofacteur (quelques picomolaires). C'est par contre un peu moins vrai pour les plus fortes concentrations (de 0,3 à 1 nM) qui montrent une plus grande variabilité.

De par la nature dimérique de la *holo*-sGDH, plusieurs mécanismes de reconstitution sont envisageables. En effet, nous savons que des effets allostériques de type coopérativité négative sont observés pour l'activité de l'enzyme⁵⁶. La question de l'intervention d'un phénomène d'allostérie durant la reconstitution se pose donc. Pour y répondre, la courbe de titrage a été analysée à l'aide de différents modèles :

Modèle 1 : 100 pM de sites totalement indépendants en termes d'affinité et d'activité sont considérés. Le seul paramètre décrivant le système est donc la constante d'affinité K_d , selon une loi d'action de masse classique.

Modèle 2 : 50 pM de dimères avec des sites indépendants (même affinité et activité) sont considérés. Comme pour le modèle 1, le système peut être décrit par un unique paramètre K_d .

Modèle 3 : 50 pM de dimères possédant des sites de même affinité mais des activités différentes selon que le site adjacent soit occupé ou non sont considérés. Dans ce cas, deux paramètres sont nécessaires pour décrire le système : la constante d'équilibre K_d et un facteur nommé δ qui correspond au rapport entre l'activité d'un site dont la sous-unité adjacente est vide et l'activité d'un site dont la sous-unité adjacente est occupée.

Modèle 4 : 50 pM de dimères ayant des sites d'affinités et d'activités différentes selon l'occupation du site adjacent sont considérés. Trois paramètres sont alors nécessaires pour décrire le système avec une affinité K_{d1} pour les sites dont la sous-unité adjacente est vide, et une affinité K_{d2} pour les sites dont la sous-unité adjacente est occupée, et le même facteur δ que celui décrit précédemment.

2.4.1.1 Modèle 1

Dans ce premier modèle, nous considérons 100 pM de sites totalement indépendants, de même affinité et de même activité. Seul le K_d suffit à décrire le système, selon la réaction équilibrée d'association récepteur (R)/ligand (L) de la FIGURE 2.37.

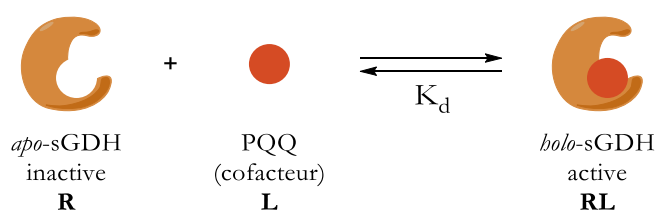


FIGURE 2.37 Modèle 1

Les concentrations à l'équilibre des espèces s'obtiennent alors par la résolution de l'équation quadratique ci-dessous :

$$[RL]_e^2 - (K_d + [R]_0 + [L]_0) \times [RL]_e + [R]_0 \times [L]_0 = 0 \quad (2.4)$$

$$\text{où } K_d = \frac{[R]_e \times [L]_e}{[RL]_e} = \frac{([R]_0 - [RL]_e) \times ([L]_0 - [RL]_e)}{[RL]_e}$$

Ce qui conduit à la solution suivante :

$$[\mathbf{RL}]_e = \frac{\mathbf{K}_d + [\mathbf{R}]_0 + [\mathbf{L}]_0 - \sqrt{(-\mathbf{K}_d - [\mathbf{R}]_0 - [\mathbf{L}]_0)^2 - 4 \times [\mathbf{R}]_0 \times [\mathbf{L}]_0}}{2} \quad (2.5)$$

L'ajustement par régression non-linéaire de l'équation théorique (2.5) aux données expérimentales est représentée FIGURE 2.38, avec une valeur de $\mathbf{K}_d = 50$ pM.

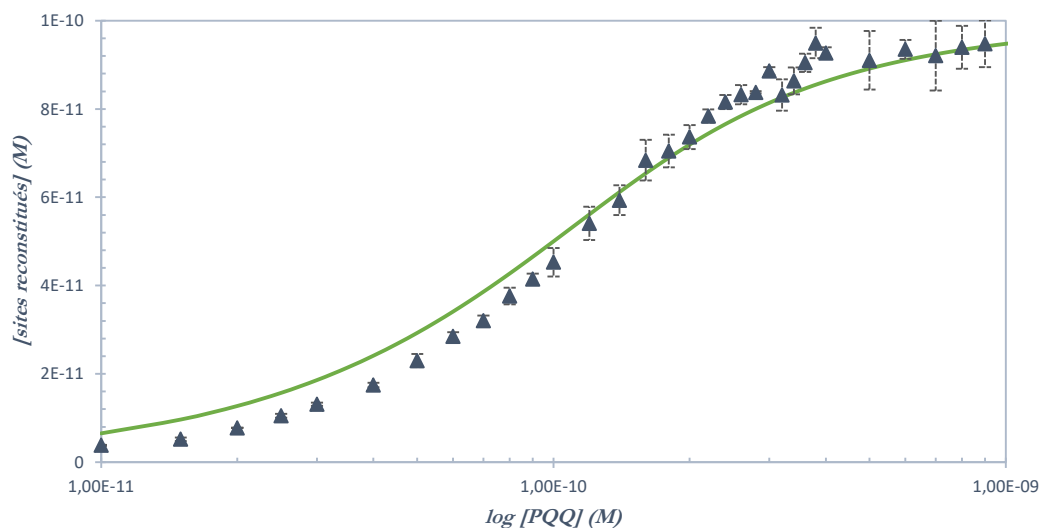


FIGURE 2. 38 Triangles bleus foncés : moyenne des données expérimentales avec barre d'erreur ; courbe verte : Modèle 1 avec $\mathbf{K}_d = 50$ pM.

Bien que la forme sigmoïdale de la courbe ajustée soit proche de celle des données expérimentales avec une valeur estimée de $\mathbf{K}_d$ en accord avec les données de la littérature⁶⁰, l'ajustement n'est pas parfait, notamment pour les faibles concentrations en PQQ, indiquant un mécanisme de reconstitution plus subtil qu'un simple équilibre régit par une loi d'action de masse. C'est aussi la raison pour laquelle nous avons exploré les autres modèles présentés précédemment pour tenter de voir dans quelle mesure nous pouvions affiner notre évaluation du $\mathbf{K}_d$.

2.4.1.2 Modèle 2

Avec le deuxième modèle, nous considérons le caractère dimérique de l'enzyme capable de fixer séquentiellement un équivalent de PQQ avec la même affinité $\mathbf{K}_d$ vis-à-vis de chacune des deux sous-unités (FIGURE 2.39).

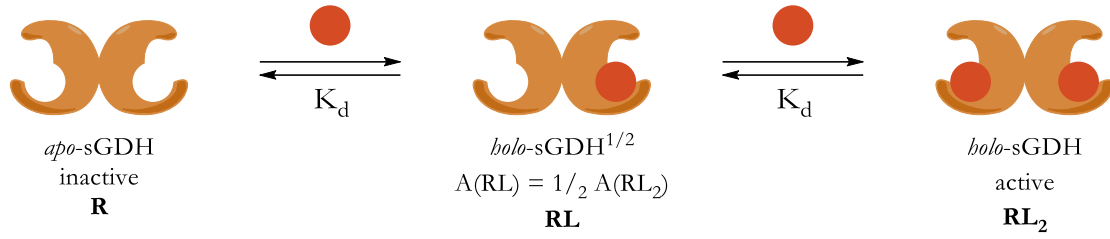


FIGURE 2. 39 Modèle 2

Nous considérons aussi qu'après reconstitution chaque unité a la même activité enzymatique. Nous devons dans ce cas écrire le mécanisme de reconstitution selon le schéma réactionnel suivant :



Dans le cas où les deux formes enzymatiques $\mathbf{RL}$ et $\mathbf{RL}_2$ sont actives, l'activité totale $\mathbf{A}$ doit correspondre à la somme de leur activité individuelle :

$$\mathbf{A} = \mathbf{A}_{\mathbf{RL}} + \mathbf{A}_{\mathbf{RL}_2} \quad (2.8)$$

Comme les enzymes ont la même activité par site, on a :

$$\mathbf{A} = \sigma([\mathbf{RL}] + 2[\mathbf{RL}_2]) \quad (2.9)$$

avec σ l'activité d'une mole.L⁻¹ de site.

Lorsque tous les sites sont occupés l'activité est maximale pour :

$$\mathbf{A}_{\max} = \sigma(2[\mathbf{RL}_2]_{\max}) = 2\sigma[\mathbf{R}]_0 \quad (2.10)$$

Ainsi, le rapport des activités s'écrit :

$$\frac{\mathbf{A}}{\mathbf{A}_{\max}} = \frac{[\mathbf{RL}] + 2[\mathbf{RL}_2]}{2[\mathbf{R}]_0} \quad (2.11)$$

$$\frac{\mathbf{A}}{\mathbf{A}_{\max}} \times [\mathbf{R}]_0 = \frac{[\mathbf{RL}]}{2} + [\mathbf{RL}_2] \quad (2.12)$$

Finalement, en traçant le nombre de sites activés $y = 2 (0,5[\mathbf{RL}] + [\mathbf{RL}_2]) = f(\log[\mathbf{PQQ}])$, il est possible d'ajuster ce modèle aux résultats expérimentaux (FIGURE 2.40). Pour simuler ce modèle, la résolution de l'équation du second degré n'est plus appropriée, c'est pourquoi la simulation a été faite à l'aide d'un logiciel de simulation numérique de cinétiques réactionnelles (logiciel

GEPASI) qui permet d'obtenir les concentrations à l'équilibre de chacune des espèces RL et RL₂ (enzyme à demi-reconstituée ou totalement reconstituée).

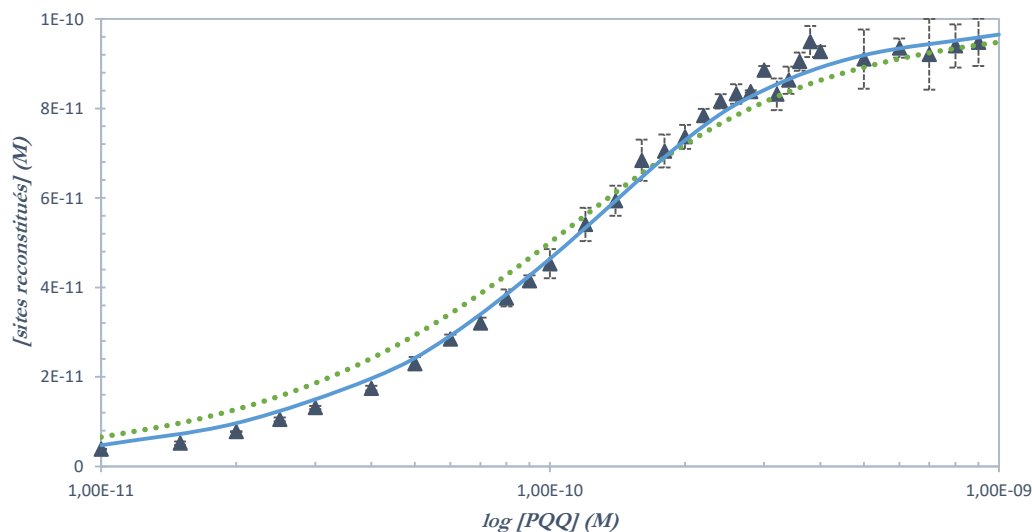


FIGURE 2. 40 Triangles bleus foncés : moyenne des données expérimentales avec barre d'erreur ; courbe verte : Modèle 1 avec $K_d = 50$ pM ; courbe bleue : Modèle 2 avec $K_d = 60$ pM.

La courbe obtenue avec le meilleur ajustement (en bleu sur la **FIGURE 2.40**) s'accorde mieux avec les résultats expérimentaux que précédemment. Toutefois, même si ce modèle permet un meilleur ajustement, ce n'est pas encore parfait. L'hypothèse que nous avons émise pour expliquer cela est qu'à faible concentration en cofacteur, c'est l'espèce enzymatique à moitié reconstituée qui est majoritairement active (*holo*-sGDH^{1/2}), tandis qu'à forte concentration en PQQ c'est la forme doublement reconstituée qui prédomine (*holo*-sGDH). Ainsi, la question se pose de savoir si l'enzyme à demi-reconstituée (*holo*-sGDH^{1/2}) est vraiment autant active que l'enzyme totalement reconstituée (*holo*-sGDH) et s'il est donc nécessaire de pondérer l'activité de chacune de ces deux formes.

2.4.1.3 Modèle 3

Dans ce troisième modèle, les activités de RL (*holo*-sGDH^{1/2}) et RL₂ (*holo*-sGDH) sont considérées différentes (**FIGURE 2.41**).

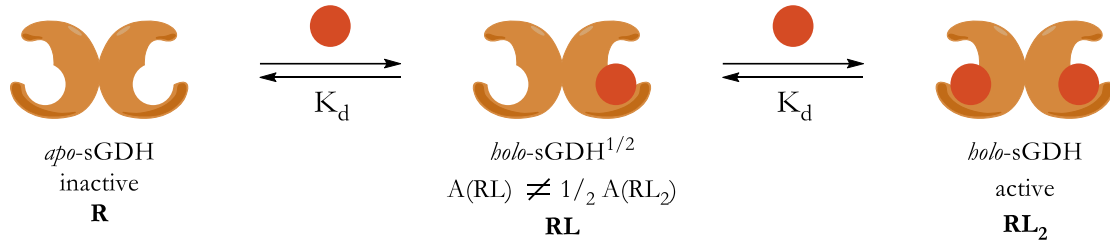


FIGURE 2. 41 Modèle 3

Pour cela, il suffit de reprendre l'équation (2.9) précédente et de différencier les activités individuelles :

$$\mathbf{A} = \varepsilon[\mathbf{RL}] + 2\sigma[\mathbf{RL}_2] \quad (2.13)$$

avec ε l'activité d'une mole.L⁻¹ de site de RL et σ l'activité d'une mole.L⁻¹ de site de RL₂.

$$\mathbf{A}_{\max} = 2\sigma[\mathbf{RL}_2]_{\max} = 2\sigma[\mathbf{R}]_0 \quad (2.10)$$

Ainsi, le rapport des activités s'écrit :

$$\frac{\mathbf{A}}{\mathbf{A}_{\max}} = \frac{\varepsilon[\mathbf{RL}] + 2\sigma[\mathbf{RL}_2]}{2\sigma[\mathbf{R}]_0} = \frac{\varepsilon[\mathbf{RL}]}{2\sigma[\mathbf{R}]_0} + \frac{[\mathbf{RL}_2]}{[\mathbf{R}]_0} = \frac{\delta[\mathbf{RL}]}{2[\mathbf{R}]_0} + \frac{[\mathbf{RL}_2]}{[\mathbf{R}]_0} \quad (2.14)$$

avec $\delta = \frac{\varepsilon}{\sigma}$

$$\frac{\mathbf{A}}{\mathbf{A}_{\max}} \times [\mathbf{R}]_0 = \frac{\delta[\mathbf{RL}]}{2} + [\mathbf{RL}_2] \quad (2.15)$$

Finalement, en traçant $y = 2(\delta \times 0,5[\mathbf{RL}] + [\mathbf{RL}_2]) = f(\log[\mathbf{PQQ}])$, il est possible de visualiser ce nouveau modèle (par sites activés). Cette fois-ci, nous avons deux paramètres ajustables $\mathbf{K_d}$ et δ . Ce dernier peut être estimé indépendamment afin de n'avoir qu'un seul paramètre à ajuster. Pour cela, il faut comparer l'activité d'un site pour une enzyme qui est soit à moitié reconstituée, soit totalement reconstituée. Ainsi, il faut mesurer l'activité d'une enzyme reconstituée dans des conditions de reconstitution où il est juste d'estimer que la majorité de la forme reconstituée est sous la forme *holo*-sGDH^{1/2} (excès de sites par rapport au cofacteur) puis où la majorité de la forme reconstituée est sous la forme *holo*-sGDH (excès de PQQ par rapport aux sites).

Pour atteindre les conditions où *holo*-sGDH^{1/2} est majoritaire, nous nous sommes placés à 50 pM de dimère (100 pM de sites) pour 15 pM de cofacteur, qui d'après la simulation GEPASI du modèle 2 avec un $\mathbf{K_d}$ à 60 pM, permet de bien prédire que, dans ces conditions, l'espèce majoritaire est la forme à demi-reconstituée. La valeur de 15 pM de cofacteur pour 100 pM de sites a également été choisie afin d'avoir une activité enzymatique suffisamment mesurable par rapport au blanc. Pour ce qui est du cas où la *holo*-sGDH est majoritaire, nous nous sommes

placés à 50 pM de dimère (100 pM de sites) pour 400 pM de cofacteur (avec un K_d à 60 pM), ce qui d'après le calcul par modélisation permet de prédire une valeur de concentration d'enzyme doublement reconstituée à l'équilibre comme étant majoritaire. Ce rapport de 400 pM de cofacteur pour 100 pM de sites a été quant à lui choisi pour éviter d'être confronté à une erreur expérimentale plus importante à fortes concentrations en cofacteur. Les valeurs d'activité obtenues pour ces deux lots d'expérience doivent ensuite être normalisées en fonction du nombre de site actif. Par souci de simplification, on considérera que tous les PQQ sont complexés dans l'expérience en sous-stœchiométrie. On peut ainsi calculer l'activité par site :

$$A_{\text{site de holo-sGDH}} = \frac{A}{[\text{sites totaux}]} \quad (2.16)$$

$$A_{\text{site de holo-sGDH}^{1/2}} = \frac{A}{0,15[\text{sites totaux}]} \quad (2.17)$$

A partir des données reportées sur la FIGURE 2.42 qui finalement compare les activités par site de *holo-sGDH*^{1/2} et *holo-sGDH* à différentes concentrations en glucose, nous avons pu déterminer le facteur δ . La représentation en double inverse du graphe de gauche, nommée Lineweaver-Burk, permet de visualiser le comportement de l'enzyme vis-à-vis de son substrat, le glucose.

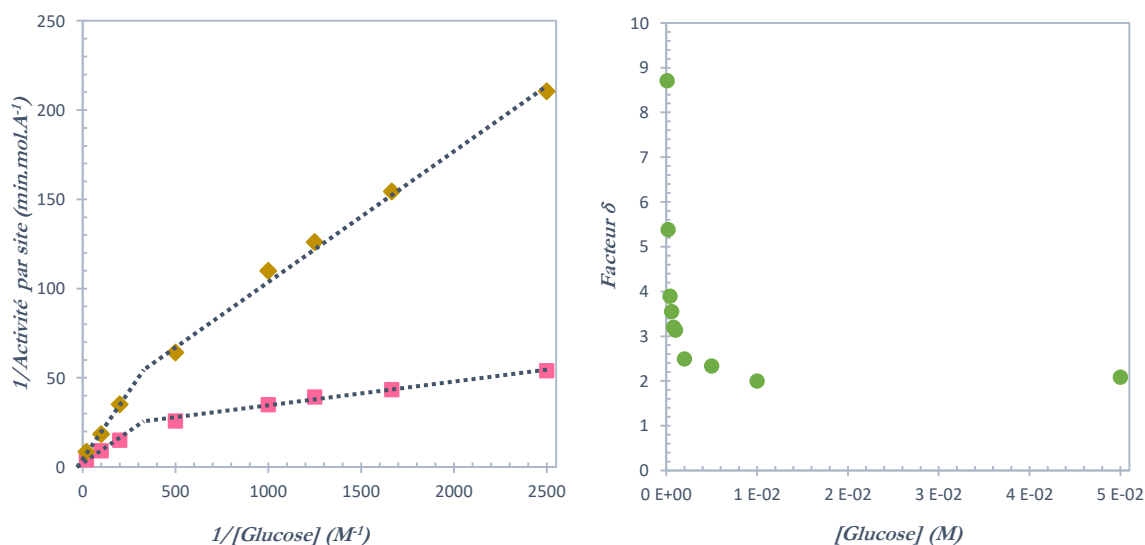


FIGURE 2. 42 A gauche : Représentation de Lineweaver-Burk (Inverse de l'activité par site en fonction de l'inverse de la concentration en glucose) dans les conditions où *holo-sGDH*^{1/2} est majoritaire : carrés roses (50 pM d'*apo-sGDH* dimérique, 15 pM de PQQ, 50 μ M de DCPIP, 1 mM de PMS et x mM de glucose, dans le tampon de reconstitution à température ambiante) ; et où *holo-sGDH* est majoritaire : losanges oranges (50 pM d'*apo-sGDH* dimérique, 400 pM de PQQ, 50 μ M de DCPIP, 1 mM de PMS et x mM de glucose, dans le tampon de reconstitution à température ambiante). A droite : Valeur du facteur δ en fonction de la concentration en glucose, calculée selon les résultats de la figure de gauche, avec : $\delta = \frac{\varepsilon}{\sigma} = 1 / \left(\frac{\text{carré rose}}{\text{losange orange}} \right)$.

La PQQ-sGDH est connue pour posséder une coopérativité négative vis-à-vis du glucose⁵⁶, ce que nous retrouvons bien sur la FIGURE 2.42 DE GAUCHE. En effet dans le cas où l'enzyme est complètement reconstituée (losanges oranges), il y a bien deux comportements distincts à faible et forte concentration en glucose (*i.e.* caractérisés par la présence de deux pentes différentes). Étonnamment, cette coopérativité négative se retrouve aussi dans le comportement d'une enzyme à demi-reconstituée (carrés roses).

Ensuite, il ressort que chacune des fractions demi- et doublement-reconstituées n'exhibent pas la même activité et que, contre-intuitivement, la forme demi-reconstituée est plus active que l'enzyme doublement reconstituée. Cela suggère, que l'activité d'une sous-unité dépend bien de la configuration du site adjacent, et qu'elle est finalement plus forte lorsque le site adjacent est libre de cofacteur.

La figure de droite correspond aux valeurs du facteur δ obtenues pour les différentes concentrations en glucose. Il est clair que la valeur de ce facteur dépend de la quantité de glucose. D'ailleurs, à de très faibles concentrations la valeur de δ est élevée ($\delta > 5$), puisqu'elle décroît progressivement pour atteindre une valeur seuil à des concentrations comprises entre 10 et 50 mM ($\delta = 2$). Les expériences de mesure d'activité après reconstitution ont été réalisées avec 5 mM de glucose. A cette concentration, le facteur δ est de 2,34. Ainsi, dans ces conditions, la *holo*-sGDH^{1/2} est 2,34 fois plus active qu'une sous-unité de la *holo*-sGDH. Cette valeur a donc été utilisée pour ajuster le modèle 3 aux données expérimentales, tel que reporté sur la courbe en trait plein (FIGURE 2.43).

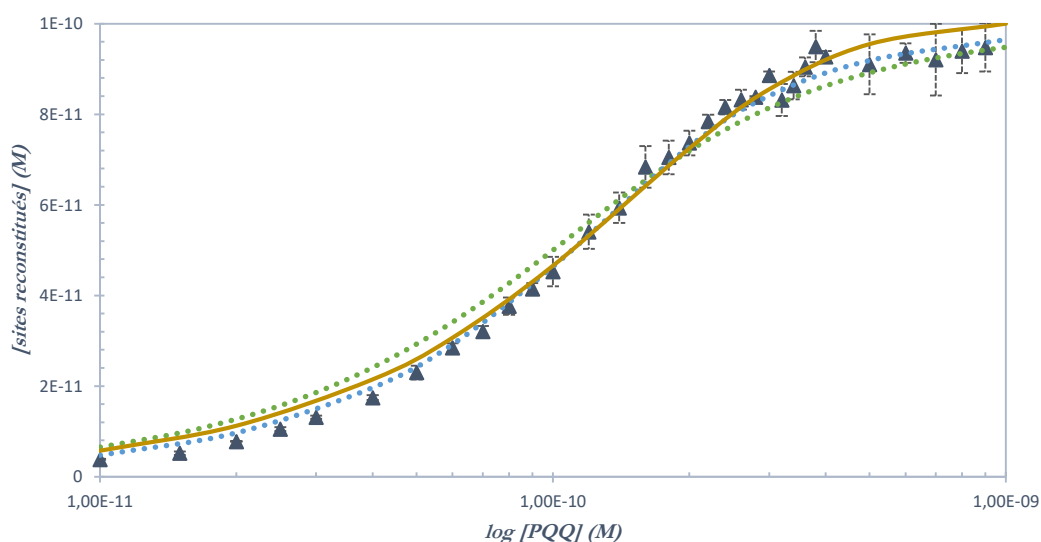


FIGURE 2. 43 Triangles bleus foncés : moyenne des données expérimentales avec barre d'erreur ; courbe verte : Modèle 1 avec $K_d = 50$ pM ; courbe bleue : Modèle 2 avec $K_d = 60$ pM ; courbe jaune : Modèle 3 avec $\delta = 2,34$ et $K_d = 150$ pM

L'ajustement de la courbe théorique s'avère cependant globalement moins bon que celui que nous avons obtenu avec le modèle 2. L'ensemble de ces résultats nous a finalement amenés à considérer le dernier cas de figure où la valeur de l'affinité pour chacun des sites n'est pas identique.

2.4.1.4 Modèle 4

Nous avons considéré pour le dernier modèle l'existence d'une pseudo-coopérativité entre les sites de fixation du PQQ, ce qui revient à dire que la fixation d'un premier PQQ dans la poche influe sur la fixation du second PQQ au niveau du site adjacent (soit en la favorisant soit en la défavorisant) (FIGURE 2.44).

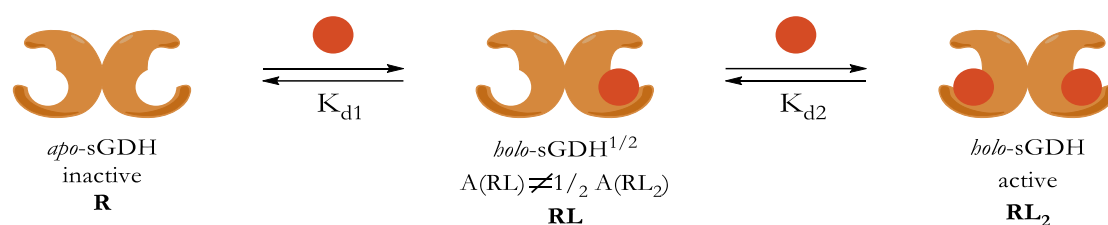


FIGURE 2. 44 Modèle 4

Pour cela des $\mathbf{K_d}$ différents, c'est-à-dire $\mathbf{K_{d1}}$ et $\mathbf{K_{d2}}$, doivent être introduits comme paramètres ajustables pour chaque étape, en prenant pour valeur de δ la même valeur que celle que nous avons précédemment estimée (FIGURE 2.45).

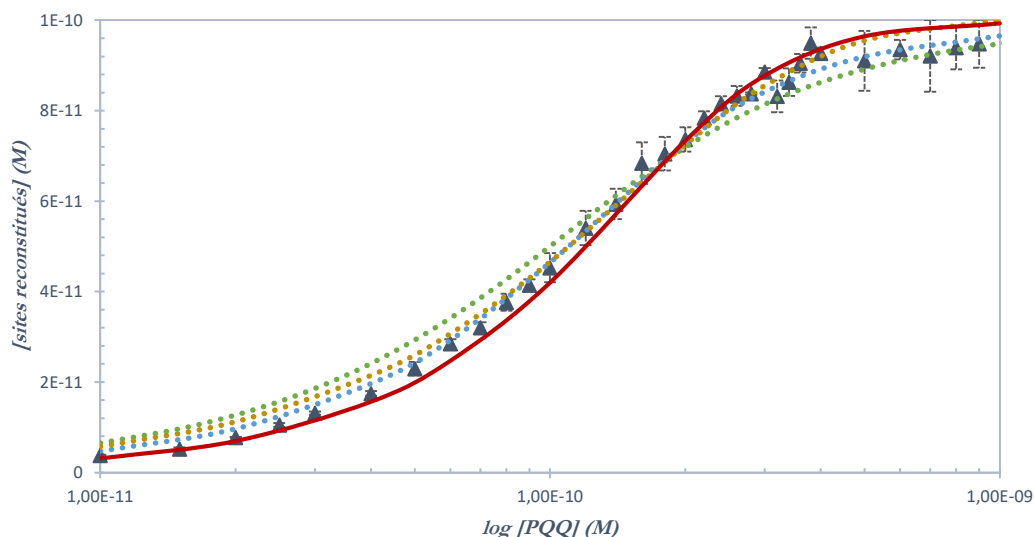


FIGURE 2. 45 Triangles bleus foncés : moyenne des données expérimentales avec barre d'erreur ; courbe verte : Modèle 1 avec $K_d = 50$ pM ; courbe bleue : Modèle 2 avec $K_d = 60$ pM ; courbe jaune : Modèle 3 avec $\delta = 2,34$ et $K_{d1} = 150$ pM ; courbe rouge : Modèle 4 avec $\delta = 2,34$ et $K_{d1} = 400$ pM et $K_{d2} = 2$ pM.

Cette fois-ci, la courbe simulée pour des valeurs de K_{d1} et K_{d2} de 400 et 2 pM, respectivement, s'ajuste globalement plutôt assez bien aux données expérimentales, reproduisant à la fois le comportement à faibles concentrations en PQQ, mais aussi à fortes concentrations. Ces résultats semblent indiquer que la fixation d'un premier équivalent de PQQ dans l'enzyme favoriserait la fixation d'un deuxième équivalent. Cependant, dans ces conditions où une fixation entraîne une forte augmentation de l'affinité du site restant, la méthode utilisée pour mesurer δ n'est plus valide. Il est donc *in fine* difficile de trancher entre les différents modèles présentés.

Indépendamment de la manière dont on peut déterminer avec plus ou moins d'exactitude l'affinité du PQQ pour l'*apo*-sGDH, ce qu'il faut retenir de l'analyse que nous venons de faire à travers ces différents modèles, c'est la possibilité de déterminer une valeur d'affinité du PQQ pour son site enzymatique particulièrement élevée et qui corrobore ce qui avait déjà été reporté dans la littérature. Dans la suite du travail, nous utiliserons le modèle le plus simple (c'est-à-dire le **modèle 1**) pour caractériser par compétition plusieurs dérivés synthétiques analogues du PQQ afin de déterminer leur affinité respective pour le site de l'enzyme.

2.4.2 Présentation des dérivés synthétiques étudiés

Comme nous l'avons vu, le PQQ possède trois types de groupes fonctionnels potentiellement modifiables : la partie quinonique, l'azote du groupe pyrrole et les trois acides carboxyliques. Afin de tenter de mieux comprendre dans quelle mesure la modification classique du PQQ *via* ces différents groupes fonctionnels affecte l'affinité du PQQ pour son site, nous avons entrepris d'étudier cinq analogues provenant soit directement du protocole de synthèse de Corey et Tramontano (molécules **2.82** et **2.83**), soit d'une dérivatisation simple de ces mêmes intermédiaires (molécules **2.84**, **2.85** et **2.86**) (FIGURE 2.46).

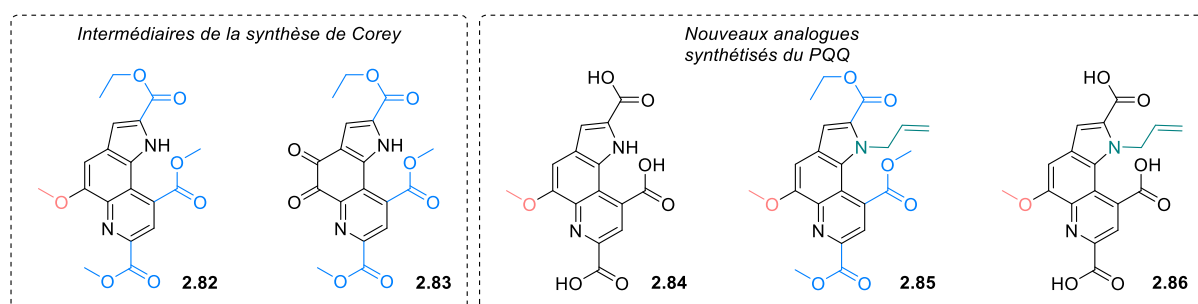


FIGURE 2.46 Présentation des cinq analogues étudiés

Le composé **2.84** a été obtenu avec un rendement de 80 % en procédant à l'hydrolyse basique des esters selon la procédure de Martin et coll.⁶³. Pour les dérivés présentant un groupement allyl sur l'azote pyrrolique, deux voies de synthèse ont été expérimentées à partir de deux intermédiaires de la synthèse de Corey et Tramontano que sont le composé **2.82** et l'indole **2.87** (FIGURE 2.47).

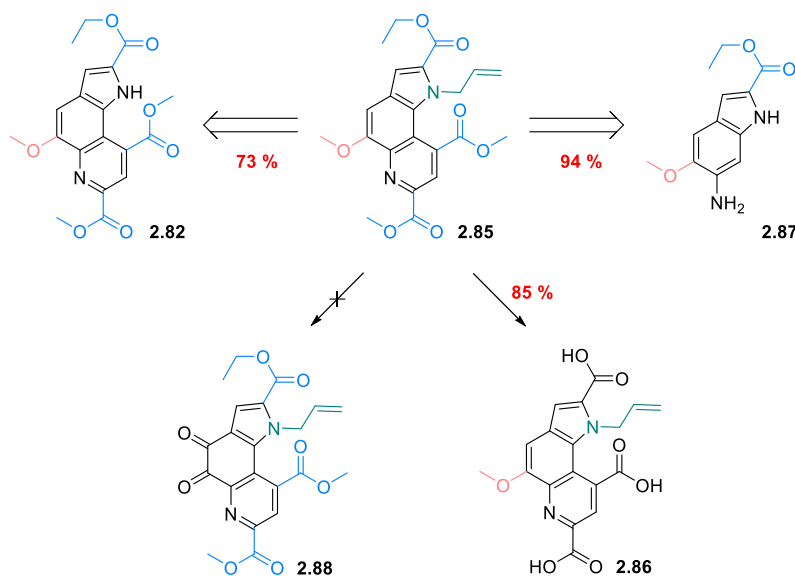


FIGURE 2.47 Voie de synthèse des composés **2.85** et **2.86**

La meilleure voie de synthèse pour préparer la molécule **2.85** s'est avérée être celle à partir de l'indole qui présente un rendement global de 94 %, l'allylation se faisant à l'aide de bromure d'allyl en présence de KHMDS (94 % de rendement) puis les étapes d'annélation de Doebner von Miller réalisées dans les mêmes conditions que Corey et Tramontano (100 % de rendement). L'oxydation du groupe méthoxy par le CAN n'a malheureusement pas abouti car le groupe allyl semble s'oxyder dans ces conditions. C'est d'ailleurs pourquoi le composé **2.88** ne fait pas parti des molécules testées. Pour ce qui concerne, l'hydrolyse des esters de **2.85**, elle a été réalisée dans les conditions habituelles avec un rendement de 85 % permettant ainsi d'obtenir le composé **2.86**. Les cinq analogues ainsi synthétisés sont complémentaires de par leurs différentes fonctionnalisations :

- **la molécule 2.83** permet de voir l'impact de l'estérification des acides carboxyliques, sachant que les carboxylates du PQQ sont impliqués dans la fixation dans la poche enzymatique par des interactions polaires (liaisons hydrogènes et interactions électrostatiques) avec des résidus^{50,51}.
- **la molécule 2.84** permet d'étudier l'effet sur la reconstitution du remplacement de la fonction *ortho*-quinone par un groupement méthoxy, mais aussi de vérifier que l'absence de quinone conduit bien à une inactivité de l'enzyme dans le cas où il y aurait une insertion du composé **2.84** dans la poche enzymatique.
- **la molécule 2.82** combine ces deux modifications.
- **les molécules 2.85** et **2.86** permettent quant à elles d'adresser l'influence de la fonction pyrrole dans la fixation du PQQ dans la poche enzymatique.

2.4.3 Détermination du K_d des analogues *via* la mesure d'un changement conformationnel par fluorescence

Selon une étude du groupe de Duine⁴⁹, la liaison du cofacteur au site actif de l'enzyme est responsable d'un changement conformationnel corroboré par différentes observations. Tout d'abord la *holoenzyme* présente une résistance accrue à la protéolyse par la chymotrypsine par rapport à la forme *apo*. Cela signifie que certains des acides aminés accessibles sur l'*apoenzyme* le sont moins en présence de PQQ. Un autre point qui semble conforter ce changement de conformation est lié à une modification de la fluorescence de la protéine. L'*apo*-sGDH, en effet, émet une forte fluorescence à 338 nm lorsqu'elle est excitée à 280 nm⁴⁹, en raison notamment de la présence de 6 tryptophanes dans l'environnement plus ou moins proche du site enzymatique, alors qu'au contraire, la *holo*-sGDH n'émet qu'une fluorescence résiduelle à cette même longueur

d'onde. Cette modification dans l'intensité de fluorescence a été attribuée à un changement conformationnel dans l'environnement des tryptophanes lié à l'insertion du PQQ.

Afin d'étudier la possible insertion des analogues de PQQ dans la poche enzymatique, nous avons mesuré l'extinction de fluorescence de l'*apo*-sGDH à 338 nm suite à l'ajout d'un équivalent par site d'analogue. La FIGURE 2.48 montre à titre de référence le changement du spectre de fluorescence des tryptophanes lorsque l'on insère le PQQ natif dans le site de l'*apo*-sGDH.

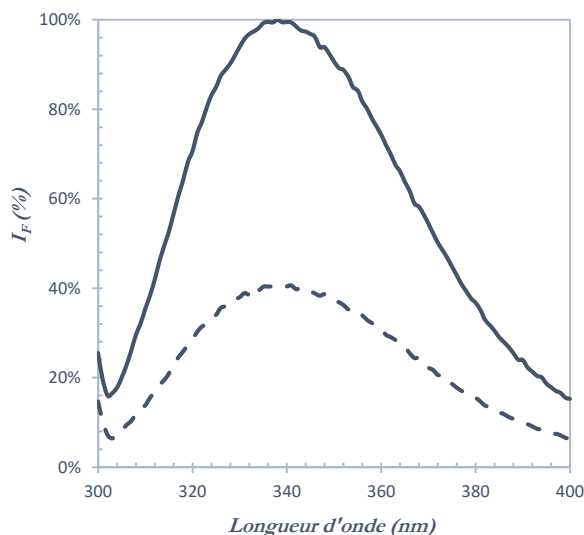


FIGURE 2. 48 Spectres de fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm) à température ambiante, convertis en pourcentage, des espèces *apo*-sGDH (200 nM de dimère) en trait plein et *holo*-sGDH (200 nM de dimère) en pointillé, dans un tampon de reconstitution (Tris 100 mM à pH 7,4 contenant 3 mM de CaCl_2).

L'extinction de fluorescence observée est en parfait accord avec ce qui avait été publié par le groupe de Duine. On obtient en effet pour l'ajout d'un équivalent de PQQ par monomère, après une brève période d'incubation, une diminution de 60 % de l'intensité de fluorescence. Ainsi, la différence entre les formes *apo* et *holo* de la glucose déshydrogénase est bien notable et ce résultat sera utilisé par la suite comme référence afin d'estimer la capacité de fixation d'analogues de PQQ dans l'*apo*-sGDH et l'éventuel changement conformationnel associé.

L'expérience a donc ensuite été répétée en remplaçant le PQQ par l'analogue **2.86** présentant un pyrrole allylé et un groupement méthoxy à la place de l'*ortho*-quinone (FIGURE 2.49).

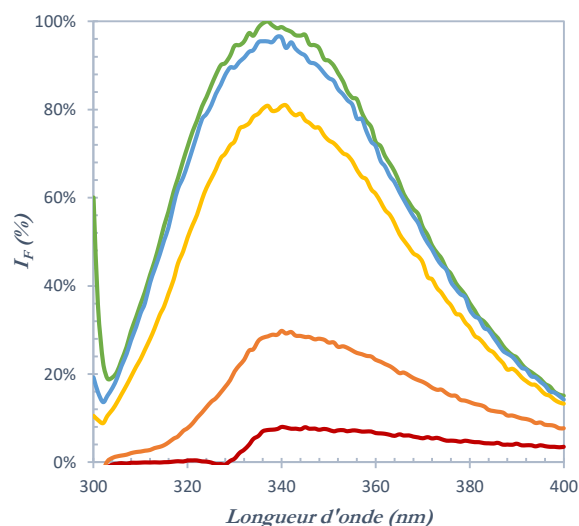


FIGURE 2. 49 Spectres de fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$) à température ambiante, convertis en pourcentage, de l'*apo*-sGDH (200 nM de dimère) en présence de diverses concentrations en analogue **2.86** dans un tampon de reconstitution. En vert 0 éq., en bleu 1 éq. (400 nM), en jaune 10 éq. (2 μM), en orange 100 éq. (20 μM), en rouge 250 éq. (50 μM).

Lors de l'ajout d'un équivalent de cet analogue par monomère, dans les mêmes conditions que précédemment, la fluorescence émise par l'enzyme n'est que très peu modifiée (diminution de l'intensité par environ 4 %). L'analogue semble donc être moins apte que le PQQ à entrer dans la poche enzymatique et à s'y fixer. Ceci est un indice quant à la faible affinité du dérivé pour l'enzyme, montrant que des modifications sur le pyrrole et sur l'*ortho*-quinone réduisent significativement l'accès au site actif.

Afin de rapidement jauger cette faible affinité de l'analogue, des ajouts successifs de dérivés ont été réalisés de manière à faire chuter l'extinction de fluorescence jusqu'à 60 % de sa valeur initiale comme celui initié par le PQQ à 1 équivalent. D'après les spectres obtenus, 10 équivalents n'aboutissent qu'à une diminution de 20 % de l'intensité émise et il faut environ 100 équivalents de dérivé pour d'atteindre 60 % d'extinction. Ces résultats tendent donc à démontrer que l'analogue **2.86** est beaucoup moins affiné que le PQQ pour la poche enzymatique. Toutefois, avec des ajouts supplémentaires du dérivé **2.86** (jusqu'à atteindre 250 équivalents par site), la fluorescence continue à diminuer progressivement jusqu'à atteindre un seuil limite de 90 % d'extinction. Le fait que cette extinction continue à diminuer et dépasse celle obtenue pour l'enzyme native laisse planer quelques doutes quant à la spécificité et à la nature de cette extinction. Rappelons qu'à la longueur d'onde d'irradiation (280 nm), l'extinction est majoritairement due au changement de l'environnement des résidus tryptophanes de l'enzyme. Ils sont au nombre de six et se situent en partie dans le site actif, mais aussi à des positions plus

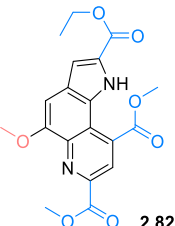
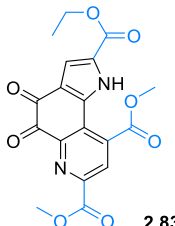
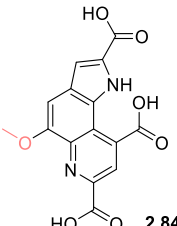
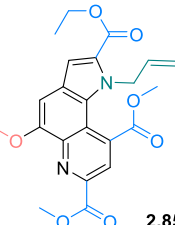
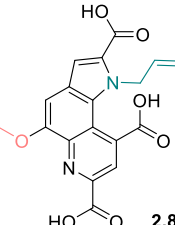
accessibles à l'interface enzyme/milieu extérieur. C'est pourquoi la perte de fluorescence peut également être le résultat d'un changement de l'environnement des tryptophanes éloignés du site actif, ce qui par conséquent pourrait ne plus avoir de lien avec une fixation dans le site enzymatique.

Cette expérience a été répétée avec les autres dérivés et le même comportement spectral a été obtenu dans chaque cas. Dans l'hypothèse où la décroissance de fluorescence correspondrait à la fixation de l'analogue, les résultats ont été traités afin d'en extraire une valeur de K_d propre à chacune des molécules testées. Pour cela, le modèle simplifié de reconnaissance ligand/récepteur tel que nous l'avons décrit précédemment (**modèle 1**) a été utilisé pour estimer la constante de dissociation du complexe à partir de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration en analogue.



Le **TABLEAU 2.3** regroupe les différentes constantes d'affinité que nous avons ainsi pu extraire par fluorescence pour chacun des analogues.

TABLEAU 2.3 K_d obtenus pour les différents analogues du PQQ

Analogue	K_d	Analogue	K_d	Analogue	K_d
	50 μ M		30 μ M		80 μ M
	60 μ M		20 μ M		

Par comparaison avec la constante d'affinité de 50 pM déterminée pour le PQQ, nous pouvons constater, pour l'ensemble des analogues, une chute d'affinité de plusieurs ordres de grandeurs. Concernant l'analogue **2.83**, porteur de trois esters à la place des carboxylates, la perte d'affinité

par rapport au PQQ est de 6 ordres de grandeur. Ce comportement est en accord avec les données cristallographiques montrant les interactions entre le PQQ et les résidus de la poche enzymatique. Les carboxylates ont un rôle important dans l'ancrage et la stabilisation du cofacteur puisque deux d'entre eux sont interconnectés aux acides aminés basiques de la poche tandis que le dernier est lié au calcium « activateur » qui est coordonné au carbone C5 de l'*ortho*-quinone ainsi qu'à la protéine *via* certains résidus de son site actif. La perte d'affinité de cet analogue pour le site actif de l'enzyme peut s'expliquer par la perte de ces liaisons stabilisatrices des carboxylates et leur remplacement par des groupes hydrophobes antagoniste empêchant l'ancrage du pseudo-cofacteur dans la poche.

Ce premier résultat est donc en accord avec les données cristallographiques et il est logique que les dérivés **2.82** et **2.85**, porteurs de ces mêmes esters, possèdent une perte d'affinité au moins du même ordre de grandeur. Il faut néanmoins remarquer qu'il n'y a pas non plus de grande différence d'affinité pour des analogues porteurs d'autres types de dérivatisation.

Pourtant, en étudiant le cas de l'analogue **2.84** exempt de son centre quinonique, la perte d'affinité est aussi de six ordres de grandeurs ce qui implique que le remplacement de la fonction *ortho*-quinone par un groupement méthoxy provoque une perte thermodynamique importante dans la fixation du cofacteur. C'est assez inattendu car l'oxygène du carbonyl en position C5 *via* son interaction avec le calcium, n'est pas censé intervenir dans l'affinité mais plutôt dans l'activation du PQQ vis-à-vis du transfert d'hydrure. Or il est clair qu'ici la modification entraîne une perte d'affinité du cofacteur. Ce résultat est très intéressant puisqu'il renforce l'idée de fonctionnaliser préférentiellement le PQQ *via* son groupe fonctionnel *ortho*-quinonique afin d'inactiver définitivement toute activité redox du cofacteur et par là même une activité enzymatique en cas de reconstitution.

Au final, ce qui ressort de cette étude c'est que, quelle que soit la modification introduite sur le cofacteur PQQ, la même extinction de fluorescence se produit, ce qui conduit à des K_d de faibles affinités qui varient peu. Ces valeurs de K_d obtenues (20 à 80 μ M) sont également très inférieures à celle de la pyrroloquinoléine quinone (50 pM selon ce modèle) et incitent à conclure que (i) une faible modification structurale du composé PQQ perturbe drastiquement l'affinité de celui-ci vis-à-vis de la poche enzymatique, ou bien alors que (ii) l'extinction de fluorescence mesurée n'est pas la résultante d'un changement conformationnel de l'enzyme au niveau du site actif mais plutôt la conséquence d'une interaction non-spécifique entre les analogues de PQQ et les tryptophanes accessibles à ces molécules. Il est donc apparu important d'envisager de déterminer

le K_d par une autre méthode afin de vérifier que la mesure d'extinction de fluorescence est bien la conséquence d'un réarrangement conformationnel suite à la liaison de l'analogue dans la poche enzymatique et non un artefact.

2.4.4 Détermination du K_d des analogues *via* une expérience de compétition

Une autre manière de déterminer le K_d des analogues de PQQ est de le faire par compétition lors de la reconstitution de l'enzyme en présence de PQQ. Précédemment, nous avons montré comment suivre la reconstitution de l'enzyme en présence de son cofacteur PQQ dans un tampon Tris à pH 7,4 contenant 3 mM de calcium. Dans le cas d'une expérience de compétition, il s'agit de mettre en œuvre le même type d'expérience mais dans laquelle on met à réagir en même temps les deux compétiteurs que sont le PQQ et l'analogue vis-à-vis d'une concentration donnée en *apo*-sGDH et, après incubation, de déterminer l'activité enzymatique résultante selon la procédure usuelle. Si on admet que les réactions équilibrées du PQQ et de l'analogue avec l'*apo*-sGDH suivent des lois d'action de masse classiques, on peut alors écrire le schéma réactionnel suivant :

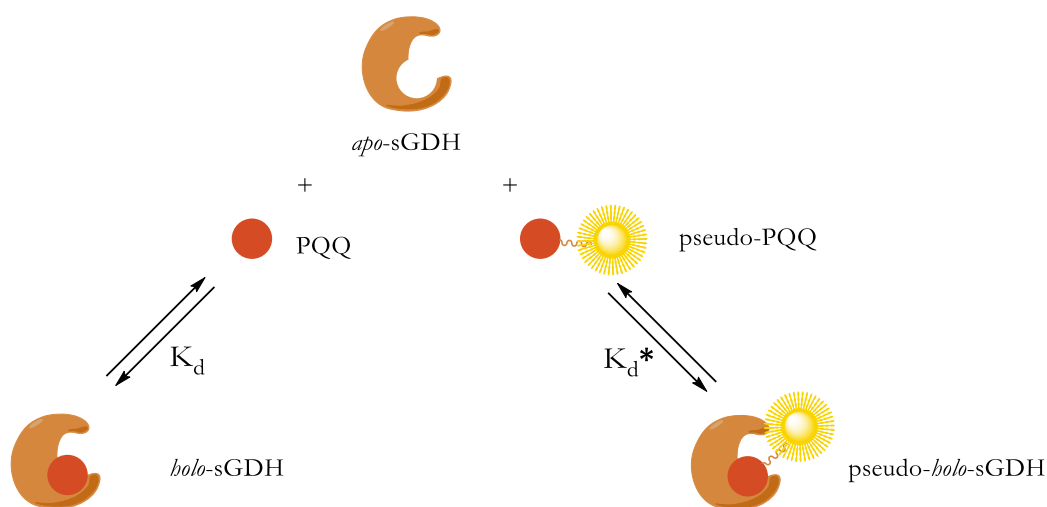


FIGURE 2. 50 Description de l'expérience de compétition

De ce schéma compétitif, il est alors possible d'établir une équation analytique cubique reliant l'ensemble des paramètres de concentration des espèces et des constantes d'affinité (K_d et K_d^*) de chacun des équilibres. Connaissant la valeur de K_d du PQQ pour l'*apo*enzyme (50 pM selon l'équation du second degré du modèle 1), il est alors possible de déterminer celle de l'analogue, K_d^* . L'équation analytique de ce titrage compétitif est la suivante :

$$[\mathbf{RL}] = \frac{[\mathbf{L}] \times \left\{ 2\sqrt{(a^2 - 3b)} \cos\left(\frac{\theta}{3}\right) - a \right\}}{3K_d + \left\{ 2\sqrt{(a^2 - 3b)} \cos\left(\frac{\theta}{3}\right) - a \right\}} \quad (2.17)$$

avec $a = K_d + K_d^* + [\mathbf{L}] + [\mathbf{L}^*] - [\mathbf{R}]_0$

$$b = K_d([\mathbf{L}^*] - [\mathbf{R}]_0) + K_d^*([\mathbf{L}] - [\mathbf{R}]_0) + K_d K_d^*$$

$$c = -K_d K_d^* [\mathbf{R}]_0$$

$$\theta = \arccos \left\{ \frac{-2a^3 + 9ab - 27c}{2\sqrt{[(a^2 - 3b)^3]}} \right\}$$

$$K_d = 50 \text{ pM (} K_d \text{ du PQQ du modèle 1)}$$

$$K_d^* \text{ à ajuster (} K_d \text{ de l'analogue)}$$

$$[\mathbf{R}]_0 = 100 \text{ pM (Concentration initiale en monomère d'apo-sGDH)}$$

$$[\mathbf{RL}] \text{ (Concentration en holo-sGDH reconstituée)}$$

$$[\mathbf{L}] \text{ (Concentration en PQQ, de 10 pM à 1 nM)}$$

$$[\mathbf{L}^*] = 10 \text{ }\mu\text{M (Concentration initiale en analogue)}$$

Les courbes de titrage reportées sur la **FIGURE 2.51** représentent trois différentes expériences obtenues avec soit uniquement du PQQ pour des concentrations variant de 10 pM à 1 nM, soit le PQQ (aux mêmes concentrations) en présence de 10 μM de l'analogue **2.86** issu de deux solutions différentes.

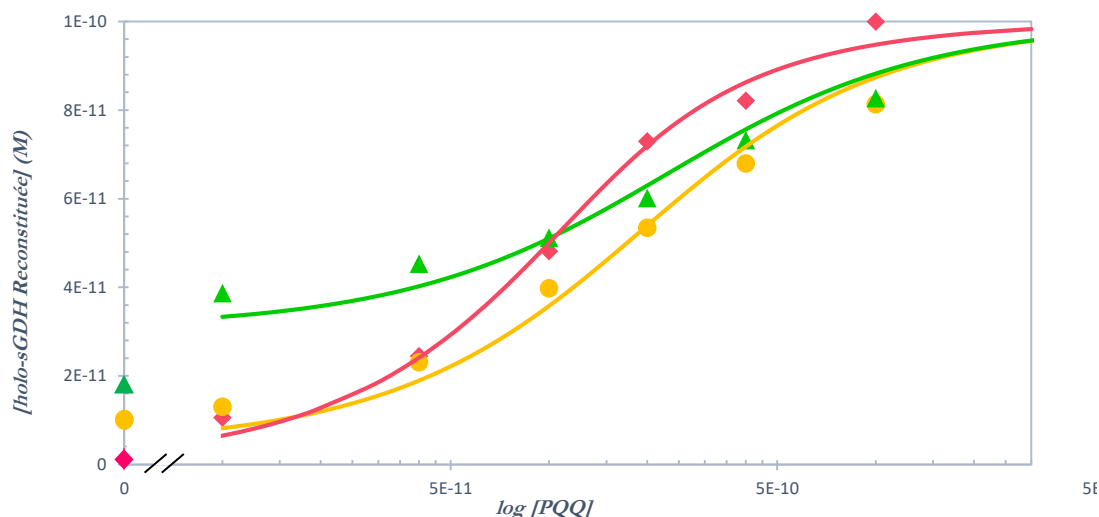


FIGURE 2. 51 Courbes de titrage obtenues pour les trois expériences de compétition réalisées à température ambiante dans un tampon de reconstitution. Reconstitution de l'*apo*-sGDH (50 nM de dimère) avec le PQQ (losanges roses), compétition entre le PQQ et l'analogue **2.86**, solution 1 (ronds jaunes) et compétition entre le PQQ et l'analogue **2.86**, solution 2 (triangles verts). En trait plein rose : simulation de la reconstitution de l'*apo*enzyme avec son cofacteur selon le modèle 1, $K_d = 50$ pM. En traits pleins jaune et vert : simulation de la reconstitution de l'*apo*enzyme avec son cofacteur en présence de l'analogue, $K_d(\text{PQQ}) = 50$ pM et $K_d^*(\text{analogue}) = 6$ μM , $\gamma(\text{solution 1}) = 10^{-6}$ (jaune) et $\gamma(\text{solution 2}) = 9 \times 10^{-6}$ (vert).

La première chose que cette expérience permet de montrer est que l'ajout du compétiteur dans le milieu n'empêche pas l'enzyme de se reconstituer, ni de catalyser l'oxydation de son substrat. Comme le montre les données, les deux expériences réalisées en présence du compétiteur **2.86** (en jaune et en vert sur le graphique) ont un comportement de reconstitution différents de celui du PQQ seul (en rose sur le graphique). Il est intéressant de noter que les solutions de compétiteur, en l'absence de PQQ, présentent un comportement inattendu. En effet, les deux expériences effectuées en absence de PQQ, bien que peu reproductibles, indiquent la présence d'une légère activité enzymatique. Ce résultat surprenant peut s'expliquer par deux hypothèses : (i) soit l'analogue est actif, ce qui est peu probable puisqu'il est dépourvu de son centre redox quinonique, (ii) soit il y a une légère contamination des solutions par des traces de PQQ permettant d'activer l'*apo*-sGDH. Ainsi en introduisant le facteur γ correspondant à une concentration initiale en impureté PQQ, nous pouvons alors prendre en compte une activité résiduelle des solutions d'analogues provenant des potentielles traces de PQQ, et ainsi corriger les courbes de titrage de cet effet.

Finalement, l'équation cubique que nous avons utilisée pour un ajustement aux données expérimentales repose sur trois paramètres clés : le K_d du PQQ, le K_d^* de l'analogue et enfin

une certaine quantité initiale de traces de PQQ dans les deux solutions de l'analogue (γ), ce qui modifie la concentration totale en PQQ dans l'équation de la manière suivante :

$$C_T^0 = [PQQ]_0 + C_{T^*}^0 \times \gamma.$$

Finalement, en traçant les courbes $C_{RT} = f([PQQ]_0)$, il est possible d'ajuster l'expression théorique avec les points expérimentaux en injectant la valeur connue de K_d (50 pM) et en sélectionnant une valeur pour l'analogue de $K_d^* = 6 \mu\text{M}$, en admettant γ (solution 1 d'analogue **2.86**) = 10^{-6} (10^{-4} % d'impureté) et γ (solution 2 d'analogue **2.86**) = 9×10^{-6} (9×10^{-4} % d'impureté) (FIGURE 2.51). La valeur de K_d^* obtenue est bien inférieure à celle du PQQ et elle s'avère être également du même ordre de grandeur que celle obtenue précédemment par la méthode de fluorescence. Ainsi cette expérience permet de conforter les résultats obtenus précédemment.

2.4.5 Conclusion

La seconde partie de ce travail a consisté à mettre en place un protocole permettant de caractériser des analogues de PQQ, et ainsi de vérifier que ces derniers peuvent être significativement affectés en termes d'affinité vis-à-vis de la poche enzymatique de l'*apo*-sGDH, mais aussi qu'ils sont incapables d'activer l'enzyme. A partir de l'étude de quelques dérivés du PQQ ne demandant pas un trop grand effort de synthèse, deux méthodes de caractérisation ont pu être abordées, la première se focalisant sur l'étude par fluorescence de l'insertion d'analogues de PQQ dans la poche enzymatique et la seconde consistant en une expérience de compétition avec le PQQ afin d'évaluer l'affinité du dérivé.

Ces deux méthodes ont permis d'obtenir des valeurs d'affinité relative des différents analogues de l'ordre de la dizaine de micromolaire, ce qui est faible comparé à celle du PQQ (50 pM). Ainsi, quelle que soit la modification structurale du PQQ, nous obtenons une chute d'affinité par 6 ordres de grandeur, ce qui apparaît comme suffisamment important pour espérer à terme valider la stratégie d'amplification moléculaire telle qu'envisagée au début de ce chapitre.

Si nous comparons ces deux méthodes de détermination du K_d^* , c'est la méthode par compétition qui est de loin la plus pertinente pour étudier l'effet d'une modification chimique du PQQ. Elle a d'ailleurs permis d'identifier des traces d'impuretés PQQ très faibles, autorisant l'activation de l'enzyme dans nos conditions. Ce résultat permet à la fois de vérifier la pureté du dérivé de PQQ mais aussi de déterminer une sorte de contamination limite en PQQ à ne pas dépasser afin de ne pas générer une réponse non-spécifique trop importante.

CHAPITRE 3

NOUVELLES STRATEGIES D'AMPLIFICATION MOLECULAIRE BASEES SUR L'AUTO-OXYDATION D'UNE HYDROQUINONE : AMPLIFICATIONS CATALYTIQUE ET AUTO-CATALYTIQUE

3.1 Introduction

Dans ce chapitre, l'objectif du travail a été, comme mentionné dans le **chapitre 1**, de mettre en place de nouvelles stratégies d'amplification moléculaires basées sur une régénération/amplification de la cible à détecter afin de mettre en place un système analytique performant. Il s'agira à la fois de sélectionner un système moléculaire capable de réaliser une réaction catalytique ou auto-catalytique déclenchée par une cible à détecter puis ensuite de valider notre système vis-à-vis des concepts d'amplification préexistants, tant sur le point de l'efficacité et de la spécificité que sur le point de la praticité (facilité d'utilisation). Les systèmes développés au cours de cette partie se veulent être amplificateurs de signal *via* la régénération ou la répllication de la molécule cible.

En particulier, nous allons ici développer des systèmes où la molécule cible déclencheur du système réactionnel est l'eau oxygénée. La mise en œuvre d'une stratégie permettant une amplification catalytique ou auto-catalytique d' H_2O_2 nécessite obligatoirement une étape réactionnelle au cours de laquelle celle-ci est produite. Une réaction typique permettant la production moléculaire de peroxyde d'hydrogène est l'auto-oxydation à deux électrons et deux protons d'une hydroquinone QH_2 par l'oxygène moléculaire naturellement présent en solution, telle que :



Dans un premier temps, nous allons aborder des exemples de la littérature utilisant cette réaction pour la détection d' H_2O_2 impliquant soit une amplification catalytique soit une amplification auto-catalytique. Le processus d'oxydation à l'air d'une hydroquinone étant bien plus compliqué que ne le laisse entendre l'équation bilan ci-dessus, son mécanisme sera détaillé dans un second temps (section 3.1.3). C'est en s'inspirant de ces exemples que nous avons imaginé une nouvelle stratégie plus performante qui sera décrite par la suite.

3.1.1 Détection d'eau oxygénée basée sur l'auto-oxydation d'une hydroquinone et une amplification catalytique

Un premier exemple de détection d' H_2O_2 mettant en jeu l'auto-oxydation d'une hydroquinone a été décrit par Shabat et son groupe en 2013 (FIGURE 3. 1).

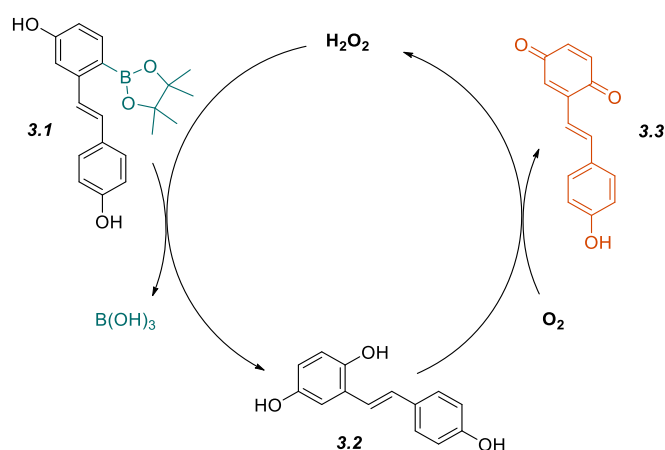


FIGURE 3. 1 Détection d'eau oxygénée selon l'auto-oxydation d'une hydroquinone en quinone, figure modifiée selon Shabat *et al.*⁴³

Le système repose sur la déprotection sélective par H_2O_2 de la molécule **3.1** porteuse d'un ester boronique. Cette réaction conduit à la formation d'une espèce de type hydroquinone **3.2** qui s'auto-oxyde en présence d'oxygène dissous pour finalement aboutir à la quinone **3.3** fluorescente ($\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$), permettant ainsi de suivre la réaction, et à la production d'eau oxygénée autorisant alors la mise en place d'une boucle catalytique amplificatrice.

Cette méthode permet la conversion totale de $500 \mu\text{M}$ de sonde **3.1** en sonde fluorescente **3.3** à partir de l'ajout de seulement $125 \mu\text{M}$ d' H_2O_2 (0,25 équivalent) en l'espace de 8 heures. Shabat et coll. ont ainsi montré que comparée à une sonde classique où la conversion serait simplement stœchiométrique (soit 25% de sonde convertie), la conversion est ici totale (100%) ce qui

implique un mécanisme de régénération de la cible H_2O_2 et donc le mécanisme catalytique tel que décrit ci-dessus. Même si cette méthode reste peu performante de par la lenteur du processus, elle démontre tout de même l'intérêt de ce type d'amplification catalytique pour la détection de petites molécules.

Il est important de noter que la réaction est fortement affectée par un déclenchement non spécifique du processus à cause de la présence, selon les auteurs, de traces d'oxydants résiduels. Afin d'éliminer ces traces d'oxydants et de réduire ainsi le déclenchement non spécifique, la méthode nécessite l'ajout au préalable dans le tampon (c'est-à-dire avant d'introduire la sonde) d'un réducteur de ces traces d'oxydants, le tris-(2-carboxyéthyl)-phosphine (TCEP), à hauteur de 0,5 équivalent par rapport à la sonde. Le TCEP n'est cependant pas un réducteur très spécifique puisqu'il est capable de réagir efficacement avec H_2O_2 ⁷⁶, ce qui pose d'ailleurs problème par rapport à la stratégie réactionnelle employée. Dans ce travail, les auteurs n'évaluent pas les performances analytiques de la méthode vis-à-vis de la détection d' H_2O_2 , et n'essaient pas non plus de mettre en évidence l'étape lente qui limite la cinétique de la conversion (soit la coupure oxydante de la liaison carbone-bore, soit l'auto-oxydation). Comme nous le verrons plus tard, l'auto-oxydation des benzohydroquinones n'est généralement pas très rapide, ce qui pourrait donc bien être l'étape lente du système proposé par le groupe de Shabat. Cette stratégie peut donc être aisément améliorée en choisissant une hydroquinone dont l'auto-oxydation est plus rapide.

3.1.2 Détection d'eau oxygénée basée sur l'auto-oxydation d'une hydroquinone et une amplification auto-catalytique

Le groupe de Phillips a développé une méthode d'amplification auto-catalytique de détection d' H_2O_2 s'appuyant également sur l'auto-oxydation d'une hydroquinone, la 1,2,4-trihydroxybenzene **3.5**, et dont le principe est schématisé FIGURE 3.2.

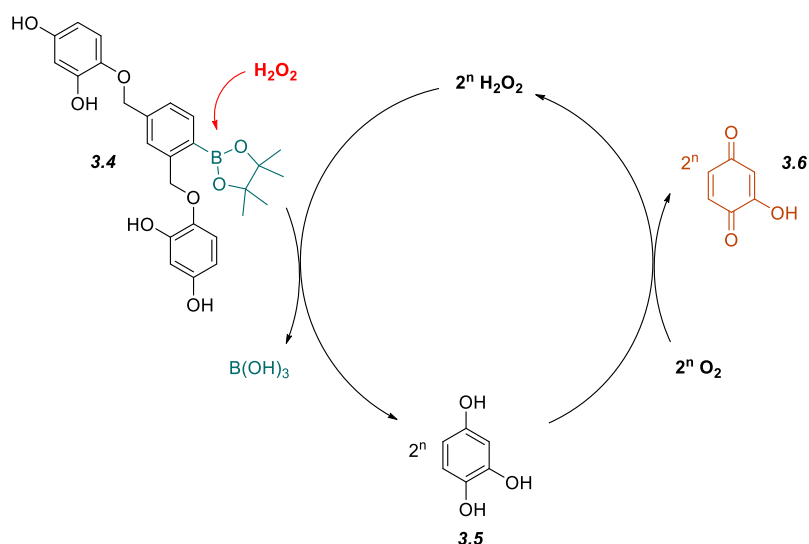


FIGURE 3. 2 Détection d'eau oxygénée selon une amplification auto-catalytique de la cible, figure modifiée selon Philipps *et al.*⁷⁷

La stratégie repose sur le clivage spécifique de l'ester boronique présent sur la sonde **3.4** par H_2O_2 , conduisant alors à un relargage par auto-immolation (*via* une 1,6- et 1,4-élimination et la formation d'une quinone-méthide) de 2 équivalents d'hydroquinones **3.5**. Celles-ci subissent alors une auto-oxydation en présence d' O_2 , naturellement présent en solution, ce qui conduit à la production de 2 équivalents de quinones **3.6**, optiquement détectables, ainsi que deux molécules d' H_2O_2 . A chaque cycle, chaque molécule d' H_2O_2 peut donc conduire à la production de deux molécules d' H_2O_2 ce qui a pour effet de générer un processus auto-catalytique. La quinone **3.6** est ainsi accumulée de manière exponentielle dans le temps, ce qui permet *in fine* de la détecter tout simplement à l'œil nu. Encore une fois une conversion totale de la sonde est rendue possible à partir de quantités sous-stœchiométriques d'eau oxygénée (*i.e.* 0,1 équivalent, soit $250 \mu\text{M}$ d' H_2O_2 pour $2,5 \text{ mM}$ de sonde **3.4**) et cela en environ 4 heures. Le problème que l'on retrouve encore une fois ici est qu'en absence d'ajout d' H_2O_2 100 % de la sonde **3.4** sont spontanément convertis en à peine plus de 4 heures, démontrant un problème de déclenchement non-spécifique de la réaction auto-catalytique. Celle-ci résulterait probablement d'une faible stabilité de la sonde au regard de la cinétique réactionnelle, rendant ainsi la méthode peu performante. Ici, hormis la vitesse de coupure oxydante de la liaison C-B et de l'auto-oxydation, la vitesse des réactions intramoléculaires de relargage des motifs hydroquinones peut également être l'étape cinétiquement limitante.

L'analyse de la littérature nous montre que les quelques rares exemples de systèmes qui ont été développés jusqu'à présent sont peu performants car impliquant des réactions catalytiques ou auto-catalytiques trop lentes au regard de la stabilité intrinsèque des réactifs.

3.1.3 Auto-oxydation des hydroquinones et formation *in situ* d'eau oxygénée

Comme rappelé précédemment, la réaction d'auto-oxydation des hydroquinones peut s'écrire de manière globale comme suit :



La littérature est extrêmement fournie vis-à-vis de l'auto-oxydation des hydroquinones⁷⁸⁻⁸³. Elle rend compte de la grande complexité de cette réaction en fonction de la nature des systèmes redox quinoniques étudiés. Cette complexité est notamment liée à la nature multi-électronique et multi-protonique de cette réaction. Tout d'abord, il est clair que le passage de l'hydroquinone QH_2 à la quinone Q se fait par un intermédiaire semiquinone $\text{Q}^\cdot$ ^{78,81,82}. L'initiation de l'auto-oxydation démarre donc par une réaction à un électron entre l'hydroquinone et l'oxygène moléculaire, formant ainsi une semiquinone et le radical anion superoxyde :



Ainsi, plus le potentiel formel E^0 du couple $\text{Q}^\cdot/\text{QH}_2$ est faible par rapport au potentiel formel du couple $\text{O}_2/\text{O}_2^\cdot$ et plus favorable est cette réaction. Des substituants favorisant la densité électronique sur le cycle hydroquinonique rendront donc plus facile cette réaction d'oxydation (**Remarque 1**).

En réalité, l'espèce réagissant le plus favorablement avec O_2 est plutôt Q^{2-} , car cette dernière est beaucoup plus réductrice⁸² que $\text{QH}^\cdot$ ou encore QH_2 :



avec :

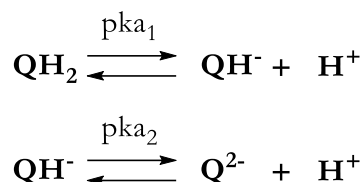
$$E^0'(\text{Q}^\cdot/\text{Q}^{2-}) = E^0'(\text{Q}^\cdot/\text{QH}_2) - \frac{2,3RT}{nF}(\text{pKa}_1 + \text{pKa}_2)$$

R, la constant des gaz parfaits ($8.31 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

T, la température (K)

n, le nombre d'électrons ($n=1$)

F, la constant de Faraday ($96500 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)



Ceci explique en partie la dépendance de la réaction au pH puisque les pKa des quinones restent relativement élevés (en général $\text{pKa}_1 \sim 9$ et $\text{pKa}_2 \sim 11$). Ainsi, plus l'on diminuera le pKa *via* l'adjonction de substituants électroattracteurs sur les cycles aromatiques des quinones et plus cette réaction d'initiation sera efficace dans des conditions légèrement basiques (**Remarque 2**). Les deux dernières remarques montrent des effets antagonistes sur cette première étape d'initiation.

Une fois la semiquinone formée, celle-ci peut s'oxyder en quinone *via* un deuxième transfert d'électron⁸² soit (i) vers O_2 pour former un nouvel anion superoxyde (**réaction 3.4**), soit (ii) vers l'anion superoxyde lui-même, lequel est un bien meilleur oxydant pour former de l'eau oxygénée (**réaction 3.5**), soit (iii) vers une autre semiquinone dans une réaction de disproportionation (**réaction 3.6**).



Concernant la **réaction 3.4**, la constante d'équilibre de la réaction est déterminée par la différence de potentiel standard entre les couples Q/Q^- et O_2/O_2^- (**FIGURE 3.3**)⁷⁸.

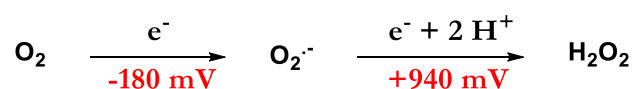


FIGURE 3. 3 Etapes de réduction mono-électroniques de l'oxygène⁷⁸ conduisant à H_2O_2

Chacun de ces couples étant en milieux aqueux indépendant du pH sur une zone de pH relativement étendue cela signifie que plus le $E^0(\text{Q}/\text{Q}^-)$ est bas (ce qui est le cas par exemple des quinones substituées par des groupements donneurs), plus la réaction sera favorisée. On a ainsi :

$$E^0(\text{O}_2/\text{O}_2^-) - E^0(\text{Q}/\text{Q}^-) = \frac{RT}{nF} \ln K$$

Concernant la **réaction 3.5**, celle-ci est le plus souvent favorable étant donné le fort pouvoir oxydant de l'anion superoxyde mais sa vitesse est dépendante de l'accumulation de chacun des deux radicaux en solution.

Pour ce qui est de la réaction de disproportionation (**3.6**), cela dépend uniquement des valeurs relatives de $E^0(Q^{\cdot-}/Q^{2-})$ et $E^0(Q/Q^{\cdot-})$, avec :

$$E^0(Q^{\cdot-}/Q^{2-}) - E^0(Q/Q^{\cdot-}) = (RT/F) \ln K_{\text{disp}}$$

Enfin, il faut noter que deux espèces sont susceptibles d'oxyder directement l'hydroquinone protonée⁸¹, à savoir :

- l'anion superoxyde qui est un oxydant plus puissant que O_2 selon la réaction :



- la quinone elle-même selon la réaction de comproportionation suivante :



Ainsi, selon le type de quinone étudié, la voie de génération de l'eau oxygénée balancera entre une voie de propagation par le radical anion superoxyde (**réaction 3.7**) et une voie de propagation par la réaction de comproportionation des quinones (**réaction 3.8**) (**FIGURE 3.4**)⁸¹. Il faut noter que dans le cas de la comproportionation, une phase de latence est souvent observée et correspond au temps nécessaire pour que la quinone Q soit suffisamment accumulée en solution. Cette phase peut être réduite suite à l'adjonction de Q dans le milieu qui agira en tant que catalyseur.

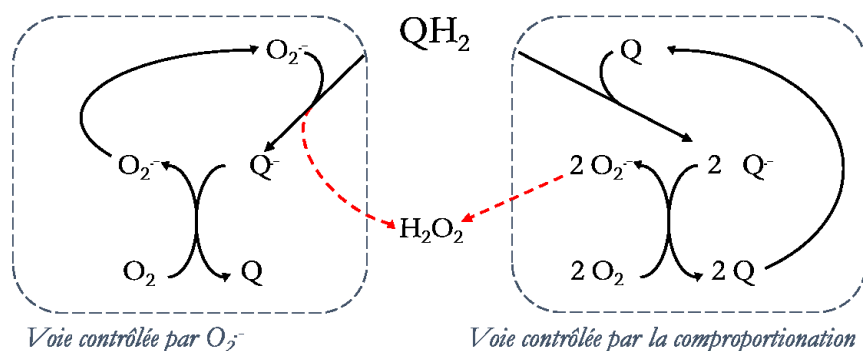


FIGURE 3. 4 Les deux voies majoritaires de génération de H_2O_2 , figure simplifiée selon Forman *et al.*⁸¹

La distinction entre ces deux voies peut se faire grâce à l'utilisation de l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) qui disproporcionne le radical anion superoxyde en oxygène et en peroxyde d'hydrogène^{81,83}. Selon la voie préférentielle d'auto-oxydation de l'hydroquinone, la SOD aura un rôle d'inhibiteur ou de catalyseur. En effet, dans le cas où $O_2^{\cdot-}$ est l'espèce propagatrice, la SOD aura un effet inhibiteur, tandis que lors de la comproportionation elle aura un effet de catalyseur puisqu'elle favorisera la formation du catalyseur Q en tirant la réaction d'auto-oxydation de $Q^{\cdot-}$ (réaction 3.4).

Comme cela a ainsi été démontré, ces mécanismes d'auto-oxydation sont très dépendants de la nature des hydroquinones étudiées, tant au niveau de leurs pKa que de leurs potentiels formels de réduction, mais aussi selon la nature des substituants et la capacité à stabiliser ou pas la forme semiquinone ou encore à résister chimiquement aux diverses espèces radicalaires réactives de l'oxygène (ROS).

3.1.4 Objectifs du travail et cahier des charges

L'objectif de cette seconde partie du travail de thèse a été de concevoir une nouvelle approche d'amplification moléculaire pour la détection sensible de l'eau oxygénée, *via* un principe d'auto-oxydation d'un motif hydroquinonique couplé à une déprotection oxydative d'un ester boronique selon deux schémas d'amplification, l'un catalytique et l'autre auto-catalytique. Ces deux schémas sont représentés **FIGURE 3.5**.

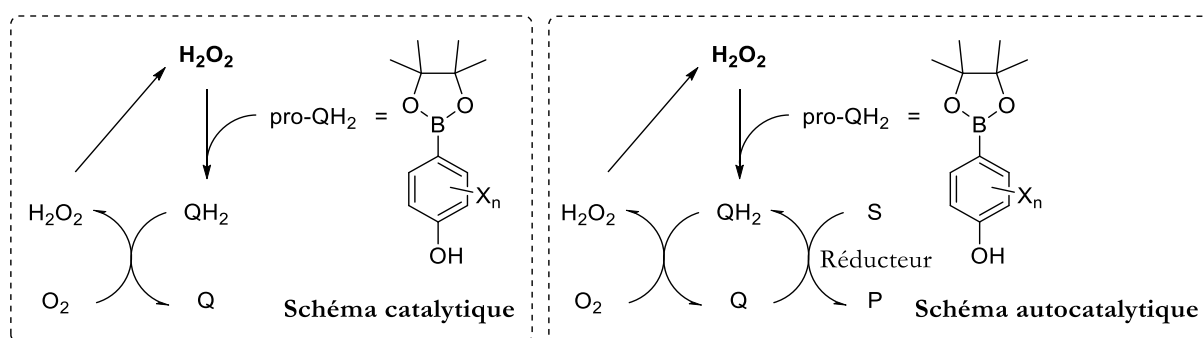


FIGURE 3. 5 Présentation schématique des systèmes catalytique et auto-catalytique explorés dans ce travail de thèse

Le premier schéma, de nature catalytique, est directement inspiré du système de régénération de l'eau oxygénée développé par le groupe de Shabat (**FIGURE 3.5 DE GAUCHE**). Le second schéma réactionnel, conçu pour être auto-catalytique, implique la mise en œuvre du recyclage redox du

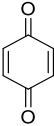
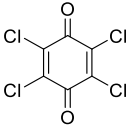
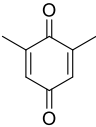
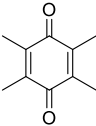
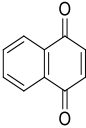
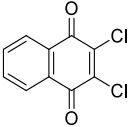
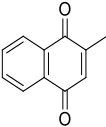
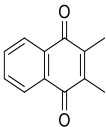
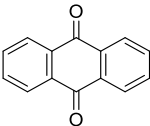
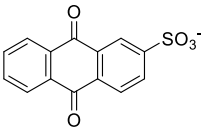
couple quinone/hydroquinone afin de ne pas seulement régénérer H_2O_2 mais aussi l'amplifier (FIGURE 3.5 DE DROITE). Pour cela il est nécessaire d'ajouter un agent réducteur capable de réduire la quinone formée en hydroquinone, la réduction pouvant alors se faire soit directement, (i) par voie chimique, en utilisant des réducteurs tels que l'acide ascorbique, soit indirectement (ii) par voie enzymatique *via* des réductases capables de réduire des quinones, ou soit encore (iii) par voie électrochimique en introduisant en solution une électrode et en appliquant un potentiel suffisamment réducteur pour réduire la quinone en hydroquinone.

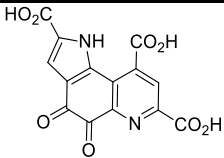
Afin d'avoir un recyclage efficace et un *modus operandi* simple, nous avons opté préférentiellement pour une voie de régénération enzymatique qui s'avère généralement très efficace en raison de la grande efficacité catalytique de réduction des quinones par différentes réductases. Cependant, le choix d'un système de réduction enzymatique pose des conditions expérimentales particulières telles qu'une température et un pH de travail appropriés à l'enzyme. Ainsi, un pH de 8,5 a été sélectionné car il permet à la fois de respecter la zone de pH optimal des réductases que nous avons utilisées tout en favorisant la déprotection par H_2O_2 de la sonde ester boronique, dite pro-QH₂ (FIGURE 3.5), ainsi que l'auto-oxydation de l'hydroquinone QH₂.

Le cyclage entre Q et QH₂, c'est-à-dire la génération *in situ* d' H_2O_2 , ne dépend que de l'efficacité du réducteur enzymatique et du mécanisme d'auto-oxydation de l'hydroquinone. Le couple quinone/hydroquinone choisi doit donc avoir des caractéristiques telles qu'elles lui permettent de rapidement réduire le dioxygène dissous, de générer un bon rendement d' H_2O_2 , d'être suffisamment hydrosoluble au pH de travail (8,5) et, dans les conditions de température ambiante (20-25°C), d'être suffisamment robuste afin de ne pas se dégrader sous l'action des divers ROS générés dans le milieu au cours de la réaction. Pour chaque couple Q/QH₂ sélectionné, le challenge est ensuite de concevoir et préparer son homologue pro-QH₂, c'est-à-dire une version protégée de l'hydroquinone *via* un ester ou acide boronique, celui-ci devant respecter les mêmes critères de solubilité et de stabilité que l'hydroquinone. Enfin, afin de pouvoir suivre par spectroscopie d'absorbance ou de fluorescence la réaction d'amplification moléculaire, il faut également que l'une des espèces possède une signature spectrale propre (sélective) et facilement mesurable.

Dans le but d'avoir un système des plus performants, le premier facteur déterminant le choix du pro-QH₂ est la structure de l'hydroquinone et sa capacité à s'auto-oxyder. Diverses quinones ont été listées selon leur $E^{0'}$ respectifs afin de mieux cerner les familles capables d'efficacement réduire l'oxygène dissous (TABLEAU 3.1).

TABLEAU 3. 1 Potentiels de réduction de la triade $Q/Q^{\cdot-}/QH_2$ de quelques quinones d'intérêts⁷⁸

Quinone	Structure	$E^0(Q/Q^{\cdot-})$ <i>en mV, à pH 7,0</i>	$E^0(Q^{\cdot-}/QH_2)$ <i>en mV, à pH 7,0</i>	$E^0(Q/QH_2)$ <i>en mV, à pH 7,0</i>
1,4-benzoquinone		99 ⁸⁴	473	286
2,3,5,6-tétrachloro-1,4-benzoquinone		650 ⁸⁵	> 650	
2,6-diméthyl-1,4-benzoquinone		-80 ⁸⁵	363	142
Duroquinone		-240 ⁸⁴	350	68
1,4-naphthoquinone		-140 ⁸⁴		
2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone		-36 ⁸⁶		
Ménadione		-203 ⁸⁷	193	-5
2,3-diméthyl-1,4-naphthoquinone		-240 ⁸⁷		
9,10-anthraquinone		-445 ⁸⁸		
9,10-anthraquinone-2-sulfonate		-380 ⁸⁹		

PQQ		-114 ⁹⁰
-----	---	--------------------

Dans ce tableau, il est possible de distinguer trois familles représentées par les *para*-benzoquinones, les *para*-naphthoquinones et les *para*-anthraquinones. Généralement, les $E^0(Q/Q^{\cdot-})$ des benzoquinones sont positifs à pH 7,0 (~ 99 mV), mais selon les substituants il est possible de faire augmenter cette valeur en ajoutant des substituants électroattracteurs comme des fonctions halogènes (le dérivé *tétra*-chloro-*para*-benzoquinone à +650 mV en est un bon exemple), ou bien de la réduire *via* l'ajout de substituants électrodonneurs comme des groupements alkyls. En ce qui concerne les *para*-naphthoquinones, les $E^0(Q/Q^{\cdot-})$ sont déplacés vers des valeurs plus négatives à pH 7,0 (entre -36 et -240 mV selon la nature des substituants) que les benzoquinones tandis que les *para*-anthraquinones possèdent des $E^0(Q/Q^{\cdot-})$ encore plus négatifs (par rapport aux naphthoquinones). Il est intéressant de noter le E^0 du PQQ présenté dans la première partie de cette thèse, qui se situe au niveau des E^0 des naphthoquinones.

Au regard de ces diverses familles de quinones, celles *a priori* le plus apte à réduire efficacement l'oxygène moléculaire sont celles de la famille des anthraquinones (TABLEAU 3.1) compte-tenu de leurs potentiels de réduction particulièrement bas. La contrepartie d'un potentiel de réduction très (trop) négatif tel que celui des anthraquinones est que la réduction du motif quinonique ne puisse plus être possible par voie enzymatique car nécessitant une enzyme réductrice qui soit capable d'opérer à de tels potentiels très réducteurs (FIGURE 3.6).

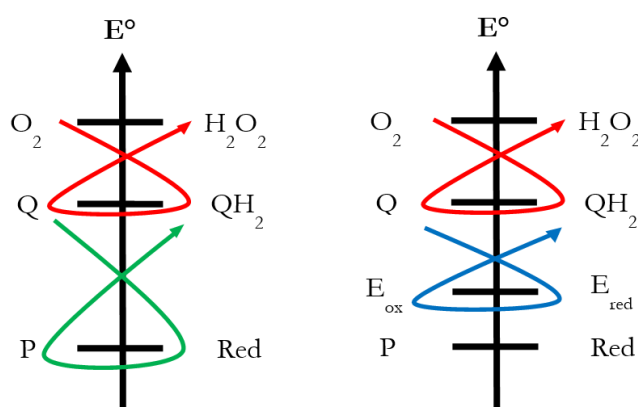


FIGURE 3. 6 Echelle de potentiel montrant la réactivité pour le couple Q/QH₂ en présence d'un réducteur chimique (à gauche) ou d'un couple enzyme/substrat (à droite).

Un autre problème des anthraquinones est leur faible solubilité en solution aqueuse et bien qu'il soit envisageable de les rendre plus hydrosolubles *via* l'adjonction de fonctions sulfonates, la synthèse de dérivés pro-anthrahydroquinones sulfonates s'avère loin d'être aisée.

La famille des *para*-naphthoquinones se situe dans une gamme de potentiels intermédiaires (entre -36 et -240 mV), relativement idéale, c'est-à-dire pas trop basse pour ne pas être limitée par le pouvoir réducteur de l'enzyme, mais suffisamment basse pour réduire efficacement l'oxygène moléculaire, autorisant ainsi un cyclage redox efficace entre les formes oxydées et réduites du couple Q/QH₂.

Quand bien même le potentiel de la 1,4-naphthoquinone s'avère légèrement supérieur à celui du couple O₂/O₂⁻ à pH 7,0 (-140 > -180 mV), ce qui n'est pas idéal pour l'auto-oxydation, nous avons quand même choisi de l'étudier et de caractériser son ester boronique vis-à-vis des schémas d'amplification moléculaire catalytique et auto-catalytique envisagés, en gardant à l'esprit que ce potentiel formel est dépendant du pH (pH de travail 8,5)⁸².

Enfin, pour ce qui concerne la famille des *para*-benzoquinones, celle-ci est remarquable de par sa large gamme de potentiel formel pouvant selon la nature des substituants rivaliser avec le potentiel de certaines *para*-naphthoquinones. Dès lors, une benzoquinone possédant un potentiel formel suffisamment bas peut être envisagée pour la préparation de molécules pro-QH₂.

3.2 Détection de l'eau oxygénée *via* la déprotection catalytique d'un dérivé ester boronique de benzo- ou naphtho-hydroquinone

3.2.1 Dérivé monoester boronique de la 1,4-naphthohydroquinone

Comme discuté précédemment, les dérivés naphthoquinoniques appartiennent à une famille de quinones qui répondent bien au cahier des charges. En particulier, la 1,4-naphthohydroquinone (**1,4-NQH₂**) entre dans les critères nécessaires à la conception d'une réaction catalytique mettant en jeu une auto-oxydation, à savoir qu'elle possède un E^{0'} suffisamment bas (> -140 mV à pH 8,5) pour réduire l'oxygène dissous et former efficacement de l'eau oxygénée. Une étude exhaustive de la réaction d'auto-oxydation de la 1,4-naphthohydroquinone en présence d'O₂⁸² a permis de montrer que cette hydroquinone réagit efficacement avec O₂ pour former H₂O₂ et que cette réactivité est meilleure en se plaçant à des pH d'autant plus basiques.

La première molécule pro-QH₂ que nous avons testée est un dérivé ester boronique commercial de la 1,4-naphthohydroquinone, il s'agit du 4-(4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)naphthalène-1-ol (**4-DBN** ou **3.7**). En présence d'H₂O₂, le schéma réactionnel que nous pouvons envisager avec cette molécule est représenté **FIGURE 3.7**.

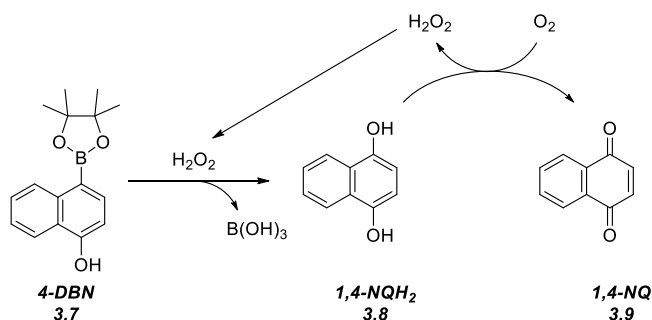


FIGURE 3. 7 Mécanisme réactionnel supposé du 4-DBN vis-à-vis de l'eau oxygénée

L'ajout d'une quantité sous-stœchiométrique d'H₂O₂ à une solution contenant la sonde **4-DBN** est censé produire la **1,4-NQH₂** via le clivage oxydatif du groupement ester boronique, laquelle molécule doit s'oxyder en **1,4-NQ** pour former H₂O₂. Le peroxyde d'hydrogène ainsi généré peut alors entrer dans une boucle catalytique pour à nouveau régir avec la molécule de départ et ce jusqu'à épuisement total de celle-ci. Afin de pouvoir suivre cette réaction en temps réel par une simple mesure d'absorbance, il est bien entendu nécessaire que l'une des espèces puisse être détectée et de préférence avec une bonne sélectivité. Pour vérifier cela, nous avons réalisé une étude spectroscopique des différentes espèces et en particulier du **4-DBN** et de la **1,4-NQ** seuls en solution. La **FIGURE 3.8** montre l'évolution en fonction du temps (sur 20 minutes) du spectre UV-vis du **4-DBN** à 50 µM dans un tampon Tris,HCl 100 mM à pH 8,5 contenant 10 µM d'EDTA.

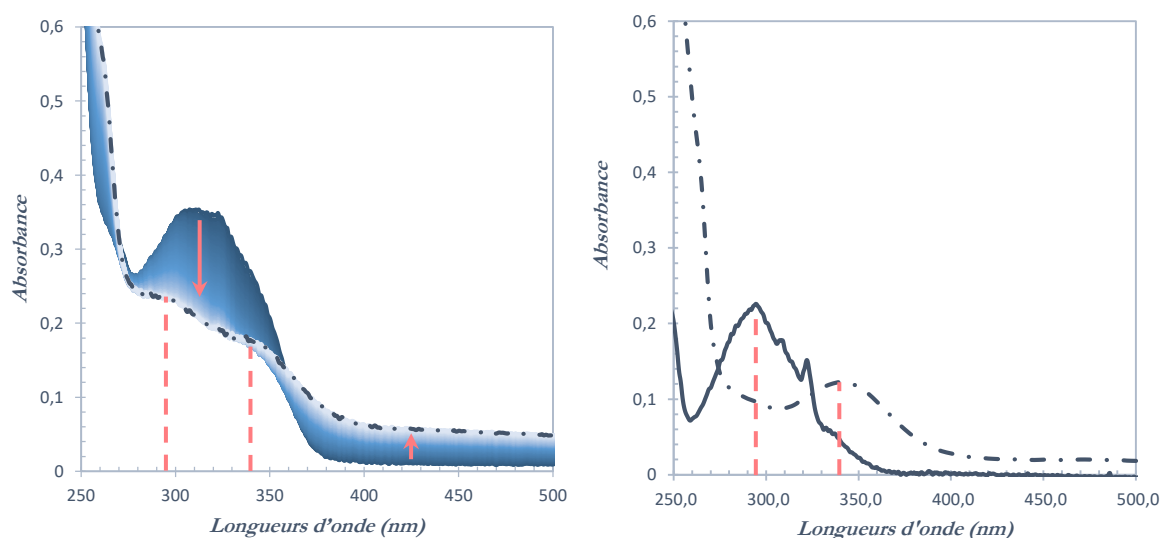


FIGURE 3. 8 A gauche : Suivi par spectroscopie UV-vis à température ambiante de l'évolution temporelle enregistrée toutes les 5 secondes (sur 20 minutes) du spectre du 4-DBN (50 μ M) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μ M d'EDTA. Le spectre en pointillé représente celui de l'espèce finale.

A droite : Spectres UV-vis à température ambiante de la 1,4-NQ (pointillé) et du 1-naphthol (trait plein) (50 μ M) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μ M d'EDTA.

L'évolution spectrale du dérivé **4-DBN** témoigne d'une assez grande instabilité de celui-ci. En effet, le premier scan montre un maximum à 310 nm pour la sonde **4-DBN** en solution aqueuse, il suffit alors de quelques minutes pour voir changer le spectre d'absorbance de façon drastique. Après stabilisation, le spectre final (spectre en pointillé sur la **FIGURE 3.8 DE GAUCHE**) possède deux pics assez proches, l'un à 295 nm et l'autre à 340 nm. Celui à 340 nm coïnciderait avec celui de la **1,4-NQ** (spectre en pointillé sur la **FIGURE 3.8 DE DROITE**), suggérant qu'en absence d'eau oxygénée, la 1,4-naphthoquinone serait produite en concomitance avec au moins un autre produit absorbant à 295 nm, sur lequel nous reviendrons par la suite.

L'étude bibliographique de l'**annexe 1** a montré que malgré la grande stabilité souvent proclamée des acides boroniques en synthèse organique, ces groupements peuvent être sujets à plusieurs réactions lentes en milieu aqueux basique en présence d'oxygène avec, tout d'abord une hydrolyse généralement aisée du groupement ester pinacol, mais aussi la possibilité d'une protodéboronation de la fonction boronique, ainsi que d'un clivage oxydatif lent de la liaison C-B *via* le pouvoir oxydant de l'oxygène dissous. Le schéma réactionnel faisant intervenir ces réactions secondaires est détaillé ci-dessous (**FIGURE 3.9**) :

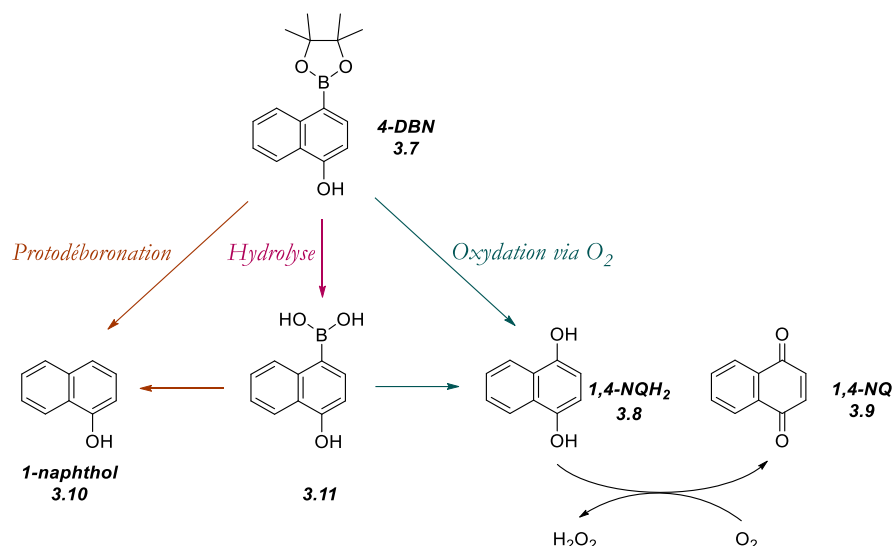


FIGURE 3. 9 Réactions secondaires que peut subir le 4-DBN, et les produits associés

La protection de l'une des fonctions hydroxy de la **1,4-NQH₂** par un groupement acide ou ester boronique permet de générer l'équivalent d'un dérivé naphthol dont les propriétés de fluorescence sont exaltées et bien meilleures que celles d'une naphthohydroquinone ou encore même d'un 1-naphthol. Nous avons tiré parti de cette différence d'émission de fluorescence pour caractériser le mécanisme de dégradation de la sonde en milieu tampon Tris pH 8,5 en présence et en absence d'oxygène (FIGURES 3.10 ET 3.11).

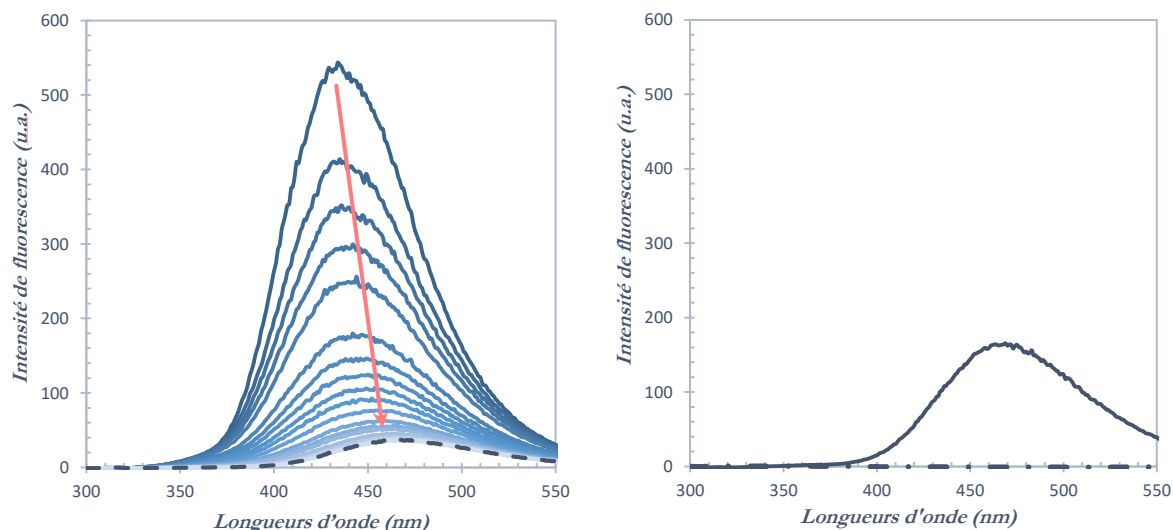


FIGURE 3. 10 A gauche : Suivi par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$) à température ambiante de l'évolution temporelle enregistrée toutes les minutes (sur 20 minutes) du spectre du 4-DBN ($50 \mu\text{M}$) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant $10 \mu\text{M}$ d'EDTA. Le spectre en pointillé représente celui de l'espèce finale.

A droite : Spectres de fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$) à température ambiante de la 1,4-NQ (pointillé) et du 1-naphthol (trait plein) ($50 \mu\text{M}$) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant $10 \mu\text{M}$ d'EDTA.

D'après la FIGURE 3.10, la sonde **4-DBN** émet une forte fluorescence à 434 nm quand elle est excitée à 285 nm, tandis que sous les mêmes conditions d'excitations la **1,4-NQ** ne fluoresce pas. Le suivi au cours du temps met en évidence que l'intensité à 434 nm du pic d'émission de fluorescence, caractéristique de la sonde **4-DBN**, diminue fortement avec un déplacement du maximum vers de plus grandes longueurs d'ondes. Après plus de 20 minutes le signal se stabilise, indiquant la fin de la réaction conduisant à une conversion totale du composé de départ en une autre molécule dont le maximum d'émission se situe à 466 nm. Cette espèce est différente de la **1,4-NQ** puisque cette dernière ne fluoresce pas dans ces conditions. Nous avons émis l'hypothèse que le phénomène observé pouvait correspondre à une réaction de protodéboronation et dont le produit attendu est le 1-naphthol. Le spectre de fluorescence de ce dernier est reporté sur la FIGURE 3.10 DE DROITE et son maximum d'émission à 466 nm suggère que l'on a bien généré une espèce 1-naphthol. D'après l'intensité relative des pics dans cette expérience, il semblerait qu'environ 25 % du **4-DBN** est transformé en 1-naphthol. Il reste donc à savoir en quoi se transforment les 75 % restants. Si l'on se réfère au spectre UV-vis de la FIGURE 3.8 et pour lequel nous avons conclu à la formation de **1,4-NQ** en raison de la présence d'un maximum d'absorbance caractéristique de cette dernière, nous pouvons en déduire que les

75 % restants des molécules transformées sont très certainement des **1,4-NQ**. Sur ce même spectre UV-vis de la **FIGURE 3.8**, la présence d'un maximum à 295 nm confirme finalement la formation de 1-naphthol par protodéboronation.

Afin de démontrer que la formation de la **1,4-NQ** résulte bien d'une réaction avec l'oxygène dissous, la sonde **4-DBN** a été examinée en fonction du temps par spectroscopie UV-visible en l'absence d'oxygène (**FIGURE 3.11**). Le résultat obtenu permet de confirmer sans équivoque la production exclusive de 1-naphthol dans ces conditions puisque le spectre final correspond bien à celui en trait plein de la **FIGURE 3.8 DE DROITE**.

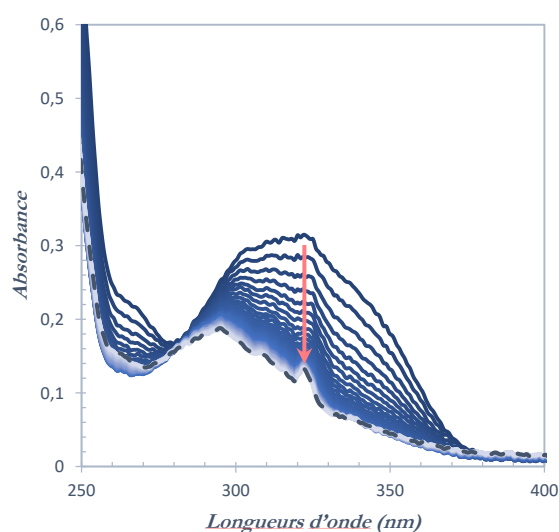


FIGURE 3. 11 Suivi par spectroscopie UV-vis à température ambiante et sous atmosphère d'argon de l'évolution temporelle enregistrée toutes les 30 secondes (sur 20 minutes) du spectre du 4-DBN (50 μM) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA. Le spectre en pointillé représente celui de l'espèce finale.

Diverses expériences ont ensuite été menées afin de caractériser la cinétique de protodéboronation (**TABLEAU 3.2**).

TABLEAU 3. 2 Détermination de k_p à température ambiante selon des expériences de fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$) en présence et en absence d'oxygène, et de spectroscopie UV-vis en absence d'oxygène du 4-DBN (50 μM) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA.

Méthodes de détermination	k_p (en s^{-1})
Fluorimétrie en présence d' O_2	0,0040
Fluorimétrie en absence d' O_2	0,0040
Spectroscopie UV-vis en absence d' O_2	0,0025

L'étude de la cinétique d'évolution du maximum d'émission en fluorescence de la **FIGURE 3.10 DE GAUCHE** a permis de déterminer une constante cinétique apparente de premier ordre $k_p = 0,004 \text{ s}^{-1}$ (**TABLEAU 3.2**). Afin de s'affranchir de la réaction secondaire d'oxydation par O_2 , laquelle conduit à la production de **1,4-NQ**, l'expérience a été répétée en absence d'oxygène. Une même constante cinétique de $0,004 \text{ s}^{-1}$ a été ainsi déterminée (**TABLEAU 3.2**). L'expérience menée en l'absence d'oxygène par spectroscopie UV-vis, **FIGURE 3.11**, nous autorise à considérer que la constante cinétique mesurée ne reflète que la cinétique de protodéboronation du **4-DBN** en 1-naphthol, permettant ainsi d'extraire une constante cinétique $k_p = 0,0025 \text{ s}^{-1}$, laquelle s'avère être du même ordre de grandeur que celle déterminée par fluorimétrie.

La réaction de déprotection du **4-DBN** en **1,4-NQH₂** sous l'action de l'eau oxygénée a ensuite été étudiée sous atmosphère inerte afin de déterminer la vitesse de coupure oxydante de la liaison C-B par H_2O_2 . Les expériences ont été suivies par absorbance afin de pouvoir visualiser la formation de l'hydroquinone (celle-ci devant être stable en l'absence d'oxygène) ainsi que celle du 1-naphthol issu de la réaction concomitante de protodéboronation (**FIGURE 3.12**).

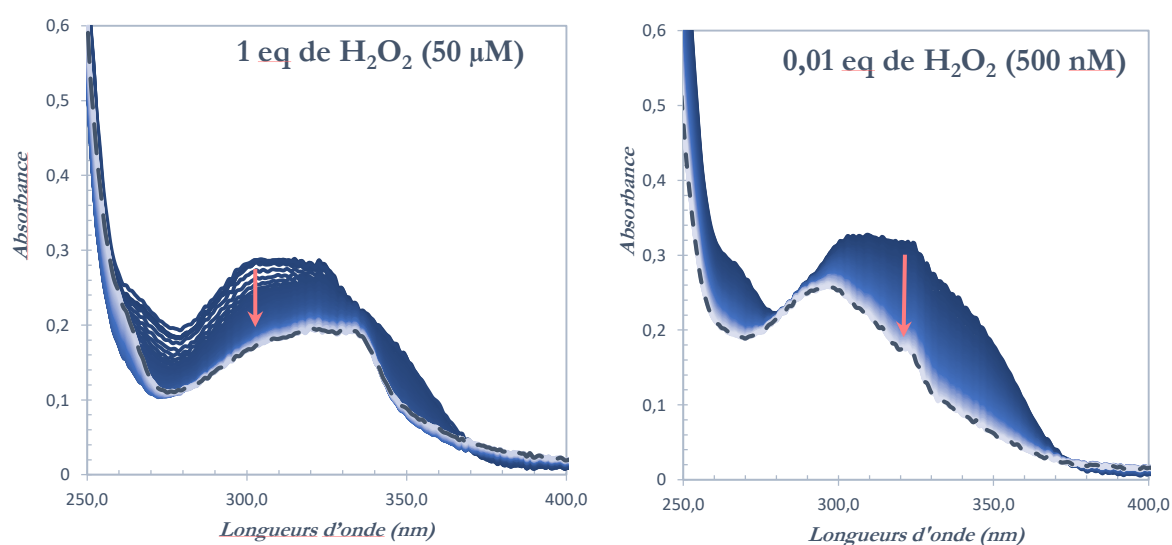
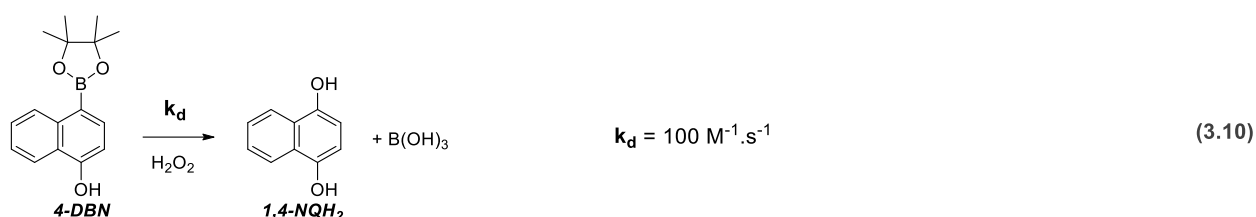
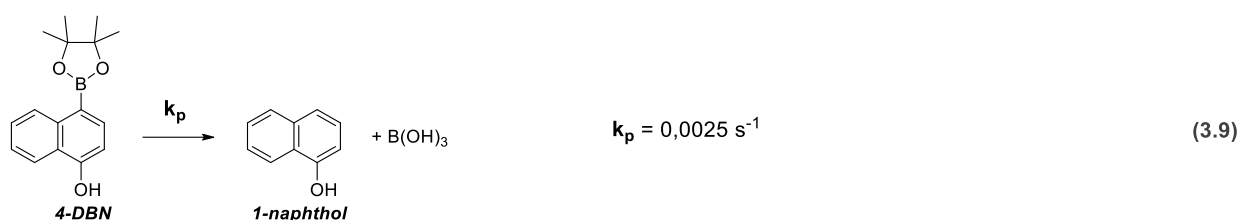


FIGURE 3. 12 A gauche : Suivi par spectroscopie UV-vis à température ambiante et sous atmosphère d'argon de l'évolution temporelle enregistrée toutes les 30 secondes (sur 20 minutes) du spectre du 4-DBN ($50 \mu\text{M}$) en présence d'un équivalent d' H_2O_2 ($50 \mu\text{M}$) dans un tampon Tris (100 mM à $\text{pH } 8,5$) contenant $10 \mu\text{M}$ d'EDTA. Le spectre en pointillé représente celui de l'espèce finale.

A droite : Suivi par spectroscopie UV-vis à température ambiante et sous atmosphère d'argon de l'évolution temporelle enregistrée toutes les 30 secondes (sur 20 minutes) du spectre du 4-DBN ($50 \mu\text{M}$) en présence de 0,01 équivalent d' H_2O_2 (500 nM) dans un tampon Tris (100 mM à $\text{pH } 8,5$) contenant $10 \mu\text{M}$ d'EDTA. Le spectre en pointillé représente celui de l'espèce finale.

Alors qu'en absence d'eau oxygénée, le **4-DBN** se transforme uniquement en 1-naphthol (FIGURE 3.11), en présence d'un équivalent d'H₂O₂, l'évolution spectrale indique une transformation de la sonde en un mélange d'espèces qui correspond de toute évidence à un mélange de **1,4-NQH₂** et 1-naphthol (FIGURE 3.12 DE GAUCHE), avec *a priori* une proportion majoritaire en hydroquinone. De fait, dans ces conditions, la réaction de déprotection par H₂O₂ est plus rapide en comparaison de la protodéboronation. Nous l'avons estimée à 100 M⁻¹.s⁻¹ en suivant la variation d'absorbance à 290 nm et en considérant le schéma réactionnel complet suivant :



Cette valeur montre que dans des conditions équimolaires à 50 μM, la déprotection par H₂O₂ est deux fois plus rapide (0,005 s⁻¹) que la protodéboronation. On devrait donc attendre un rapport d'un facteur deux entre les quantités d'hydroquinone et de 1-naphthol produites.

Enfin, dans des conditions sous-stœchiométriques telles qu'à 0,01 équivalent en H₂O₂, la réaction de protodéboronation devient largement majoritaire (FIGURE 3.12 DE DROITE).

Au final, ces résultats ne sont pas favorables à la mise en œuvre des stratégies d'amplification moléculaire envisagées pour détecter H₂O₂ dans la mesure où la molécule **4-DBN** n'est pas suffisamment stable en phase aqueuse, se transformant spontanément trop rapidement en 1-naphthol par protodéboronation ou pire en **1,4-NQ** via une réaction d'oxydation par l'oxygène dissous. Pour toutes ces raisons, la molécule **4-DBN** n'a pas pu être retenue pour la suite du travail. Toutefois, il nous est apparu intéressant d'essayer de mieux comprendre les causes de cette instabilité afin de mieux anticiper par la suite leurs impacts vis-à-vis des autres sondes pro-QH₂ qui ont été envisagées. Afin de vérifier dans quelle mesure les dérivés naphthyls esters boroniques peuvent être sujets à des réactions de protodéboronation ou des réactions de

déprotection oxydative *via* la présence d'O₂, nous avons examiné la réactivité de l'acide boronique naphthalène **3.13** dans un tampon Tris pH 8,5 (FIGURE 3.13).

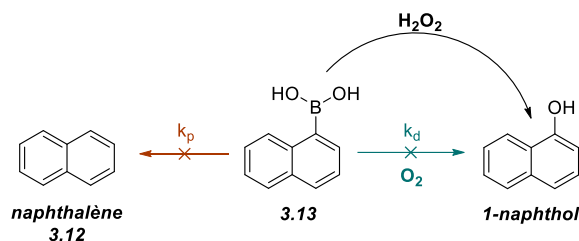


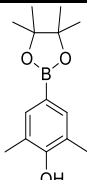
FIGURE 3. 13 Comportement de l'acide boronique 1-naphthalène vis-à-vis des réactions secondaires (protodéboronation et déprotection oxydative *via* O₂) et d'H₂O₂

Nous avons pu constater par spectroscopie UV-vis et par fluorimétrie que celui-ci est très stable en phase aqueuse et qu'il ne se convertit en 1-naphthol qu'après l'ajout d'H₂O₂. D'ailleurs, la réactivité de ce composé vis-à-vis de l'eau oxygénée s'est révélée également beaucoup plus faible que celle du **4-DBN**. En effet, une constante cinétique de l'ordre de 7,5 M⁻¹.s⁻¹ a pu être déterminée, ce qui est environ 50 fois plus faible que pour le composé **4-DBN** précédent. Ces résultats suggèrent une influence importante du groupement OH en *para* de l'acide boronique non seulement sur la cinétique de réaction avec H₂O₂, mais aussi sur les cinétiques des réactions de protodéboronation et d'oxydation à l'air.

Afin d'affiner notre compréhension, des mesures cinétiques de déprotection par H₂O₂ de différents esters boroniques aromatiques ont été réalisées. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le TABLEAU 3.3 suivant :

TABEAU 3. 3 Données cinétiques sur la réaction de déprotection oxydative d'esters ou acides boroniques aromatiques par H_2O_2 à pH 8,5 (Tris 0,1 M, 10 μM EDTA) et mise en évidence de réactions secondaires

Structure	k_d (en $\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	Mise en évidence d'une réaction de protodéboronation et/ou d'hydroxylation
	7,5	Non
	100	Oui
	25	Non
	n.d. (trop lent)	Non
	n.d. (trop lent)	Non
	77	Non
	0,09	Non
	25	Non

	150	Non
---	-----	-----

D'après les valeurs de k_d mesurées pour les différentes espèces présentes dans ce tableau, il apparaît que :

- pour la série des dérivés naphthyls esters boroniques, plus le groupement substituant en *para* a un effet électrodonneur et plus la réaction est rapide. Par ailleurs, la comparaison des dérivés boroniques portant un groupe méthoxy en position *ortho* ou *para* montre un avantage cinétique en faveur de la position *para* contrairement à celui en *ortho* qui semble éteindre toute réactivité.
- pour la série des dérivés benzoquinones, plus le groupement substituant en *para* a un effet électrodonneur et plus la réaction est rapide. Pour ce qui est d'une fonctionnalisation en *méta*, un substituant donneur favorise également la réaction.
- le **4-BDN** est le seul à induire des réactions de protodéboronation et de déprotection oxydative relativement rapides dans les conditions expérimentales sélectionnées.

Ainsi, il ressort d'après l'étude de la sonde **4-DBN** qu'une fonction OH en *para* d'un naphthyl acide ou ester boronique joue à la fois sur la réactivité avec H_2O_2 mais également facilite la mise en place de réactions secondaires de protodéboronation ou de déprotection oxydative *via* O_2 . Trois stratégies d'élaboration de sondes seront développées dans la suite de ces travaux dans le but d'obtenir une sonde stable, et plus spécifique vis-à-vis de l'eau oxygénée. Ces trois stratégies nous ont conduits à la conception des trois dérivés esters boroniques représentés sur la **FIGURE 3.14**.

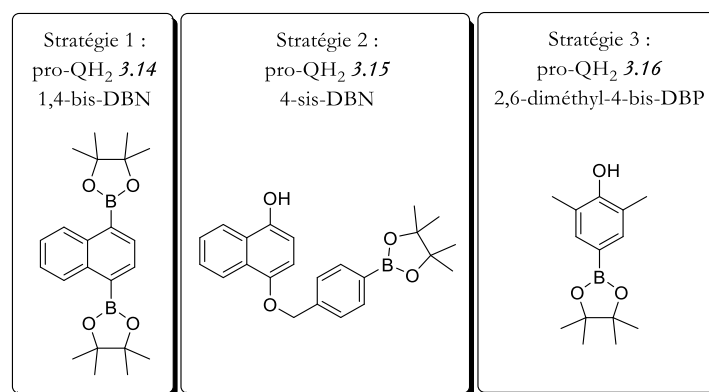


FIGURE 3. 14 Description des trois stratégies via la présentation des nouveaux pro-QH₂

La première stratégie consiste à substituer chacune des fonctions hydroxyles de la **1,4-NQH₂** par un groupement ester boronique avec l'idée de ne plus avoir de fonction OH en *para* et ainsi d'assurer une stabilité du composé **3.14**. Bien qu'il y ait la nécessité de faire réagir 2 molécules d'H₂O₂ pour cliver chacune des fonctions esters boroniques et ainsi aboutir à la génération de l'hydroquinone, ce qui conceptuellement pourrait être un problème pour détecter de faibles concentrations en H₂O₂, ici nous comptons tirer parti de l'instabilité de la forme mono-déprotégée pour autoriser la mise en œuvre d'un processus catalytique.

La seconde stratégie repose sur un éloignement de la fonction ester boronique du cycle naphthyl en introduisant *via* un bras espaceur auto-immolant le deuxième groupement ester boronique (sonde **3.15**), de manière ainsi à ne plus être confronté aux problèmes d'instabilité observés avec le **4-DBN** (*cf.* TABLEAU 3.3). Grâce à cette approche on évite à nouveau la présence d'un groupement OH en position *para* tout en conservant la possibilité de générer cette fois-ci indirectement, une molécule **1,4-NQH₂** *via* le schéma réactionnel présenté FIGURE 3.15.

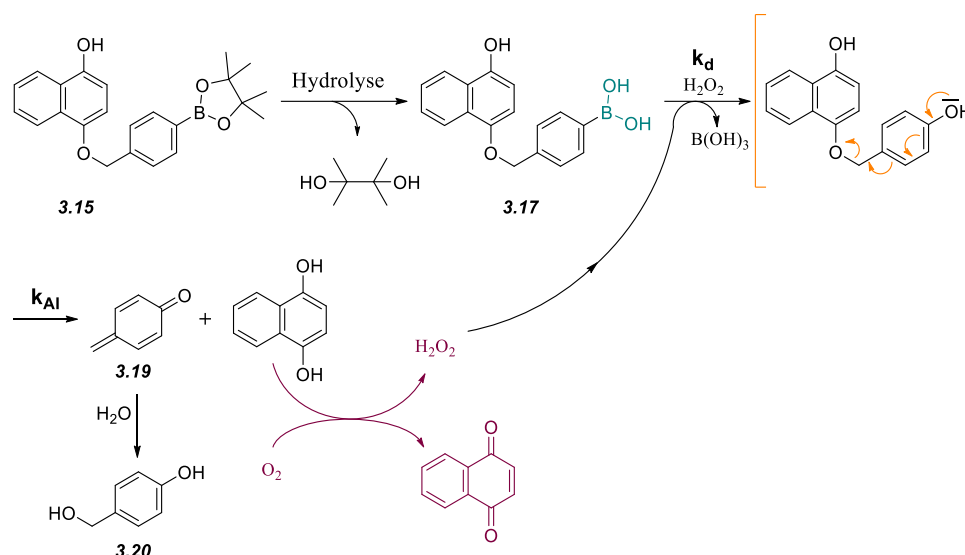


FIGURE 3. 15 Mécanisme réactionnel supposé de la sonde 4-sis-DBN

La troisième stratégie a pour objectif de s'affranchir du centre naphthyl en le substituant par un cycle benzyl diméthylé, lequel fournit alors une quinone de potentiel formel de réduction moins bas (-80 mV à pH 7,0) mais aussi permet d'explorer une réactivité quinonique différente.

3.2.2 Stratégie 1 : double protection de la 1,4-naphthohydroquinone

Comme expliqué précédemment, la fonction hydroxyle en *para* de l'acide boronique **4-DBN** semble être un facteur clé dans le manque de stabilité de ce composé en milieux aqueux par rapport à d'autres monoesters boroniques aromatiques (TABLEAU 3.3). Nous avons pensé que le masquage de cette fonction par un deuxième groupement ester boronique suffirait à assurer une meilleure stabilité de la molécule pro-QH₂ en s'affranchissant des réactions de déprotection oxydative en présence d'O₂ et de protodéboronation auxquelles est particulièrement sensible le **4-DBN**. La molécule 1,4-bis(4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)naphthalène (**1,4-bis-DBN**) a donc été synthétisée selon la procédure de Miyaura *et al.*⁹¹, une réaction croisée entre un bis(pinacolato)diborane et un dibromure de naphthalène catalysée par du Palladium (FIGURE 3.16). Sa purification s'est faite sur colonne chromatographique et conduit à un solide très légèrement jaunâtre.

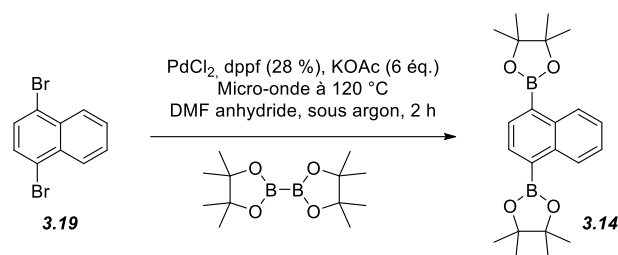


FIGURE 3. 16 Synthèse du 1,4-bis-DBN selon une procédure modifiée de Miyaura⁹¹

Avec cette nouvelle molécule pro-QH₂, le schéma réactionnel catalytique attendu en présence d'H₂O₂ est représenté FIGURE 3.17.

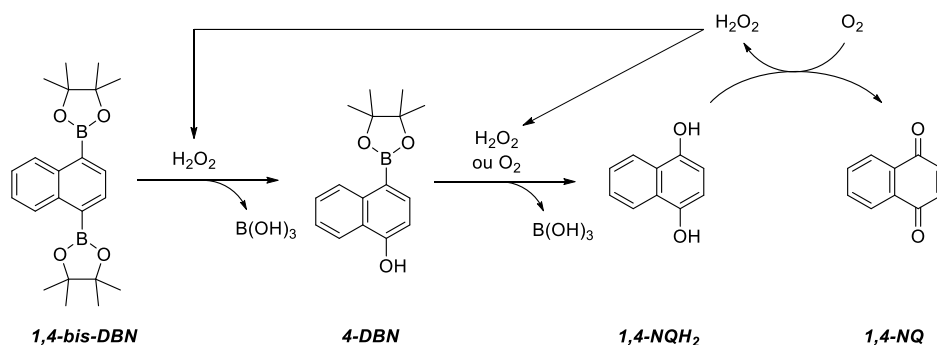


FIGURE 3. 17 Mécanisme réactionnel supposé de la sonde 1,4-bis-DBN en présence d'H₂O₂

Le principal intérêt d'utiliser cette sonde est qu'après introduction d'une concentration sous-stœchiométrique en eau oxygénée, on génère un intermédiaire **4-DBN** qui, de par son instabilité, peut conduire à la génération de **1,4-NQH₂**, ce dernier par auto-oxydation enclenchant alors la production de nouvelles molécules d'H₂O₂ pour générer un cycle catalytique.

Afin de vérifier la stabilité du **1,4-bis-DBN** en phase aqueuse, celle-ci a été suivie par spectroscopie UV-vis dans les conditions expérimentales usuelles (0,1 mM de tampon Tris pH 8,5 en présence d'EDTA à 25 °C) (FIGURE 3.18).

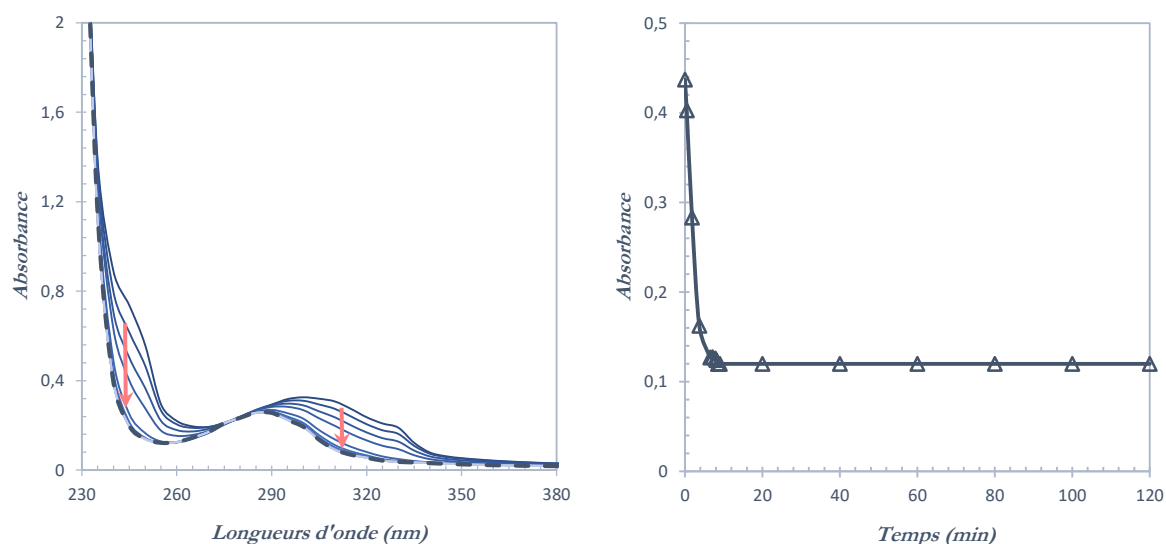


FIGURE 3. 18 A gauche : Suivi par spectroscopie UV-vis à température ambiante de l'évolution temporelle enregistrée toutes les 30 secondes (sur 8 minutes) puis toutes les 20 minutes sur (2 heures) du spectre du 1,4-bis-DBN (50 μ M) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μ M d'EDTA. Le spectre en pointillé représente celui de l'espèce finale.

A droite : Report en fonction du temps de l'intensité d'absorbance à 310 nm obtenue pour la sonde 1,4-bis-DBN.

Cette expérience montre que le spectre du **1,4-bis-DBN** évolue dans un premier temps rapidement dès sa dilution dans le tampon pour aboutir au bout de quelques minutes à un spectre stable dont le maximum d'absorbance se situe à 290 nm. Compte tenu des caractéristiques spectrales respectives de la **1,4-NQ** et du 1-naphthol (*cf.* FIGURE 3.8 DE DROITE), il apparaît clairement que cette évolution du spectre UV-vis du **1,4-bis-DBN** n'est pas liée à une réaction de protodéboronation ou de déprotection oxydative. La seule hypothèse raisonnable est qu'il s'agit de la réaction d'hydrolyse des esters pinacoliques en milieu aqueux comme cela a été démontré pour d'autres esters boroniques⁹². Cette hydrolyse est relativement rapide puisqu'elle s'achève en moins de dix minutes à pH 8,5. L'acide boronique résultant est ensuite très stable dans ces conditions puisque le spectre d'absorption n'évolue quasiment plus durant les 4 heures de suivi cinétique que nous avons réalisé.

Ces résultats ont été confirmés par des mesures en fluorescence avec pour longueur d'onde d'excitation à 285 nm. La fluorescence permet de suivre sélectivement l'évolution de l'ester boronique pinacolique vis-à-vis de la forme hydrolysée acide boronique puisque le premier émet un signal de fluorescence à 364 nm, tandis que le second émet à une plus faible longueur d'onde de $\lambda_{\text{max}} = 338$ nm. Les résultats de la FIGURE 3.19 montrent comme précédemment une

évolution rapide du spectre de fluorescence en quelques minutes vers un état stable (pendant plusieurs heures dans nos conditions). Ces résultats indiquent finalement que sous forme d'acide boronique, la molécule **1,4-bis-DBN** est très stable en milieu aqueux à pH 8,5, ce qui contraste avec le mono-ester **4-DBN** et aussi valide notre stratégie de double protection des groupements OH de la **1,4-NQH₂** pour garantir une meilleure stabilité en milieu aqueux.

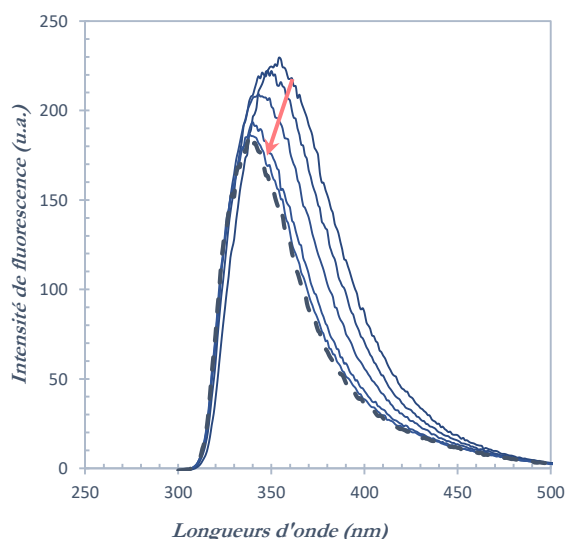


FIGURE 3. 19 Suivi par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$) à température ambiante de l'évolution temporelle enregistrée toutes les 90 secondes (sur 8 minutes) du spectre du **1,4-bis-DBN** ($50 \mu\text{M}$) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant $10 \mu\text{M}$ d'EDTA. Le spectre en pointillés représente celui de l'espèce finale.

Une étude de la cinétique de déprotection des esters boroniques de la sonde **1,4-bis-DBN** par H_2O_2 a ensuite été menée avec un suivi par spectroscopie UV-vis. Pour réaliser les mesures sur un grand nombre d'expériences en parallèle nous avons utilisé un lecteur UV-vis de microplaque à 96 puits. Nous avons ainsi examiné la cinétique à différentes concentration en H_2O_2 , chaque expérience ayant été conduite en triplica pour vérifier la reproductibilité. Le suivi s'effectue à 290 nm , une longueur d'onde qui permet de sélectivement suivre la disparition de la sonde **1,4-bis-DBN** en fonction du temps (FIGURE 3.20). Afin de s'affranchir de la variation d'absorbance liée à l'hydrolyse de la sonde, l'ajout d' H_2O_2 n'est réalisé qu'après avoir attendu une quinzaine de minutes. Ces expériences mettent en évidence une conversion de la sonde qui va au-delà d'une stœchiométrie de conversion 1:1, indiquant qu'un processus de type catalytique est à l'œuvre. Cela conduit d'ailleurs à détecter seulement 0,1 équivalent ($5 \mu\text{M}$) d'eau oxygénée en moins de 20 minutes. Les courbes cinétiques sont rassemblées sur la FIGURE 3.20 (chaque courbe correspond à la moyenne des 3 répliques).

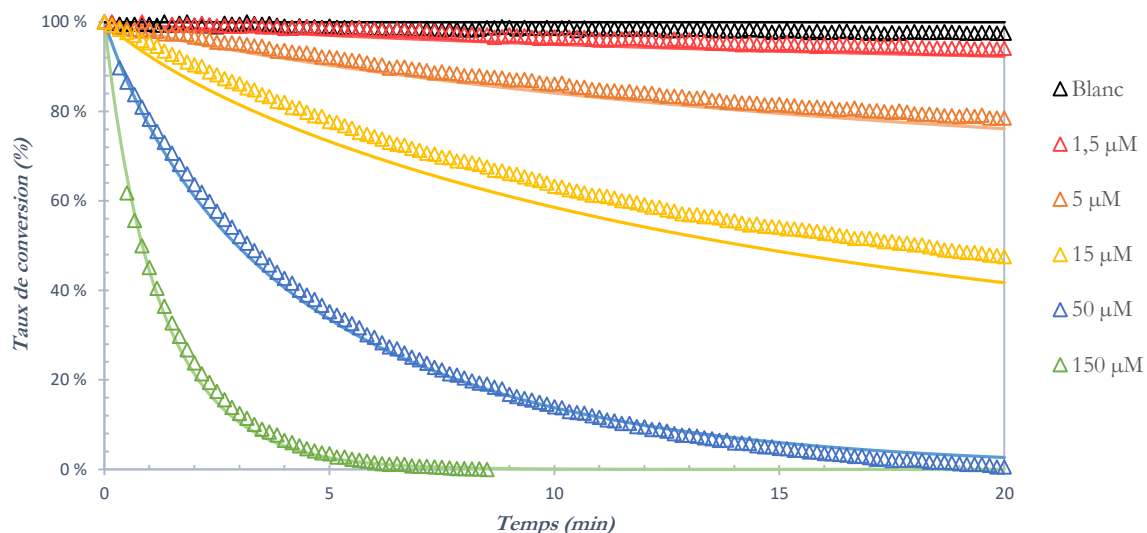
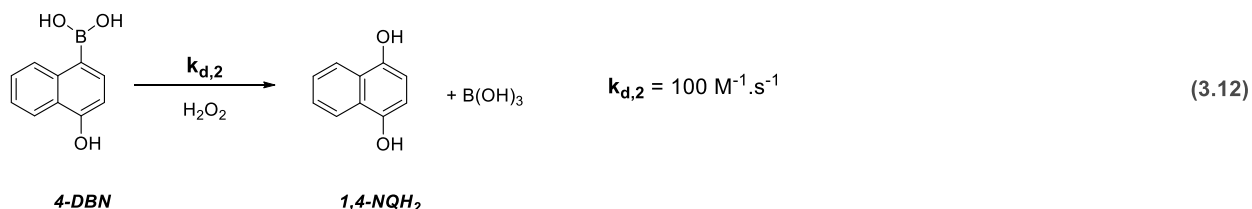
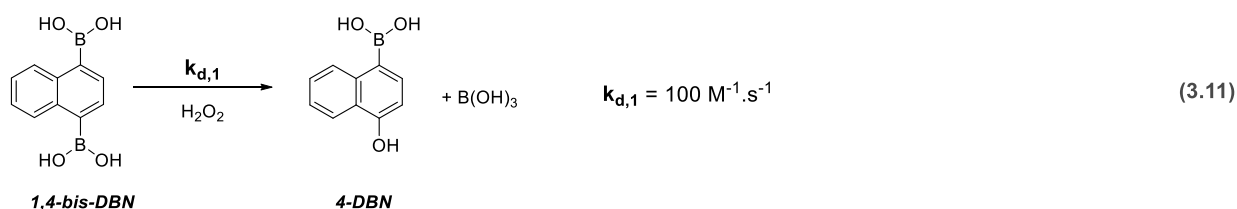
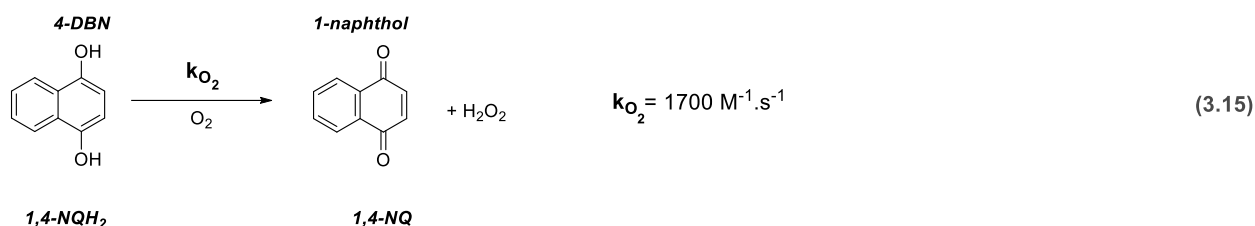
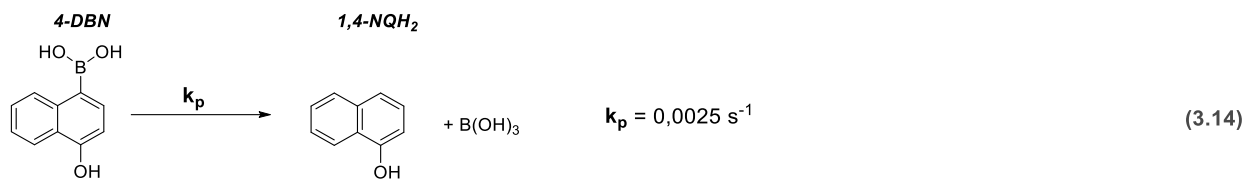
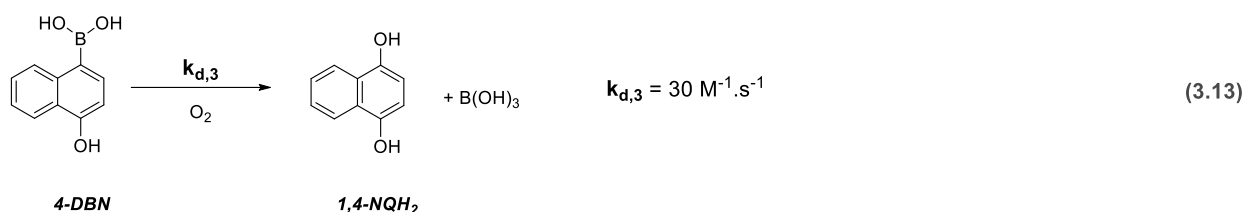


FIGURE 3. 20 Suivi cinétique sur 20 minutes par spectroscopie UV-vis à 290 nm, à température ambiante, de la conversion de la sonde 1,4-bis-DBN (50 μM) en fonction des différentes concentrations en H_2O_2 (triangles) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA et modélisation *via* le logiciel COPASI (trait plein).

Afin de vérifier que les cinétiques observées sont bien le fruit du mécanisme catalytique tel que proposé **FIGURE 3.17**, nous avons procédé à des expériences de simulations numériques de ce mécanisme à l'aide du logiciel COPASI. Pour cela nous avons considéré le schéma réactionnel suivant où l'ensemble des réactions sont considérées irréversibles :





Pour chacune des réactions de déprotection par H_2O_2 de chacun des esters boroniques (réactions 3.11 et 3.12) nous avons considérés une constante de vitesse identique et égale à celle mesurée pour le **4-DBN**. Afin de rendre compte dans des conditions de faibles concentrations en H_2O_2 (conditions sous-stœchiométriques) de l'instabilité du mono-ester boronique **4-DBN** et donc de sa conversion partielle en **1,4-NQH₂** via un clivage oxydatif, nous avons représenté cela par une simple réaction bi-moléculaire entre O_2 et le **4-DBN** (réaction 3.13). Nous avons également tenu compte de la réaction de protodéboronation du **4-DBN** via la réaction 3.14, cette dernière ne pouvant être négligée. Enfin la réaction de production d' H_2O_2 à partir de l'auto-oxydation de la **1,4-NQH₂** par O_2 (réaction 3.15) est considérée ici avec une stœchiométrie de 1, même si cela ne représente pas forcément la réalité.

La valeur de la constante cinétique de la réaction 3.14 est celle que nous avons déterminée précédemment avec le mono-ester **4-DBN**, tandis que la constante cinétique d'auto-oxydation a été estimée à partir du courant catalytique de plateau mesuré électrochimiquement en présence d' O_2 et de **1,4-NQ** (FIGURE 3.21 DE GAUCHE). Le courant catalytique de plateau est défini par la relation suivante⁹³ :

$$i_{\text{plateau}} = nFSC_{\text{cat}}\sqrt{D_{\text{cat}}k_{O_2}C_{O_2}} \quad (3.16)$$

avec i_{plateau} , le courant de plateau (A)

n , le nombre d'électrons impliqués dans la réduction du médiateur (ici $n = 2$)

F , la constante de Faraday ($96500 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)

S , la surface de l'électrode ($0,07 \text{ cm}^2$)

C_{cat} , la concentration en 1,4-naphthoquinone ($50 \times 10^{-9} \text{ mol.cm}^{-3}$)

D_{cat} , la constante de diffusion de la 1,4-naphthoquinone ($5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$)

k_{O_2} , la constante d'auto-oxydation de la 1,4-naphthohydroquinone ($\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)

C_{O_2} , la concentration en oxygène dissous ($2,5 \times 10^{-4} \text{ M}$ à 1 atm et 25°C)

Ainsi, la constante d'auto-oxydation, se calcule selon $k_{O_2} = \left(\frac{i_{plateau}}{nFSC_{cat}} \right)^2 \times \frac{1}{D_{cat}C_{O_2}}$.

Finalement, seule la constante $k_{d,3}$ a été ajustée dans les simulations pour rendre compte au mieux des résultats expérimentaux. Dans nos conditions, on a considéré la concentration en oxygène dissous à une valeur de $250 \mu\text{M}$, ce qui conduit à une vitesse de déprotection par O_2 légèrement plus rapide ($0,0075 \text{ s}^{-1}$) que la réaction avec H_2O_2 à 1 équivalent ($0,005 \text{ s}^{-1}$) ou que la réaction de protodéboronation ($0,0025 \text{ s}^{-1}$). On peut ainsi déduire qu'à faibles concentrations en H_2O_2 la voie majoritaire de transformation du **4-DBN** en **1,4-NQH₂** est la réaction de déprotection du **4-DBN** en présence d' O_2 et que c'est bien cette réaction qui autorise un schéma réactionnel catalytique. Ces valeurs de constantes cinétiques confirment par ailleurs le rendement en 1,4-naphthoquinone par rapport au 1-naphthol (75/25) obtenu précédemment *via* notre étude spectroscopique de l'instabilité du **4-DBN** en absence d' H_2O_2 .

De la même façon, si l'on caractérise par électrochimie (voltammétrie cyclique) le contenu d'une solution de **4-DBN** ayant (ou pas) été mise à régir pendant 2 heures avec 1 équivalent d' H_2O_2 (FIGURE 3.21 DE DROITE), nous avons bien la présence d'un courant de réduction catalytique d' O_2 qui signe la transformation du **4-DBN** en **1,4-NQ** et cela aussi bien en présence comme en absence de d' H_2O_2 . Ce résultat confirme bien la transformation relativement rapide du **4-DBN** en **1,4-NQ** et 1-naphthol.

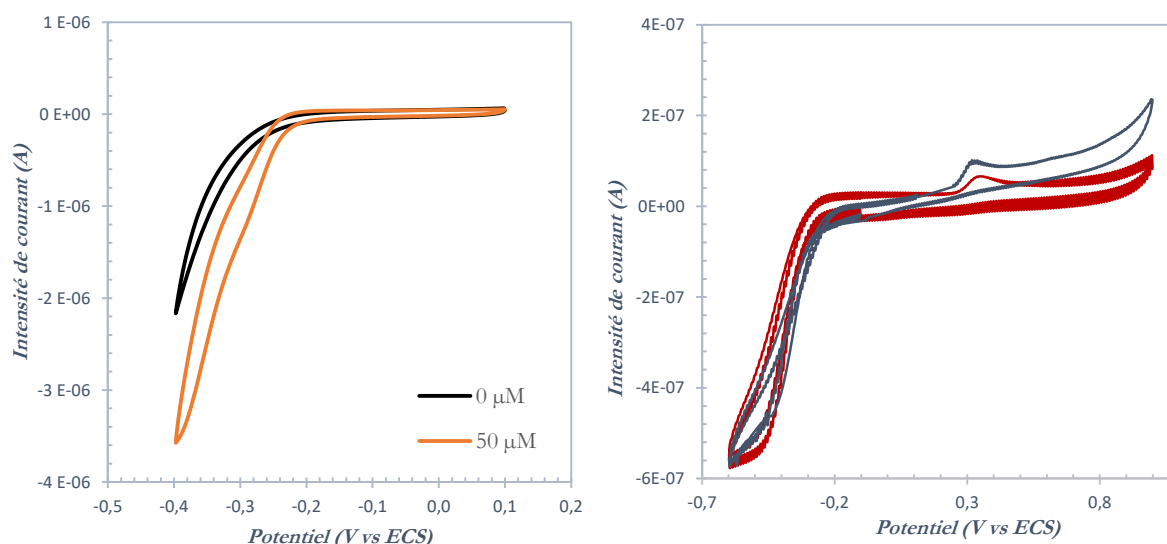


FIGURE 3. 21 A gauche : Voltammogrammes de la 1,4-NQ à différentes concentrations dans un tampon Tris non dégazé à température ambiante (100 mM à pH 8,5). Electrode de travail : disque de carbone vitreux (0,071 cm²). Vitesse de balayage : 10 mV.s⁻¹.

A droite : Voltammogrammes de la sonde 4-DBN (50 μM) après 2 heures de réaction à température ambiante en présence (courbe rouge) ou en absence (courbe grise) d'un équivalent d'H₂O₂ dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5). Electrode de travail : carbone sérigraphiée (0,096 cm²). Vitesse de balayage 100 mV.s⁻¹.

Indépendamment des mesures cinétiques par spectroscopie UV-vis, nous avons également examiné par spectroscopie de fluorescence la transformation de 50 μM de **1,4-bis-DBN** en **1,4-NQ** par l'ajout d'un équivalent d'eau oxygénée (**FIGURE 3.22**).

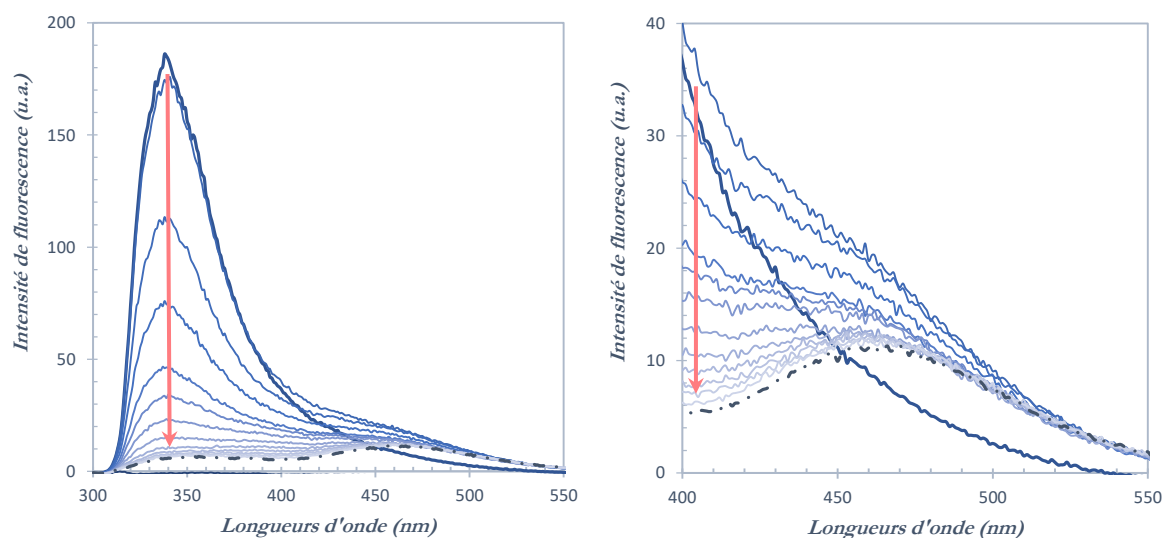


FIGURE 3. 22 A gauche : Suivi par fluorimétrie ($\lambda_{\text{ex}} = 285 \text{ nm}$) à température ambiante de l'évolution temporelle enregistrée toutes les minutes (sur 20 minutes) du spectre du 1,4-bis-DBN ($50 \mu\text{M}$) en présence d'un équivalent en H_2O_2 ($50 \mu\text{M}$) dans un tampon Tris (100 mM à $\text{pH } 8,5$) contenant $10 \mu\text{M}$ d'EDTA. Le spectre en pointillé correspond au spectre final.

A droite : Zoom sur l'intervalle 400-550 nm permettant de visualiser l'apparition de 1-naphthol en concomitance avec la conversion du 1,4-bis-DBN en 1,4-NQ par H_2O_2 .

Comme attendu, dès l'ajout d' H_2O_2 , l'intensité de fluorescence de la sonde diminue au cours du temps. Grâce à la fluorescence, il est possible de suivre sélectivement les trois espèces que sont la sonde **1,4-bis-DBN**, l'intermédiaire **4-DBN** et le produit de protodéboronation **1-naphthol** puisque chacune de ces molécules émet à des longueurs d'onde distinctes (338 nm pour la sonde **1,4-bis-DBN**, 434 nm pour le **4-DBN** et 466 nm pour le 1-naphthol). Néanmoins, comme le montre la **FIGURE 3.22**, seule la disparition de la sonde **1,4-bis-DBN** et apparition du 1-naphthol peuvent être clairement visualisés, l'apparition de la sonde **4-DBN** à 434 nm étant plus difficile à révéler. Ce résultat est en accord avec la simulation numérique des cinétiques de chacune des espèces selon le schéma réactionnel proposé avec son jeu de constantes cinétiques (**FIGURE 3.23**). La simulation prédit en effet une apparition transitoire de l'intermédiaire **4-DBN** avant d'être totalement transformé en 1-naphthol et 1,4-naphthoquinone.

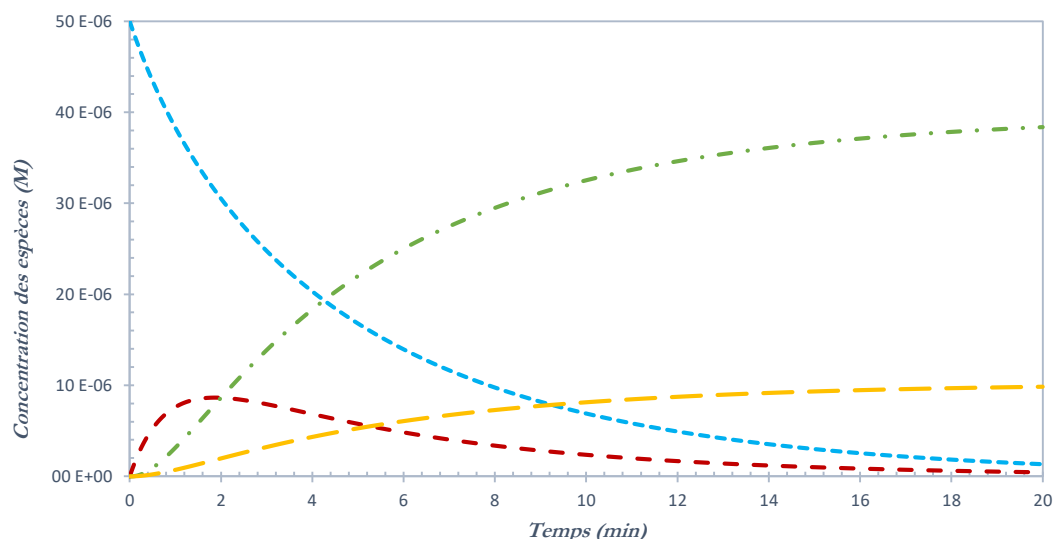


FIGURE 3. 23 Simulation numérique *via* le logiciel COPASI de la concentration de chacune des espèces 1,4-bis-DBN (en bleu), 4-DBN (en rouge), 1-naphthol (en jaune) et 1,4-NQ (en vert) au cours d'une réaction de 50 μM de 1,4-bis-DBN avec 50 μM d' H_2O_2 . La simulation est réalisée en prenant en compte les réactions 3.11 à 3.15 et leur jeu de constantes cinétiques telles que nous les avons estimées.

En conclusion, l'étude des résultats obtenus *via* les microplaques permet d'évaluer la sensibilité du système catalytique avec la sonde **1,4-bis-DBN**. Tout d'abord cette sonde montre une bien meilleure stabilité comparée au **4-DBN** étudié précédemment, puisqu'elle reste stable en solution aqueuse durant plusieurs heures et ne semble pas faire l'objet de réactions secondaires telles que la protodéboronation et la déprotection oxydative en présence d' O_2 . Ensuite, l'analyse cinétique du système *via* la simulation numérique a permis d'évaluer la valeur des constantes cinétiques contrôlant la vitesse de transformation catalytique de la sonde, c'est-à-dire k_{O_2} , $k_{\text{d},1}$ et $k_{\text{d},2}$. D'un côté le système est favorisé par une constante d'auto-oxydation de la **1,4-NQ** plutôt élevée ($1700 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) et de l'autre la vitesse de déprotection des esters ou acides boroniques par H_2O_2 qui s'avère relativement rapide dans nos conditions ($100 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$). Enfin, nous avons pris le parti d'utiliser l'instabilité même du **4-DBN** pour qu'un seul équivalent d' H_2O_2 soit nécessaire à la déprotection totale de la sonde diprotégée **1,4-bis-DBN**. Cette démarche permet ainsi d'établir un système d'amplification moléculaire catalytique de la détection d' H_2O_2 .

Pour le moment, la limite de détection est de 5 μM en H_2O_2 après 20 minutes de réaction, ce qui est tout de même meilleur que ce qui a été proposé par le groupe de Shabat à partir de l'utilisation d'une sonde pro-benzoquinone ester boronique (*cf* FIGURE 3.1), dont la limite de détection en H_2O_2 était de 500 μM après plusieurs centaines de minutes de réaction⁴³.

3.2.3 Stratégie 2 : monoprotection de la 1,4-naphthohydroquinone par un groupement benzyl ester boronique capable de s'auto-immoler en présence d'H₂O₂

La sensibilité particulière qu'a la molécule **4-DBN** à se déprotéger en présence d'O₂ mais aussi à se protodéboroner par rapport à d'autres composés esters boroniques aromatiques laisse supposer que cela pourrait être dû à un effet électronique particulier du OH en position *para* du groupement ester boronique sur la molécule **4-DBN**. En substituant chacun des groupements OH de la naphthohydroquinone par des esters boroniques nous avons d'ailleurs pu considérablement limiter ces réactions de protodéboronation et de déprotection oxydative *via* O₂. Forts de ce résultat, nous avons envisagé que nous pourrions également contourner ce problème en externalisant la fonction ester boronique hors du cycle aromatique de la naphthohydroquinone, en s'appuyant notamment sur une stratégie de réaction auto-immolante *via* l'introduction d'un groupement benzyl ester boronique sur l'une des fonctions OH de la **1,4-NQH₂**. La molécule pro-QH₂ **3.15** résultante, 4-((4-(4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzyl)oxy)naphthalen-1-ol, dénommée aussi **4-sis-DBN**, en présence d'H₂O₂ devrait donc pouvoir conduire au schéma réactionnel catalytique de la FIGURE 3.24.

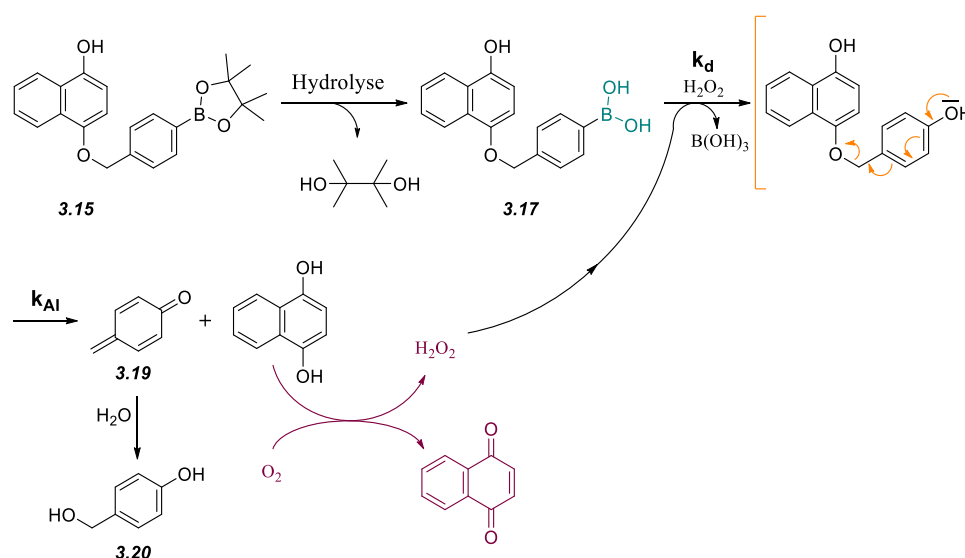


FIGURE 3. 24 Mécanisme réactionnel supposé de la sonde 4-sis-DBN

D'un point de vue mécanistique, l'ajout d'eau oxygénée provoque la rupture oxydante de la liaison C-B, formant un groupe mésomère fortement donneur capable *via* une 1,6-élimination de libérer la naphthohydroquinone ainsi qu'une quinone méthide **3.19** (FIGURE 3.24).

Afin de vérifier la stabilité de la molécule **4-sis-DBN** en phase aqueuse, nous l'avons suivie par spectroscopie UV-vis en fonction du temps dans nos conditions habituelles de 50 μM dans un tampon Tris à pH 8,5 contenant 10 μM d'EDTA (FIGURE 3.25).

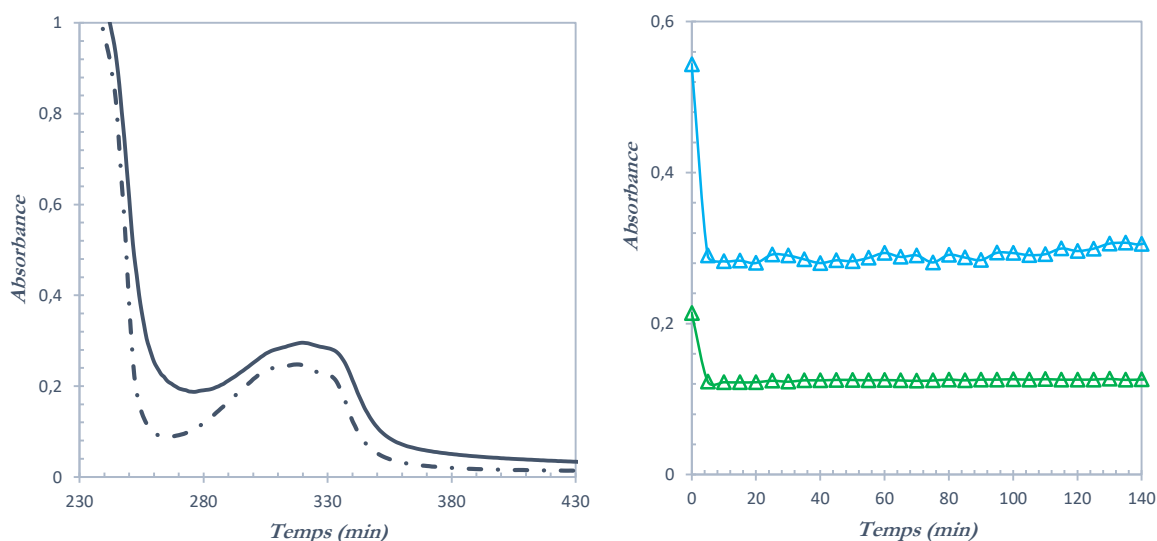


FIGURE 3. 25 A gauche : Spectres UV-vis à température ambiante de la sonde 4-sis-DBN (trait plein) et de son produit d'hydrolyse (pointillé) (50 μM) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA.

A droite : Suivi cinétique sur 140 minutes par spectroscopie UV-vis à 251 nm (en bleu) et 340 nm (en vert), à température ambiante, de l'évolution de la sonde 4-sis-DBN (50 μM) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA.

Comme pour la molécule diprotégée **1,4-bis-DBN**, nous observons aux temps courts une rapide diminution d'absorbance sur une majeure partie du spectre comprise entre 251 et 340 nm, caractéristique de l'hydrolyse rapide en phase aqueuse de la fonction pinacol de l'ester boronique. Après quelques minutes, le spectre reste stable pendant plusieurs heures, indiquant une grande stabilité de la molécule ainsi hydrolysée sous forme d'acide boronique **3.12**. Dès lors que la molécule **3.12** s'avère stable en solution aqueuse à pH 8,5, nous avons vérifié sa réactivité vis-à-vis d' H_2O_2 . Un équivalent d'eau oxygénée a été ajouté dans un milieu contenant 50 μM de composé **3.12** et l'évolution suivie par spectroscopie UV-vis (FIGURE 3.26). L'évolution spectrale centrée sur deux points isobestiques à 285 et 340 nm met en évidence une transformation de la sonde en une espèce dont le spectre en fin de réaction est très proche de celui de la 1,4-naphthoquinone (maximum d'absorbance à 262 et 340 nm).

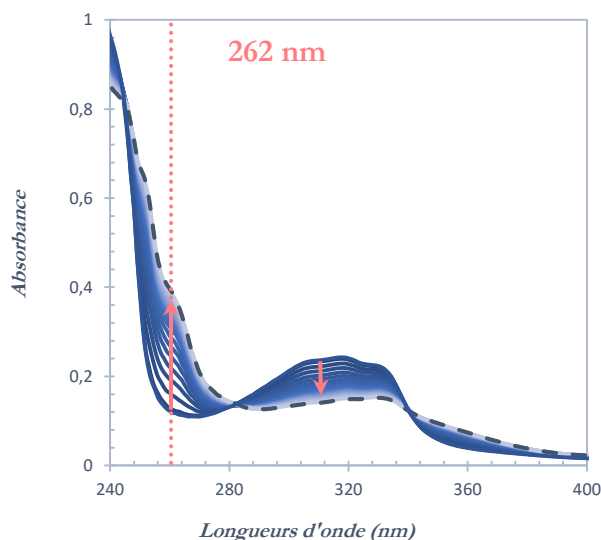


FIGURE 3. 26 Suivi par spectroscopie UV-vis à température ambiante de l'évolution temporelle enregistrée toutes les 5 minutes (sur 85 minutes) du spectre du 4-sis-DBN (50 μM) en présence d'un équivalent d' H_2O_2 (50 μM) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA. Le spectre en pointillé représente celui de l'espèce finale.

Afin de suivre sélectivement l'apparition de la **1,4-NQ** sans être affecté par l'absorbance du produit de départ et des autres sous-produits de la réaction, une longueur d'onde de 262 nm a été choisie. Des expériences de suivi cinétique de la conversion de la sonde **3.15** en présence de différentes concentrations en eau oxygénée ont alors été réalisées à l'aide du lecteur UV-vis de microplaque (FIGURE 3.27).

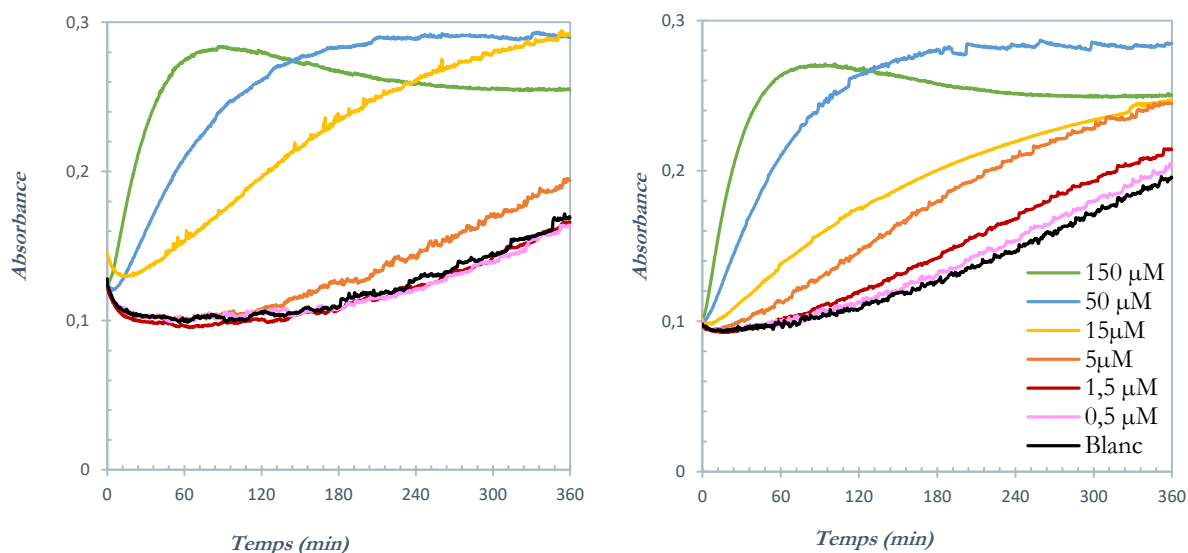
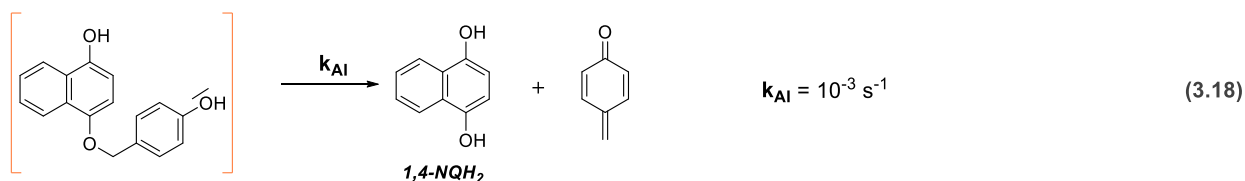
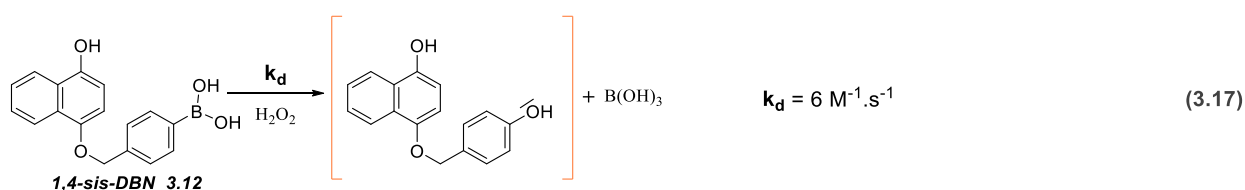


FIGURE 3. 27 Suivi cinétique par spectroscopie UV-vis à 262 nm sur 6 heures de la conversion de la sonde 1,4-bis-DBN (50 μM) en fonction de différentes concentrations en H_2O_2 à température ambiante dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA. A gauche : avant recristallisation de la sonde. A droite : après recristallisation.

Les augmentations d'absorbance à 262 nm confirment la formation de 1,4-naphthoquinone suite à l'ajout d' H_2O_2 (passage de 0,1 à 0,3 u.a.), ce qui est plus faible que dans une cuvette de 1 cm pour la simple raison que sur microplaque la longueur du trajet optique est moins élevée (0,596 cm). Les vitesses initiales de variation d'absorbance sont également proportionnelles à la concentration en H_2O_2 . Dans les conditions testées, la détection d'eau oxygénée n'est possible que jusqu'à 5 μM car les plus faibles concentrations sont confondues avec le signal issu d'une réaction non-spécifique en l'absence d' H_2O_2 . Il faut par ailleurs noter que les variations d'absorbance convergent vers une amplitude maximale de 0,2 u.a. ce qui équivaut à une conversion totale de la sonde. Comme cela reste valable pour des concentrations sous-stœchiométriques d' H_2O_2 , cela permet de conclure sur la validité d'un processus réactionnel catalytique. La limite de détection (1,5 μM soit 0,03 équivalent) a pu être améliorée suite à la purification par recristallisation de la sonde. Les cinétiques de réaction avec H_2O_2 sont cependant relativement lentes par rapport aux cinétiques obtenues avec le **1,4-bis-DBN** (FIGURE 3.20). La vitesse d'apparition de la 1,4-naphthoquinone étant dépendante de la concentration en H_2O_2 , on peut penser que c'est bien la déprotection oxydante de la fonction ester boronique et non pas l'étape de 1,6-élimination qui suit qui est limitante. Cette étape de 1,6-élimination a d'ailleurs été estimée à $k_{\text{AI}} = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, une valeur qui se situe dans la gamme de vitesse généralement observée pour des réactions auto-immolantes du même type^{94,95}. Nous avons donc pu finalement attribuer cette réactivité beaucoup plus lente vis-à-vis d' H_2O_2 comme étant liée à la nature benzylique de

l'ester boronique, moins réactif que les dérivés naphthyls ester boroniques examinés précédemment. A partir des cinétiques de la **FIGURE 3.27** et du schéma réactionnel ci-après, une constante apparente $k_{d,app}$ de $6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ a pu être estimée. Cette constante est plus faible que pour le composé **1,4-bis-DBN**, ce qui est logique puisque cette fois-ci c'est un motif benzénique qui porte l'acide boronique. D'ailleurs, étant donné qu'il y a un groupement alkyl faiblement donneur en *para* de l'acide boronique, la constante est supérieure à celle d'un acide boronique *para*-nitrobenzène mais inférieure à un acide boronique *para*-aniline (*cf* **TABLEAU 3.3**). Les résultats de la simulation numérique sont présentés sur la **FIGURE 3.28**.



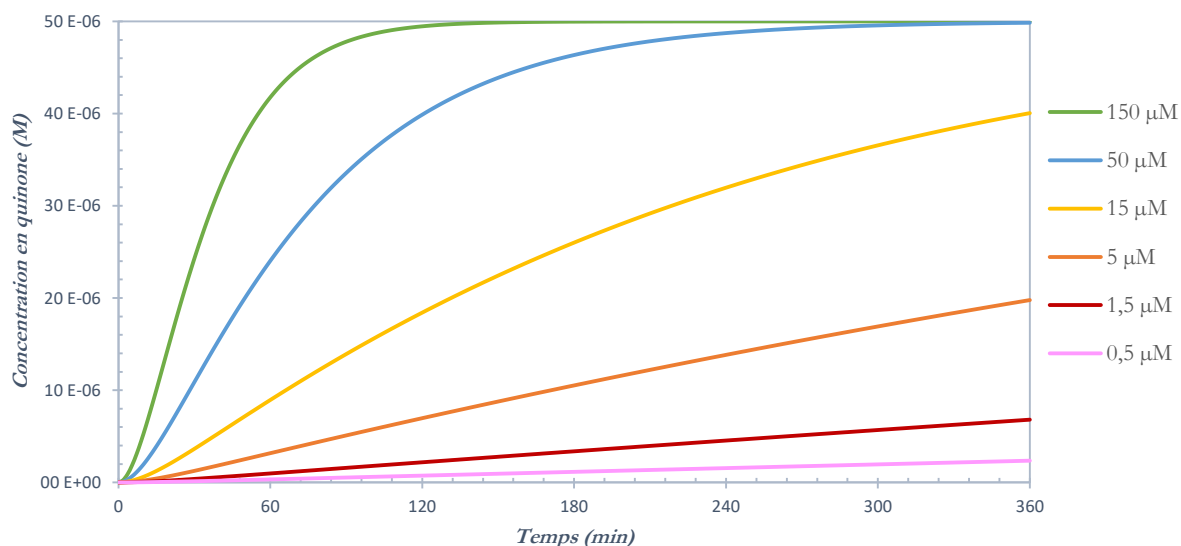


FIGURE 3. 28 Simulation numérique *via* le logiciel COPASI du système catalytique pour la sonde 4-sis-DBN **3.15** (50 µM) à différentes concentrations en H₂O₂. La simulation est réalisée en prenant en compte les réactions 3.15, 3.17 et 3.18 et leur jeu de constantes cinétiques telles que nous les avons estimées.

Les cinétiques obtenues par simulation numérique du système catalytique avec la sonde **4-sis-DBN** reflètent approximativement ce que nous obtenons expérimentalement. Elles reproduisent d'ailleurs assez bien les inflexions de départ observées. En revanche, elles ne rendent pas compte de la présence d'une réaction non-spécifique, ni non plus de la chute d'absorbance observée à forte concentration en H₂O₂ une fois que toute la sonde est transformée.

Comme précédemment avec le composé **1,4-bis-DBN**, cette nouvelle molécule pro-QH₂ avec un bras auto-immolant est *a priori* intéressante de par sa bonne stabilité, quand bien même elle reste peu performante pour la détection d'H₂O₂ en raison d'une réactivité moins bonne vis-à-vis de cette dernière. Nous l'avons néanmoins retenue dans la suite du travail afin de l'examiner dans un schéma réactionnel de type auto-catalytique.

3.2.4 Stratégie 3 : utilisation d'une 1,4-benzohydroquinone monoprotégée par un ester boronique

Dans cette dernière approche nous avons cherché à substituer le motif naphthohydroquinone par un motif benzoquinone, notamment une 2,6-diméthyle-benzohydroquinone, dont le potentiel formel de réduction est $E^{0'} = -80$ mV à pH 7,0. Bien que ce potentiel formel soit plus élevé que celui d'une naphthohydroquinone, il reste encore suffisamment bas (grâce aux groupements méthyles donneurs) pour espérer avoir une réactivité d'auto-oxydation avec O₂ suffisante. L'ester

boronique 2,6-diméthyl-4-(4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phénol ou **2,6-diMe-4-DBP** est un dérivé commercial de cette benzohydroquinone. Le schéma réactionnel catalytique que l'on peut écrire avec ce composé en présence d'H₂O₂ est le suivant :

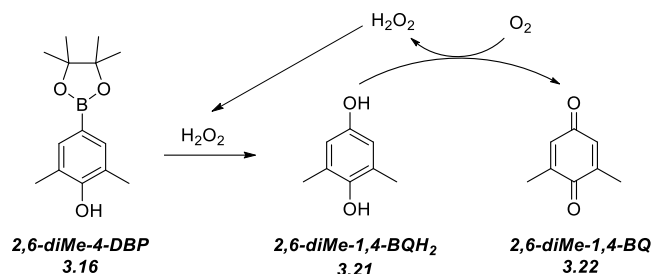


FIGURE 3. 29 Mécanisme réactionnel supposé de la sonde 2,6-diMe-4-DBP

Nous avons, comme pour les autres composés, d'abord cherché à vérifier la stabilité du **2,6-diMe-4-DBP** par spectroscopie UV-vis (FIGURE 3.30). La sonde en phase aqueuse présente deux maxima d'absorbance à 245 et 270 nm. A l'instar des précédentes sondes, dès sa dissolution dans le tampon la molécule **2,6-diMe-4-DBP** subit une réaction rapide d'hydrolyse de l'ester pinacolique, puis l'espèce acide boronique hydrolysée reste stable pendant plus d'une heure.

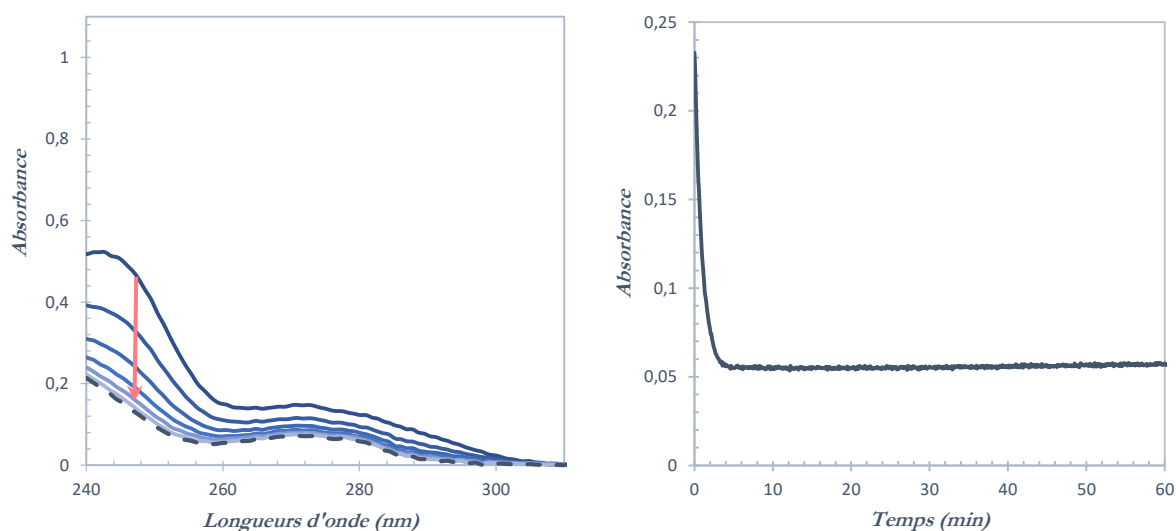


FIGURE 3.30 A gauche : Suivi temporel par spectroscopie UV-vis à température ambiante enregistré toutes les 30 secondes (sur 60 minutes) de l'hydrolyse de la sonde 2,6-diMe-4-DBP (50 μM) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA. Le spectre en pointillé représente celui de l'espèce finale.

A droite : Suivi cinétique sur 60 minutes par spectroscopie UV-vis à 255 nm, à température ambiante, de l'évolution de la sonde 2,6-diMe-4-DBP (50 μM) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA.

Ce n'est qu'après l'ajout d'eau oxygénée que l'absorbance à 280 nm décroît au profit d'un intense pic d'absorbance qui croît à 258 nm, laissant supposer la transformation de la **2,6-diMe-4-DBP** en 2,6-diméthyle-1,4-benzohydroquinone **3.21**, laquelle s'auto-oxyde spontanément en présence d'oxygène moléculaire pour former la quinone correspondante **3.22** et H_2O_2 (FIGURE 3.31).

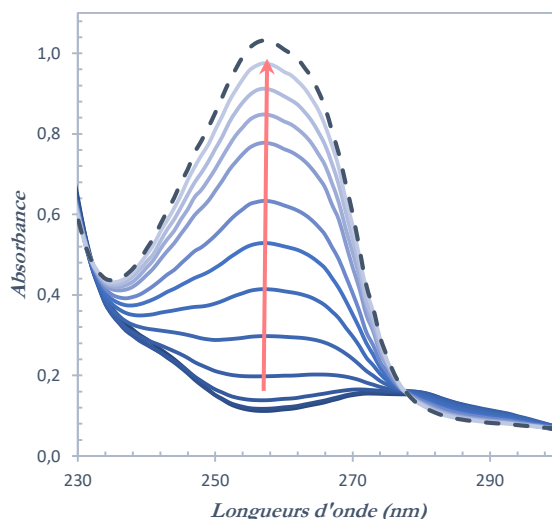


FIGURE 3. 31 A droite : Suivi par spectroscopie UV-vis à température ambiante de l'évolution temporelle enregistrée toutes les 5 minutes (sur 30 minutes) de la sonde 2,6-diMe-4-DBP (50 μM) en présence d'un équivalent d' H_2O_2 (50 μM) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA. Le spectre en pointillé représente celui de l'espèce finale (la 2,6-diméthyle-1,4-benzoquinone).

Le suivi de l'augmentation d'absorbance à 258 nm en fonction de la concentration en H_2O_2 permet donc d'envisager d'évaluer la cinétique de l'étape cinétiquement déterminante du schéma réactionnel catalytique présenté **FIGURE 3.29**. Pour cela des concentrations variant de 1 à 0,01 équivalent en H_2O_2 ont été mises à réagir avec 50 μM de **2,6-diMe-4-DBP** et suivies à 258 nm à l'aide d'un lecteur UV-vis de microplaque. Les résultats sont présentés **FIGURE 3.32**.

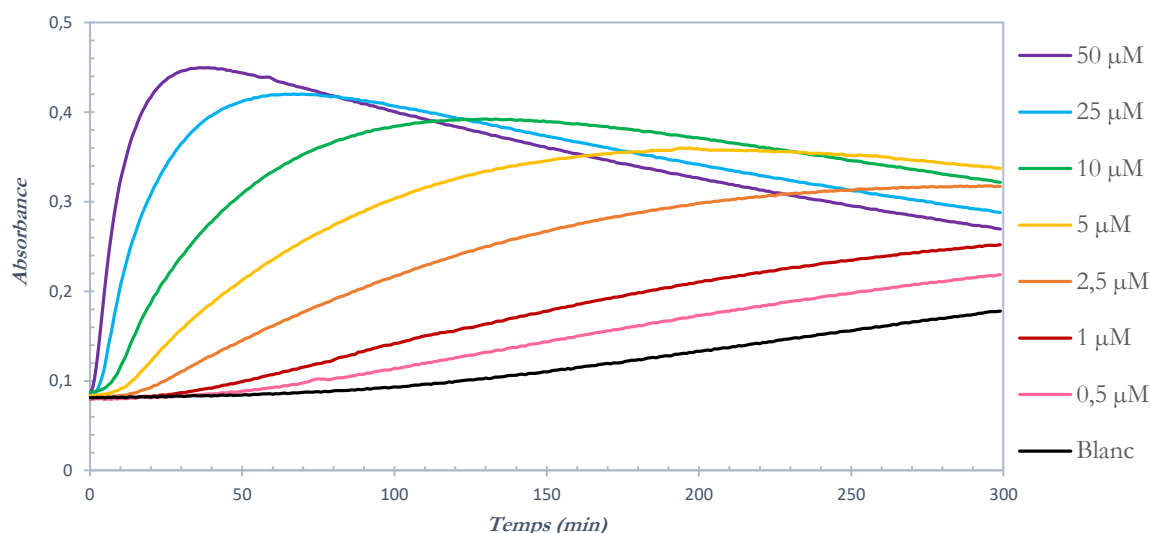


FIGURE 3. 32 Suivi cinétique sur 5 heures par spectroscopie UV-vis à 258 nm, à température ambiante, de la conversion de la sonde 2,6-diMe-4-DBP (50 μM) en fonction de différentes concentrations en H_2O_2 dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA.

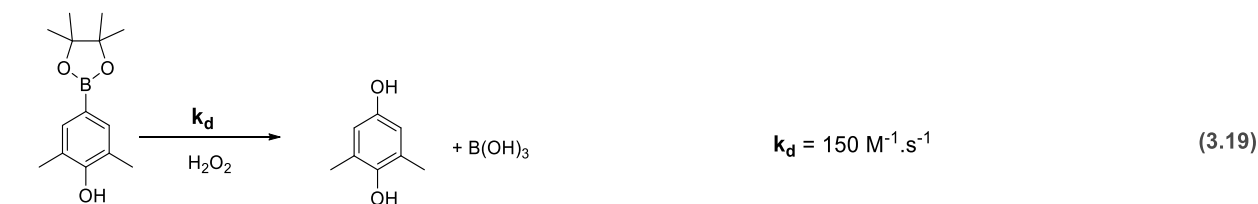
Les cinétiques sont bien dépendantes de la concentration en eau oxygénée puisque plus il y a d' H_2O_2 au départ, plus la cinétique d'apparition de l'espèce quinone est rapide. A noter également qu'une certaine latence est observée au temps court. Par ailleurs, en l'absence d' H_2O_2 une lente augmentation d'absorbance est observée, indiquant la transformation non-spécifique de la sonde en benzoquinone sur le long terme. Les données indiquent qu'il est possible de détecter facilement des concentrations en H_2O_2 jusqu'à 0,5 μM .

L'ensemble des courbes cinétiques permet également d'établir que :

- la quantité de benzoquinone formée en fin de réaction à partir de l'ester boronique est totale pour des ajouts sous-stœchiométriques en H_2O_2 , ce qui démontre que l'on a bien affaire à une réaction catalytique dans laquelle H_2O_2 joue le rôle de catalyseur.
- la décroissance de l'intensité d'absorbance à 258 nm en fin de réaction témoigne de la transformation de la molécule 2,6-diméthylbenzoquinone **3.14** en une autre espèce. Ce fait n'est pas surprenant puisque plusieurs exemples de la littérature démontrent une instabilité des quinones à forte concentration en H_2O_2 conduisant généralement à l'époxydation du cycle aromatique ou la condensation d'une quinone sur elle-même⁹⁶⁻⁹⁸.

Afin de pouvoir rendre compte de l'allure des cinétiques observées à partir du schéma réactionnel proposé **FIGURE 3.29**, nous avons cherché à simuler numériquement les cinétiques en

considérant la série de réactions suivantes, incluant deux voies de dégradation de la benzoquinone.



2,6-diMe-4-BQ

Les réactions de dégradation de la **2,6-diMe-1,4-BQ** ont été intégrées à la simulation afin de tenter de reproduire au mieux les comportements expérimentaux (U et V sont des produits de dégradation non déterminés). La première réaction de dégradation de la benzoquinone *via* l'excès d'eau oxygénée généré *in situ* par le processus catalytique. La cinétique de cette réaction a été estimée à $0,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à partir du suivi de l'évolution spectrale de la quinone mise en présence de différentes concentrations d'eau oxygénée. La seconde voie de dégradation correspond à l'instabilité intrinsèque de la benzoquinone une fois solubilisée dans un tampon Tris pH 8,5, instabilité que nous avons d'ailleurs pu indépendamment estimer à partir de solutions de benzoquinone à différentes concentrations (constante cinétique de $0,3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Les simulations nous ayant permis de reproduire au plus près les cinétiques expérimentales de la **FIGURE 3.32** sont reportées **FIGURE 3.33**. C'est en ajustant les deux paramètres k_d et k_{O_2} à une valeur de $150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ que nous avons pu obtenir par simulation la meilleure représentation des courbes expérimentales de la **FIGURE 3.32**. La valeur de k_d est en réalité plus facile à extraire à partir des courbes obtenues à forte concentrations en H_2O_2 et la constante k_{O_2}

inversement plus facile à déduire des cinétiques obtenues à faibles concentrations en H_2O_2 (c'est en effet à faibles concentrations en H_2O_2 que l'on finit par être cinétiquement contrôlé par la réaction 3.20). La valeur de la constante k_d est finalement assez semblable à celles des composés **4-DBN** 3.7 et **1,4-bis-DBN** 3.14, et significativement plus rapide que celle de la sonde **4-sis-DBN** 3.15. En revanche, une valeur de $8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ montre que la réaction d'auto-oxydation de la 2,6-diméthyle-1,4-benzoquinone est beaucoup plus lente que celle de la **1,4-NQ** ($8 \ll 1700 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$), ce qui est en accord avec un potentiel formel de réduction plus élevé pour cette benzoquinone que celui de la naphthoquinone.

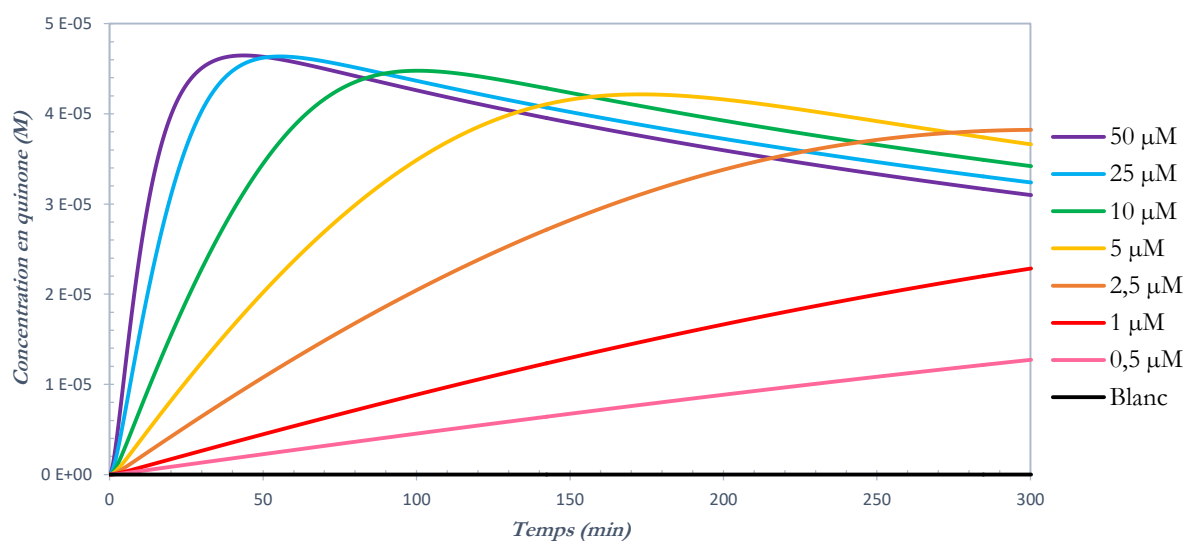


FIGURE 3. 33 Simulation numérique *via* le logiciel COPASI du système catalytique pour la sonde 2,6-diMe-4-DBP 3.16 (50 μM) à différentes concentrations en H_2O_2 . La simulation est réalisée en prenant en compte les réactions 3.19 à 3.22 et leur jeu de constantes cinétiques telles que nous les avons estimées.

Bien que possédant une réactivité d'auto-oxydation plus lente que les dérivés naphtho-hydroquinoniques, le composé **2,6-diMe-4DBP** autorise un processus catalytique de détection d' H_2O_2 . Il est également beaucoup plus stable que le **4-DBN** en raison d'une moins grande sensibilité à la protodéboronation et à une déprotection oxydative par O_2 . Ce composé reste donc un candidat intéressant pour sa mise en œuvre dans un processus d'amplification moléculaire auto-catalytique.

3.2.5 Conclusion sur les schémas catalytiques

Dans ce chapitre nous avons pu mettre en évidence à partir de différentes sondes pro-QH₂ la possibilité de détecter H₂O₂ à travers un processus d'amplification moléculaire catalytique mettant en jeu la génération d'un dérivé hydroquinonique à partir d'un ester boronique et une réaction d'auto-oxydation autorisant la régénération d'H₂O₂.

Nous avons pu à travers cette étude identifier/caractériser différents paramètres clefs intervenant dans le processus catalytique tels que la stabilité de la sonde et de la quinone générée, la vitesse de déprotection oxydative par H₂O₂ des acides ou esters boroniques, et la cinétique d'auto-oxydation de l'hydroquinone par O₂. Le cahier des charges qu'il est nécessaire de respecter si l'on veut améliorer les performances de détection d'H₂O₂ est donc :

- de synthétiser/utiliser une sonde qui soit stable dans nos conditions, et particulièrement qui soit insensible aux réactions de protodéboronation d'une part, afin de ne pas court-circuiter la production d'H₂O₂, et à la déprotection oxydative en présence d'O₂ d'autre part, dans le but d'éviter un déclenchement non-spécifique de la réaction catalytique.
- d'assurer une vitesse de déprotection oxydative par H₂O₂ suffisamment rapide en faisant attention à la nature du dérivé boronique choisi et du potentiel formel de la quinone qui lui est associé.
- de sélectionner une hydroquinone dont l'efficacité d'auto-oxydation par O₂ est grande et dont le rendement de production d'H₂O₂ est suffisamment important pour améliorer les performances du système.
- de pouvoir suivre facilement la conversion de la sonde ou l'apparition du produit quinonique *via* une signature spectroscopique UV-vis ou de fluorescence suffisamment sensible et sélective.

La suite de ces travaux de thèse consistera à s'appuyer sur ces approches d'amplification moléculaire catalytique pour aller vers des approches d'amplification moléculaire auto-catalytique.

3.3 Détection d'eau oxygénée *via* une réaction d'amplification moléculaire auto-catalytique

Etant donné l'efficacité relative du système précédent où l'amplification moléculaire repose sur une régénération de la molécule cible à détecter, nous avons cherché à améliorer cette approche en faisant en sorte de la rendre auto-catalytique grâce à l'introduction d'une boucle de recyclage redox enzymatique convertissant Q en QH₂ selon le schéma réactionnel global suivant :

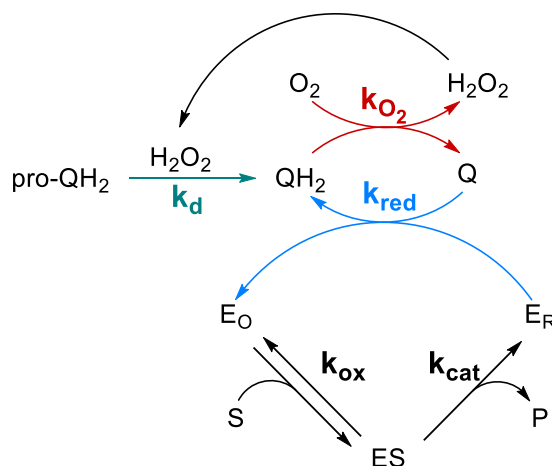
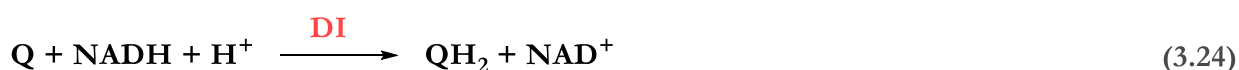


FIGURE 3. 34 Mécanisme réactionnel pour le système pro-QH₂/H₂O₂ en présence d'oxygène moléculaire, mettant en jeu le recyclage redox enzymatique de Q en QH₂

Pour assurer de manière efficace la réduction de Q en QH₂, nous avons envisagé de tirer parti des deux réductases suivantes : la PQQ-dépendante glucose déshydrogénase (PQQ-sGDH) et la diaphorase (DI). Chacune de ces enzymes a la particularité de pouvoir catalyser la réduction d'un grand éventail de molécules redox dont de nombreuses quinones. La PQQ-dépendante glucose déshydrogénase a été décrite en détail dans le **chapitre 2** et nous ne reviendrons pas ici sur son mode de fonctionnement, mais juste sur la réaction globale donnée par :



La diaphorase est une oxydoréductase ayant un centre redox flavinique (FMN) lié de façon covalente au site actif. C'est une enzyme capable de catalyser, tout comme la PQQ-sGDH, la réduction à deux électrons d'un large panel d'accepteurs d'électrons, dont de nombreuses quinones, *via* son substrat NADH selon la réaction globale suivante :



Les mécanismes ping-pong de ces deux enzymes ont été largement étudiés au laboratoire^{55,60,99}. La vitesse de réduction d'un co-substrat (ici il s'agit en particulier d'un co-substrat quinonique Q), est reliée aux paramètres cinétiques de l'enzyme (k_{cat} , k_{red} et k_{ox} cf **FIGURE 3.34**) selon l'équation cinétique suivante :

$$v_0 = -\left(\frac{d[Q]}{dt}\right)_{t=0} = \frac{[E]}{\frac{1}{k_{cat}} + \frac{1}{k_{ox}[S]} + \frac{1}{k_{red}[Q]}} \quad (3.25)$$

A forte concentration en substrat, l'équation précédente peut être simplifiée selon :

$$v_0 = -\left(\frac{d[Q]}{dt}\right)_{t=0} = \frac{[E]}{\frac{1}{k_{cat}} + \frac{1}{k_{red}[Q]}} \quad (3.26)$$

Le **TABLEAU 3.4** regroupe quelques données caractéristiques de ces enzymes.

TABLEAU 3. 4 Données caractéristiques des deux couples enzyme/substrat choisis : potentiel formel de réduction des médiateurs à pH 8,5, constantes cinétiques (k_{ox} , k_{cat} et k_{red}), gammes de pH et de température.

Couple	Cofacteur	Co-substrat	E^0 (médiateur) (mV vs SCE)	k_{ox} ($M^{-1}.s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	k_{red} ($M^{-1}.s^{-1}$)	pH	T (°C)
PQQ-sGDH / Glucose	PQQ	Fc-MeOH ^a	190	2×10^7	1500	10^8	7,5 - 9,5	20 – 40
		ClQ ^b	-27			$1,5 \times 10^9$		
DI / NADH	FMN	2-Me-NQ ^c	-340	2×10^7	1200	$1,5 \times 10^9$	7,0 - 9,0	25 - 37
		2,6-AQS ^d	-495			2×10^6		

Avec ^aferrocène méthanol ^bchloro-*para*-benzoquinone, ^c2-méthyl-1,4-naphthoquinone et ^d2,6-*para*-anthraquinone disulfonatée.

A partir des caractéristiques cinétiques connues, par exemple pour la diaphorase, et des constantes cinétiques que nous avons pu déterminer avec certaines sondes pro-QH₂ vis-à-vis d'H₂O₂ mais aussi vis-à-vis de l'auto-oxydation par O₂ de certaines quinones QH₂, nous avons cherché à voir dans quelle mesure le mécanisme réactionnel **FIGURE 3.34** pouvait être intéressant pour détecter H₂O₂. Pour cela, nous avons simulé avec le logiciel COPASI la cinétique de consommation de la sonde pro-QH₂ pour le jeu de valeurs de constantes cinétiques suivantes :

$$k_d = 100 M^{-1}.s^{-1} \quad (3.27)$$

$$k_{O_2} = 1700 M^{-1}.s^{-1} \quad (3.28)$$

$$k_{ox} = 2 \times 10^7 M^{-1}.s^{-1} \quad (3.29)$$

$$k_{\text{cat}} = 1200 \text{ s}^{-1} \quad (3.30)$$

$$k_{\text{red}} = 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \quad (3.31)$$

Les simulations pour différentes concentrations en H_2O_2 et des concentrations fixes en enzyme (10 nM), substrat (250 μM), O_2 (250 μM) et pro-QH₂ (50 μM) sont reportées sur la FIGURE 3.35.

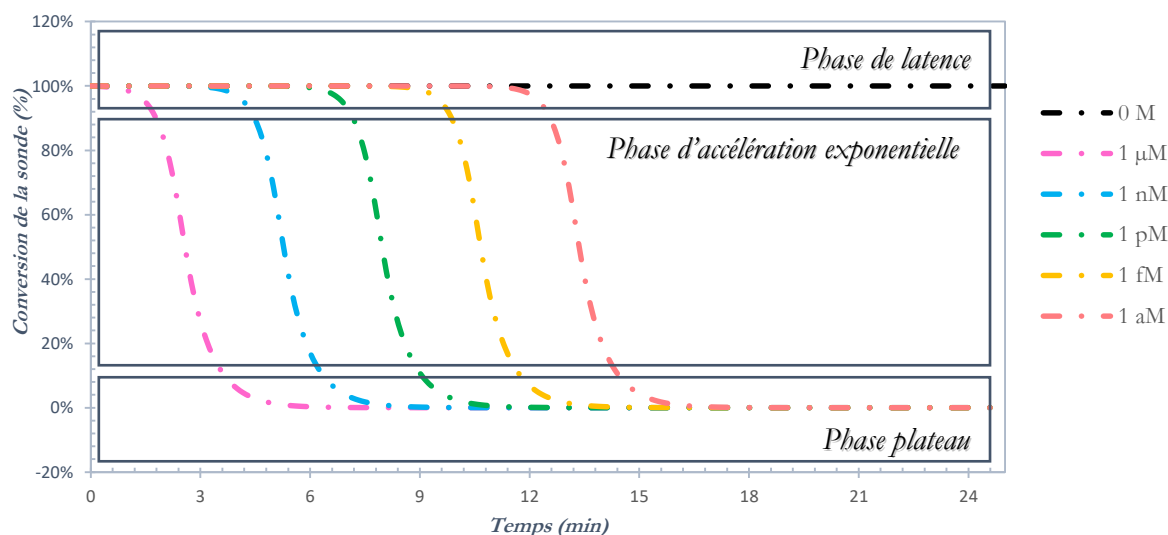


FIGURE 3. 35 Simulation du système auto-catalytique pour une sonde pro-QH₂ ester boronique (50 μM) en milieu réducteur : DI (10 nM) / NADH (250 μM), en présence d' O_2 (concentration d'oxygène dissous de 250 μM) à différentes concentrations en eau oxygénée. Les réactions appliquées au système sont celles décrites dans la FIGURE 3.34 et les constantes associées selon les réactions 3.27 à 3.31.

Les cinétiques simulées sont caractéristiques d'une réaction auto-catalytique. En particulier, le signal obtenu (représenté ici par le taux de conversion de la sonde pro-QH₂) montre une phase de latence pendant laquelle la concentration en sonde pro-QH₂ reste approximativement constante. Puis à partir d'un seuil temporel donné, une phase d'accélération exponentielle liée à l'accélération de la vitesse de transformation de pro-QH₂, suivi d'une phase transitoire avant d'atteindre une phase plateau indiquant la déplétion complète de la sonde pro-QH₂ et/ou du substrat enzymatique. Pour le jeu de constante employées, dont les valeurs sont plutôt réalistes, il apparaît clairement que l'on peut détecter l'eau oxygénée à des concentrations très faibles en un temps très court (ici 1 pM d' H_2O_2 est détectable en moins de 8 minutes). Ces simulations démontrent bien tout l'intérêt de mettre en place un schéma réactionnel auto-catalytique si l'on veut considérablement amplifier un signal. Forts de ces prédictions particulièrement encourageantes, nous avons donc exploré les possibilités offertes par les différentes molécules ester boroniques pro-QH₂ que nous avons étudiées précédemment.

3.3.1 Système auto-catalytique et sonde 1,4-bis-DBN

Afin de démontrer la preuve de concept d'une amplification moléculaire auto-catalytique combinant la déprotection oxydative d'un motif quinonique et son recyclage redox, nous avons choisi de commencer nos essais par la sonde pro-QH₂ **1,4-bis-DBN** qui a le mérite d'être stable en milieu aqueux et de conduire à une 1,4-naphthoquinone dont l'auto-oxydation est relativement efficace. Nous avons également choisi comme système de régénération enzymatique le couple diaphorase/NADH car c'est une enzyme pour laquelle nous avons des données cinétiques vis-à-vis de différentes naphthoquinones⁹⁹.

3.3.1.1 Etude avec le couple réducteur Diaphorase / NADH

Le schéma réactionnel auto-catalytique que nous pouvons espérer avoir dans ces conditions est le suivant :

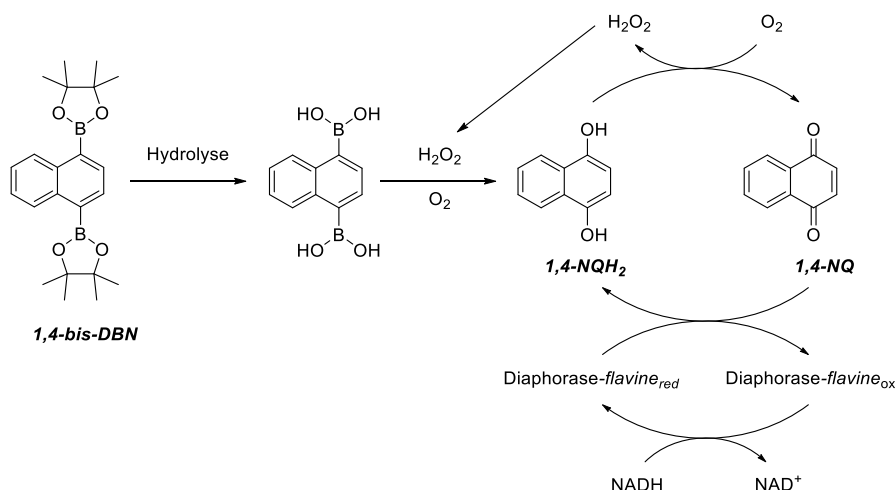


FIGURE 3. 36 Mécanisme auto-catalytique de la sonde 1,4-bis-DBN en présence du couple enzymatique réducteur diaphorase/NADH

Afin d'assurer une réduction efficace et non-cinétiquement limitante de la **1,4-NQ** en **1,4-NQH₂**, une concentration en diaphorase et en NADH de 10 nM et 250 μM respectivement a été sélectionnée pour l'ensemble des expériences. La concentration de 50 μM en sonde **1,4-bis-TDBN** a quant à elle été gardée identique à celle que nous avons utilisée lors des études menées dans des conditions catalytiques. Le suivi cinétique de la réaction en fonction de différentes concentrations en H_2O_2 a été entrepris à deux longueurs d'ondes, l'une permettant le suivi de la disparition de la molécule pro-QH₂ à $\lambda = 290 \text{ nm}$ et l'autre celle de la consommation

du NADH à $\lambda = 340$ nm. Les mesures ont été réalisées en triplica sur microplaque à l'aide d'un lecteur UV-vis. Les résultats sont présentés FIGURE 3.37.

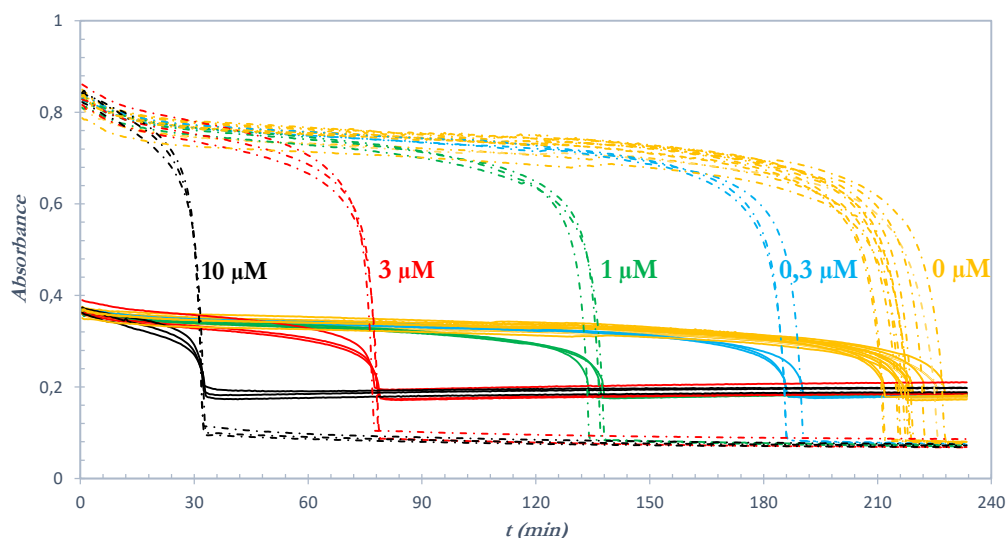


FIGURE 3. 37 Suivi cinétique sur 4 heures à température ambiante par spectroscopie UV-vis à 290 nm (trait plein) et à 340 nm (pointillé) de la conversion de la sonde 1,4-bis-DBN (50 μ M) en fonction des différentes concentrations en H_2O_2 en présence de DI (10 nM) et NADH (250 μ M) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μ M d'EDTA.

Il apparait de manière évidente, pour chaque concentration en H_2O_2 la vitesse de disparition de la sonde pro-QH₂ ou du NADH est accélérée au cours de la réaction, montrant ainsi une phase de latence suivi d'une brusque diminution de l'absorbance caractéristique d'une réaction auto-catalytique. Le temps de latence est directement relié aux conditions initiales de concentrations en H_2O_2 . Il est intéressant de noter que la chute d'absorbance du NADH est parfaitement synchronisée avec celle du pro-QH₂. Ceci signifie que la boucle catalytique de recyclage redox génère suffisamment d'eau oxygénée pour que la totalité de la sonde soit *in fine* déprotégée. Cela a également pour effet de produire une telle quantité de médiateur Q/QH₂ que la déplétion en NADH finit par être totale malgré un large excès au départ. Enfin la reproductibilité des triplicatas est très satisfaisante.

Ce système permet de détecter quantitativement des concentrations initiales en H_2O_2 allant de 10 à 0,3 μ M sur une durée allant de 30 minutes à moins de 4 heures. Toutefois, la performance en limite de détection reste modeste car limitée par l'apparition d'une chute d'absorbance en l'absence d' H_2O_2 au bout de quatre heures, dont l'allure auto-catalytique caractéristique indique un déclenchement non-spécifique de la réaction. A noter que cette chute a pu être ralentie en prenant soin de purifier par centrifugation l'enzyme DI sur membranes filtrantes avec un seuil de

coupure à 10 kDa. La centrifugation sur membrane permet de séparer de la solution enzymatique d'éventuelles petites molécules, telles que des traces métalliques ou encore la présence de cofacteurs flaviniques libres en solution, capables de catalyser ou favoriser la déprotection oxydative de la sonde. La présence de traces de flavines libres est en effet problématique car ces traces peuvent initier la production d'eau oxygénée *via* le cyclage de redox et de fait déclencher non-spécifiquement la réaction auto-catalytique. Par ailleurs, la diaphorase commerciale que nous avons employée est, d'après le fournisseur, susceptible de contenir des traces de NADH oxydase à hauteur d'une activité résiduelle inférieure à 0,01 %. Or, la NADH oxydase est une oxydoréductase capable en présence de NADH et d'O₂ de produire H₂O₂ selon la réaction :



Ayant un poids moléculaire proche de celui de la diaphorase, il est difficile de séparer les potentielles traces de NADH oxydase de la diaphorase. L'activité résiduelle de cette NADH oxydase est donc susceptible d'être à l'origine de la réponse auto-catalytique non-spécifique observée. Enfin, un dernier point concerne la possibilité pour le substrat NADH, une fois solubilisé dans un tampon, de lentement s'oxyder en présence d'O₂ pour conduire à la production de traces d'H₂O₂ (un processus qui peut être favorisé par une exposition à la lumière)¹⁰⁰. C'est d'ailleurs ce que nous nous sommes attachés à éviter dans nos expériences en prenant soin de préparer au dernier moment la solution mère de NADH dans de l'eau milliQ ultra-pure. Dès lors l'utilisation de solutions mères de NADH toujours fraîchement préparées s'avère indispensable. Afin d'essayer de remédier à ces différents problèmes associés à l'enzyme DI, nous avons envisagé de la substituer par un système enzymatique s'affranchissant des inconvénients de cette dernière. C'est ce qui nous a poussés à envisager d'utiliser la PQQ-sGDH comme nous allons maintenant le voir.

3.3.1.2 Etude du système PQQ-sGDH / glucose

Le deuxième couple enzyme/substrat capable de réduire efficacement des quinones et que nous avons donc utilisé est le couple PQQ-dépendante glucose déshydrogénase/glucose. L'avantage du substrat réducteur glucose par rapport au NADH est qu'il est très stable en solution aqueuse. C'est en effet une molécule beaucoup plus difficile à oxyder et elle ne peut, contrairement au NADH, conduire en présence d'O₂ à la production d'H₂O₂. Par ailleurs, bien que le cofacteur PQQ de l'enzyme possède un potentiel formel plus élevé que le FMN de la DI, la PQQ-sGDH est capable de réduire efficacement et relativement indifféremment un grand nombre de dérivés quinoniques, et en l'occurrence la 1,4-naphthoquinone qui nous intéresse¹⁰¹.

Le schéma réactionnel auto-catalytique que nous pouvons écrire avec cette nouvelle enzyme est très similaire à celui avec la DI :

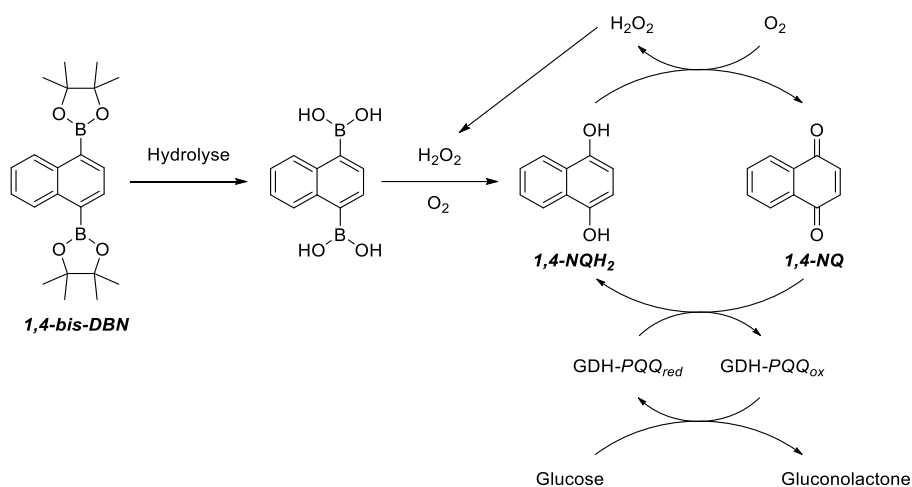


FIGURE 3. 38 Mécanisme auto-catalytique avec la sonde **1,4-bis-DBN** et le couple enzymatique réducteur PQQ-sGDH / glucose

Avec cette nouvelle enzyme, il n'est cependant plus possible de suivre la consommation du substrat puisque contrairement au NADH, le glucose ne possède pas de signature spectroscopique aisément détectable. Le seul moyen efficace de suivre la cinétique de la réaction a donc été de se positionner en spectroscopie UV-vis à la longueur d'onde qui correspond au maximum d'absorption de la molécule **1,4-bis-DBN**. Des concentrations de 10 nM en PQQ-sGDH et 1 mM en glucose ont été sélectionnées de manière à réduire rapidement la **1,4-NQ** et à ne pas être cinétiquement limité par cette réaction. Les résultats obtenus pour différentes concentrations initiales en H_2O_2 sont présentés **FIGURE 3.39**.

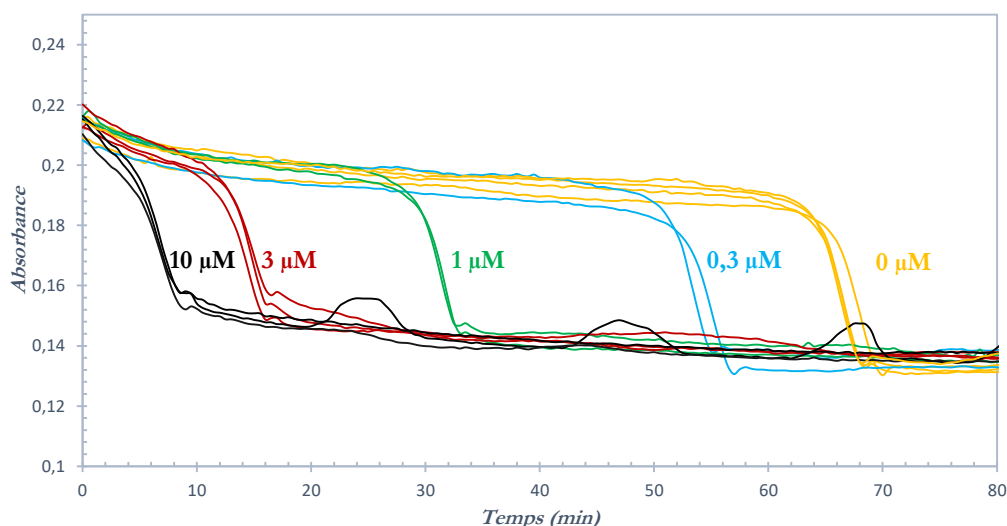


FIGURE 3. 39 Suivi cinétique sur 80 minutes à température ambiante par spectroscopie UV-vis à 290 nm de la conversion de la sonde 1,4-bis-DBN (50 µM) en fonction des différentes concentrations en H_2O_2 en présence de PQQ-sGDH (10 nM) et glucose (1 mM) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 µM d'EDTA.

Les cinétiques obtenues pour le système PQQ-sGDH/glucose sont comparables à celles du précédent couple DI/NADH, même si dans ce cas la transformation de la sonde **1,4-bis-DBN** est suivie à 290 nm. Les cinétiques correspondent bien à celles d'un processus réactionnel auto-catalytique puisque nous retrouvons tout d'abord une phase de latence, qui dépend de la concentration de départ en H_2O_2 , puis une phase d'accélération exponentielle de la cinétique en fonction du temps, et enfin une phase plateau qui indique une déprotection totale de la sonde.

La particularité de ce nouveau couple enzymatique est qu'il permet de réduire considérablement le temps de détection d' H_2O_2 par rapport au couple précédent DI/NADH. Les seuils de détections obtenus pour les deux systèmes (DI/NADH et PQQ-sGDH/glucose) en fonction des différentes concentrations initiales en H_2O_2 sont regroupés dans le **TABLEAU 3.5**. Le seuil de détection pour chaque concentration est défini comme étant le temps nécessaire à la transformation de 90 % de la sonde **1,4-bis-DBN**.

TABLEAU 3. 5 Comparaison des couples réducteurs DI/NADH et PQQ-sGDH/glucose en fonction des temps de détection obtenus pour des concentrations en H_2O_2 allant de 0 à 10 μM . Le temps de détection est défini comme étant le temps nécessaire pour la conversion de 90 % de sonde 1,4-bis-DBN (suivi à 290 nm).

Concentration en H_2O_2	Temps de détection (min)	
	DI/NADH	PQQ-sGDH/glucose
10 μM	52 ± 0	8 ± 0
3 μM	77 ± 1	16 ± 1
1 μM	132 ± 1	32 ± 1
0,3 μM	186 ± 2	53 ± 1
0 μM	218 ± 5	68 ± 4

Il est intéressant de noter qu'avec la PQQ-sGDH les seuils de détection apparaissent à des temps plus courts (réduits par un facteur 4) indiquant une cinétique auto-catalytique plus rapide. Cependant, la limite de détection est toujours d'environ 0,3 μM (FIGURE 3.39 et TABLEAU 3.5). Ce résultat est troublant puisque pour chacune des enzymes, les conditions sélectionnées pour réduire la quinone sont telles que l'on ne devrait pas être dépendant de cette étape réductrice. Si l'on compare la réponse non-spécifique obtenue en l'absence d' H_2O_2 , on remarque qu'elle apparaît elle aussi à des temps bien plus courts qu'avec la DI. Il pourrait donc simplement s'agir d'un déclenchement de la réaction non-spécifique qui est plus rapide dans le cas du système PQQ-sGDH/glucose, ce qui aurait pour effet d'accélérer l'ensemble des réponses auto-catalytiques en présence d' H_2O_2 . Une autre hypothèse pourrait être liée à une différence d'ordre mécanistique lors de l'amplification. Notamment, aucune évidence expérimentale ne permet d'assurer que la réduction de la quinone est un processus mono- ou bi-électronique (réduction en semiquinone ou en hydroquinone). Une différence de ce type pourrait entraîner des comportements cinétiques globaux différents.

Comme pour la DI, nous avons cherché à purifier l'enzyme par centrifugation sur membrane filtrante Nanosep afin d'essayer d'éliminer toutes traces d'impuretés pouvant contribuer à faciliter le déclenchement non-spécifique de la réaction. Ceci est d'autant plus important que la fonction active de la PQQ-sGDH est obtenue par reconstitution de la *holo*-sGDH en présence d'un large excès de PQQ et que cet excès, sous forme de fraction libre, peut intervenir dans une production d' H_2O_2 par recyclage redox et donc être la source d'un déclenchement non-spécifique de l'auto-catalyse. Grâce à une purification de l'enzyme reconstituée sur membrane filtrante, nous avons pu repousser l'apparition de la réponse non-spécifique à des temps plus élevés. Forts de ce constat, nous avons alors cherché à préparer une PQQ-sGDH reconstituée non plus avec un excès de

PQQ mais tout simplement avec un ratio 1 : 1 stœchiométrique de manière à réduire au maximum la fraction libre de PQQ pouvant être à l'origine de la réponse non-spécifique et, auquel ensuite nous avons ajouté un léger excès d'*apo*-sGDH afin d'éliminer au maximum d'éventuelles traces de PQQ libre. De ce fait, la procédure de préparation de la PQQ-sGDH que nous avons finalement retenue consiste en la préparation d'une solution enzymatique constituée de 10 nM d'*holo*-sGDH pour 2,5 nM d'*apo*-sGDH (80/20). C'est typiquement avec cette solution enzymatique que nous avons obtenu les résultats de la **FIGURE 3.39**.

En conclusion, le système avec le couple PQQ-sGDH/glucose est en termes de cinétique assez performant puisque le temps de détection est globalement réduit. Cependant, l'existence d'un déclenchement non-spécifique de la réaction auto-catalytique limite la performance analytique de détection d'H₂O₂, tout comme cela était d'ailleurs le cas avec le couple DI/NADH. Ce problème de réaction non-spécifique pourrait être lié à un problème intrinsèque de stabilité de la sonde dans le milieu réactionnel qui conduirait, *via* un processus très lent, à la déprotection des esters boroniques selon un mécanisme qu'il reste à identifier. Un travail systématique d'analyse des conditions de réactions est donc nécessaire pour envisager de mieux comprendre l'origine du problème. C'est ce que nous allons maintenant examiner.

3.3.1.3 Identification des facteurs pouvant être à l'origine de la réaction non-spécifique

Si l'on veut améliorer les performances analytiques des systèmes d'amplification moléculaire auto-catalytique présentés précédemment, il est nécessaire de s'affranchir au maximum du problème de réponse non-spécifique observée en l'absence d'H₂O₂. Dans ce but, les travaux présentés ci-après s'attacheront à comprendre le rôle de chaque partenaire réactionnel dans l'apparition des cinétiques non-spécifiques (sonde, enzyme, substrat, O₂) ainsi que l'influence de divers paramètres expérimentaux sur la stabilité du système (pH, nature du tampon et sa concentration).

3.3.1.3.1 Rôle des partenaires réactionnels

L'impact de chacun des partenaires sur la réponse non-spécifique de la réaction d'auto-catalyse a été étudié selon deux approches différentes. La première approche a consisté à réaliser différentes expériences de contrôles (c'est-à-dire en l'absence d'eau oxygénée) en parallèle des expériences réalisées **FIGURES 3.37 ET 3.39**. Etant donné qu'il y a 4 partenaires réactionnels, nous pouvons envisager la mise en œuvre de 4 contrôles différents : (i) la réaction est suivie sous atmosphère inerte (en absence d'O₂), (ii et iii) l'un des partenaires du couple réducteur enzyme/substrat est absent, (iv) la sonde **1,4-bis-DBN** n'est pas présente dans le milieu. Ces différents contrôles permettent de vérifier si l'ensemble des 4 partenaires est bien nécessaire à l'apparition d'une

réponse auto-catalytique non-spécifique et que si l'un d'entre eux vient à manquer aucune réponse non-spécifique ne peut apparaître. La seconde approche a pour but d'appréhender l'impact de la pré-incubation de certains réactifs avant le lancement de la réaction auto-catalytique et son effet sur le délai d'apparition de la réponse non-spécifique. Bien entendu, comme précédemment il est nécessaire de comparer cette expérience avec pré-incubation à celle standard (c'est-à-dire sans pré-incubation).

Voyons dans un premier temps l'impact de l'absence d'un des 4 partenaires sur la réponse non-spécifique mesurée en l'absence d' H_2O_2 (TABLEAU 3.6).

TABLEAU 3. 6 Description des 4 contrôles réalisés à température ambiante dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA et résultats du suivi spectroscopique à l'aide du lecteur UV-vis de microplaque.

	1,4-bis-DBN (50 μM)	Enzyme (10 nM)	Substrat (250 μM NADH ou 1 mM glucose)	O_2 (250 μM)	Résultats et commentaires
Cas 1	+	+	+	-	L'absorbance à 290 nm reste très stable dans le temps car l'auto-oxydation de la 1,4-NQH ₂ ne peut se faire en l'absence d' O_2 .
Cas 2	+	+	-	+	L'absorbance à 290 nm est très stable en fonction du temps car l'enzyme ne peut pas réduire la 1,4-NQ en l'absence de son substrat.
Cas 3	+	-	+	+	Les absorbances à 290 et 340 nm sont très stables en fonction du temps car sans enzyme, il n'est pas possible de réduire la 1,4-NQ.
Cas 4	-	+	+	+	L'absorbance à 340 nm est très stable.

Comme attendu, le déclenchement auto-catalytique de la réaction nécessite la présence des 4 partenaires de la réaction et ne peut donc se faire si l'un d'eux n'est pas présent dans la solution.

Pour tenter d'identifier l'origine de la réponse non-spécifique, nous avons ensuite essayé de voir dans quelle mesure cela pouvait être lié à une éventuelle interaction entre certains des partenaires en fonction du temps. Ainsi, si nous pré-incubons différentes combinaisons de réactifs (sonde/O₂; sonde/O₂/enzyme; sonde/O₂/substrat; O₂/enzyme/substrat) préalablement à l'ajout de l'ensemble des 4 partenaires, nous pourrions théoriquement évaluer l'effet de la coexistence de ces réactifs sur la génération de la réponse non-spécifique. Ces expériences ont été menées avec le couple PQQ-sGDH/glucose, et ont été comparées à un système de référence sans pré-incubation (TABLEAU 3.7).

TABLEAU 3. 7 Description des expériences de pré-incubation suivies par spectroscopie à l'aide du lecteur UV-vis de microplaque : **(i)** représente les espèces pré-incubées durant 2 heures à température ambiante dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 µM d'EDTA et **(r)** représente les espèces ajoutées après les 2 heures d'incubation pour activer (ou compléter) le système réactionnel auto-catalytique. Ces expériences sont menées sans aucun ajout d'H₂O₂, et le temps de détection correspond à la transformation de 90 % de la sonde 1,4-bis-DBN (celui-ci est d'ailleurs comparé à celui d'un système de référence non pré-incubé).

	1,4-bis-DBN (50 µM)	PQQ-sGDH (10 nM)	Glucose (1 mM)	O ₂ (250 µM)	Comparaison du temps de détection de la réponse non-spécifique par rapport à un système de référence sans pré-incubation
Cas 5	i	r	r	i	Identique
Cas 6	i	i	r	i	- 20 min
Cas 7	i	r	i	i	Identique
Cas 8	r	i	i	i	+ 30 min

Les résultats regroupés dans le TABLEAU 3.7 permettent d'émettre quelques hypothèses :

- (i) La sonde est bien stable dans le tampon puisqu'il n'y a pas de différence en termes de temps d'apparition de la réponse non-spécifique entre le cas 5 (sonde pré-incubée durant deux heures) et le cas référence.
- (ii) La pré-incubation de l'enzyme avec la sonde réduit le temps d'apparition de la réponse non-spécifique (cas 6). Ce résultat semble indiquer que l'enzyme, en l'absence de substrat, peut induire une déprotection de la sonde pro-QH₂ en fonction du temps.

- (iii) Le glucose n'a pas d'effet sur la sonde (cas 7) et si l'on imagine une possible réaction de transestérification entre l'ester pinacol du boronique et le sucre, celle-ci est sans effet sur le mécanisme d'apparition de la réponse non-spécifique.
- (iv) La pré-incubation du couple réducteur PQQ-sGDH/glucose ralentit significativement le temps d'apparition de la réponse non-spécifique (cas 8). Ce résultat permet d'établir que la PQQ-sGDH en présence de son substrat est bien comme attendu incapable de générer H_2O_2 , mais aussi qu'en raison de son pouvoir réducteur dans ces conditions elle élimine sans doute des traces d'impuretés oxydantes capables de déclencher une réponse non-spécifique.

3.3.1.3.2 Impact du pH du milieu

Un pH de 8,5 a été jusqu'ici employé afin de favoriser à la fois la déprotection de la liaison C-B par H_2O_2 et l'auto-oxydation par O_2 de l'hydroquinone formée. A ce pH les enzymes DI et PQQ-sGDH fonctionnent également de manière plutôt optimale. Au regard de ces éléments d'information, la question qui se pose est donc dans quelle mesure le pH affecte la réponse non-spécifique en l'absence d' H_2O_2 par rapport à celle spécifique en présence d' H_2O_2 . Pour répondre à cette question, nous avons donc examiné l'impact d'un pH moins basique sur le temps de détection de l'eau oxygénée et sur celui de l'apparition de la réaction non-spécifique. Les résultats sont regroupés dans le **TABLEAU 3.8** :

TABLEAU 3. 8 Temps de détection obtenus pour la transformation de 90 % de la sonde 1,4-bis-DBN (50 μ M) en présence et en absence de 0,02 équivalent d' H_2O_2 (1 μ M), en milieu réducteur PQQ-sGDH (10 nM)/glucose (1mM), à température ambiante dans un tampon Tris (100 mM à différents pH) contenant 10 μ M d'EDTA.

pH	Temps de détection (min) ^a	
	1 μ M H_2O_2	0 μ M H_2O_2
8,5	31 $\pm$ 1	77 $\pm$ 3
8	177 $\pm$ 9	225 $\pm$ 5
7,4	nd (> 360)	nd (> 360)

^a L'erreur correspond à l'écart type de triplica

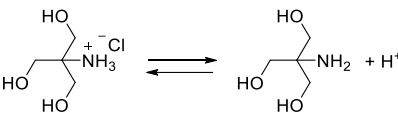
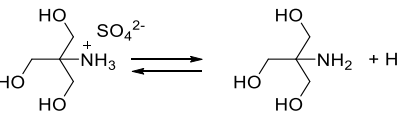
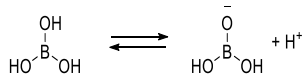
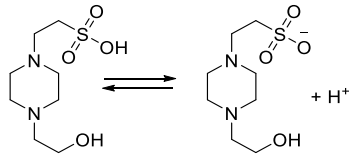
En passant d'un tampon Tris de pH 8,5 à 7,4, nous confirmons qu'un pH plus basique est favorable à la cinétique de la réaction puisque la diminution exponentielle de l'absorbance se produit à des temps plus courts qu'en milieu moins basique ou neutre. Cela va bien dans le sens

de cinétiques de déprotection de l'acide boronique par H_2O_2 et d'auto-oxydation de l'hydroquinone théoriquement plus rapides en milieu basique. En revanche, cela n'améliore pas le rapport signal spécifique/signal non-spécifique, les deux évoluant avec le pH de manière quasi-homothétique.

3.3.1.3.3 Effet de la nature du tampon

Le choix du tampon est comme pour le pH un facteur clef important. Il peut potentiellement agir sur la cinétique de déprotection de la sonde vis-à-vis d' H_2O_2 , mais aussi sur le mécanisme complexe d'auto-oxydation de l'hydroquinone. En effet, le tampon peut être impliqué dans des interactions électroniques avec le bore pouvant diminuer ou augmenter son caractère acide de Lewis et donc affecter plus ou moins l'attaque nucléophile de l'eau oxygénée. D'autre part, il peut aussi gêner cette attaque en encombrant le bore ou en le rendant moins disponible. Le **TABLEAU 3.9** récapitule les résultats que nous avons obtenus.

TABLEAU 3. 9 Temps de détection obtenus pour la transformation de 90 % de la sonde 1,4-bis-DBN (50 μM) en présence et en absence de 0,02 équivalent d' H_2O_2 (1 μM), en milieu réducteur PQQ-sGDH (10 nM)/glucose (1mM), à température ambiante dans un tampon (Tris,HCl ; Tris, H_2SO_4 ; Borate ou HEPES) (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA.

Tampons	Structure	Concentration	Temps de détection (min) ^a	
			1 μM H_2O_2	0 μM H_2O_2
Tris,HCl ^b		100 mM	69 $\pm$ 3	95 $\pm$ 1
		10 mM	277 $\pm$ 4	358 $\pm$ 2
Tris, H_2SO_4		100 mM	80 $\pm$ 1	126 $\pm$ 1
Borate		100 mM	89 $\pm$ 1	146 $\pm$ 1
HEPES		100 mM	nd (> 403)	nd (> 403)

^a L'erreur correspond à l'écart type de triplica ^b Tampon de référence que nous avons jusqu'ici systématiquement utilisé

L'étude de différents tampons témoigne de la complexité du système :

- (i) Tout d'abord, la concentration du tampon est un paramètre important à considérer compte tenu de son influence sur la cinétique de l'auto-catalyse. En effet, en diluant par un facteur 10 le tampon Tris, on ralentit par un facteur 4 le temps nécessaire à la transformation de 90 % de la sonde, et ceci aussi bien pour la réponse spécifique à 1 μM d' H_2O_2 que pour le signal non-spécifique. Il faut noter que pour une concentration plus faible en tampon à pH 8,5, l'hydrolyse même du groupement pinacol est ralentie.
- (ii) Le contre-ion du tampon Tris (Cl^- ou SO_4^{2-}) influe également sur la réaction puisque dans les mêmes conditions de concentration de tampon et de pH (100 mM, pH 8,5) les deux systèmes montrent des temps de détection différents.
- (iii) La nature du tampon joue aussi sur la réactivité puisque en tampon borate les temps de détection sont légèrement allongés par rapport à ceux obtenus en tampon Tris.
- (iv) Plus surprenant encore sont les résultats obtenus avec le tampon HEPES, qui se révèle être totalement inhibiteur de la réaction auto-catalytique dans des conditions pourtant similaires à celles du tampon Tris,HCl, que nous avons systématiquement employé. En effet, le temps de détection à 1 μM d' H_2O_2 n'est toujours pas détectable au bout de 8 heures, alors qu'il suffit d'une heure dans le tampon Tris. Cette différence vient probablement d'une différence dans le caractère plus ou moins donneur de doublet (base de Lewis) de l'HEPES par rapport au Tris. L'HEPES repose sur un cycle pipérazine avec des amines tertiaires et un groupe sulfonique, tandis que le Tris est porteur d'une amine primaire (TABLEAU 3.9).

Dans chacun des cas, le tampon a un effet à la fois sur la détection auto-catalytique d' H_2O_2 initialement présent en solution, mais aussi sur l'apparition d'une réponse auto-catalytique non-spécifique. Nous pouvons donc conclure que le tampon joue un rôle dans le mécanisme auto-catalytique du système et en particulier sur la déprotection oxydative des fonctions esters boroniques. Bien que ces effets ne soient pas encore compris faute d'études plus approfondies, le choix d'utiliser le tampon Tris,HCl à une concentration de 100 mM est finalement favorable à la réaction d'auto-catalyse.

3.3.2 Système auto-catalytique et sonde 4-sis-DBN

La deuxième molécule pro-QH₂ que nous avons choisi de tester dans des conditions auto-catalytiques est le **4-sis-DBN**. Comme nous l'avons vu précédemment, cette molécule présente

l'avantage d'être très stable en milieu tampon Tris pH 8,5. Par ailleurs, elle ne nécessite le clivage que d'un seul ester boronique par H_2O_2 pour conduire, *via* une réaction intramoléculaire d'auto-immolation, à une **1,4-NQH₂**. En présence d'une enzyme telle que la PQQ-sGDH et son substrat glucose, il est donc possible d'envisager le schéma réactionnel auto-catalytique présenté **FIGURE 3.40**.

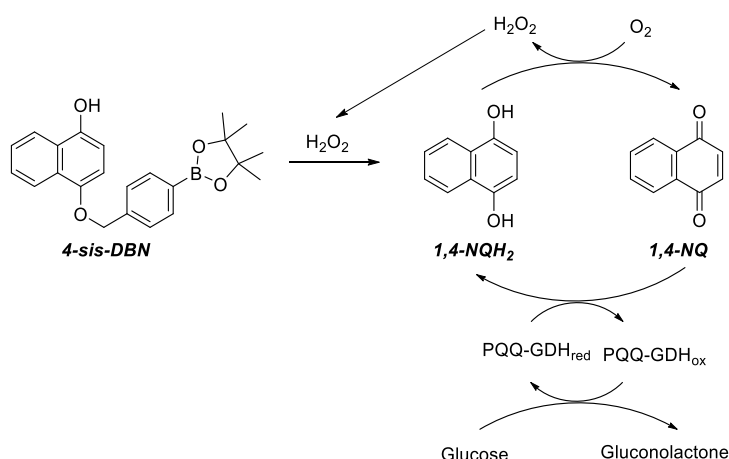


FIGURE 3. 40 Mécanisme auto-catalytique de sonde 4-sis-DBN en présence du couple enzymatique réducteur PQQ-sGDH/glucose

Pour rappel, en l'absence d'enzyme, nous avons montré qu'il était possible avec cette sonde de détecter jusqu'à $1,5 \mu\text{M}$ d' H_2O_2 après un peu plus de 5 heures. En ajoutant le couple PQQ-sGDH/glucose, la régénération de la naphthohydroquinone doit permettre d'accélérer la production d'eau oxygénée par auto-catalyse et aussi autoriser théoriquement la détection d' H_2O_2 à de plus faibles concentrations en un laps de temps plus court.

Afin de vérifier le caractère auto-catalytique de la réaction en présence de PQQ-sGDH et de glucose, nous avons choisi de suivre par spectroscopie UV-vis la cinétique d'apparition de la **1,4-NQ** à 262 nm. En effet, comme le montre les spectres de la **FIGURE 3.41**, à cette longueur d'onde seule la forme oxydée absorbe raisonnablement.

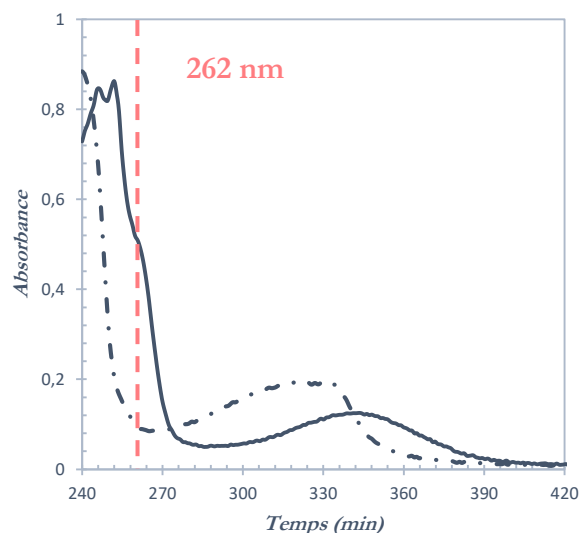


FIGURE 3. 41 Spectres UV-vis à température ambiante de la 1,4-NQ (trait plein) (50 μ M) et de la 1,4-NQH₂ (pointillé) (50 μ M) en l'absence d'O₂, dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μ M d'EDTA.

Nous avons donc mis en place le mécanisme réactionnel d'auto-catalyse en préparant des solutions contenant 50 μ M de **4-sis-DBN**, 10 nM de PQQ-sGDH et 1 mM de glucose dans un tampon Tris à pH 8,5 et en y ajoutant des concentrations en eau oxygénée allant de 3 à 0,001 équivalents. Les résultats du suivi spectroscopique à 262 nm sont présentés **FIGURE 3.42**.

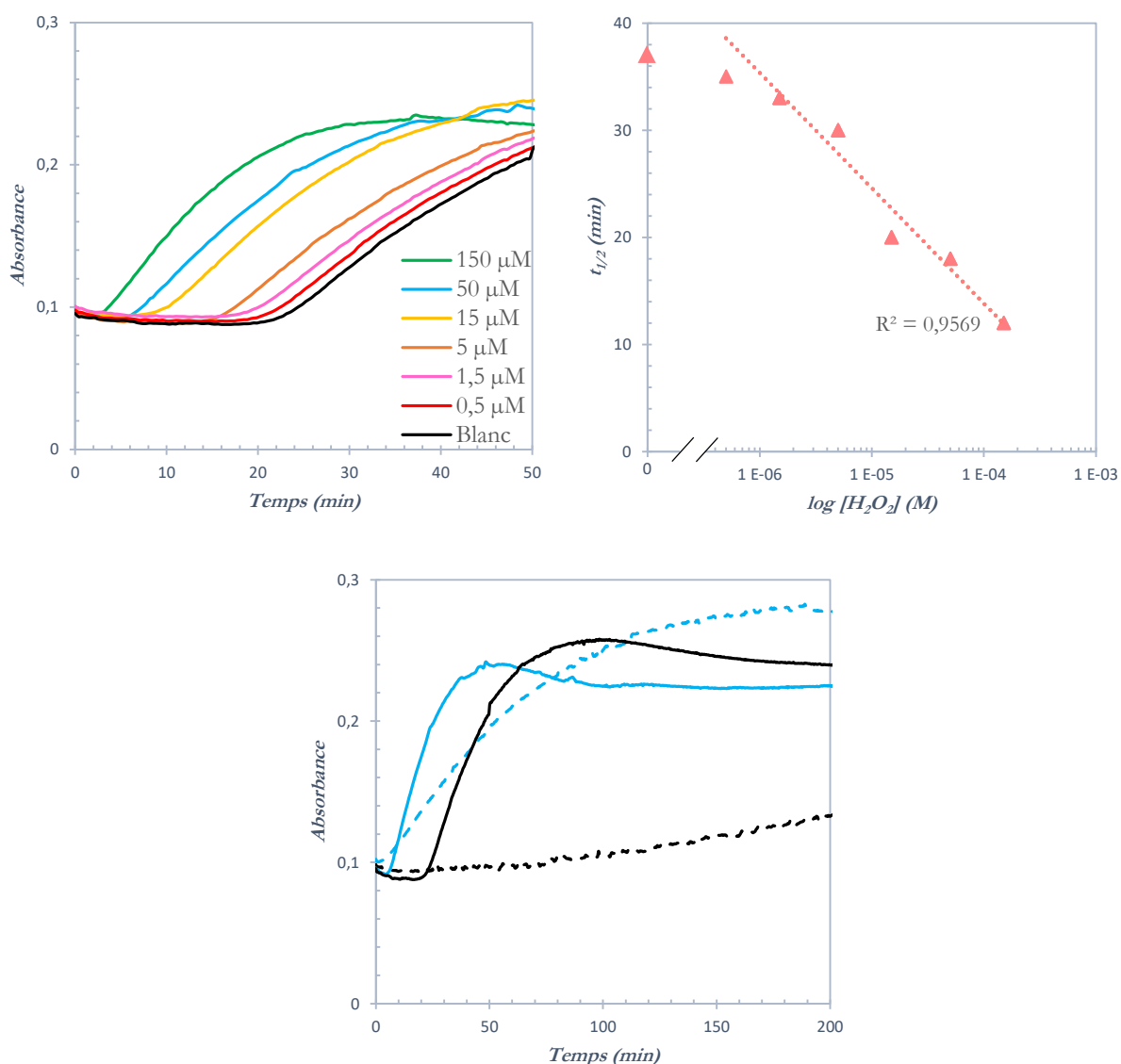


FIGURE 3. 42 En haut à gauche : Suivi cinétique à température ambiante sur 50 minutes à 262 nm de la conversion de la sonde 4-sis-DBN (50 μM) en fonction de différentes concentrations en H_2O_2 en milieu réducteur PQQ-sGDH (10 nM)/glucose (1 mM) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA.

En haut à droite : Temps d'apparition de 50 % de 1,4-NQ, $t_{1/2}$, en fonction du logarithme décimal de la concentration d' H_2O_2 . D'après les résultats de la figure de gauche.

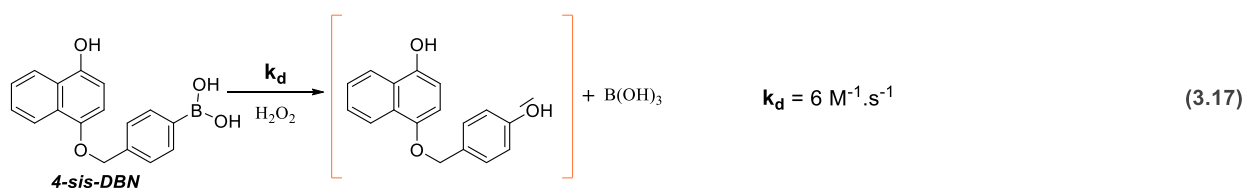
En bas : Comparaison des suivis cinétiques à 262 nm de la conversion de la sonde 4-sis-DBN (50 μM) en 1,4-NQ pour les systèmes catalytique (pointillé) et auto-catalytique (trait plein). En bleu : 50 μM H_2O_2 ; en noir : 0 μM H_2O_2 .

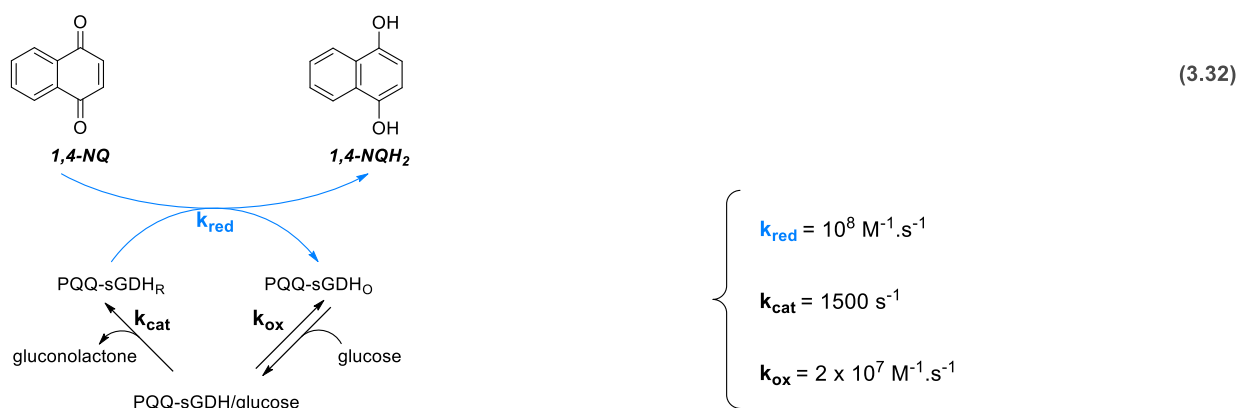
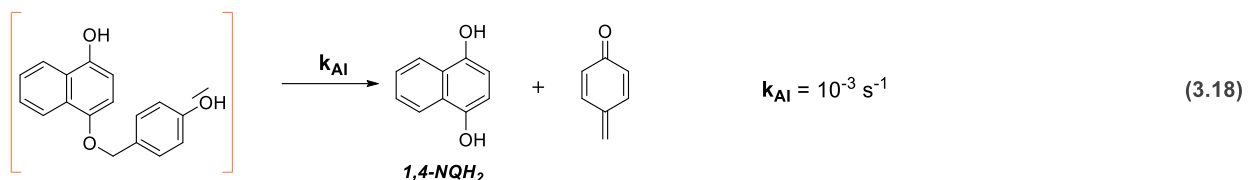
Cette expérience montre que le système auto-catalytique fonctionne dans nos conditions : il permet dorénavant de détecter jusqu'à 500 nM en eau oxygénée en moins d'une heure. Ainsi, en

comparant les résultats obtenus à ceux en l'absence d'enzyme (c'est-à-dire en mode catalyse) (FIGURE 3.42 BAS), on peut relever plusieurs points intéressants : (i) la détection d' H_2O_2 est grandement accélérée grâce à l'auto-catalyse et (ii) le rapport signal spécifique sur signal non-spécifique est amélioré puisque nous pouvons détecter une concentration plus faible d' H_2O_2 qu'en mode catalyse. Une expérience de pré-incubation de la sonde dans le tampon Tris pH 8,5 nous a permis de déterminer que cette réponse non-spécifique était directement liée à une instabilité de la sonde dans le tampon en fonction du temps et non à une impureté résiduelle. En effet, si on laisse vieillir une solution aqueuse de **4-sis-DBN** et qu'on la reprend pour réaliser des expériences d'auto-catalyse, on observe une réponse non-spécifique apparaitre bien plus tôt, suggérant une hydrolyse lente de la molécule pro-QH₂ en Q/QH₂.

Etant donné qu'à 262 nm nous suivons l'apparition de **1,4-NQ**, qui est une espèce impliquée dans le cyclage redox Q/QH₂, les cinétiques que nous observons FIGURE 3.42 n'ont pas le profil typique de celui d'une réaction d'auto-catalyse. En effet, pour suivre un schéma réactionnel d'auto-catalyse il est généralement préférable de suivre soit la consommation de la sonde, soit la consommation du substrat enzymatique (comme c'était le cas pour la sonde **1,4-bis-DBN**). Or, ici nous ne pouvons suivre par spectroscopie UV-vis aucune de ces deux molécules puisque d'une part le glucose n'a pas de signature spectrale en UV-vis et que d'autre part nous n'avons pas pu identifier de longueur d'onde qui soit bien spécifique de la sonde dans nos conditions. Toutefois, en traçant $t_{1/2}$, soit le temps d'apparition de 50 % de **1,4-NQ**, en fonction du logarithme de la concentration d' H_2O_2 , (FIGURE 3.42 DE DROITE) nous vérifions bien que ce système est auto-catalytique puisque l'on obtient une fonction linéaire de la concentration en H_2O_2 sur le graphe semi-logarithmique de la FIGURE 3.42 DE DROITE. A faibles concentrations en H_2O_2 en revanche on dévie de cette linéarité car la réponse devient entachée par le signal d'une réaction non-spécifique.

Dans le but de nous convaincre définitivement que ce système possède bien des cinétiques propres à un schéma réactionnel d'auto-catalyse, nous avons effectué des simulations numériques en nous appuyant sur les mesures des cinétiques des réactions décrites précédemment dans la partie catalyse et sur celles propres à la PQQ-sGDH. Le schéma auto-catalytique que nous avons donc simulé est le suivant :





Le résultat des simulations effectuées avec 50 μM de sonde **4-sis-DBN**, 10 nM de PQQ-sGDH et 1 mM de glucose est présenté **FIGURE 3.43**.

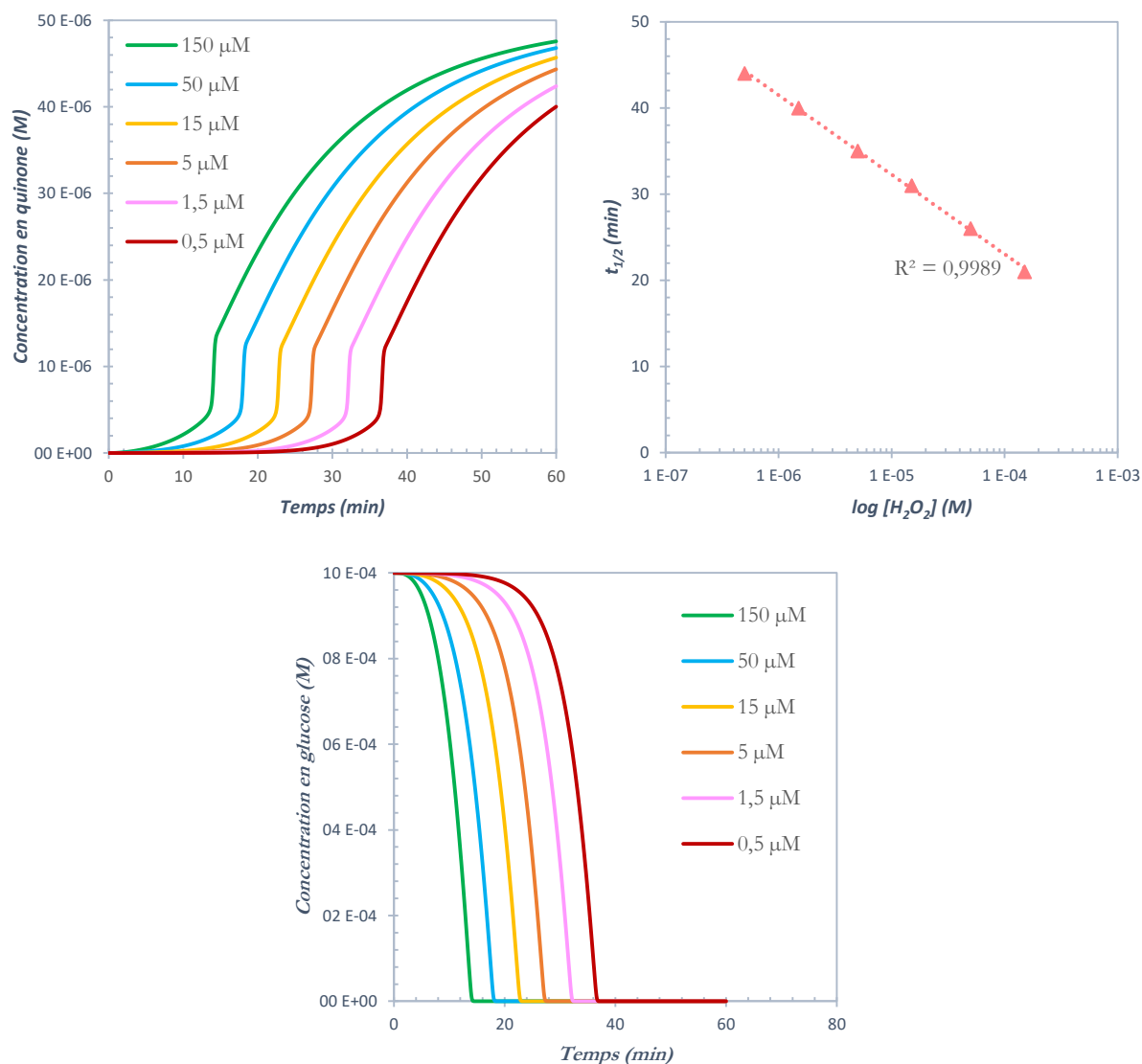


FIGURE 3.43 En haut : Simulation numérique *via* le logiciel COPASI du système auto-catalytique pour la sonde 4-sis-DBN (50 μM) en milieu réducteur : PQQ-sGDH (10 nM)/glucose (1 mM), en présence d' O_2 (concentration d'oxygène dissous de 250 μM), à différentes concentrations en H_2O_2 . La simulation est réalisée en prenant en compte les réactions 3.15, 3.17, 3.18 et 3.32 et leur jeu de constantes cinétiques telles que nous les avons estimées. Suivi de l'apparition de la 1,4-NQ (à gauche) et $t_{1/2}$ correspondant (à droite) en fonction de la concentration en H_2O_2 selon une échelle semi-logarithmique.

En bas : Suivi du glucose par simulation numérique *via* le logiciel COPASI du même système auto-catalytique pour la sonde 4-sis-DBN.

La simulation des courbes cinétiques correspondant à l'évolution de la concentration du glucose en fonction du temps reportée sur la **FIGURE 3.43 BAS** est caractéristique d'une amplification auto-catalytique (phase de latence suivie d'une chute exponentielle de la concentration en glucose). Pour ce qui est de l'apparition de la **1,4-NQ**, les cinétiques sont plus complexes à

interpréter. En effet, nous distinguons trois domaines. Le premier correspond à une lente apparition de la quinone dans un milieu qui devient de moins en moins réducteur (disparition du glucose). Le second qui apparaît au moment de la consommation totale en glucose correspond à la conversion rapide de la **1,4-NQH₂** accumulée en **1,4-NQ** en présence d'O₂. Et enfin, le troisième reflète la lente conversion en fonction du temps de la sonde en milieu non réducteur. Le temps à laquelle la concentration du glucose diminue de moitié suit une loi exponentielle en fonction de la concentration en H₂O₂, comme le montre la **FIGURE 3.43 DE DROITE**, c'est-à-dire que les points s'alignent sur une échelle semi-logarithmique.

Finalement, les résultats obtenus nous permettent de conclure que l'auto-catalyse se fait plutôt assez bien avec la sonde **4-sis-DBN**, et que celle-ci permet de détecter 500 nM d'H₂O₂ en moins de 30 minutes. En revanche, la sonde pose un problème de stabilité dans le temps en milieu tamponné, ce qui limite les performances analytiques.

3.3.3 Système auto-catalytique et sonde 2,6-diMe-4-DBP

Le troisième système que nous avons examiné repose sur l'association de la molécule pro-QH₂ **2,6-diMe-4-DBP** avec le couple PQQ-sGDH/glucose pour laquelle on peut envisager en présence d'H₂O₂ de déclencher le schéma réactionnel auto-catalytique suivant :

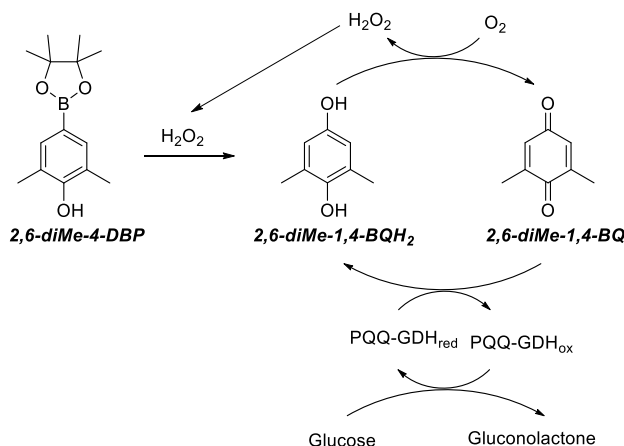


FIGURE 3. 44 Mécanisme auto-catalytique de la sonde **2,6-diMe-4-DBP** en présence du couple PQQ-sGDH/glucose

Dans un premier temps, il est important de vérifier si l'enzyme PQQ-sGDH en présence de glucose est bien capable de réduire efficacement la 2,6-diméthyle-1,4-naphthoquinone. Pour cela 10 nM de PQQ-sGDH et 1 mM de glucose ont été ajoutés à une solution de 50 µM de quinone

3.14 dans un tampon Tris à pH 8,5 et les spectres UV-vis enregistrés avant et après cet ajout sont présentés **FIGURE 3.45**.

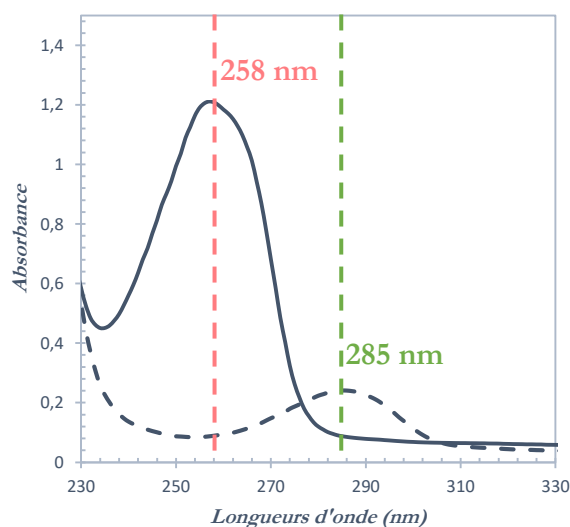


FIGURE 3. 45 Spectres UV-vis à température ambiante de 2,6-diméthyle-1,4-benzoquinone **3.14** commerciale (50 μM) (trait plein) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA, et du produit formé suite à l'ajout du couple enzymatique réducteur PQQ-sGDH (10 nM)/glucose (1 mM) à la solution (pointillé).

Dès l'ajout de l'enzyme et son substrat, la bande d'absorption intense à $\lambda_{\text{max}} = 258 \text{ nm}$ (typique de la quinone **3.14**) est rapidement (en quelques minutes) convertie en une nouvelle bande moins intense à $\lambda_{\text{max}} = 285 \text{ nm}$ caractéristique d'une benzohydroquinone réduite. Ce résultat montre que la PQQ-sGDH en présence de glucose peut réduire efficacement la quinone **3.14**. Par ailleurs, le fait que l'hydroquinone **3.13** s'accumule rapidement en présence d' O_2 indique une réduction enzymatique plus efficace que l'auto-oxydation.

A partir de ces deux spectres bien distincts, il est aisé de concevoir un suivi de la cinétique d'auto-catalyse par spectroscopie UV-vis en se plaçant à 285 nm pour voir apparaître la forme hydroquinone et à 258 nm pour voir la forme quinone. Les cinétiques obtenues pour chacune de ces deux longueurs d'onde sont présentées **FIGURE 3.46** en fonction de différentes concentrations en H_2O_2 et pour des concentrations fixes en proQH₂ **3.16**, PQQ-sGDH et glucose de respectivement 50 μM , 1 nM et 100 μM .

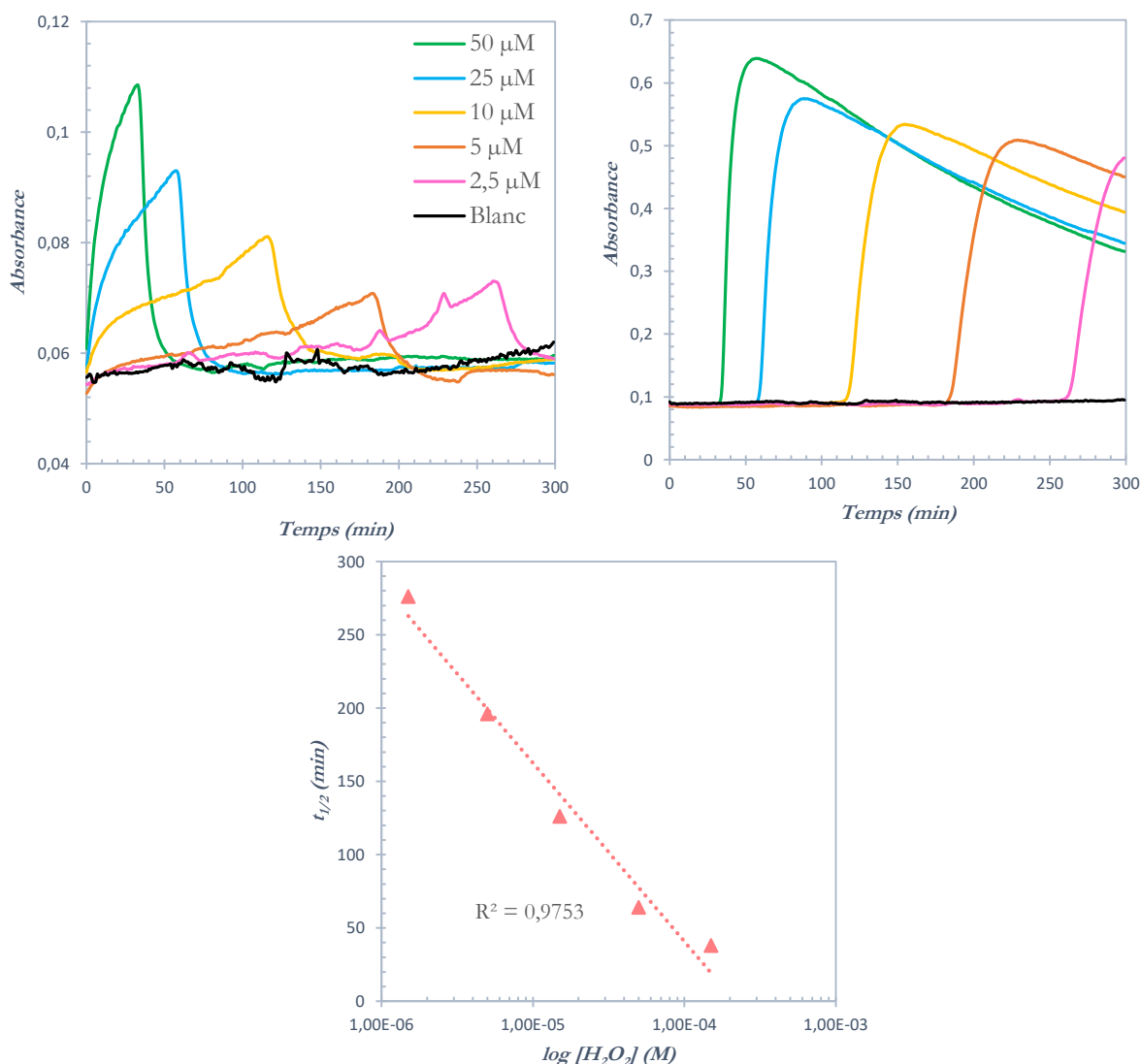


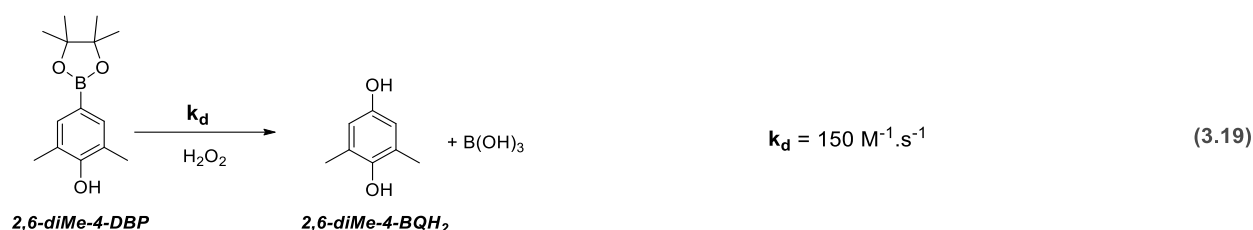
FIGURE 3. 46 En haut : Suivi cinétique sur 5 heures à température ambiante à 285 nm (à gauche) et à 258 nm (à droite) de la conversion de la sonde 2,6-diMe-4-DBP (50 μ M) en fonction des différentes concentrations en H_2O_2 en milieu réducteur PQQ-sGDH (1 nM)/glucose (100 μ M) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μ M d'EDTA.

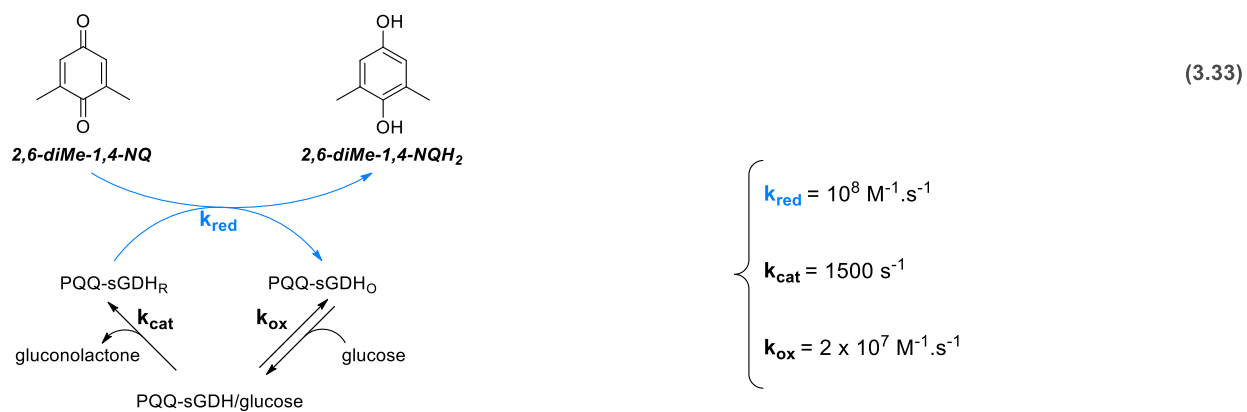
En bas : Temps d'apparition de 50 % de 1,4-NQ, $t_{1/2}$, en fonction du logarithme décimal de la concentration d' H_2O_2 . D'après les résultats de la figure de droite.

Les cinétiques obtenues pour le suivi à 285 nm (**FIGURE 3.46 DE GAUCHE**), correspondent à l'apparition de la forme hydroquinone qui, compte tenu de sa cinétique lente d'auto-oxydation par O_2 , s'accumule dans le milieu réducteur. Lorsque le glucose est totalement consommé, le signal chute brutalement à différents temps (et pour différents maxima d'absorbance) en fonction de la concentration initiale en H_2O_2 . Cette chute coïncide avec l'apparition de la forme oxydée de la benzohydroquinone, suivie à 258 nm (**FIGURE 3.46 DE DROITE**). Il est intéressant de noter la

diminution d'absorbance en fonction du temps lorsque toute la benzoxyhydroquinone est oxydée en benzoquinone. Cette diminution d'absorbance suggère une certaine instabilité de la quinone en milieu aqueux au cours du temps, comme précédemment (voir **section 3.2.4**). Enfin, en traçant $t_{1/2}$, soit le temps d'apparition de 50 % de la quinone en fonction du logarithme de la concentration d' H_2O_2 , nous obtenons une relation linéaire (**FIGURE 3.46 BAS**) qui indique le caractère auto-catalytique du processus.

Comme lors de l'étude de la **4-sis-DBN**, nous avons tenté de vérifier dans quelle mesure nous pouvions rendre compte par simulation du schéma réactionnel auto-catalytique proposé de l'allure des cinétiques expérimentales obtenues. Nous avons donc effectué des simulations numériques à l'aide du logiciel COPASI en combinant le schéma réactionnel précédemment décrit (**section 3.2.4**) dans des conditions de catalyse (**réactions 3.19 à 3.22**) avec le mécanisme ping-pong de la PQQ-sGDH (**réaction 3.32**).





Le résultat des simulations est représenté **FIGURE 3.47**, pour des concentrations fixes en sonde **2,6-diMe-4-DBP** (50 μM), PQQ-sGDH (1 nM) et glucose (100 μM).

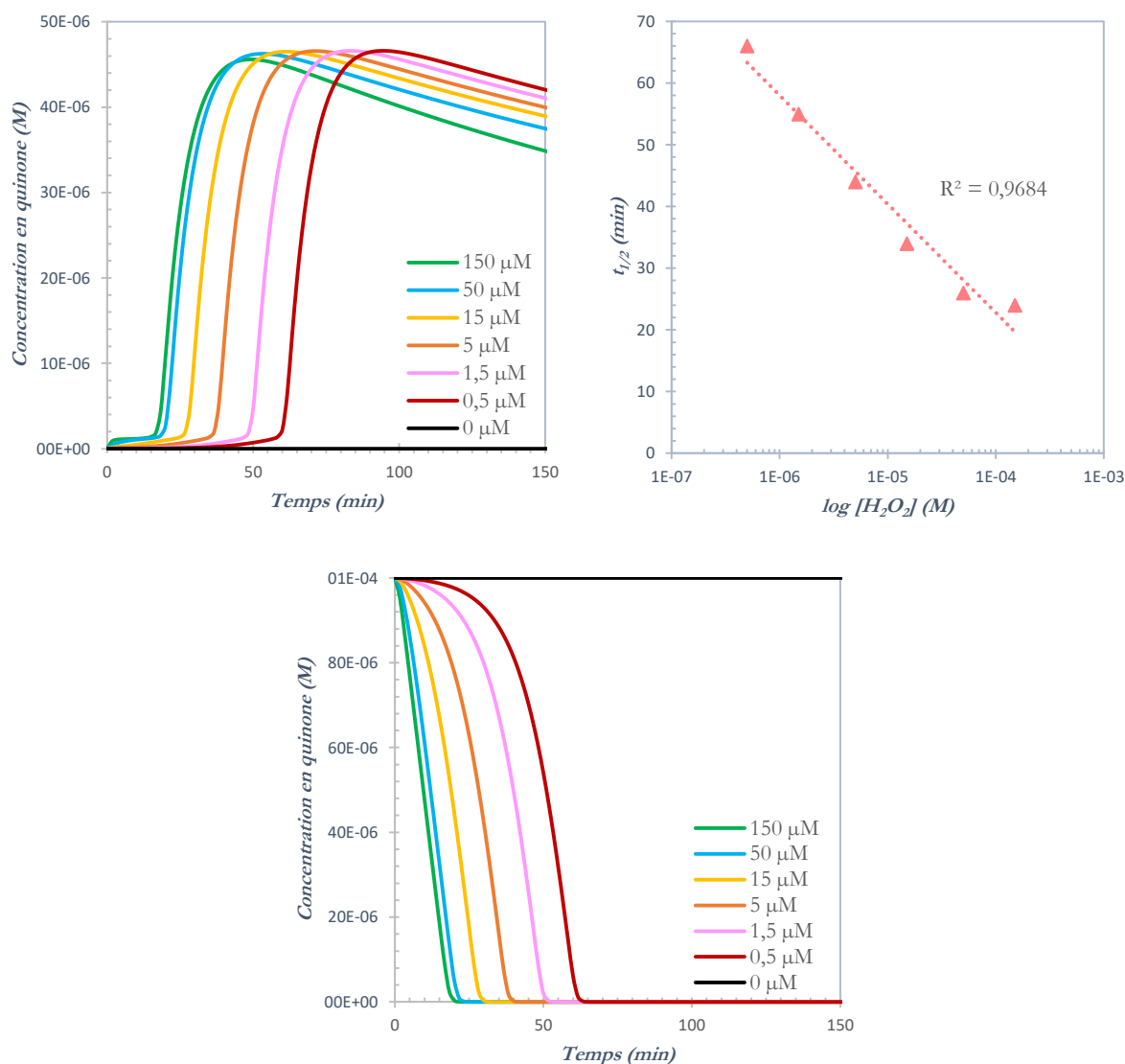


FIGURE 3.47 En haut : Simulation numérique *via* le logiciel COPASI du système auto-catalytique pour la sonde 2,6-diMe-4DBP (50 μM) en milieu réducteur : PQQ-sGDH (10 nM)/glucose (1 mM), en présence d' O_2 (concentration d'oxygène dissous de 250 μM), à différentes concentrations en H_2O_2 . La simulation est réalisée en prenant en compte les réactions 3.19 à 3.22 et 3.33 et leur jeu de constantes cinétiques telles que nous les avons estimées. Suivi de l'apparition de la 2,6-diMe-1,4-BQ (à gauche) et $t_{1/2}$ correspondant (à droite) en fonction de la concentration en H_2O_2 selon une échelle semi-logarithmique.

En bas : Suivi du glucose par simulation numérique *via* le logiciel COPASI pour le même système auto-catalytique pour la sonde 2,6-diMe-4DBP.

La **FIGURE 3.47** montre les simulations de l'évolution des concentrations en **2,6-diMe-1,4-BQ** et glucose au cours du temps. Les courbes cinétiques obtenues pour la consommation du glucose sont bien caractéristiques d'un schéma réactionnel auto-catalytique, à savoir une phase de latence suivie d'une phase d'accélération exponentielle, tandis que la brusque apparition de la

2,6-diméthyle-1,4-benzoquinone signe la consommation totale du glucose ainsi que la cinétique moyennement rapide d'auto-oxydation par O_2 de la benzohydroquinone en benzoquinone.

Pour conclure, nous avons ici pu démontrer qu'il était possible de générer une amplification moléculaire auto-catalytique avec le composé **2,6-diMe-4-DBP** et ce quand bien même sa constante d'auto-oxydation est lente vis-à-vis d' O_2 ($8\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Ce système n'est cependant pas très performant puisqu'il nécessite 5 heures de réaction pour pouvoir détecter $2,5\text{ }\mu\text{M}$ d' H_2O_2 .

3.3.4 Conclusion sur les systèmes auto-catalytiques

Les trois différentes sondes testées au cours de ce travail montrent à quel point le choix de la sonde est important pour aboutir à une réaction auto-catalytique efficace.

En ce qui concerne la sonde **2,6-diMe-4-DBP**, les résultats ne sont pas très encourageants en termes de performances analytiques. Bien que la sonde ait une constante de déprotection oxydative par H_2O_2 supérieure à celle des deux autres sondes testées ($150 > 100\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), l'amplification auto-catalytique reste limitée par la lente auto-oxydation de l'hydroquinone mais aussi par une relativement faible stabilité de la forme quinone en solution aqueuse rendant globalement le recyclage redox Q/QH_2 peu efficace. Il n'en reste pas moins que l'on a bien affaire à une réaction auto-catalytique.

La sonde **1,4-bis-DBN** quant à elle possède à la fois de bonnes constantes $k_{d,1}$ et $k_{d,2}$ de déprotection oxydative par H_2O_2 , et la **1,4-NQH₂** une assez bonne cinétique d'auto-oxydation ($1700\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Cela conduit à une amplification moléculaire auto-catalytique plus performante que pour le composé **2,6-diMe-4-DBP**, ce qui permet d'ailleurs de détecter plus sensiblement H_2O_2 (300 nM d' H_2O_2 en moins d'une heure). Néanmoins, ce système est limité par le passage obligé vers le composé intermédiaire instable **4-DBN** qui, à cause d'une réaction de protodéboronation rapide, contribue à diminuer le rendement de production du couple Q/QH_2 , ce qui *in fine* impacte l'efficacité globale de la réaction. De plus, la réaction de déprotection oxydative plutôt lente de l'intermédiaire **4-DBN** en **1,4-NQH₂** contribue également à la performance moyenne de ce système.

Finalement, le pro QH_2 **4-sis-DBN** donne les meilleurs résultats en auto-catalyse puisqu'il permet de détecter jusqu'à 500 nM de cible en moins de 30 minutes. Ce résultat encourageant était plutôt inattendu vu la lenteur de la réaction de déprotection de l'acide boronique par H_2O_2 ($6\text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). Le problème avec cette sonde est essentiellement lié à son manque de stabilité en solution aqueuse. En effet, elle a tendance à s'hydrolyser de façon spontanée en phase aqueuse, ce qui limite les

performances analytiques par l'apparition prématurée d'une réponse auto-catalytique non-spécifique.

En conclusion, si l'on veut améliorer les performances de cette nouvelle approche d'amplification moléculaire par auto-catalyse, il est nécessaire de *designer* de nouvelles sondes ayant des stabilités et réactivités plus favorables. Pour aller dans cette direction, il est nécessaire d'identifier des systèmes quinoniques ayant la capacité d'effectuer un recyclage redox efficace et c'est ce que nous allons maintenant aborder.

3.4 Détection auto-catalytique de quinones à l'aide de la molécule pro-QH₂ 1,4-bis-DBN

Indépendamment de la détection d'H₂O₂, le concept d'amplification auto-catalytique tel que nous le proposons peut également être mis à profit pour détecter sensiblement des molécules porteuses d'un centre redox et en particulier un centre redox quinonique. En effet, plutôt que de déclencher la réaction d'amplification moléculaire *via* l'ajout d'H₂O₂, il est également envisageable de le faire *via* l'ajout d'une quinone Q à une solution contenant par exemple la sonde **1,4-bis-DBN**, l'enzyme PQQ-GDH et du glucose, conduisant alors au schéma réactionnel de la FIGURE 3.48.

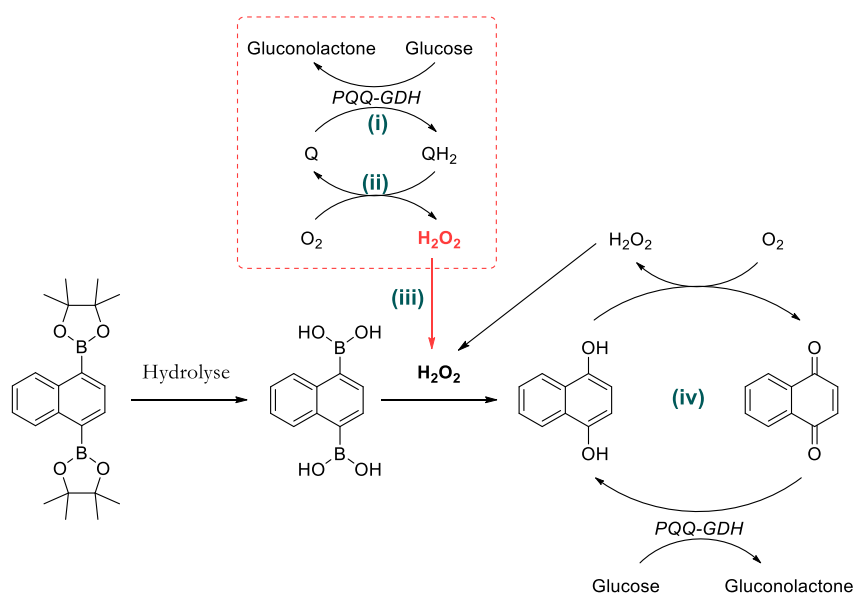


FIGURE 3. 48 Schéma réactionnel de détection de quinones

Dans ces conditions, dès l'introduction d'une concentration infime de quinones, la production d' H_2O_2 par cyclage redox se met en route permettant alors de déprotéger la molécule pro-QH₂ en **1,4-NQH₂** qui elle-même à son tour entre dans un cyclage redox pour produire H_2O_2 , accélérant d'autant la réaction de consommation des réservoirs de pro-QH₂ et de glucose.

3.4.1 Exemple analytique de détection de quinones, la 1,4-naphthoquinone et la 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone

Nous avons d'abord entrepris d'étudier cette approche avec la 1,4-naphthoquinone, laquelle est notre quinone de référence puisque c'est elle que nous générons à partir de la sonde **1,4-bis-DBN**. Les conditions expérimentales employées sont les mêmes que précédemment à savoir : 100 mM de tampon Tris pH 8,5 contenant 10 μM d'EDTA, 10 nM de *holo*-sGDH, 2,5 nM d'*apo*-sGDH et 1 mM de glucose. La seule différence réside dans le fait que cette fois-ci l'initiateur ne sera plus directement H_2O_2 mais **1,4-NQ**. Les cinétiques de disparition de la sonde **1,4-bis-DBN** sont suivies à 290 nm à l'aide du lecteur de microplaques et les résultats obtenus présentés FIGURE 3.49.

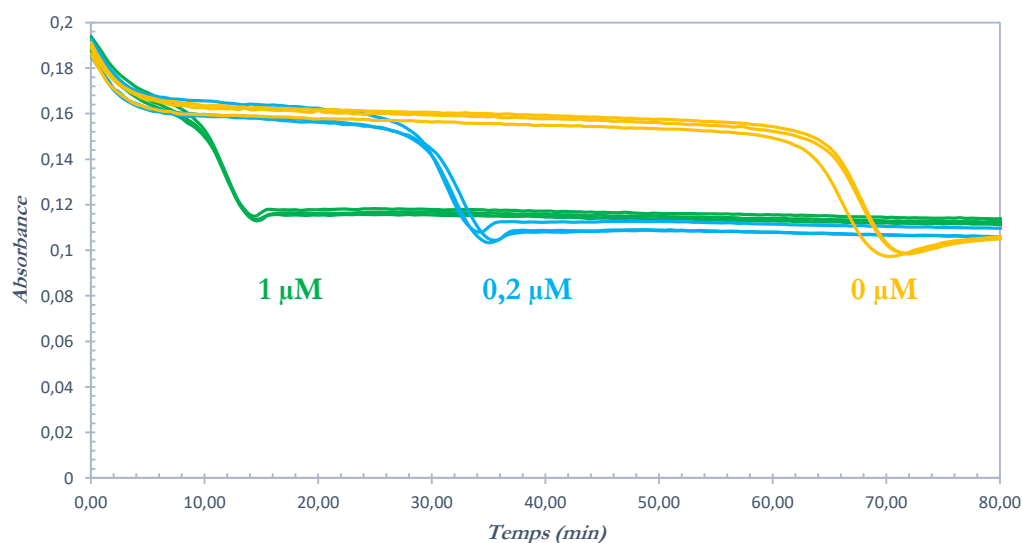


FIGURE 3. 49 Suivi cinétique sur 80 minutes à température ambiante par spectroscopie UV-vis à 290 nm de la conversion de la sonde 1,4-bis-DBN (50 μM) en fonction des différentes concentrations en 1,4-NQ en présence de PQQ-sGDH (10 nM), d'*apo*-sGDH (2,5 nM) et glucose (1 mM) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μM d'EDTA.

Les cinétiques de disparition de la sonde **1,4-bis-DBN** en présence de **1,4-NQ** ont le profil typique d'une cinétique d'auto-catalyse (phase de latence, accélération exponentielle et phase plateau due à la déplétion en sonde). Ces résultats démontrent bien que la détection de la **1,4-NQ**

est possible avec cette approche autorisant une détection de la naphthoquinone de seulement $0,2\ \mu\text{M}$ en une trentaine de minutes. En l'absence d'ajout de **1,4-NQ** on retrouve la réponse non-spécifique qui apparaît au bout d'une heure d'incubation.

Nous avons ensuite répété l'expérience avec la 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone (**2,3-diCl-1,4-NQ**) pour des concentrations allant de $1\ \mu\text{M}$ à $1\ \text{nM}$. Les cinétiques obtenues par suivi spectroscopique UV-vis à $290\ \text{nm}$ sont présentées **FIGURE 3.50**.

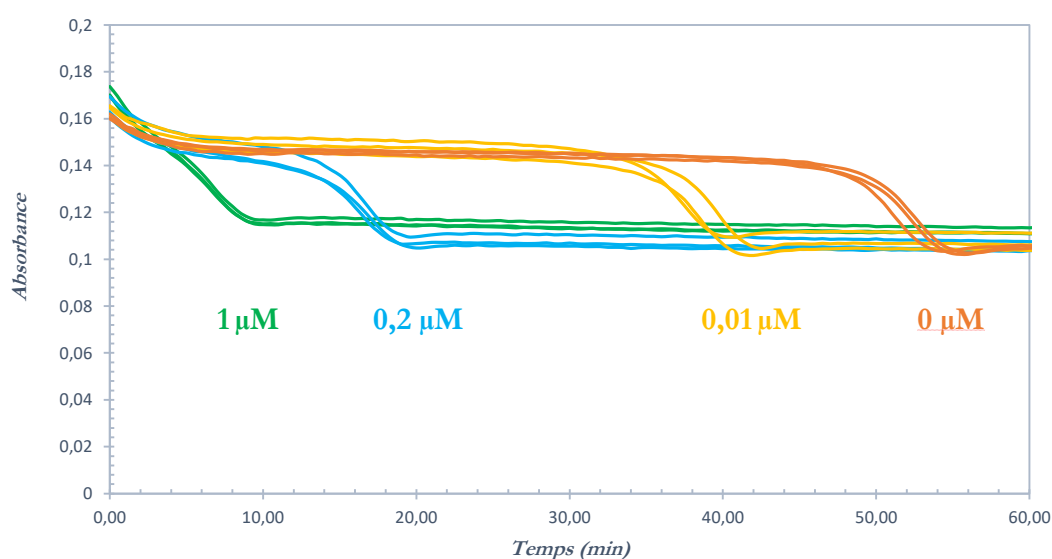


FIGURE 3. 50 Suivi cinétique sur 80 minutes à température ambiante par spectroscopie UV-vis à $290\ \text{nm}$ de la conversion de la sonde 1,4-bis-DBN ($50\ \mu\text{M}$) en fonction des différentes concentrations en 2,3-diCl-1,4-NQ en présence de PQQ-sGDH ($10\ \text{nM}$), d'*apo*-sGDH ($2,5\ \text{nM}$) et glucose ($1\ \text{mM}$) dans un tampon Tris ($100\ \text{mM}$ à pH 8,5) contenant $10\ \mu\text{M}$ d'EDTA.

Encore une fois, les cinétiques obtenues ont le profil typique d'une réaction auto-catalytique. Grâce à cette expérience nous montrons qu'il est possible de déclencher la réaction auto-catalytique à l'aide d'une quinone différente de celle générée par la sonde **1,4-bis-DBN**. La **2,3-diCl-1,4-NQ** contribue d'ailleurs à accélérer la cinétique d'auto-catalyse puisque les seuils de détection sont raccourcis. Il est même possible de détecter jusqu'à $10\ \text{nM}$ de la cible **2,3-diCl-1,4-NQ** en 40 minutes.

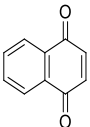
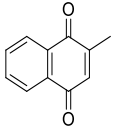
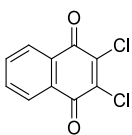
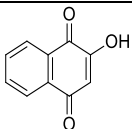
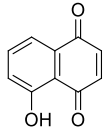
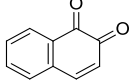
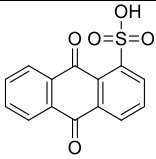
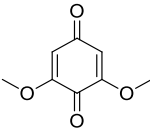
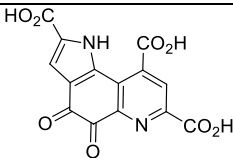
Ces résultats nous confortent dans le fait que chaque quinone a une efficacité de génération d' H_2O_2 qui lui est propre, c'est-à-dire qu'en fonction de sa constante d'auto-oxydation et de son potentiel formel de réduction, elle aura une cinétique et un rendement de production d' H_2O_2 plus ou moins rapide et bon. Ainsi, grâce à cette méthodologie, nous pouvons envisager de tester de nombreux autres systèmes quinoniques afin de les classer en fonction de leur efficacité

d'induction auto-catalytique, c'est d'ailleurs ce que nous avons réalisé comme nous allons maintenant le voir.

3.4.2 Mise en œuvre d'un système entier pour le classement de quinones selon leur efficacité de production d' H_2O_2

Les résultats obtenus pour les diverses quinones sont présentés dans le **TABLEAU 3.10**. La **FIGURE 3.51** quant à elle montre une sélection de différentes cinétiques obtenues pour différentes quinones.

TABLEAU 3. 10 Temps de détection correspondant à la transformation à température ambiante de 90 % de la sonde 1,4-bis-DBN (50 μ M) en fonction de différentes concentrations en quinones, en milieu réducteur PQQ-sGDH (10 nM)/glucose (1 mM) dans tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μ M d'EDTA.

Quinones	Structure	Concentration (μ M)	$E^0(Q/Q^{\cdot-})$ (mV à pH 7,0)	Temps de détection (min) ^a
1,4-NQ		1	-140 ⁸⁴	13 $\pm$ 0
		0,2		33 $\pm$ 1
Ménadione		0,2	-203 ⁸⁹	40 $\pm$ 0
2,3-diCl-1,4-NQ		1	-36 ⁸⁶	8 $\pm$ 0
		0,2		16 $\pm$ 1
		0,02		34 $\pm$ 4
		0,01		36 $\pm$ 2
2-OH-1,4-NQ		0,2	-139 ¹⁰²	nd (Avec le blanc)
Juglone		0,2	-95 ⁸⁷	14 $\pm$ 0
1,2-NQ		0,2	-89 ⁸⁴	50 $\pm$ 1
Anthraquinone sulfonate		0,2	-380 ⁸⁹	nd (Avec le blanc)
2,6-dimethoxy-1,4-BQ		0,2	nd	71 $\pm$ 2
PQQ		1	-114 ⁹⁰	26 $\pm$ 0

^a L'erreur correspond à l'écart type de triplica

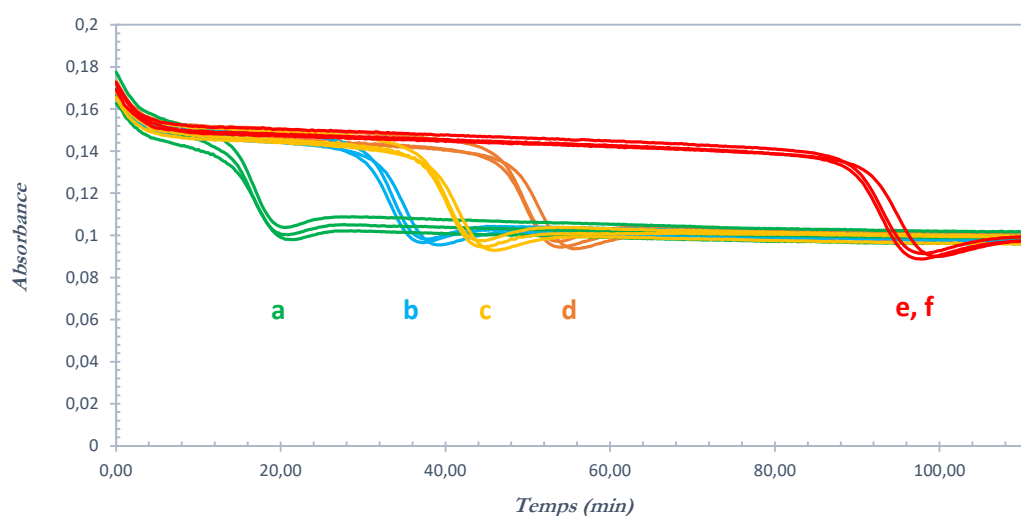


FIGURE 3. 51 Suivi cinétique sur 110 minutes à température ambiante par spectroscopie UV-vis à 290 nm de la conversion de la sonde 1,4-bis-DBN (50 μ M) en fonction des différentes quinones (0,2 μ M) en présence de PQQ-sGDH (10 nM), d'*apo*-sGDH (2,5 nM) et glucose (1 mM) dans un tampon Tris (100 mM à pH 8,5) contenant 10 μ M d'EDTA. **a** : 2,3-diCl-1,4-NQ ; **b** : 1,4-NQ ; **c** : ménadione ; **d** : 1,2-NQ ; **e** : 2-OH-1,4-NQ ; **f** : pas de quinone (non-spécifique).

Au vu de ces résultats, nous pouvons classer les quinones en trois groupes distincts en fonction de leur efficacité d'induction auto-catalytique par rapport à la quinone 1,4-naphthoquinone de référence.

Le premier groupe de quinones regroupe celles qui sont plutôt inefficaces pour activer l'auto-catalyse. Cette inefficacité fait qu'à 0,2 μ M le signal auto-catalytique reste confondu avec la réponse non-spécifique du système **1,4-bis-DBN**. Les quinones présentes dans ce groupe sont de deux sortes, l'anthraquinone monosulfonate, appartenant comme son nom l'indique à la famille des anthraquinones dont le potentiel formel de réduction est plus négatif que celui de la **1,4-NQ** ce qui, théoriquement, est favorable pour son auto-oxydation par O_2 , et la 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone qui elle appartient à la famille des naphthoquinones et devrait donc être également relativement efficace pour réagir avec O_2 et générer H_2O_2 (**FIGURE 3.52**).

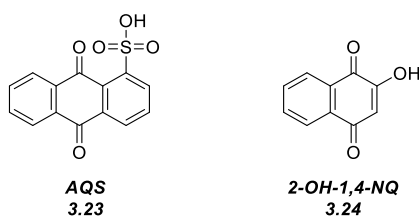


FIGURE 3. 52 Deux quinones inefficaces pour activer l'auto-catalyse : la 2-sulfonate-9,10-anthraquinone (AQS) et la 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone

L'absence de réactivité pour ces deux quinones dans nos conditions peut s'expliquer pour chacune de ces molécules par deux raisons différentes. Concernant l'anthraquinone, la raison de son inactivité tient au fait que son potentiel formel est trop négatif par rapport au $E^{0\prime}$ du centre actif de la PQQ-sGDH, rendant ainsi la réduction enzymatique inefficace. Concernant la **2-OH-1,4-NQ** dont le $E^{0\prime}$ est de -0,14 V, il s'agirait plutôt d'un problème d'incapacité à réduire efficacement O_2 jusqu'au stade d' H_2O_2 , préférant selon certains travaux de la littérature^{103,104} s'arrêter à $O_2^{\cdot-}$.

Le second groupe de quinones regroupe celles dont l'efficacité est intermédiaire et dans l'ensemble d'efficacité inférieure à celle de la **1,4-NQ**. Cela regroupe la ménadione, la 1,2-naphthoquinone et la 2,5-diméthoxy-1,4-benzoquinone (**FIGURE 3.53**).

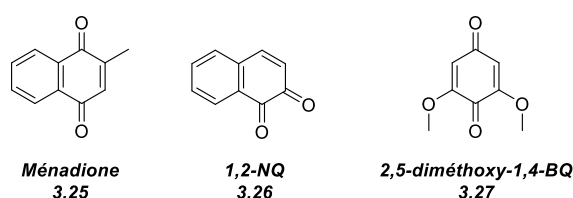


FIGURE 3. 53 Trois quinones moins efficaces que la quinone de référence : la ménadione, la 1,2-naphthoquinone et la 2,5-diméthoxy-1,4-benzoquinone.

La ménadione ou vitamine K_3 est une molécule synthétique analogue de la vitamine K. Elle est donc utilisée dans de nombreux pays, en particulier les pays en voie de développement, comme complément alimentaire. Elle est également intéressante de par ses propriétés anti-cancéreuses, notamment vis-à-vis du cancer de la prostate. Son mode d'action anti-cancéreux serait lié à sa capacité à produire des espèces réactives de l'oxygène. Le groupement donneur méthyle en *ortho* permet de porter le $E^{0\prime}$ de cette molécule à -0,203 V soit 63 mV plus bas que la **1,4-NQ**, ce qui est favorable pour réagir plus rapidement avec O_2 . Malgré cela, dans nos conditions d'auto-

catalyse, il s'avère que la ménadione est moins efficace que la **1,4-NQ**, ce qui encore une fois montre toute l'importance des substituants et de leurs effets sur le cycle quinonique.

La dernière catégorie de quinones regroupe celles qui fournissent les meilleurs résultats, c'est-à-dire la juglone, la 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone et le PQQ (FIGURE 3.54).

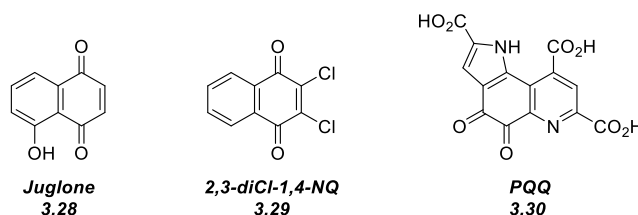


FIGURE 3. 54 Trois quinones plus efficaces que la quinone modèle : la juglone, la 2,3-dichloro-1,4-naphthoquinone et la pyrroloquinoléine quinone.

Avec les deux naphthoquinones on favorise considérablement la production d' H_2O_2 puisqu'il suffit de 15 minutes pour détecter 200 nM de naphthoquinones. Or ce résultat est plutôt contre-intuitif puisque la **2,3-diCl-1,4-NQ** possède le potentiel formel de réduction le plus haut des quinones testées, tandis que la juglone possède un $E^{0'}$ proche de celui de la **1,2-NQ**. Ces deux quinones sont donc des candidates intéressantes pour significativement améliorer le cyclage redox dans un schéma réactionnel auto-catalytique exploitant par exemple les diesters boroniques pro- QH_2 présentés ci-dessous :

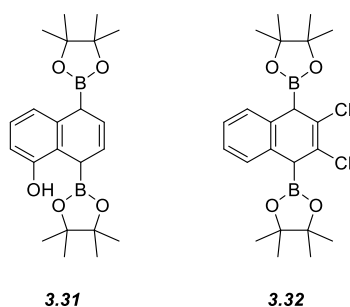


FIGURE 3. 55 Exemples de dérivés diesters boroniques de la juglone (à gauche) et de la 2,3-diCl-1,4-NQ (à droite)

D'autre part, la pyrroloquinoléine quinone, cofacteur de la glucose déshydrogénase, montre également de bons résultats puisque 1 μM en PQQ est détectable en 25 minutes. Ceci indique d'ailleurs que nos hypothèses concernant la présence de traces de PQQ libres capables d'activer

de manière non-spécifique l'auto-catalyse sont tout à fait envisageables et des expériences complémentaires sont donc nécessaires afin de bien identifier la ou les sources des réponses non-spécifiques liées à l'utilisation de la PQQ-sGDH.

Par ailleurs, au vu du bon rendement en eau oxygénée de cette molécule, nous pouvons considérer comme particulièrement intéressant de poursuivre les efforts pour synthétiser les dérivés ester boroniques de la quinone (FIGURE 3.56), tel que proposé au **chapitre 2**.

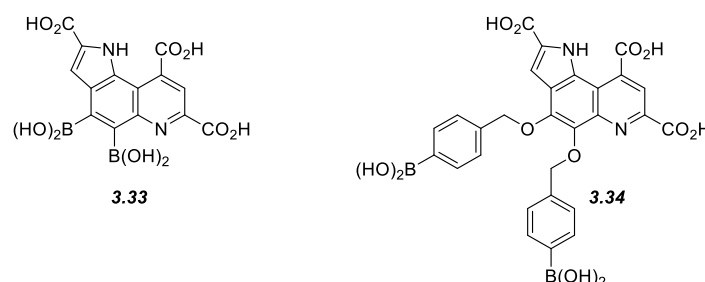


FIGURE 3. 56 Exemples de dérivés diacides boroniques du PQQ

En conclusion, une méthode de caractérisation des quinones *via* leur efficacité de recyclage redox a ainsi été mise en place grâce à notre système auto-catalytique (FIGURE 3.48). Cette méthode permet de sélectionner les quinones ayant un recyclage redox optimal (rendement maximal en H_2O_2) et nous permet de nous projeter sur l'élaboration de nouvelles sondes pro- QH_2 . Les meilleures candidates identifiées sont la 2,3-dichloro-1,4-NQ, la juglone et le PQQ.

3.5 Conclusion et perspective

Si l'on considère l'ensemble des résultats obtenus en auto-catalyse pour les trois sondes que sont la **2,6-diMe-4-DBP**, la **1,4-bis-DBN** et la **4-sis-DBN**, nous pouvons d'ores et déjà proposer le design de nouvelles sondes en vue d'améliorer les performances analytiques de détection d' H_2O_2 devant respecter les trois critères suivants :

- posséder un recyclage redox optimal (c'est typiquement le point faible de la sonde **2,6-diMe-4-DBP**). Grâce à l'étude que nous avons faite dans la dernière section de ce chapitre, nous avons pu identifier trois nouvelles candidates possédant un recyclage redox efficace (dérivés boroniques de la **2,3-diCl-1,4-NQ**, de la juglone et du PQQ).
- conduire à une quinone qui soit stable en milieu aqueux et en présence d' H_2O_2 (c'est également l'autre point faible de la sonde **2,6-diMe-4-DBP**).

- préférentiellement envisager une sonde monoprotégée soit *via* un bras espaceur auto-immolant porteur de l'ester ou acide boronique (à l'image de la sonde **4-sis-DBN**), soit *via* la protection d'un seul des deux groupements hydroxy de l'hydroquinone choisie, à condition que ce dérivé reste stable dans les conditions expérimentales sélectionnées. En effet, bien que la double protection de la **1,4-NQ** ait permis d'obtenir une molécule stable, le fait de devoir rompre deux équivalents d'ester boronique est un frein pour la performance du système. D'ailleurs, nous avons vérifié cette hypothèse en testant la réactivité d'une ménadione diprotégée par des esters boroniques. Dans ce cas, la sonde est très peu réactive vis-à-vis d'H₂O₂ et le système catalytique ne peut être mis en place puisque deux équivalents sont nécessaires pour convertir la sonde en ménadione.

CONCLUSION GENERALE

Le développement d'outils POC non invasifs pour dépister en routine des maladies incapacitantes liées au vieillissement d'un individu est un enjeu majeur pour la société. Le challenge de ce type de dispositif est de réussir à analyser des fluides biologiques facilement accessibles (*i.e.* salive, sueur, sang, urine, larmes, *etc.*) dans lesquels les marqueurs sont présents en très faibles quantités. Pour cela, deux grandes stratégies sont adoptées, soit l'instrumentation analytique est améliorée et complexifiée pour détecter avec précision un marqueur donné dans un échantillon complexe, soit c'est directement le signal qui est amplifié. Au cours de mon travail de thèse, je me suis penchée sur l'amplification moléculaire d'un signal pour la détection de petites molécules. Cette amplification peut se faire de nombreuses façons, comme je l'ai décrit dans le **chapitre 1** de ce manuscrit, et nous avons décidé d'explorer deux modes d'amplification du signal, à savoir une amplification moléculaire du signal due à un événement de reconnaissance cible/récepteur au cours duquel la cible permet de cliver un pro-cofacteur en cofacteur qui active une enzyme, ou bien une amplification du signal par régénération ou amplification de la cible.

Le **chapitre 2** de cette thèse a porté sur une amplification du signal basée sur la reconstitution enzymatique de l'*apo*-sGDH avec son cofacteur PQQ. Nous nous sommes inspirés du système développé par le groupe de Pavlov⁴² avec la HRP, dans lequel un pro-cofacteur est utilisé. Brièvement, en mettant en contact ce pro-cofacteur avec une cible d'intérêt, il est possible de cliver la molécule en cofacteur, ce dernier est alors capable de reconstituer l'enzyme et de l'activer. Cette stratégie dépend fortement dans notre cas de l'obtention d'une sonde pro-PQQ, clivable spécifiquement sous l'action de la cible choisie (H_2O_2 ou F^-). Je me suis ainsi investie dans la synthèse de dérivés de PQQ, sensibles à H_2O_2 ou à F^- , en tentant différentes approches qui n'ont malheureusement pas abouties. Mes travaux montrent que la dérivatisation du PQQ *via* une synthèse totale est très complexe mais ils m'ont permis de mieux appréhender la réactivité de cette quinone particulière, ce qui à terme permettra à mes successeurs d'identifier de nouvelles voies de synthèse pour ce pro-PQQ d'intérêt.

En parallèle de la synthèse totale de ces molécules, j'ai mis en place deux méthodes déterminant la constante d'affinité de quelques analogues du PQQ (que j'ai synthétisés en suivant les principales étapes de la synthèse de Corey et Tramontano avec les améliorations de Martin *et al.*) vis-à-vis de l'*apo*-sGDH. La première méthode se base sur une publication du groupe de Duine portant sur la différence de fluorescence entre l'*apo*-sGDH et la *holo*-sGDH⁴⁹. J'ai alors considéré l'extinction de fluorescence obtenue comme étant liée à l'insertion du cofacteur dans la poche enzymatique, et donc par extrapolation à celle de l'analogue du PQQ dans la poche de l'enzyme, ce qui m'a finalement permis de déterminer les constantes d'affinité des différents analogues. La seconde méthode est une détermination des constantes d'affinité des analogues par compétition lors de la reconstitution de l'enzyme en présence de PQQ. Avec ces deux méthodes, j'ai déterminé pour chaque analogue une constante d'affinité faible (de l'ordre de la dizaine de micromolaires) d'au moins 6 ordres de grandeurs supérieure à celle du PQQ (50 pM). Ces résultats sont plutôt encourageants car cela signifie qu'une faible dérivation du PQQ provoque une perte d'affinité pour l'*apo*-sGDH suffisamment importante pour espérer valider la stratégie d'amplification proposée. Ce travail supporte donc la stratégie présentée de modifier structurellement le PQQ pour l'isoler de l'*apo*enzyme.

Le **chapitre 3** a exploré quant à lui une stratégie basée sur l'auto-oxydation des quinones et leur capacité à générer de l'eau oxygénée. Pour cela, des dérivés esters boroniques de quinones ont été utilisés, puisqu'ils se déprotègent spécifiquement en présence d'H₂O₂. Cette réaction de déprotection oxydante transforme une sonde pro-QH₂ en hydroquinone. Or, en présence d'oxygène, celle-ci s'auto-oxyde immédiatement et génère un équivalent d'H₂O₂. Dans un premier temps un système simple de régénération de la cible a été mis en place avec quatre différentes sondes pro-QH₂. Le **4-DBN**, une 1,4-naphthoquinone dont une des fonctions hydroxyles est protégée par un ester pinacol boronique, s'est révélé très instable dans nos conditions à cause de l'occurrence de réactions secondaires de déprotection oxydative en présence d'O₂ et de protodéboronation. Nous avons alors décidé d'améliorer la stabilité de la sonde pro-QH₂ soit en protégeant les deux fonctions hydroxyles de la 1,4-naphthoquinone (**1,4-bis-DBN**), soit en mono-protégeant la 1,4-naphthoquinone par un groupement benzyl ester boronique capable de s'auto-immoler en présence d'H₂O₂ (**4-sis-DBN**), soit en utilisant une 1,4-benzohydroquinone mono-protégée par un ester boronique (**2,6-diMe-1,4-DBP**). C'est la sonde **2,6-diMe-1,4-DBP** qui a montré les meilleurs résultats en mode catalytique. Elle a notamment permis de détecter jusqu'à 500 nM d'H₂O₂ en moins d'une heure. L'étude mécanistique des systèmes réactionnels de

ces quatre sondes a permis d'extraire des constantes cinétiques propres à chacune, et de vérifier que dans chaque cas la sonde pro-QH₂ peut, sous l'action d'H₂O₂, générer H₂O₂.

Dans un second temps, nous avons utilisé ces sondes en auto-catalyse, c'est-à-dire par amplification de la cible, en ajoutant une enzyme capable de réduire la quinone produite en hydroquinone. Ce cyclage entre la forme oxydée et la forme réduite de la quinone permet de générer H₂O₂ de façon exponentielle. Grâce aux études des cinétiques et à la détermination des constantes en catalyse, nous avons pu « prédire » le comportement des différentes sondes. Par exemple, le **2,6-diméthyle-1,4-DBP** n'est pas du tout efficace car la réaction d'auto-oxydation de l'hydroquinone est beaucoup trop lente. Par contre, les deux autres sondes sont plus prometteuses. Le **1,4-bis-DBN** permet bien d'améliorer le seuil et le temps de détection d'H₂O₂ par rapport à un système en catalyse, même s'il reste gêné par le passage à l'intermédiaire **4-DBN** qui, soit se dégrade lentement par réaction secondaire avec l'oxygène moléculaire pour former la **1,4-NQH₂**, soit nécessite un second équivalent d'H₂O₂. Et enfin, **4-sis-DBN** permet de détecter 500 nM de cible en moins de 30 minutes. Ce résultat est encourageant même s'il nous reste encore à améliorer la stabilité du composé auto-immolant puisqu'en s'hydrolysant spontanément de façon non-spécifique il limite la sensibilité globale du système. L'étude avec les différentes sondes m'a permis de mieux cerner les nombreuses propriétés que doit posséder le pro-QH₂ idéal afin d'avoir un système d'amplification moléculaire auto-catalytique performant (*i.e.* forte constante d'auto-oxydation de l'hydroquinone, réduction enzymatique efficace de la quinone, stabilité de la quinone vis-à-vis d'H₂O₂, stabilité en solution de la sonde pro-QH₂ et de la quinone).

Finalement, nous avons mis au point un système de détection auto-catalytique de quinones à l'aide de la molécule pro-QH₂ **1,4-bis-DBN**. Cette méthode permet de caractériser les quinones selon leur efficacité de recyclage redox. Elle a notamment permis d'identifier des quinones à fort potentiel (bon rendement de production d'H₂O₂) pour notre système de détection d'H₂O₂ et ainsi de diriger la synthèse de pro-QH₂ vers des dérivés monoesters boroniques de la **2,3-diCl-1,4-NQ**, de la juglone et du PQQ. Des efforts de synthèse sont en ce moment fournis pour avoir à disposition les dérivés esters boroniques de ces quinones.

Il est intéressant de noter que si le PQQ porteur d'un ester boronique est finalement synthétisé avec succès, il sera utilisé à la fois dans le système de reconstitution enzymatique (**chapitre 2**) et celui d'auto-catalyse (**chapitre 3**). Bien que cette synthèse soit ardue, elle conduira probablement au fil des prochaines thèses à des systèmes d'amplification moléculaire performants.

ANNEXE 1

REACTIVITE ET SYNTHÈSE DES ACIDES ET ESTERS BORONIQUES

Comme le montrent les quelques exemples décrits dans le chapitre 1, diverses stratégies ont été mises en place pour détecter le peroxyde d'hydrogène, soit comme cible directe, soit comme intermédiaire d'amplification. Le chapitre 3 de ce manuscrit a pour ambition de mettre en œuvre des stratégies d'amplification encore plus efficace concernant la détection d'H₂O₂. Or, le groupe réactif de choix qui présente une sélectivité pour H₂O₂ est l'acide ou l'ester arylboronique. Cette annexe se propose donc de présenter très succinctement quelques-unes des propriétés des acides/esters boroniques afin de compléter les notions abordées dans le chapitre 3.

A1.1 Définition des acides ou esters boroniques

Les acides boroniques sont des composés organo-boreux oxygénés qui forment une classe de molécules organiques possédant un atome de bore trivalent de liaison hybridée sp², lié à un groupement alkyl ou aromatique par une liaison carbone-bore (C-B), ainsi qu'à deux groupes hydroxyles par des liaisons bore-oxygène (B-O). Ces liaisons à l'oxygène sont connues pour être plus courtes et plus fortes que celles des éthers, conférant une assez bonne stabilité à ces composés et accroissant leur caractère polaire dû à la capacité des groupements hydroxyles à former des liaisons hydrogènes. La grande particularité des acides boroniques vient de l'orbitale p vacante portée par l'atome de bore. Elle leur confère un caractère d'acide de Lewis qui leur permet de coordonner des molécules basiques et, par un transfert indirect de proton, d'ioniser l'eau afin de former un adduit tétraédrique, l'ion hydroxyborate, stable selon la règle de l'octet (d'après la configuration type du carbone) (FIGURE A1.1).

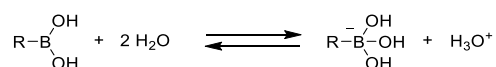


FIGURE A1. 1 Equilibre d'ionisation de l'acide boronique en milieu aqueux

En effet, en milieux aqueux basique, les acides boroniques se comportent bien en acide de Lewis, même s'ils restent des acides de Lewis relativement faibles puisqu'un fort pH est nécessaire pour la formation de cet anion tétraédrique ($pK_{a\text{ moyen}} \sim 9$). Cette acidité participe fortement au caractère électrophile du groupement et favorise la formation et la stabilisation de cet anion tétraédrique boronate. Elle est augmentée lorsque le cycle aromatique R est porteur de groupements pauvres en électrons, et au contraire, diminuée si la position en *ortho* du bore est encombrée, car cela défavorise la formation de l'espèce tétraédrique.

A1.2 Synthèse des acides ou esters boroniques

Synthétisée pour la première fois en 1859 par l'équipe de Frankland^{105,106}, cette molécule abiotique est devenue un intermédiaire de synthèse de choix et est majoritairement utilisée lors du couplage de la réaction de Suzuki^{107,108}, une réaction d'addition 1,4 catalysée au rhodium. Bien plus que pour sa fonction d'acide de Lewis, l'engouement pour ce groupement vient de sa stabilité à l'air et à l'humidité, sa facilité d'utilisation et sa faible toxicité puisque sa dégradation finale conduit à générer l'acide borique, composé à faible impact environnemental. Une étiquette de composé « vert » est souvent rattachée à cette classe de molécules, qui devient même d'un intérêt prometteur dans les thérapies anti-cancéreuses comme nous le démontre l'exemple du Velcade® (FIGURE A1.2).

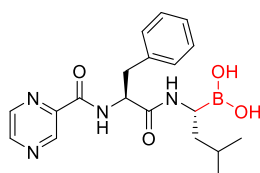


FIGURE A1. 2 Structure du Velcade®

Pour des raisons de synthèse organique, l'acide boronique est souvent utilisé sous sa forme ester pinacol (FIGURE A1.3) (par analogie avec l'acide carboxylique pour lequel le remplacement d'un groupe hydroxyle par un groupe alkoxy ou aryloxy donne une fonction ester), ce qui lui fait perdre son caractère polaire et facilite sa purification, son isolation et sa caractérisation.

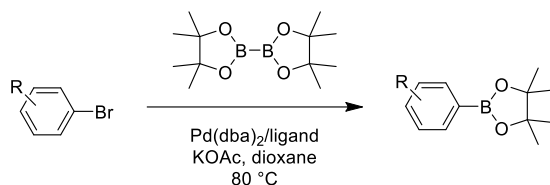


FIGURE A1. 3 Synthèse d'un ester pinacol boronique aromatique : le dioxaborolane, selon le couplage croisé de Miyaura⁹¹

A1.3 Mécanisme de la déprotection oxydative des acides ou esters boroniques par H_2O_2

Depuis sa découverte par Challenger¹⁰⁹ en 1930, le traitement des acides boroniques par l'eau oxygénée en milieu basique afin de produire des phénols a été fortement exploité (FIGURE A1.4).

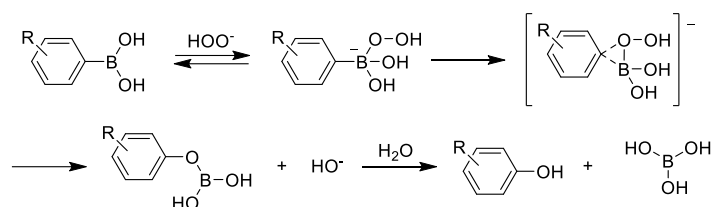


FIGURE A1. 4 Coupure oxydante de la liaison C-B par H_2O_2 en milieux aqueux basique

Le mécanisme réactionnel de cette coupure oxydante se base sur l'attaque nucléophile de HO_2^- sur le bore afin de former un complexe boronate. Cet équilibre est l'étape limitante du processus et est dépendant du pH puisque le taux d'addition de l'anion peroxyde dépend de sa concentration. Le complexe boronate ainsi formé est l'état de transition qui permet la migration bore-oxygène du carbone en ipso (c'est-à-dire la migration de la liaison C-B à la liaison C-O) qui sera suivi par le départ de l'hydroxyde¹¹⁰⁻¹¹².

L'effet des substituants du cycle aromatique R sur la vitesse de la réaction de déprotection oxydative par H_2O_2 a été beaucoup étudié par Kuivila¹¹¹⁻¹¹⁴. Il montre par ailleurs que les effets des substituants en *méta* et *para* sur la vitesse de la réaction est corrélée avec les valeurs de σ de Hammett¹¹².

Quelques travaux publiés dans la littérature proposent un rôle prépondérant des sucres lors de ce processus de coupure de la liaison C-B. Dans certains cas des réactions d'estérifications de l'acide boronique se font en présence de sucre dans le milieu réactionnel et conduisent à une accélération ou à un ralentissement de la coupure oxydante par H_2O_2 . Par exemple, le groupe de

James¹¹⁵ a mis en avant cette dualité *via* l'étude de deux sondes boroniques fluorescente, l'une dite « intégrée » et l'autre « isolée » (FIGURE A1.5), ayant toutes deux des réactivités différentes suite à l'adjonction de fructose sur le boronique.

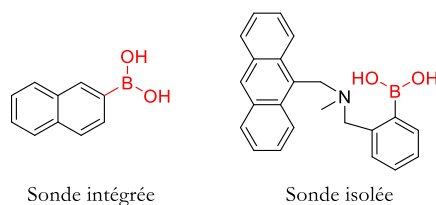


FIGURE A1. 5 Sonde intégrée et sonde isolée présentée par James

Dans le premier cas, la liaison du fructose sur la première sonde provoque l'augmentation du pK_a de l'acide boronique rendant l'ester formé plus acide et ainsi plus électrophile. La liaison C-B de l'ester est ainsi plus facilement oxydable que celle de l'acide. Dans le second cas, l'estérification du boronique favorise l'interaction entre l'amine voisine et l'atome de bore, ce qui réduit son accessibilité par H_2O_2 .

A1.4 Stabilité des acides ou esters boroniques en milieu aqueux

A1.4.1 L'hydrolyse de l'ester pinacol

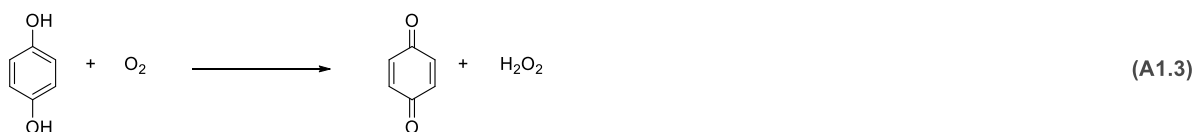
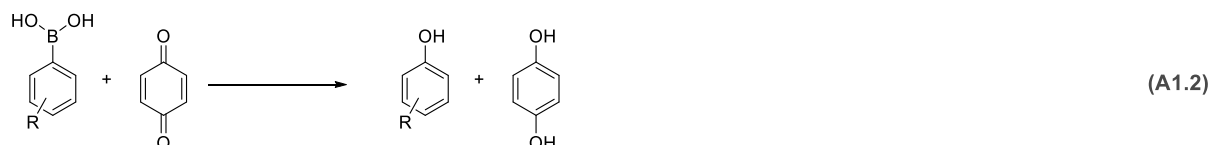
La conversion des esters boroniques en acides boroniques par hydrolyse est une réaction courante quand on manipule des esters boroniques aromatiques en milieu aqueux, *a fortiori* basique^{92,110}. En effet, les esters boroniques subissent une réaction de « saponification », c'est-à-dire que l'attaque nucléophile de l'eau sur le bore est favorisée à pH basique et résulte en la formation d'un groupement acide boronique $-B(OH)_2$.

Cette hydrolyse est dépendante du caractère électrophile du bore, ce qui est médié par les substituants du cycle aromatique. En effet, des substituants électrodonneurs participent à diminuer le caractère électrophile du bore, en accumulant une charge partielle négative sur celui-ci et ainsi défavorisent l'attaque d' H_2O . Ceci est d'autant plus vrai quand le substituant est en *para* du bore. De ce fait, l'hydrolyse de l'ester boronique d'un phénol est plus facile que celle de l'ester boronique d'une aniline, puisqu'un groupe hydroxyle a un plus faible caractère électro-donneur qu'un groupe amine. Par ailleurs, l'hydrolyse peut être ralentie selon l'encombrement stérique sur le cycle dioxaborolane.

A1.4.2 La déprotection oxydative de l'acide boronique en présence d'O₂

Historiquement, les acides arylboroniques étaient couramment employés dans le but de générer des phénols. Des études récentes semblent montrer que cette oxydation de la liaison C-B en présence d'O₂ dépend fortement des substituants des cycles aromatiques et de la possible coordination des ions hydroxyles en milieu basique sur le bore¹¹⁰. Son efficacité dépendrait d'un équilibre entre deux étapes d'addition conjuguée et de migration, chaque étape étant contrôlée par l'aromatisation du fragment de naphthalène. Cette réaction peut d'ailleurs être catalysée par des métaux de transition comme le palladium ou le cuivre¹¹⁰.

Dans la littérature divers groupes tentent de procéder à la déprotection oxydative de la liaison C-B dans des conditions plus douces qu'avec H₂O₂. Par exemple une méthode électrochimique reposant sur le radical anion superoxyde a été développée par Jorgensen en 2012¹¹⁶ tandis qu'une autre se basant sur une forte irradiation UV de la sonde boronique a été étudiée par le groupe de Fu en 2014⁹⁶. D'autre part, cette même année, le groupe de Cui⁹⁸ a montré l'importance de la benzoquinone (BQ) pour la réaction d'hydroxylation des acides boroniques dans l'eau, selon le schéma réactionnel suivant :

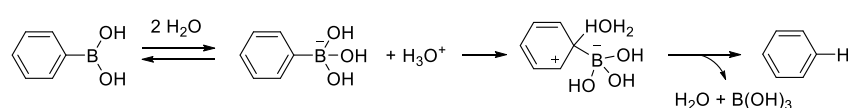


Cette proposition mécanistique du groupe de Cui, repose sur le fait que la benzoquinone agit en tant que catalyseur et oxyde l'anion hydroxyboronate formé à pH basique afin de générer du phénol et de la benzohydroquinone, celle-ci s'auto-oxydant à l'air et générant H₂O₂ et BQ. Il a aussi montré que la benzohydroquinone avait le même effet que la benzoquinone sur le mécanisme réactionnel, puisqu'elle génère de la benzoquinone de façon très rapide.

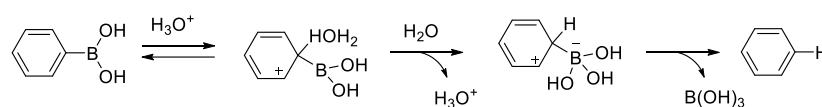
A1.4.3 La protodéboronation

La protodéboronation est une réaction secondaire des acides boroniques assez bien connue, laquelle pose d'ailleurs des problèmes lors du couplage croisé de Suzuki-Miyaura^{107,108,117}. Depuis les années 1960, le groupe de Kuivila s'attache à identifier les mécanismes de protodéboronation et les divisent en quatre groupes comprenant la réaction non-catalysée due au solvant, la catalyse acide, la catalyse basique et la catalyse par des sels métalliques comme le cadmium ou le cuivre (FIGURE A1.6).

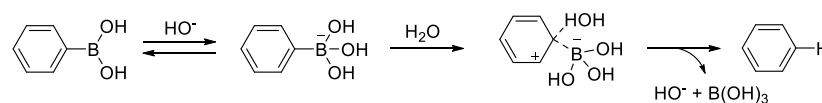
Voie non-catalysée



Voie catalysée par l'acide



Voie catalysée par la base



Voie catalysée par les sels métalliques

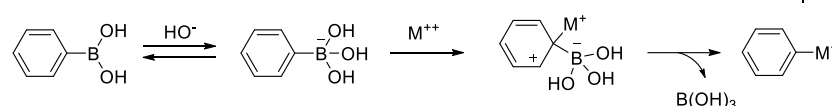


FIGURE A1. 6 Les différents mécanismes de la protodéboronation selon Kuivila

La protodéboronation repose toujours sur deux étapes, c'est-à-dire l'équilibre générant un anion boronate et l'étape limitante de clivage de la liaison C-B. Ces deux étapes ayant des demandes électroniques opposées, tout changement dans les substituants du cycle aromatique tend alors à une augmentation du taux de protodéboronation^{110,118-120}.

ANNEXE 2

PARTIE EXPERIMENTALE

A2.1 La synthèse organique

A2.1.1 Procédures générales

All reactions were carried out under air unless specified. For dry conditions an argon atmosphere and dry solvents were used. Dry *tetrahydrofuran* (THF) and diethyl ether (Et₂O) were distilled over sodium/benzophenone, dry dichloromethane (DCM) were distilled over calcium hydride, and dry dimethylformamide (DMF) and acetonitrile were purchased from Acros Organics. Reactions were magnetically stirred and monitored by thin-layer chromatography (TLC) carried out on 0.25 mm E. Merck silica gel plates (60F-254) using UV-light as visualizing agent, and an ethanolic solution of phosphomolybdic acid and cerium sulfate, and heat as developing agents. Silica gel (60 Å, academic grade, particle size 40–63 µm) was used for flash column chromatography. NMR spectra were recorded on Bruker 400 MHz instrument and calibrated using residual undeuterated solvent as an internal reference. The following abbreviations were used to explain the multiplicities: s = singlet, d = doublet, t = triplet, br = broad.

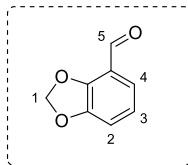
Starting materials reagents were purchased from TCI, Fisher or Sigma-Aldrich.

A2.1.2 Voie A

Benzo[d][1,3]dioxole-4-carbaldehyde (**2.40**)

A flask containing 5.0 g of 2,3-dihydroxybenzaldehyde **2.39** (35.93 mmol) and 19.9 g of cesium carbonate (61.08 mmol) was degassed and kept under an argon atmosphere before the addition of 30 mL of dry DMF. Then, 4.3 mL of dibromomethane (61.08 mmol) were carefully added, the reaction mixture was heated to 70 °C and stirred for 2 hours. Then 1 mL of benzyl bromide (14.25 mmol) was added and the reaction mixture was stirred for 1 more hour (completion was monitored by TLC, 40/60 Pentane/DCM). The reaction mixture was filtrated through celite and

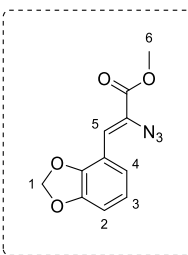
washed with EA. The solvents were distilled out under reduced pressure and the resulting mixture was diluted with 100 mL of water and extracted four time with EA. Organic layers were collected, washed with brine, dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure leading to 4.4 g of **2.40** as a tan solid (29.44 mmol, 82 % yield).



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 10.11 (s, 1H, H-5), 7.28 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-4), 7.01 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, H-2), 6.92 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-3), 6.12 (s, 2H, H-1).

Methyl-2-azido-3-(benzo[d][1,3]dioxol-4-yl)acrylate (**2.41**)

Under an argon atmosphere, 620 mg of **2.40** (4.13 mmol) were dissolved in 12,4 mL of dry DMF, then 12.4 mL of a 0.5 M solution of sodium methoxide in methanol (6.20 mmol) and 2.6 mL of methyl-2-azidoacetate (26.85 mmol) were added at -15 °C. The reaction mixture was stirred at this temperature for 4 hours. The reaction mixture was quenched with 100 mL of NH_4Cl saturated solution and extracted three times with 100 mL of EA. The organic phases were collected, washed with brine, dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude mixture was purified by flash column chromatography (70/30 pentane/DCM to 100 % DCM) affording 209 mg of **2.41** as a yellow oil (0.85 mmol, 20 % yield).

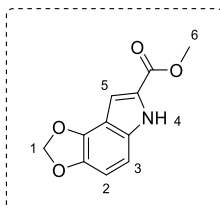


^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.70 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-4), 6.99 (s, 1H, H-5), 6.82 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-3), 6.76 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-2), 5.96 (s, 2H, H-1), 3.87 (s, 3H, H-6).

Methyl 6H-[1,3]dioxolo[4,5-e]indole-7-carboxylate (**2.42**)

Microwave experiment with 50 mg of **2.41** (0.20 mmol) and 4 mL of cyclohexane at 200 °C during 5 minutes. The reaction mixture was concentrated under reduced pressure and a

purification by column chromatography was made (70/30 pentane/DCM) leading to 37 mg of **2.42** as a solid (0.17 mmol, 83 % yield).

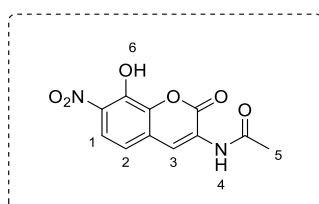


¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂), δ (ppm): 9.04 (bs, 1H, H-4), 7.09 (s, 1H, H-5), 6.98 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-2), 6.94 (d, J = 8.7 Hz, 1H, H-3), 6.04 (s, 2H, H-1), 3.93 (s, 3H, H-6).

A2.1.3 Voie B

N-(8-hydroxy-7-nitro-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetamide (**2.50**)

1.0 g of N-(8-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetamide **2.46** (4.56 mmol) was dissolved with 8 mL of DMF, then 24 mL of acetone and 4.0 g of iron (III) nitrate nonahydrate (2.2 eq, 10.11 mmol) were added to the solution. The reaction mixture was heated to 50 °C and let to react for 4 hours (completion was monitored by TLC, 50/50 EA/CyH). The reaction mixture was quenched with 0.1 N HCl and extracted three times with EA. The organic layers were dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (50/50 EA/CyH to 100 % EA) yielded 400 mg of **2.50** as a yellow oil (1.53 mmol, 34 % yield).

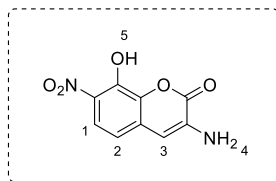


¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): 10.43 (bs, 1H, H-6), 9.59 (s, 1H, H-3), 9.07 (bs, 1H, H-4), 8.10 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H-1), 7.17 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H-2), 2.31 (s, 3H, H-5).

3-amino-8-hydroxy-7-nitro-2H-chromen-2-one (**2.51**)

50 mg of N-(8-hydroxy-7-nitro-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetamide **2.50** (0.19 mmol) were dissolved in 900 μ L of a mix of concentrated HCl/ethanol (2/1). The reaction mixture was heated to reflux (110 °C) and stirred for 1 hour (completion was monitored by TLC: 60/40

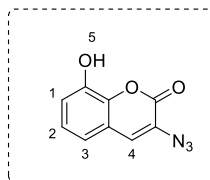
CyH/EA). Purification by column chromatography (60/40 CyH/EA to 100 % EA) yielded 40 mg of **2.51** as a yellow solid (0.18 mmol, 95 % yield).



¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): 10.05 (bs, 1H, H-5), 8.05 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-2), 7.73 (s, 1H, H-3), 6.93 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, H-1), 5.96 (bs, 2H, H-4).

3-azido-8-hydroxy-7-nitro-2H-chromen-2-one (**2.52**)

50 mg of N-(8-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl)acetamide **2.50** (0.23 mmol) were dissolved in 0.9 mL of a mix concentrated HCl/ethanol (2/1). The solution was heated to reflux and stirred for 1 hour. Then, 1.2 mL of iced-water was added to dilute the mixture, the reaction was cooled in an ice-bath and 32 mg of sodium nitrite (0.46 mmol) were added. After 10 minutes of reaction, 45 mg of sodium azide (0.46 mmol) were carefully added by portions. The reaction mixture was stirred for 15 minutes. The obtained precipitate was washed with water and dried under reduced to yield 26 mg of **2.52** as a brown solid (0.13 mmol, 56 % yield).



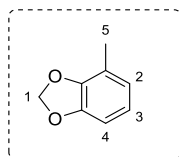
¹H NMR (400 MHz, (CD₃)₂CO), δ (ppm): 9.23 (bs, 1H, H-5), 7.47 (s, 1H, H-4), 7.18 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H, H-2), 7.09 (d, $J = 7.9$ Hz, 2H, H-1 and H-3).

A2.1.4 Voie C

4-methylbenzo[d][1,3]dioxole (**2.56**)

To a solution of 1.00 g of 3-methylcatechol **2.55** (8.0 mmol) in 5.00 mL anhydrous DMF were introduced 5.20 g of Cs₂CO₃ (2 eq, 16.0 mmol) and 1.13 mL of CH₂Br₂ (2eq, 16.0 mmol). The flask was heated to 70 °C and the reaction mixture was vigorously stirred for 2 hours (completion was monitored by TLC : 70/30 CyH/EA). The mixture was filtrated through a pad of celite with EA washing. The organic layer obtained was concentrated under reduced pressure almost to dryness, diluted with water and extracted three times with EA. The organic layers were collected,

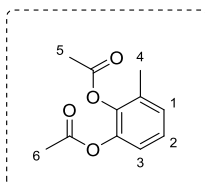
washed with water and with brine, dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (100 % CyH) yielded 0.84 g of **2.56** as a yellow oil (6.2 mmol, 77 % yield).



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.72 (m, 3H, H-2; H-3; H-4), 5.93 (s, 2H, H-1), 2.25 (s, 3H, H-5).

3-methyl-1,2-phenylene diacetate (**2.62**)

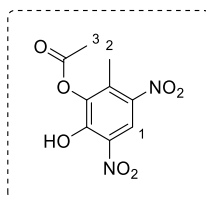
2.00 g of 3-methylcatechol **2.55** (16.1 mmol) were added to 20.0 mL of freshly distilled THF. The flask was cooled down to 0 °C, followed by the addition of 3.4 mL of acetic anhydride (2.2 eq, 35.4 mmol) and 4.8 mL of triethylamine (2.2 eq, 35.4 mmol). The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred overnight. The mixture was diluted with EA, washed with 0.1 N HCl (until complete acidification of the aqueous phase) and washed with brine. The organic layers were collected and dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure to yield 3.43 g of **2.62** as a clear brown-yellowish oil (16.1 mmol, 100 % yield).



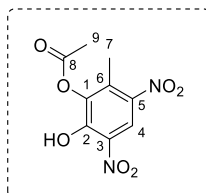
^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): 7.11 (m, 3H, H-1; H-2; H-3), 2.30 (s, 3H, H-6), 2.25 (s, 3H, H-5), 2.18 (s, 3H, H-4).

2-hydroxy-6-methyl-3,5-dinitrophenyl acetate (**2.63**)

1.0 g of 3-methyl-1,2-phenylene diacetate **2.62** (4.8 mmol) were added drop by drop to 5.2 mL of a -15 °C-cooled solution of 100% fuming nitric acid. The reaction mixture was vigorously stirred for 15 minutes, followed by the addition of 40 g of ice. After the complete melting of the ice into the solution, the mixture was filtrated and washed with cold water until the aqueous phase was neutral. Finally the obtained solid was dissolved in methanol and concentrated under reduced pressure to yield 1.14 g of **2.63** as a strong red powder (4.5 mmol, 93 % yield).



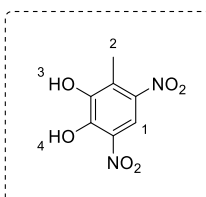
^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): 8.74 (s, 1H, H-1), 2.49 (s, 3H, H-2), 2.44 (s, 3H, H-3).



^{13}C NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): 168.41 (s, 1C, C-8), 151.17 (s, 1C, C-2), 141.79 (s, 1C, C-5), 141.23 (s, 1C, C-1), 136.85 (s, 1C, C-6), 133.23 (s, 1C, C-3), 120.41 (s, 1C, C-4), 20.21 (s, 1C, C-9), 13.95 (s, 1C, C-7).

3-methyl-4,6-dinitrobenzene-1,2-diol (**2.64**)

To a solution of 1.14 g of 2-hydroxy-6-methyl-3,5-dinitrophenyl acetate **2.63** (4.4 mmol) in 20 mL of methanol were introduced 40 drops of 37 % HCl. The reaction mixture was heated to 50 °C and stirred for 5 h (completion was obtained when the initially red solution turned to orange). The mixture was concentrated under vacuo and the obtained solid was washed with water, dissolved by methanol and concentrated under reduced pressure to yield 0.78 g of **2.64** as an orange solid (3.65 mmol 83 % yield).



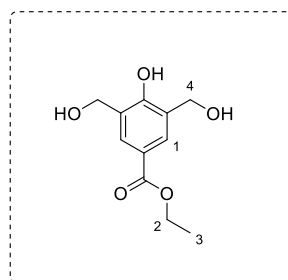
^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$), δ (ppm): 10.92 (bs, 1H, H-4), 9.35 (bs, 1H, H-3), 8.30 (s, 1H, H-1), 2.52 (s, 3H, H-2).

A2.1.5 Synthèse du groupe auto-immolant

Ethyl 4-hydroxy-3,5-bis(hydroxymethyl)benzoate (**2.79**)

10 g of ethyl-4-hydroxybenzoate **2.78** (60.0 mmol) were added to 47 mL of a 0 °C - cooled **3 M** NaOH solution (140.0 mmol), followed by the addition of 40 mL of an excess 37 %

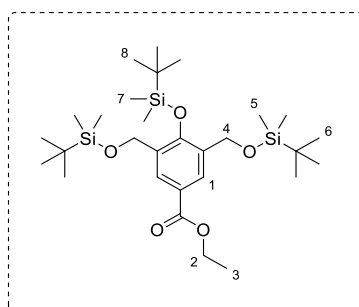
formaldehyde solution (1440.0 mmol). The reaction mixture was put between 55 to 60 °C during 5 days with vigorous stirring (completion was monitored by TLC: EA/Hexane 3/2). The colorless solution became red after the end of the reaction. The mixture was diluted with EA and washed with NH₄Cl twice. Finally the organic layers were collected, dried over MgSO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by recrystallization with EA to give a negligible amount of white spheric cristals. Then, a new purification by flash chromatography (80/20 cyH/ EA then 50/50 then 100 % EA) afforded **2.79** as a white powder weighing 5.8 g (25.6 mmol, 43 % yield).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.66 (s, 2H, H-1), 4.72 (s, 4H, H-4), 4.25 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-2), 1.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H, H-3).

Ethyl 4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3,5-bis(((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)methyl)benzoate (**2.80**)

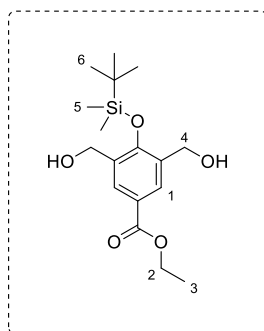
To a solution of 242 mg of **2.79** (0.71 mmol) in 5 mL DMF, at 0 °C were introduced 160 mg of imidazole (2.3 mmol) and 347 mg of *tert*-butyldimethylsilyl chloride (2.3 mmol). The flask was warmed to room temperature and the reaction mixture was stirred for 2 hours (completion was monitored by TLC: 95/5 H/EA). The mixture was diluted with ether, washed with saturated NH₄Cl solution and brine. The organic layers were collected and dried over Na₂SO₄, filtrated and concentrated under reduced pressure. Purification by column chromatography (99/1 H/EA) yielded 305 mg of **2.80** as a colorless oil (0.54 mmol, 76 % yield).



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8.08 (s, 2H, H-1), 4.69 (s, 4H, H-4), 4.31 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-2), 1.35 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-3), 1.00 (s, 9H, H-8), 0.93 (s, 18H, H-6), 0.17 (s, 6H, H-7), 0.07 (s, 12H, H-5).

Ethyl 4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3,5-bis(hydroxymethyl)benzoate (2.81**)**

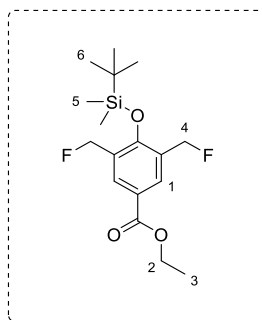
In a flask, 1.15 g of **2.80** (2.02 mmol) and a catalytic amount of *para*-toluenesulfonic acid were dissolved in 11.5 mL of methanol. The reaction mixture was stirred at room temperature during 20 minutes (completion was monitored by TLC: 40/60 EA/cyH). The reaction mixture was diluted with EA, washed with NaHCO_3 saturated solution and brine. The organic layers were dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure to yield 0.69 g of **2.81** as a white solid (2.02 mmol, 100 % yield).



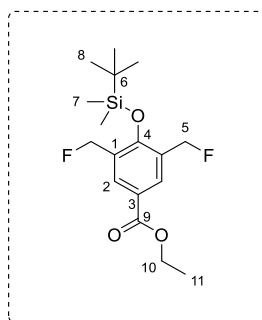
^1H NMR (400 MHz, CD_3OD), δ (ppm): 8.09 (s, 2H, H-1), 4.65 (s, 4H, H-4), 4.34 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-2), 1.38 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-3), 1.05 (s, 9H, H-6), 0.24 (s, 6H, H-5).

Ethyl 4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3,5-bis(fluoromethyl)benzoate (2.77**)**

In a flask, 150 mg of **2.81** (0.44 mmol) were dissolved in 7 mL DCM. The reaction mixture was cooled down to -78°C and 265 μL of DAST (1.80 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at -78°C for 5 min (completion was monitored by TLC: 20/80 EA/CyH). After warming to room temperature, the reaction mixture was quenched with 2 mL of water, diluted with EA and washed twice with brine. The organic layers were dried over MgSO_4 , filtrated and concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by flash chromatography (10/90 EA/CyH) to yield 67 mg of **2.77** as a yellowish oil (0.19 mmol, 44 % yield).



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8.10 (s, 2H, H-1), 5.38 (d, 4H, H-4, $J = 47.7$ Hz), 4.34 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-2), 1.37 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-3), 1.02 (s, 9H, H-6), 0.20 (s, 6H, H-5).



^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 165.81 (1C, C-9), 155.34 (1 C, C-4), 132.67 (2C, C-2), 127.99 (d, $J = 16.9$ Hz, 2C, C-1), 124.62 (1C, C-3), 79.79 (d, $J = 166.9$ Hz, 2C, C-5), 61.20 (1C, C-10), 26.10 (3C, C-8), 19.00 (1C, C-6), 14.54 (1C, C-11), -3.75 (2C, C-7).

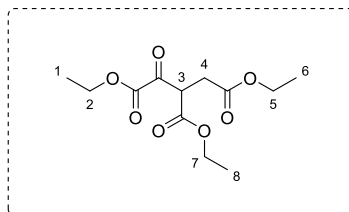
^{19}F NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): -208.58 (t, $J = 49.0$ Hz).

A2.1.6 Synthèse des analogues de PQQ

Triethyl oxalylsuccinate (**2.89**)

Under argon, to a solution of 6.8 g of sodium ethoxide (100 mmol, 1 eq) in 65 mL of anhydrous ether were added 13.64 mL of diethyl oxalate (100 mmol, 1 eq). The solution becomes instantaneously yellow. Into this solution were added 16.75 mL of diethyl succinate (100 mmol, 1 eq). The mixture was stirred at room temperature for 12 hours, then the solution became red and completely soluble. The mixture was thereafter hydrolyzed by the addition of 50 mL of water with vigorous stirring. The aqueous layer was recovered and the organic layer was extracted with 15 mL of water. The ether layer was discarded while the combined aqueous layers were then acidified with 10 mL of 12 N hydrochloric acid and the oily layer was collected. The aqueous layer was extracted with 3 x 15 mL of ether, and the organic phases were added to the oily layer.

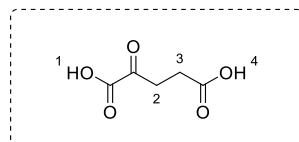
The final ethereal solution was dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered, concentrated and dried under vacuum. 25.4 g of **2.89** were obtained as a yellow oil (93 mmol, 93% yield).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 4.60 (dd, $J = 5.1, 3.8$ Hz, 1H, H-3), 4.30 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-2), 4.13 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-5), 4.08 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-7), 2.91 (dd, $J = 3.8$ Hz, 5.1 Hz, 2H, H-4), 1.32 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-1), 1.19 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-6), 1.18 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-8).

α -Ketoglutaric acid (**2.90**)

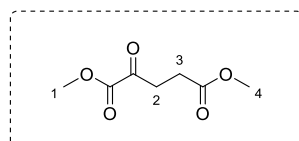
A mixture of 50.0 g of **2.89** (0.18 mol), 66 mL of 12 N hydrochloric acid, and 132 mL of water was heated at reflux for 4 hours. This mixture was then distilled to dryness under reduced pressure at a temperature of 50 °C. Two 100-mL portions of toluene were successively added and evaporated under reduced pressure to remove traces of water by azeotropy. **2.90** was obtained as a pale yellow solid (25.9 g, 0.15 mmol, 98 % yield).



¹H NMR (400 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 3.11 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-2), 2.62 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-3).

Dimethyl 2-oxoglutarate (**2.91**)

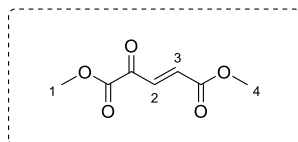
3.0 g (20.95 mmol) of **2.90** were dissolved in a mix of methanol (MeOH) and concentrated hydrochloric acid (HCl) (50:1 mL). This reaction mixture was heated under reflux at 60 °C for 1 hour. A fast purification by column chromatography under pressure (pentane/ ether = 1.5:1) was carried out. 1.6 g of **2.91** were isolated as a yellow oil (9.20 mmol, 44 % yield).



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 3.82 (s, 3H, H-1), 3.62 (s, 3H, H-4), 3.11 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-2), 2.62 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-3).

Dimethyl 2-oxoglutaconate (**2.92**)

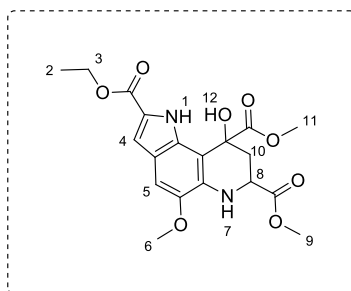
A solution of 200 mg of **2.91** (1.15 mmol) in 754 μL of DCM was heated under reflux for 15 minutes. Then a solution of 56 μL of bromine (0.96 eq, 1.10 mmol) in 240 μL of dichloromethane was added dropwise over a 45-min period during the reflux. The reaction mixture was refluxed and was stirred for 3.5 hours. After transferring the solution into a 100 mL flask, it was concentrated under reduced pressure and ether was added to remove all traces of DCM. The resulting powder was then dissolved in 6.56 mL of ether and, after complete dissolution, 150 μL of triethylamine (0.88 eq, 1.01 mmol) were added dropwise. The reaction mixture was stirred for 45 min and was filtrated over silica to remove HBr salts and the silica was washed with ether. After evaporation of the solvent, 200 mg g of **2.92** were obtained as a yellow powder (0.85 mmol, 74 % yield).



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.54 (d, $J = 16$ Hz, 1H, H-2), 6.89 (d, $J = 16$ Hz, 1H, H-3), 3.85 (s, 3H, H-1), 3.76 (s, 3H, H-4).

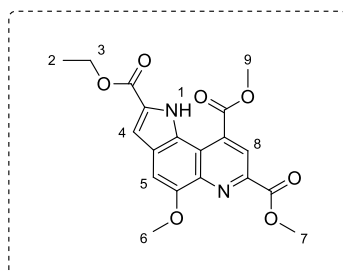
5-Methoxy-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2,7,9-tricarboxylic acid 2-ethyl ester 7,9-dimethyl ester (**2.82**)

A solution of 1 g of ethyl 6-amino-5-methoxy-1H-indole-2-carboxylate (4.27 mmol) in 8.51 mL of DCM was mixed with a solution of 1.101 g of **2.92** (6.40 mmol) in 4.47 mL of DCM. The reaction was stirred at room temperature for 7 hours and a sample of the obtained compound **2.93** was analyzed by ^1H NMR to check the advancement of the reaction.



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.58 (bs, 1H, H-1), 7.00 (s, 1H, H-5), 6.87 (s, 1H, H-4), 5.38 (bs, 1H, H-7), 4.28 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-3), 4.06 (m, 1H, H-8), 3.84 (s, 3H, H-9), 3.78 (s, 3H, H-11), 3.66 (s, 3H, H-6), 2.50 (m, 2H, H-10), 1.31 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-2).

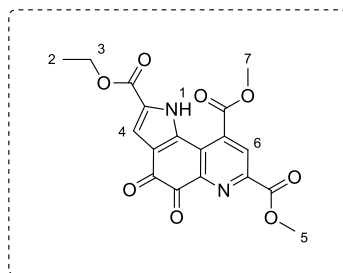
After verification of the completion of the previous reaction by NMR analysis, 0.85 g of copper acetate was added to the mixture and a stream of anhydrous HCl gas was bubbled for 15 min. The reaction medium was then exposed to air and stirred for 10 h. The reaction was afterwards diluted in 50 mL of DCM and the organic phase was washed with 3 x 250 mL of a 5 % sodium bicarbonate aqueous solution (or until the aqueous layer goes from a deep blue to a colorless solution) and 250 mL of brine. The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered and the solvent was removed under reduced pressure. The solid residue was then purified by flash chromatography (DCM/MeOH: 99.9/0.1). 1.17 g of **2.82** was isolated as a yellow-orange powder (3.11 mmol, 73 % yield).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 12.12 (bs, 1H, H-1), 8.90 (s, 1H, H-8), 7.29 (s, 1H, H-5), 7.23 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-4), 4.40 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-3), 4.10 (s, 3H, H-7), 4.06 (s, 3H, H-9), 4.03 (s, 3H, H-6), 1.39 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-2).

4,5-Dioxo-4,5-dihydro-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2,7,9-tricarboxylic acid 2-ethyl ester 7,9-dimethyl ester (**2.83**)

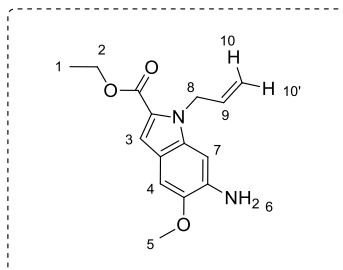
0.87 g of **2.82** (2.32 mmol) were dissolved in 20 mL of a mix of water/acetonitrile (1/4) and cooled at 0°C. 7.01 g of Ceric Ammonium Nitrate (12.76 mmol) were added and the reaction medium was stirred for 10 minutes at 0°C. Completion of the reaction was checked by TLC (DCM/AcOEt : 4/1) and the mixture was diluted in 100 mL of water and extracted with 2 x 100 mL of a mix of AcOEt/DCM (4/1). The organic layer was then dried over sodium sulfate, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. 815 mg of **2.83** were obtained as a red powder (2.18 mmol, 94 % yield).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 12.86 (bs, 1H, H-1), 8.82 (s, 1H, H-6), 7.41 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H-4), 4.36 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-3), 4.11 (s, 3H, H-5), 4.00 (s, 3H, H-7), 1.36 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-2).

Ethyl 1-allyl-6-amino-5-methoxy-indole-2-carboxylate (**2.87**)

Under argon atmosphere, 10 mg of ethyl 6-amino-5-methoxy-1H-indole-2-carboxylate (0.043 mmol) were dissolved in dry acetonitrile at -20 °C. Then 85 μ L of KHMDS (0.043 mmol) were added onto the solution and the solution was stirred for 30 minutes at -20 °C. Thereafter, 11 μ L of allyl bromide were put in the reaction mixture and the stirring was continued for 4 hours at the same temperature. After completion of the reaction the solvent was evaporated and the resulting mixture was purified by flash chromatography (DCM/MeOH = 99.5:0.5 then DCM/MeOH = 98/2) to afford 11 mg of **2.87** (0.040 mmol, 94 % yield).

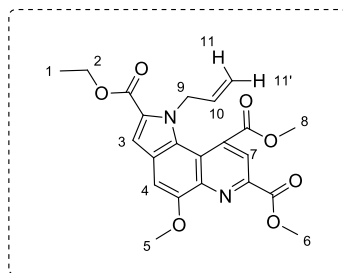


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.18 (s, 1H, H-4), 6.92 (s, 1H, H-3), 6.56 (s, 1H, H-7), 5.96 (m, 1H, H-9), 5.07 (m, 2H, H-8), 5.06 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H, H-10'), 4.84 (d, $J = 17.3$ Hz, 1H, H-10), 4.30 (q, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-2), 3.92 (bs, 2H, H-6), 3.87 (s, 3H, H-5), 1.36 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H, H-1).

5-Methoxy-1-allyl-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2,7,9-tricarboxylic acid 2-ethyl ester 7,9-dimethyl ester (**2.85**)

55 mg of **2.87** (0.20 mmol) were dissolved in 468 μ L of DCM and a solution of 51.6 mg of **2.92** (0.30 mmol) in 246 μ L of DCM was added. This solution was stirred at room temperature for 7 hours. After this time, 40 mg of copper acetate were added (0.22 mmol) and an HCl/air stream was bubbled in the solution. DCM was added as many times as needed to keep constant the

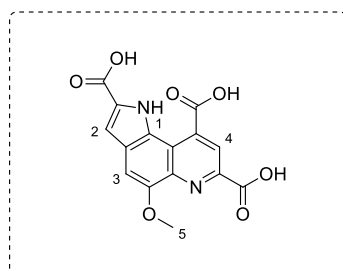
solvent volume in the flask during the bubbling. Then the mixture was stirred for 10 hours, in presence of air. The solution was then washed with a solution of aqueous sodium bicarbonate 5 % (to remove copper impurities), then with brine. Finally, the organic phase was dried with magnesium sulfate, filtered and the solvent was evaporated. The resulting powder was purified by flash chromatography (DCM/MeOH = 99.5/0.5). 82 mg of the three ring compound **2.85** were isolated as a yellow powder (0.20 mmol, 100% yield).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.58 (s, 1H, H-7), 7.39 (s, 1H, H-4), 7.22 (s, 1H, H-3), 5.30 (m, 1H, H-10), 5.25 (s, 1H, H-), 5.00 (d, J = 5.6 Hz, 2H, H-9), 4.75 (d, J = 10.3 Hz, 1H, H-11'), 4.60 (d, J = 16.9 Hz, 1H, H-11), 4.30 (q, J = 7.2 Hz, 2H, H-2), 4.06 (s, 3H, H-6), 4.03 (s, 3H, H-8), 4.01 (s, 3H, H-5), 1.36 (t, J = 7.2 Hz, 3H, H-1).

5-methoxy-1H-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2,7,9-tricarboxylic acid (**2.84**)

50 mg of **2.82** (0.13 mmol) were dissolved in 4 mL mix of 0.5 M aqueous solution of LiOH and THF (67:33). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30.5 hours (advancement was monitored by TLC: 4/1 DCM/EA). The reaction mixture was then acidified with 1 N HCl to reach pH 6 before being concentrated under reduced pressure. Next, the crude product was dissolved in water (until neutral pH) and concentrated HCl was carefully dropwise added leading to the precipitation of the product. The powder was washed with cold 1 N HCl, and recovered by dissolution in DMF/Toluene mix (50/50). 35 mg (0.10 mmol, 80 % yield) of **2.84** as a pure brown powder were obtained by this way.

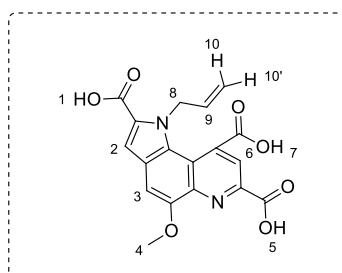


¹H NMR (400 MHz, DMF_d/Toluene_d), δ (ppm): 12.62 (bs, 1H, H-1), 8.99 (s, 1H, H-4), 7.38 (s, 1H, H-3), 7.30 (s, 1H, H-2), 3.85 (s, 3H, H-5).

5-Methoxy-1-allyl-pyrrolo[2,3-f]quinoline-2,7,9-tricarboxylic acid (**2.86**)

20 mg of **2.85** (0.048 mmol) were dissolved in 1 mL of THF and 0.96 mL of a 0.5 M LiOH solution (0.48 mmol) and the reaction medium was stirred for 31 hours at room temperature. The mixture was then acidified to reach pH 6, the solvent was evaporated and the resulting powder was diluted in water. The solution was transferred in a 100 mL Erlenmeyer flask and 12 N HCl was carefully added dropwise until full precipitation of the product. The solution was then filtered and the residue was washed with cold 1N HCl. The product was retrieved from the filter with MeOH.

17 mg of **2.86** were isolated after evaporation of the solvent (0.041 mmol, 85 % yield).

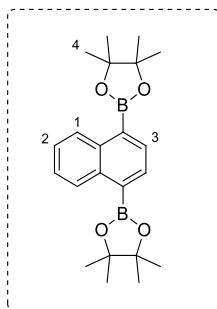


¹H NMR (400 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 8.57 (s, 1H, H-6), 7.56 (s, 1H, H-3), 7.51 (s, 1H, H-2), 5.42 (m, 1H, H-9), 5.24 (d, J = 5.5 Hz, 2H, H-8), 4.79 (d, J = 10.3 Hz, 1H, H-10'), 4.60 (d, J = 17.1 Hz, 1H, H-10), 4.14 (s, 3H, H-4).

A2.1.7 Synthèse de pro-QH₂

1,4-bis(4,4,5,5-tétraméthyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)naphthalène, *1,4-bis-DBN* (**3.14**)

To a solution of 250 mg of 1,4-dibromonaphthalene (0,86 mmol) in 9 mL of dry DMF were introduced 978 mg of bis(pinacolato)diboron (4,4 eq 3,85 mmol) and 515 mg of KOAc (6 eq 5,25 mmol). The reaction mixture was stirred for 20 minutes, followed by the addition of 64 mg of PdCl₂(CH₃CN)₂ (0,28 eq 0,25 mmol) and 136 mg of 1,1'-bisdiphenylphosphine Fc (0,28 eq 0,25 mmol). The reaction mixture was stirred for 10 minutes. The mixture was transferred to a microwave vial and it was heated to 120 °C for 20 minutes. The reaction mixture was diluted in Et₂O and filtrated over silica. Purification by column chromatography (CyH/H 94/6) yielded a pale brown solid.



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8.74 (dod, $J = 6.4$ Hz, 2H, H-1), 8.01 (s, 2H, H-3), 7.50 (dod, $J = 6.4$ Hz, 2H, H-2), 1.41 (s, 24H, H-4).

A2.2 La biochimie

A2.2.1 Procédure générale

Reagents

PQQ, D-glucose, NADH, Triton X-100, 2,6-dichloroindophenol (DCPIP), phenazine methosulfate (PMS), 1,4-NQ, menadione, 2,3-diCl-1,4-NQ, 2-OH-1,4-NQ, juglone, 1,2-NQ, *para*-anthraquinone sulfonate and 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone were purchased from Sigma and used without further purification. Salts for buffer solutions (Tris-HCl, PBS, HEPES, Borax, CaCl_2) were obtained from Sigma. The *apo*-sGDH was produced by controlled expression in an *E.coli* strain by Nicolas Mano's group¹²¹. Diaphorase was purchased from Nipro and was centrifugated ($11\,000 \times g$, 30 min, 4 °C) using a Nanosep membrane of 10 kDa MWCO (Pall Corporation) pre-equilibrated with PBS buffer.

Double-deionized water (18.2 M Ω cm, TKA Micro-Pure UV) was used to prepare all aqueous solutions. Glucose solutions were allowed to mutarotate to the anomeric equilibrium for 1 day before use. All H_2O_2 , PMS and NADH solutions were prepared freshly. The concentration of PQQ was determined spectrophotometrically using a molar extinction coefficient of 19 000 M $^{-1}$.cm $^{-1}$ at 250 nm.

Instrumentation

Specord S-600 spectrophotometer (Analytical-Jena)

Cary eclipse fluorescence spectrophotometer

Microwell plate spectrophotometer: TECAN

Disposable cuvettes made of PMMA from Brand and UV-transparent Corning® disposable 96-well plate were used.

A2.2.2 Reconstitution de l'*apo*-sGDH avec son cofacteur PQQ

50 pM of *apo*-sGDH were incubated for accurately 1 hour at room temperature with various concentrations of PQQ (from 10 pM to 1 nM) in the reconstitution buffer (0.1 M Tris pH 7.4 containing 3 mM CaCl₂ and 0,1 % of Triton X-100). To this incubated solution were added 50 µM DCPIP, 1 mM freshly prepared PMS solution and 5 mM glucose.

The evolution of the reaction (*i.e.* the discoloration of DCPIP) is followed using a UV-vis spectrophotometer at $\lambda = 606$ nm, data recorded each 2 s for 200 s.

A2.2.3 Détermination du facteur δ

50 pM of *apo*-sGDH were incubated for accurately 1 hour at room temperature with 15 pM or 400 pM of PQQ in the reconstitution buffer (0.1 M Tris pH 7.4 containing 3 mM CaCl₂ and 0,1 % of Triton X-100). To this incubated solution were added 50 µM DCPIP, 1 mM freshly prepared PMS solution and various concentrations of glucose (from 400 µM to 50 mM).

The evolution of the reaction (*i.e.* the discoloration of DCPIP) is followed using a UV-vis spectrophotometer at $\lambda = 606$ nm, data recorded each 2 s for 120 s.

A2.2.4 Suivi d'un changement conformationnel de l'*apo*-sGDH via la fluorimétrie

En présence de PQQ

To a solution of 200 pM of *apo*-sGDH diluted in reconstitution buffer (0.1 M Tris pH 7.4 containing 3 mM CaCl₂ and 0,1 % of Triton X-100) were introduced 400 pM of PQQ.

The fluorescence spectrum was recorded from 300 nm to 400 nm with $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm.

En présence d'analogue

To a solution of 200 pM of *apo*-sGDH diluted in reconstitution buffer (0.1 M Tris pH 7.4 containing 3 mM CaCl₂ and 0,1 % of Triton X-100) were introduced increasing concentrations of analogue (from 400 pM to 135 µM). 1 mM analogue solutions were generally prepared as

followed: first the solid powder was dissolved in 100 μL ACN, then 900 μL milliQ water were added.

The fluorescence spectra were recorded from 300 nm to 400 nm with $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm.

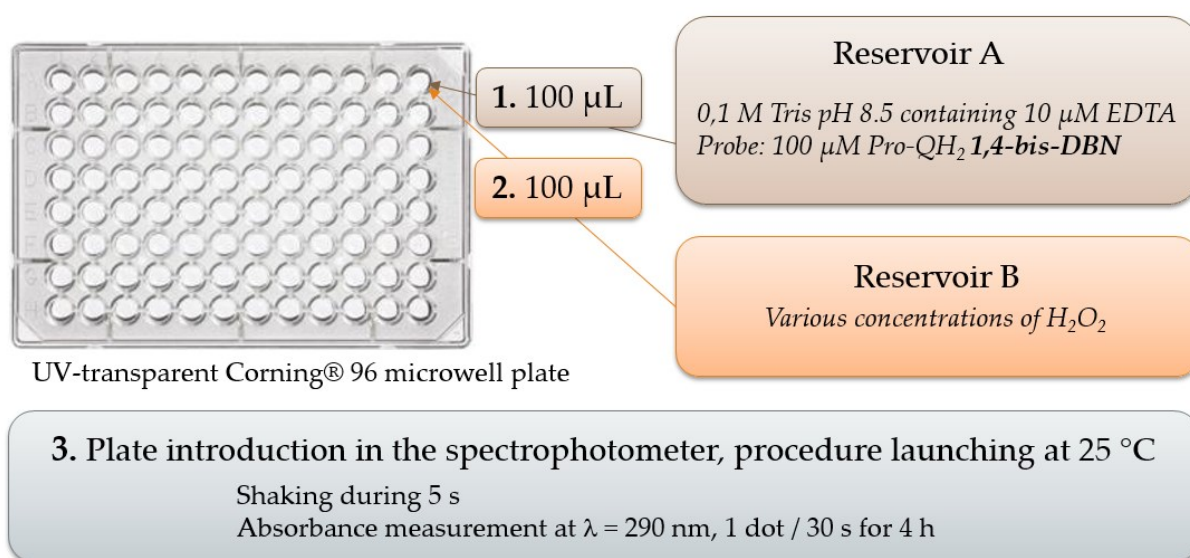
A2.2.5 Expérience de compétition entre PQQ et analogue

50 pM of *apo*-sGDH were incubated for accurately 1 hour at room temperature with various concentrations of PQQ (from 10 pM to 1 nM) and 10 μM of analogue in the reconstitution buffer (0.1 M Tris pH 7.4 containing 3 mM CaCl₂ and 0,1 % of Triton X-100). The introduction of PQQ and analogue solutions must be done in the same time. To this incubated solution were added 50 μM DCPIP, 1 mM freshly prepared PMS solution and 5 mM glucose.

This experiment was made with a control, *i.e.* only PQQ was added to the enzyme solution.

The evolution of the reaction (*i.e.* the discoloration of DCPIP) is followed using a UV-vis spectrophotometer at $\lambda = 606$ nm, data recorded each 2 s for 200 s.

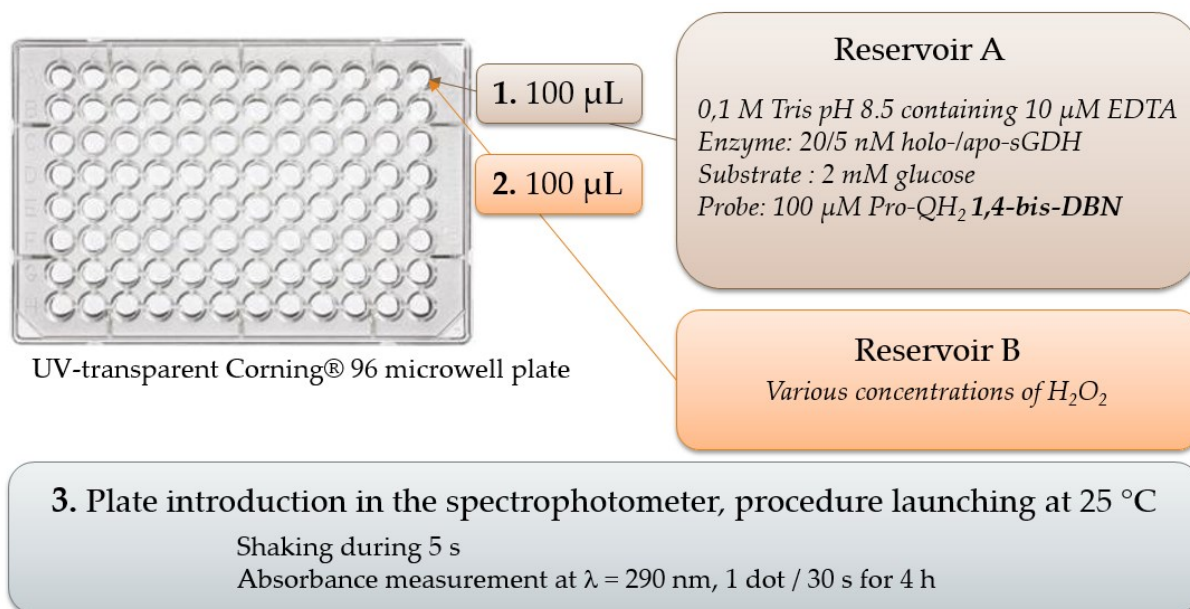
A2.2.6 Détection d' H_2O_2 via la déprotection catalytique d'un dérivé ester boronique



Pro-QH₂ solution was made by dissolution of the solid powder in DMSO.

A2.2.7 Détection d'H₂O₂ via la déprotection auto-catalytique d'un dérivé ester boronique

Avec le couple PQQ-sGDH/glucose

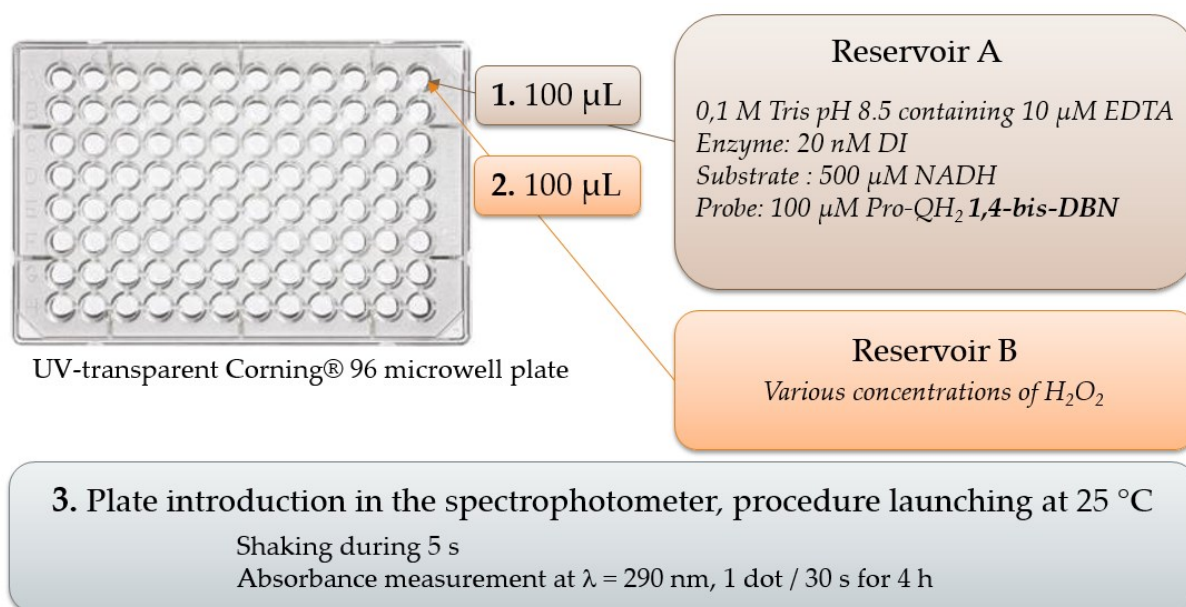


Pro-QH₂ solution was made by dissolution of the solid powder in DMSO.

PQQ-sGDH preparation consisted of a homogeneous reconstitution of PQQ-GDH from *apo*-sGDH. The protocol for homogeneous reconstitution was carried out according to a slightly modified published protocol⁶⁰. Briefly, 15 µM *apo*-sGDH monomer were mixed with 15 µM PQQ solution in freshly prepared reconstitution buffer (0.1 M Tris pH 7.4 containing 3 mM CaCl₂) and incubated for 30 min at room temperature. Then, excess of PQQ was removed by centrifugation (11 000 × g, 30 min, 4 °C) using a Nanosep membrane of 10 kDa MWCO (Pall Corporation) pre-equilibrated with reconstitution buffer. The reconstituted PQQ-sGDH was next washed three times with 0.01 M PBS pH 7.5 and finally re-dispersed in the same buffer. Incorporation of PQQ within the protein scaffold was confirmed from the UV-vis spectrum, showing a peak at $\lambda = 352$ nm. Subsequent addition of 1 mM glucose led to a slight increase and blue shift in the absorption maximum (*i.e.*, $\lambda = 338$ nm), characteristic of the absorbance of the reduced form of bound PQQ. The ratio between the absorbance at 338 and 280 nm (A_{338}/A_{280}) was taken as an indicator of the relative amount of active enzyme. Values ranging from 0.47 to 0.50 were found, in agreement with that reported by Duine⁵². The resulting concentration of glucose-reduced *holo*-sGDH (dimer) was determined using a molar extinction coefficient of 174

000 M⁻¹ cm⁻¹ at $\lambda = 280$ nm. Once prepared the reconstituted enzyme was aliquoted and stored at -20 °C.

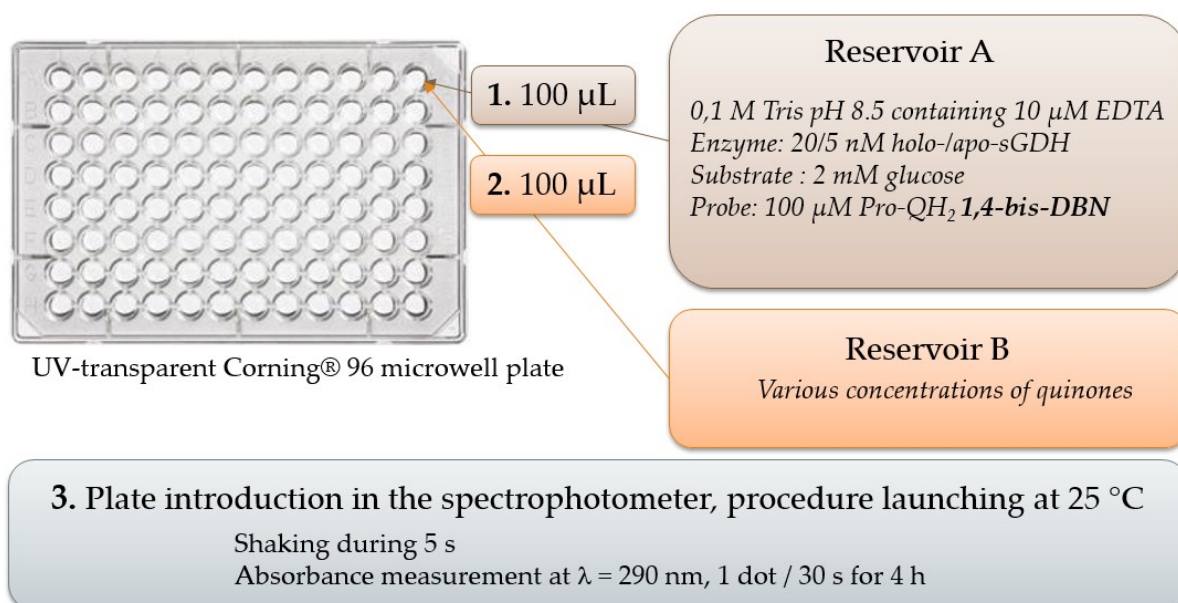
Avec le couple DI/NADH



Pro-QH₂ solution was made by dissolution of the solid powder in DMSO.

DI was centrifugated (11 000 × g, 30 min, 4 °C) using a Nanosep membrane of 10 kDa MWCO (Pall Corporation) pre-equilibrated with PBS buffer.

A2.2.8 Détection auto-catalytique de quinones



Pro-QH₂ solution was made by dissolution of the solid powder in DMSO.

PQQ-sGDH preparation consisted of a homogeneous reconstitution of PQQ-GDH from *apo*-sGDH, described in section **A2.2.7**.

1,2-NQ, 2,3-diCl-1,4-NQ, *para*-anthraquinone sulfonate, juglone and 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone solutions were made by dissolution of the solids in DMSO.

1,4-NQ, 2-OH-1,4-NQ and menadione were made by dissolution of the solids in ethanol.

REFERENCES

1. http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Healthy_life_years_statistics/fr.
2. Rissin, D. M. *et al.* Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotech* **28**, 595–599 (2010).
3. Wu, A. H., Fukushima, N., Puskas, R., Todd, J. & Goix, P. Development and preliminary clinical validation of a high sensitivity assay for cardiac troponin using a capillary flow (single molecule) fluorescence detector. *Clin. Chem.* **52**, 2157–2159 (2006).
4. Schultze, A. E., Konrad, R. J., Credille, K. M., Lu, Q. A. & Todd, J. Ultrasensitive cross-species measurement of cardiac troponin-I using the Erenna immunoassay system. *Toxicol. Pathol.* **36**, 777–782 (2008).
5. Felton, L. M. & Anthony, C. Biochemistry: Role of PQQ as a mammalian enzyme cofactor? *Nature* **433**, E10–E10 (2005).
6. Kasahara, T. & Kato, T. Biochemistry: Is pyrroloquinoline quinone a vitamin? (Reply). *Nature* **433**, E11–E12 (2005).
7. Perrin, R. J., Fagan, A. M. & Holtzman, D. M. Multi-modal techniques for diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease. *Nature* **461**, 916 (2009).
8. Catalano, S. M. *et al.* The role of amyloid-beta derived diffusible ligands (ADDLs) in Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **6**, 597–608 (2006).
9. Thaxton, C. S. *et al.* Nanoparticle-based bio-barcode assay redefines 'undetectable' PSA and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Proc Natl Acad Sci U A* **106**, 18437–42 (2009).

10. Giljohann, D. A. & Mirkin, C. A. Drivers of biodiagnostic development. *Nature* **462**, 461–4 (2009).
11. Ostwald, W. Elektrische eigenschaften halbdurchlässiger scheidewände. *Z. Für Phys. Chem.* **6**, 71–82 (1890).
12. Laidler, K. J. The development of theories of catalysis. *Arch. Hist. Exact Sci.* **35**, 345–374 (1986).
13. Ostwald, W. Bunsen-Gesellschaft? *Berichte Bunsenges. Für Phys. Chem.* **8**, 154–155 (1902).
14. Watson, J. D. & Crick, F. H. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
15. Tyagi, S. & Kramer, F. R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* **14**, 303–308 (1996).
16. Simon, P., Dueymes, C., Fontecave, M. & Décout, J. DNA detection through signal amplification by using NADH: flavin oxidoreductase and oligonucleotide–flavin conjugates as cofactors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 2764–2767 (2005).
17. Zuo, X., Xia, F., Xiao, Y. & Plaxco, K. W. Sensitive and Selective Amplified Fluorescence DNA Detection Based on Exonuclease III-Aided Target Recycling. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 1816–1818 (2010).
18. Mullis, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. in **51**, 263–273 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986).
19. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/.
20. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Nat. Biotechnol.* **10**, 413–417 (1992).
21. Yeung, S. S., Lee, T. M. & Hsing, I.-M. Electrochemical real-time polymerase chain reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 13374–13375 (2006).
22. Gill, P. & Ghaemi, A. Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies—A Review. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **27**, 224–243 (2008).

23. Van Ness, J., Van Ness, L. K. & Galas, D. J. Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 4504–4509 (2003).
24. Zhang, K. *et al.* Digital quantification of miRNA directly in plasma using integrated comprehensive droplet digital detection. *Lab Chip* **15**, 4217–4226 (2015).
25. Srinivas, P. R., Kramer, B. S. & Srivastava, S. Trends in biomarker research for cancer detection. *Lancet Oncol.* **2**, 698–704 (2001).
26. Sano, T., Smith, C. L. & Cantor, C. R. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* **258**, 120–122 (1992).
27. Adler, M., Wacker, R. & Niemeyer, C. M. Sensitivity by combination: immuno-PCR and related technologies. *Analyst* **133**, 702–718 (2008).
28. Goggins, S. & Frost, C. G. Approaches towards molecular amplification for sensing. *The Analyst* **141**, 3157–3218 (2016).
29. Nam, J. M., Thaxton, C. S. & Mirkin, C. A. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science* **301**, 1884–6 (2003).
30. Nam, J.-M., Park, S.-J. & Mirkin, C. A. Bio-barcodes based on oligonucleotide-modified nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 3820–3821 (2002).
31. Dongxuan Shen. The study of apo-enzyme/prosthetic groups and their applications in chemical analysis. (University of Michigan, 2009).
32. Shen, D. & Meyerhoff, M. E. Pyrroloquinoline quinone-doped polymeric nanospheres as sensitive tracer for binding assays. *Anal Chem* **81**, 1564–9 (2009).
33. Zimmerman, L. B., Lee, K. D. & Meyerhoff, M. E. Visual detection of single-stranded target DNA using pyrroloquinoline-quinone-loaded liposomes as a tracer. *Anal Biochem* **401**, 182–7 (2010).
34. Liu, X., Freeman, R. & Willner, I. Amplified Fluorescence Aptamer-Based Sensors Using Exonuclease III for the Regeneration of the Analyte. *Chem. - Eur. J.* **18**, 2207–2211 (2012).

35. You, L., Zha, D. & Anslyn, E. V. Recent Advances in Supramolecular Analytical Chemistry Using Optical Sensing. *Chem. Rev.* **115**, 7840–7892 (2015).
36. Zhu, L. & Anslyn, E. V. Signal Amplification by Allosteric Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 1190–1196 (2006).
37. Anslyn, E. V. Supramolecular Analytical Chemistry. *J. Org. Chem.* **72**, 687–699 (2007).
38. Alouane, A., Labruere, R., Le Saux, T., Schmidt, F. & Jullien, L. Self-Immolative Spacers: Kinetic Aspects, Structure-Property Relationships, and Applications. *Angew Chem Int Ed Engl* **54**, 7492–509 (2015).
39. Scrimin, P. & Prins, L. J. Sensing through signal amplification. *Chem Soc Rev* **40**, 4488–505 (2011).
40. Roth, M. E., Green, O., Gnaim, S. & Shabat, D. Dendritic, Oligomeric, and Polymeric Self-Immolative Molecular Amplification. *Chem Rev* (2015).
41. Gianneschi, N. C., Nguyen, S. T. & Mirkin, C. A. Signal amplification and detection via a supramolecular allosteric catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1644–1645 (2005).
42. Virel, A., Saa, L., Köster, S. D. & Pavlov, V. Ultrasensitive optical detection of hydrogen peroxide by triggered activation of horseradish peroxidase. *Analyst* **135**, 2291–2295 (2010).
43. Sella, E. & Shabat, D. Hydroquinone-quinone oxidation by molecular oxygen: a simple tool for signal amplification through auto-generation of hydrogen peroxide. *Org Biomol Chem* **11**, 5074–8 (2013).
44. Perry-Feigenbaum, R., Sella, E. & Shabat, D. Autoinductive exponential signal amplification: a diagnostic probe for direct detection of fluoride. *Chemistry* **17**, 12123–8 (2011).
45. Sun, X., Dahlhauser, S. D. & Anslyn, E. V. New Autoinductive Cascade for the Optical Sensing of Fluoride: Application in the Detection of Phosphoryl Fluoride Nerve Agents. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 4635–4638 (2017).
46. Sella, E., Lubelski, A., Klafter, J. & Shabat, D. Two-Component Dendritic Chain Reactions: Experiment and Theory. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 3945–3952 (2010).

47. Ikeda, M. *et al.* Installing logic-gate responses to a variety of biological substances in supramolecular hydrogel–enzyme hybrids. *Nat. Chem.* **6**, 511–518 (2014).
48. Yoshii, T., Onogi, S., Shigemitsu, H. & Hamachi, I. Chemically reactive supramolecular hydrogel coupled with a signal amplification system for enhanced analyte sensitivity. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 3360–3365 (2015).
49. Matsushita, K. *et al.* Soluble and Membrane-bound Quinoprotein D-Glucose Dehydrogenases of the *Acinetobacter calcoaceticus*: The Binding Process of PQQ to the Apoenzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1548–1555 (1995).
50. Arthur Oubrie, H. J. R., Kor H.Kalk, Johannis A.Duine and Bauke W.Dijkstra. The 1.7 Å Crystal Structure of the Apo Form of the Soluble Quinoprotein Glucose Dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* Reveals a Novel Internal Conserved Sequence Repeat. *J Mol Biol* **289**, 319–333 (1999).
51. Oubrie, A. *et al.* Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase. *EMBO J.* **18**, 5187–5194 (1999).
52. Olsthoorn, A. J. & Duine, J. A. Production, characterization, and reconstitution of recombinant quinoprotein glucose dehydrogenase (soluble type; EC 1.1.99.17) apoenzyme of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Arch Biochem Biophys* **336**, 42–8 (1996).
53. Oubrie, A. Structure and mechanism of soluble glucose dehydrogenase and other PQQ-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1647**, 143–151 (2003).
54. Olsthoorn, A. J. & Duine, J. A. On the mechanism and specificity of soluble, quinoprotein glucose dehydrogenase in the oxidation of aldose sugars. *Biochemistry (Mosc.)* **37**, 13854–61 (1998).
55. Durand, F. *et al.* Effect of substrate inhibition and cooperativity on the electrochemical responses of glucose dehydrogenase. Kinetic characterization of wild and mutant types. *J Am Chem Soc* **133**, 12801–9 (2011).

56. Olsthoorn, A. J. J., Otsuki, T. & Duine, J. A. Negative cooperativity in the steady-state kinetics of sugar oxidation by soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus*. *Eur. J. Biochem.* **255**, 255–261 (1998).
57. Bruice, S. Y. R. and T. C. Mechanism of Glucose Oxidation by Quinoprotein Soluble Glucose Dehydrogenase: Insights from Molecular Dynamics Studies. *J Am Chem Soc* **126**, 2431–2438 (2004).
58. Olsthoorn, A. J. J., Otsuki, T. & Duine, J. A. Ca^{2+} and its Substitutes have Two Different Binding Sites and Roles in Soluble, Quinoprotein (Pyrroloquinoline-Quinone-Containing) Glucose Dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **247**, 659–665 (1997).
59. Ameyama, M., Nonobe, M., Shinagawa, E., Matsushita, K. & Adachi, O. Method of enzymatic determination of pyrroloquinoline quinone. *Anal. Biochem.* **151**, 263–267 (1985).
60. Zhang, L. *et al.* Heterogeneous reconstitution of the PQQ-dependent glucose dehydrogenase immobilized on an electrode: a sensitive strategy for PQQ detection down to picomolar levels. *Anal Chem* **86**, 2257–67 (2014).
61. Corey, E. J. & Tramontano, A. Total synthesis of the quinonoid alcohol dehydrogenase coenzyme (1) of methylotrophic bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 5599–5600 (1981).
62. Denmark, S. E. & Venkatraman, S. On the Mechanism of the Skraup-Doebner-Von Miller Quinoline Synthesis. *J Org Chem* **71**, 1668–1676 (2006).
63. Martin, P., Steiner, E., Auer, K. & Winkler, T. Zur Herstellung von PQQ in kg-Mengen. *Helv. Chim. Acta* **76**, 1667–1673 (1993).
64. Kempf, V. J., Gopal, D. & Stalzer, W. Synthesis of pyrroloquinoline quinone (pqq). (2006).
65. Roderick Mackenzie, A., Moody, C. J. & Rees, C. W. Synthesis of the bacterial coenzyme methoxatin. *Tetrahedron* **42**, 3259–3268 (1986).
66. MacKenzie, A. R., Moody, C. J. & Rees, C. W. Synthesis of the bacterial coenzyme methoxatin. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1372 (1983).

67. Martin, P. Ein einfacher Zugang zu PQQ. *Helv. Chim. Acta* **76**, 988–992 (1993).
68. Puthiarampil, T. T., Sambasivam, G., Govinda, R. G. & Koramangala, R. C. PQQ synthesis and application thereof. (2014).
69. Trammell, G. L. The total synthesis of ($\pm$)-puupehenone. *Tetrahedron Lett.* **19**, 1525–1528 (1978).
70. Morin Deveau, A. & Macdonald, T. L. Practical synthesis of biaryl colchicinoids containing 3',4'-catechol ether-based A-rings via Suzuki cross-coupling with ligandless palladium in water. *Tetrahedron Lett.* **45**, 803–807 (2004).
71. Kondo, K., Morohoshi, S., Mitsunashi, M. & Murakami, Y. Synthetic Utility of tert-Butyl Azidoacetate on the Hemetsberger-Knittel Reaction. Synthetic Studies of Indoles and Related Compounds. Part 47. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **47**, 1227–1231 (1999).
72. Shopsowitz, K., Lelj, F. & MacLachlan, M. J. Regioselectivity in the Nitration of Dialkoxybenzenes. *J. Org. Chem.* **76**, 1285–1294 (2011).
73. Nelson, K. L. Directive Effects in Electrophilic Aromatic Substitution. *J. Org. Chem.* **21**, 145–155 (1956).
74. Amir, R. J., Popkov, M., Lerner, R. A., Barbas, C. F. & Shabat, D. Prodrug Activation Gated by a Molecular 'OR' Logic Trigger. *Angew. Chem.* **117**, 4452–4455 (2005).
75. Plasson, R., Brandenburg, A., Jullien, L. & Bersini, H. Autocatalyses. *J. Phys. Chem. A* **115**, 8073–8085 (2011).
76. Han, J., Yen, S., Han, G. & Han, P. Quantitation of Hydrogen Peroxide Using Tris(2-carboxyethyl)phosphine. *Anal. Biochem.* **234**, 107–109 (1996).
77. Yeung, K., Schmid, K. M. & Phillips, S. T. A thermally-stable enzyme detection assay that amplifies signal autonomously in water without assistance from biological reagents. *Chem Commun Camb* **49**, 394–396 (2013).

78. Song, Y. & Buettner, G. R. Thermodynamic and kinetic considerations for the reaction of semiquinone radicals to form superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **49**, 919–962 (2010).
79. Suenobu, T., Shibata, S. & Fukuzumi, S. Catalytic Formation of Hydrogen Peroxide from Coenzyme NADH and Dioxygen with a Water-Soluble Iridium Complex and a Ubiquinone Coenzyme Analogue. *Inorg. Chem.* **55**, 7747–7754 (2016).
80. Rana, P., Naven, R., Narayanan, A., Will, Y. & Jones, L. H. Chemical motifs that redox cycle and their associated toxicity. *MedChemComm* **4**, 1175 (2013).
81. Watanabe, N. & Forman, H. J. Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **411**, 145–157 (2003).
82. Yuan, X., Miller, C. J., Pham, A. N. & Waite, T. D. Kinetics and mechanism of auto- and copper-catalyzed oxidation of 1,4-naphthohydroquinone. *Free Radic. Biol. Med.* **71**, 291–302 (2014).
83. Munday, R. Autoxidation of naphthohydroquinones: effects of metals, chelating agents, and superoxide dismutase. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 689–695 (1997).
84. Ilan, Y. A., Czapski, G. & Meisel, D. The one-electron transfer redox potentials of free radicals. I. The oxygen/superoxide system. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Bioenerg.* **430**, 209–224 (1976).
85. Roginsky, V. A., Pisarenko, L. M., Bors, W. & Michel, C. The kinetics and thermodynamics of quinone–semiquinone–hydroquinone systems under physiological conditions. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 871–876 (1999).
86. Knüpling, M., Törring, J. T. & Un, S. The relationship between the molecular structure of semiquinone radicals and their g-values. *Chem. Phys.* **219**, 291–304 (1997).

87. Öllinger, K., Buffinton, G. D., Ernster, L. & Cadenas, E. Effect of superoxide dismutase on the autoxidation of substituted hydro-and semi-naphthoquinones. *Chem. Biol. Interact.* **73**, 53–76 (1990).
88. Pal, H., Mukherjee, T. & Mittal, J. One-electron reduction of 9, 10-anthraquinone, 1-amino-9, 10-anthraquinone and 1-hydroxy-9, 10-anthraquinone in aqueous-isopropanol-acetone mixed solvent: A pulse radiolysis study. *Radiat. Phys. Chem.* **44**, 603–609 (1994).
89. Swallow, A. Physical chemistry of semiquinones. *Funct. Quinones Energy Conserv. Syst.* 59–72 (1982).
90. Faraggi, M., Chandrasekar, R., McWhirter, R. B. & Klapper, M. H. The methoxatin semiquinone: A pulse radiolysis study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 955–960 (1986).
91. Ishiyama, T., Ishida, K. & Miyaura, N. Synthesis of pinacol arylboronates via cross-coupling reaction of bis (pinacolato) diboron with chloroarenes catalyzed by palladium (0)–tricyclohexylphosphine complexes. *Tetrahedron* **57**, 9813–9816 (2001).
92. Achilli, C., Ciana, A., Fagnoni, M., Balduini, C. & Minetti, G. Susceptibility to hydrolysis of phenylboronic pinacol esters at physiological pH. *Open Chem.* **11**, (2013).
93. Savéant, J.-M. *Elements of molecular and biomolecular electrochemistry: an electrochemical approach to electron transfer chemistry.* **13**, (John Wiley & Sons, 2006).
94. Alouane, A. *et al.* Light Activation for the Versatile and Accurate Kinetic Analysis of Disassembly of Self-Immolative Spacers. *Chem.-Eur. J.* **19**, 11717–11724 (2013).
95. Alouane, A. *et al.* Disassembly Kinetics of Quinone-Methide-Based Self-Immolative Spacers that Contain Aromatic Nitrogen Heterocycles. *Chem. - Asian J.* **9**, 1334–1340 (2014).
96. Jiang, M. *et al.* Metal-free UV-Vis-light-induced aerobic oxidative hydroxylation of arylboronic acids in the absence of a photosensitizer. *RSC Adv.* **4**, 12977–12980 (2014).
97. Brunmark, A. & Cadenas, E. Redox and addition chemistry of quinoid compounds and its biological implications. *Free Radic. Biol. Med.* **7**, 435–477 (1989).

98. Cheng, G., Zeng, X. & Cui, X. Benzoquinone-Promoted Aerobic Oxidative Hydroxylation of Arylboronic Acids in Water. *Synthesis* **46**, 295–300 (2014).
99. Limoges, B., Marchal, D., Mavre, F. & Saveant, J. M. Electrochemistry of immobilized redox enzymes: kinetic characteristics of NADH oxidation catalysis at diaphorase monolayers affinity immobilized on electrodes. *J Am Chem Soc* **128**, 2084–92 (2006).
100. Wu, J. T., Wu, L. H. & Knight, J. A. Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation. *Clin. Chem.* **32**, 314–319 (1986).
101. Okumura, N., Abo, T., Tsujimura, S. & Kano, K. Electron transfer kinetics between PQQ-dependent soluble glucose dehydrogenase and mediators. *Electrochemistry* **74**, 639–641 (2006).
102. Rao, P. & Hayon, E. Ionization constants and spectral characteristics of some semiquinone radicals in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* **77**, 2274–2276 (1973).
103. Doherty, M. D., Rodgers, A. & Cohen, G. M. Mechanisms of toxicity of 2-and 5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone; absence of a role for redox cycling in the toxicity of 2-hydroxy-1, 4-naphthoquinone to isolated hepatocytes. *J. Appl. Toxicol.* **7**, 123–129 (1987).
104. Ollinger, K. & Brunmark, A. Effect of hydroxy substituent position on 1, 4-naphthoquinone toxicity to rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 21496–21503 (1991).
105. Frankland, E. & Duppa, B. On Boric Ethide. *Proc. R. Soc. Lond.* **10**, 568–570 (1859).
106. Frankland, E. & Duppa, B. Vorläufige Notiz über Boräthyl. *Eur. J. Org. Chem.* **115**, 319–322 (1860).
107. Lennox, A. J. J. & Lloyd-Jones, G. C. Selection of boron reagents for Suzuki–Miyaura coupling. *Chem Soc Rev* **43**, 412–443 (2014).
108. Lennox, A. J. J. & Lloyd-Jones, G. C. The Slow-Release Strategy in Suzuki–Miyaura Coupling. *Isr. J. Chem.* **50**, 664–674 (2010).
109. Ainley, A. D. & Challenger, F. CCLXXX.—Studies of the boron–carbon linkage. Part I. The oxidation and nitration of phenylboric acid. *J Chem Soc* 2171–2180 (1930).

110. Hall, D. G. *Boronic acids: preparation and applications in organic synthesis and medicine*. (WILEY-VCH, 2006).
111. Kuivila, H. G. Electrophilic Displacement Reactions. III. Kinetics of the Reaction between Hydrogen Peroxide and Benzenboronic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 870–874 (1954).
112. Kuivila, H. G. & Armour, A. G. Electrophilic Displacement Reactions. IX. Effects of Substituents on Rates of Reactions between Hydrogen Peroxide and Benzenboronic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5659–5662 (1957).
113. Kuivila, H. G. Electrophilic Displacement Reactions. VI. Catalysis by Strong Acids in the Reaction between Hydrogen Peroxide and Benzenboronic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 4014–4016 (1955).
114. Kuivila, H. G., Reuwer Jr, J. F. & Mangravite, J. A. Electrophilic displacement reactions: XV. Kinetics and mechanism of the base-catalyzed protodeboronation of areneboronic acids. *Can. J. Chem.* **41**, 3081–3090 (1963).
115. Sun, X. *et al.* ‘Integrated’ and ‘insulated’ boronate-based fluorescent probes for the detection of hydrogen peroxide. *Chem. Commun.* **49**, 8311 (2013).
116. Jiang, H., Lykke, L., Uttrup Pedersen, S., Xiao, W.-J. & Anker Jørgensen, K. A practical electromediated ipso-hydroxylation of aryl and alkyl boronic acids under an air atmosphere. *Chem. Commun.* **48**, 7203 (2012).
117. Cox, P. A., Leach, A. G., Campbell, A. D. & Lloyd-Jones, G. C. Protodeboronation of Heteroaromatic, Vinyl, and Cyclopropyl Boronic Acids: pH–Rate Profiles, Autocatalysis, and Disproportionation. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 9145–9157 (2016).
118. Fischer, F. C. & Havinga, E. Thermal and photoinduced deboronations of some pyridine- and benzenboronate anions. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **93**, 21–24 (2010).
119. Kuivila, H. G., Reuwer, J. F. & Mangravite, J. A. Electrophilic Displacement Reactions. XVI. Metal Ion Catalysis in the Protodeboronation of Areneboronic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 2666–2670 (1964).

120. Lee, C.-Y., Ahn, S.-J. & Cheon, C.-H. Protodeboronation of ortho- and para-Phenol Boronic Acids and Application to ortho and meta Functionalization of Phenols Using Boronic Acids as Blocking and Directing Groups. *J. Org. Chem.* **78**, 12154–12160 (2013).
121. Durand, F., Stines-Chaumeil, C., Flexer, V., André, I. & Mano, N. Designing a highly active soluble PQQ–glucose dehydrogenase for efficient glucose biosensors and biofuel cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **402**, 750–754 (2010).