



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY 1
FACULTE DE PHARMACIE

**LES PUCES À ANTICORPS
NOUVEAUX OUTILS DE DIAGNOSTIC**

**PRÉPARATION D'UN SUPPORT PLAN
FONCTIONNALISÉ ET STRUCTURÉ
POUR UNE APPLICATION DANS LE DÉPISTAGE
ET LE SUIVI DES CANCERS BRONCHIQUES**

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 15 Janvier 2010

Pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par **Lucie MANACHE**
Née le 13 mars 1982 à Strasbourg (67)

Membres du jury

Président : C. FINANCE Professeur, Faculté de Pharmacie, Nancy

Juges : N. MARTINET Directeur de Recherche INSERM, Nice
S. CORBEL Chargé de Recherche CNRS, Nancy
M-C. CARRE Chargée de Recherche INSERM, Nancy

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2009-2010

DOYEN

Chantal FINANCE

Vice-Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Directeur des Etudes

Gérald CATAU

Mobilité ERASMUS et Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine : Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie : Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du CEPH : Jean-Michel SIMON

(Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier)

Doyen Honoraire

Claude VIGNERON

Professeurs Emérites

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

Professeurs Honoriaires

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMAN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

Maîtres de Conférences Honoriaires

Gérald CATAU

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Assistant honoraire

Madame BERTHE

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Gilles AULAGNER	Pharmacie clinique
Alain BAGREL.....	Biochimie
Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE.....	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL.....	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Christophe GANTZER	Microbiologie environnementale
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU.....	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE.....	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD.....	Pharmacologie cardiovasculaire
Dominique LAURAIN-MATTAR.....	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	Biochimie
Pierre LEROY	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	Chimie thérapeutique
Patrick MENU	Physiologie
Jean-Louis MERLIN.....	Biologie cellulaire oncologique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	Biochimie, Biologie moléculaire
Jean-Michel SIMON.....	Economie de la santé, législation pharmaceutique

MAITRES DE CONFERENCES

Monique ALBERT	Bactériologie, Virologie
Sandrine BANAS	Parasitologie
Mariette BEAUD	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	Communication et santé
Isabelle BERTRAND.....	Microbiologie environnementale
Michel BOISBRUN	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER.....	Chimie Physique
Cédric BOURA.....	Physiologie
Jean-Claude CHEVIN	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT	Chimie analytique
Jocelyne COLLOMB	Parasitologie, Mycologie
Joël COULON.....	Biochimie
Sébastien DADE.....	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	Chimie analytique
Béatrice DEMORE.....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Florence DUMARCAY.....	Chimie thérapeutique
François DUPUIS.....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	Hématologie
Adel FAIZ.....	Biophysique-accoustique
Luc FERRARI	Toxicologie
Stéphane GIBAUD	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT.....	Chimie organique

Frédéric JORAND	Santé et environnement
Olivier JOUBERT.....	Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZ	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI.....	Hématologie biologique
Christophe MERLIN	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU	Pharmacognosie
Maxime MOURER.....	Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUS	Informatique
Christine PERDICAKIS	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	Pharmacologie
Virginie PICHON	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY	Santé publique
Gabriel TROCKLE	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER.....	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIOU	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	Sémiologie
--------------------------	------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	Anglais
--------------------------	---------

ASSISTANT

Annie PAVIS	Bactériologie
-------------------	---------------

Bibliothèque Universitaire Santé – Lionnois (Pharmacie - Odontologie)

Anne-Pascale PARRET.....	Directeur
--------------------------	-----------

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



«LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDERES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR».

REMERCIEMENTS

À Madame Chantal FINANCE

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Nancy et
Professeur

Qui m'a fait l'honneur de s'intéresser à ce sujet et de présider cette thèse.
Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

À Madame Marie-Christian CARRÉ

Chargée de Recherche à l'ENSIC à Nancy

Qui m'a proposé ce projet de fin d'études et a encadré ce travail.
Merci pour votre dynamisme et votre confiance tout au long de l'évolution de ce projet.
Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

À Monsieur Serge CORBEL

Chargé de Recherche à l'ENSIC à Nancy

Qui m'a ouvert les portes de son laboratoire et a co-encadré ce travail.
Merci pour votre précieuse aide durant ce projet et pour tous vos bons conseils.
Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

À Madame Nadine MARTINET

Directeur de Recherche à l'INSERM de Nice

Qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a aidée dans ce travail.
Merci de m'avoir donné la possibilité de faire évoluer ce projet expérimental.
Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

À Madame Mireille DONNER pour toute son aide, sa disponibilité et pour les discussions intéressantes que nous avons eues durant ce projet.

À Fanny EVENOU, Cécile BRIANÇON, Stéphanie LACOMME et Francis BAROS pour leur aide précieuse dans les expériences menées aux laboratoires du DCPR à l'ENSIC et du CRB à l'Hôpital Central de Nancy.

À tous les membres du DCPR à l'ENSIC et de l'U724-INSERM à la Faculté de Médecine de Nancy qui m'ont accueillie et aidée au quotidien.

À tous mes maîtres de stages durant mon cursus de Pharmacie :

Madame feue Marie-Madeleine KEPPI et Monsieur René DUCHÈNE, Pharmaciens d'Officine à Lunéville

Monsieur Pierre WOURMS, Pharmacien Chef de Service, Centre Hospitalier de Saint-Nicolas-de-Port

Madame Anna PÉLISSIER-NIEL, Responsable d'équipe, Département des Sciences Pharmaceutiques, Sanofi-Aventis R&D à Vitry-sur-Seine

Merci de m'avoir accueillie dans vos équipes respectives, et de m'avoir initiée aux différentes facettes de la profession et de la recherche et du développement pharmaceutiques.

À mes parents et mon frère, pour leur indéfectible soutien et leur présence de chaque instant, avec toute mon affection.

À toute ma famille, d'Alsace, de Syrie et d'ailleurs pour tout leur soutien.

À tous mes amis de la Faculté de Pharmacie, de l'AENC et de l'ENSIC avec qui j'ai passé des moments inoubliables durant ma vie étudiante.

À tous mes amis qui se reconnaîtront parmi les voyageurs, profs, cinéphiles, fans des made in France, mélomanes, amis d'enfance, fans des Starbucks, skieurs, eurockéennophiles, fins cuisiniers, shopping addicts, stagiaires... et organisatrice de pot de thèse (thanks miss !).

À mon grand-père Joseph qui me manque énormément.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES.....	16
TABLE DES TABLEAUX	17
LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES.....	18
AVANT-PROPOS	20
INTRODUCTION.....	22
PARTIE A : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	25
1. Généralités sur les anticorps	26
1.1. Définitions	26
1.2. Description d'un anticorps	26
1.2.1. Structure et configuration	26
1.2.1.1. Chaînes lourdes et légères.....	26
1.2.1.2. Domaines variables et constants	27
1.2.1.3. Glycosylation.....	28
1.2.1.4. Configuration spatiale.....	29
1.2.2. Relation structure-activité.....	30
1.3. Propriétés	32
1.3.1. Liaison à l'antigène	32
1.3.2. Activation du complément et des cellules immunocompétentes	33
1.4. Anticorps monoclonaux	33
1.4.1. Définition.....	33
1.4.2. Anticorps chimériques, humanisés et recombinants.....	35
1.4.3. Production et purification	37
1.4.4. Méthodes de caractérisation.....	38
1.4.5. Stabilité.....	39
2. Le diagnostic biologique <i>in vitro</i>	40
2.1. Définition.....	40
2.2. Evolutions.....	40
2.3. Dispositifs Médicaux de Diagnostic <i>In Vitro</i> (DMDIV)	40
2.4. La réactovigilance	41
2.4.1. Définitions	41
2.4.2. Cadre de fonctionnement.....	42
3. Principe des immunoessais	43
3.1. La réaction antigène-anticorps <i>in vitro</i>	43
3.2. Détection de la liaison antigène-anticorps.....	44
3.2.1. Traitement préalable des anticorps : le marquage	44
3.2.2. Les anticorps anti-immunoglobulines	46
3.3. Utilisation des anticorps en tant que réactifs des techniques de diagnostic <i>in vitro</i>	46
3.3.1. Anticorps libres en solution	46
3.3.1.1. Réaction d'agglutination.....	47
3.3.1.2. Réaction de précipitation.....	47
3.3.2. Anticorps sur support solide	47

4.	Méthodes d'immobilisation des anticorps.....	48
4.1.	Immobilisation aléatoire	48
4.1.1.	Par adsorption passive	48
4.1.1.1.	Sur support en verre	48
4.1.1.2.	Sur membrane en nitrocellulose	48
4.1.1.3.	Sur support en polystyrène.....	49
4.1.2.	Par diffusion dans un gel à base de polyacrylamide	49
4.2.	Immobilisation orientée	50
4.2.1.	Via le complexe biotine/streptavidine.....	50
4.2.2.	Via les protéines A et G (liaison par bioaffinité)	50
4.2.3.	Via un peptide synthétique	51
4.2.4.	Par liaison covalente.....	51
4.2.4.1.	Anticorps non modifié.....	52
4.2.4.2.	Fragments Fab'	52
4.2.4.3.	Anticorps oxydé	53
5.	Techniques d'immunodiagnostic en phase solide.....	56
5.1.	Principes	56
5.2.	Plaques de microtitration	56
5.2.1.	ELISA ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay")	57
5.2.1.1.	ELISA direct et indirect	57
5.2.1.2.	ELISA en sandwich	59
5.2.1.3.	ELISA par inhibition compétitive	59
5.2.2.	RIA ("RadioImmunoAssay").....	59
5.3.	Particules sphériques	60
5.3.1.	Types de particules	60
5.3.2.	Tests d'agglutination	60
5.4.	Tests immunochromatographiques	61
5.4.1.	Principe, description	61
5.4.2.	Exemples d'applications	61
5.5.	Macro et micro-puces à anticorps.....	62
6.	Les puces à anticorps	63
6.1.	Définitions	63
6.2.	Principe	63
6.3.	Autres exemples de biopuces	64
6.3.1.	Puces à ADN	64
6.3.2.	Puces à peptides	64
6.3.3.	Puces à carbohydrates	64
6.4.	Conception	65
6.4.1.	Supports de choix	65
6.4.2.	Techniques de fixation des anticorps pour l'élaboration d'une puce....	67
6.5.	Fonctionnement	68
6.6.	Méthodes de détection	69
6.6.1.	Fluorescence	70
6.6.2.	Résonance plasmionique ou "surface plasmon resonance"	70
6.7.	Applications actuelles et à venir	71
6.7.1.	Puces fonctionnelles.....	71
6.7.2.	Puces analytiques.....	72
6.7.3.	Exemples d'application	73
6.8.	Avantages et limites de ces dispositifs	74
7.	Notions de tests diagnostiques et tests de dépistage	76

7.1.	Définitions	76
7.2.	Types de tests	76
7.3.	Indices d'évaluation d'un test	77
7.4.	Les mesures de prévention médicale	78
7.5.	Les puces à anticorps : l'avenir du diagnostic précoce ?	78
PARTIE B : ETUDE EXPERIMENTALE.....		79
PREPARATION D'UN SUPPORT POUR LE GREFFAGE COVALENT		
D'ANTICORPS		79
1.	Contexte du projet.....	80
1.1.	Quelques rappels sur les cancers bronchiques	80
1.2.	Situation de la recherche sur les cancers bronchiques dans le Grand Est....	81
1.2.1.	Les récepteurs aux rétinoïdes	81
1.2.2.	Intérêts d'une puce à anticorps anti-récepteurs aux rétinoïdes.....	82
1.3.	Objectifs	83
2.	Conception de la puce à anticorps	84
2.1.	Protocole global	84
2.2.	Méthodologies particulières	84
2.2.1.	Réactions chimiques sur support	84
2.2.2.	Utilisation de rotors moléculaires fluorescents.....	85
2.2.3.	Analyse de la fluorescence	86
2.2.3.1.	La spectroscopie d'absorption UV visible.....	86
2.2.3.2.	La spectroscopie de fluorescence ou spectrofluorimétrie.....	86
2.2.3.3.	Cas particulier des anticorps marqués.....	88
2.3.	Mise en œuvre expérimentale et résultats	91
2.3.1.	Caractérisation du support	91
2.3.1.1.	Description	91
2.3.1.2.	Intérêts.....	92
2.3.1.3.	Propriétés surfaciques.....	92
2.3.2.	Fonctionnalisation du support pour une orientation des greffages	94
2.3.2.1.	1 ^{ère} étape : Action de l'anhydride succinique sur les lames silanisées - NH ₂	95
2.3.2.2.	2 ^{ème} étape : Activation de la fonction acide	95
2.3.2.3.	3 ^{ème} étape : Greffage du bras espaceur	95
2.3.2.4.	4 ^{ème} et 5 ^{ème} étapes : Formation d'une terminaison -COONHS sur le bras diamino	96
2.3.2.5.	6 ^{ème} étape : Réaction du <i>tert</i> -butyl carbazate	96
2.3.2.6.	7 ^{ème} étape : Déprotection de la fonction hydrazide	97
2.3.3.	Vérification de la modification de l'état de surface par le greffage d'un fluorophore	97
2.3.3.1.	Greffage de CouCHO.....	97
2.3.3.2.	Résultats	99
2.3.4.	Utilisation de la stéréolithographie pour la localisation des greffages	104
2.3.4.1.	Qu'est-ce que la stéréolithographie ?	105
2.3.4.2.	Appareillage	105
2.3.4.3.	Description du procédé	106
2.3.4.4.	Protocole appliqué.....	108
2.3.4.5.	Analyse du motif par profilométrie optique	110
2.3.5.	Greffage des anticorps	112
2.3.5.1.	Choix des anticorps	113

2.3.5.2. Choix des conditions opératoires	115
2.3.5.3. Protocole d'oxydation et de greffage des anticorps.....	118
2.3.5.4. Résultats	121
2.4. Discussion.....	122
CONCLUSION.....	124
ANNEXES.....	127
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	140

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de la structure d'un anticorps	28
Figure 2 : Exemple de structure d'oligosaccharide d'IgG	29
Figure 3 : Structure tridimensionnelle d'une IgG	30
Figure 4 : Schéma d'un fragment F(ab') ₂	31
Figure 5 : Système antigène/anticorps comme système ligand/récepteur.....	32
Figure 6 : Production d'anticorps monoclonaux par fusion somatique	34
Figure 7 : Différentes formes d'anticorps monoclonaux	36
Figure 8 : Structure chimique du polystyrène	49
Figure 9 : Principe de la technique ELISA	58
Figure 10 : Schéma d'un test de grossesse utilisant le principe de l'immunochromatographie	62
Figure 11 : Comparaison du signal obtenu après immobilisation d'anticorps par adsorption sur lame aminosilane et par liaison covalente sur lame aminosilane fonctionnalisée par BS3 ou DSS.....	67
Figure 12 : Schématisation du principe de fonctionnement d'une puce à anticorps	69
Figure 13 : Schématisation de la technique de résonance plasmionique	71
Figure 14 : Comparaison d'une nanopuce et d'une plaque 96 trous	72
Figure 15 : Formule chimique du fluorophore "CouCHO"	85
Figure 16 : Schéma de positionnement d'une lame dans le compartiment échantillon.....	88
Figure 17 : Etalonnage d'une solution de FITC par spectroscopie UV et lecteur de micro plaque	90
Figure 18 : Photographies d'une lame neuve commercialisée par Sigma Diagnostics	91
Figure 19 : Schéma de formation de chaînes amino-alkylsiloxanes	92
Figure 20 : Caractéristiques spectroscopiques d'une lame	93
Figure 21 : Réaction de l'anhydride succinique sur les terminaisons -NH ₂ d'une lame Sigma	95
Figure 22 : Réaction de greffage du bras espaceur diaminé sur les terminaisons -COONHS d'une lame.....	96
Figure 23 : Différentes étapes conduisant à la fonction hydrazide	97
Figure 24 : Greffage de CouCHO sur une terminaison -NH ₂	98
Figure 25 : Comparaison entre une lame neuve et une lame greffée par CouCHO (émission)	100
Figure 26 : Comparaison entre une lame neuve et une lame greffée par CouCHO (excitation)	100
Figure 27 : Comparaison entre une lame neuve et une lame additionnée du groupe diamino,	101
Figure 28 : Comparaison entre une lame neuve et une lame additionnée du groupe diamino,	102
Figure 29 : Greffage de CouCHO sur la fonction hydrazide et comparaison	103
Figure 30 : Schéma du motif en résine fabriqué sur la lame fonctionnalisée	107
Figure 31 : Photographie d'une lame modifiée avec un motif de 10 trous en polymère	110
Figure 32 : Profil d'un trou en polymère	111
Figure 33 : Spectre d'émission d'une solution d'anticorps marqués FITC.....	114
Figure 34 : Microscopie de fluorescence : observation de trois lames après plusieurs greffages à des temps différents	117
Figure 35 : Lecture au lecteur de plaques de micro titration de quatre lames différentes.....	121

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Anticorps monoclonaux utilisés en imagerie actuellement sur le marché	36
Tableau 2 : Quelques anticorps monoclonaux à usage thérapeutique actuellement sur le marché	37
Tableau 3 : Principales méthodes d'analyse des anticorps monoclonaux	39
Tableau 4 : Longueurs d'onde d'excitation et d'émission de quelques fluorophores d'usage courant.....	45
Tableau 5 : Méthodes de greffage d'anticorps oxydés sur des supports fonctionnalisés par des groupements amino ou hydrazide	55
Tableau 6 : Marqueurs enzymatiques utilisés dans la méthode ELISA	57
Tableau 7 : Quelques exemples d'application des puces à anticorps à des fins de diagnostic	73
Tableau 8 : Comparaison entre une puce à anticorps et un test ELISA classique	74

LISTE DES ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

AcOtBu	Acétate de <i>tert</i> -Butyle
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messager
BOC	<i>t</i> -ButOxyCarbonyle
BS₃	bis[sulfosuccinimidyl] suberate
BSA	Bovine Serum Albumin
CAO	Conception Assistée par Ordinateur
CDR	Complementary Determining Region
CH	Domaine constant de la chaîne lourde d'une immunoglobuline
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
CHO	Chinese Hamster Ovary
CL	Domaine constant de la chaîne légère d'une immunoglobuline
CouCHO	7-(N,N-diéthylamino)-3-formylcoumarine
Da	Dalton (unité de mesure)
DMDIV	Dispositif Médical de Diagnostic In Vitro
DMF	DiMéthylFormamide
DSS	DiSuccinimidyl Suberate
EDAC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EtOH	Ethanol
Fab	Fragment de liaison à l'antigène
Fc	Fragment de liaison au complément
FITC	Fluorescein Iso Thio Cyanate
fM	femto Molaire (10^{-15} mole/Litre)
H	Heavy (symbole de la chaîne lourde d'une immunoglobuline)
HCl	Acide Chlorhydrique
IEF	IsoElectroFocalisation
Ig	Immunoglobuline
IgG	Immunoglobuline de type G
IR	Infrarouge
kDa	kilo Dalton
L	Light (symbole de la chaîne légère d'une immunoglobuline)

LOD	Limit Of Detection (Limite de détection)
M	Molaire (mole/Litre)
 mM	milli Molaire (10^{-3} mole/Litre)
NHS	N-HydroxySuccinimide
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGMEA	Propylene Glycol Monomethyl Ether Acetate
pM	pico Molaire (10^{-12} mole/Litre)
RAR	Retinoic Acid Receptor
RMN ^1H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RXR	Retinoic X Receptor
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEC	Size Exclusion Chromatography
TEA	TriEthylAmine
UV	Ultra-Violet
VH	Domaine variable de la chaîne lourde d'une immunoglobuline
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VL	Domaine variable de la chaîne légère d'une immunoglobuline

AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
CGE	Cancéropôle du Grand Est
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CR	Chargé de Recherche
CRB	Centre de Ressources Biologiques
DCPR	Département de Chimie Physique des Réactions
DR	Directeur de Recherche
ENSIC	Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques
GRAPP	Groupe de Recherches et Applications en Photophysique et Photochimie
INPL	Institut National Polytechnique de Lorraine
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

AVANT-PROPOS

Ce travail de Thèse d'Exercice fait suite au Projet de Fin d'Etudes réalisé de janvier 2006 à mars 2007, dans le cadre de la formation "Pharma Plus" à l'ENSIC (Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques, Nancy) sous la direction de Mme M.C. Carré, CR INSERM et de Mr. S. Corbel, CR CNRS.

Le sujet traité a été réalisé au DCPR (Département de Chimie Physique des Réactions) situé dans les locaux de l'ENSIC (Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques), en collaboration avec Mme N. Martinet, DR INSERM, et Mme M. Donner, DR INSERM, de l'équipe "Oncogénèse bronchique : chimioprévention et immuno-modulation épithéliale" (U724/CRB, Nancy).

INTRODUCTION

Après la découverte de la séquence intégrale du génome humain, la communauté scientifique s'est rapidement aperçue que cette information n'était pas suffisante pour prédire le comportement cellulaire : dans de nombreux cas, seule l'étude des protéines exprimées par ce génome permet de le comprendre, voire de le maîtriser.

L'un des plus grands challenges de la protéomique réside dans l'étude de l'expression des protéines impliquées dans les pathologies de type cancers, ceci avec une grande sensibilité, des temps d'analyses les plus courts possibles et en utilisant le moins d'analyte. Les puces à protéines constituent des outils très prometteurs pour répondre à cette demande, plus particulièrement grâce aux anticorps qui permettent d'identifier rapidement des biomarqueurs utiles au diagnostic.

Les puces à anticorps présentent l'avantage de détecter avec une grande sensibilité de très faibles quantités d'antigènes, comparées aux immunoessais classiques comme l'ELISA. Mais ces dispositifs ne se construisent pas sans mal, tant l'intégrité de la structure et l'activité de l'anticorps sont difficiles à préserver. Ainsi, la fabrication d'une puce à anticorps requiert le bon choix du support de fixation, de la préparation de l'anticorps et de la technique de greffage. Par ailleurs, le choix et la validation de la méthode de détection du complexe immun formé avec l'antigène est une étape clé pour réussir le développement de cet outil en vue d'une application diagnostique.

Ce mémoire de thèse fait référence à des expériences menées dans le but de préparer un support de verre silanisé devant permettre l'immobilisation d'anticorps anti-récepteurs de rétinoïdes, pour une application dans le diagnostic du cancer bronchique.

Avant d'exposer la partie expérimentale, nous décrirons l'importance des anticorps dans l'arsenal des techniques de diagnostic *in vitro* appliquées en laboratoire, mais aussi disponibles pour le corps médical, voire pour le patient lui-même.

Pour expliquer l'intérêt grandissant porté à ces molécules prometteuses dans le domaine du diagnostic *in vitro*, il faut comprendre leur structure, leurs propriétés et leurs avantages liés à la spécificité de liaison avec leur antigène.

Enfin, pour aborder l'exemple de construction d'une puce à anticorps, nous étudierons au préalable la description de ce type de dispositif, puis les méthodes de fabrication décrites dans la littérature.

PARTIE A : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur les anticorps

1.1. Définitions

Les **anticorps**, ou **immunoglobulines** (Ig), sont des glycoprotéines produites par le système immunitaire en réponse à la présence d'une substance étrangère appelée antigène et considérée par l'organisme comme du "non soi". Chaque antigène induit la formation d'un anticorps spécifique susceptible de l'éliminer, ceci assurant l'immunité de l'organisme.

Les anticorps sont synthétisés par les plasmocytes, cellules du système immunitaire provenant de la différenciation de certains lymphocytes B. Ils circulent dans le sérum sanguin et la lymphe et sont présents dans la rate et la moelle osseuse.

Chez l'Homme, on distingue cinq classes d'immunoglobulines (IgG, IgM, IgA, IgE et IgD) qui se différencient par leur structure, leurs propriétés et leur proportion dans le sérum. Les immunoglobulines de type G étant les plus abondantes et les plus étudiées, les descriptions qui suivent seront basées sur leur structure.

1.2. Description d'un anticorps

1.2.1. Structure et configuration

1.2.1.1. Chaînes lourdes et légères

Un anticorps présente la forme d'un "Y" constitué de l'association de deux types de chaînes polypeptidiques :

- deux chaînes identiques dites **légères** ou "light" (L), soit de type *lambda*, soit de type *kappa*, d'environ 25 kDa chacune ;
- deux chaînes identiques dites **lourdes** ou "heavy" (H), d'environ 50 kDa chacune, variant d'une classe d'immunoglobuline à une autre [Janeway *et al.*, 2003].

Pour l'espèce humaine, le ratio *kappa/lambda* est de 2 pour 1 environ [Wang *et al.*, 2007].

Pour rappel : 1 kDa = $1,66 \times 10^{-21}$ g

1 kDa correspond approximativement à 8,42 acides aminés et à 136 atomes.

Comme toutes les protéines, les anticorps proviennent de la traduction des codons d'ARNm en acides aminés. Les chaînes sont synthétisées de manière séparée au niveau des ribosomes du réticulum endoplasmique du plasmocyte, puis sont assemblées deux par deux selon deux possibilités : soit H et L s'unissent en donnant HL puis H₂L₂, soit 2 H s'unissent donnant H₂, puis H₂L₁ puis H₂L₂.

Etant donné que ces chaînes sont constituées d'une succession d'acides aminés, chacune possède une extrémité carboxylique et une extrémité aminée.

Dans le cas des IgG, chaque chaîne H est associée à une chaîne L par l'intermédiaire d'une **liaison disulfure** (pont disulfure inter caténaires). Ce type de liaison permet aussi l'attachement des deux chaînes lourdes entre elles : à ce niveau se situe la région dite **charnière**. Les ponts disulfures sont également présents dans les chaînes elles-mêmes (ponts disulfures intra caténaires), dans chaque domaine de chaque chaîne [Wang, 2007].

1.2.1.2. Domaines variables et constants

Chaque chaîne possède une zone variable (au niveau de la moitié amino-terminale) et une zone constante (au niveau de la moitié carboxy-terminale). Les zones constantes sont nommées C-*kappa* ou C-*lambda* pour les chaînes légères, CH₁ à CH₃ pour les chaînes lourdes, et les zones variables sont nommées VH et VL selon qu'elles sont situées sur les chaînes lourdes ou légères (Figure 1).

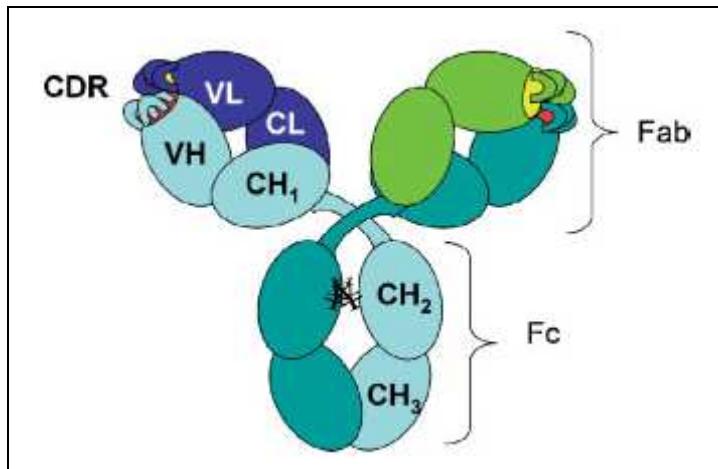


Figure 1 : Schéma de la structure d'un anticorps

VH : domaine variable de la chaîne lourde - VL : domaine variable de la chaîne légère - CH : domaine constant de la chaîne lourde - CL : domaine constant de la chaîne légère - CDR : Complementary Determining Region -

Fab : fragment de liaison à l'antigène - Fc : fragment de liaison au complément - ☈ : sucres

[Ionescu *et al.*, 2008]

1.2.1.3. Glycosylation

Lors de leur synthèse dans les plasmocytes, les immunoglobulines subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles. L'une des plus importantes est la glycosylation de chaque chaîne lourde au niveau de l'asparagine en position 297 du domaine CH₂, ceci se traduisant par l'attachement d'un oligosaccharide à cet emplacement.

Cet oligosaccharide peut être de composition diverse, avec pour "motif" de base un heptasaccharide pouvant être substitué par différents sucres : on parle alors de glycoformes. La glycosylation de l'anticorps influence la stabilité et la conformation de la protéine [Jefferis, 2005] (Figure 2).

Cette molécule joue par ailleurs un rôle important dans les propriétés effectrices des IgG, et en son absence, les Ig seraient plus sensibles à l'action de certaines protéases [Wang, 2007].

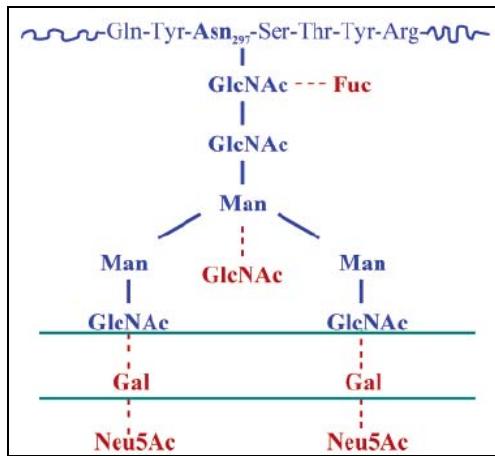


Figure 2 : Exemple de structure d'oligosaccharide d'IgG

GlcNAc : N-Acétylglucosamines - Man : mannose - Fuc : fucose - Gal : galactose - Neu5Ac : acide N-Acétylneuraminique - Gln : glutamine - Tyr : tyrosine - Asn : asparagine - Ser : sérine - Thr : thréonine - Arg : arginine - En bleu : motif de base (heptasaccharide) - En rouge : divers glycoformes [Jefferis, 2005]

1.2.1.4. Configuration spatiale

Les anticorps possèdent différents niveaux de structure caractéristiques des protéines :

- **Structure primaire** : définie par la séquence d'acides aminés liés par liaison peptidique, ceci donnant forme aux chaînes lourdes et légères ainsi qu'aux domaines variables et constants ;
- **Structure secondaire** : essentiellement des feuillets β stabilisés par liaisons hydrogène et interactions hydrophobes, et des hélices α ; l'analyse en infrarouge d'une immunoglobuline de type G révèle une structure secondaire à 70 % de type feuillets β ;
- **Structure tertiaire** : elle est obtenue par repliement de chaque "bras" de la molécule, donnant naissance à une structure tridimensionnelle indispensable à l'activité biologique. En effet, la structure tertiaire de l'anticorps se caractérise par un repliement spécifique des différentes zones, ceci permettant soit leur exposition (exemple : les CDR ou "Complementary Determining Region", intervenant dans la liaison à l'antigène), soit leur confinement (exemple : les motifs de glycosylation). L'anticorps est alors de nature hydrophile à l'extérieur et renferme un cœur dit hydrophobe, l'ensemble conférant à la protéine une forme plus ou moins globulaire, maintenue par des interactions non covalentes entre les domaines. Lorsque l'anticorps possède cette structure dans son intégrité, on parle de forme native. Sous certaines

conditions (température, pH), la structure tertiaire devient vulnérable et le dépliement de l'anticorps se produit, caractérisant une forme dite dénaturée [Wang, 2007] (Figure 3).

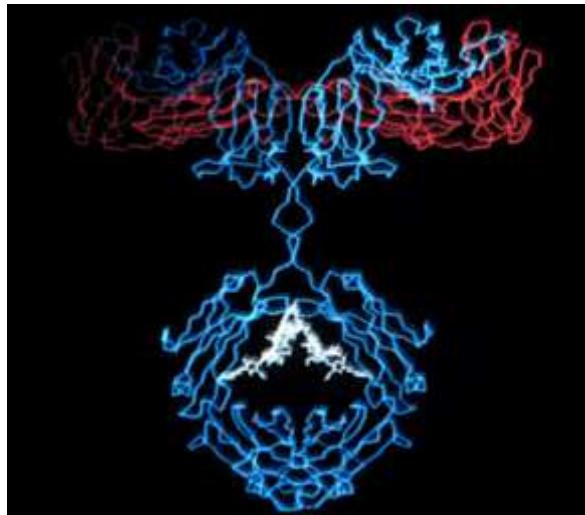


Figure 3 : Structure tridimensionnelle d'une IgG
[Wang, 2007]

1.2.2. Relation structure-activité

Un anticorps est constitué de deux parties qui confèrent à cette molécule une dualité fonctionnelle :

- les deux fragments **Fab** ("ab" pour "antigen binding") : constitués chacun d'une chaîne légère entière et d'une moitié de chaîne lourde, ils se lient à l'antigène ;
- le fragment **Fc** ("c" pour "crystallizable") : il est constitué de deux moitiés de chaînes lourdes associées par des liaisons disulfures, et possède la particularité de se fixer au complément et aux récepteurs situés à la surface des cellules effectrices (cytotoxiques) (Figure 1).

Les deux sites de liaison à l'antigène, appelés **paratopes**, sont constitués par l'interaction non covalente des régions variables des chaînes H et L (donc des extrémités des fragments Fab) et sont identiques entre eux : c'est à ce niveau que se fixent les sites antigéniques ou **épitopes**. La spécificité de ces sites de liaison réside dans les zones dites hypervariables appelées **CDR**

("Complementary Determining Region"), à l'extrémité des zones variables, constituées de quelques acides aminés [Janeway *et al.*, 2003].

La région charnière, région située entre les fragments Fab et le fragment Fc, confère aux sites de liaison des capacités de mouvements latéraux et rotationnels, ceci permettant des interactions avec des antigènes de conformations différentes.

Dans les années 60, la pepsinolyse des anticorps est décrite : grâce à l'action de la pepsine, on peut désormais produire le fragment **F(ab')₂**, anticorps dépourvu de son fragment Fc et dont l'activité des deux Fab est conservée. Ce fragment est constitué des deux Fab liés entre eux par les liaisons disulfures qui peuvent elles aussi être rompues pour donner deux fragments Fab indépendants (appelés **Fab'**) [Wilson, 2002 - Daugherty et Mrsny, 2006] (Figure 4).

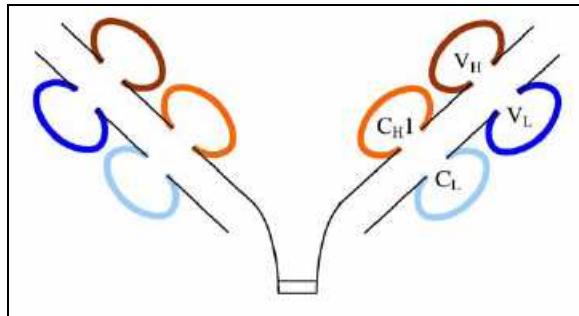


Figure 4 : Schéma d'un fragment $F(ab')_2$
[Daugherty et Mrsny, 2006]

Un anticorps possède donc une structure tridimensionnelle particulière et nécessaire à ses fonctionnalités : la connaissance de cette structure est indispensable lorsque l'on souhaite par exemple manipuler cette molécule pour effectuer des réactions chimiques.

1.3. Propriétés

1.3.1. Liaison à l'antigène

Lorsqu'un anticorps entre en contact avec un antigène, le site anticorps ne détalle pas la composition biochimique de l'antigène, il en reconnaît la forme et les interactions de surface, sans tenir compte de la nature protéique, lipidique, glucidique ou hétérogène de cet antigène. C'est la complémentarité des interactions moléculaires (acides aminés chargés positivement ou négativement, acides aminés aromatiques, acides aminés hydrophobes, liaisons électrostatiques, liaisons ioniques, force de Van der Waals) qui détermine l'affinité de la liaison.

La liaison entre un anticorps et un antigène est **spécifique, non covalente et réversible**, et de type ligand/récepteur. Un partage s'établit selon leurs concentrations et l'affinité du système, entre une forme liée LR et des formes libres L + R. L'affinité du système ou constante d'affinité intrinsèque K_a est le rapport de la constante de vitesse d'association et de la constante de vitesse de dissociation du système [Cohen, 1997] (Figure 5).

La force de cette interaction peut donc être décrite en termes d'équilibre réactionnel entre deux molécules : l'affinité créée entre un anticorps et un antigène se traduit par un certain taux du complexe immun atteint à l'équilibre [Harlow et Lane, 1988].

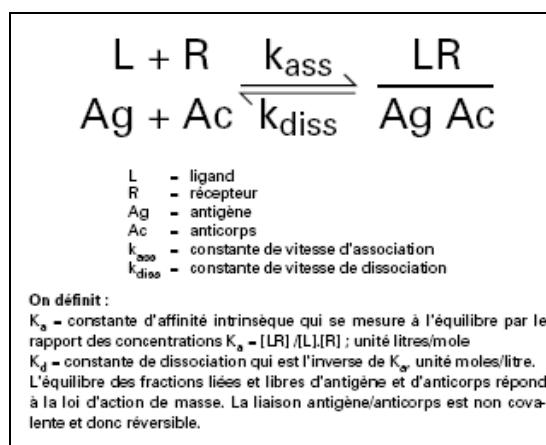


Figure 5 : Système antigène/anticorps comme système ligand/récepteur
[Cohen, 1997]

Les anticorps présentent plusieurs particularités qui les rendent tout spécialement adaptés aux détections et aux dosages que l'on veut en faire : l'affinité des systèmes (qui, par convention, est exprimée par la mesure de la constante de dissociation K_d) est élevée, $K_d = 10^{-6}$ à 10^{-12} mole/Litre. Cela implique que l'anticorps peut capter un ligand faiblement concentré sans le relâcher trop vite. Contrairement aux enzymes qui transforment leur ligand (substrat) en produit, les anticorps ne modifient pas, sauf exception, leur antigène par cette liaison [Cohen, 1997].

Un anticorps est donc dit à haute affinité pour l'antigène contre lequel il est dirigé, et cette propriété de spécificité permet l'utilisation de la réponse immune humorale à base d'anticorps comme outil pour de nombreuses applications, *in vivo* comme *in vitro*.

1.3.2. Activation du complément et des cellules immunocompétentes

In vivo, une fois le complexe anticorps-antigène (ou complexe immun) formé, le système immunitaire produit des cellules capables d'éliminer l'antigène présenté par l'anticorps, ceci par l'intermédiaire du fragment Fc qui se fixe sur les récepteurs de ces cellules et qui est alors reconnu. On parle de **toxicité cellulaire anticorps-dépendante** ("Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity" ou ADCC). Le fragment Fc peut également se lier au complément pour déclencher le processus de **toxicité cellulaire complément-dépendante** ("Complement Dependent Cellular Cytotoxicity" ou CDCC) par recrutement de phagocytes [Wang, 2007].

1.4. Anticorps monoclonaux

1.4.1. Définition

Les immunoglobulines présentent une grande diversité expliquée par :

- la variabilité **isotypique**, qui est liée aux différents types de chaînes légères et lourdes pour tous les individus d'une même espèce ;
- la variabilité **allotypique**, qui est observée entre individus d'une même espèce ;

- la variabilité **idiotypique**, qui est observée entre les anticorps provenant de plasmocytes différents chez un individu.

Par conséquent, il est extrêmement difficile d'utiliser les anticorps sériques, dits **polyclonaux**, en tant que produits thérapeutiques ou comme outils dans les réactions immunochimiques : dans le premier cas, une réaction du système immunitaire de l'hôte est immédiatement induite, dans le second cas, les différents types d'anticorps interfèrent entre eux. De plus, les anticorps sont produits *in vivo* par les plasmocytes qui ne peuvent pas être cultivés *in vitro*. C'est pour ces raisons que la recherche s'est longtemps penchée sur le problème de la production d'anticorps.

En 1975, Köhler et Milstein ont développé une méthode de culture de cellules produisant des anticorps de spécificité définie. Le principe de cette technique repose sur la constitution d'un **hybridome**, c'est-à-dire la fusion entre un plasmocyte (clone) sécrétant un type d'anticorps spécifiques (suite à l'immunisation d'un animal, par exemple la souris), et une cellule de myélome qui confère à l'hybridome une capacité de prolifération illimitée. L'hybridome produit alors une catégorie d'anticorps dirigés contre un type d'antigène, spécificité provenant du plasmocyte unique employé dans la fusion. On parle donc d'anticorps monoclonaux, par opposition aux anticorps polyclonaux issus de plasmocytes différents (Figure 6).

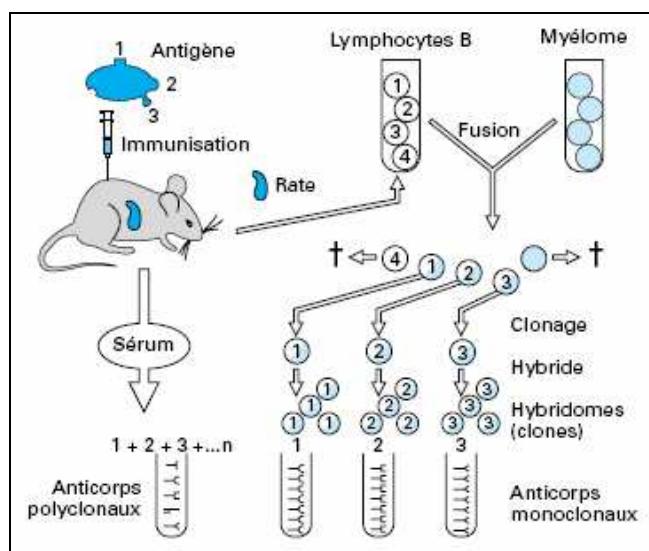


Figure 6 : Production d'anticorps monoclonaux par fusion somatique
[Cohen, 1997]

1.4.2. Anticorps chimériques, humanisés et recombinants

La découverte des anticorps monoclonaux a permis, dès la fin des années 70, des avancées considérables en clinique humaine, mais également dans le domaine de la recherche fondamentale et du diagnostic.

Cependant, d'importants problèmes liés à l'utilisation itérative d'un anticorps de souris ou de rat chez l'Homme, en tant que thérapeutiques, sont apparus rapidement : des anti-anticorps de souris (HAMA pour "Human Anti-Mouse Antibody") sont produits par le système immunitaire du patient lors de l'administration d'anticorps issus d'un hybridome d'origine murine, et conduisent à la diminution d'efficacité et à des effets secondaires indésirables dus à la formation de complexes immuns.

Ces problèmes ont progressivement disparu, au début des années 80, grâce à l'élaboration d'anticorps monoclonaux issus du génie génétique :

- **Les anticorps chimériques** : ils sont issus de l'assemblage de l'ADN codant pour le domaine VH et le domaine VL d'un anticorps monoclonal murin avec l'ADN codant les domaines constants H et L d'une immunoglobuline humaine. De tels anticorps sont humains à 75% et moins immunogènes que les anticorps de souris.
- **Les anticorps humanisés** : ils sont construits par greffe de régions hypervariables (ou CDR) d'anticorps monoclonaux de souris sur des régions dites charpentes (VH et VL humaines). Ces anticorps se révèlent peu immunogènes pour l'Homme.
- **Les anticorps humains recombinants** : grâce, notamment, à la maîtrise des techniques d'expression de peptides à la surface des phages filamentueux (appelées "phage display"), on peut désormais construire des régions VH et VL humaines en partant de l'ADN codant pour ces régions et provenant de lymphocytes B humains ou produits *in vitro* [Bourel et Teillaud, 2006 – Carter, 2001] (Figure 7).

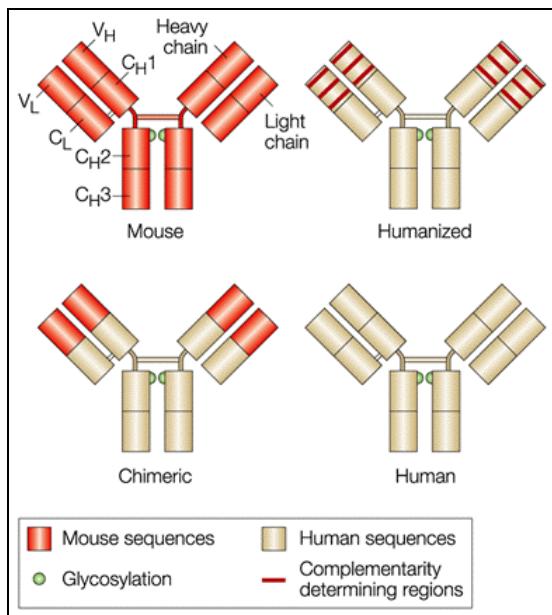


Figure 7 : Différentes formes d'anticorps monoclonaux
[Carter, 2001]

Ainsi, grâce à leur spécificité de liaison, leur homogénéité et leur production en quantités illimitées, les anticorps monoclonaux deviennent incontournables, notamment en tant que produits thérapeutiques innovants. À l'heure actuelle, ils sont employés en imagerie médicale et dans le cadre d'immunothérapies pour traiter certains cancers, maladies auto-immunes et infectieuses, ou encore pour éviter des rejets de greffe (Tableaux 1 et 2).

DCI	Spéc. Pharma	Type	Antigène	Pathologie	Dates obtention AMM ^c	
					FDA	EMEA
Satumomab	Oncoscint ¹¹¹ In	Murin IgG	TAG-72	Cancer colorectal et ovaires	30-12-1992	NA
Arcitumomab ^a	CEA-Scan ^{99m} Tc	Murin F(ab') ₂	CEA	Cancer colorectal	28-6-1996	4-10-1996
Imciromab	Myoscint ¹¹¹ In	Murin Fab	Myosin	Nécroses myocarde	3-7-1996	NA
Nofetumomab	Verluma ^{99m} Tc	Murin Fab	TAG-40	Cancer poumon à petites cellules	20-8-1996	NA
Capromab	Prostascint ¹¹¹ In	Murin IgG	PSMA	Cancer prostate	28-10-1996	NA
Sulesomab	LeukoScan ^{99m} Tc	Murin Fab'	NCA	Ostéomyélite	NA	14-2-1997
Fanolesomab ^b	NeuroSpec ^{99m} Tc	Murin IgM	CD15	Appendice et ostéomyélite	2-7-2004	NA

^a AMM retirée le 27 septembre 2005 du Marché européen.

^b AMM retirée le 19 décembre 2005.

^c NA : non approuvé.

Tableau 1 : Anticorps monoclonaux utilisés en imagerie actuellement sur le marché
[Baty et Chames, 2006]

Generic name	US trade name	Description	Therapeutic category	US approval date	FDA designations
Muromonab-CD3	Orthoclone OKT3	Murine, IgG2a, anti-CD3	Immunological	06/19/86	None
Abciximab	ReoPro	Chimeric, IgG1κ Fab, anti-GPIIb/IIIa	Hemostasis	12/22/94	P
Rituximab	Rituxan	Chimeric, IgG1κ, anti-CD20	Cancer	11/26/97	P, O
Daclizumab	Zenapax	Humanized, IgG1κ, anti-CD25	Immunological	12/10/97	P, O
Basiliximab	Simulect	Chimeric, IgG1κ, anti-CD25	Immunological	05/12/98	P, O
Palivizumab	Synagis	Humanized, IgG1κ, anti-RSV	Anti-infective	06/19/98	P
Infliximab	Remicade	Chimeric, IgG1κ, anti-TNFα	Immunological	08/24/98	P, AA, O
Trastuzumab	Herceptin	Humanized, IgG1κ, anti-HER2	Cancer	09/25/98	P, FT
Gemtuzumab ozogamicin	Mylotarg	Humanized, IgG4κ, anti-CD33; immunotoxin	Cancer	05/17/00	P, AA, O
Alemtuzumab	Campath	Humanized, IgG1κ, anti-CD52	Cancer	05/07/01	P, AA, FT, O
Ibrutumomab tiuxetan	Zevalin	Murine, IgG1κ, anti-CD20; radiolabeled (Y-90)	Cancer	02/19/02	P, AA, FT, O
Adalimumab	Humira	Human, IgG1κ, anti-TNFα	Immunological	12/31/02	S
Omalizumab	Xolair	Humanized, IgG1κ, anti-IgE	Immunological	06/20/03	S
Tositumomab-I131	Bexxar	Murine, IgG2aλ, anti-CD20; radiolabeled (I-131)	Cancer	06/27/03	P, FT, O
Efalizumab	Raptiva	Humanized, IgG1κ, anti-CD11a	Immunological	10/27/03	S
Cetuximab	Erbitux	Chimeric, IgG1κ, anti-EGF receptor	Cancer	02/12/04	P, AA, FT
Bevacizumab	Avastin	Humanized, IgG1κ, anti-VEGF	Cancer	02/26/04	P, FT
Natalizumab	Tysabri	Humanized, IgG4κ, anti-α4-integrin	Immunological	11/23/04	P, AA
Ranibizumab	Lucentis	Humanized, IgG1κ Fab, anti-VEGF	Ophthalmic	6/30/06	P
Panitumumab	Vectibix	Human, IgG2κ, anti-EGF receptor	Cancer	9/27/06	P, AA, FT
Eculizumab	Soliris	Humanized, IgG2/4κ, anti-complement-5	Immunological	3/16/07	P, O

CD, cluster of differentiation; EGF, epidermal growth factor; Fab, antigen-binding fragment; GP, glycoprotein; HER, human epidermal growth factor receptor; RSV, respiratory syncytial virus; TNF, tumor necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; AA, accelerated approval; FT, US fast track designation; O, US orphan designation; P, priority review; S, standard review.

Note added in press: Certolizumab pegol was approved in the US on 4/22/08.

Tableau 2 : Quelques anticorps monoclonaux à usage thérapeutique actuellement sur le marché
[Reichert, 2008]

De plus, ces progrès récents d'ingénierie des anticorps ont également ouvert de nouvelles perspectives pour le développement de réactifs servant au diagnostic.

1.4.3. Production et purification

Il existe deux grands types de procédés pour produire des anticorps monoclonaux : des procédés fondés sur la culture cellulaire et des procédés faisant appel à la transgénèse.

Actuellement, les anticorps monoclonaux thérapeutiques sont produits *in vitro* dans des cellules eucaryotes de mammifères, principalement de type CHO ("Chinese Hamster Ovary"). Ce type de cellules a pour intérêt la possibilité de reproduire les modifications post-traductionnelles, comme la N-Glycosylation, produites *in vivo* par les cellules humaines [Bourel et Teillaud, 2006].

Les lignées cellulaires sont cultivées en suspension dans des milieux de culture sans protéine, en particulier sans protéine d'origine animale. Les procédés de fabrication sont mis au point dans des unités pilotes, puis transférés dans des unités de fabrication aux normes BPF, pour des productions dans des réacteurs pouvant atteindre une capacité de 20 000 L [Birch et Racher, 2006].

Un exemple de schéma de procédé de fabrication d'anticorps monoclonaux à grande échelle est présenté en ANNEXE A1.

Enfin, la purification des anticorps intervient à partir de surnageant de culture, qui est dans un premier temps clarifié et concentré. Une chromatographie d'affinité à base de protéine A est ensuite utilisée, sachant que dans la majorité des cas, il s'agit d'anticorps de type IgG. Au moins une étape de chromatographie d'affinité est alors ajoutée au procédé, ce qui permet d'éliminer l'ADN résiduel et les protéines de la lignée productrice contaminantes (HCPs pour "Host Cell Proteins"). Un traitement permettant une inactivation de virus enveloppés potentiellement présents ainsi qu'une étape de nanofiltration, permettant d'éliminer les particules virales, complètent le procédé de purification pour assurer une sécurité biologique maximale [Bourel et Teillaud, 2006].

Une fois purifiés, les anticorps monoclonaux sont généralement conditionnés sous forme liquide et aux concentrations souhaitées, après échange du tampon de purification par le tampon final lors des étapes d'ultrafiltration/diafiltration [Shukla *et al.*, 2007].

1.4.4. Méthodes de caractérisation

Durant la production et à chaque étape de purification, la pureté et l'intégrité des anticorps monoclonaux sont suivies à l'aide de diverses méthodes analytiques (Tableau 3).

Méthode	Caractéristiques étudiées
SDS-PAGE (électrophorèse sur gel)	Pureté, protéolyse, dissociation, contaminants
IEF (IsoElectroFocalisation)	Isoformes de charge, déamidation, déglycosylation, oxydation
SEC (chromatographie par exclusion de taille)	Agrégation, dissociation, protéolyse
Absorbance ($\lambda = 280\text{nm}$)	Concentration
Peptide mapping	Pureté, identité (déamidation, substitution, oxydation, protéolyse, structure primaire)
Spectrométrie de masse	Masse moléculaire, structure primaire, glycosylation
Analyses biophysiques (RMN, dichroïsme circulaire, fluorescence intrinsèque)	Structures secondaire et tertiaire, dénaturation
Immunoessais	Liaison à l'antigène, contaminants spécifiques, isotypage
Hybridation ADN	Contamination par ADN cellulaire
Essais cellulaires <i>in vitro</i>	Activité (liaison à l'antigène, neutralisation)
Western blot	Contaminants ("Host Cell Protein"), profils des produits de dégradation

Tableau 3 : Principales méthodes d'analyse des anticorps monoclonaux
[Birch, 1995]

1.4.5. Stabilité

De par leur nature protéique, les anticorps sont sensibles à de nombreuses influences environnementales : température, lumière, pH extrêmes, agitation, cisaillement, cycles de congélation/décongélation, et certains métaux et solvants organiques.

Les principales voies de dégradation des anticorps sont de nature chimique (oxydation des résidus méthionine, déamidation, hydrolyse, etc.) et/ou physique (agrégation). Pour pallier ces problèmes, les anticorps sont formulés en solutions tamponnées additionnées d'excipients appropriés selon leur utilisation finale (en tant que thérapeutiques ou pour le domaine expérimental) ou encore peuvent être stabilisés *via* la lyophilisation [Daugherty et Mrsny, 2006].

2. Le diagnostic biologique *in vitro*

2.1. Définition

Le diagnostic biologique est fondé sur des épreuves (tests) de laboratoire réalisées sur un sujet, sur les résultats des cultures bactériennes ou sur l'analyse de prélèvements organiques [Manuila *et al.*, 1999]. Ces analyses sont réalisées au sein des laboratoires d'analyses médicales (libéraux ou hospitaliers), des centres de transfusion sanguine, des centres de lutte contre le cancer. Certains tests peuvent également être réalisés en cabinet médical ou par les patients eux-mêmes [SFRL, 2009].

2.2. Evolutions

L'industrie des réactifs et instruments à usage diagnostique *in vitro* pour les tests standardisés sur des prélèvements biologiques est une activité répertoriée depuis 1960. A l'heure actuelle, deux évolutions se distinguent :

- d'une part, les laboratoires d'analyses médicales deviennent de plus en plus automatisés,
- d'autre part, les pratiques de tests proches du patient utilisant des outils intégrés, d'emploi très simple et qualifiés de "tests de diagnostic rapides" prennent une place de plus en plus importante.

Par ailleurs, le diagnostic *in vitro* s'étend également au suivi pronostique des traitements : on parle alors de théagnostic [Delair, 2003].

2.3. Dispositifs Médicaux de Diagnostic *In Vitro* (DMDIV)

Les Dispositifs Médicaux de Diagnostic *In Vitro* (DMDIV) regroupent les réactifs, produits, matériaux, instruments et systèmes, leurs composants accessoires ainsi que les récipients pour échantillons destinés à être utilisés *in vitro*, seuls ou en combinaison, dans l'examen

d'échantillons provenant du corps humain. Selon l'article L5221-1 du code de la Santé Publique, on peut citer comme principales catégories de DMDIV :

- les dispositifs (réactifs et automates) utilisés en biologie médicale y compris les étalons et contrôles,
- les dispositifs pour auto-diagnostic,
- les dispositifs (réactifs et automates) utilisés en anatomo-cytopathologie,
- les récipients pour échantillons.

Avant leur mise sur le marché, les DMDIV font tous l'objet d'essais cliniques au même titre que les médicaments afin d'obtenir l'AMM délivrée par les autorités de santé. Par ailleurs, ils doivent tous porter un marquage CE conformément à la directive européenne n° 98/79/CE [AFSSAPS, 2008].

2.4. La réactovigilance

2.4.1. Définitions

La réactovigilance a pour objet la surveillance des incidents et risques d'incidents résultant de l'utilisation d'un dispositif médical de diagnostic *in vitro* (DMDIV).

Comme les autres vigilances mises en œuvre par l'AFSSAPS, elle s'exerce sur les produits de santé après leur mise sur le marché pour permettre aux autorités compétentes de prendre les mesures nécessaires à la protection de la santé publique.

La réactovigilance est instituée en France en tant que vigilance sanitaire, au même titre que la pharmacovigilance (pour les médicaments), l'hémovigilance (produits sanguins labiles), la matériovigilance (dispositifs médicaux), la pharmacodépendance (stupéfiants et psychotropes), la biovigilance (organes, tissus, cellules et produits thérapeutiques annexes), la cosmétovigilance (produits à finalité cosmétique ou d'hygiène corporelle) et l'infectiovigilance (risque infectieux).

2.4.2. Cadre de fonctionnement

La réactovigilance a pour objectifs :

- le signalement et la déclaration de tout incident ou risque d'incident,
- l'enregistrement, l'évaluation et l'exploitation de ces informations,
- la réalisation de toutes études ou travaux concernant la qualité ou la sécurité d'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*,
- la réalisation et le suivi des actions correctives décidées.

Ce système est organisé à l'échelon national par le biais de l'AFSSAPS et de la commission nationale des DMDIV, mais aussi à l'échelon local grâce à l'Etablissement Français du Sang, aux fabricants, mandataires, distributeurs et importateurs de DMDIV, aux correspondants locaux de réactovigilance et aux professionnels de santé.

3. Principe des immunoessais

Les tests de diagnostic biologique utilisent des molécules de très grande spécificité : substrats d'enzymes, anticorps, antigènes, oligonucléotides, qui leur confèrent une extrême sélectivité. Un anticorps reconnaît la conformation spécifique d'un antigène avec une très forte sélectivité, la limite de sensibilité étant de l'ordre de 10^5 molécules dans un échantillon qui peut en contenir 10^{16} , dont certaines sont de structures proches. Cette particularité propre aux anticorps en fait des outils diagnostiques puissants [Delair, 2003].

Ainsi, de nombreuses techniques standard utilisées en biologie exploitent la spécificité et la stabilité de la liaison des antigènes aux anticorps [Janeway *et al.*, 2003].

3.1. La réaction antigène-anticorps *in vitro*

Les immunoessais sont définis comme des techniques basées sur le principe de la reconnaissance spécifique entre un antigène et un anticorps.

Aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, les anticorps sont des molécules à fort pouvoir de liaison spécifique envers de nombreuses catégories de molécules biologiques (protéines, particules virales, oligonucléotides, etc...), mais également avec des molécules de faible poids moléculaire appelées **haptènes**, telles que certaines hormones ou vitamines [Ekins, 1998]. Pour ces raisons, les anticorps sont choisis comme « réactifs » dans de nombreuses réactions immunochimiques, notamment diagnostiques [Harlow et Lane, 1988].

Lorsqu'un anticorps et l'antigène contre lequel il est dirigé sont en présence, il se produit deux phénomènes :

- la combinaison réversible entre les paratopes et les épitopes,
- la révélation de la constitution du complexe immun.

Les techniques de diagnostic immunologique sont basées sur ces principes.

On distingue deux façons d'employer les anticorps à des fins de diagnostic :

- soit on cherche à détecter et/ou quantifier des anticorps présents dans un sérum grâce à un antigène connu,
- soit on utilise les anticorps en tant que réactif pour détecter et/ou quantifier un ou plusieurs types d'antigènes dans un échantillon biologique : on parle alors d'agent ou d'anticorps «de capture».

Il est intéressant pour la présente étude de comparer les techniques d'immunoessais classiques avec les puces à anticorps à des fins de diagnostic. Ainsi, pour une comparaison précise avec le type de puce évoqué par la suite, seules seront traitées les techniques faisant intervenir l'anticorps comme réactif.

3.2. Détection de la liaison antigène-anticorps

3.2.1. Traitement préalable des anticorps : le marquage

Une fois le complexe immun formé, celui-ci doit être révélé, c'est-à-dire détecté. La réaction de liaison entre un analyte présent en forte concentration et son anticorps spécifique peut être facilement mise en évidence, généralement par la formation d'un précipité visible. En revanche, lorsque l'analyte est en faible quantité, ce qui constitue le cas le plus fréquent en immunochimie, il est d'usage d'employer un anticorps marqué par une substance permettant l'amplification de la liaison spécifique obtenue et donc une reconnaissance plus aisée du complexe anticorps-antigène [Ekins, 1998].

Il existe deux sortes de détection par marquage de l'anticorps :

- la détection directe : elle consiste à marquer l'anticorps dirigé contre l'antigène étudié ;
- la détection indirecte : dans ce cas, l'anticorps spécifique de l'antigène n'est pas marqué, et le complexe immun formé est révélé par un second agent, soit un anticorps anti-Ig marqué, soit une protéine A marquée [Harlow et Lane, 1988].

La possibilité de marquer les anticorps par des molécules de marquage en font de bons outils d'identification : on parle ainsi de **sondes**. Lorsque le marqueur est un fluorophore, la

méthode est alors basée sur l'immunofluorescence. Lors de l'étape de détection, les marqueurs sont excités par une lumière de longueur d'onde propre au traceur, habituellement bleue ou verte (fluorophores commerciaux), et émettent une lumière de longueur d'onde différente déplacée vers le visible (Tableau 4).

Sonde	Excitation (nm)	Emission (nm)	Couleur de la lumière émise
Fluorescéine	495	519	Verte
PerCP («Peridin Chlorophyll Protein»)	490	675	Rouge
Texas Red	589	615	Rouge
Rhodamine	550	573	Rouge/Orange
R-phycoérythrine (PE)	480/565	578	Rouge/Orange

Tableau 4 : Longueurs d'onde d'excitation et d'émission de quelques fluorophores d'usage courant
[Janeway *et al.*, 2003]

Le greffage de fluorophore sur des molécules biologiques telles que les anticorps se fait classiquement par fonctionnalisation préalable grâce à l'ester de N-hydroxysuccinimidyl. Ce groupe réactif va ensuite se lier de façon covalente aux fonctions amines primaires de l'anticorps, généralement sur les lysines ou les fonctions amines terminales [Kusnezow *et al.*, 2007].

Le marquage des anticorps peut également faire intervenir un couple enzyme/substrat dont la réaction aboutit à l'obtention d'une couleur. Ce type de marquage est notamment utilisé dans la technique ELISA qui sera décrite par la suite (Voir paragraphe A.5.2.1).

Enfin, pour amplifier le signal obtenu par ces divers moyens de marquage, la méthode de choix est de coupler plusieurs molécules de biotine (ou vitamine B₈) à la molécule étudiée. La biotine possède une grande affinité pour la streptavidine ($K_D = 10^{-15}$ mole/Litre), protéine tétramère extraite de *Streptomyces avidinii*. Un anticorps peut être lié jusqu'à 10 molécules de biotine qui réagit avec la streptavidine elle-même marquée par un système enzymatique ou un fluorophore [Perry, 1995].

3.2.2. Les anticorps anti-immunoglobulines

Pour éviter d'avoir à marquer chaque préparation d'anticorps fixés, il convient de les détecter avec un anticorps marqué spécifique des immunoglobulines elles-mêmes. Les immunoglobulines, comme les autres protéines, sont immunogènes pour des individus d'une autre espèce. Les anticorps anti-immunoglobulines produits en grande majorité de cette manière reconnaissent des régions conservées communes à toutes les molécules d'immunoglobulines de l'espèce immunisante. D'autres peuvent, par exemple, être spécifiques des chaînes lourdes ou légères d'immunoglobulines, ou spécifiques d'un isotype particulier. Ainsi, les anticorps produits par immunisation de chèvres avec des IgG de souris sont beaucoup utilisés dans les tests immunologiques. Les anticorps anti-immunoglobulines marqués par des fluorophores sont désormais largement utilisés, aussi bien en immunologie que dans les autres secteurs de la biologie en tant que réactifs secondaires pour la détection de la fixation spécifique des anticorps, par exemple à des structures cellulaires [Janeway *et al.*, 2003].

3.3. Utilisation des anticorps en tant que réactifs des techniques de diagnostic in vitro

De nombreuses techniques standardisées utilisées en biologie exploitent la spécificité et la stabilité de la liaison des antigènes aux anticorps.

3.3.1. Anticorps libres en solution

La mesure directe de la liaison d'un anticorps à un antigène est utilisée dans la plupart des tests sérologiques quantitatifs. Les interactions entre ces deux molécules peuvent être mises en évidence de différentes manières.

3.3.1.1. Réaction d’agglutination

L’agglutination est un principe qui s’applique notamment aux réactions utilisées pour le groupage sanguin : on parle alors d'**hémagglutination**. Cette technique est utilisée pour identifier le groupe sanguin dans le système ABO des donneurs et receveurs de transfusion sanguine. L’agglutination est induite par des anticorps ou agglutinines appelés anti-A ou anti-B qui se fixent respectivement sur les antigènes des groupes A ou B. Ces antigènes de groupe sanguin sont disposés de manière répétitive à la surface des hématies, permettant aux cellules d’être interconnectées par les anticorps et ainsi d’être agglutinées. L’hémagglutination impliquant la fixation simultanée des anticorps à des antigènes identiques sur différentes cellules démontre que chaque molécule d’anticorps possède au moins deux sites de liaison à l’antigène [Janeway *et al.*, 2003].

3.3.1.2. Réaction de précipitation

Lorsqu’une quantité suffisante d’anticorps est mélangée à un antigène soluble macromoléculaire, il peut se former un précipité visible, en milieu liquide ou gélose, constitué de grands agrégats d’antigène lié à l’anticorps. La quantité de précipité dépend des taux d’antigène et d’anticorps, et du rapport entre les deux. Cette réaction a été le premier test utilisé pour la quantification des anticorps, mais aujourd’hui il n’est que rarement utilisé en immunologie [Janeway *et al.*, 2003].

3.3.2. Anticorps sur support solide

De nombreuses techniques de diagnostic utilisent les anticorps immobilisés sur support. Avant de présenter ce type de dispositif, il est intéressant de balayer les différentes méthodes d’immobilisation des anticorps. Cette partie est traitée dans le paragraphe suivant (Voir A.4.).

4. Méthodes d'immobilisation des anticorps

4.1. Immobilisation aléatoire

4.1.1. Par adsorption passive

Cette méthode est la plus simple à mettre en œuvre, puisqu'elle nécessite uniquement le contact entre l'anticorps et le support d'immobilisation. La liaison entre les deux espèces peut résulter d'interactions entre groupements polaires qui forment des liaisons hydrogènes entre eux (c'est le cas des groupements $-OH$, $-NH_2$, $=O$ et $=NH$), mais aussi d'interactions de type hydrophobe [Bilitewski, 2006].

Les interactions hydrophobes à l'origine de l'adsorption passive présentent le risque de bloquer le(s) site(s) de liaison entre l'anticorps et l'antigène [Brillhart et Ngo, 1991].

4.1.1.1. Sur support en verre

Le verre présente de nombreux avantages : il est peu onéreux, inerte, non polaire, mécaniquement stable et transparent (ce qui facilite la lecture en fluorescence) [Evenou, 2006]. Par ailleurs, ce matériau est facile à manipuler pour la fonctionnalisation de la surface, la fabrication en elle-même de la puce, et l'analyse du test [Kusnezow *et al.*, 2003]

4.1.1.2. Sur membrane en nitrocellulose

Les membranes en nitrocellulose permettent l'immobilisation d'approximativement $100\mu g$ de protéine par cm^2 . De plus, ce type de matrice présente une biocompatibilité vis-à-vis des protéines immobilisées, dans la mesure où celles-ci peuvent maintenir leur activité au cours du temps. Néanmoins, ces membranes possèdent une fluorescence intrinsèque et une capacité de diffusion de la lumière non négligeable. Pour ces raisons, on observe un faible signal sur bruit lors de l'analyse de faibles concentrations d'échantillon [Bilitewski, 2006].

4.1.1.3. Sur support en polystyrène

Le polystyrène est un polymère hydrophobe très utilisé pour les tests en plaques multi puits (Figure 8).

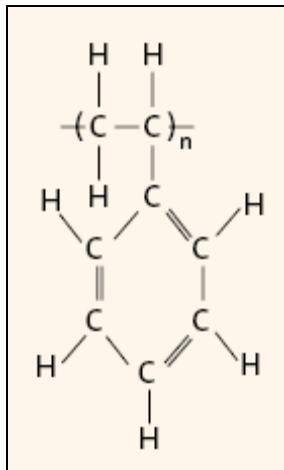


Figure 8 : Structure chimique du polystyrène
[Corning Technical Bulletin, 2008]

L’adsorption passive de biomolécules de type anticorps sur ce type de support se fait *via* des interactions hydrophobes et ioniques. A noter que l’immobilisation par liaison covalente est également possible sur du polystyrène chimique modifié (surface aminée ou carboxylée) [Corning Technical Bulletin, 2008].

4.1.2. Par diffusion dans un gel à base de polyacrylamide

Les gels en polyacrylamide ont l’avantage de présenter une faible fluorescence intrinsèque, une faible capacité d’absorption non spécifique et un pouvoir élevé de fixation des molécules à immobiliser. En revanche, la porosité limitée de ces gels retarde la diffusion des molécules à analyser, ces dernières devant interagir avec les composés immobilisés [Arenkov *et al.*, 2000].

4.2. Immobilisation orientée

D'une manière générale, l'immobilisation des anticorps est conditionnée par la nécessité de favoriser la liaison avec l'antigène, donc de faciliter l'accès aux bras Fab. On parle d'**immobilisation orientée** lorsque les anticorps sont fixés par l'extrémité opposée aux fragments Fab, c'est-à-dire le fragment Fc.

4.2.1. Via le complexe biotine/streptavidine

Comme décrit précédemment (Voir paragraphe A.3.2.1), la biotine et la streptavidine possèdent une grande affinité l'une envers l'autre, et ceci est exploité pour immobiliser des anticorps : la streptavidine est directement fixée au support et sert de point d'ancre à l'anticorps biotinylé [Peluso *et al.*, 2003].

4.2.2. Via les protéines A et G (liaison par bioaffinité)

Les protéines A et G sont des protéines membranaires extraites respectivement des germes *Staphylococcus aureus* et des streptocoques des groupes G et C. Elles ont la particularité de se lier spécifiquement, et avec une grande affinité, aux fragments Fc des IgG : on parle alors de récepteurs aux fragments Fc. Dans les années 70, ces protéines ont rapidement montré un grand intérêt dans la purification et l'analyse des immunoglobulines, mais également dans la séparation des différentes sous-classes (IgA, IgM, etc...) [Goding, 1978 ; Sjöbring *et al.*, 1991].

Leur spécificité de liaison pour le fragment Fc en fait des intermédiaires intéressants pour la fabrication de puces à anticorps. Néanmoins, ces protéines présentent les inconvénients d'être sensibles à la dénaturation et de s'adsorber sur le support de façon aléatoire, ceci conduisant à leur inactivation. Pour pallier ces deux problèmes, il a été montré par Tanaka, en 2006, l'intérêt de fusionner le domaine de la protéine G fixant le fragment Fc avec de l'élastine dont le domaine hydrophobe se lie préférentiellement au support solide.

Enfin, cette technique présente l'inconvénient d'immobiliser les anticorps en faible densité de surface, souvent avec des interactions fragiles et instables entre les protéines de capture et les anticorps [Peluso *et al.*, 2003].

4.2.3. Via un peptide synthétique

Les peptides synthétiques constituent une autre alternative aux protéines A et G : constitués de quelques acides aminés, ils sont généralement stables et préparés assez facilement actuellement. Leur utilisation dans l'immobilisation des anticorps à des fins d'immunoessais est néanmoins, pour l'instant, peu étudiée [Jung *et al.*, 2008].

4.2.4. Par liaison covalente

Le greffage covalent d'un anticorps, qui est par conséquent issu d'une réaction chimique, permet d'obtenir des conjugués protéine/support (en général des polymères) stables et utilisables en diagnostic [Delair, 2003]. En effet, la liaison covalente est une technique d'immobilisation des anticorps très robuste [Cretich *et al.*, 2006].

Néanmoins, toute modification chimique d'une protéine peut conduire à une altération de son intégrité, et donc à des pertes d'activité biologique [Delair, 2003]. Dans le cas des anticorps, la perte d'activité biologique modifie la capacité de liaison à l'antigène. Plusieurs phénomènes décrits par Peluso *et al.*, 2003, sont en cause:

- la modification chimique du site de liaison à l'antigène (situé dans les zones hypervariables des fragments Fab) ;
- l'encombrement stérique provoqué par le support lui-même ;
- l'encombrement stérique provoqué par la promiscuité des anticorps immobilisés ;
- la dénaturation due aux multiples sites d'attachement.

Pour éviter ce problème de perte d'activité, les réactions chimiques impliquées dans le greffage doivent avoir lieu à des positions prédéfinies sur l'anticorps, dans des sites qui ne sont pas impliqués dans les processus de reconnaissance entre anticorps et antigène. On parle

alors de régio-sélectivité qui se contrôle en utilisant des réactions chimio-sélectives entre le support et une fonction particulière portée par l'anticorps, par exemple les thiols de la région charnière, ou encore les groupements amine, carbonyle ou acide carboxylique des résidus oligosaccharidiques [Delair, 2003].

4.2.4.1. Anticorps non modifié

Certains complexes métalliques possèdent des propriétés chélatantes vis-à-vis des régions riches en histidine, tryptophane ou cystéine, situées dans le troisième domaine constant de la chaîne lourde des IgG (CH3). Il s'agit essentiellement de sels de chrome, zinc, fer ou nickel. Les interactions métal-protéine ne sont pas à proprement parler des liaisons covalentes, mais on les qualifie plutôt de complexes [Muir *et al.*, 2007].

4.2.4.2. Fragments Fab'

4.2.4.2.1. Fab' liés à des lipides

Vikholm *et al.*, 1999 ont étudié l'immobilisation de fragments Fab' sur une monocouche de phospholipides formée à la surface d'un support solide silanisé. Lorsque ces fragments sont liés de façon covalente à la N-(O-maleimidocaproyl) DiPalmitoylPhosphatidylEthanolamine (DPPE-EMC) contenue dans une couche de DiPalmitoylPhosphatidylCholine (DPPC), les fragments présentent une capacité de liaison à leur antigène élevée.

4.2.4.2.2. Fab' liés au complexe biotine/streptavidine

Une fois réduits, les groupements thiols des résidus cystéines des fragments Fab' peuvent réagir avec la biotine, ceci permettant ensuite une liaison spécifique à la streptavidine elle-même fixée sur un support [Peluso *et al.*, 2003].

4.2.4.3. Anticorps oxydé

4.2.4.3.1. Méthode d'oxydation

En 1995, Wolfe et Hage ont décrit une méthode de coupure des fonctions diols des carbohydrates des anticorps par le périodate, conduisant à la formation de fonctions aldéhydes. Ces fonctions peuvent ensuite être utilisées pour coupler des anticorps à des substrats possédant des résidus amines ou hydrazides (par exemple pour immobiliser des anticorps sur un support solide ou les conjuguer à des composés fluorescents). L'avantage de cette méthode est que la réaction d'oxydation a lieu sur des fonctions éloignées des sites de liaison à l'antigène, et par conséquent l'activité de l'anticorps n'est pas altérée. Si on utilise cette réaction pour ensuite immobiliser des anticorps, on cherchera à obtenir un nombre limité de fonctions aldéhydes. En revanche, si l'objectif est de marquer l'anticorps par des traceurs fluorescents, on aura besoin d'un nombre plus important de fonctions aldéhydes. Il faut veiller aux conditions d'oxydation, qui ne doivent pas être agressives pour la protéine, auquel cas les chaînes carboxyliques peuvent être endommagées. On veillera donc au temps de réaction, au pH et à la température mais également à la concentration de l'agent oxydant.

4.2.4.3.2. Fixation de l'anticorps oxydé

4.2.4.3.2.1. Via le complexe biotine/streptavidine

Cette fixation a été décrite par Peluso *et al.*, en 2003, grâce à l'utilisation d'un dérivé aminoxy de la biotine, ARP (N-(aminoxyacetyl)-N0-(D-biotinoyl)hydrazine), relié au fragment Fc oxydé pour former une O-alkyl oxime.

4.2.4.3.2.2. Via un bras espaceur

En 1988, Hoffman et O'Shannessy ont montré l'intérêt d'un bras espaceur pour immobiliser des anticorps oxydés sur une surface de type hydrazide : plus le bras espaceur est long, plus

l'activité de l'anticorps lié est importante, ceci grâce à la réduction des contraintes stériques envers les sites de liaison à l'antigène [Hoffman, O'Shannessy, 1988].

Depuis, différentes méthodes de fixation des anticorps par leur fragment Fc et *via* un bras espaceur plus ou moins long ont été rapportées, la plus fréquente étant la méthode faisant intervenir une liaison de type hydrazone [Evenou, 2006] (Tableau 5).

.

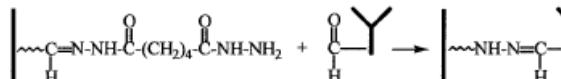
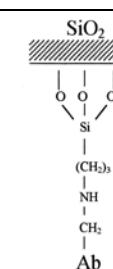
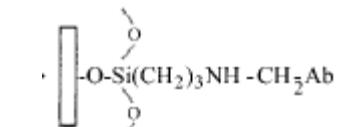
Type de support	Fonction réactive du support	Type de liaison	Schéma de l'immobilisation	Référence
Quartz ou verre silanisé avec GPTS	Acide adipique dihydrazide	Hydrazone		Gering <i>et al.</i> , 2002
Verre recouvert de gel en polyacrylamide	Fonctions amide partiellement substituées par des fonctions hydrazide	Hydrazone	-	Arenkov <i>et al.</i> , 2000
Laine de verre silanisée	APTES	Imine		Nisnevitch <i>et al.</i> , 2000
Silicium silanisé	APTES	Imine		Weiping <i>et al.</i> , 1999
Support recouvert de cellulose activée	Fonctions hydrazide	Hydrazone	-	Vankova <i>et al.</i> , 1998
Lame de verre ou fibre optique silanisée	Ligand maléimide/hydrazide ou disulfure/hydrazide	Hydrazone	-	Shriver-Lake <i>et al.</i> , 1997
Silice activée	Ligand dihydrazide	Hydrazone	-	Ruhn <i>et al.</i> , 1994

Tableau 5 : Méthodes de greffage d'anticorps oxydés sur des supports fonctionnalisés par des groupements amino ou hydrazide

Ab : anticorps - APTES : 3-aminopropyltriethoxysilane - GPTS : glycidoxypropyltriméthoxysilane [Evenou, 2006]

5. Techniques d'immunodiagnostic en phase solide

5.1. Principes

Les techniques de diagnostic immunologique en phase solide consistent à mettre en présence un système sur lequel le réactif (anticorps ou antigène) est immobilisé, et une phase liquide contenant un analyte qui pourra potentiellement se lier au réactif. Après incubation, la phase liquide contenant l'analyte libre est retirée. Ce type de technique est diffusion-dépendante : l'analyte en solution doit diffuser jusqu'au réactif immobilisé pour que l'interaction entre les deux entités ait lieu [Butler *et al.*, 1992].

On distingue 4 paramètres critiques intervenant dans ces techniques : la cinétique et le volume de réaction, la concentration réelle disponible du réactif (par opposition à la concentration théorique) et la configuration moléculaire des réactifs immobilisés [Butler, 2000].

La description de ces différentes techniques est réalisée ci-après selon le type de support employé.

5.2. Plaques de microtitration

Les plaques multi puits sont généralement en polymère rigide préformé (polystyrène ou polypropylène) et se présentent sous forme de systèmes à 96 puits (dits plaques de microtitration). Les avantages de ces dispositifs sont : leur faible coût, la simplicité d'utilisation, et la compatibilité avec de nombreux systèmes automatiques de révélation [Butler *et al.*, 1992].

La fixation des anticorps sur ce type de matériaux s'effectue *via* des interactions hydrophobes [Delair, 2003].

Les principales méthodes employant ces supports sont les radioimmunoessais (ou RIA pour "RadioImmunoAssay") et les immunoessais enzymatiques (ou EIA pour "Enzyme

ImmunoAssay"). Ces techniques utilisent la fixation directe des anticorps ou des antigènes et diffèrent par les moyens de détection des liaisons spécifiques. Les deux méthodes nécessitent une préparation pure d'anticorps ou d'antigène connu, ou les deux, afin de standardiser la technique. La description des techniques est faite en prenant pour exemple le plus fréquent des anticorps en tant que réactif.

5.2.1. ELISA ("Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay")

Les tests ELISA sont les immunoessais (EIA) les plus fréquemment employés pour détecter des concentrations sériques d'anticorps dirigés contre un antigène connu (exemple : diagnostics virologiques, comme le dépistage de l'infection par le VIH) ou bien pour détecter la présence d'antigènes [Janeway *et al.*, 2003].

La technique peut s'opérer de trois manières :

5.2.1.1. ELISA direct et indirect

L'anticorps utilisé comme réactif est couplé chimiquement à une enzyme, tandis que l'antigène non marqué est fixé à la paroi des puits de la plaque (Tableau 6).

Type d'enzyme	Type de substrat	Couleur du produit
Phosphatase alcaline	p-Nitrophénylphosphate (pNPP)	Jaune
Peroxydase	2'2-Azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)	Verte
	o-Phénylénediamine (OPD)	Orange
	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Bleue
	o-Dianisidine	Jaune/orange
	5-Aminosalicylic Acid	Marron
β-galactosidase	o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (NP GP)	Jaune

Tableau 6 : Marqueurs enzymatiques utilisés dans la méthode ELISA
[Cohen, 1997]

On laisse l'anticorps marqué se fixer à l'antigène non marqué dans des conditions permettant d'éviter une adsorption non spécifique et d'éliminer les anticorps non fixés. Ainsi, les sites de fixation résiduels sont bloqués par addition de protéines, en général la sérumalbumine bovine ("Bovine Serum Albumin" ou BSA), ou bien des surfactants de type polysorbates. La fixation des anticorps est mise en évidence par une réaction qui transforme un substrat chromogène en produit coloré [Steinitz, 2000 ; Janeway *et al.*, 2003] (Figure 9).

Lorsque l'anticorps dirigé contre l'antigène n'est pas directement marqué, mais lui-même détecté par un anticorps anti-immunoglobuline marqué, on parle alors d'ELISA indirect. Le second anticorps, qui peut se lier à raison de deux molécules marquées pour une non marquée, forme alors une seconde couche et permet l'amplification du signal [Janeway *et al.*, 2003].

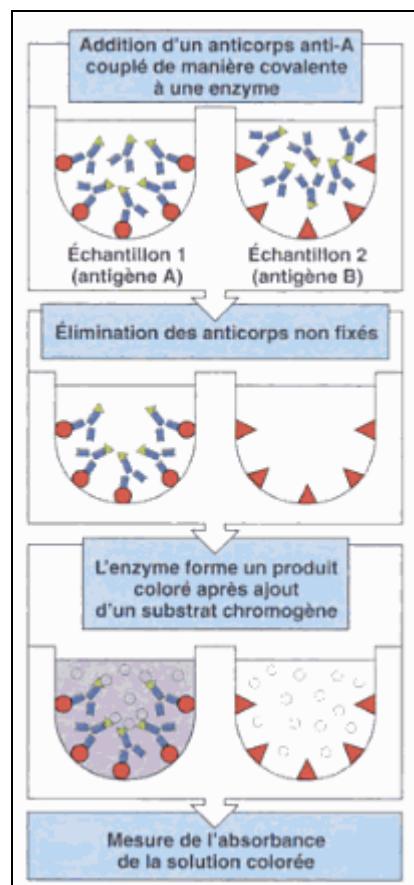


Figure 9 : Principe de la technique ELISA
[Janeway *et al.*, 2003]

5.2.1.2. ELISA en sandwich

La technique ELISA en sandwich, ou dosage par capture d’antigène, peut être utilisée pour mettre en évidence des produits sécrétés comme les cytokines. Au lieu de fixer directement l’antigène aux puits de la plaque, des anticorps spécifiques de l’antigène sont fixés d’abord. Ceux-ci sont capables de se lier à l’antigène avec une forte affinité, et concentrent donc l’antigène à la surface de la plaque, même s’il est présent en très faible concentration dans le mélange initial. Un autre anticorps marqué, reconnaissant des épitopes différents de ceux qui sont repérés par l’anticorps fixé à la plaque, est ensuite utilisé pour la mise en évidence de l’antigène lié [Janeway *et al.*, 2003].

5.2.1.3. ELISA par inhibition compétitive

Les techniques précédemment citées ne permettent pas de mesurer directement le taux d’antigènes ou d’anticorps dans un échantillon de composition inconnue, étant donné qu’elles dépendent de la fixation d’un anticorps ou d’un antigène pur marqué. Une manière de résoudre ce problème consiste à recourir à un dosage par inhibition compétitive (ou compétition). La présence et la quantité d’un antigène donné dans un échantillon inconnu sont déterminées par sa capacité d’entrer en compétition avec un antigène de référence marqué pour la liaison à un anticorps fixé aux puits de la plaque. Une courbe standard est d’abord tracée par addition de taux croissants d’une préparation de référence, non marquée ; on peut ensuite mesurer les taux d’antigène dans des échantillons inconnus par comparaison au standard [Janeway *et al.*, 2003].

5.2.2. RIA ("RadioImmunoAssay")

Introduite en 1960 par Yalow et Berson, cette technique est devenue rapidement une méthode analytique de routine [Perry, 1995].

Les RIA sont généralement utilisés pour mesurer les taux d’hormones dans le sang ou divers liquides biologiques. Ces techniques diffèrent des méthodes EIA par le type de molécule

permettant le marquage : on parle de radio marquage, réalisé en général avec l'iode 125. La fixation en RIA des anticorps sur l'antigène cible est mesurée directement par les taux de radioactivité des puits [Janeway *et al.*, 2003].

5.3. Particules sphériques

5.3.1. Types de particules

Les particules ou billes de latex de quelques millimètres sont les plus utilisées. Le couplage des anticorps à leur surface s'effectue par liaison hydrophobe. Ces supports servent à réaliser les tests d'agglutination, méthodes restant assez sensibles aux vibrations et à l'agitation thermique du milieu, susceptibles de fausser la réaction [Cohen, 1997].

5.3.2. Tests d'agglutination

Les tests d'agglutination permettent la quantification d'antigènes à une concentration de l'ordre de 1 µg/mL. Ils reposent sur le principe de formation de réseaux de particules décelables à l'œil nu par formation de complexes immunologiques entre les anticorps portés par des particules de latex et l'antigène présent dans l'échantillon [Delair, 2003].

L'agglutination survient quand la fixation des anticorps modifie le potentiel de surface des particules en diminuant leur répulsion réciproque. C'est le fragment Fc des immunoglobulines qui en est responsable. Les conditions physico-chimiques du milieu, pH, force ionique, substances hydrophobes, peuvent modifier le seuil critique d'agglutination et être utilisées pour sensibiliser l'agglutination [Cohen, 1997].

5.4. Tests immunochromatographiques

Dans les années 80, on a pris conscience que le diagnostic clinique pouvait être moins coûteux s'il était possible de transposer certaines analyses de routine du laboratoire vers le cabinet médical, voire même au domicile du patient, notamment dans les cas non pathologiques tels que la prise en charge de la grossesse et de la fertilité. C'est ainsi que le diagnostic biologique a connu un grand développement avec l'avènement des tests immunochromatographiques (ou "immunostrip").

5.4.1. Principe, description

Le principe de ce dispositif est de contenir, sur une bande poreuse de petite surface (quelques cm²), sous forme déshydratée, tous les réactifs nécessaires à la détection de l'analyte. À l'une des extrémités du support se trouve un réservoir contenant quelques millilitres d'une solution de développement, celle-ci étant physiquement séparée des réactifs grâce à une membrane. Après dépôt de l'échantillon contenant l'analyte sur la zone dédiée, qui est imprégnée d'un anticorps de capture marqué (en général par une enzyme), une pression doit être appliquée sur le réservoir pour rompre la membrane de rétention et ainsi libérer la solution de développement. Par capillarité, cette solution contenant un substrat coloré pour l'enzyme marquant l'anticorps, va entrer en contact avec le complexe immun formé. Celui-ci va migrer sur la bande et rencontrer un second anticorps immobilisé dirigé contre l'analyte ; l'ensemble sera stoppé sur une zone précise de la bande (en général une fenêtre de lecture du test) qui deviendra alors colorée. Le premier anticorps marqué présent en excès va ensuite migrer plus loin sur la bande et rencontrer à son tour un second anticorps (un anti-Fc), l'ensemble formant la bande de contrôle [Perry, 1995].

5.4.2. Exemples d'applications

La plupart des tests de grossesse vendus à l'heure actuelle reposent sur le principe de l'immunochromatographie : le test permet de détecter le taux de hCG (hormone Chorio-Gonadotrophique humaine) contenu dans l'urine. Ce type de test utilise des particules de latex

submicroniques colorées sur lesquelles sont immobilisés des anticorps dirigés contre la sous-unité α de l'hCG. Le second anticorps est quant à lui dirigé contre la sous-unité β de l'hormone. La zone de dépôt de l'échantillon (ici l'urine) est constituée d'une tige en contact direct avec la bande poreuse [Perry, 1995] (Figure 10).

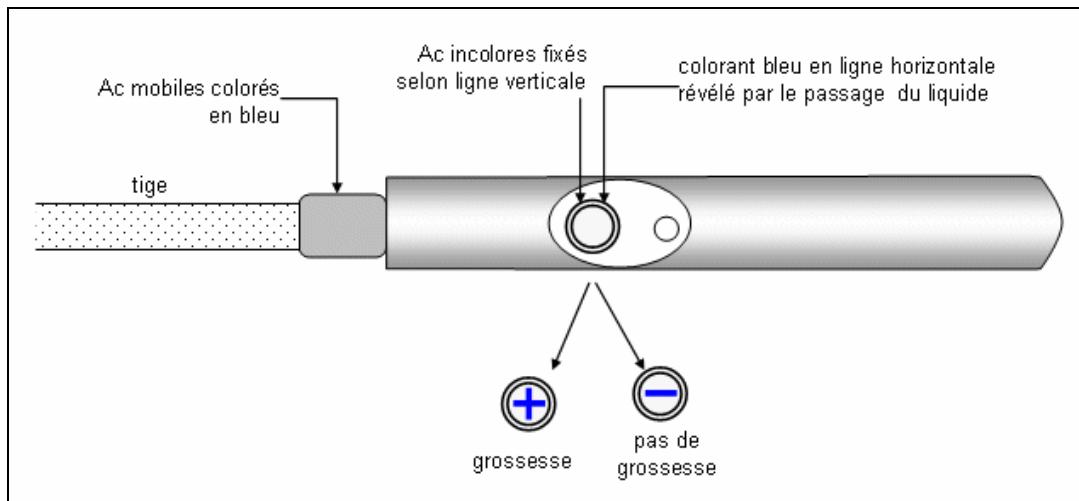


Figure 10 : Schéma d'un test de grossesse utilisant le principe de l'immunochromatographie
Ac : anticorps [Gallien, 2008]

Outre la rapidité d'utilisation et d'obtention du résultat, les tests immunochromatographiques permettent également de s'affranchir de l'intervention de personnel et d'équipements dédiés aux tests diagnostiques. Ainsi, ce type de test présente un grand intérêt pour le diagnostic et/ou la surveillance de certaines maladies infectieuses prépondérantes dans les pays en développement, où les moyens techniques pour effectuer des tests biologiques sont très limités. On peut noter les exemples de la peste [Chanteau *et al.*, 2003], du paludisme [Hance *et al.*, 2005], de la syphilis [Juárez-Figueroa *et al.*, 2007], ou encore de la dengue [Blacksell *et al.*, 2008].

5.5. Macro et micro-puces à anticorps

Ce type de dispositif permettant la mise en œuvre de tests immunodiagnostiques en phase solide fait l'objet du chapitre suivant.

6. Les puces à anticorps

6.1. Définitions

Une puce à anticorps est avant tout une **biopuce**, constituée d'un support, en général de type lame ("slide"), sur lequel sont intégrées des informations biologiques.

La technologie des puces à biomolécules a pris naissance à la suite des travaux de Roger Ekins décrivant les avantages potentiels d'un système miniaturisé, les **micro-spots**, par rapport à d'autres systèmes d'étude d'interactions moléculaires [Ekins, 1989]. Cette technologie repose sur trois étapes fondamentales :

- **le dépôt des molécules dites "sondes" sur un support solide,**
- **les interactions cibles-sondes,**
- **la détection du signal issu de cet appariement.**

Les puces à anticorps font partie de la catégorie des **puces à protéines** ("protein array" ou "protein chip") correspondant à l'arrangement ordonné d'un grand nombre d'échantillons sur un support miniaturisé, et pouvant contenir sous toutes leurs formes des protéines actives ou des membres d'une famille de protéines voire même l'ensemble des protéines d'un organisme (protéome).

6.2. Principe

Le principe des puces à anticorps est fondé sur la réaction antigène-anticorps entre des protéines à identifier et des anticorps spécifiques immobilisés sur la surface d'un support. On parle également de capteur d'affinité pour définir ce type de dispositif.

Le terme de puce sous-entend l'idée de miniaturisation, et la distinction arbitraire entre une **macro-puce** et une **micro-puce** repose principalement sur le nombre de spots protéiques déposés par cm^2 , la première en regroupant une vingtaine, tandis que la seconde peut en atteindre plus de 1 000, voire même 5 000 pour les plus récentes [Sakanyan, 2004 ;

Borrebaeck, 2006]. Pour les systèmes les plus miniaturisés, on parle même de surface inférieure au cm² [Wingren et Borrebaeck, 2008].

6.3. Autres exemples de biopuces

6.3.1. Puces à ADN

Le principe des puces à ADN limite les applications à la seule détection de séquences nucléotidiques complémentaires : on parle d'hybridation de l'ADN. Pour cette raison, ce type de puce ne bénéficie pas du même intérêt que les puces à anticorps pour l'application aux tests diagnostiques [Ekins, 1998].

La technologie actuelle des puces à protéines dérive de celle des puces à ADN, mais elle est pour l'instant moins avancée [Seurynck-Servoss *et al.*, 2007]. En effet, les puces à ADN sont désormais bien connues des autorités de santé comme la FDA et constituent une technique suffisamment mature pour être mise sur le marché [Coppée, 2008].

6.3.2. Puces à peptides

Les peptides synthétiques sont des molécules faciles à synthétiser, peu coûteuses, et qui présentent l'intérêt de mimer l'activité biologique de protéines, comme par exemple des enzymes dont on souhaite étudier l'activité. En revanche, de par leur simplicité de structure (la structure tertiaire n'est pas ou peu existante), leur orientation sur un support est souvent difficile à maîtriser, et ceci impacte l'activité biologique [Cretich *et al.*, 2006].

6.3.3. Puces à carbohydrates

Les puces à carbohydrates permettent d'étudier certaines interactions spécifiques carbohydrates/protéines, lesquelles sont souvent mises en jeu au cours de divers processus

cellulaires. À titre d'exemple, le mannose et le galactose immobilisés se lient à certaines lectines [Evenou, 2006].

6.4. Conception

6.4.1. Supports de choix

Dans la préparation des puces à protéines, l'un des problèmes majeurs réside dans l'ancrage des protéines et le maintien de leur configuration spatiale initiale, condition cruciale pour évaluer les interactions spécifiques impliquées dans leurs fonctions. La liaison des biomolécules au support dépend donc fortement de sa nature. De ce fait, dans le choix du type de support, de nombreux paramètres sont à prendre en compte : les propriétés physico-chimiques (résistance physique, stabilité au pH, etc.), l'absence de dénaturation des protéines, l'homogénéité et la morphologie des dépôts, la limite de détection, l'intensité absolue et la reproductibilité du signal, la facilité de manipulation, la compatibilité avec différents systèmes de détection des signaux [Sakanyan, 2004].

De façon générale, les principales qualités d'une lame nécessaires à l'immobilisation d'anticorps en vue de la fabrication d'une puce sont les suivantes :

- un fort taux de liaison à la molécule,
- la capacité à conserver l'activité biologique de la protéine,
- une faible variabilité entre les supports,
- un ratio signal/bruit élevé.

Selon Zhu et Snyder [2001], certains matériaux ne sont pas adaptés à la fabrication de puces : c'est le cas du polystyrène, du PVDF ("polyvinylidene fluoride") et de la nitrocellulose. Les raisons en sont nombreuses :

- la densité des liaisons des protéines au support est faible,
- l'immobilisation est aléatoire (c'est le cas de la nitrocellulose),
- les dépôts de protéines s'étalent en général sur le support,
- la détection des dépôts n'est pas évidente.

Il s'avère en revanche que les supports en verre sont des matériaux de choix. De plus, le verre est peu onéreux, inerte, non polaire, mécaniquement stable, et il présente un très faible signal de fluorescence intrinsèque, ceci facilitant les techniques de détection basées sur la spectroscopie de fluorescence.

Par ailleurs, l'addition d'une couche de gel à base de polyacrylamide et d'agarose permet de former une matrice 3D qui augmente la proportion de protéines immobilisées par rapport à un système en 2D et limite leur dénaturation. Cette matrice très poreuse et hydrophile facilite aussi la diffusion des molécules "capturées" par la protéine sonde [Zhu et Snyder, 2001].

Malgré toutes ces qualités, les matrices de type gel présentent l'inconvénient majeur de provoquer une immobilisation aléatoire des protéines, ceci pouvant entraver la reproductibilité des immunoessais puisque le nombre de sites Fab disponibles pour lier l'antigène n'est pas constant d'une lame à une autre. Une immobilisation directe des protéines sur la surface en verre n'est également pas envisageable car elle n'est pas stable et peut être source d'adsorption aléatoire. Pour ces raisons, la modification chimique de la surface des lames en verre, en vue d'une immobilisation par liaison covalente, est privilégiée.

En 2007, Seurnick-Servoss et *al.* ont montré la complexité des puces à protéines, en comparant 17 lames disponibles sur le marché, de chimies de surface diverses et destinées à l'immobilisation d'anticorps. Cette étude a révélé que les surfaces permettant l'immobilisation par liaison non covalente (adsorption physique) présentaient la même efficacité que les surfaces destinées à l'immobilisation par liaison covalente. Basée sur la comparaison de la taille des dépôts, du ratio signal/bruit, de la limite de détection et de la reproductibilité, cette étude a par ailleurs montré que les surfaces en verre fonctionnalisé de type **aminosilane**, **aldéhyde silane** et **poly-L-lysine** étaient les plus efficaces pour immobiliser des anticorps en vue d'une utilisation de type puce et avec un système de détection de type ELISA.

Il est intéressant de noter que les surfaces aminosilane et poly-L-lysine permettent une immobilisation *via* une adsorption physique, tandis que les silanes porteurs de fonctions aldéhydes se prêtent bien pour le greffage covalent des anticorps [Angenendt *et al.*, 2002].

6.4.2. Techniques de fixation des anticorps pour l'élaboration d'une puce

Comme cela a été décrit précédemment (Voir paragraphe A.4), plusieurs stratégies existent pour immobiliser des anticorps sur un support. Dans le cas des puces à anticorps, la littérature fournit de nombreux exemples : adsorption, liaison aux groupes thiols ou amines, etc [Kusnezow *et al.*, 2003]. Bien que les anticorps présentent un risque de dénaturation moindre par rapport à d'autres protéines, le challenge de cette étape de fabrication réside dans la conservation de l'état natif de l'anticorps et donc de sa capacité de liaison. Bien souvent, les liaisons covalentes présentent ce risque, mais elles permettent toutefois d'assurer une orientation optimale, et surtout de meilleures performances en terme de reproductibilité [Seurynck-Servoss *et al.*, 2007].

Certains auteurs remettent en question l'intérêt du bras espaceur, résultat de la fonctionnalisation de surfaces comme les lames de verre aminosilane. Seurynck-Servoss, en 2007, a notamment montré que l'addition d'un bras en C8 de type suberate (DSS ou BS3) n'apporte pas d'amélioration significative de l'intensité du signal détecté, quelque soit la quantité de protéine déposée (Figure 11).

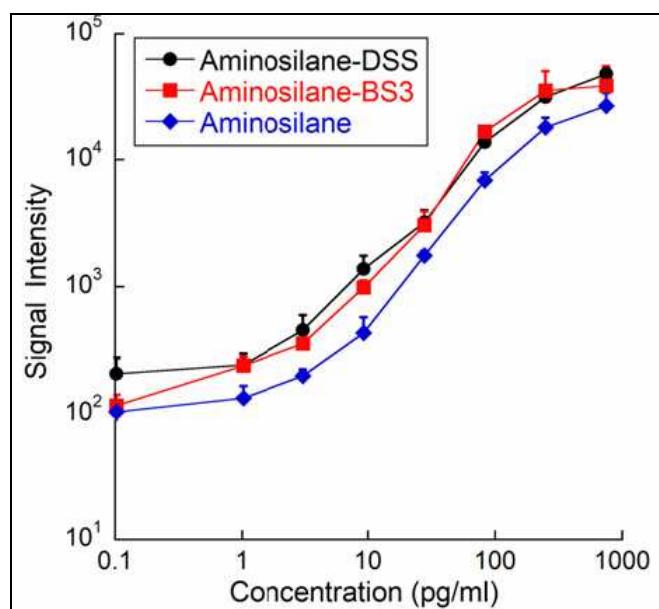


Figure 11 : Comparaison du signal obtenu après immobilisation d'anticorps par adsorption sur lame aminosilane et par liaison covalente sur lame aminosilane fonctionnalisée par BS3 ou DSS.

[Seurynck-Servoss *et al.*, 2007]

Le choix de la méthode d'immobilisation n'est pas le seul critère à étudier pour conserver l'intégrité des protéines. Les conditions de température et d'humidité doivent être également adaptées et l'absence de poussières parasites contrôlée durant le dépôt [Sanchez-Carbayo, 2006].

Enfin, une fois les anticorps immobilisés, il est nécessaire de bloquer les sites qui seraient disponibles pour se lier non spécifiquement aux protéines. La BSA est décrite comme un agent bloquant de choix, en particulier sur les surfaces de type poly-L-lysine [Steinitz, 2000].

6.5. Fonctionnement

Globalement, le fonctionnement d'une puce à anticorps se déroule de la manière suivante :

- Un échantillon contenant l'analyte à détecter parmi de nombreuses autres entités est déposé sur le support pour incubation.
- L'anticorps immobilisé à la surface du support joue le rôle d'une "sonde", détectant l'antigène pour lequel il est spécifique. Une liaison faible non covalente (donc réversible) mais à haute affinité va alors se créer entre l'anticorps et l'antigène.
- L'étape de détection permet de révéler cette interaction ainsi créée [Cretich *et al.*, 2006].

Pour l'étape de détection, deux cas se distinguent (Figure 12):

- Méthode directe : l'antigène est marqué, généralement par un fluorophore dérivé de la cyanine, Cy3 ou Cy5, qui sont respectivement vert et rouge (voie A) ;
- Méthode indirecte : on procède à une deuxième étape consistant à utiliser un anticorps secondaire marqué, qui va, lui aussi, se fixer à l'antigène (voie B) [Sanchez-Carbayo, 2006].

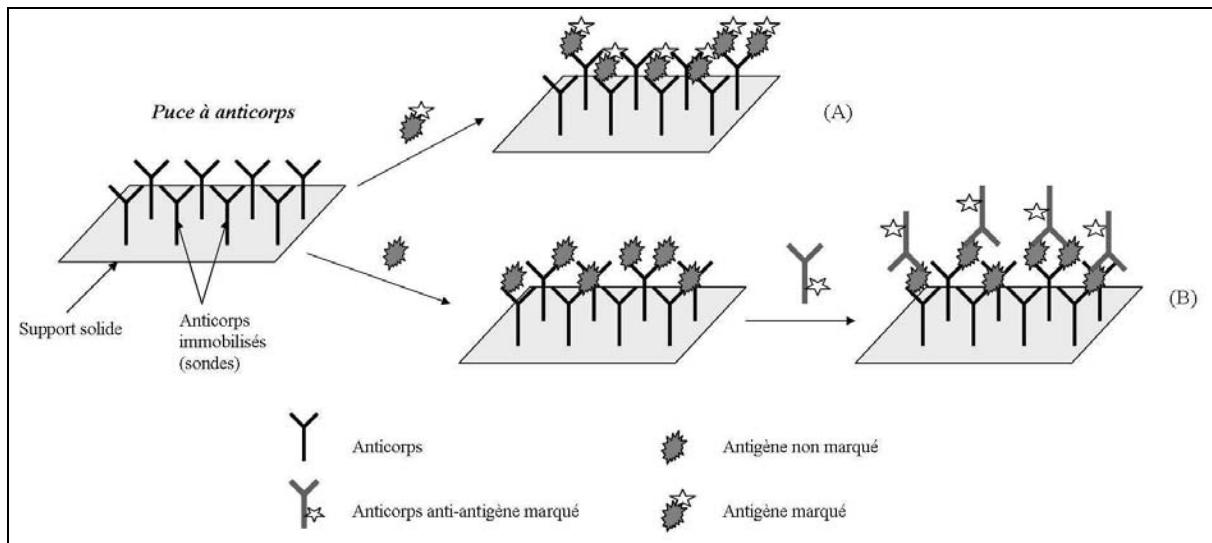


Figure 12 : Schématisation du principe de fonctionnement d'une puce à anticorps
[Evenou, 2006]

Dans le cas de la méthode indirecte, la liaison de l'antigène, à la fois par l'anticorps de capture et par l'anticorps marqué (ou anticorps de détection), augmente la spécificité du test par comparaison à la méthode directe. En revanche, cette technique est plus difficile à développer car elle nécessite systématiquement la combinaison d'une paire d'anticorps pour chaque antigène étudié [Sanchez-Carbayo, 2008].

6.6. Méthodes de détection

Les techniques actuelles de révélation des interactions anticorps-antigènes dans le cas des puces à anticorps sont classées en deux groupes [Cretich *et al.*, 2006]:

- Méthodes sans marquage utilisant la spectroscopie de masse, la résonance des plasmons de surface ("surface plasmon resonance", SPR) ou la microscopie à force atomique ("atomic force microscopy", AFM),
- Méthodes avec marquage mettant en œuvre la fluorescence (méthode la plus utilisée), la chimiluminescence, l'électrochimiluminescence ou la radioactivité.

6.6.1. Fluorescence

Certaines applications des puces à anticorps conduisent à étudier de nombreuses protéines en même temps, ceci compliquant l'étape de détection. L'une des approches simples, peu coûteuses, très reproductibles et hautement sensibles est l'utilisation de fluorophores tels que la fluorescéine ou les dérivés de la cyanine que l'on fixe essentiellement sur les résidus lysine [Kusnezow et al., 2007].

Par ailleurs, le principe de détection par méthode ELISA est souvent employé dans le fonctionnement des puces à anticorps, car elle permet le criblage de plusieurs protéines contenues dans un échantillon de faible volume (une dizaine de microlitres) [Seurynck-Servoss et al., 2007].

En 2008, Wingren et Borrebaeck publient une revue bibliographique intéressante des différents fluorophores utilisés pour la détection par méthode directe, pour des puces à anticorps à applications oncologiques.

6.6.2. Résonance plasmionique ou "surface plasmon resonance"

Lorsque des protéines sont fixées à la surface d'un film métallique, il existe, pour une longueur d'onde donnée, un angle où la réflexion de la lumière est perturbée par un phénomène physique complexe de transferts électroniques appelé résonance plasmionique [Cohen, 1997].

Cette technique détecte, en général à la longueur d'onde de 200 nm, les variations de l'index de réfraction du milieu influencées par les interactions entre molécules présentes dans ce milieu (Figure 13).

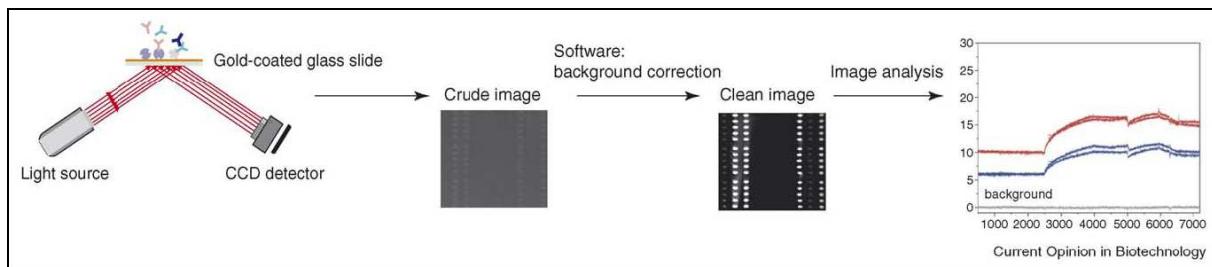


Figure 13 : Schématisation de la technique de résonance plasmonique
[Boozer *et al.*, 2006]

L'avantage de cette technique réside dans l'absence de tout marquage et de détection du fluorophore, étapes supplémentaires à envisager dans le cas de la détection par fluorescence. Par ailleurs, elle permet l'analyse de la cinétique de liaison en temps réel [Boozer *et al.*, 2006].

6.7. Applications actuelles et à venir

6.7.1. Puces fonctionnelles

Dans le cas des puces fonctionnelles, de nombreuses protéines, voire l'ensemble des protéines d'un organisme (protéome) peuvent être immobilisées. Le système ainsi obtenu sert à étudier les interactions biochimiques de ces entités [Cretich *et al.*, 2006].

Contrairement aux méthodes non ciblées, telles que la spectrométrie de masse ou l'électrophorèse sur gel, les puces à anticorps permettent de détecter la(s) protéine(s) d'intérêt avec une bonne reproductibilité et une grande sensibilité. Ces qualités sont de plus en plus exploitées pour étudier l'ensemble des protéines impliquées dans les cancers. Ces systèmes sont néanmoins limités par la disponibilité des anticorps à haute affinité pour la totalité des protéines étudiées, et sont donc supplantés par d'autres techniques (puce à tissus "tissue array" et Western Blot) [Sanchez-Carbayo, 2006].

6.7.2. Puces analytiques

L'utilité des puces à anticorps analytiques est la détection et/ou la quantification d'une entité particulière issue d'une matrice complexe telle que le sérum [Cretich *et al.*, 2006]. En comparaison de la méthode ELISA traditionnelle en plaque de microtitration 96 puits, l'usage des puces à anticorps est possible pour des quantités très limitées d'analytes (quelques microlitres). C'est ce qui constitue l'intérêt principal de ce dispositif à des fins diagnostiques [Seurynck-Servoss *et al.*, 2007].

De plus, l'avènement des nanotechnologies a permis une miniaturisation poussée de ces dispositifs (Figure 14) conduisant à une réduction considérable de la taille des dépôts (jusqu'à 200 µm de diamètre), à une haute densité de greffage d'anticorps (jusqu'à 2000 anticorps/cm²), et à une réduction du volume d'analyte déposé (entre 6 et 8 nL) [Dietrich *et al.*, 2004 ; Wingren et Borrebaeck, 2008].

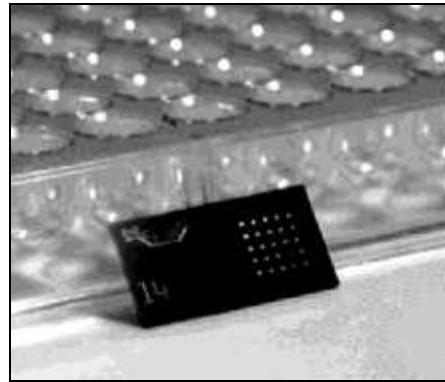


Figure 14 : Comparaison d'une nanopuce et d'une plaque 96 puits
[Dietrich *et al.*, 2004]

A l'heure actuelle, les ultramicropuces à anticorps permettent la détection de très faibles concentrations d'analytes (Limite de détection ou LOD "Limit of Detection" de l'ordre du fM), ceci constituant l'enjeu principal de ces dispositifs [Sanchez-Carbayo, 2008].

6.7.3. Exemples d'application

La littérature regorge d'exemples divers de l'intérêt grandissant de ces dispositifs dans l'application aux diagnostics, essentiellement pour la classification des cancers. Le tableau suivant en fait référence à travers quelques publications (Tableau 7).

Par ailleurs, Kopf et Zharhary ont publié une revue bibliographique en 2007 recueillant de nombreux exemples de travaux traitant de l'application des puces à anticorps en tant qu'outils innovants pour le diagnostic de certains cancers tels que celui du sein, de la vessie, de la prostate, du colon, etc [Kopf et Zharhary, 2007].

Anticorps immobilisés	Type de support	Echantillon étudié	Méthodes de détection	Application	Référence
82 Anticorps dirigés contre 147 CD différents	Film de nitrocellulose	Moelle osseuse et sang	Fluorescence	Classification des leucémies - Technologie appelée DotScan™	Barber <i>et al.</i> , 2009
Anticorps scFv dirigés contre différentes interleukines	Polymère MaxiSorp® (polystyrène modifié)	Sérum	Marquage par la biotine et détection par la streptavidine conjuguée à Cy5	Classification du cancer du sein métastatique	Carlsson <i>et al.</i> , 2008
Anticorps scFv dirigés contre une soixantaine de protéines	Polymère MaxiSorp® (polystyrène modifié)	Sérum	Marquage par la biotine et détection par la streptavidine conjuguée à Cy5	Diagnostic du cancer du pancréas	Ingvarsson <i>et al.</i> , 2008
Anticorps dirigés contre 12 cytokines	-	Cellules cancéreuses issues d'une culture	ELISA	Diagnostic du cancer du sein (détectio de HER2) - Technologie appelée RayBio™	Vasquez-Martin <i>et al.</i> , 2007
12 Anticorps dirigés contre différents CD	Membrane de cellulose activée	Cellules issues d'une culture de lymphocytes (modèles)	Fluorescence (Rhodamine)	Phénotypage de cellules souches pour transplantation	Ko <i>et al.</i> , 2005

Tableau 7 : Quelques exemples d'application des puces à anticorps à des fins de diagnostic

CD : Cluster de Différenciation – scFv : single chain Fv

6.8. Avantages et limites de ces dispositifs

Si on les compare aux divers formats d'immunoessais en phase solide décrits précédemment (Voir paragraphe A.5), les puces à anticorps constituent une technologie prometteuse dans le domaine du diagnostic et plus généralement dans l'étude des marqueurs biologiques (ou biomarqueurs). En effet, grâce à ces outils innovants, on peut désormais envisager le criblage à haut débit des protéines impliquées dans les pathologies, en consommant de moins en moins de produit, tout en gardant une sensibilité et une spécificité très satisfaisantes. Ainsi, Sanchez-Carbayo, en 2008, a comparé les caractéristiques d'une puce à anticorps à détection de type ELISA à celles d'un test ELISA classique (Tableau 8).

Feature	Antibody array (multiplex ELISA)*	ELISA (individual ELISA)
Sample type	Cell culture supernatant, cell culture protein extract, serum, plasma, body fluids, tissue	Cell culture supernatant, serum [‡] , plasma, body fluids
Volume/assay	2 – 5 µl	50 – 100 µl
Analytes/assay	100 – 1000	1
Reproducibility	< 10%	5%
Sensitivity	1 – 50 fg/ml	1 – 50 pg/ml
Specificity	High	High
Dynamic range	3 – 4 logs	2 logs
Assay time	4 h	4 h
Instrumentation	Simple	Simple

*Please note that antibody arrays commercially available in planar or bead versions are frequently described as multiplex ELISA kits by many suppliers, especially for cytokine and specific cell signalling measurements.
[‡]Although ELISAs can be used for any type of protein extract, usually their most recommended applications do not include total protein extracts of cell lysates or tissue. These samples may require dilution optimization analyses of the protein extract depending on the varying level of expression of the target protein in these specimens.

Tableau 8 : Comparaison entre une puce à anticorps et un test ELISA classique
[Sanchez-Carbayo, 2008]

Bien que leur utilité ne soit plus à démontrer, il faut néanmoins noter quelques limites de ces dispositifs. La conception des puces à protéines, et plus particulièrement des puces à anticorps, constitue un défi technologique. L'efficacité de ces dispositifs n'est garantie que si les molécules immobilisées sont intactes. Il est donc important de maintenir la structure native des protéines, ceci entre autres, grâce à un niveau d'hydratation suffisant. Ainsi, les structures de types micro ou nanopuits peuvent contribuer à limiter l'évaporation des solutions déposées, mais le problème de stockage de ces dispositifs reste entier [Weiner et al., 2005].

Par ailleurs, l'un des problèmes majeurs de conception des puces à anticorps est la sélection des protéines à haute affinité : il est important de valider la spécificité des anticorps monoclonaux destinés à ces fins. En général ceci peut être mené en couplant la méthode du Western Blot et la spectrométrie de masse pour identifier une entité de masse moléculaire précise. Par ailleurs, la linéarité de la méthode de détection de l'antigène doit être vérifiée en incluant des essais de dilution [Sanchez-Carbayo, 2006].

7. Notions de tests diagnostiques et tests de dépistage

7.1. Définitions

On parle de **test** pour désigner tout procédé de recueil de données sur la santé au sens large, qu'il s'agisse de question, de geste clinique, d'examen complémentaire. L'usage de tests sur l'état de santé correspond à deux situations très différentes : le diagnostic et le dépistage.

Le diagnostic correspond à une réponse à la demande d'un patient qui se plaint de symptômes, ou présente des signes, ou anomalies biologiques, et chez lequel l'existence d'une affection est vraisemblable [Czernichow *et al.*, 2001].

Le dépistage se définit comme l'identification dans une population a priori en bonne santé, de sujets présentant soit une maladie inapparente soit un risque élevé d'une maladie donnée, en vue d'examens complémentaires ou de mesures de prévention. Il est différent du diagnostic dans lequel les examens sont réalisés sur indications, symptômes ou test de dépistage positif, en vue d'un traitement. On distingue deux types de dépistage :

- le dépistage à haut risque : il est utile à condition qu'il soit effectivement possible de définir des groupes à haut risque, qu'il existe un traitement préventif efficace, applicable et acceptable, pour aboutir à une diminution de l'incidence de la maladie que l'on cherche à prévenir ;
- le dépistage à un stade précoce : dans ce cas, l'utilité du dépistage implique qu'il existe une possibilité de faire le diagnostic de la maladie à un stade préclinique et un traitement adapté au stade précoce qui améliore l'évolution [Rumeau-Rouquette, 2002].

7.2. Types de tests

Les tests posent des problèmes d'évaluation de l'état de santé différents selon leur nature :

- pour les examens qualitatifs (imagerie médicale, cytologie, questionnement, etc.), le résultat s'exprime :

- par une réponse binaire (exemple : anomalie absente ou présente),
- sous la forme d'une échelle nominale (exemple : fibrose, nécrose, etc.),
- sous la forme d'une échelle ordinale (exemple : germe sensible, intermédiaire ou résistant à un antibiotique donné),
- pour les examens quantitatifs (biochimie, hématologie, etc.), le résultat est une variable quantitative, qui nécessite de définir un "seuil" pour séparer le "normal" du "pathologique" ; ce seuil peut être défini sur des critères statistiques, compte tenu de la probabilité plus élevée de survenue de complications au-delà de ce seuil, ou en fonction de la pertinence ou non d'une intervention corrective comme le traitement [Czernichow *et al.*, 2001].

7.3. Indices d'évaluation d'un test

Le résultat d'un test, comparativement à un état de santé défini par un autre test de référence, est exposé à deux types d'erreurs :

- celle de conclure à tort qu'un malade (défini par l'examen de référence) ne l'est pas (au vu de l'examen à évaluer) : la recherche de ces **faux négatifs** ne peut se faire que chez de "vrais malades" ;
- celle de conclure à tort qu'une personne non-malade (définie par l'examen de référence) l'est (au vu de l'examen à évaluer) : la recherche de ces **faux positifs** ne peut se faire que chez des personnes indemnes de la maladie à étudier.

Deux indices permettent de quantifier chacune de ces erreurs :

- la **sensibilité** : c'est la proportion de tests positifs (vrais positifs) chez les personnes malades ; elle exprime la proportion des malades que le test est en mesure de repérer par un résultat positif. Plus un test est sensible, moins il y a de faux négatifs.
- la **spécificité** : c'est la proportion de tests négatifs (vrais négatifs) chez des personnes indemnes de la maladie, qui exprime la part des personnes indemnes reconnues comme telles par le résultat négatif du test. Plus un test est spécifique, moins il y a de faux positifs [Czernichow *et al.*, 2001].

7.4. Les mesures de prévention médicale

La prévention médicale désigne l'ensemble des mesures permettant d'éviter l'apparition, la progression et les séquelles d'une maladie au sein de la population. Le dépistage à visée collective, de masse ou organisé est un exemple de moyen de prévention de certaines pathologies. Dans certains cas, les mesures de prévention ont pour but d'empêcher ou de freiner l'évolution d'une maladie existante. Cela passe par un dépistage précoce envers des populations "cible", identifiées soit par groupe d'individus dits à risque vis à vis d'une pathologie, soit par tranche d'âge. C'est le cas du cancer du sein pour lequel des actions de dépistage sont organisées en France pour les femmes âgées de 50 à 75 ans [EURASANTE, 2008].

7.5. Les puces à anticorps : l'avenir du diagnostic précoce ?

A l'heure actuelle, les tests diagnostiques et les tests de dépistage précoce font de plus en plus appel au génie génétique et à la protéomique pour identifier et suivre l'évolution des marqueurs biologiques (ou biomarqueurs) spécifiques des pathologies étudiée. Les puces à anticorps constituent une technologie prometteuse pour répondre à cette demande (pour revue de certains exemples de biomarqueurs découverts par la technologie des puces à anticorps : Sanchez-Carbayo, 2008).

De ce constat est né le projet expérimental présenté dans la partie qui suit.

PARTIE B : ETUDE EXPERIMENTALE

**PREPARATION D'UN SUPPORT POUR LE
GREFFAGE COVALENT D'ANTICORPS**

1. Contexte du projet

1.1. Quelques rappels sur les cancers bronchiques

Les cancers du poumon sont en constante progression, ceci à l'échelle mondiale :

- en France, en 2005, ils constituaient la première cause de mortalité par cancer chez l'homme, avec environ 30 000 nouveaux cas et plus de 26 000 décès [La ligue contre le cancer, 2008] ;
- aux Etats-Unis, en 2006, des études statistiques prévoyaient 162 000 décès provoqués par cette pathologie durant l'année [Borczuk et Powell, 2007].

A l'heure actuelle, le diagnostic est basé dans un premier temps sur la radiographie du thorax qui peut être complétée par la tomodensitométrie ou scanner. Ensuite, l'examen histologique d'un fragment tissulaire recueilli par fibroscopie bronchique, et/ou l'examen cytologique du liquide pleural ou d'aspiration bronchique déterminent avec certitude le diagnostic.

On distingue deux types de cancers du poumon dits "primitifs", c'est-à-dire ne résultant pas de métastases d'un cancer d'un autre organe :

- **les cancers à petites cellules**, traités par chimiothérapie en association avec la radiothérapie,
- **les cancers non à petites cellules**, représentant environ 85% des cancers bronchiques recensés, et dont le traitement repose d'abord sur la chirurgie.

La consommation de tabac étant le facteur de risque principal de cette maladie, la lutte contre le tabagisme est donc la première intention de prévention, d'autant plus qu'il n'existe pas, pour l'instant, de dépistage précoce fiable [La ligue contre le cancer, 2008].

Néanmoins, de nombreuses équipes scientifiques orientent actuellement leurs recherches vers les origines moléculaires de ces cancers, afin de faciliter les diagnostics précoces, d'identifier les facteurs biologiques et histologiques, et ainsi de cibler les nouvelles thérapeutiques [Borczuk et Powell, 2007].

1.2. Situation de la recherche sur les cancers bronchiques dans le Grand Est

Le Cancéropôle du Grand Est (CGE) rassemble des équipes de recherche hospitalo-universitaires, des centres de lutte contre le cancer, ainsi que de nombreuses associations des régions Alsace, Bourgogne, Champagne-Ardenne, Franche-Comté et Lorraine. Le but de ce regroupement est de développer et valoriser des axes de recherche sur les cancers, mais également de constituer des tumorothèques permettant la conservation des fragments de tumeurs et de tissus cancéreux.

Dans le cadre de l'un de ces axes de recherche, l'équipe du Docteur N. Martinet responsable du Centre de Ressources Biologiques (CRB, Hôpital Central, CHU, Nancy) effectue depuis plusieurs années des travaux sur les origines moléculaires des cancers bronchiques. Il a été démontré que des lésions pré néoplasiques pouvaient être mises en évidence à l'échelle moléculaire, grâce à l'étude du génome de ces tissus. Cela pourrait être le point de départ pour développer des moyens de dépistage précoce de ce type de cancer [Martinet *et al.*, 2000].

1.2.1. Les récepteurs aux rétinoïdes

Les rétinoïdes sont des substances analogues à la vitamine A, présents dans certains aliments et également utilisés en tant que principes actifs dans certains médicaments. [Manuila *et al.*, 1999]

Les rétinoïdes jouent également un rôle très important dans le contrôle de l'expression de certains gènes, notamment ceux responsables du développement et du maintien de l'épithélium bronchique sain. En effet, les rétinoïdes ont pour cibles des récepteurs nucléaires issus de deux familles (RAR et RXR) et six sous-familles (RAR- α , RAR- β , RAR- γ , RXR- α , RXR- β et RXR- γ) structurellement proches mais différents quant à leur affinité pour les rétinoïdes. Ces récepteurs se lient à la fois aux rétinoïdes et à l'ADN.

Par ailleurs, les cellules bronchiques cancéreuses ont la particularité de présenter une sous expression des récepteurs aux rétinoïdes à leur surface. Cet état serait à l'origine d'une

diminution du signal rétinoïde dans le noyau des cellules bronchiques et par conséquent favoriserait la transformation maligne de celles-ci [Picard *et al.*, 1999].

1.2.2. Intérêts d'une puce à anticorps anti-récepteurs aux rétinoïdes

Les puces à anticorps analytiques ont pour grand avantage de limiter la quantité de réactif, en l'occurrence les anticorps fixés sur un support, mais aussi l'échantillon à étudier. Il faut également remarquer qu'un tel dispositif permettrait un gain de temps non négligeable lors des étapes de diagnostic. Ce type de puce aurait une place privilégiée en milieu hospitalier, plus précisément dans les services d'anatomo-pathologie qui possèdent le matériel adéquat pour révéler les réactions immunologiques sur support.

Cette puce à anticorps permettrait de procéder à un dépistage précoce des cancers bronchiques, mais aussi d'évaluer l'efficacité des traitements mis en œuvre.

Le Département de Chimie Physique des Réactions (UMR 7630 CNRS-INPL, ENSIC, Nancy) et l'équipe du Docteur N. Martinet (CRB, Nancy) ont mis en commun leurs compétences afin de développer ce dispositif.

Plusieurs étudiants ont contribué à son étude :

- En 2003, Valérie Henrique, étudiante "Pharma Plus" à l'ENSIC, a étudié différents supports puis s'est attachée à synthétiser un fluorophore, plus précisément un ester de succinimidyle, qu'elle a ensuite greffé. [Henrique, 2003]
- En 2004, Vincent Malaterre, étudiant "Pharma Plus" à l'ENSIC, a démontré la possibilité de quantifier les fonctions amines de supports commerciaux grâce à un fluorophore dérivé de coumarine. Il a également envisagé la fonctionnalisation du support par un bras espaceur.
- En 2006, Fanny Evenou, Doctorante, a étudié l'immobilisation de molécules fluorescentes sur lame de verre silanisée fonctionnalisée, ainsi que la localisation de ces greffages, en vue, par la suite, de travailler sur l'application biologique. [Evenou, 2006]

1.3. Objectifs

Les objectifs expérimentaux de ce travail ont été les suivants :

- Etudier les techniques de greffage sur supports, nécessitant des conditions opératoires particulières, par comparaison avec des réactions chimiques en solution.
- Fonctionnaliser le support choisi afin d'optimiser le greffage et d'éviter le phénomène aléatoire d'adsorption des protéines.
- Développer des techniques de spectrofluorimétrie pour réaliser un suivi des réactions chimiques mises en œuvre, et pour caractériser la fonctionnalisation entreprise, grâce à des fluorophores.
- Immobiliser des anticorps de façon localisée et orientée, grâce à des liaisons covalentes (donc stables), afin de détecter plus aisément la réaction anticorps-antigène recherchée. Si l'immobilisation est aléatoire, ceci compromet la capacité des anticorps à reconnaître les antigènes.

Pour ce dernier objectif, certaines manipulations ont été menées au sein du laboratoire du Docteur Martinet, à Brabois (Faculté de Médecine, Université Henri Poincaré).

2. Conception de la puce à anticorps

2.1. Protocole global

Le protocole de fabrication de la puce à anticorps repose sur trois phases principales :

- (1) **La fonctionnalisation du support**, basée sur une publication récente concernant une technique de greffage de saccharides sur des lames de verre. Cette technique repose sur l'élaboration d'un "bras espaceur", à même le support, sur lequel seront greffés les anticorps et dont le rôle est d'orienter ces greffages et de réduire les effets d'encombrement stérique [Lee, Shin, 2005].
- (2) **La fabrication par stéréolithographie de la structuration du support fonctionnalisé** devant permettre la localisation des greffages des anticorps.
- (3) **Le greffage orienté des anticorps**, après oxydation de ceux-ci en vue de créer une liaison covalente stable avec le bras espaceur.

2.2. Méthodologies particulières

Certains aspects de ce travail ont nécessité des méthodes expérimentales particulières.

2.2.1. Réactions chimiques sur support

Les étapes de fonctionnalisation des lames de verre consistent à opérer des réactions chimiques entre les fonctions terminales de la surface du support et des composés préparés au préalable en solution. Pour optimiser le contact entre les fonctions et donc favoriser la formation des liaisons covalentes, toutes les réactions ont été menées dans des petits réacteurs en verre, sous agitation magnétique. Les lames ont été placées verticalement dans ces réacteurs et entièrement immergées dans les diverses solutions de réactifs.

Lors de la construction du bras espaceur, entre chaque étape de synthèse organique, chaque lame a été soigneusement rincée par le solvant employé à l'étape précédente.

2.2.2. Utilisation de rotors moléculaires fluorescents

L'une des compétences du Groupe de Recherches et Applications en Photophysique et Photochimie (GRAPP/DCPR/ENSIC) est la synthèse et la caractérisation photophysique de molécules fluorescentes appelées rotors moléculaires. L'absorption photonique de ces fluorophores entraîne la formation d'état(s) électronique(s) pouvant se relaxer au moins par deux voies :

- des processus radiatifs comme la fluorescence,
- des processus non radiatifs, comme des rotations internes, des isomérisations, etc.

La molécule utilisée principalement dans ce travail est un dérivé de la coumarine : il s'agit de la 7-(N,N-diéthylamino)-3-formylcoumarine notée pour la suite "CouCHO" ("Cou" pour la structure coumarine et "CHO" pour la fonction aldéhyde) (Figure 15).

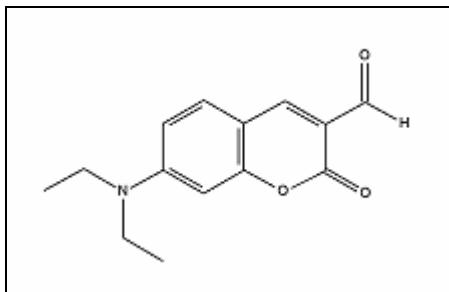


Figure 15 : Formule chimique du fluorophore "CouCHO"

Ce composé a permis de caractériser certaines étapes lors de la construction du bras espaceur. Son usage sera décrit ultérieurement.

Remarque :

Un autre fluorophore a été d'un grand intérêt pour cette étude : le fluorophore FITC (Fluorescein Iso Thio Cyanate) qui est souvent utilisé pour marquer les anticorps destinés à des fins de recherche. Comme nous le verrons plus loin, nous avons employé ce type d'anticorps marqué commercialisé par *Sigma Aldrich*.

2.2.3. Analyse de la fluorescence

L'utilisation de rotors moléculaires fluorescents nécessite l'usage de techniques de détection adéquates, basées sur les propriétés de fluorescence des molécules. Pour cela, plusieurs techniques d'analyse ont été employées.

2.2.3.1. La spectroscopie d'absorption UV visible

Les aspects théoriques de cette technique ainsi que la description de l'appareillage utilisé sont consignés en annexe (Annexe B1).

L'appareil employé est un spectrophotomètre **Lambda EZ210** de **Perkin Elmer**.

Cette technique d'étude de l'absorption des molécules fluorescentes est importante pour envisager par la suite une étude de spectrofluorimétrie : en effet, le spectre d'absorption détermine la longueur d'onde d'excitation optimale.

2.2.3.2. La spectroscopie de fluorescence ou spectrofluorimétrie

Les aspects théoriques de cette technique ainsi que la description de l'appareillage utilisé sont consignés en annexe (Annexe B2).

L'appareil employé est un spectrofluorimètre **Spex FluoroLog-3** de **HORIBA Jobin Yvon**.

La spectrofluorimétrie est devenue une méthode de choix pour l'analyse, elle est rapide et surtout beaucoup plus sensible que la spectrophotométrie. Afin de caractériser les molécules fluorescentes employées dans les expériences, les mesures des spectres d'émission et d'excitation de ces molécules doivent être opérées.

- **Spectre d'émission**

Pour mesurer un spectre d'émission, on fixe la longueur d'onde d'excitation, et on définit la plage d'observation de l'émission de fluorescence. Pour connaître la longueur d'onde d'excitation optimale, c'est-à-dire telle que la réponse en émission soit la plus intense, on commence par réaliser un spectre d'absorption du composé fluorescent en solution. En effet, si les expériences sont réalisées dans le même solvant, les spectres d'absorption et d'excitation sont semblables, à une correction près. Dans la présente étude, la fluorescence des molécules greffées sur des supports a été mesurée. Les résultats sont alors différents de ceux que l'on peut obtenir en solution. Les analyses réalisées avec le spectrophotomètre à partir des composés en solution deviennent dans ce cas purement indicatives.

- **Spectre d'excitation**

Pour le tracé des spectres d'excitation, on fixe la longueur d'onde d'émission et on fait varier la longueur d'onde d'excitation dans une plage bien définie.

Un spectre de type S ("Sample") correspond au signal brut reçu par le détecteur (photomultiplicateur). Un spectre de type R ("Reference") correspond au signal de référence (lumière incidente émise par la lampe). Pour s'affranchir des variations de l'efficacité de certains éléments de l'appareil (monochromateurs et photomultiplicateur) ainsi que des variations d'intensité de la lampe au cours du temps, les spectres sont automatiquement corrigés dès leur acquisition, notamment grâce aux fichiers de correction stockés dans l'ordinateur associé au spectrofluorimètre (Sc et Rc). Par ailleurs, les spectres sont normés par rapport à la lumière excitatrice (Sc/Rc).

Les spectres ont été réalisés avec une résolution spectrale, notée f , égale à 3 nm et le temps d'intégration a été fixé à 0,5 secondes (pour 1 nm). L'intensité est exprimée en coups par seconde (cps).

Pour les mesures de fluorescence sur support, les lames sont disposées en position frontale ("front face"), c'est-à-dire de telle sorte que le faisceau réémis forme un angle de 45 ° avec la lame (Figure 16).

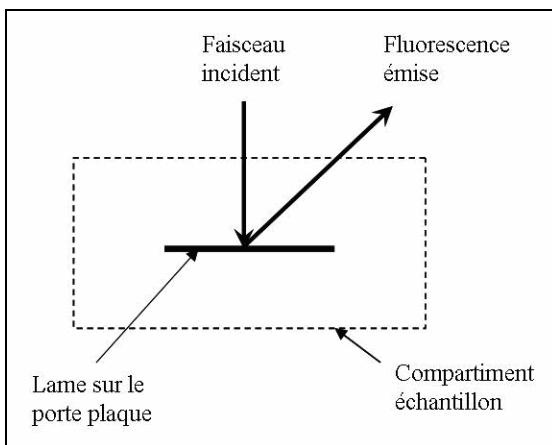


Figure 16 : Schéma de positionnement d'une lame dans le compartiment échantillon du spectrofluorimètre Spex FluoroLog-3 (vue du dessus)

2.2.3.3. Cas particulier des anticorps marqués

Afin de tester l'efficacité de la fonctionnalisation du support, des anticorps commerciaux marqués à la FITC, ont été employés. Par conséquent, l'analyse de la fluorescence de cette molécule a été possible avec les techniques citées ci-dessus.

Néanmoins, certaines expériences de greffage d'anticorps sur lames n'ont pas pu être analysées à l'aide du spectrofluorimètre *Spex FluoroLog-3* : en effet, avec cet appareil, en sortie du monochromateur d'excitation, le faisceau lumineux qui vient exciter l'échantillon est de forme rectangulaire et mesure environ 10 mm de haut. Ceci a posé problème puisque le diamètre des dépôts d'anticorps pouvait être supérieur ou inférieur à 10 mm.

Pour pallier ce problème, deux techniques ont été employées en alternative :

- **Microscopie de fluorescence**

Les aspects théoriques de cette technique ainsi que la description de l'appareillage utilisé sont consignés en annexe (Annexe B3).

L'appareil employé est un microscope en épifluorescence de type **ZEISS Axiotech**.

Pour analyser le dépôt d'anticorps, on «se déplace» sur le dépôt pour relever plusieurs valeurs d'intensité de fluorescence, qui servent ensuite à calculer une valeur moyenne.

- **Lecteur de micro plaques**

L'appareil employé est un lecteur **VICTOR³ V™ Multilabel Counter** de **Perkin Elmer**.

Ce type d'appareil est conçu pour analyser les plaques de micro titration en biologie, notamment pour révéler les réactions de type ELISA. Les "puits" fabriqués sur la lame par stéréolithographie ont été volontairement calqués sur ceux de ces plaques (diamètre, espacement) de manière à pouvoir être analysés par ce lecteur. En effet, en superposant la lame sur la plaque de micro titration en plastique, en faisant coïncider les "puits" fabriqués sur la lame par stéréolithographie et les puits de la plaque, on peut analyser la fluorescence du fluorophore FITC des anticorps greffés sur la lame de verre.

L'analyse de la fluorescence de la FITC est effectuée en sélectionnant les longueurs d'onde de 485 nm pour l'excitation et 530 nm pour l'émission. Ces longueurs d'onde présélectionnées sur l'appareil ne peuvent pas être modifiées par l'utilisateur.

L'un des inconvénients de cet appareil est le format des données chiffrées : en effet, le logiciel d'exploitation fournit des valeurs sans unité. Ceci pose problème pour interpréter les résultats et par conséquent met en doute la validité des mesures.

Afin de valider l'emploi de ce lecteur, deux droites d'étalonnage d'une gamme de dilution d'une solution de FITC de concentration connue ont été construites :

- la première en mesurant l'absorbance par spectrophotométrie UV visible,
- la seconde en employant le lecteur de micro plaque.

Les deux droites ont ensuite été reportées sur un même graphique où l'on peut observer une très bonne concordance (Figure 17).

On peut alors en déduire que les valeurs du lecteur de micro plaque sont cohérentes et exploitables, bien qu'elles n'aient aucune unité.

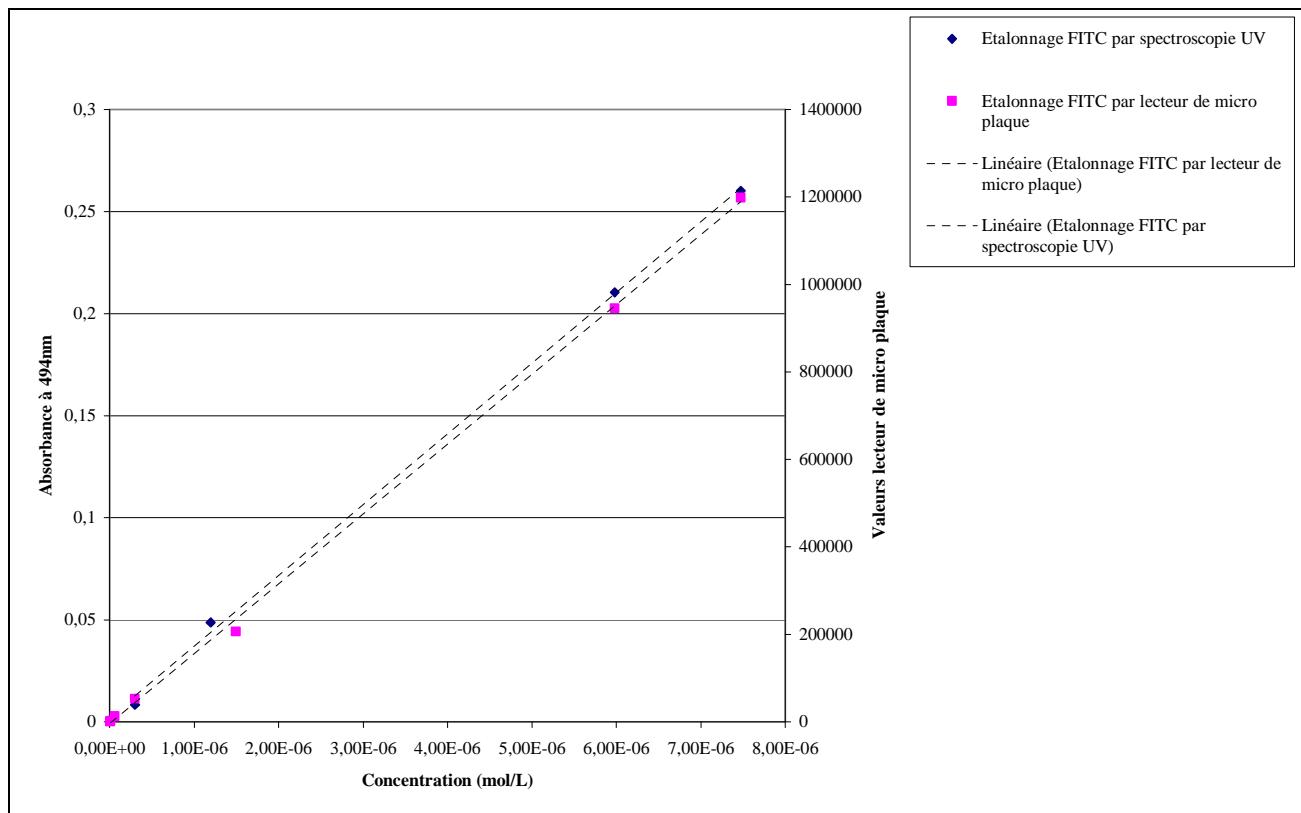


Figure 17 : Etalonnage d'une solution de FITC par spectroscopie UV et lecteur de micro plaque

2.3. Mise en œuvre expérimentale et résultats

2.3.1. Caractérisation du support

Le support étudié a été choisi dès le début des travaux de recherche sur ce sujet : il s'agit de lames de verre commerciales, silanisées sur les deux faces, commercialisées sous la dénomination *Silane-Prep Slides* (Fabricant : *Sigma Diagnostics*, référence : S4651).

2.3.1.1. Description

Les dimensions de chaque lame sont les suivantes :

- Longueur : 75 mm
- Largeur : 25 mm
- Epaisseur : 2 mm

Le fabricant dédie ce type de lames à l'usage en laboratoire d'analyses médicales, c'est pourquoi une partie du verre est dépolie (donc inactive chimiquement) pour permettre une identification de la lame ou du patient. Cette zone est appelée "frosted end" (Figure 18).

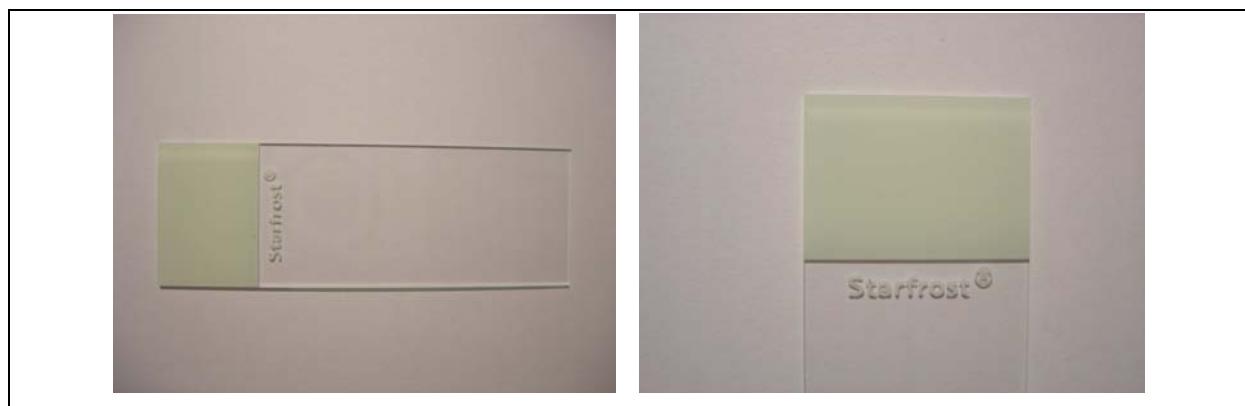


Figure 18 : Photographies d'une lame neuve commercialisée par Sigma Diagnostics

2.3.1.2. Intérêts

Ces lames présentent une grande densité surfacique de groupements amines, intéressants pour les étapes de greffage de composés organiques lors de la conception de la puce.

Outre l'intérêt chimique de ces lames, leurs dimensions sont également d'une grande importance en ce qui concerne leur manipulation. En effet, les lames étudiées dans le cas présent ont des dimensions tout à fait comparables à celles utilisées en temps normal pour des études anatomopathologiques ou biochimiques d'échantillons biologiques, grâce à des appareils de mesure adaptés. On peut alors penser que ces mêmes appareils pourraient servir à révéler les réactions de diagnostic mises en œuvre sur la puce à anticorps étudiée.

2.3.1.3. Propriétés surfaciques

Tout au long de l'étude, nous emploierons les termes "lames neuves" ou "lames silanisées" ou encore "lames silanisées NH₂" pour désigner les lames commerciales qui possèdent à leur surface des groupements amines, plus précisément des chaînes amino-alkylsiloxanes dans notre cas. L'introduction de ces groupements nécessite deux étapes : l'hydroxylation de la silice constitutive du verre pour former des groupements silanols, puis la silanisation de ces groupements, c'est-à-dire la formation de liaisons covalentes siloxanes en faisant réagir des chaînes alkylsiloxanes terminées par une fonction amino (Figure 19).

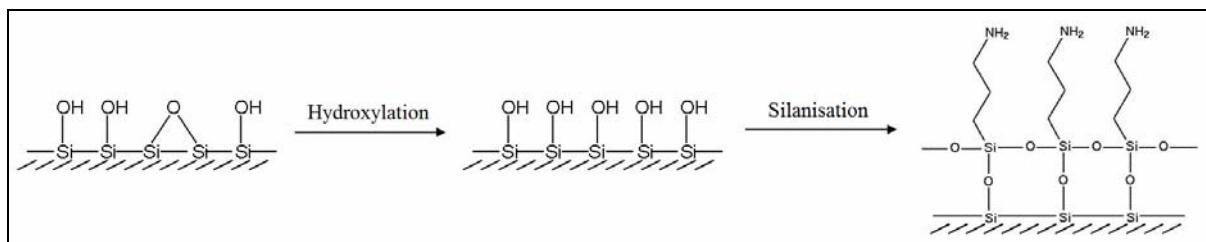


Figure 19 : Schéma de formation de chaînes amino-alkylsiloxanes

Le fabricant ne mentionne pas la densité de recouvrement en groupements amines de ces lames. Or cette donnée est très importante pour toute réalisation de greffages.

De précédents travaux réalisés au DCPR ont permis d'évaluer cette densité à **4,6.10⁻¹⁰ moles de fonctions amines par cm²** [Evenou, 2006], ce qui correspond à des recouvrements surfaciques décrits dans la littérature.

D'autres particularités de ces lames ont également été mises en évidence au cours de ces travaux :

- le caractère hydrophobe de leur surface, révélé par la mesure de l'angle à l'interface liquide/solide formé par une goutte d'eau déposée à la surface (test de la goutte sessile);
- leurs caractéristiques spectrales qui soulignent la fluorescence intrinsèque du verre qu'il faut prendre en compte lors des analyses des greffages par le spectrofluorimètre (Figure 20).

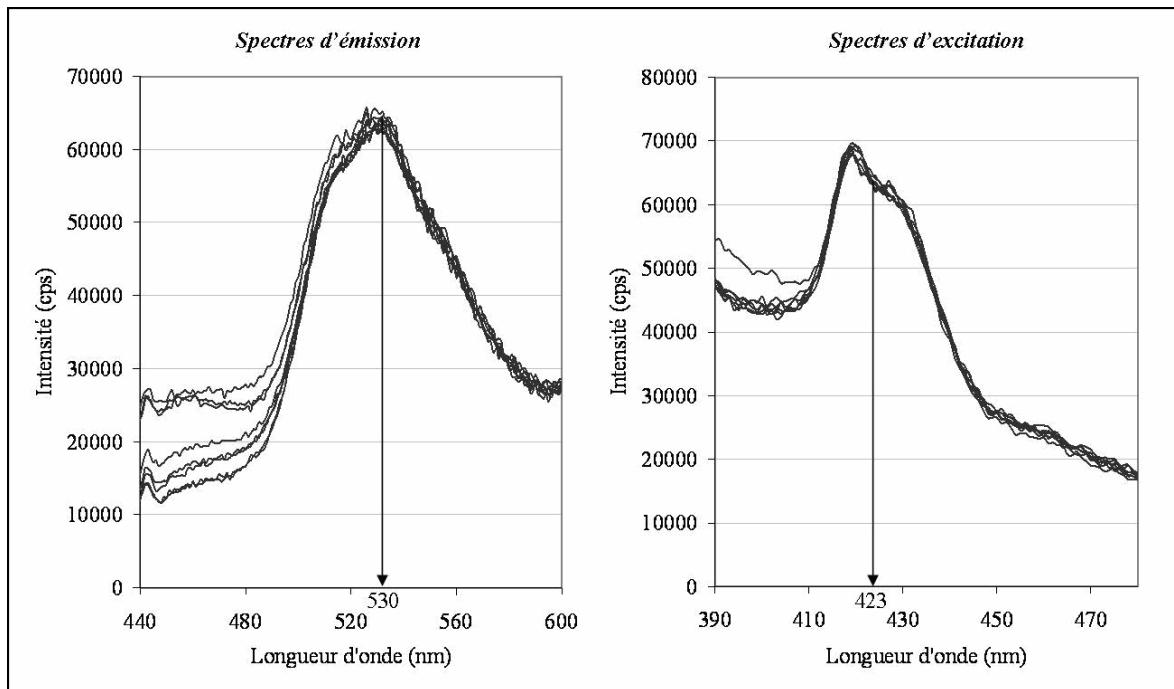


Figure 20 : Caractéristiques spectroscopiques d'une lame

Spectres d'émission pour $\lambda_{\text{exc}} = 423 \text{ nm}$ et spectres d'excitation pour $\lambda_{\text{ém}} = 530 \text{ nm}$, mode Sc/Rc, résolution spectrale de 3 nm.

2.3.2. Fonctionnalisation du support pour une orientation des greffages

L'objectif de notre étude est la préparation d'un support permettant d'immobiliser, de façon covalente et orientée, des anticorps dirigés contre un antigène particulier, ceci dans des conditions non agressives pour ces protéines.

Afin d'optimiser la liaison d'un anticorps avec son antigène spécifique, il faut que ses sites de liaison, à savoir les fragments Fab, soient libres et facilement accessibles pour l'antigène. Ainsi, la meilleure orientation est obtenue en fixant l'anticorps par son fragment Fc. La connaissance de la structure chimique du fragment Fc des immunoglobulines révèle la présence de nombreux carbohydrates (Voir paragraphe A.1.2.1.3) qui, une fois oxydés, présentent des fonctions aldéhydes réactives.

Par ailleurs, afin de limiter la liaison non spécifique de l'anticorps sur le support, il faut éloigner l'anticorps de celui-ci, grâce à l'élaboration d'un "bras espaceur" qui permet une diminution de l'encombrement stérique.

Une structure de bras espaceur a été recherchée pour répondre à deux objectifs : une longueur suffisante pour diminuer l'encombrement tridimensionnel et une fonction terminale pouvant réagir dans des conditions douces avec les fonctions aldéhydes de l'anticorps oxydé.

A partir de cette réflexion, un protocole de fonctionnalisation des lames silanisées NH₂ a été élaboré, pour permettre, par la suite, de lier les anticorps par une liaison covalente forte.

Ce protocole, basé en partie sur un protocole décrit par Lee et Shin en 2005, se déroule en sept étapes.

2.3.2.1. 1^{ère} étape : Action de l'anhydride succinique sur les lames silanisées - NH₂

Cette première étape consiste à faire réagir, sur une lame neuve, l'anhydride succinique en solution à 3% dans un volume final de DMF suffisant pour immerger la lame.

On immerge la lame pendant trois heures, sous agitation, à température ambiante (Figure 21).

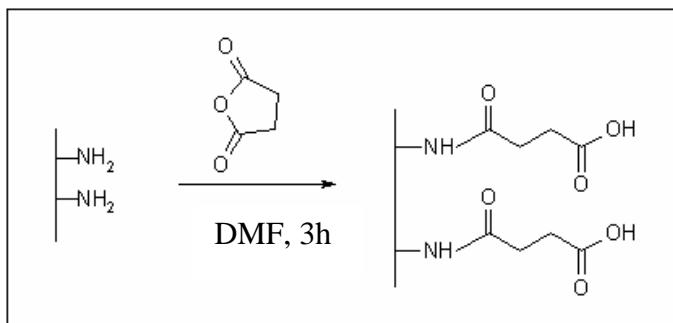


Figure 21 : Réaction de l'anhydride succinique sur les terminaisons -NH₂ d'une lame Sigma

2.3.2.2. 2^{ème} étape : Activation de la fonction acide

La fonction carboxylique obtenue est activée par le N-hydroxysuccinimide (NHS) en solution à 3% dans un volume final de DMF suffisant pour immerger la lame, en présence d'EDAC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride) à 3%.

On immerge la plaque pendant trois heures, sous agitation, à température ambiante.

Cette étape permet de transformer la fonction acide en ester de succinimidyle -COONHS.

2.3.2.3. 3^{ème} étape : Greffage du bras espaceur

La 3^{ème} étape consiste à greffer une partie du bras espaceur : on prépare une solution de 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (diamine) à 3% dans du DMF et on y immerge la lame pendant trois heures, sous agitation, à température ambiante.

Les étapes 2 et 3 sont résumées sur la figure suivante.

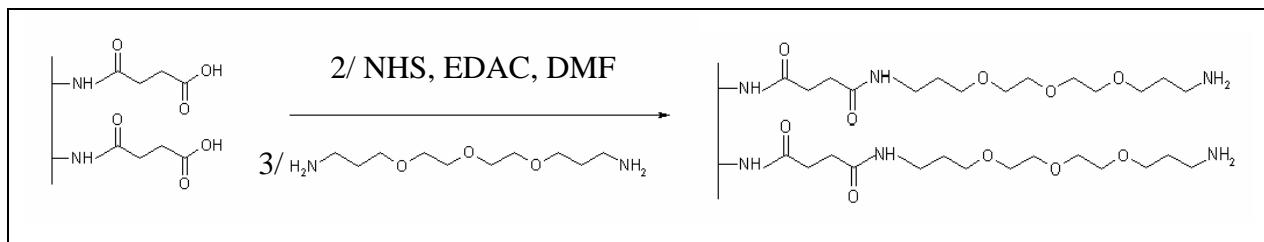


Figure 22 : Réaction de greffage du bras espaceur diaminé sur les terminaisons –COONHS d'une lame

Dans l'étape 3, l'addition d'un bras supplémentaire permettra d'éloigner l'anticorps du support.

Les étapes suivantes consistent à introduire une fonction terminale appropriée au greffage d'un anticorps. Nous avons choisi la fonction hydrazide souvent retenue pour fixer des anticorps par liaison covalente [Arenkov *et al.*, 2000]. Ainsi, la fonction hydrazide pourra réagir avec la fonction aldéhyde engendrée par oxydation des anticorps pour former une liaison hydrazone stable, dans des conditions douces pour la biomolécule.

Cette fonction a été introduite par réaction du *tert*-butyl carbazate sur l'extrémité amino du bras espaceur.

2.3.2.4. 4^{ème} et 5^{ème} étapes : Formation d'une terminaison –COONHS sur le bras diamino

Afin de greffer le *tert*-butyl carbazate, nous avons au préalable introduit une fonction –COONHS, en reproduisant dans les **étapes 4 et 5** les conditions opératoires des **étapes 1 et 2**.

2.3.2.5. 6^{ème} étape : Réaction du *tert*-butyl carbazate

Le *tert*-butyl carbazate dissout dans un faible volume de DMF est ajouté à une solution tampon de bicarbonate de sodium pH 8,5. La lame activée –COONHS est plongée dans cette solution pendant 24 h, sous agitation, à température ambiante.

2.3.2.6. 7^{ème} étape : Déprotection de la fonction hydrazide

Le groupement *tert*-butyl carbazate possède une fonction BOC (*tert*-ButOxyCarbonyle) qui protège la fonction hydrazide. La réaction de déblocage a été réalisée en immergeant la lame dans l'acétate de *tert*-butyle (AcOtBu) en présence d'une quantité stoechiométrique d'acide sulfurique concentré, pendant 20 h, à température ambiante et sous agitation magnétique. La lame est ensuite rincée avec de l'acétate d'éthyle, puis neutralisée 1 h en milieu basique (TEA/CH₂Cl₂) [Lin *et al.*, 2000].

Les étapes 4 à 7 sont résumées sur la figure 23:

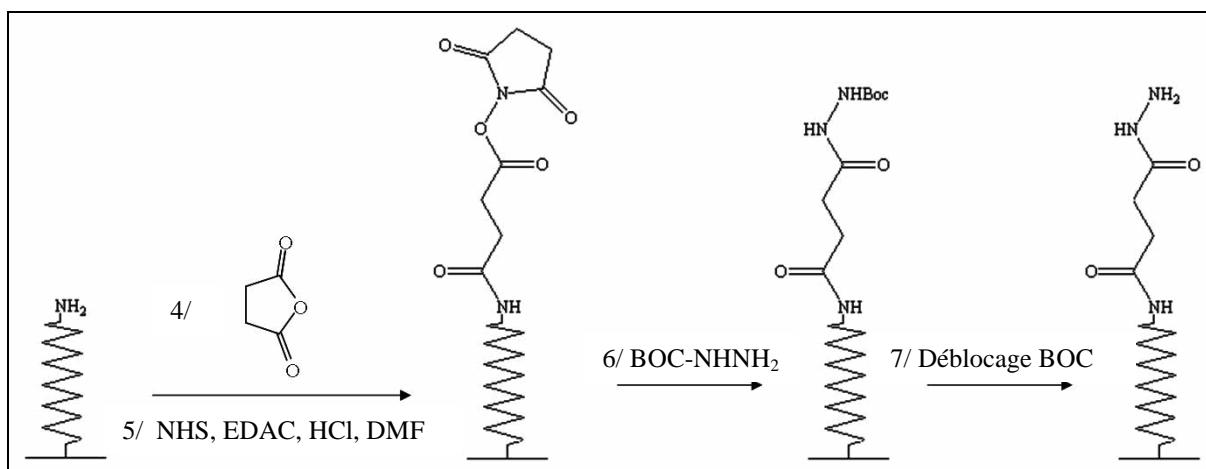


Figure 23 : Différentes étapes conduisant à la fonction hydrazide portée par l'extrémité du bras espaceur

2.3.3. Vérification de la modification de l'état de surface par le greffage d'un fluorophore

2.3.3.1. Greffage de CouCHO

Afin de vérifier le bon déroulement des différentes étapes permettant le greffage d'un bras espaceur terminé par une fonction spécifique, nous avons utilisé le fluorophore

"CouCHO". Ceci a nécessité l'étude de plusieurs lames, puisqu'une même lame ne peut plus être réutilisée après greffage covalent du fluorophore sur la surface fonctionnalisée.

Le dérivé coumarine a été utilisé pour caractériser les étapes de greffage en raison de son seuil de sensibilité élevé.

Le dérivé CouCHO a été greffé pour caractériser deux étapes :

- le greffage du bras espaceur diamino,
- l'introduction de la fonction hydrazide formée à la fin de cette étape de fonctionnalisation.

La fixation de CouCHO a été réalisée à 50 °C, sous agitation et à l'abri de la lumière (Figure 24).

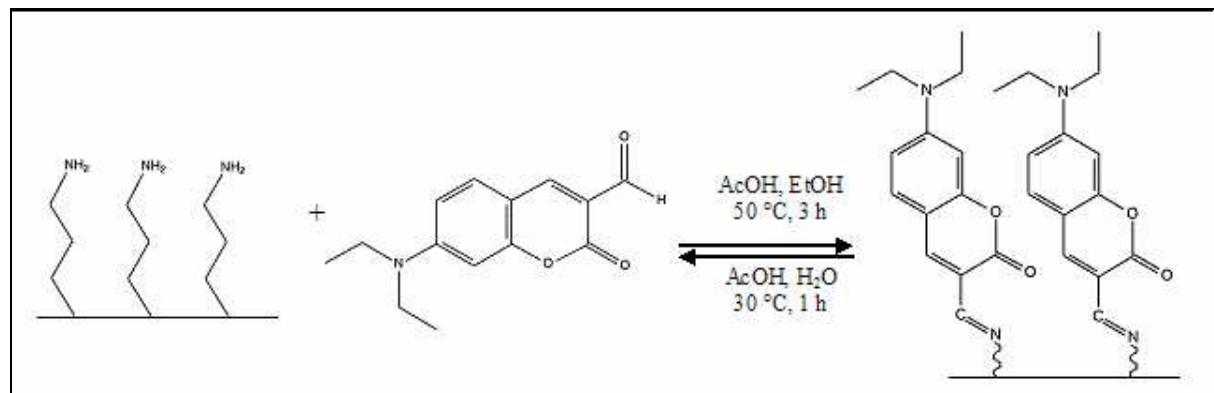


Figure 24 : Greffage de CouCHO sur une terminaison -NH2

Ce fluorophore, qui a également servi à caractériser les lames neuves (silanisées NH₂), a permis de comparer les trois principaux stades de fonctionnalisation :

- lame neuve,
- lame + bras diamine,
- lame + bras complet (noté "carbazate" car le groupement *tert*-butyl carbazate est ajouté).

Afin de réaliser les spectres d'émission et d'excitation des lames greffées avec ce fluorophore, nous avons recherché les maxima d'émission et d'excitation pour ce type de lame.

Les résultats suivants ont été obtenus :

- un maximum d'excitation à **423 nm** avec mesure des spectres d'émission entre 440 et 600 nm,
- un maximum d'émission à **470 nm** avec mesure des spectres d'excitation entre 360 et 465 nm.

2.3.3.2. Résultats

2.3.3.2.1. Caractérisation de la lame neuve

Dans un premier temps, la lame neuve présente une fluorescence intrinsèque : ceci a été montré précédemment (Voir paragraphe B.2.3.1.3) grâce aux spectres de lame seule, sachant que la longueur d'onde pour le maximum d'excitation est de 423nm et celle pour le maximum d'émission de 530nm.

Ces spectres ont ensuite été comparés à ceux d'une lame sur laquelle a été greffé le fluorophore CouCHO (Figures 25 et 26).

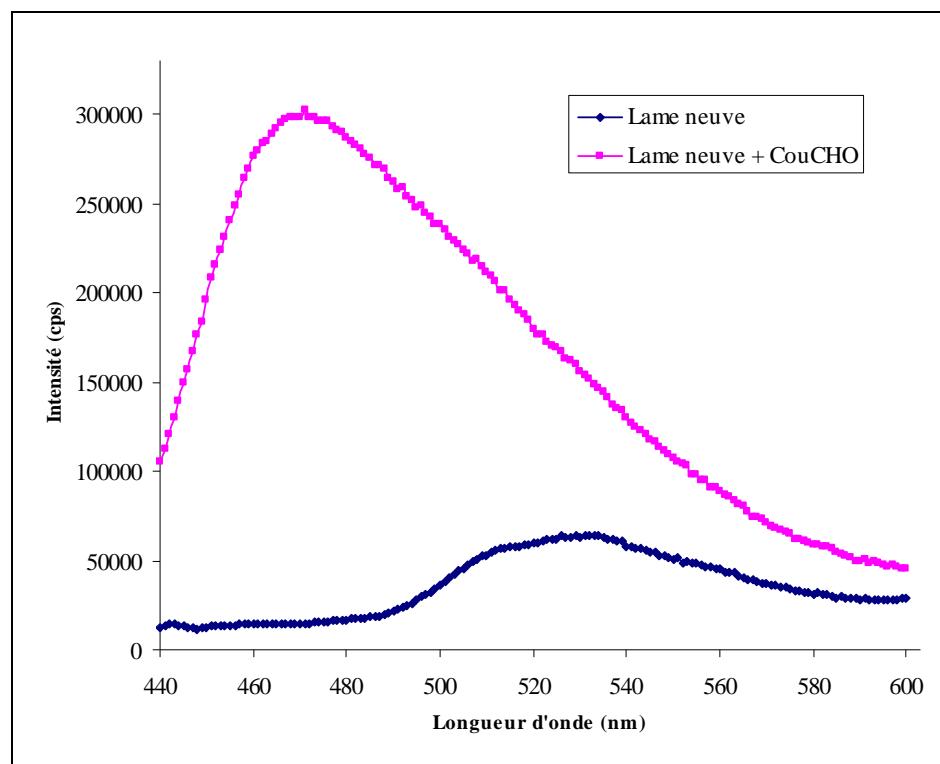


Figure 25 : Comparaison entre une lame neuve et une lame greffée par CouCHO (émission)
Spectres d'émission pour $\lambda_{\text{exc}} = 423 \text{ nm}$, mode Sc/Rc, résolution spectrale de 3 nm.

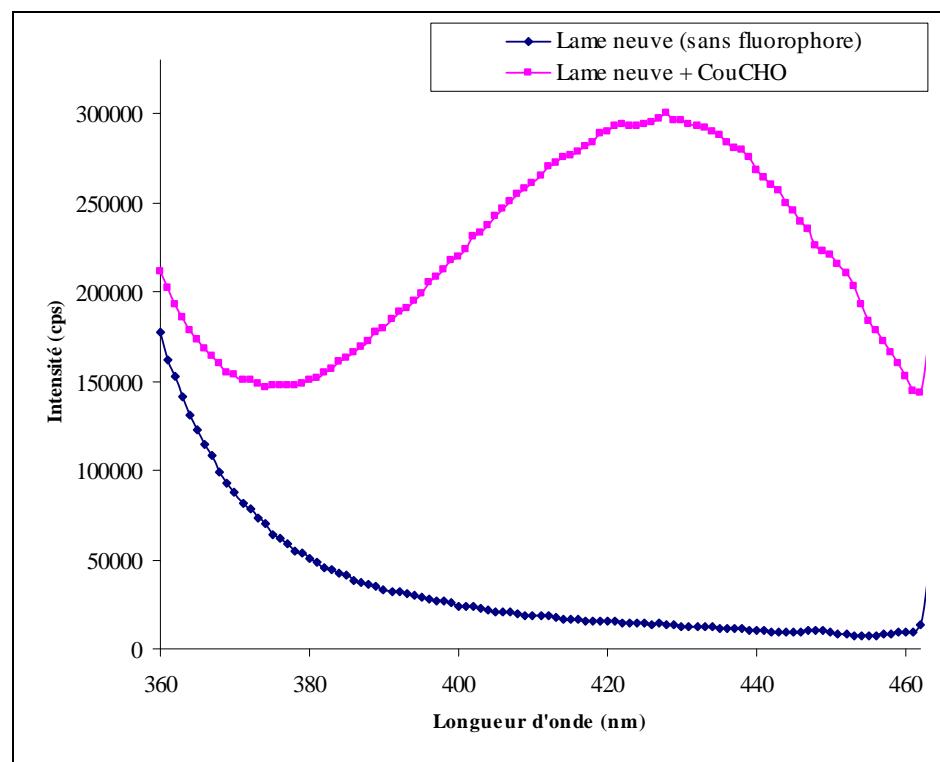


Figure 26 : Comparaison entre une lame neuve et une lame greffée par CouCHO (excitation)
Spectres d'excitation pour $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$, mode Sc/Rc, résolution spectrale de 3 nm.

La lame neuve présente une fluorescence intrinsèque, mais on remarque de façon nette que ce signal est faible comparé à celui d'une lame additionnée du fluorophore. La fluorescence propre de la lame est donc négligeable par rapport à celle du fluorophore employé.

On peut aussi remarquer que l'amplitude d'intensité est identique pour les deux spectres : environ 300 000 coups par seconde. Il a alors été choisi, pour la suite de ce travail, de ne montrer que les spectres d'émission, puisque les spectres d'excitation donnent des informations similaires.

2.3.3.2.2. Caractérisation de la lame additionnée du bras diamino

De la même façon que précédemment, on cherche à s'assurer que le bras «diamine» ne possède pas de fluorescence intrinsèque significative. On réalise alors le spectre d'émission juste après le greffage du groupement diamine, aux mêmes longueurs d'onde que pour la lame seule. On les compare au spectre de lame seule obtenu précédemment (Figure 27).

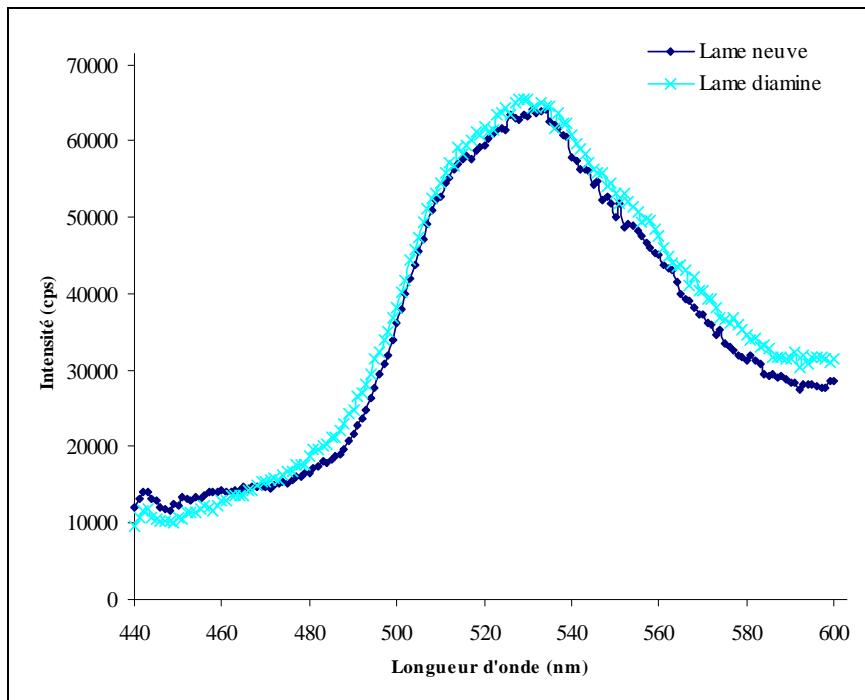


Figure 27 : Comparaison entre une lame neuve et une lame additionnée du groupe diamino, sans fluorophore

Spectres d'émission pour $\lambda_{\text{exc}} = 423 \text{ nm}$, mode Sc/Rc, résolution spectrale de 3 nm.

On remarque ici, comme pour la lame seule, que l'addition du groupement diamine ne fait pas apparaître de signal significatif.

On peut alors comparer ce spectre à ceux de la lame neuve et de la lame diamine additionnées du fluorophore CouCHO (Figure 28).

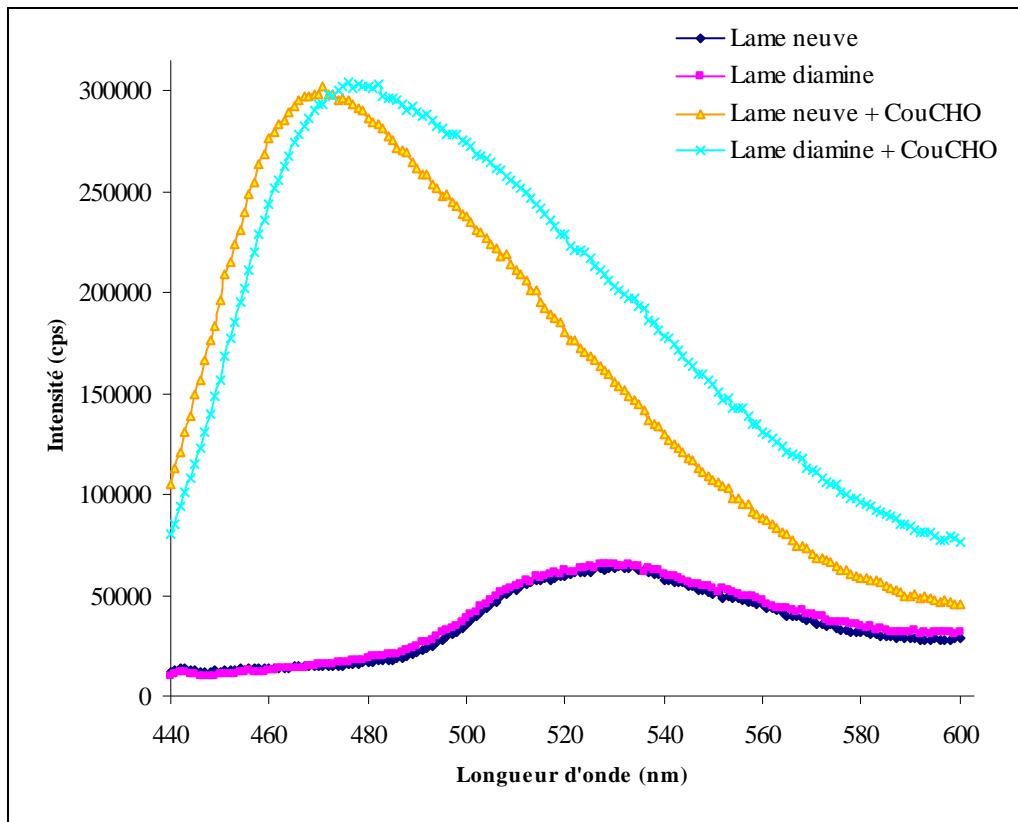


Figure 28 : Comparaison entre une lame neuve et une lame additionnée du groupe diamino, avec et sans fluorophore

Spectres d'émission pour $\lambda_{\text{exc}} = 423 \text{ nm}$, mode Sc/Rc, résolution spectrale de 3 nm.

L'addition du fluorophore sur le bras diamine donne un signal de même intensité que celui de la lame neuve greffée avec CouCHO.

On ne peut pas conclure sur la réussite du greffage du bras diamine car le signal obtenu peut être celui d'une lame neuve. En effet, dans le cas d'une lame neuve et d'une lame avec un bras diamine, la terminaison sur laquelle se greffe le fluorophore est un groupement amine : si

le bras diamine n'a pas été greffé, le fluorophore s'attache donc sur la lame neuve et donne le signal précédemment décrit.

Néanmoins, même si le signal est de même intensité, il est différent de celui de la lame neuve greffée avec CouCHO (léger décalage vers la droite) donc ceci peut être une preuve d'efficacité.

2.3.3.2.3. Caractérisation de la fonction hydrazide

Afin de mettre en évidence la présence du bras espaceur finalisé, le fluorophore CouCHO a été greffé par création d'une liaison hydrazone avec la fonction hydrazide, de la même façon que l'anticorps oxydé (Figure 29).

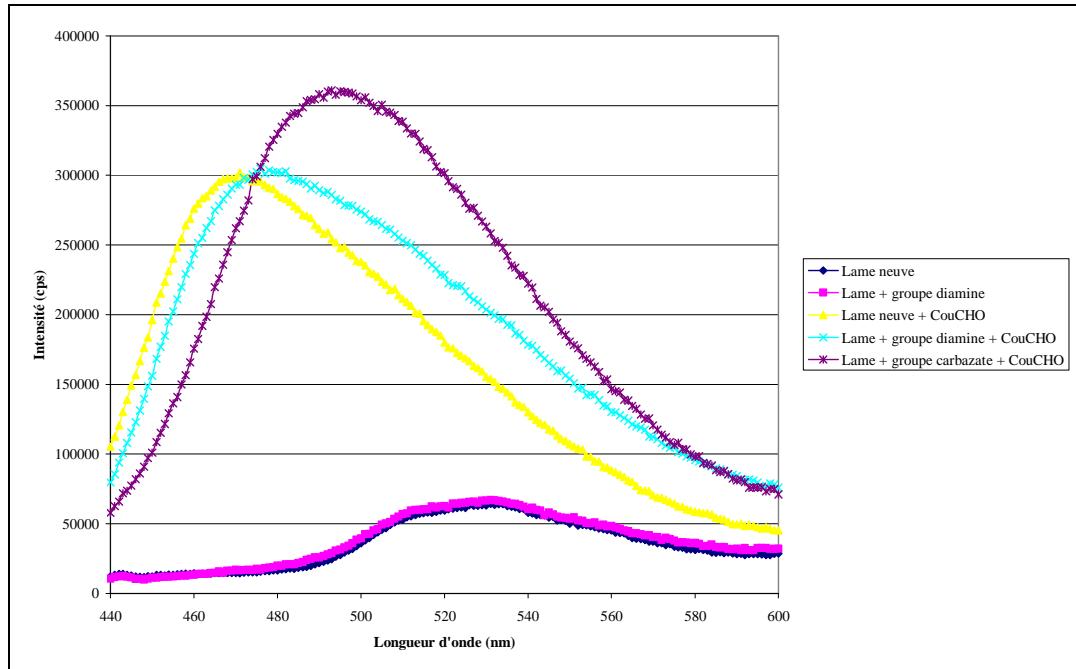


Figure 29 : Greffage de CouCHO sur la fonction hydrazide et comparaison avec une lame neuve et une lame diamine

Spectres d'émission pour $\lambda_{\text{exc}} = 423 \text{ nm}$, mode Sc/Rc, résolution spectrale de 3 nm.

L'addition du fluorophore sur le bras espaceur final montre un spectre bien différent de celui d'une lame sans bras, ou d'une lame porteur du bras diaminé : l'intensité du spectre ainsi que le décalage par rapport aux deux autres types de lames le prouvent. Par ailleurs, on peut invoquer la nature de la liaison qui est plus stable dans le cas du composé hydrazone comparée au dérivé imine issu des fonctions aminées, au vu de l'intensité plus élevée du signal. Ces différentes études ont montré qu'il était possible de greffer par liaison covalente stable un composé aldéhydique sur un support porteur de groupements hydrazide. Le greffage des anticorps faisant intervenir ce type de liaison nous paraissait donc réalisable à ce stade de l'étude.

Mais avant d'envisager ces manipulations, nous avons poursuivi la modification du support pour permettre des greffages d'anticorps **localisés et séparés**, ceci grâce à une technologie particulière maîtrisée par S. Corbel (DCPR), décrite dans le chapitre suivant.

2.3.4. Utilisation de la stéréolithographie pour la localisation des greffages

L'une des caractéristiques qui permet de valoriser le dispositif de diagnostic étudié, est la possibilité de déposer de très faibles quantités de réactifs et d'analytes.

En effet, nous avons choisi de fabriquer une puce constituée de plusieurs "puits" ou "miniréacteurs" de tailles bien contrôlées, délimitant donc un volume précis. Ainsi, sur une même lame fonctionnalisée (par ajout du bras espaceur) puis modifiée (grâce à la construction des puits) différentes protéines pourraient être déposées de façon bien localisée, sans risque d'étalement sur la surface, ni d'interférence entre elles.

La technologie employée pour atteindre cet objectif est la **stéréolithographie**, technique de prototypage rapide, qui permet de fabriquer très rapidement des objets solides à partir d'un modèle numérique créé par une conception assistée par ordinateur (C.A.O.)

Les explications qui suivent sont en partie inspirées du travail de Thèse de Fanny Evenou (2006) avec qui les expériences ont été initiées.

2.3.4.1. Qu'est-ce que la stéréolithographie ?

Le terme stéréolithographie comprend les mots "lithographie", qui provient de "litho" (pierre) et "graphie" (dessin), l'ensemble désignant l'art de reproduire par impression les dessins (2D) tracés avec une encre ou un crayon gras sur une pierre calcaire. La stéréolithographie est donc, par analogie, une technique de reconstitution en trois dimensions (3D) d'un objet par addition de couches de photopolymères.

Apparue dans les années 80 aux Etats-Unis et en France au DCPR la stéréolithographie a pour principe la polymérisation d'une résine photosensible, grâce à un dispositif d'irradiation laser, suivant un motif.

Dans la présente étude, la polymérisation de la résine se fait sur l'une des faces de la lame étudiée, après que celle-ci soit fonctionnalisée.

Le principal avantage de cette technique est la possibilité de dupliquer un même motif rapidement et avec une reproductibilité parfaite. D'autre part, l'utilisation d'une source laser, dont le diamètre de faisceau mesure quelques centaines de microns, confère une extrême précision aux tracés.

2.3.4.2. Appareillage

Le procédé de stéréolithographie fait intervenir plusieurs sous-éléments :

- Un système informatique permettant de piloter les différentes interfaces nécessaires au balayage du faisceau laser dans le plan (x,y), et la déposition suivant l'axe z ;
- Un laser, émettant dans le domaine proche UV : nous avons utilisé le modèle "**Navigator X15SC UV (355nm)**" de *Spectra-Physics*. Le faisceau est guidé grâce à un système de miroirs galvanométriques commandés par l'interface.

- Un ensemble optique d'obturation du faisceau laser pour masquer le faisceau : en effet, le motif que l'on souhaite reproduire à la surface de la lame délimite des zones dans lesquelles la résine n'est pas polymérisée.

2.3.4.3. Description du procédé

- Conception du modèle

Dans un premier temps, le modèle d'objet à fabriquer est créé grâce à un logiciel de CAO (Conception Assistée par Ordinateur) ou par acquisition numérique d'un objet existant que l'on souhaite reproduire.

Le modèle une fois dessiné est exporté dans un format standard, le format STL (pour STereoLithography), dans le programme de pilotage de la machine de fabrication (SL).

Le modèle (en 3D) est découpé en tranches (2D) d'épaisseur fixe choisie par l'opérateur. Ce paramètre détermine donc la précision de l'objet à reconstituer.

Dans le cas de la fabrication de la puce à anticorps, il a été choisi de reproduire, sur chaque lame fonctionnalisée, un ensemble de dix trous, de 6mm de diamètre pour chacun, espacés de 2 mm, selon une disposition particulière. Ces dimensions et cette disposition ont été calquées sur celles des plaques de micro titration utilisées dans le lecteur décrit précédemment (Figure 30).

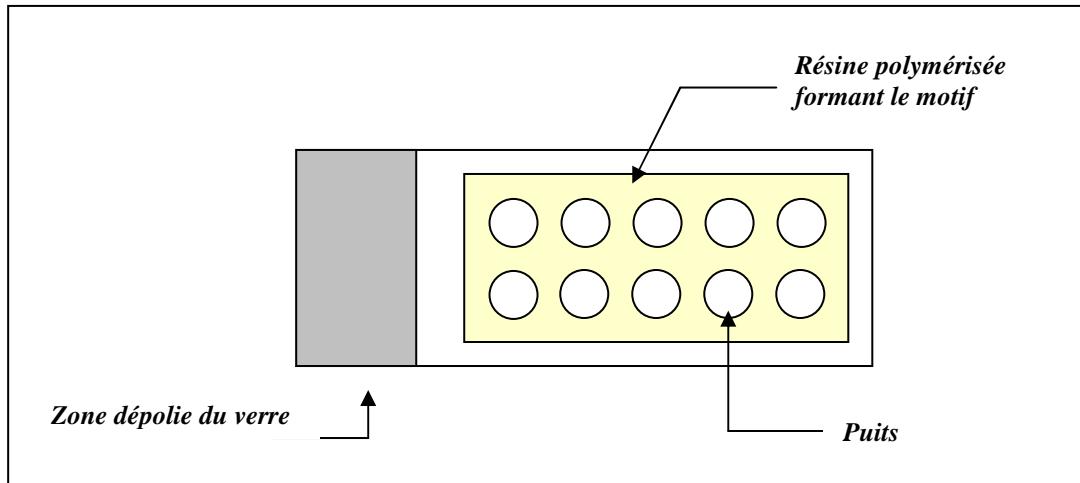


Figure 30 : Schéma du motif en résine fabriqué sur la lame fonctionnalisée

- Dépôt de la résine

Le choix de la résine est primordial car elle conditionne l'étape de la photopolymérisation. Elle doit donc être adaptée au matériau sur lequel elle est déposée, et permettre la réalisation du ou des motifs désirés.

Dans le cas de la fabrication d'un motif créé sur support plan, la résine choisie doit répondre à plusieurs critères :

- Facilité et homogénéité de l'étalement,
- Bonne adhésion au support,
- Imperméabilité aux solvants organiques et aqueux,
- Stabilité et innocuité chimique.

Une résine performante pour la technologie UV et la fabrication de microsystèmes a été choisie. Elle présente de bonnes propriétés d'adhésion sur le verre qui est le support utilisé. Il s'agit d'une formulation particulière d'une résine hydrophobe appelée **SU-8 5**, fournie par **MicroChem Corp.** (réf. Y131252). Cette résine est de type «époxy» (avec des cycles époxydes), et présente une grande stabilité chimique et thermique.

Si on s'intéresse à la composition de cette résine, on distingue :

- un monomère caractérisé par huit cycles époxydes (SU-8) : le diglycidyl éther de bisphénol A novolaque,
- un amorceur cationique : il s'agit d'un mélange de sels d'hexafluoroantimonate SbF_6^- et de triarylsulfonium,
- les solvants du monomère et de l'amorceur.

- Irradiation

Cette étape a pour but la polymérisation de la résine, c'est-à-dire sa réticulation. La photolyse de l'amorceur cationique (hexafluoroantimonate/triarylsulfonium) va générer un acide fort qui va jouer le rôle de catalyseur dans la polymérisation. L'ouverture des cycles époxydes va alors permettre la polymérisation dite cationique de la résine.

- Finalisation de l'objet

Pour que le motif prenne forme, il faut finaliser le procédé en immergeant la lame dans un solvant révélateur qui va dissoudre la résine liquide non polymérisée (dans le cas présent, il s'agit de la résine à l'intérieur de chaque puits). Ce solvant est l'acétate de l'éther monométhylique du propylène glycol (PGMEA) ou "SU-8 developper", fourni par **MicroChem Corp.** (référence Y020100).

2.3.4.4. Protocole appliqué

La fabrication du motif en polymère nécessite plusieurs étapes depuis la préparation de la résine à la photopolymérisation jusqu'aux traitements de post-polymérisation.

- Pré-polymérisation

On dépose la résine (environ 2 mL) au centre de chaque lame. L'étalement est ensuite assuré par un appareil appelé "tournette" ou "spin coater" (**Karl Süss, RC Spin Coater**, référence CT62 V08) dont le plateau tournant engendre une force centrifuge formant un film d'épaisseur contrôlé de la résine.

Après l'étape d'étalement de la résine, on effectue un précuit sur une plaque chauffante horizontale qui permet l'évaporation uniforme du solvant et va entraîner la réticulation des brins des chaînes de polymère : 5 min de précuit à 95 °C suffisent pour assurer une bonne polymérisation de la résine.

- Photopolymérisation

La lame ainsi préparée est ensuite positionnée sur le support du dispositif d'irradiation. Afin d'obtenir la stabilité du faisceau laser, celui-ci est allumé au préalable (30 min avant la première expérimentation), en sélectionnant une puissance d'environ 3,50 Watt.

L'interface de pilotage du faisceau laser permet l'irradiation de la surface de l'échantillon par un balayage vectoriel, suivant le modèle conçu par CAO et avec un remplissage des zones pleines par des lignes à la vitesse de 0,46 m/s.

- Post-polymérisation

Quatre étapes constituent le protocole de post-polymérisation :

- Premier recuit de durcissement sur plaque chauffante à 95 °C durant 2 min : ceci permet la réticulation du polymère obtenu et diminue la viscosité de la résine liquide (au centre des trous formés) pour faciliter son élimination.
- Révélation dans le PGMEA : la résine liquide non réticulée est alors dissoute, ceci donnant forme aux trous.

- Irradiation : on place la lame débarrassée de la résine liquide et sèche, sous lampe UV pendant 15 min.
- Deuxième recuit de durcissement sur plaque chauffante à 95 °C durant 30 min : ainsi la réticulation complète du polymère s'opère, ceci favorisant son adhésion sur la lame.

La lame est alors prête pour les étapes de greffage (Figure 31).

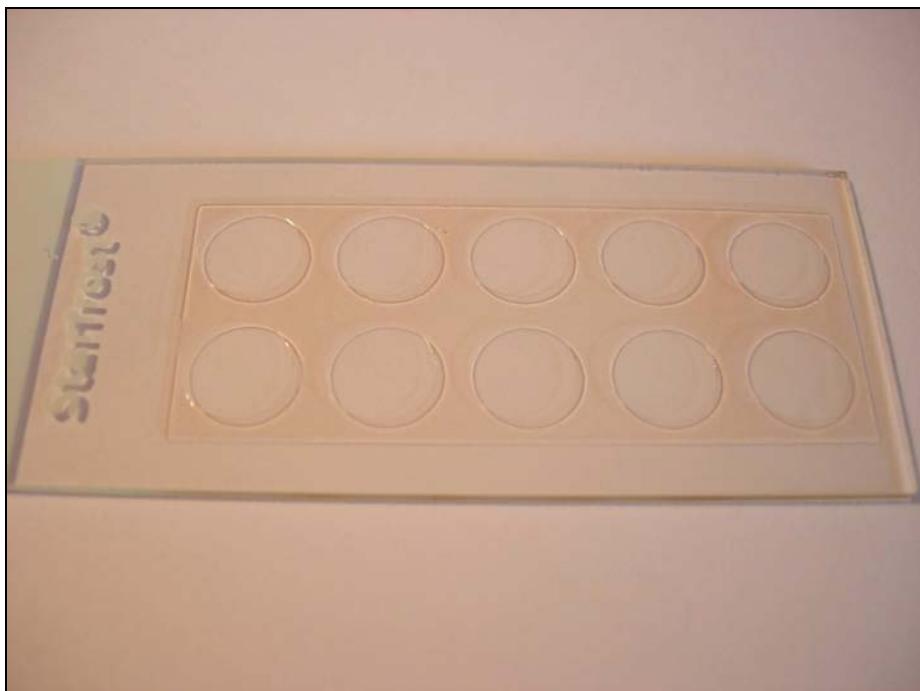


Figure 31 : Photographie d'une lame modifiée avec un motif de 10 trous en polymère

2.3.4.5. Analyse du motif par profilométrie optique

Lorsque l'on programme les dimensions du motif à créer, on ne peut malheureusement pas maîtriser la hauteur du polymère. En effet, celle-ci dépend du volume de résine déposé puis étalé.

De façon à contrôler l'épaisseur, on analyse le motif obtenu par profilométrie optique (dispositif de marque **UBM**) qui permet de déterminer des profils de ligne (2D) ou de surface (3D).

Ce profil a été enregistré pour un puits entouré de polymère (Figure 32).

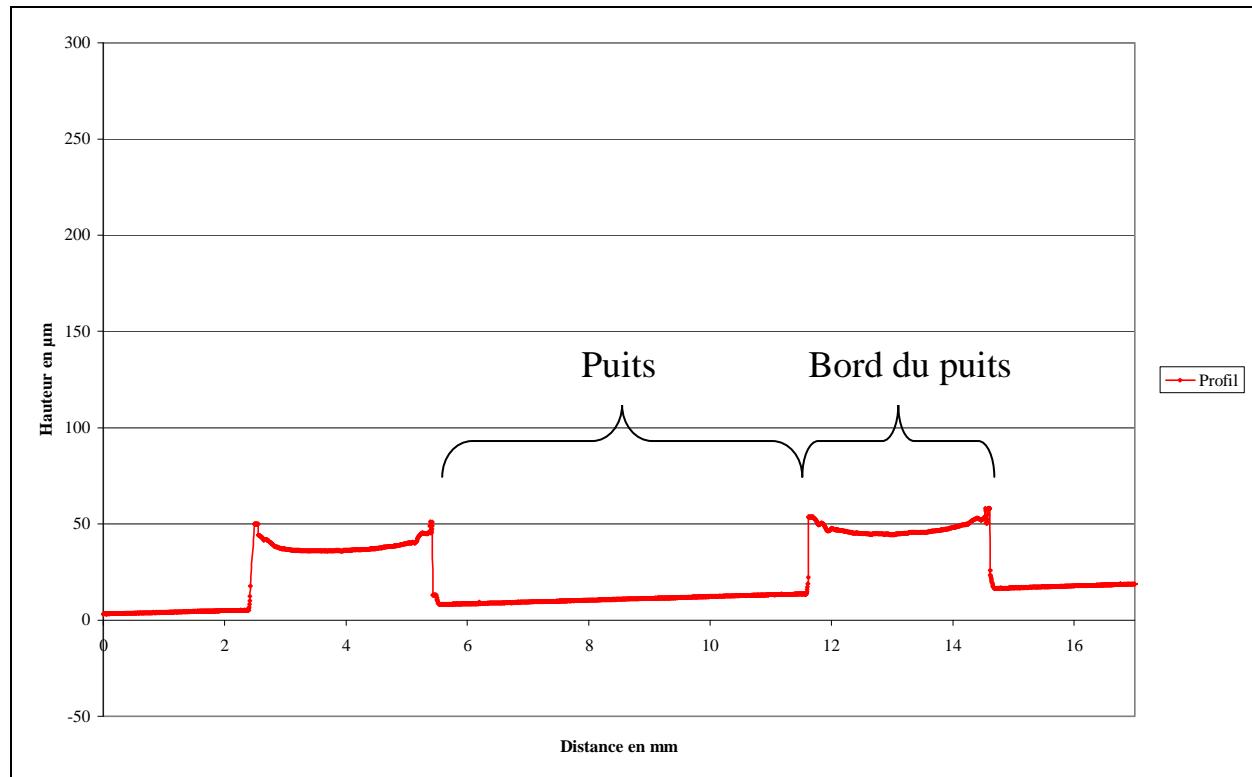


Figure 32 : Profil d'un puits en polymère

Remarque :

On observe une légère "pente" de la ligne de base du profil : ceci peut s'expliquer par le fait que le support n'est pas parfaitement plan. Comme on mesure une hauteur de polymère de l'ordre de la dizaine de micron, une légère variation de la surface du support peut faire "pencher" la lame.

En analysant ce profil, on observe que le diamètre du puits est bien celui fixé lors de la programmation du motif, à savoir **6 mm**. De plus, la hauteur d'un puits est évaluée à environ **37,5 μm**. Ceci permet de calculer un volume de puits théorique, c'est-à-dire la contenance de ce motif : environ **1 mm³**. Il est intéressant de noter que, lors des expériences, **10 μL** de solution ont pu être déposés dans ces puits.

2.3.5. Greffage des anticorps

Le but initial du Projet de Fin d'Etudes était d'étudier la fonctionnalisation de lames de verre silanisées afin de les employer, par la suite, comme support pour développer une puce à anticorps.

Les résultats encourageants observés avec le greffage du fluorophore CouCHO sur ces supports, nous ont conduits à envisager des essais de greffage d'anticorps selon le même principe : la formation d'une liaison hydrazone entre l'anticorps oxydé et le bras espaceur. Ces greffages ont la particularité d'orienter les anticorps, de façon à rendre les sites antigéniques facilement accessibles.

Cette étape de greffage se déroule de la façon suivante :

- les anticorps sont mis en contact avec un oxydant, pour une courte durée, afin d'oxyder les carbohydrates présents sur les fragments Fc et ainsi créer des fonctions aldéhydes,
- on sépare ensuite les anticorps de l'oxydant,
- la solution d'anticorps est déposée sous forme de gouttes sur une lame, dans chacun des trous fabriqués par stéréolithographie,
- après un certain temps de contact, on retire l'excédent de solution et on rince la lame par immersion dans une solution tampon appropriée,
- on procède enfin à la lecture de la lame grâce au lecteur de plaque de micro titration.

La réussite de ce type d'expérience réside dans le choix des anticorps mais aussi des conditions opératoires auxquelles on les soumet : celles-ci doivent être les plus «douces» possible pour l'anticorps, qui, rappelons-le, est une protéine de conformation tridimensionnelle complexe, et dont les propriétés, liées à cette conformation, peuvent être facilement altérées.

2.3.5.1. Choix des anticorps

- Anticorps marqués

Dans un premier temps, pour faciliter la lecture des résultats de greffage, des anticorps polyclonaux commerciaux marqués par la FITC ont été employés.

Les anticorps ainsi marqués ont été analysés par lecture de la lame grâce au lecteur de plaque de micro titration selon le principe décrit dans le paragraphe B.2.2.3.3. Connaissant le ratio de marquage protéine/fluorophore, et par comparaison de la lame à une solution de FITC de concentration connue, il est possible de quantifier, après rinçage des dépôts, les anticorps greffés.

- Importance de l'espèce

Deux types d'anticorps, commercialisés par **Sigma Aldrich**, sont disponibles :

- des anticorps produits chez le lapin, et dirigés contre des antigènes de chèvre (anticorps dits "lapin anti-chèvre") ;
- des anticorps produits chez la chèvre et dirigés contre des antigènes de lapin (anticorps dits «chèvre anti-lapin»).

Ces anticorps ont été marqués par FITC avec un ratio protéine/fluorophore comparable.

On a alors comparé des dépôts de concentrations identiques des deux types d'anticorps, oxydés et non oxydés, sur les lames fonctionnalisées et après rinçage des lames, des différences d'intensité de fluorescence ont été observées. Il est apparu que les anticorps produits chez le lapin présentaient une meilleure réponse que ceux développés chez la chèvre.

Une caractéristique importante a ainsi été mise en évidence : l'espèce animale dans laquelle est produit l'anticorps joue un rôle non négligeable dans le comportement physico-chimique de celui-ci.

- Détection des greffages

Hormis le choix d'espèce qui s'est montré primordial, un problème d'instabilité du fluorophore FITC est apparu dans les solutions d'oxydation. En effet, cette étape présente un bon rendement d'autant plus qu'elle est menée en milieu légèrement acide (pH 5). Or cette condition d'acidité s'est révélée néfaste pour les molécules de fluorescéine attachées aux anticorps. On peut observer une nette diminution d'intensité de fluorescence des anticorps marqués lorsqu'ils sont en solution acide, par rapport à une solution de pH 7,4 proche de la neutralité (Figure 33).

Cette diminution du rendement quantique de fluorescence de la fluorescéine en milieu acide est bien connue. Ce qui explique que généralement, les études réalisées avec ce fluorophore sont préférentiellement conduites en milieu plutôt basique.

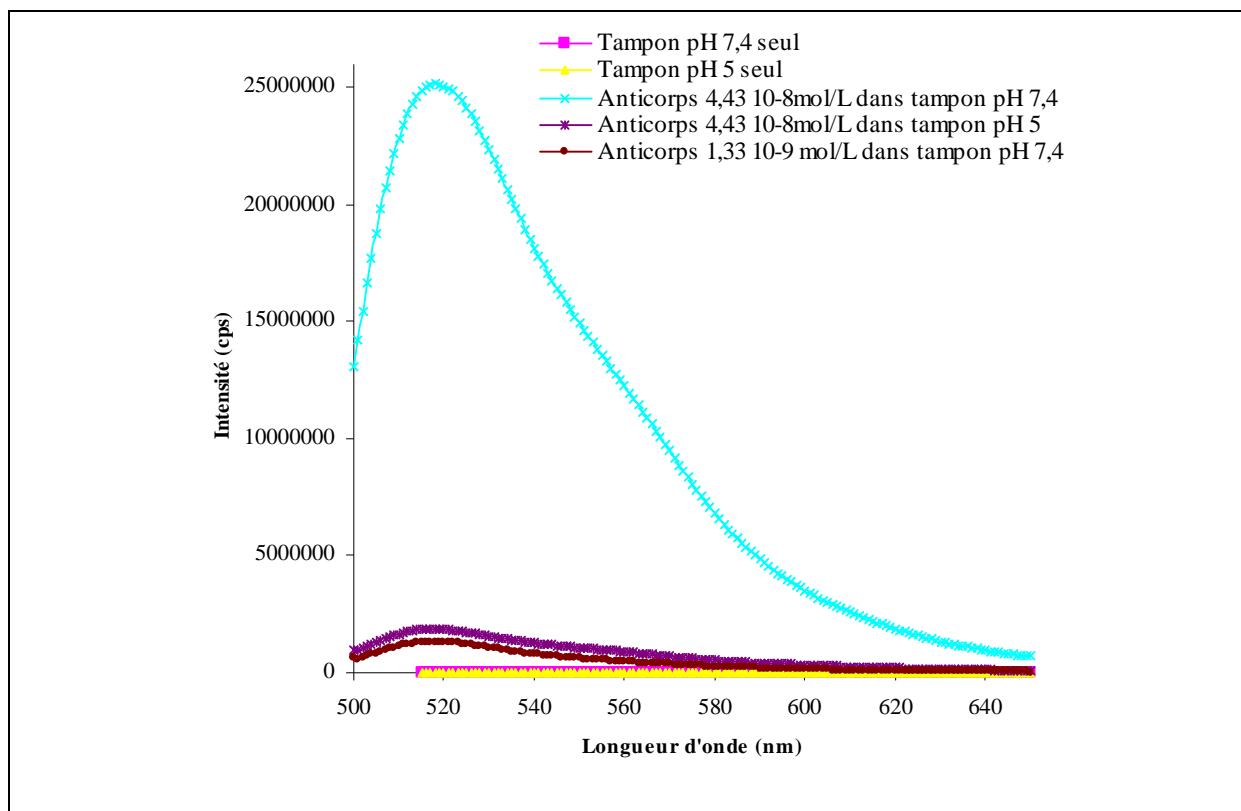


Figure 33 : Spectre d'émission d'une solution d'anticorps marqués FITC (concentration : $4,43^{10-8}$ mole/Litre) dans deux tampons différents

Spectre d'émission pour $\lambda_{ex} = 495$ nm, mode Sc/Rc, résolution spectrale de 3 nm.

Remarque : Les deux courbes des solutions tampons (jaune et rose) sont superposées

Les expériences ont été poursuivies avec un couple d'anticorps, ce qui correspondait mieux aux immunoessais que l'on cherchait à développer :

- un anticorps dit "primaire" développé chez le lapin, non marqué, lyophilisé, destiné à être oxydé pour ensuite être greffé sur le support,
- un anticorps dit "secondaire", développé chez la chèvre, en solution, dirigé contre les antigènes de lapin, et marqué par FITC : celui-ci sert lors de l'étape de révélation des greffages, par mise en contact avec le dépôt d'anticorps primaire après lavage de celui-ci.

On cherche donc à détecter la fluorescence de l'anticorps secondaire, par la même méthode que pour l'anticorps marqué initialement choisi. Le fluorophore FITC, dans ce cas, n'est pas soumis à l'acidité de l'oxydation, il garde donc son intégrité.

2.3.5.2. Choix des conditions opératoires

- Conditions d'oxydation des anticorps

Pour cette étape primordiale, un protocole décrit dans la littérature a été choisi : son principal avantage est de concerner des sites éloignés des sites de liaison à l'antigène.

Ce mécanisme d'oxydation met en jeu le périodate de sodium agissant sur les fonctions diols vicinales des carbohydrates présents au niveau des chaînes des anticorps pour obtenir des fonctions aldéhydes. Le temps de réaction est proportionnel à la quantité de groupements aldéhydes obtenus. Néanmoins, bien que cette étape de réaction chimique n'altère pas les fonctions de liaison de l'anticorps, il faut veiller à ne pas prolonger le temps de réaction au-delà de ce qui est recommandé, sachant que seulement quelques fonctions aldéhydes suffisent pour l'étape suivante de greffage covalent [Wolfe et Hage, 1991].

Les paramètres essentiels à maîtriser dans cette étape sont : la concentration en oxydant, la durée, le pH et la température de réaction.

- Conditions de séparation des anticorps et de la solution oxydante

Pour poursuivre le protocole de greffage de l'anticorps, il faut impérativement le séparer de la solution oxydante. Sachant que le poids moléculaire moyen d'un anticorps est d'environ 150 000 daltons, il a été envisagé, en premier lieu, de séparer les anticorps de la solution de periodate de sodium grâce à un système de colonne d'exclusion. Ce dispositif est avantageux dans la mesure où, non seulement il sépare les protéines de l'oxydant de façon rapide, mais il permet aussi de changer la solution tampon contenant les anticorps. En effet, la réaction d'oxydation se déroulant à pH acide, les anticorps sont transférés dans un tampon plus favorable, le tampon PBS ("Phosphate Buffered Saline"), dont le pH s'élève à 7,4.

En revanche, ce type de colonne de séparation présente l'inconvénient de diluer la solution initialement déposée. L'alternative suivante a été choisie : afin de contourner le problème de dilution de la solution d'anticorps, on sépare les anticorps de la solution oxydante par centrifugation en plusieurs étapes sur micro filtre de coupure de masse ("cut off") 30 000 Da. Ainsi, à la fois les anticorps sont concentrés, et le tampon d'oxydation est remplacé progressivement par le tampon de conservation (PBS) par piquage de volumes connus.

- Conditions de greffage

Comme évoqué auparavant, les anticorps marqués par le fluorophore FITC subissent une diminution de l'intensité de leur signal lorsqu'ils sont en solution de pH acide. On peut donc en déduire l'une des conditions du greffage : les anticorps oxydés sont placés en solution tampon de pH 7,4 (tampon PBS).

Le second paramètre de greffage très important est le temps de contact entre les anticorps oxydés et le support : intuitivement, on peut penser que plus ce temps est long, plus la liaison covalente est favorisée.

Après de nombreux essais de temps de greffage courts (1 à 3 h) et longs (plus de 20 h), à 4 °C, on remarque une différence d'intensité : les greffages de longue durée présentent une intensité de fluorescence plus élevée que les greffages courts. Mais cette différence est observable

aussi bien pour les supports fonctionnalisés hydrazide que pour des lames fonctionnalisées uniquement avec le bras diamino (Figure 34).

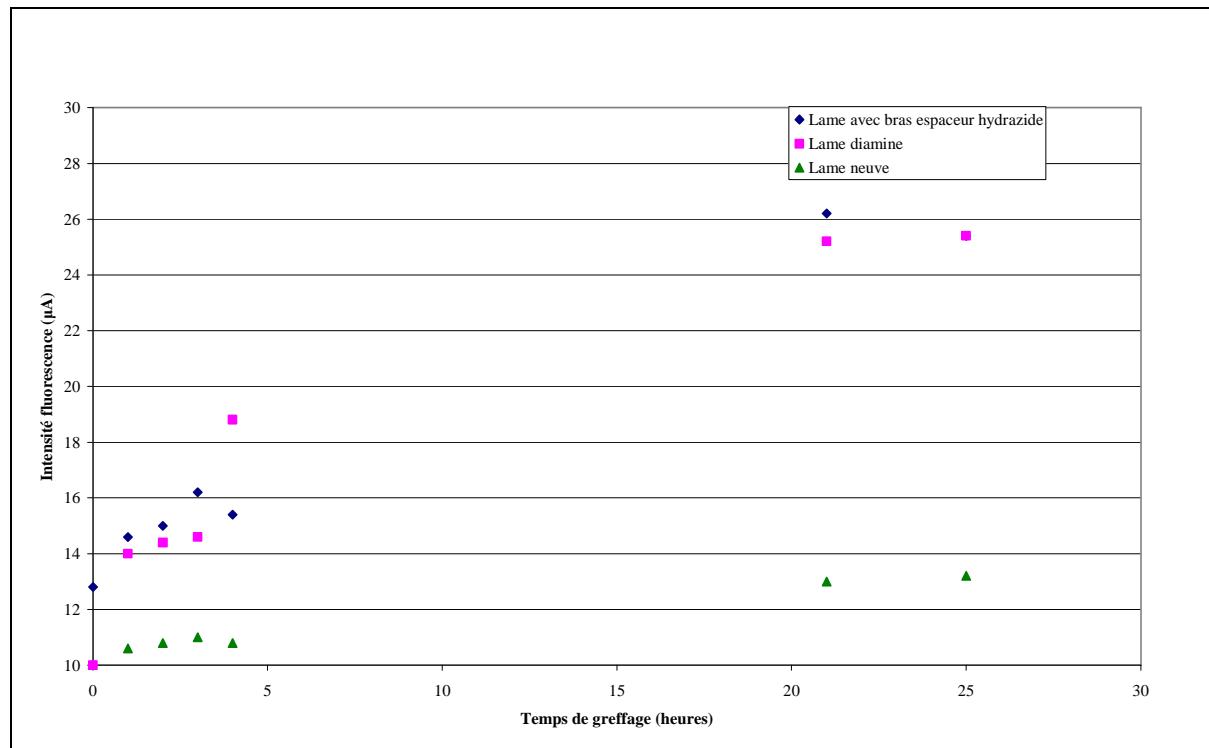


Figure 34 : Microscopie de fluorescence : observation de trois lames après plusieurs greffages à des temps différents

En effet, plus on prolonge le temps de contact entre les protéines et le support, plus on favorise un effet non contrôlé : l'adsorption des protéines sur le support en verre. Les résultats d'intensité sont donc faussés : ils ne reflètent pas correctement l'évolution du nombre de liaisons covalentes.

De ce fait, et en prenant également en considération que de tels temps de réaction sont contraignants pour l'opérateur, nous avons finalement opté pour des greffages d'une heure à température ambiante.

2.3.5.3. Protocole d'oxydation et de greffage des anticorps

Ce protocole se déroule de la manière suivante :

- Préparation des solutions

➤ Tampon acétate (pH 5)

Ce tampon est utilisé pour dissoudre à la fois l'anticorps primaire et l'oxydant. Le tampon acétate est une solution 20 mM d'acétate de sodium et 0,15 M de chlorure de sodium. Le pH est ajusté à 5 par quelques gouttes d'acide acétique.

➤ Solution d'oxydation

On la prépare de la façon suivante : le périodate de sodium est dissous dans le tampon acétate afin d'obtenir une solution de concentration 10 mM. Cette concentration a été choisie pour oxyder une solution d'immunoglobulines de lapin dosée à 2 mg/mL [Wolfe et Hage, 1995].

➤ Ethylène glycol

L'éthylène glycol utilisé à raison de $2 \cdot 10^{-3}$ mmol ajoutés pour $5 \cdot 10^{-3}$ mmol d'oxydant permet de stopper la réaction d'oxydation.

➤ Tampon PBS ("Phosphate Buffered Saline", pH 7,4)

Ce tampon sert à transférer les anticorps une fois qu'ils sont séparés de la solution oxydante.

On prépare cette solution de la manière suivante :

- Dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4 , 2 mM
- Hydrogénophosphate de sodium $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, 8 mM
- Chlorure de potassium KCl , 10 mM
- Chlorure de sodium NaCl , 140 mM

Le pH final s'élève à 7,4.

➤ Tampon de lavage ("Washing buffer")

Une fois que les dépôts de l'anticorps primaire ont réagi après un temps défini, les lames sont lavées pour éliminer la solution en excédent et limiter l'adsorption des anticorps non liés de façon covalente. Pour ce faire, nous avons utilisé un tensioactif non ionique, le tween 20 (ou polysorbate 20) qui entoure la molécule de protéine et limite donc les forces électrostatiques

entre les anticorps et le verre. Ce tampon est préparé par addition de tween 20 à un volume de tampon PBS, de façon à obtenir une solution dosée à 0,05 % (p/v).

➤ **Tampon de blocage ("Blocking buffer")**

Afin d'empêcher l'anticorps secondaire de se greffer sur les bras espaces libres (non liés à l'anticorps primaire), on dépose un tampon de blocage (ou "blocking buffer") : ce tampon est une solution de BSA à raison de 1 % (v/v) dans du tampon PBS. L'albumine est une protéine de poids moléculaire élevé qui permet un encombrement des sites d'adsorption et/ou de liaison de l'anticorps secondaire. Celui-ci ayant moins de possibilités d'atteindre la surface de la lame pour s'y lier, il va préférentiellement se lier à l'anticorps primaire (par la réaction de type antigène-anticorps).

• Préparation des anticorps primaires

L'anticorps primaire (immunoglobuline de lapin) lyophilisé est dissout dans du tampon acétate à raison de 2 mg/mL.

Afin de comparer les dépôts d'anticorps oxydés et non oxydés, on sépare l'aliquote en deux. L'un des aliquotes est mis en contact avec la solution oxydante de façon à diluer la solution d'anticorps de moitié. La réaction d'oxydation est réalisée à l'abri de la lumière, à température ambiante, avec agitation, pendant strictement 30 min. La réaction est ensuite stoppée par l'addition d'éthylène glycol et par une trempe indirecte glacée.

On sépare ensuite les anticorps de la solution oxydante par centrifugation thermostatée (à 4 °C) sur filtre de seuil de coupure ("cut off") 30 000 Da. Les anticorps sont alors séparés et transférés dans un tampon PBS, de façon à obtenir une solution de même concentration qu'au départ : 2 mg/mL. Les éluats de centrifugation sont recueillis afin de les analyser au spectrophotomètre UV : l'absorbance mesurée à 280 nm, longueur d'onde d'absorption des protéines, permet de quantifier la proportion de protéines de poids moléculaire inférieur à 30 000 Da. Cette valeur permet d'évaluer la nocivité de l'oxydation vis-à-vis des anticorps : plus il y a d'absorbance à 280nm, moins de protéines ont été dégradées, et donc meilleure a été la réaction d'oxydation.

La solution d'anticorps est alors prête à être déposée.

- Dépôts sur lame

En fonction de ce que l'on souhaite étudier, la solution mère d'anticorps primaires oxydés est diluée dans du tampon PBS. On dépose alors les diverses solutions d'anticorps oxydés par volume de 20 µL par puits, en réservant au moins un puits par lame au dépôt du tampon PBS seul (dépôt qui sert de témoin). Les lames sont placées sur un porte lame, dans une boîte hermétique saturée par le tampon employé. Les conditions de réaction retenues sont les suivantes : 1 h à température ambiante.

Une fois la réaction terminée, on retire les excédents de dépôts et on immerge la lame dans le tampon de lavage pendant 7 min suivies d'une seconde immersion dans un tampon de lavage neuf. On dépose ensuite le tampon de blocage, et on le laisse réagir pendant 30 min à température ambiante avant de le retirer.

Les anticorps secondaires peuvent alors être déposés (leur concentration est choisie de façon à ce qu'ils soient en excès par rapport aux anticorps primaires), et on les laisse réagir 1 heure à température ambiante. Les conditions de lavage sont identiques à celles de l'étape précédente.

- Lecture

Les lames ainsi préparées sont prêtes à être lues grâce au lecteur de plaques de micro titration. Afin de ne pas altérer les anticorps lors du balayage du faisceau laser, on dépose une goutte de tampon PBS sur chaque puits. Chaque lame est lue en même temps qu'une lame abaque FITC, c'est-à-dire une lame sur laquelle est déposée une solution de FITC de concentration connue.

2.3.5.4. Résultats

Après quelques essais de greffage pour rechercher les conditions optimales de liaison covalente, nous avons mesuré l'intensité de fluorescence d'un dépôt d'anticorps primaires oxydés sur le support fonctionnalisé et l'avons comparée à celle d'anticorps non oxydés déposés sur lame non modifiée.

Curieusement, ces résultats de greffage réalisés dans les conditions expérimentales décrites précédemment ont été inattendus et difficilement compréhensibles : les anticorps non oxydés, déposés sur le support non fonctionnalisé ont présenté une réponse meilleure en intensité de fluorescence que les anticorps oxydés déposés sur support fonctionnalisé (Figure 35).

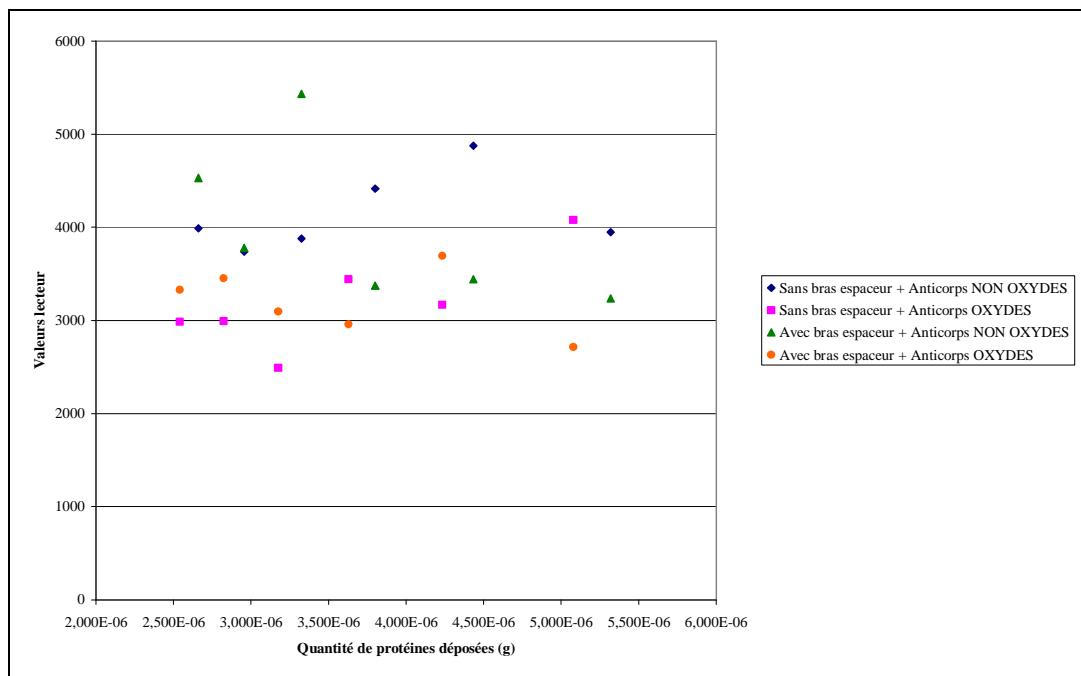


Figure 35 : Lecture au lecteur de plaques de micro titration de quatre lames différentes

2.4. Discussion

Lorsque l'on souhaite immobiliser des anticorps sur un support par liaison covalente, deux phénomènes se produisent : le greffage covalent, par liaison solide (ce que l'on cherche ici à obtenir) et le phénomène d'adsorption, par liaison plus faible, plus fragile. Ce second type de liaison, résultant des forces électrostatiques entre les protéines et le verre, est inévitable, mais représente une contrainte car elle n'assure pas une fixation fiable de l'anticorps. En effet, l'anticorps ainsi lié au support peut subir une désorption favorisée par certaines conditions de stockage ou d'emploi de la lame. Il est évident que pour une utilisation aussi importante que le diagnostic *in vitro*, le dispositif ne peut présenter une telle incertitude d'intégrité.

Tout au long des expériences de greffage, nous avons cherché à diminuer ce phénomène. En l'occurrence, le bras espaceur est l'un des moyens de limiter cette adsorption en créant une barrière physique entre le support et l'anticorps, qui est alors trop éloigné pour s'adsorber.

Pour rechercher une explication à nos résultats expérimentaux, ils ont été comparés à ceux de la littérature : en 1991, Brillhart et Ngo ont décrit les différentes réponses obtenues suite au greffage d'anticorps sur un support en polystyrène dont la surface possède des groupements hydrazides.

Les résultats expérimentaux de ces auteurs ont permis de mettre en lumière les informations suivantes :

- Le greffage d'anticorps oxydés sur un support fonctionnalisé par une terminaison hydrazide donne une meilleure réponse que le greffage d'anticorps non oxydés sur ce même support,
- Les signaux des greffages d'anticorps oxydés et non oxydés sur un support non fonctionnalisé sont d'intensités similaires (les résultats sont quasi superposables),
- De plus, ces derniers signaux sont moins intenses que dans le cas d'anticorps oxydés sur support fonctionnalisé, mais plus intenses que pour des anticorps non oxydés sur un support fonctionnalisé.

Pour expliquer les différences observées entre les résultats de la littérature et nos propres résultats, il faut remarquer les points suivants :

- Le support utilisé par Brillhart et Ngo est en polystyrène : bien que la fonction terminale soit une fonction hydrazide, le support n'a pas subi les mêmes modifications. Cet aspect a sûrement une grande importance quant à la facilité ou non d'adsorber les protéines.
- De plus, il faut noter que les anticorps employés sont différents de ceux qui ont été choisis pour la puce : Brillhart et Ngo ont oxydé des immunoglobulines humaines, alors que nous avons choisi des anticorps de lapin. Ceux-ci servent d'antigènes aux anticorps secondaires qui les reconnaissent. On peut émettre l'hypothèse que les anticorps humains supportent plus facilement l'oxydation. Cette réaction a pu altérer les capacités de reconnaissance de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire dans le cas des anticorps développés chez le lapin.

D'autres expériences permettraient de confirmer ou infirmer ces propositions : en appliquant les conditions expérimentales au même support que celui utilisé par Brillhart et Ngo, nous aurions pu évaluer l'influence plus ou moins importante du type de support et de l'espèce d'anticorps employée.

CONCLUSION

Une recherche bibliographique et nos travaux menés dans le domaine des puces à anticorps, font apparaître que la fabrication d'un tel dispositif n'est pas aisée : le choix du support et de sa fonctionnalisation, la méthode retenue pour le greffage covalent et les conditions d'analyse constituent des challenges. L'utilisation d'une puce à anticorps en tant que système dédié au diagnostic implique donc de relever des défis technologiques.

Au cours de cette étude, des supports plans ont été fonctionnalisés et structurés en vue de réaliser le greffage covalent, orienté et localisé d'anticorps. A partir de lames de microscope silanisées à l'origine par un bras espaceur portant une fonction amino, une courte chaîne polyoxyéthylène terminée par une fonction hydrazide a été introduite. Cette terminaison a permis de réaliser dans des conditions douces, le greffage covalent de composés possédant une fonction aldéhyde. Dans notre cas, en réalisant le greffage d'un composé fluorescent dérivé de coumarine, nous avons pu caractériser les étapes intermédiaires. Le greffage d'anticorps par les carbohydrates présents sur leur fragment Fc (après oxydation des diols vicinaux), via une liaison covalente stable de type hydrazone n'a cependant pas été observé. Sur les différents supports étudiés, il est apparu une forte adsorption des anticorps.

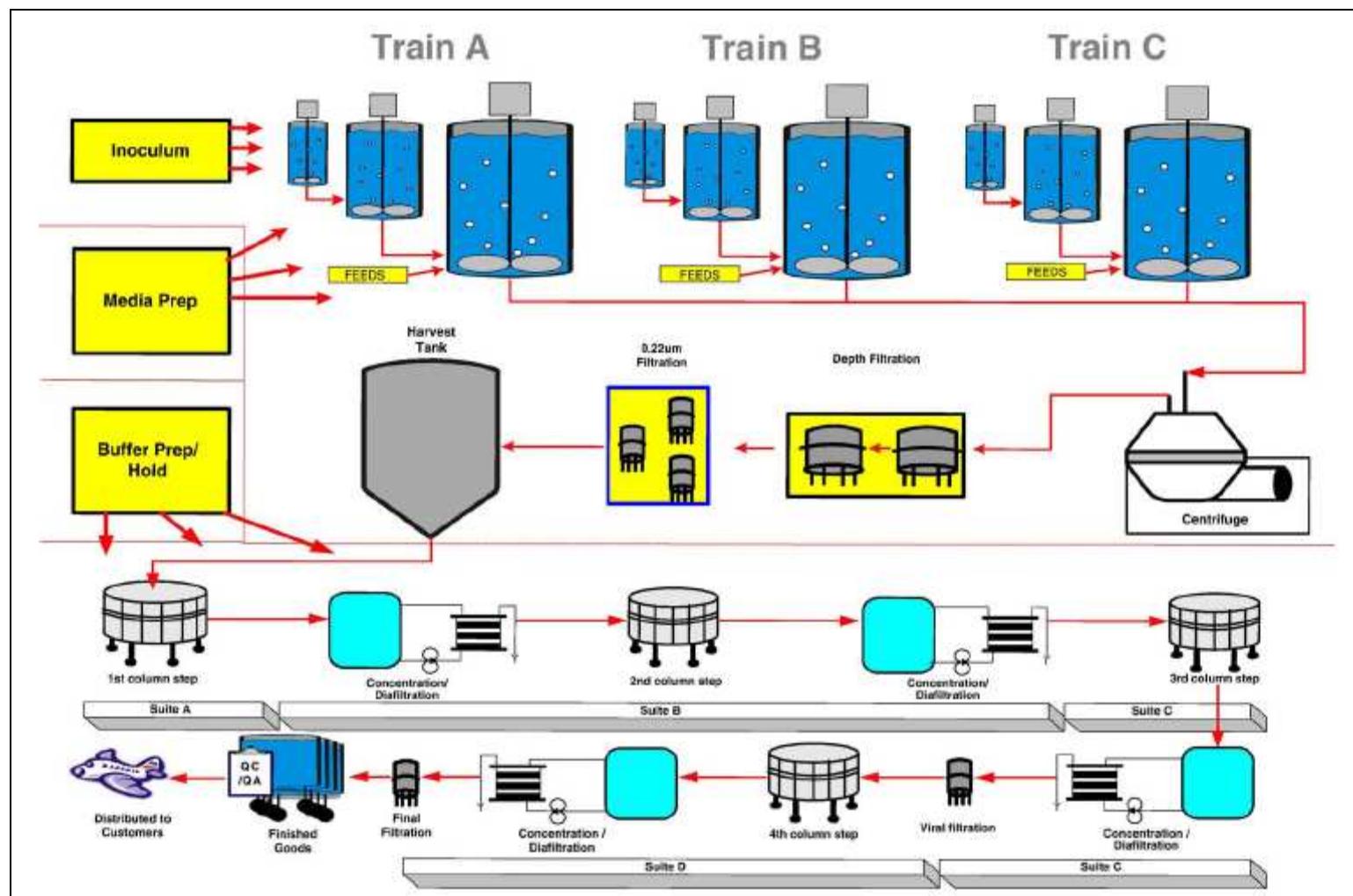
Néanmoins, ce travail expérimental a démontré qu'il était possible de préparer un support fonctionnalisé, à partir d'une simple lame de verre compatible avec tous les systèmes automatisés classiques disponibles dans les laboratoires d'analyse médicale ou d'anatomopathologie. Par ailleurs, nos premiers essais de greffage ont permis de distinguer les voies possibles d'amélioration des conditions expérimentales : le choix de l'anticorps modèle pour le développement, la vérification de l'intégrité de la protéine après greffage, la méthode de détection du complexe immun sont, par exemple, des aspects importants de la fabrication qu'il faudrait optimiser pour garantir la robustesse de la future puce.

Si les anticorps présentent un intérêt grandissant dans l'éventail thérapeutique des années à venir, ils gardent aussi une place de choix dans le domaine du diagnostic. Bien que l'analyse de la séquence d'ADN soit toujours une cible pour les chercheurs, elle ne permet pas toujours d'effectuer des tests en routine aussi facilement et rapidement que les immunoessais. Les anticorps restent donc des molécules puissantes et efficaces pour le diagnostic.

Si on considère l'évolution de la connaissance des pathologies et de leur(s) étiologie(s), on peut espérer, à l'avenir, stopper l'évolution de certaines d'entre elles. Ainsi, dans le cas des cancers, les puces à anticorps pourraient trouver une place de choix pour aider au diagnostic précoce et initier rapidement les traitements, ou encore permettre la sélection de patients candidats pour une inclusion dans des essais cliniques de thérapies en développement.

La littérature nuance cet espoir : en effet, la faible concentration des protéines-cibles, la réactivité croisée des anticorps avec plusieurs protéines et aussi les recherches constantes menées pour identifier de nouveaux biomarqueurs révèlent les difficultés rencontrées pour l'extension des puces à anticorps appliquées au diagnostic précoce du cancer.

ANNEXES

ANNEXE A1 : Schéma de procédé de fabrication de protéines à grande échelle. [Birch et Racher, 2006]

ANNEXE B1 : La spectroscopie d'absorption UV visible

Cette technique est basée sur la propriété de la matière, et plus particulièrement de certaines molécules, d'absorber des longueurs d'ondes caractéristiques du spectre UV visible.

1. Théorie de la spectroscopie d'absorption UV visible

En l'absence de toute perturbation extérieure, chaque molécule se trouve généralement dans un état énergétiquement stable appelé état fondamental. L'absorption d'un photon par une molécule peut avoir lieu lorsque celui-ci possède une énergie qui correspond exactement à l'écart entre deux niveaux énergétiques de la molécule ; il y a alors promotion d'un électron depuis une orbitale d'énergie E_1 vers une orbitale inoccupée d'énergie E_2 plus élevée. La molécule se trouve alors dans un état dit excité.

Ce gain d'énergie, qui correspond à l'énergie transportée par un photon, est donné par la relation :

$$\Delta E = h\nu = h\frac{c}{\lambda}$$

Avec :

ΔE : écart entre deux niveaux d'énergie de la molécule (= énergie d'un photon à la longueur d'onde λ), en Joules (J)

h : constante de Planck, $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}$

ν : fréquence de la radiation, en s^{-1}

c : célérité de la lumière, $c = 3 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$

λ : longueur d'onde de la lumière incidente, en m

L'excitation de la plupart des molécules s'effectue par absorption de photons dans une gamme de longueurs d'onde s'échelonnant de l'ultraviolet au visible. La région ultraviolette s'étend de 150 à 400 nm et la région du visible de 400 à 800 nm.

La densité optique (DO) ou absorbance (A) d'une solution est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Une source lumineuse émet un rayonnement monochromatique d'intensité I_0 . L'échantillon à analyser est contenu dans une cuve (en quartz, en verre ou en plastique) placée sur le trajet lumineux ; une cellule réceptrice mesure l'intensité transmise I_t . Pour les solutions diluées, la loi de Beer-Lambert établit une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration des espèces absorbantes :

$$A = \log \frac{I_0}{I_t} = \log \frac{I_0}{I_0 - I_a} = \epsilon cl$$

Avec :

I_a : intensité absorbée ($I_a = I_0 - I_t$)

ϵ : coefficient d'extinction molaire ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

c : concentration de la solution ($mol \cdot L^{-1}$)

l : longueur de la cuve contenant la solution à analyser (cm)

Généralement, on utilise des cuves dont le trajet optique mesure 1 cm ; l'expression de la loi de Beer-Lambert se trouve alors simplifiée :

$$A = \epsilon \times c$$

Les cuves doivent être maintenues très propres, particulièrement les faces polies placées sur le trajet lumineux.

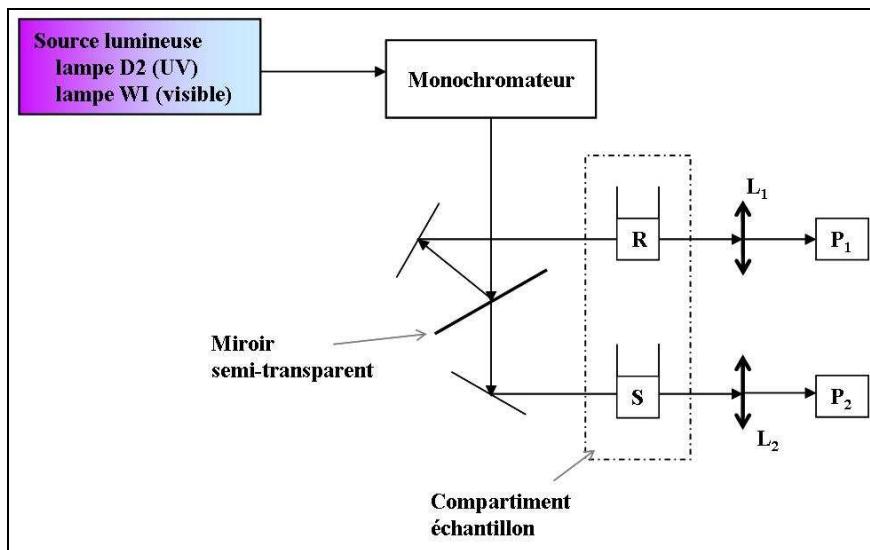
Le choix du solvant dans lequel est dissous le produit à analyser est par ailleurs très important. En effet, il doit être transparent dans la région examinée. De plus, les molécules étudiées sont susceptibles d'interagir avec le solvant. Il s'agit généralement de stabilisation par liaisons hydrogène. La longueur d'onde et l'intensité du maximum d'absorption varient selon la nature du solvant, du fait des changements de polarité.

En pratique, on mesure l'absorption relative de la lumière par rapport à une référence.

2. Description du spectrophotomètre Lambda EZ210 (Perkin Elmer)

L'appareil que nous avons utilisé est un spectrophotomètre **Lambda EZ210 Perkin Elmer**.

Son principe de fonctionnement est schématisé ci-dessous :



Principe de fonctionnement du spectrophotomètre Lambda EZ210 PerkinElmer

Ce spectrophotomètre est équipé d'une lampe au deutérium (D2) et d'une lampe à iodure de tungstène (WI) qui émettent respectivement dans l'UV et dans le visible respectivement. La plage de longueurs d'onde mesurables s'étend de 190 à 1100 nm (commutation automatique des deux lampes à $\lambda = 340$ nm) et la résolution spectrale est égale à 2 nm (par défaut).

La lumière émise est dirigée vers un monochromateur qui se compose d'un réseau de diffraction concave et d'un ensemble de fentes mécaniques. Il permet de sélectionner les longueurs d'onde pour lesquelles les mesures vont être réalisées.

Le faisceau monochromatique ainsi créé est dirigé vers un miroir semi-transparent. Le faisceau est alors séparé en deux : une partie du rayonnement va traverser l'échantillon (S), et l'autre, la solution de référence (R). Le système est conçu de telle sorte que les trajets optiques pour l'échantillon et pour la référence soient identiques.

Après avoir traversé les cuves (en quartz, en verre ou en plastique), les deux faisceaux sont focalisés respectivement par les lentilles L₁ et L₂ sur les détecteurs P₁ et P₂, deux photodiodes au silicium.

Le spectrophotomètre est piloté par un ordinateur (HP Vectra), lequel permet le réglage des paramètres d'excitation, l'acquisition et le traitement des données.

3. Applications de la spectroscopie UV visible

D'un point de vue qualitatif, les spectres UV fournissent généralement moins de renseignements sur les structures moléculaires que les spectres RMN ou IR. Néanmoins, ils peuvent permettre de rendre compte de modifications apportées dans la structure d'une molécule par comparaison avec son spectre de référence (déplacement des maxima d'absorption), ainsi que des effets de solvant.

D'un point de vue quantitatif, par application de la loi de Beer-Lambert dans le cas de solutions suffisamment diluées, il est possible de doser des espèces en solution, pourvu qu'on soit au-dessus de la limite de détection de l'appareil. Cette technique d'analyse est en effet bien moins sensible que les techniques fluorimétriques (qui sont jusqu'à 1 000 fois plus sensibles que la spectrophotométrie).

Enfin, la connaissance des maxima en absorption UV visible des composés fluorescents que nous avons utilisés au cours de notre étude, va nous être utile pour tracer leurs spectres d'émission de fluorescence.

ANNEXE B2 : La spectroscopie de fluorescence

1. Théorie de la spectroscopie de fluorescence

Lorsqu'une molécule, après avoir absorbé un photon, se trouve dans un état excité, elle peut revenir à l'état fondamental en émettant un photon de fluorescence. Plus précisément, il s'agit d'une transition électronique depuis un état excité singulet noté S_n ($n > 0$) vers l'état fondamental S_0 , singulet lui aussi. Dans l'état fondamental, les deux électrons qui occupent la même orbitale moléculaire ont des spins opposés. Lorsqu'un des deux électrons est promu dans une orbitale d'énergie supérieure, son spin est en principe inchangé et il se trouve dans un état excité dit singulet ; si l'électron promu subit une inversion de son spin, il se trouve alors dans un état dit triplet T_n ($n > 0$), de plus basse énergie par rapport à S_n .

Le diagramme de Jablonski présenté ci-dessous permet d'illustrer les diverses transitions électroniques consécutives à l'absorption d'un photon :

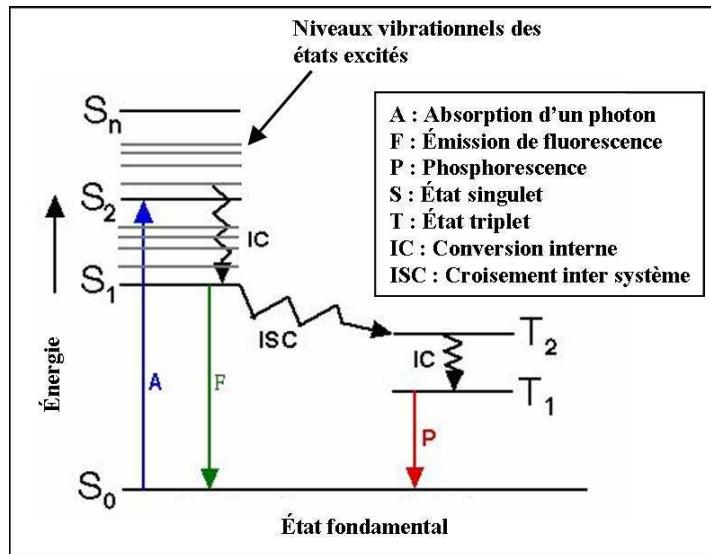


Diagramme de Jablonski

A chaque état énergétique correspondent plusieurs niveaux vibrationnels. À température ambiante, la molécule excitée retombe rapidement (10^{-11} - 10^{-9} s) au niveau vibrationnel de plus basse énergie de S_1 : ce processus non radiatif est appelé conversion interne (IC).

Plusieurs voies de désexcitation sont alors possibles :

- La molécule revient à l'état fondamental S_0 en émettant un photon de fluorescence (10^{-15} s). La durée de vie de l'état excité singulet est de l'ordre de 10^{-10} à 10^{-7} s. Pendant ce temps, la molécule subit néanmoins des changements conformationnels et elle est sujette à de multiples interactions avec son environnement. L'énergie de S_1 est donc partiellement dissipée, soit sous forme de chaleur, soit par transferts d'énergie avec les molécules du milieu. Le photon de fluorescence qui est réémis possède donc une énergie $h\nu_{\text{ém}}$ inférieure à l'énergie du photon absorbé $h\nu_{\text{ex}}$, et comme $\nu = c/\lambda$ l'émission de fluorescence se fera à une longueur d'onde $\lambda_{\text{ém}}$ plus grande que la longueur d'onde d'excitation λ_{ex} . La différence entre ces deux valeurs ($\lambda_{\text{ém}} - \lambda_{\text{ex}}$) est appelée déplacement de Stokes. Si celui-ci est faible, il sera difficile de séparer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission au moyen de filtres.

On définit une grandeur qui est le rendement quantique de fluorescence Φ_F : il correspond au rapport du nombre de photons émis par fluorescence sur le nombre de photons absorbés :

$$\Phi_F = \frac{\text{Nombre de photons émis par fluorescence}}{\text{Nombre de photons absorbés}}$$

Parmi les divers paramètres exerçant une influence sur l'émission de fluorescence d'une molécule, on peut citer :

- La température : lorsqu'elle augmente, la part des divers processus de désexcitation en compétition avec l'émission de fluorescence augmente. Il s'ensuit une diminution du rendement quantique de fluorescence.
- La polarité du solvant : lorsque la polarité augmente, l'état excité étant plus stable, on observe un déplacement de l'émission de fluorescence vers les grandes longueurs d'onde.
- Le pH (transferts de protons) : exemple de la fluorescéine.
- La présence d'autres molécules dans le même milieu, qui peut se traduire par une inhibition de fluorescence (désactivation par collisions, transferts d'électrons, etc.).
- La concentration (effets de filtre interne à fortes concentrations).

- **La molécule passe à l'état triplet T₁ par une transition non radiative appelée croisement inter système ("Inter System Crossing", ISC).** Elle peut alors retourner à l'état fondamental en émettant un photon de phosphorescence (P) à une longueur d'onde supérieure à la longueur d'émission de fluorescence puisque l'état triplet T₁ est moins énergétique que l'état singulet S₁. Cependant, la probabilité qu'un électron passe de S₁ à T₁ (10^{-10} - 10^{-8} s) est nettement plus faible que la désexcitation radiative de S₁ vers S₀ (10^{-15} s). Par ailleurs, la durée de vie d'un état triplet par rapport à un état singulet est plus grande (10^{-6} à 1 s !) : la probabilité que la molécule se désactive depuis cet état par divers processus non radiatifs est donc plus importante. C'est pourquoi il est plus rare d'observer le phénomène de phosphorescence.
- **La molécule retourne à l'état fondamental sans émettre de photons (réactions chimiques, transferts d'énergie, transferts d'électrons, etc.).** Ces transitions non radiatives sont plus ou moins probables et dépendent de divers paramètres liés à l'environnement direct de la molécule.

Ainsi un spectre d'émission de fluorescence traduit la distribution des probabilités des transitions électroniques à partir du plus bas niveau vibrationnel de S₁ (et parfois de S₂) vers les différents niveaux vibrationnels de l'état fondamental S₀.

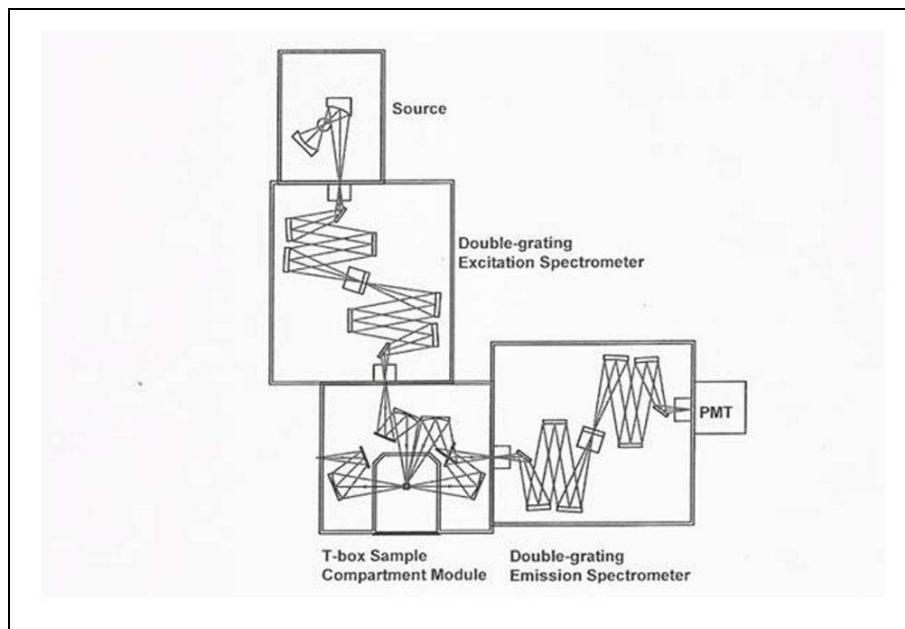
A l'inverse, un spectre d'excitation de fluorescence traduit la distribution des probabilités des transitions électroniques depuis l'état fondamental vers les divers niveaux vibrationnels excités. Lorsque les variations d'intensité de la lumière incidente avec la longueur d'onde sont compensées, le spectre d'excitation est identique au spectre d'absorption [Valeur, 2004].

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence sont globalement symétriques par rapport à une transition (effet miroir).

2. Description du spectrofluorimètre Spex FluoroLog-3 (HORIBA Jobin Yvon)

L'appareil que nous avons utilisé est un *Spex FluoroLog-3* de chez **HORIBA Jobin Yvon**.

Son principe de fonctionnement est illustré sur le schéma présenté ci-dessous :



Principe de fonctionnement du spectrofluorimètre

Ses caractéristiques sont les suivantes :

- La lampe Xénon délivre une puissance de 450 W. Elle émet dans l'UV visible entre 240 et 850nm.
- Les monochromateurs d'excitation et d'émission se composent d'un ensemble (réseau de diffraction + fentes mécaniques). Plus les fentes sont étroites, meilleure est la résolution spectrale, mais ceci au détriment du rapport signal/bruit. Il s'agit de trouver le meilleur compromis en fonction de l'échantillon analysé.
- La photodiode joue le rôle de détecteur de référence. La lumière qui sort du monochromateur d'excitation arrive sur un miroir semi-transparent : la majorité est réfléchie et vient irradier l'échantillon, tandis qu'une petite fraction est récupérée par la photodiode. En normalisant le signal reçu par le photomultiplicateur par

celui reçu par la photodiode, on s'affranchit des éventuelles variations d'intensité de la lampe au cours du temps.

- Le détecteur est un photomultiplicateur : il transforme un signal lumineux en un signal électrique qui est amplifié (effet photoélectrique). Il fonctionne en mode "comptage de photons".
- Le compartiment échantillon peut comporter un porte cuve ou un porte plaque interchangeables.
- Le FluoroLog-3 est entièrement contrôlé par le logiciel **DataMax** (Jobin Yvon).

3. Intérêt des techniques fluorimétriques

L'intérêt particulier porté aux techniques fluorimétriques, tient au fait qu'elles sont à la fois très sensibles et hautement spécifiques. En effet, une espèce fluorescence est caractérisée, dans un environnement donné, par ses spectres d'excitation et d'émission (maxima et allures des courbes), son rendement quantique de fluorescence, sa durée de vie de fluorescence (durée de vie statistique de l'état excité S₁). Pour une molécule donnée, la modification de ces caractéristiques informe sur les changements survenus dans le milieu d'analyse (changements de polarité, de température, interactions avec d'autres molécules, etc.), voire au niveau de la structure même de la molécule.

Contrairement à la spectrophotométrie, la détection ne se fait pas par rapport à une référence, mais le photomultiplicateur (PM) opère un comptage de tous les photons émis, d'où une plus grande sensibilité de la technique. La limite de détection dans un spectrofluorimètre atteint 10⁻⁹ à 10⁻¹² mol/L, et peut descendre jusqu'à 10⁻¹⁷ mol/L en microscopie à fluorescence !

Cependant, du fait qu'on travaille sans référence, la possibilité d'observer des artéfacts est plus grande : en effet, le photomultiplicateur prend en compte tous les photons émis, notamment ceux pouvant provenir d'impuretés présentes dans le milieu d'analyse ou sur les parois de la cuve, ainsi que le signal correspondant à la diffusion par l'échantillon de la lumière excitatrice. Par ailleurs, pour des solutions suffisamment diluées, l'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration. L'écart par rapport à la linéarité augmente avec la concentration et il est possible d'observer pour de fortes concentrations une diminution de l'intensité de fluorescence due à des effets de filtres internes.

ANNEXE B3 : La microscopie de fluorescence

Cette technique permet de visualiser sur une surface l'émission de fluorescence de molécules excitées à une longueur d'onde appropriée.

La source lumineuse est généralement constituée d'une lampe à arc à vapeur de mercure ou de xénon qui émet dans l'UV-visible. Un microscope à fluorescence est généralement équipé de plusieurs jeux de filtres, comprenant chacun un filtre pour l'excitation et un filtre pour l'émission. Un miroir dichroïque permet de séparer la fluorescence émise du faisceau exciteur, focalisé par un objectif sur l'échantillon. La fluorescence est directement observée à l'œil ou est enregistrée avec un appareil photographique ou une caméra CCD (charge-coupled-device).

L'appareil que nous avons utilisé est un microscope en épifluorescence (c'est-à-dire que l'objectif sert à la fois à exciter l'échantillon et à collecter la fluorescence) de type **ZEISS Axiotech**. Il est équipé d'une lampe halogène et d'une lampe à vapeur de mercure et est surmonté d'une caméra CCD. La sensibilité de cette dernière s'étant révélée beaucoup trop faible, nous l'avons remplacée par un photomultiplicateur IP28 (Hamamatsu) que nous avons connecté à un ampèremètre pour pouvoir quantifier la fluorescence émise ; l'intensité peut être lue sur différents calibres (1 à 4). Le faisceau exciteur est diaphragmé afin d'illuminer une petite partie de la surface à analyser. Pour mesurer la fluorescence à l'intérieur d'une zone supposée homogène, une moyenne est réalisée sur plusieurs points choisis par l'expérimentateur pour éviter de prendre en compte des motifs fluorescents ne correspondant pas à des greffages (agrégats, traînées fluorescentes, polymère).

Toutes les modifications apportées au microscope pour qu'il puisse être utilisé dans l'analyse de la fluorescence dans les puits des différentes lames ont été réalisées par F. Baros, CR CNRS.

Le principe de fonctionnement d'un microscope en épifluorescence est schématisé sur la figure suivante :

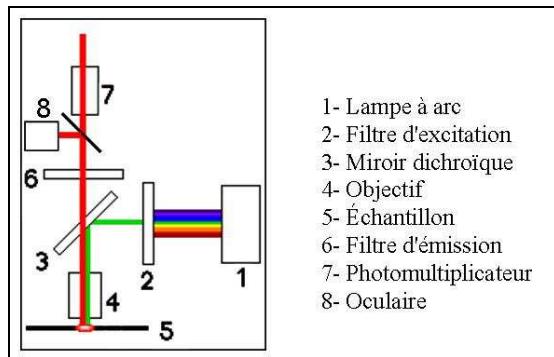


Schéma de principe d'un microscope en épifluorescence

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

AFSSAPS

Actualités en réactovigilance - Bilan et nouveaux outils

Disponible sur : <http://agmed.sante.gouv.fr/pdf/1/presentation-finale-rv.pdf>

(page web consultée le 20/04/2008)

Angenendt P., Glokler J., Murphy D., Lehrach H., Cahill D.J.

Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials

Anal. Biochem., 2002, 309, 253–260

Arenkov P., Kukhtin A., Gemmell A., Voloshchuk S., Chupeeva V., Mirzabekov A.

Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions

Anal. Biochem., 2000, 278, 123-131

B

Barber N., Gez S., Belov L., Mulligan S.P., Woolfson A., Christopherson R.I.

Profiling CD antigens on leukaemias with an antibody microarray

FEBS Letters, 2009, 583, 1785–1791

Baty D., Chames P.

Le point sur les anticorps autorisés en imagerie et en immunothérapie

Immuno-analyse et biologie spécialisée, 2006, 21, 255-263

Bilitewski U.

Protein-sensing assay formats and devices

Analytica Chimica Acta, 2006, 568, 232-247

Birch J.R. et al.

The production of monoclonal antibodies

In: Birch J.R., Lennox E.S. Monoclonal antibodies: principles and applications. New York: Wiley-Liss, 1995, 344 p.

Birch J.R., Racher A.J.

Antibody production

Advanced Drug delivery Reviews, 2006, 58, 671-685

Blacksell S.D., Mammen M.P., Thongpaseuth S., Gibbons R.V., Jarman R.G., Jenjaroen K., Nisalak A., Phetsouvanh R., Newton P.N., Day N.P.J

Evaluation of the Panbio dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2008, 60, 43–49

Boozer C., Kim G., Cong S.X., Guan H.W., Lonberg T.

Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: a review of new surface plasmon resonance technologies
Current Opinion in Biotechnology, 2006, 17(4), 400–405

Borczuk A.C., Powell C.A.

Expression profiling and lung cancer development
Proceedings of the American Thoracic Society, 2007, 4, 127-132

Borrebaeck C.A.K.

Antibody microarray-based oncoproteomics
Expert Opinion on Biological Therapy, 2006, 6(8), 833-838

Bourel D., Teillaud J.L.

Anticorps monoclonaux : tours et détours technologiques pour de nouveaux espoirs thérapeutiques
C. R. Biologies, 2006, 329, 217-227

Brillhart K.L., Ngo T.T.

Use of microwell plates carrying hydrazide groups to enhance antibody immobilization in enzyme immunoassays
J. Immunol. Methods, 1991, 144, 19-25

Butler J.E., Ni L., Nessler R., Joshi K.S., Suter M., Rosenberg B., Chang J., Brown W.R., Cantarero L.A.

The physical and functional behaviour of capture antibodies adsorbed on polystyrene
J. Immunol. Methods, 1992, 150, 77-90

Butler J.E.

Solid supports in enzyme-linked immunosorbent assay and other solid-phase immunoassays
Methods, 2000, 22, 4-23

C

Carlsson A., Wingren C., Ingvarsson J., Ellmark P., Baldertorp B., Fernö M., Olsson H., Borrebaeck C.A.K.

Serum proteome profiling of metastatic breast cancer using recombinant antibody microarrays
European Journal of Cancer, 2008, 44, 472-480

Carter P.

Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies
Nature Reviews Cancer, 2001, 118-129

Chanteau S., Nato F., Migliani R.

L'intérêt des tests rapides par immunochromatographie pour la surveillance des maladies à caractère épidémique dans les pays en développement: l'exemple de la peste à Madagascar
Médecine Tropicale, 2003, 63, 574-576

Cohen J.

Méthodes analytiques immunologiques

Les techniques de l'ingénieur, 1997, PE 3335, 1-25

Coppée J.Y.

Do DNA microarrays have their future behind them?

Microbes and Infection, 2008, 10, 1067-1071

Corning Technical Bulletin

Immobilization Principles - Selecting the Surface

Disponible sur : <http://catalog2.corning.com/lifesciences/media/pdf/elisa1.pdf>

(page web consultée le 19/03/2008)

Cretich M., Damin F., Pirri G., Chiari M.

Protein and peptide arrays: recent trends and new directions

Biomolecular Engineering, 2006, 23, 77-88

Czernichow P., Chaperon J., Le Coutour X.

Epidémiologie

Paris : Masson, 2001, 443 p.

D

Daugherty A.L., Mrsny R.J.

Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics

Advanced Drug Delivery Reviews, 2006, 58, 686-706

Delair T., Elaissari A., Perrin A., Mandrand B.

Les polymères de synthèse, supports du diagnostic médical

L'actualité chimique, novembre-décembre 2003

Disponible sur : <http://disc.vjf.inserm.fr/basisdiaggen/AC/2003-11-12/Mandrand.pdf>

(page web consultée le 20/03/2007)

Dietrich H.R.C., Knoll J., Van Den Doel L.R., Van Dedem G.W.K., Daran-Lapujade P.A.S., Van Vliet L.J., Moerman R., Pronk J.T., Young I.T.

Nanoarrays : a method for performing enzymatic assays

Anal. Chem., 2004, 76, 4112-4117

E

Ekins R.P.

Multi-analyte immunoassay.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1989, 7, 155–68

Ekins R.P.

Immunoassays

In : Roitt I.M., Delves P.J. Encyclopedia of Immunology. San Diego; London; Boston: Academic Press, 1998, 2516 p.

EURASANTE

Place du diagnostic *in vitro* et des tests génétiques dans le développement des marchés de la prévention.

Disponible sur:

<http://www.eurasante.com/fileadmin/web/pdf-publications/EtudeDiagnosticinVitro.pdf>

(Page web consultée le 15/02/2008)

Evenou F.

Irradiations localisées pour des greffages covalents sur supports

Thèse de doctorat d'université. Nancy : Institut National Polytechnique de Lorraine, ENSIC, DCPR, 2006, 257 p.

G

Gallien A.

Test de grossesse

Disponible sur : http://svt.ac-dijon.fr/schemassvt/article.php3?id_article=1330

(page web consultée le 08/12/2008)

Gering J.P., Quaroni L., Chumanov G.

Immobilization of antibodies on glass surfaces through sugar residues

J. Colloid Interface Sci., 2002, 252, 50–56

Goding J.W.

Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent

J. Immunol. Methods, 1978, 20, 241-253

H

Hance P., Garnotel E., De Pina J.J., Vedy S., Ragot C., Chadli M., Morillon M.

Tests immunochromatographiques rapides de détection du paludisme, principes et stratégies d'utilisation

Médecine Tropicale, 2005, 65, 389-393

Harlow E., Lane D.

Antibodies. A laboratory manual.

Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, 726 p.

Henriquel V.

Greffages covalents sur supports. Contribution à l'étude d'une puce "Récepteurs des rétinoïdes" pour la chimio prévention du cancer bronchique.

Thèse d'exercice en Pharmacie. Nancy : Université Henri Poincaré, 2003, 121 p.

Hoffman W.L., O'Shannessy D.J.

Site-specific immobilization of antibodies by their oligosaccharide moieties to new hydrazide derivatized solid supports.

J. Immunol. Methods, 1988, 112, 113-120

I

Ingvarsson I., Wingren C., Carlsson A., Ellmark P., Wahren B., Engström G., Harmenberg U., Krogh M., Peterson C. , Borrebaeck C.A.K.

Detection of pancreatic cancer using antibody microarray-based serum protein profiling
Proteomics, 2008, 8, 2211–2219

Ionescu R.M., Vlasak J., Price C., Kirchmeier M.

Contribution of variable domains to the stability oh humanized IgG1 monoclonal antibodies
Journal of Pharmaceutical Sciences, 2008, 97(4), 1414-1426

J

Janeway C.A., Travers P., Duverlie G., Fournel S., Masson P.L.

Immunobiologie. Le système immunitaire fondamental et pathologique.
2^e éd. Paris ; Bruxelles : De Boeck Université, 2003, 782 p.

Jefferis R.

Glycosylation of recombinant antibody therapeutics
Biotechnology Progress, 2005, 21, 11-16

Juárez-Figueroa L., Uribe-Salas F., García-Cisneros S., Olamendi-Portugal M., Conde-Glez C.J.

Evaluation of a rapid strip and a particle agglutination tests for syphilis diagnosis
Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2007, 59, 123-126

Jung Y., Kang H.J., Lee J.M., Jung S.O., Yun W.S., Chung S.J., Chung B.H.

Controlled antibody immobilization onto immunoanalytical platforms by synthetic peptide
Anal. Biochem., 2008, 374, 99-105

K

Ko I.K., Kato K., Iwata H.

Antibody microarray for correlating cell phenotype with surface marker
Biomaterials, 2005, 26, 687–696

Köhler G., Milstein C.

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity
Nature, 1975, 256 (5517), 495-497

Kopf E., Zharhary D.

Antibody arrays - An emerging tool in cancer proteomics
The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39, 1305–1317

Kusnezow W., Jacob A., Walijew A., Diehl D., Hoheisel J.D.

Antibody microarrays: An evaluation of production parameters

Proteomics, 2003, 3, 254-264

Kusnezow W., Banzon V., Schröder C., Schaal R., Hoheisel J.D., Rüffer S., Luft P., Duschl A., Syagailo Y.V.

Antibody microarray-based profiling of complex specimens: systematic evaluation of labeling strategies

Proteomics, 2007, 7, 1786–1799

L

La Ligue Contre Le Cancer

Les cancers du poumon. Brochure.

Disponible sur :

http://www.ligue-cancer.asso.fr/files/national/article/documents/bro/cancer_poumon.pdf

(page web consultée le 05/05/2008)

Lee M.-R., Shin I.

Facile preparation of carbohydrate microarrays by site-specific, covalent immobilization of unmodified carbohydrates on hydrazide-coated glass slides

Org. Lett., 2005, 19, 4269-4272

Lin L.S., Lanza Jr. T., De Laszlo S.E., Truong Q., Kamenecka T., Hagmann W.K.

Deprotection of N-tert-butoxycarbonyl (Boc) groups in the presence of tert-butyl esters

Tetrahedron Letters, 2000, 41, 7013-7016

M

Manuila L., Manuila A., Lewalle P.

Dictionnaire médical

8^e éd. Paris : Masson, 1999, 663 p.

Martinet N., Alla F., Farre G., Labib T., Drouot H., Vidili R., Picard E., Gaube M.P., Le Faou D., Siat J., Borelly J., Vermylen P., Bazarbachi T., Vignaud J.M., Martinet Y.

Retinoic Acid Receptor and Retinoic X Receptor alterations in lung cancer precursor lesions

Cancer Research, 2000, 60, 2869-2875

Muir B.W., Barden M.C., Collett S.P., Gorse A.D., Monteiro R., Yang L., McDougall N.A., Gould S., Maeji N.J.

High-throughput optimization of surfaces for antibody immobilization using metal complexes

Anal. Biochem., 2007, 363, 97-107

N

Nisnevitch M., Kolog-Gulcob M., Trombkab D., Greenb B.S., Firera M.A.

Immobilization of antibodies onto glass wool

Journal of Chromatography B, 2000, 738, 217–223

P

Peluso P., Wilson D.S., Do D., Tran H., Venkatasubbaiah M., Quince D., Heidecker B., Poindexter K., Tolani N., Phelan M., Witte K., Jung L.S., Wagner P., Nock S.

Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays

Anal. Biochem., 2003, 312, 113-124

Perry M.J.

The role of monoclonal antibodies in the advancement of immunoassay technology

In: Birch J.R., Lennox E.S. Monoclonal antibodies: principles and applications. New York : Wiley-Liss, 1995, 344 p.

Picard E., Seguin C., Monhoven N., Rochette-Egly C., Siat J., Borrelly J., Martinet Y., Martinet N., Vignaud J.M.

Expression of retinoid receptor genes and proteins in non-small-cell lung cancer

Journal of the National Cancer Institute, 1999, 91(12), 1059-1066

R

Reichert J.M.

Monoclonal Antibodies as Innovative Therapeutics

Current Pharmaceutical Biotechnology, 2008, 9, 423-430

Rumeau-Rouquette C. et al.

Epidémiologie. Méthodes et pratiques.

6e éd. Paris : Flammarion Médecine - Sciences, 2002, 312 p.

S

Sakanyan V.

Puces à protéines : nouvelle approche du diagnostic des maladies infectieuses

Antibiotiques, 2004, 6, 185-192

Sanchez-Carbaya M.

Antibody arrays: technical considerations and clinical applications in cancer

Clinical Chemistry, 2006, 52(9), 1651-1659

Sanchez-Carbaya M.

Discovery of cancer biomarkers using arrays

Expert Opin. Med. Diagn., 2008, 2(3), 249-262

Seurynck-Servoss S.L., White A.M., Baird C.L., Rodland K.D., Zangar R.C.

Evaluation of surface chemistries for antibody microarrays

Anal. Biochem., 2007, 371, 105-115

SFRL – Syndicat de l'industrie du diagnostic *in vitro*

L'industrie du diagnostic *in vitro*. Une culture d'innovation.

Disponible sur: http://www.sfrl.fr/IMG/pdf/Livre_Blanco_SFRL_080702.pdf

(Page web consultée le 16/10/2009)

Shukla A.A., Hubbard B., Tressel T., Guhanb S., Lowb S.

Downstream processing of monoclonal antibodies – Application of platform approaches

Journal of Chromatography B, 2007, 848, 28-39

Sjöbring U., Bjorck L., Kasternll W.

Streptococcal Protein G. Gene structure and protein binding properties

Journal of Biological Chemistry, 1991, 266, 399-405

Steinitz M.

Quantitation of the Blocking Effect of Tween 20 and Bovine Serum Albumin in ELISA
Microwells

Anal. Biochem., 2000, 282, 232-238

T

Tanaka G., Funabashi H., Mie M., Kobatake E.

Fabrication of an antibody microwell array with self-adhering antibody binding protein

Anal. Biochem., 2006, 350, 298-303

V

Vankova R., Gaudinova A., Sussenbekova H., Dobrev P., Strnad M., Holik J., Lenfeld J.

Comparison of oriented and random antibody immobilization in immunoaffinity chromatography of cytokinins

Journal of Chromatography A, 1998, 811, 77-84

Vazquez-Martin A., Colomer R., Menendez J.A.

Protein array technology to detect HER2 (erbB-2)-induced ‘cytokine signature’ in breast cancer

European Journal of Cancer, 2007, 43, 1117-1124

Vikholm I., Viitala T., Albers W.M., Peltonen J.

Highly efficient immobilisation of antibody fragments to functionalised lipid monolayers

Biochimica et Biophysica Acta, 1999, 1421, 39-52

W

Wang W., Singh S., Zeng D.L., King K., Nema S.

Antibody structure, instability, and formulation

Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007, 96(1), 1-26

Weiner H., Glökler J., Hultschig C., Büssow K., Walter G.

Protein, antibody and small molecule microarrays

In: Müller U.R., Nicolau D.V. Microarray Technology and Its Applications. Berlin ; New York : Springer, 2005, 379 p.

Weiping Q., Bin X., Lei W., Chunxiao W., Danfeng Y., Fang Y., Chunwei Y., Yu W.

Controlled site-directed assembly of antibodies by their oligosaccharide oieties onto APTES derivatized surfaces

J. Colloid Interface Sci., 1999, 214, 16–19

Wilson D.S., Wu J., Peluso P., Nock S.

Improved method for pepsinolysis of mouse IgG1 molecules to F(ab')₂ fragments

J. Immunol. Methods, 2002, 260, 29–36

Wingren C., Borrebaeck C.A.

Antibody microarray analysis of directly labelled complex proteomes

Curr. Opin.Biotechnol., 2008, 19, 55–61

Wolfe C.A.C., Hage D.S.

Studies on the rate and control of antibody oxidation by periodate

Anal. Biochem., 1995, 231, 123-130

Z

Zhu H., Snyder M.

Protein arrays and microarrays

Current Opinion in Chemical Biology, 2001, 5, 40-45

N° d'identification :

TITRE

LES PUCES À ANTICORPS, NOUVEAUX OUTILS DE DIAGNOSTIC

**PRÉPARATION D'UN SUPPORT PLAN FONCTIONNALISÉ ET STRUCTURÉ
POUR UNE APPLICATION DANS LE DÉPISTAGE ET LE SUIVI DES CANCERS
BRONCHIQUES**

Thèse soutenue le 15 Janvier 2010

Par Lucie MANACHE

RESUME :

L'un des plus grands challenges de la protéomique réside dans l'étude de l'expression des protéines impliquées dans les pathologies de type cancers, ceci avec une grande sensibilité, des temps d'analyses les plus courts possibles et en utilisant le moins d'analyte. Les puces à protéines constituent des outils très prometteurs pour répondre à cette demande, plus particulièrement grâce aux anticorps qui permettent d'identifier rapidement des biomarqueurs utiles au diagnostic.

Des expériences ont été menées au DCPR (Département de Chimie Physique des Réactions) de l'ENSIC (Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques), en collaboration avec l'équipe "Oncogénèse bronchique : chimioprévention et immuno-modulation épithéliale" (U724/CRB, Nancy) dans le but de préparer un support de verre silanisé devant permettre l'immobilisation d'anticorps anti-récepteurs de rétinoïdes, pour une application dans le diagnostic du cancer bronchique.

Ce travail expérimental a démontré qu'il était possible de préparer un support fonctionnalisé, à partir d'une simple lame de verre compatible avec tous les systèmes automatisés classiques disponibles dans les laboratoires d'analyse médicale ou d'anatomo-pathologie, ceci permettant d'envisager ultérieurement le greffage d'anticorps pour l'élaboration d'une puce.

MOTS CLES : Puce à anticorps / Diagnostic / Cancer bronchique

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Monsieur Serge CORBEL	Département de Chimie Physique des Réactions, ENSIC, Nancy	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème 5

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 – Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle