



HAL
open science

Détections d'interactions biologiques par imagerie de résonance plasmonique de surface: applications au criblage pharmaceutique de chimiothèques & à la détection de toxines

Sébastien Laurent

► To cite this version:

Sébastien Laurent. Détections d'interactions biologiques par imagerie de résonance plasmonique de surface: applications au criblage pharmaceutique de chimiothèques & à la détection de toxines. Biotechnologie. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00731249v1

HAL Id: tel-00731249

<https://theses.hal.science/tel-00731249v1>

Submitted on 12 Sep 2012 (v1), last revised 14 Sep 2012 (v2)

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER GRENOBLE 1
ECOLE DOCTORALE CHIMIE SCIENCES DU VIVANT

THESE

Pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université Joseph Fourier
Spécialité : Chimie-Biologie

Présentée par

SEBASTIEN LAURENT

**DETECTIONS D'INTERACTIONS BIOLOGIQUES
PAR IMAGERIE DE RESONANCE PLASMONIQUE
DE SURFACE : APPLICATIONS AU CRIBLAGE
PHARMACEUTIQUE DE CHIMIOTHEQUES & A LA
DETECTION DE TOXINES**

Composition du Jury

Président

PR ALAIN FAVIER

Rapporteurs

DR ALAIN THERETZ
DR ERIC QUEMENEUR

Examineur

DR STEPHANE ARBAULT

Directeur de Thèse

DR THIERRY LIVACHE

Thèse préparée au laboratoire Chimie de la Reconnaissance et Etude des
Assemblages Biologiques, UMR SPrAM, DRFMC, CEA Grenoble

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans l'aide de mes collègues de travail. A ce titre, je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe du CREAB. En effet, chacun d'entre vous a joué un rôle différent. Mais conjointement, vous m'avez permis de « découvrir » la recherche par ses aspects attrayants, c'est-à-dire la joie que l'on a de « trouver » une expérience qui fournit des résultats nouveaux, mais aussi par ses aspects plus rugueux tels les nombreuses semaines à se demander pourquoi rien ne fonctionne comme prévu.

Plus spécialement, je tiens à remercier Thierry pour son aide alors que la situation n'était pas toujours très « simple » à gérer pour moi en début de thèse, mais surtout à la fin de celle-ci autant du point de vue scientifique qu'humain... Une dernière qualité bien rare ! Et merci Thierry pour m'avoir donné une formation qui m'a donné le sens de l'autonomie ; à l'avenir, ce que tu m'as enseigné portera ses fruits. Aussi, une seconde personne a été très présente pour moi, une personne que je n'oublierai jamais : Pascal. Pourquoi ? Car Pascal, tes blagues parfois bien lourdes cachent derrière cette façade une personne que j'estime beaucoup pour l'implication qu'il donne gratuitement pour les autres. Et puis, les manip avec toi, c'était... inédit ! (De la voltamétrie dans 10 μL , qui l'aurait cru ?) Bien sûr, je garde un souvenir mémorable de tous les autres permanents ; Roberto avec ses longues discussions tard le soir et avec ses péripéties en aviron, Yoann avec ses blagues de bureau et sa sortie en télémark à Chamrousse, Alexandre lors de notre sortie vélo vers les Deux-Alpes, et Sébastien en Corse (quel voyage !), etc... Bref, que de beaux souvenirs.

Le travail d'un thésard restant bien compliqué, les échanges que j'ai pu avoir avec tous les thésards du laboratoire (Jean-Bernard, Manu, Emeline, Charles, Julia, ...) m'ont permis de prendre du recul sur mes résultats, de les discuter sur le plan pratique. En somme, ce travail est un peu le leur. Le mot n'est pas trop fort car Manu a toujours répondu « présent » pour répondre à mes questions parfois difficiles ; que d'heures de discussion passionnantes ! C'est bien une chose qui va me manquer par la suite. Je n'oublie ni Charles, avec mes manip d'électrochimie où tu es venu pour me prêter une partie de ton cerveau afin de résoudre mes soucis de caractérisation de la rifampicine. Ni Julia, toujours joyeuse, et que j'adore taquiner... ayant toujours des remarques pertinentes.

Bien sûr, il manque une personne du laboratoire que je n'ai pas « décrite » : Emeline. Bien sûr, comme tous les autres thésards, tu t'es impliquée pour m'aider. Mais ma reconnaissance va bien au-delà, tu le sais. En effet, j'ai découvert en toi LA personne la plus

extraordinaire qui soit tant scientifiquement que personnellement. Ton tempérament de battante, ton courage, ta ténacité au travail sont vraiment admirables et m'ont grandement aidé depuis ma première année jusqu'à aujourd'hui. Dommage que l'on ne puisse pas emmener ma paillasse à Brest !

Pour finir, je dédie ce travail à deux personnes qui me sont chères. A commencer par ma compagne, Lydie, sans qui j'aurais certainement... changé de voie. Mais, non, elle a toujours su trouver les mots justes alors que j'étais en plein doute, en pleine crise de confiance : le « moteur » d'un chercheur quelque part. Tu m'as accompagné durant ces trois années avec toujours l'idée de me voir heureux dans ce que j'ai choisi de faire de ma vie.

Au cours de ma dernière année, un grand changement s'est produit ; ma fille, Anaïs, est venue au monde. Ce petit bout de vie découvert il y a de cela pratiquement un an jour pour jour me remplit de bonheur. C'est pour toi, ma fille que j'écris ces derniers mots qui te feront, je l'espère « chaud au cœur » dans quelques années...

Sébastien

TABLE DES MATIERES

PREAMBULE	10
INTRODUCTION GENERALE.....	10
1. Conception de puces.....	10
1.1. Propriétés du pyrrole.....	11
1.2. Electrosporting	12
1.3. Appareillages	13
2. Détection d'interactions entre sonde et cible	14
2.1. La microscopie de fluorescence	14
2.1.1. Principe physico-chimique	14
2.1.2. Application aux puces à ADN	15
2.1.3. Limites de la technique	16
2.2. La résonance de plasmons de surface (SPR)	16
2.2.1. Principe de la résonance de plasmons de surface	16
2.2.2. L'imagerie SPR	18
2.2.3. Applications déjà mises au point	19
PARTIE I: DES PUCES POUR LE CRIBLAGE PHARMACEUTIQUE	21
I. CONTEXTE SCIENTIFIQUE	22
1. L'antibiothérapie	22
1.1. Rappels historiques	22
1.2. Les cibles pharmacologiques	23
1.2.1. L'homéostasie des folates	23
1.2.2. L'ADN bactérien	23
1.2.3. L'ARN polymérase bactérienne	24
1.2.4. Le ribosome	25
1.2.5. La membrane plasmique	26
1.2.6. La synthèse du peptidoglycane	26
1.3. Les problèmes de résistance	27
1.3.1. Les différents mécanismes	28
1.3.2. Conséquences cliniques	28
2. A la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques	30
2.1. La chimie combinatoire	30
2.1.1. Synthèse en mélange.....	30
2.1.2. Synthèse en parallèle	31
2.2. Les méthodes de criblage <i>in vitro</i>	33
2.2.1. Tests par mise en culture	33
2.2.2. Tests moléculaires	34
3. Les puces à petits ligands	35
3.1. Les chimies de greffage existantes	35
3.1.1. Synthèse <i>in situ</i>	35

3.1.2. Adressage non covalent	37
3.1.3. Adressage covalent par chimie « classique »	38
3.1.4. Adressage covalent par photochimie	41
3.2. Les systèmes de détection	42
3.2.1. La microscopie de fluorescence	42
3.2.2. La résonance de plasmon de surface	43
4. Cribler des chimiothèques par imagerie SPR	45
4.1. Choix de la cible pharmacologique	45
4.1.1. L'ARN polymérase II bactérienne	45
4.1.2. Les systèmes biologiques de régulation	47
4.1.3. Les molécules actives	48
4.2. Description de la chimiothèque	50
4.2.1. Les 2,5-dicétopipérazines	50
4.2.2. Les quinazoline-2,4-diones	52
4.3. La criblage biologique par imagerie SPR	53
4.3.1. Application des principes de la SPR	53
4.3.2. La stratégie d'immobilisation	54
4.3.3. Les tests d'interaction par SPRi	55
II. DEVELOPPEMENT D'UNE PUCE A PETITS LIGANDS	57
1. Etude de systèmes « modèles » de petits ligands	57
1.1. Etude initiale de faisabilité	58
1.1.1. Validation par microscopie de fluorescence	58
1.1.2. Validation par imagerie SPR	60
1.2. Choix du bras espaceur pour la chimiothèque	63
1.2.1. Série n°1	63
1.2.2. Série n°2	65
1.2.3. Bilan des essais	67
1.3. Formulation d'un nouveau milieu de polymérisation	68
1.3.1. Critères chimiques	68
1.3.2. Critères physiques	69
1.3.3. Les sondes utilisées	69
1.3.4. Influence des solvants organiques	70
1.3.5. Incorporation d'additif	73
1.3.6. Sels supports	74
1.3.7. Validation finale par SPRi	76
1.4. Densification des puces	78
1.4.1. Problèmes posés	78
1.4.2. Fonctionnalisation par alcane-thiols	79
1.4.3. Limites de la cellule électrochimique en cône	80
1.4.4. L'automate à aiguilles	80
1.4.5. Procédés en cours de développement	82
1.5. Etude finale de faisabilité	83
1.5.1. Comparatif de sensibilité	83
1.5.2. Essais de dosage de la cible	84
1.5.3. Essais de dosage de la sonde	85
2. Etude d'un système connu rifampicine / ARN polymérase	86
2.1. Validation par SPRi de la cible pharmacologique	87
2.1.1. L'ARN polymérase « sonde »	87
2.1.2. L'ARN polymérase « cible »	88
2.2. Propriétés chimiques de la rifampicine	90
2.2.1. Structure et dérivés	90
2.2.2. Stabilité chimique	91

2.2.3. Réactivité électrochimique	92
2.3. Caractérisation électrochimique de la rifampicine	92
2.3.1. Etude préliminaire par voltamétrie cyclique	93
2.3.2. Etudes voltamétriques sur des analogues structuraux simples	93
2.3.2. Etudes voltamétriques de la rifamycine SV	95
2.3.3. Etudes voltamétriques finales de la rifampicine	97
2.3.4. Approches chronopotentiométriques	99
2.4. Analyse de l'interaction rifampicine / ARN polymérase par SPRi	102
2.4.1. Stratégie d'ancrage	102
2.4.2. Acquisition cinétique	102
3. Immobilisation et criblage d'une chimiothèque par SPRi	104
3.1. Immobilisation de la chimiothèque	104
3.1.1. Synthèse combinatoire	104
3.1.2. Production et caractérisation de biopuces à « petits ligands »	105
3.2. Acquisition cinétique par imagerie SPR	106
3.2.1. Interactions directes	106
3.2.2. Caractérisation par compétition	109
3.2.3. Analyse structure / activité	112
III. EVOLUTION FUTURE DU PROJET	115
1. A court terme	115
1.1. Détermination fine de la structure active	115
1.2. Localisation du site de fixation	115
1.3. Test d'activité en solution	116
1.4. Autres cibles pharmacologiques	117
2. A long terme	117
2.1. Extension de la chimiothèque	117
2.2. Couplage avec la spectrométrie de masse	118
PARTIE II : UN OUTIL POUR DETECTER LES TOXINES..	119
I- CONTEXTE SCIENTIFIQUE	120
1. Le bioterrorisme	120
1.1. Les agents utilisés à des fins bioterroristes	120
1.2. Les méthodes et les voies de contamination des populations	122
1.3. Les instances luttant contre le bioterrorisme	123
1.4. Les outils préexistants pour la détection de substances nocives	123
2. La ricine : une protéine toxique	124
2.1. L'origine biologique	124
2.2. Le mécanisme d'action	125
2.2.1. Caractérisation moléculaire	125
2.2.2. Stratégies de traitement	126
2.2.3. Utilisation à des fins thérapeutiques	127
2.3. Les données toxicologiques	127
2.3.1. Symptomatologie	127
2.3.2. Toxicocinétique	128
2.4. Les cas d'intoxication	128

2.5. La ricine, agent du bioterrorisme	129
2.6. Les méthodes de détection de la ricine	130
2.6.1. Avantages des biopuces	130
2.6.2. Principes analytiques	132
3. Détecter des traces de toxines par imagerie SPR.....	134
3.1. Vers une approche « multitoxines ».....	134
3.1.1. Avantages des biopuces	134
3.1.2. Principes analytiques	134
3.1.3. Intérêt pratique	135
3.2. Contraintes associées au projet	135
3.2.1. Sensibilité et rapidité	135
3.2.2. La ricine	136
 II- MISE AU POINT D'UNE METHODE ANALYTIQUE POUR LA DETECTION DE LA RICINE	 137
1. Fabrication d'un immunocapteur	137
1.1. L'anticorps utilisé pour l'immunocapteur	137
1.2. Le choix des références	138
1.3. Le milieu expérimental	138
2. L'imagerie SPR à haute sensibilité.....	139
2.1. Faisabilité sous un format de détection « classique »	139
2.1.1. Réglages optiques pour l'imagerie SPR	139
2.1.2. Traitement de l'échantillon.....	140
2.1.3. Acquisition cinétique	140
2.1.4. Détermination de la sensibilité	142
2.2. Mise en place d'un mode « sandwich »	143
2.2.1. Choix du type d'anticorps secondaire	143
2.2.2. Acquisition cinétique	144
2.2.3. Evaluation de la sensibilité	145
2.3. L'amplification par nanoparticules d'or	146
2.3.1. Choix du type de nanoparticule	146
2.3.2. Les nanoparticules saturées à la BSA	147
2.3.3. Les nanoparticules non saturées à la BSA	149
2.3.4. Optimisation de la régénération du capteur	150
2.3.5. Sensibilité finale de la méthode analytique	152
2.3.6. Mode d'emploi pour l'utilisateur	153
2.4. Améliorations du procédé de détection	154
2.4.1. Evolution du procédé de synthèse du capteur	154
2.4.2. Quantification de l'apport du marqueur SPR	156
2.4.3. Caractérisation de la cinétique d'amplification par billes d'or	157
2.4.4. Effets cumulatifs	160
2.4.5. Effets d'encombrement en surface	161
2.4.6. Amélioration de la capture de l'échantillon	162
 III- DEVELOPPEMENTS FUTURS	 165
1. Amélioration de la détection de l'analyte	165
1.1. Le système fluide	165
1.2. L'analyte	165
1.3. Différents types de prélèvements envisagés	166

2. Autres applications possibles	167
2.1. Les médicaments & polluants de l'environnement	167
2.2. Un système embarqué	167

CONCLUSION169

PARTIE EXPERIMENTALE171

I- FABRICATION DES PUCES172

1. Préparation des solutions d'immobilisation	172
1.1. Cas des sondes ODN	172
1.1.1. Milieu de polymérisation « classique »	172
1.1.2. Nouveau milieu de polymérisation	172
1.2. Cas des sondes « petits ligands »	173
1.2.1. Etude initiale de faisabilité	173
1.2.2. Immobilisation de la rifampicine et de la chimiothèque	173
1.3. Cas des sondes protéiques	173
2. Etudes voltamétriques	174
2.1. Solutions analysées	174
2.2. Appareillage	174
2.2.1. Montage à 3 électrodes	175
2.2.2. Montage à 2 électrodes	175
3. Electrospeoting	175
3.1. Fonctionnalisation par les alcane-thiols	175
3.2. Séquences appliquées	176
3.2.1. Cas général	176
3.2.2. Cas particulier de la rifampicine	176
3.3. Automates	176
3.3.1. Polypotter II	176
3.3.2. Omnigrad	177

II- ANALYSE PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE177

1. Par type de puce.....	178
1.1. Puce à ADN	178
1.2. Pucés à petits ligands	178
1.2.1. Révélation directe	178
1.2.2. Révélation indirecte	179
2. Lecture et analyse des données.....	179

III- ANALYSE PAR IMAGERIE SPR180

1. Appareillage	180
1.1. Optique.....	180
1.2. Microfluidique.....	180

2. Suivi des interactions	181
1.1. Acquisition des courbes de plasmon	181
1.2. Acquisition cinétique et traitement des données	181
3. Analytes	182
3.1. Préparation	182
3.2. Injection	183
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	184

PREAMBULE

Le présent travail de thèse a trait à la détection d'événements ayant une faible probabilité de se produire. Plus précisément, cette problématique est ici exemplifiée suivant deux thématiques différentes :

- le criblage de bibliothèques de composés à vocation pharmaceutique et plus précisément antibiotique. Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec des chimistes (Dr Muriel Amblard) et des biologistes (Dr Martine Pugnière et Dr Jean-Paul Léonetti) de la faculté de pharmacie de Montpellier.
- la détection de traces de toxines dans les milieux biologiques. La méthode bio-analytique a ici été développée en lien étroit avec des biologistes (Dr Philippe Thullier) du Centre de Recherche du Service de Santé des Armées de Grenoble.

Ce manuscrit se divise donc en deux parties précédées d'une description des outils et méthodes utilisées pour ces deux projets.

INTRODUCTION GENERALE

Au cours de cette introduction, seront présentées les techniques utilisées au cours de ce travail de recherche. Ainsi, dans un premier temps, le procédé général de production des biopuces au laboratoire est décrit. Ensuite, seront abordées les méthodes physiques de lecture de ces dernières.

1. Conception des biopuces

Un biocapteur se définit comme un support fonctionnel capable de détecter un ou plusieurs types des substances biologiques. Les biopuces correspondent quant à elles à une version miniaturisée d'une multitude de biocapteurs individualisés sur un support commun, autorisant ainsi la détection simultanée de plusieurs analytes ; c'est qu'on appelle communément la notion de détection multiparamétrique. Au laboratoire, les biopuces fabriquées sont obtenues grâce à la chimie du polypyrrole, un polymère conducteur π -conjugué obtenu par électrosynthèse ou simple oxydation chimique.

1.1. Propriétés du pyrrole

Le pyrrole est un hétérocycle azoté hydrosoluble oxydable et capable de polymériser facilement dans l'eau à pH neutre lorsqu'un potentiel supérieur à + 0,7 V / ECS est appliqué à l'électrode de travail ^[1] ; le mécanisme radicalaire de polymérisation du pyrrole est indiqué en figure 1. Au cours de leur élongation, les oligomères de pyrrole deviennent de plus en plus insolubles jusqu'à précipiter à l'électrode de travail. L'accrochage du polymère à la surface est alors relativement puissant puisqu'il résiste à l'action de détergents, d'acides ou de bases. De plus, lors de la réaction d'électropolymérisation, l'anion du sel support, c'est-à-dire l'anion servant de conducteur de charge dans la solution entre les électrodes, vient s'insérer dans la matrice de polymère pour contrecarrer les charges positives naissantes (figure 1). Au laboratoire, les anions classiquement employés dans le milieu de polymérisation sont le Cl⁻ ainsi que le couple H₂PO₄⁻ / HPO₄²⁻. La concentration minimale en pyrrole nécessaire pour obtenir un dépôt de polymère est de 20 mM.

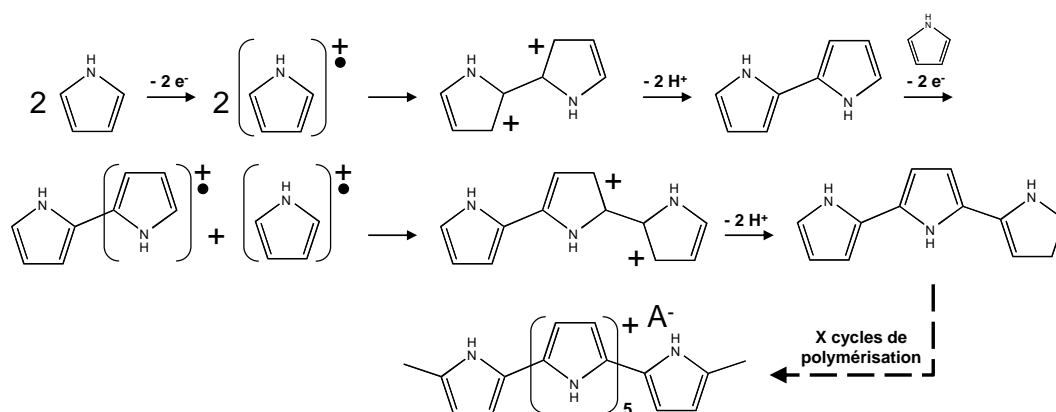


Figure 1 : Mécanisme d'électropolymérisation du pyrrole (A^- : anion de l'électrolyte support) ^[1]

Dans l'optique de fabriquer un biocapteur, une entité biologique ou chimique appelée « sonde » doit être incorporée dans ce film de polymère. Pour se faire, il s'agit de munir cette sonde d'un noyau pyrrole à l'une de ses extrémités. Au laboratoire, le pyrrole est donc modifié au niveau de l'hétéroatome d'azote pour accueillir ladite sonde, ce qui ne modifie que de manière négligeable le potentiel d'oxydation du pyrrole ainsi fonctionnalisé (figure 2). Afin de rendre davantage accessible la sonde pour son partenaire biologique, un « bras espaceur » est inséré entre l'unité pyrrole et ladite sonde ; après électropolymérisation, ce bras permet d'écarter et de fournir un meilleur degré de liberté de déplacement à la sonde vis-à-vis de la surface de polymère.

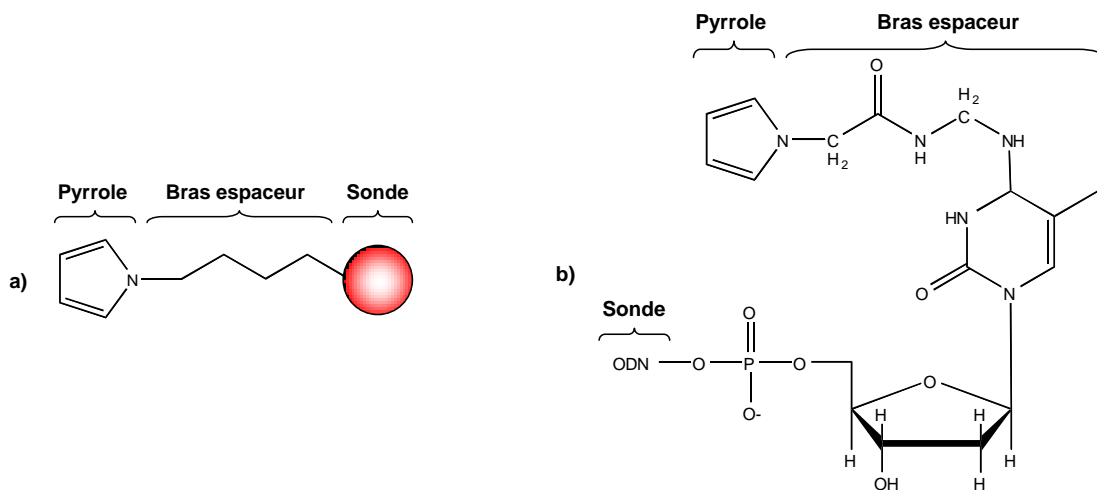


Figure 2 : a) Structure schématique typique d'une sonde fonctionnalisée par un noyau pyrrole – b) Exemple appliqué aux sondes ODNs pour la fabrication de puces à ADN ^[2]

Ces composés n'étant pas disponibles commercialement, différentes stratégies de couplage entre le pyrrole-bras espaceur et la sonde ont été mises au point au laboratoire ^[3]. Ainsi, selon ce principe, plusieurs catégories de sondes d'intérêt biologique ont été modifiées : les oligodésoxyribonucléotides ou ODNs (figure 2) ^[4], les peptides ^[5], les oligosaccharides ^[6] et les protéines ^[7, 8].

Ainsi, en contrôlant le rapport de concentration pyrrole-sonde / pyrrole dans le milieu à polymériser, il est possible de gérer la densité de sonde immobilisée à la surface de l'électrode. Classiquement, ce rapport est de 1 pour 2 000 pour la production de puces à ADN. Or, celui-ci peut différer suivant le type de sonde envisagée ^[3-5, 7, 8].

1.2. Electrosporting

Comme indiqué précédemment, l'application d'un potentiel supérieur à + 0,7 V / ECS induit la polymérisation du pyrrole en milieu aqueux à l'électrode de travail. Différentes méthodes électrochimiques peuvent être employées pour engager ce processus : la voltamétrie cyclique, la chronoampérométrie, la chronopotentiométrie,... Au laboratoire, une méthode électrochimique dérivée de la chronoampérométrie a été mise au point : l'électrosporting. A la différence des montages classiques, compte-tenu de la miniaturisation importante de la cellule électrochimique où se tient la réaction, le montage ne contient pas d'électrode de référence. Concrètement, pour obtenir la polymérisation du pyrrole, l'application séquentielle de deux voltages entre la contre-électrode en platine et l'électrode de travail en or a été fixée (figure

3a). Dans un premier temps, le potentiostat délivre une tension de + 0,4 V, tension pour laquelle le courant est nul dans le milieu de polymérisation. Ensuite, une impulsion de + 2,4 V est appliquée durant un temps bien défini, variant généralement entre 50 ms et 500 ms ; c'est durant cette phase que le potentiel de polymérisation du pyrrole est atteint. Enfin, de nouveau une tension de + 0,4 V est appliquée pour engager une réduction partielle du film de polymère. L'enregistrement de l'intensité passant dans le système peut être lue en temps réel par le potentiostat ; c'est le chronoampérogramme (figure 3b).

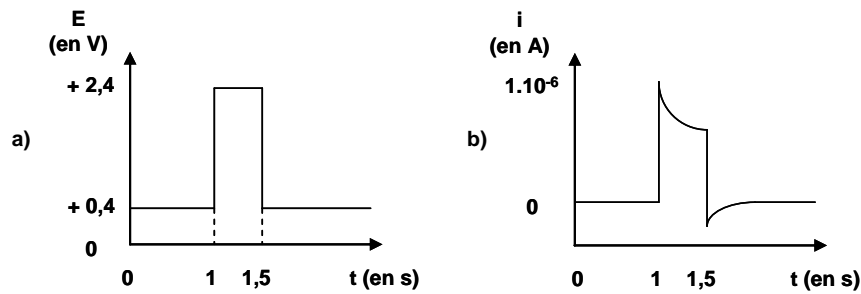


Figure 3 : a) Séquence impulsionnelle classique délivrée par le potentiostat lors de l'électrospotting – b) Chronoampérogramme correspondant obtenu lors du procédé de polymérisation par l'électrospotting

L'avantage de cette technique à potentiel imposé est qu'elle limite la suroxydation du polymère néoformé à l'électrode d'or, ce qui pourrait endommager la structure du film et par conséquent la qualité de son accroche à la surface. D'autre part, elle permet de moduler facilement l'épaisseur des films de polymère qui peuvent avoir des épaisseurs inférieures à 5 nanomètres.

1.3. Appareillages

Ce procédé d'immobilisation des sondes sur support étant très rapide – 2 secondes par séquence impulsionnelle – et effectué en une seule étape, l'extension de cette technique pour fabriquer des biopuces a été envisagée au laboratoire. Ainsi, une cellule électrochimique constituée d'un cône de micropipette se déplace successivement aux différentes zones de d'immobilisation de la matrice de plots à former *via* une interface informatique développée au laboratoire. Le principe d'utilisation est relativement simple ; après avoir chargé le cône de micropipette en mélange pyrrole / pyrrole-sonde à immobiliser, l'embout de celui-ci est amené au contact de la surface dorée (50 nm d'épaisseur). Le circuit électrique étant « fermé », la séquence impulsionnelle est alors délivrée afin que la polymérisation ait lieu, le diamètre de l'embout déterminant la taille de la zone de polymère créée. Dans un dernier

temps, la cellule revient à sa position initiale pour être purgée du liquide ayant déjà servi et pour accueillir une nouvelle solution contenant éventuellement une autre sonde. D'autre part, une goutte du liquide reste sur le support à l'endroit où s'est tenue la polymérisation.

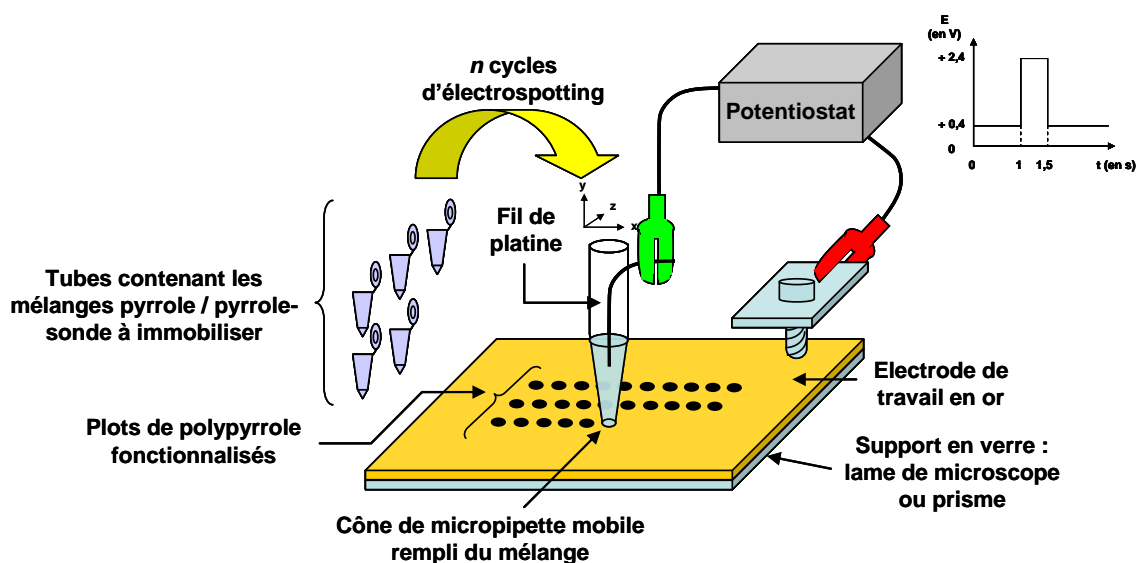


Figure 4 : Représentation schématique du robot Polypotter conçu pour la fabrication de biopuces par électrosotting ; les commandes de déplacement de la cellule électrochimique sont pilotées par logiciel développé au laboratoire

Par itérations successives, ce procédé permet d'obtenir rapidement des biopuces comportant respectivement jusqu'à 81 zones (9 x 9) et 36 zones (6 x 6) pour une étude par microscopie de fluorescence et en imagerie SPR.

L'étude des interactions entre les sondes immobilisées dans le polymère et les agents biologiques à détecter est effectuée selon plusieurs techniques au laboratoire. Parmi elles figurent une technique dite « avec marqueur »^[9], la microscopie de fluorescence et une technique « sans marqueur », l'imagerie SPR.

2. Détection d'interaction entre sondes et cibles

2.1. La microscopie de fluorescence

2.1.1. Principe de la fluorescence

La fluorescence correspond à un phénomène d'émission de lumière par un atome ou une molécule suite à leur irradiation par une onde électromagnétique incidente. Plus précisément, d'un point de vue atomistique, sous l'effet de la lumière, les électrons de ces atomes ou molécules absorbent une quantité d'énergie pour passer d'un état fondamental à un état excité

de plus haute énergie (figure 5). Le niveau d'énergie de chacun des états précités dépendant de l'atome ou de la molécule, la différence d'énergie nécessaire pour effectuer la transition, c'est-à-dire par extension la longueur d'onde d'absorption, est par conséquent une propriété intrinsèque au fluorophore. Dans un deuxième temps, les électrons à l'état excité viennent se placer successivement à des niveaux d'énergie intermédiaires correspondant à des états dégénérés liés aux rotations et vibrations du fluorophore. Dans un dernier temps, les électrons reviennent brutalement à l'état fondamental tout en léguant l'énergie libérée au milieu extérieur sous la forme de photons dont l'énergie, et donc la longueur d'onde, est supérieure à celle initialement absorbée.

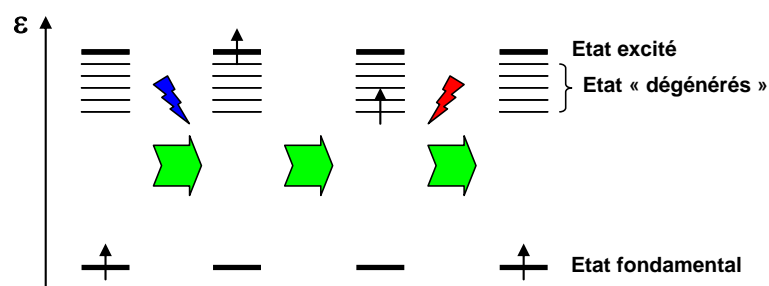


Figure 5 : Principe physique du phénomène de fluorescence

En biologie, les fluorophores utilisés font appel soit à des petites molécules chimiques possédant des liaisons π -conjuguées, la forte délocalisation électronique contribuant à l'absorption, soit à des protéines connues pour leurs propriétés fluorescentes. Parmi les fluorophores chimiques, figurent par exemple la fluorescéine, les composés de la série Cy, les Alexa, etc. Pour les fluorophores protéiques, les plus connus sont les dérivés de la Green Fluorescent Protein (GFP) pour qui l'ingénierie moléculaire a permis d'établir une large gamme de spectre d'absorption / émission, et la *R*-phycoérythrine.

Au laboratoire, de par sa grande taille limitant les phénomènes de « quenching » du support doré, c'est sur cette dernière molécule que reposent les essais de révélation par microscopie de fluorescence.

2.1.2. Application aux biopuces à ADN

Historiquement, le premier protocole de révélation des biopuces à ADN a reposé sur le principe décrit en figure 6 ^[9]. Concrètement, le support fonctionnalisé réagit dans un premier temps avec un oligonucléotide biotinyllé à son extrémité 5'. Après hybridation avec la séquence sonde complémentaire immobilisée, la protéine de fusion streptavidine / *R*-

phycoérythrine va reconnaître spécifiquement *via* sa partie streptavidine les emplacements où se trouvent la biotine. Le support peut alors être disposé dans un microscope par épifluorescence où le signal fluorescent est recueilli suite à l'illumination par une lampe au mercure.

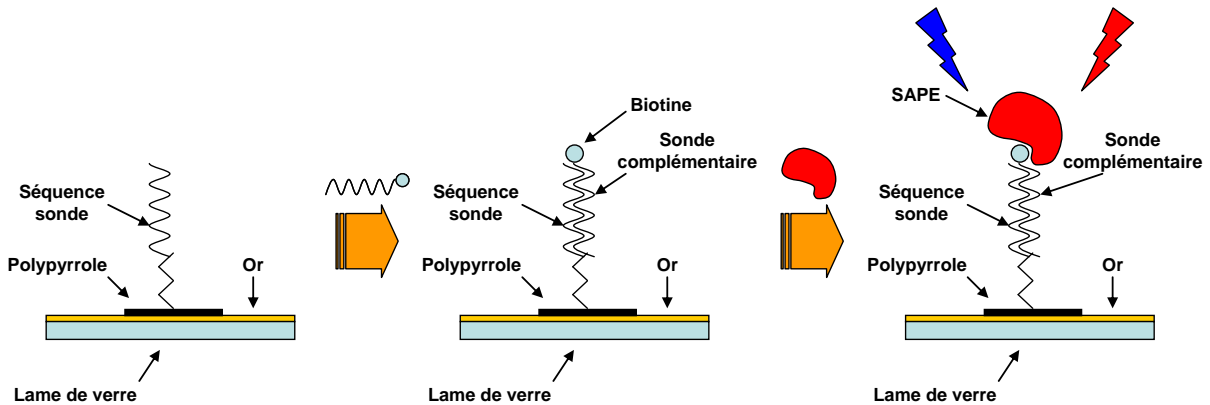


Figure 6 : Représentation schématique du principe de révélation d'une biopuce à ADN pour une lecture par microscopie de fluorescence

2.1.3. Limites de la technique

Bien que l'imagerie par fluorescence soit la méthode « de référence » au laboratoire car très sensible ^[9], elle présente cependant plusieurs limitations qui en font un moyen de détection assez limité. En effet, d'une part, cette méthode nécessite un marquage de l'analyte ou plus généralement un agent de révélation couplé à un fluorophore ; en conséquence, la fonction biologique de l'analyte peut s'en retrouver altérée, induisant des erreurs d'interprétation quant à la nature réelle des interactions entre sondes et cibles.

De plus, au cours de l'irradiation de l'échantillon lors de la phase de lecture, une destruction progressive du fluorophore dite « photoblanchiment » se produit avec pour conséquence une diminution de l'intensité du signal lu sur le support biopuce.

Enfin, le procédé de révélation par fluorescence reste une mesure « en point final ». Ainsi, pour accéder aux paramètres cinétiques des interactions sonde / cible, une autre technique de révélation « sans marqueur » en temps réel a été développée au laboratoire en partenariat avec la société Genoptics[®] (France) : l'imagerie par résonance de plasmons de surface.

2.2. La résonance de plasmons de surface (SPR)

2.2.1. Principe de la résonance de plasmons de surface

Le plasmon de surface correspond à l'oscillation d'un quantum de densité d'électrons très délocalisés à l'interface entre deux milieux, l'un étant un métal (Al, Ag, Au, Cu, ...), l'autre un diélectrique (figure 7). La résultante de ces oscillations est une onde électromagnétique évanescente se propageant à cette même interface sur une épaisseur de 100 nanomètres et latéralement sur 10 microns. Aussi, la fréquence de cette onde dépend de l'indice optique local du milieu diélectrique, c'est-à-dire de la quantité de matière présente à l'interface.

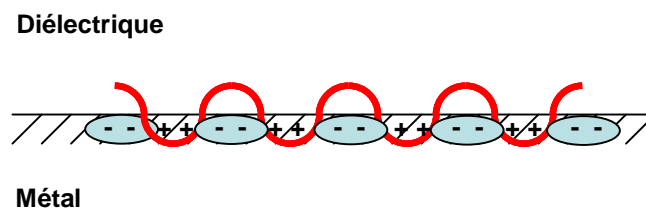


Figure 7 : Représentation schématique de l'oscillation des plasmons de surface

En pratique, lorsqu'un rayon lumineux incident traverse un milieu d'indice n_1 avec un angle θ_1 supérieur à l'angle critique θ_c , le rayon lumineux ne pénètre pas dans le milieu d'indice optique n_2 ($n_1 > n_2$) pour être totalement réfléchi dans le milieu d'indice n_1 ; c'est la réflexion totale interne ou TIR. De manière concomitante, une onde évanescente est créée et se propage à l'interface des deux milieux.

Pour un angle d'incidence θ_1 de TIR particulier et une longueur d'onde définie, l'énergie apportée par le rayon incident va créer une onde évanescente capable de résonner avec l'onde électromagnétique du plasmon de surface. En conséquence, l'absorption de cette énergie photonique va induire une diminution de l'intensité du rayon lumineux réfléchi ; cet angle est communément appelé l'« angle de résonance plasmonique » (figure 8).

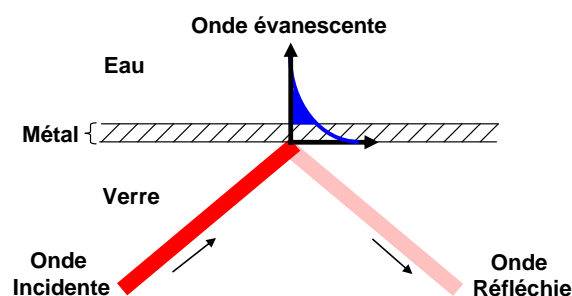


Figure 8 : Représentation schématique du phénomène de résonance de plasmon sous l'effet d'un rayon lumineux incident subissant la TIR

Lorsqu'une espèce biologique vient réagir à l'interface métal / diélectrique, l'énergie nécessaire pour exciter les plasmon de surface va aussi changer. Ainsi, pour une longueur d'onde fixe, l'angle de plasmon va évoluer. Parallèlement, pour un angle fixe, la longueur

d'onde d'excitation va aussi changer. Enfin, à angle d'incidence et longueur d'onde fixes, l'intensité lumineuse va systématiquement augmenter. Ces trois méthodes de mesures ont respectivement été exploitées par les appareils BIAcore[®] International (Suède), les spectrophotomètres en réflexion et l'imagerie SPR (figure 9).

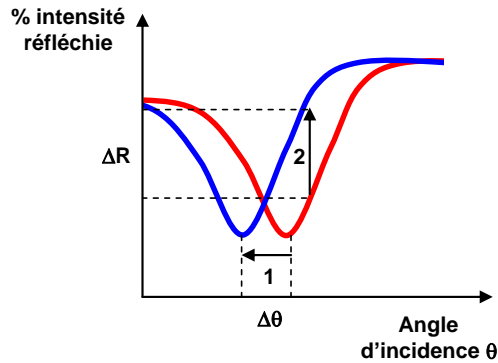


Figure 9 : Différentes méthodes exploitant l'évolution des courbes de plasmon (1 : lecture type BIAcore[®] – 2 : lecture par imagerie SPR)

2.2.2. L'imagerie SPR

A la différence des autres techniques de lecture, l'imagerie SPR offre la possibilité d'analyser un nombre de zones d'interaction relativement élevé (jusqu'à 36 zones suivant la technique d'électrospotting précédemment décrite). D'un point de vue pratique, l'appareil employé au laboratoire est constitué tel que représenté en figure 10. Une LED illumine par-dessous le prisme en verre doré support de la biopuce sous un angle fixe pour lequel se produit la résonance de plasmons de surface (SPR). Le rayon réfléchi est alors capté par une caméra CCD elle-même reliée à un ordinateur. Grâce à un logiciel commercialisé par la société Genoptics[®], Genovision, la lecture en temps réel des valeurs de réflectivité est rendue possible.

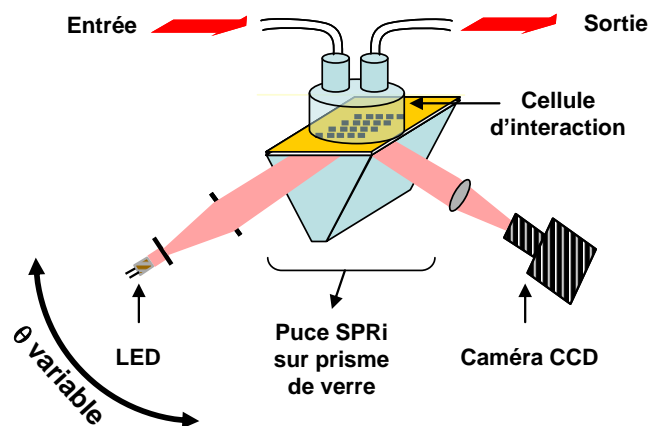


Figure 10 : Représentation schématique de l'appareil d'imagerie SPR utilisé au laboratoire

Au-dessus du prisme est disposé un appareillage microfluidique constitué d'une voie d'entrée, d'une cellule ou chambre d'interaction, et d'une voie de sortie (figure 10). En amont de la voie d'entrée se trouve un système à boucle d'injection analogue à ceux en place pour les appareils de chromatographie. Le volume de l'échantillon injectable est alors défini par le volume de la boucle installée. Enfin, toujours plus en amont, un système de dégazage du milieu de travail permet de prévenir l'apparition de bulles d'air dans l'ensemble de l'appareillage microfluidique.

Au cours de l'injection d'un échantillon contenant une cible biologique réagissant en surface, l'enregistrement de la réflectivité au cours du temps, dit « sensorgramme », permet de recueillir des données cinétiques d'association avec la sonde immobilisée sur polypyrrole. Une fois l'injection terminée, le retour dans le milieu de travail va provoquer le décrochage de la cible par rapport au support ; de même, l'enregistrement en temps réel des valeurs de réflectivité permet de décrire la cinétique de dissociation entre les deux partenaires impliqués (figure 11). Par modélisation, suivant le modèle de Langmuir, il est alors possible de retrouver les constantes d'association et de dissociation pour le couple sonde / cible et par extension la constante d'équilibre de la réaction aussi nommée constante d'affinité.

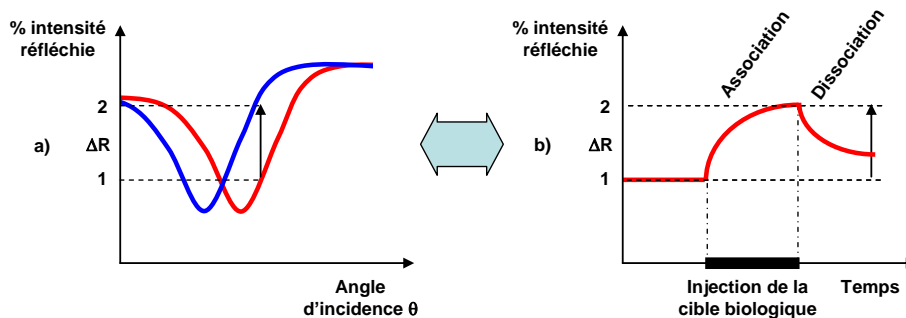


Figure 11 : a) Evolution des courbes plasmon avant (1) et après (2) une interaction biologique – b) Suivi cinétique en temps réel de la réflectivité décrivant successivement une phase d'association et une phase de dissociation

2.2.3. Applications déjà mises au point

Historiquement, des applications diverses ont déjà été développées avec succès au laboratoire. En effet, plusieurs catégories de sondes ont pu être immobilisées puis étudiées grâce à ce système : l'ADN pour la détection de mutations ponctuelles ^[4], les oligosaccharides pour

l'analyse d'interactions avec des protéines telles que l'interféron γ ^[3], les peptides pour le diagnostic sérologique dans les infections virales à l'hépatite C ^[5] et les anticorps pour l'extension de la technique d'électrospotting aux immunocapteurs ^[7, 8].

C'est précisément à partir de ce savoir-faire de production des biopuces et de leur utilisation par SPRi que viendront s'appuyer les travaux présentés ci-après dans le manuscrit.

**PARTIE I : DES PUCES POUR LE CRIBLAGE
PHARMACEUTIQUE**

Cette première partie concerne le développement d'une puce à petits ligands dans l'optique du criblage pharmaceutique haut-débit pour la recherche de nouvelles molécules à activité antibiotique. Après une présentation des différents moyens d'actions utilisés en antibiothérapie, des phénomènes de résistance associés et des stratégies de découverte de nouveaux composés, seront décrits nos travaux concernant une approche miniaturisée de recherche de ligands. A partir des résultats obtenus, les voies de recherche envisagées à plus ou moins long terme seront exposées.

I. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

1. L'antibiothérapie

L'antibiothérapie correspond à l'emploi en thérapeutique, selon un protocole bien établi, de molécules à activité antibiotique. Plus exactement, ces dernières se distinguent selon leur capacité à inhiber – agents bactériostatiques – ou tuer – agents bactéricides – des germes bactériens.

1.1. Rappels historiques

Initialement, le concept proposant qu'une molécule soit capable d'entraver la multiplication d'une bactérie a été formulé par Roberts en 1874. Dès lors, plusieurs autres grands scientifiques de l'époque ont suivi ce courant de pensée ; Tyndall en 1876, Pasteur et De Joubert en 1877 et Duchesne plus tardivement en 1897. Cependant, ce n'est que bien plus tard, en 1929, qu'Alexander Fleming trouve fortuitement les propriétés inhibitrices de la culture de certaines moisissures sur la prolifération de la souche bactérienne *Penicillium notatum*. De manière analogue, en 1929, le même type d'observation est fait entre le bacille de la diphtérie et les moisissures poussant sur les fromages. La mise en culture de ces moisissures fournit alors un milieu aux propriétés antibiotiques une fois injecté.

Plus tard, en 1935, Domagk remet à jour les propriétés antibactériennes de composés obtenus par synthèse chimique suivant les travaux d'Ehrlich datant de 1905. Lesdites molécules ont ensuite été identifiées à l'Institut Pasteur comme étant des sulfamides. Cette série de composés a alors amorcé l'obtention de produits obtenus à plus grande échelle que les milieux de culture précédemment utilisés. Enfin, l'antibiothérapie a connu un réel essor dès lors que

Dubos a mis en évidence un produit antibiotique naturellement secrété par les souches de *Bacillus brevis* : la pénicilline. Depuis, de nombreuses classes d'antibiotiques naturels, semi-synthétiques ou synthétiques ont vu le jour et sont actuellement employées en antibiothérapie. Associées à cette classification chimique, et grâce au développement des techniques d'analyse en biologie moléculaire, plusieurs cibles pharmacologiques leurs ont été attribuées.

1.2. Les cibles pharmacologiques

1.2.1. L'homéostasie des folates

L'acide folique « réduit » est un cofacteur impliqué dans plusieurs étapes de la synthèse des nucléosides triphosphates aussi bien pour les bases puriques et que les bases pyrimidiques. Sachant que celles-ci sont utilisées au cours de la réplication de l'ADN et de la transcription, une déplétion en acide folique sous sa forme réduite induit la mort cellulaire. Ainsi, deux cibles thérapeutiques ont alors été visées : d'une part, la synthèse de l'acide folique et d'autre part la dihydrofolate réductase.

La première correspond à la cible de la série des sulfamides et des sulfones telles que la dapsone (Disulfone[®]) (figure 12). Ces produits présentent des analogies structurales fortes par rapport à l'acide para-aminobenzoïque (APAB), le précurseur utilisée dans la biosynthèse bactérienne des folates. Quant à la dihydrofolate réductase bactérienne, elle est la cible de différents produits synthétiques à la structure analogue aux folates ; par exemple, le triméthoprime (Bactrim[®]) ou le méthotrexate (Methotrexate[®]) (figure 12).

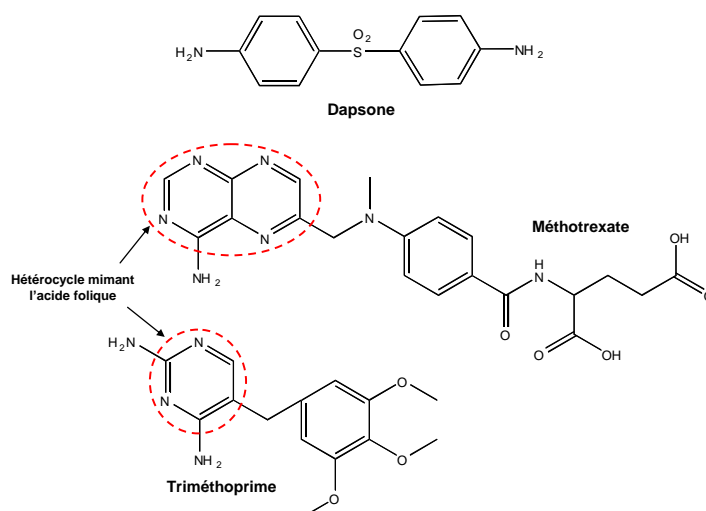


Figure 12 : Structure d'une sulfone, la dapsone (Disulfone[®]), et de deux inhibiteurs de la dihydrofolate déshydrogénase, le triméthoprime (Bactrim[®]) et le méthotrexate (Methotrexate[®])

1.2.2. L'ADN bactérien

Globalement, deux grandes classes chimiques d'antibiotiques couramment utilisées en thérapeutique ont pour cible l'ADN bactérien ; les dérivés nitrés et les dérivés de quinolones. Le principe d'action des dérivés nitrés repose sur les capacités que possèdent les bactéries sensibles à réduire la fonction « nitro » *via* leurs ferredoxines et leurs flavoprotéines intracytoplasmiques. L'analogue aminé vient alors réagir directement sur l'ADN bactérien qui va se dénaturer. Plus précisément, deux types de dérivés nitrés sont commercialisés : les nitrofuranes avec le nifuroxazide (Ercéfuryl[®]) (figure 13) et les nitroimidazoles avec le métronidazole (Flagyl[®]).

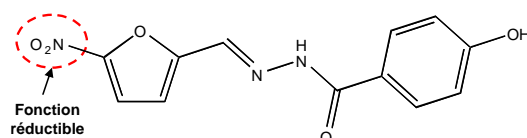


Figure 13 : Structure du nifuroxazide, un dérivé nitré de la série des nitrofuranes

Quant aux dérivés de quinolones, elles agissent sur le génome bactérien par inhibition de l'ADN topoisomérase II. Cette enzyme initialement chargée de limiter le surenroulement de l'ADN bactérien lors des processus de réplication et de transcription, intervient aussi lors de la compaction du génome. Plus précisément, alors que ladite protéine procède à la coupure simultanée des deux brins pour « surenrouler » l'ADN, les quinolones viennent bloquer l'enzyme en s'intercalant dans la double hélice en présence d'un atome de magnésium. Cette grande classe chimique est subdivisée en deux grandes familles de produits : les quinolones avec l'acide nalidixique (Negram[®]) (figure 3) et les fluoroquinolones avec la péfloxacin (Péflacine[®]) (figure 14), l'unique différence entre ces composés reposant sur l'ajout d'un atome de fluor sur l'hétérocycle.

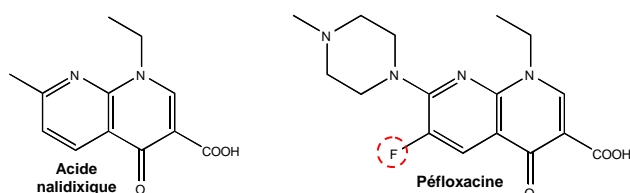


Figure 14 : Structure d'une quinolone, l'acide nalidixique (Negram[®]), et d'une fluoroquinolone, la péfloxacin (Péflacine[®])

Enfin, s'ajoute à ces deux classes de produits une phénazine, la clofazimine (Lamprene[®]), utilisée dans le traitement des infections au bacille de la lèpre.

1.2.3. L'ARN polymérase bactérienne

Le processus de transcription, c'est-à-dire la production d'ARN à partir d'une matrice d'ADN, constitue la première étape menant à l'obtention de protéines. L'enzyme chargée de remplir ce rôle, l'ARN polymérase bactérienne, est la cible d'une catégorie particulière d'antibiotique, les rifamycines. Ces antibiotiques naturels ou semi-synthétiques sont capables d'interagir avec l'ARN polymérase en bloquant la synthèse de l'ARN messager. Le plus largement employé d'entre eux est la rifampicine (figure 15) éventuellement en association avec l'isoniazide et le pyrazinamide (Rifater[®]).

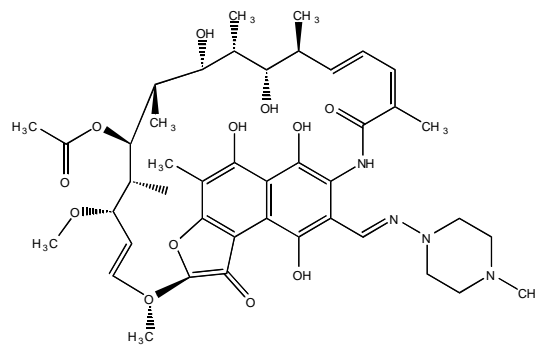


Figure 15 : Structure d'une rifamycine, la rifampicine (Rifadine[®])

1.2.4. Le ribosome

Responsable de la deuxième étape clé vers la production de protéine au sein du règne bactérien, le ribosome est aussi la cible de plusieurs agents thérapeutiques antibiotiques. Plus précisément, certains vont interagir avec la partie 50S alors que d'autres vont se lier à la partie 30S. Parmi ceux agissant sur la partie 50S, trois grandes classes de médicaments ont été découverts et commercialisés : les macrolides avec l'érythromycine (Erythrocin[®]) (figure 16), les synergistines avec la pristinaamycine (Pyostacine[®]), les lincosamides avec la clindamycine (Dalacine[®]), et les phénycolés avec le chloramphénicol (Cébénicol[®]) (figure 16). Toutes ces molécules viennent se fixer sur des sites relativement proches et empêchent l'adjonction d'un amino-acyl-ARNt à la chaîne peptidique en cours de synthèse.

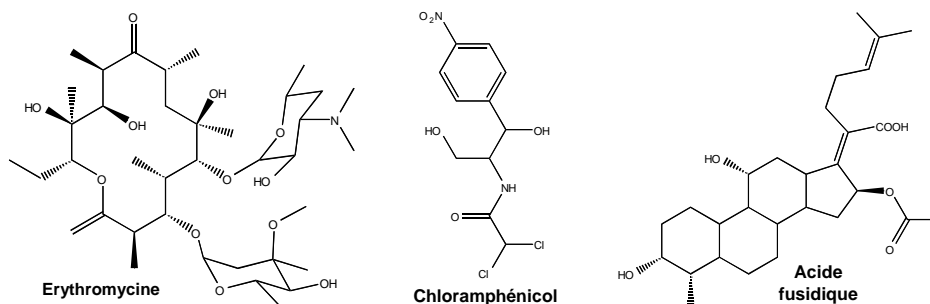


Figure 16 : Structure d'un macrolide, l'érythromycine (Erythrocin[®]), d'un phénycolé, le chloramphénicol (Cébénicol[®]) et de l'acide fusidique (Fucidine[®])

Enfin, s'ajoute à ces différents composés l'acide fusidique, à la structure stéroïdienne (figure 16) ; celui-ci a la propriété de se fixer au facteur d'élongation EF-G, lui-même nécessaire à l'activité GTPasique de la partie 50S.

Quant aux inhibiteurs de la partie 30S du ribosome, ils se répartissent suivant deux classes chimiques distinctes : les tétracyclines (figure 17) avec la doxycycline (Vibramycine[®]) et les aminosides avec la gentamicine (Gentalline[®]). Ici, la fixation de l'amino-acyl-ARNt est empêchée suite à la fixation de ces composés.

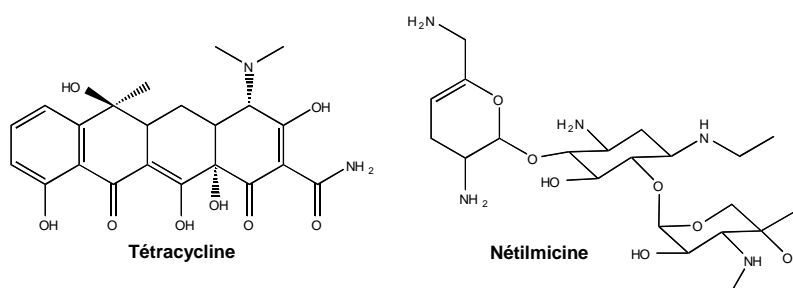


Figure 17 : Structure de la tétracycline (Tétracycline[®]) et d'un aminoside, la nétilmicine (Nétrimycine[®])

Parmi les aminosides, la mupirocine (Bactroban[®]) a pour cible pharmacologique l'isoleucyl-ARNt synthétase impliquée dans la production d'amino-acyl-ARNt substrat du ribosome.

1.2.5. La membrane plasmique

Certains antibiotiques viennent interférer avec la composition de la membrane plasmique selon deux principes. Le premier consiste en une inhibition de la synthèse de l'un de ses constituants, l'acide mycolique ; ceci est le mode d'action de l'éthambutol (Desambutol[®]). La seconde voie repose sur une simple insertion des molécules thérapeutique au sein de la membrane plasmique, causant par conséquent une déstabilisation de cette dernière et par suite à la lyse cellulaire ; ce mode d'action est rencontré chez la daptomycine, la polymyxine B et la colistine (Colimycine[®]).

1.2.6. La synthèse du peptidoglycane

Le peptidoglycane correspond à l'appellation biochimique de la paroi des bactéries. Celle-ci est synthétisée suivant trois grandes étapes ; la biosynthèse de l'UDP-acétylmuramyl-

pentapeptide intracytoplasmique, la polymérisation de ce dernier avec la *N*-acétylglucosamine au niveau membranaire et enfin la transpeptidation / transglycosylation au niveau de la paroi. Parmi les molécules agissant sur la première partie du processus, certaines vont inhiber le fonctionnement d'enzymes : la bacitracine (Bacitracine[®]) et la fosfomycine (Monuril[®]). D'autres vont par contre réagir directement sur la partie peptidique, plus précisément au niveau du dipeptide *N*-terminal D-alanyl-D-alanine : les glycopeptides avec la vancomycine (Vancomycine[®]), et la cyclosérine (retirée du marché).

L'ensemble des autres composés, les β -lactames, va interférer avec l'étape de transpeptidation ayant lieu au niveau de la partie membranaire côté extracellulaire en mimant la partie dipeptidique D-alanyl-D-alanine. Suivant leur squelette chimique, on y distingue trois grandes classes d'antibiotiques (figure 18) : les monobactames ou β -lactames monocycliques avec l'aztréonam (Azactam[®]), les pénicillines avec l'amoxicilline (Augmentin[®]), les carbapénèmes avec l'imipénème (Tienam[®]) et les céphalosporines avec la ceftriaxone (Rocéphine[®]).

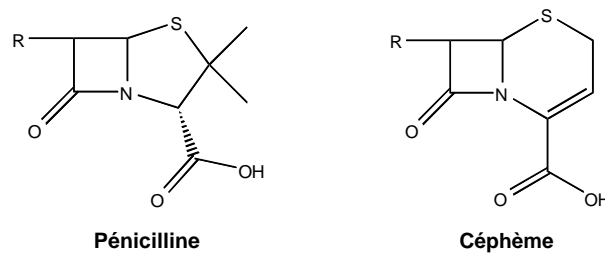


Figure 18 : Comparatif de la structure des noyaux du type « pénicilline » et du type « céphalosporine »

Enfin, pour l'isoniazide (Rimifon[®]) et le pyrazinamide (Rifater[®]), deux antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à mycobactéries, le mécanisme d'action n'est pas encore clairement élucidé. Cependant, de par leur structure, ils sont soupçonnés d'intervenir en tant qu'analogue de l'acide nicotinique.

1.3. Les problèmes de résistances

Face à cet arsenal thérapeutique, les bactéries ont développé différentes stratégies de défense pour se prémunir des effets létaux de ces molécules. Ces mécanismes peuvent être qualifiés de « naturels », c'est-à-dire rencontrés chez toutes les souches bactériennes d'une même espèce, ou d'« acquis », c'est-à-dire uniquement en place chez certaines souches d'une même espèce. Plus précisément, dans le cas d'une résistance naturelle, le support de l'information génétique codant pour ces protéines de résistance aux antibiotiques est systématiquement l'ADN chromosomique ; ici, la transmission se fait de manière verticale. *A contrario*, pour les

résistances acquises, plusieurs supports génétiques sont utilisés : l'ADN chromosomique après recombinaison, un plasmide après conjugaison, l'ADN viral après transduction par un bactériophage. Lorsque la résistance est acquise, la transmission peut se faire verticalement mais aussi horizontalement.

1.3.1. Les différents mécanismes

Comme indiqué ci-dessus, les bactéries ont mis en place plusieurs mécanismes permettant leur survie en présence d'antibiotique dans le milieu où elles évoluent. Elles peuvent consister à inactiver la molécule après modification de cette dernière au moyen d'une enzyme ; à titre d'exemples, la rifampicine subit une ADN-ribosylation, le chloramphénicol reçoit un groupement acétyle, les aminosides sont pris en charge par des acétylases et des phosphorylases, et les β -lactamines sont dégradées par les β -lactamases.

Une autre manière qu'ont employée les bactéries pour détourner l'activité d'un antibiotique est de modifier la structure de la cible protéique par mutation ; ceci est le cas des quinolones avec la topoisomérase, des macrolides avec la partie 50S du ribosome et des aminosides avec la partie 30S du ribosome. De manière analogue, une résistance à la vancomycine est possible par substitution de la D-alanine terminale par l'acide D-lactique.

Enfin, une dernière stratégie découverte consiste à limiter la concentration intracytoplasmique en agent thérapeutique. Pour se faire, les bactéries peuvent opter pour deux solutions. L'une revient à bloquer la voie d'entrée par diminution de l'expression des transporteurs membranaires appelés « porines » suite à une mutation sur la partie promotrice du gène codant pour ces protéines ; ceci a été rencontré pour les nitroimidazoles, l'isoniazide, les aminosides et les macrolides en utilisation prolongée. L'autre procédé permet de refouler activement l'antibiotique par un système de pompes membranaires, ce qui correspond à l'un des mécanismes employé envers les quinolones et les tétracyclines.

1.3.2. Conséquences cliniques

Chez certains germes tels que les entérobactéries, les pneumocoques, les staphylocoques, la transmission acquise de phénotypes résistants a abouti à des germes insensibles à plusieurs classes thérapeutiques. Ce phénomène de résistances multiples (« Multi-Drug Resistance ») limite par conséquent le nombre de molécules efficaces vis-à-vis de ces germes. Selon une étude menée par l'Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux

Antibiotiques (ONERBA) ^[10, 11], les dix souches présentant les plus résistantes sont regroupées dans le tableau 1.

Appellation	Profil de résistance
SAMR	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant aux β -lactamines
PSDP / PRDP	<i>Streptococcus pneumoniae</i> de sensibilité réduite ou résistant aux β -lactamines
VRE	<i>Enterococcus faecalis</i> résistant à la vancomycine et à la téicoplanine
BLSE	Bacilles à Gram négatif produisant des β -lactamases actives sur les céphalosporines de 3 ^e génération
MDR-TB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> résistant à l'isoniazide et à la rifampicine
	<i>Acinetobacter baumannii</i> résistant à l'imipénème
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> résistant à tous les antibiotiques sauf la colimycine
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> produisant des β -lactamase actives sur la ciprofloxacine
GISA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant aux glycopeptides
	<i>Salmonella enterica</i> souche DT104 multirésistante

Tableau 1 : Classification des dix germes pathogènes les plus résistants selon l'ONERBA ^[10]

Devant l'apparition de résistances multiples, le corps médical préconise l'association de plusieurs antibiotiques durant le traitement, limitant de ce fait les risques de rechute et l'apparition de nouvelles résistances ^[12]. D'autre part, pour les pénicillines, leur association à des inhibiteurs des β -lactamases tels que l'acide clavulanique (Augmentin[®]) a permis de renforcer le pouvoir antibiotique des produits déjà disponibles. En effet, la recherche de nouveaux composés depuis ces vingt dernières années n'a abouti à la mise sur le marché que de très peu de molécules. Par ailleurs, actuellement, un nombre restreint de nouvelles molécules sont en cours de validation ^[13, 14] (tableau 2) où seul le linézolide ^[15], une oxazolidone active sur la partie 50S du ribosome, constitue une réelle classe thérapeutique originale.

Série chimique	Dénomination
Fluoroquinolone	Trovafloxacine ^[16]
	Gatifloxacine ^[17-19]
	Moxifloxacine ^[20, 21]
Glycopeptide	Dalbavancine ^[22]
	Oritavancine ^[23]
Macrolide	Isépamicine ^[24, 25]
Synergistine	Quinupristine-dalfopristine ^[26]
Oxazolidone	Linézolide ^[15, 27] *

Tableau 2 : Molécules actuellement en phase de développement pour l'antibiothérapie ^[13] (molécule commercialisée aux Etats-Unis)

Devant ce problème majeur de santé publique, les compagnies pharmaceutiques ainsi que les laboratoires académiques s'orientent vers la découverte de nouvelles séries chimiques dotées d'activités antibiotiques ^[28]. Depuis ces vingt dernières années, le criblage pharmaceutique

reposant sur le test de milliers de molécules candidates s'associe bien aux nouvelles méthodes de synthèse combinatoire permettant d'accéder à une grande variété de composés.

2. A la découverte de nouvelles molécules antibiotiques

Pour trouver de nouvelles molécules à visée antibiotique, l'industrie pharmaceutique et les laboratoires académiques proposent deux stratégies bien distinctes. La première des deux exploite les propriétés naturelles de composés produits par des bactéries ou champignons. Ceci est par exemple le cas de la plastinomycine découverte par le groupe Merck® chez un champignon sévissant en Afrique du Sud [29, 30]. Pour autant, cette stratégie est souvent limitée car ce type de molécules présente des structures souvent extrêmement complexes, rendant ainsi leur synthèse totale impossible par les opérations de chimie organique [31].

La deuxième voie employée en recherche pharmaceutique revient à produire des composés synthétiques « non naturels ». Ainsi, l'approche de synthèse chimique employée par les industriels pharmaceutiques jusqu'à la fin des années 1980 a consisté à produire successivement une par une de nouvelles molécules. Cependant, ce principe nécessite un temps de développement assez long par molécule, pour qui la probabilité d'être réellement active est très faible. Pour raccourcir ces délais de synthèse, une nouvelle stratégie chimique est née au cours des années 1990 : la chimie combinatoire.

2.1. La chimie combinatoire

La chimie combinatoire repose sur un principe relativement simple ; en lieu et place de la chimie classique où un composé A va réagir avec un composé B pour produire un produit unique AB, la chimie combinatoire fait intervenir n composés A allant réagir avec n composés B pour générer n^2 produits notés de A_1B_1 à A_nB_n . Par suite, si l'on ajoute une deuxième étape de synthèse faisant intervenir n composés C, on peut obtenir n^3 produits, soit 1 000 composés lorsque $n = 10$. Pour mettre en place ce concept chimique, deux grandes voies de synthèse ont été développées : la synthèse en mélange et la synthèse en parallèle. Initialement, les opérations de synthèse ont été développées en solution. Puis, la chimie sur support en résine l'a supplantée car elle permet de meilleurs rendements *via* l'emploi d'excès en composé B par rapport au composé A et des étapes de purification simplifiées.

2.1.1. Synthèse en mélange

Ici, l'ensemble des réactifs A et B sont mélangés dans un seul flacon pour donner naissance aux n^2 combinaisons structurales possibles. Cette technique est la mieux adaptée pour accéder rapidement à une grande variété de structures chimiques ; elle est principalement employée au stade du criblage « primaire » pour la recherche de nouvelles molécules originales ou « lead ». Dérivée de cette approche, une stratégie de synthèse nommée « partage-mélange » effectuée sur support bille a été développée pour limiter la compétition entre réactifs. Le principe consiste à diviser le lot de résine en autant de portions qu'il y a de réactifs A. Après réaction de ces derniers sur le support, l'ensemble des lots est mélangé puis de nouveau redivisé en autant de portions qu'il y a de réactifs B. De la sorte, chaque bille comporte un seul type de composé.

Pour les tests biologiques, le mélange de molécules, éventuellement encore attachées au support, est mis en présence de la cible pharmacologique à cribler. S'il s'avère que ce mélange possède l'activité biologique escomptée, des méthodes permettant d'identifier le ou les produits actifs doivent être utilisées. Parmi elles, la méthode de « déconvolution » par sous-bibliothèque est schématisée en figure 19. D'autres techniques existent cependant comme le « criblage positionnel », ou le cas des bibliothèques « orthogonales ».

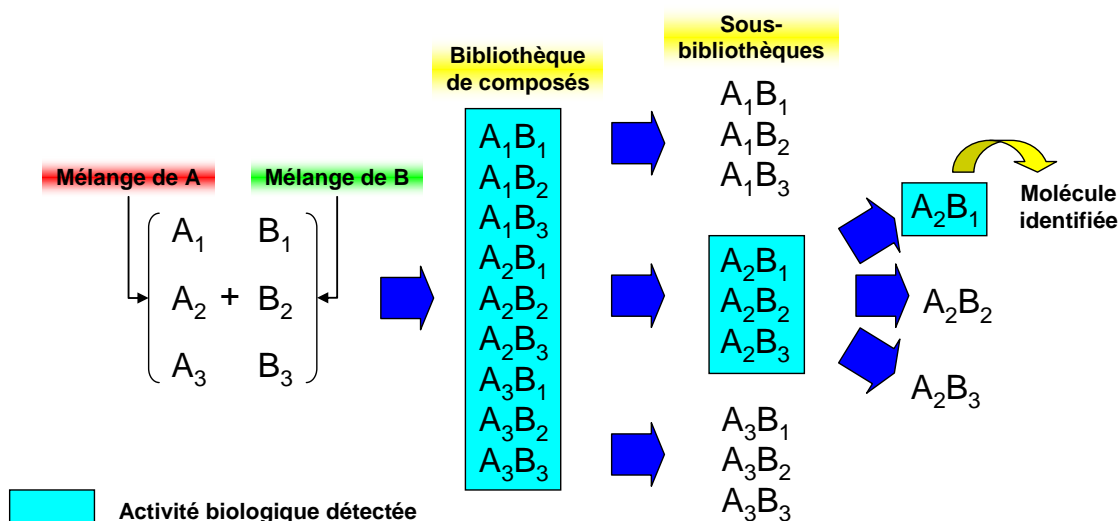


Figure 19 : Schéma de principe de la synthèse en mélange suivie de la méthode de déconvolution par sous-ensembles

2.1.2. Synthèse en parallèle

La mise en place de ces méthodes nécessitant des resynthèses nombreuses avant l'identification finale, un autre concept de la chimie combinatoire a vu le jour : la synthèse en parallèle.

Contrairement à la synthèse en mélange, ici, au final, les composés sont obtenus individuellement dans chaque flacon. Deux variantes à ce concept existent ; soit les produits sont synthétisés individuellement avec autant de réacteurs que de composés finaux (n^x flacons pour x étapes à n composés en solution), soit ils sont synthétisés en présence d'un seul type de composé par réacteur (x^n flacons pour x étapes à n composés sur support, « sort & combine ») (figure 20). Ainsi, contrairement à la synthèse en mélange, la synthèse en parallèle nécessite beaucoup de moyens techniques incluant un nombre de réacteurs élevé, d'où la nécessité d'automatiser ces opérations pour gagner du temps. Ces limitations techniques font que ce principe n'est utilisable que dans le criblage « secondaire » où les bibliothèques de molécules sont réduites (moins de 1 000 composés). Enfin, pour la stratégie « sort & combine », un « étiquetage » individuel du support est nécessaire pour le triage ; des systèmes à radiofréquence et des codes couleurs ont alors été instaurés.

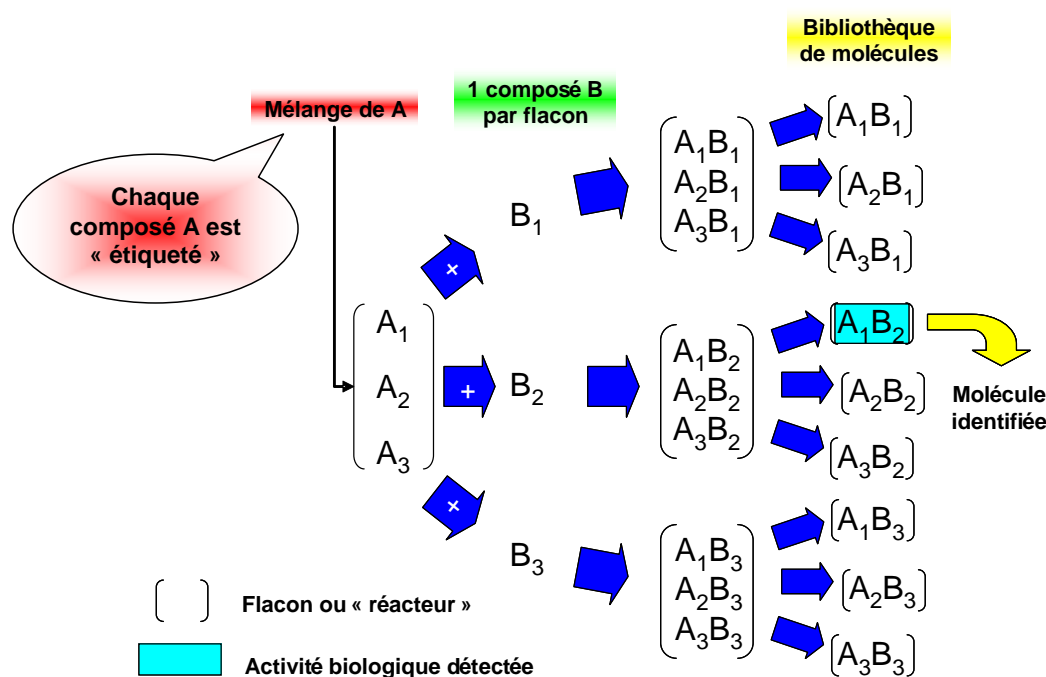


Figure 20 : Schéma de principe des opérations selon le procédé « sort & combine » ; aucune déconvolution n'est nécessaire pour la synthèse en parallèle

De manière générale, la chimie combinatoire permet donc d'accéder à une variété de structures chimiques très importantes en relativement peu de temps. Cependant, à la différence de la chimie « classique », les quantités produites sont petites, de l'ordre du

milligramme. En conséquence, les essais de criblage biologique *in vitro* doivent subir parallèlement une miniaturisation.

2.2. Les tests *in vitro*

Dans le cadre de la recherche de nouveaux antibiotiques, plusieurs techniques peuvent être employées selon qu'il s'agit d'établir un criblage « général » ou un criblage « spécifique ». Pour le premier, les procédés de mise en culture sont les plus adaptés alors que pour le second, des tests directs avec la cible pharmacologique sont à envisager.

2.2.1. Tests par mise en culture

Selon l'OMS, la technique de référence pour qualifier le spectre antibiotique d'une molécule est celle de la dilution en milieu liquide ^[32]. Plus précisément, elle permet de définir quels germes sont sensibles à la molécule suivant la concentration minimale inhibitrice (CMI) en produit nécessaire à la croissance des colonies, mais aussi à la classification en tant qu'agent bactériostatique ou bactéricide. Une miniaturisation de cette méthode a été mise au point sur dispositif type microplaque ^[33]. Des automates basés sur les cultures en milieux liquides ont par ailleurs été développés pour effectuer ces analyses en continu tel que l'automate Bactec[®] MGIT 960 (Becton Dickinson).

Une variante de cette méthode consiste à introduire des bactéries dans un milieu solide contenant une concentration donnée en molécule à tester. Après incubation, la présence macroscopique de colonies bactériennes au point d'inoculation détermine la sensibilité de germe. Grâce à un système semi-automatique, jusqu'à 20 germes différents peuvent être testés par boîte de Pétri.

Une seconde technique bien connue consiste en l'emploi sur des milieux gélosés, de disques de cellulose imprégnés de la molécule ; cette dernière diffuse selon un gradient de concentration dans le milieu de culture pré-ensemencé. Après incubation, la mesure du diamètre de la zone où aucune colonie bactérienne ne s'est développée permet de définir une CMI pour l'antibiotique testé selon une droite de concordance.

De même, une variante de cette technique nommée « E-test » est apparue plus récemment et est commercialisée par AB Biotech[®] ; elle consiste à remplacer le disque de cellulose par une bandelette pré-imprégnée selon un gradient interne en antibiotique. Grâce à une échelle imprimée sur le dispositif, une lecture rapide de la CMI est possible ^[34, 35].

Enfin, d'autres systèmes originaux de détection en milieu liquide sont commercialisés ; par exemple, la société BioPharm[®] (Canada) utilise un procédé de détection par impédance. Toutefois, ces technologies ne permettent pas actuellement le test de milliers de molécules en parallèle. Or, pour le criblage haut débit de composés antibiotiques, ceci est un inconvénient majeur.

En conclusion, le criblage de molécules selon toutes ces méthodes est relativement lent puisque ces dernières nécessitent généralement un temps d'incubation minimal de 24 heures. Aussi, les quantités d'antibiotiques nécessaires pour imprégner ces dispositifs ne sont pas compatibles avec la chimie combinatoire lors du criblage « primaire ». D'autres techniques biochimiques plus facilement miniaturisables sont donc envisagées par les industriels.

2.2.2. Tests moléculaires

Ces méthodes biochimiques permettent de cribler directement des cibles pharmacologiques prédéfinies ; ces essais peuvent se faire en format liquide microplaque^[36]. Par exemple, il est possible de réaliser un modèle de transcription *in vitro* et de vérifier si la molécule à cribler va interférer avec la production d'ARN_m après analyse par électrophorèse sur gel^[37, 38]. Cependant, limitées par le format microplaque, ces techniques n'offrent pas la possibilité d'analyser simultanément à grande échelle l'activité de milliers de composés et nécessite un système modèle biochimique approprié type de processus criblé (réplication, transcription, traduction, etc...).

Dans ce contexte, une solution consiste à miniaturiser davantage les essais biologiques en produisant des supports capables d'accueillir simultanément plusieurs centaines de composés à leur surface ; ce sont les biopuces. En effet, selon un procédé par simple dépôt sur lame de verre de gouttes de 1,6 nL renfermant les molécules chimiques issus de la chimie combinatoire, Gosalia et al^[39] ont pu découvrir un nouvel inhibiteur des caspases après aérosolisation de l'enzyme sur la lame de verre. Cependant, un tel procédé « en solution » nécessite la présence d'agents anti-desséchant tels le glycérol ou le DMSO en quantités non négligeables, ce qui limite son extension à d'autres cibles biologiques. Une alternative à ce problème a été proposée par d'autres équipes ayant été amenées à développer des procédés physico-chimiques autorisant l'immobilisation des molécules à la surface du matériau support.

3. Les puces à « petits ligands »

Par définition, les « petits ligands » correspondent à des composés organiques de faible poids moléculaire. Selon la littérature, certains auteurs regroupent dans cette catégorie de sondes, les oligonucléotides, les peptides, les sucres simples et plus généralement les produits chimiques issus de la chimie combinatoire ^[40]. Décrites pour la première fois en 1984 par Geysen et al ^[41], les supports à « petits ligands », au départ sous forme discrète (billes) ont connu, dès lors, un fort développement.

3.1. Les chimies de greffage existantes

Différentes stratégies de fabrication ont été mises au point au cours des vingt dernières années. Classiquement, on distingue deux grandes méthodes de production de ces supports. La première consiste à produire la sonde directement sur le support alors que la seconde nécessite la synthèse totale de la sonde en solution avant son immobilisation en surface.

3.1.1. Synthèse *in situ*

Dans ce type de synthèse, les sondes sont synthétisées directement sur support. Une première stratégie de synthèse *in situ* nommée SPOT[®] a été développée par Frank et al en 1992 ^[42] puis adoptée par l'équipe de Granier et al pour des sondes de nature peptidique ^[43, 44]. Brièvement, un automate adresse spatialement un mélange réactionnel permettant le couplage de l'acide aminé protégé (Fmoc) avec le support membrane en polypropylène aminé. Après réaction et lavage de la puce, une nouvelle solution est adressée afin que la fonction aminée terminale soit déprotégée et puisse accueillir un nouvel acide aminé. Cette technique présente cependant l'inconvénient de générer des contaminations entre zones de dépôt adjacentes ce qui limite par conséquent l'évolution d'une telle approche vers une densification des zones par unité de surface (25 zones.cm⁻¹). Actuellement, cette technologie est commercialisée avec une station robotisée Auto-Spot ASP222.

Une seconde stratégie de synthèse *in situ* de sondes peptidiques a été développée par Fodor et al en 1991 ^[45]. A la différence de la technologie proposée par Frank et al, ici, l'étape de déprotection fait appel à une réaction photochimique grâce à un groupement protecteur photoclivable, 6-nitroveratryloxycarbonyl (NVOC) (figure 21). Cette méthode de production

de biopuces a ensuite été adaptée à la synthèse d'oligonucléotides par Pease et al ^[46]. Enfin, suivant les travaux de McGall et al, ce principe a été associé à l'utilisation de masques photolithographiés ce qui a permis de procéder à un adressage spatial très fin de l'étape de déprotection ^[47]. Grâce à cette amélioration technologique, la densité des biopuces ainsi obtenues est bien supérieure au procédé SPOT[®]. Actuellement, ce procédé correspond à la méthode de production des puces à ADN commercialisées par la société Affymetrix[®], leader du marché mondial.

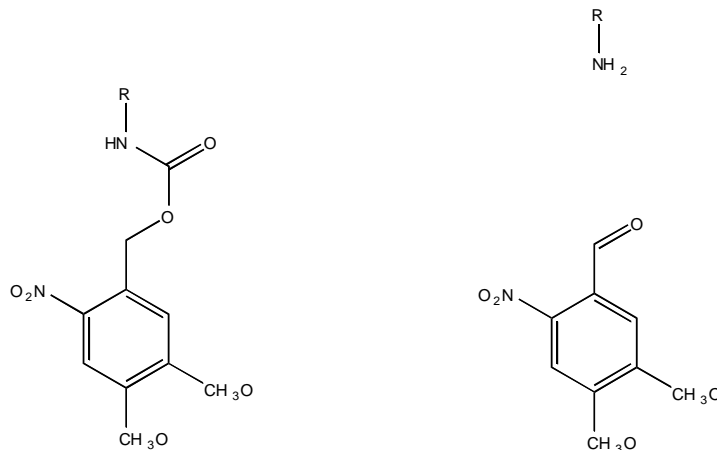


Figure 21 : Déprotection photochimique impliquant un groupement NVOC ^[47]

Toujours suivant le même principe, le groupement chimique photolabile MeNPOC a été utilisé par Kodadek et al (figure 22) pour déprotéger l'acide glycolique dans le cadre de la synthèse de peptoides ^[48].

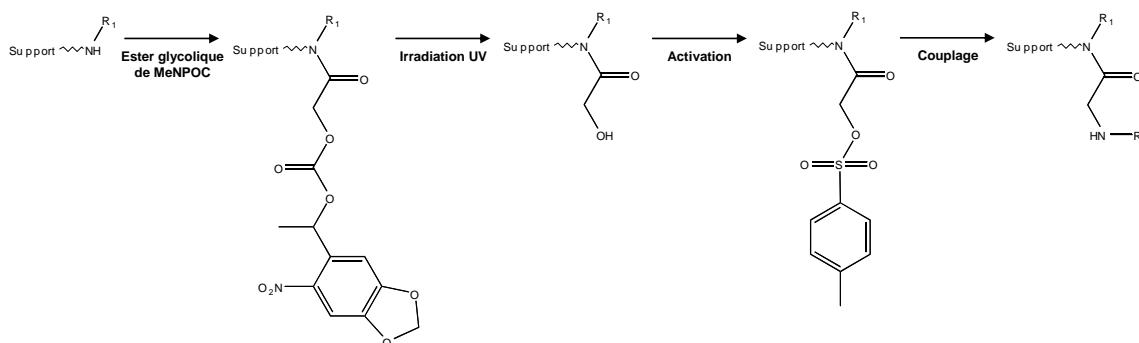


Figure 22 : Déprotection photochimique impliquant un groupement MeNPOC ^[48]

En plus des méthodes précitées, une stratégie de déprotection photochimique originale a été mise au point par l'équipe de Pellois et al ^[49, 50] ; sous illumination, l'acide est libéré dans le milieu liquide ce qui induit la déprotection de groupes fonctionnels classiquement utilisés en synthèse automatisée – Boc pour les peptides, DMT pour les oligonucléotides –.

Alors qu'elle convient parfaitement à la production de biopuces à ADN ou à peptide, c'est-à-dire des oligomères, l'approche de synthèse *in situ* présente cependant une limite gênante pour l'obtention de puces à petits ligands aux structures chimiques très variables telles que celles obtenues par chimie combinatoire. En effet, seule la technique SPOT[®] a été appliquée à la production de dérivés 1,3,5-triazines^[51] ; la pureté des produits synthétisés en surface n'est cependant pas suffisante et nécessite par conséquent une identification ultérieure par spectrométrie de masse après clivage du support. Ainsi, pour ces raisons de faible adaptabilité, une autre voie de production a été développée en parallèle : l'immobilisation après synthèse et purification des sondes.

3.1.2. Adressage non covalent

Deux principes pour l'immobilisation de sondes coexistent ; l'une fait appel à une adsorption physique de la sonde alors que la seconde repose sur une interaction spécifique avec le support. Le premier principe correspond à la méthode la plus facile à mettre en œuvre. Plus précisément, elle a été largement développée pour des méthodes faisant référence en biologie moléculaire : l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay) et le Western Blot. Habituellement, le support employé est en polystyrène ou en nitrocellulose. Plus récemment, à partir de ces supports, d'autres substrats ont été développés tels que le dextran sur nitrocellulose^[52], des lames de verre aminées cationiques^[53] ou encore des lames de verre dorées fonctionnalisées par une monocouche auto-assemblée de γ -aminopropylsilane^[54]. Cependant, hormis la technique de piégeage dans une matrice de polymère type poly-(D)-(L)-lactide/glycolide (PLGA) développée par Bailey et al^[55], ces procédés par physisorption ne sont « compatibles » qu'avec des sondes de grande taille, c'est-à-dire des protéines – anticorps, protéines membranaires, des sucres complexes –.

Ainsi, pour étendre les capacités d'immobilisation non covalente aux sondes « petits ligands », plusieurs équipes ont fait appel à un système d'interaction spécifique entre le support et la sonde. Concrètement, les sondes préalablement couplées à un marqueur de type biotine^[56] ou un « tag » polyhistidine^[57], vont reconnaître respectivement un support fonctionnalisé à la streptavidine ou une surface chélatant l'atome de nickel. Cette stratégie d'immobilisation a été employée avec succès pour des puces à protéines, mais aussi à peptides. A partir de ce principe, l'équipe de Schultz et al a synthétisé une librairie de petites sondes chimiques où chaque composé est couplé à une séquence spécifique de PNA (Peptido-

Nucleic Acid) munie d'un fluorophore ^[58]. Ces sondes « encodées » sont d'abord incubées en solution en présence de la cible biologique. Puis, après avoir éliminé celles n'ayant pas réagi, le mélange est déposé sur une puce à ADN où le décodage de la séquence de PNA associée à la sonde permet une identification des composés actifs. Bien que séduisante, cette technique nécessite cependant une fonction chimique permettant le couplage entre la sonde et la séquence de PNA.

Plus généralement, ce type d'adressage non covalent mais spécifique offre une compatibilité plus étendue vis-à-vis des sondes « petits ligands ». Cependant, les conditions d'utilisation restent limitées aux milieux non dénaturants – streptavidine / biotine -, ou à des sondes présentant des groupements chimiques particuliers. Ainsi, afin d'obtenir des puces plus robustes et mieux adaptées à l'immobilisation de « petits ligands », l'adressage covalent des sondes a été développé.

3.1.3. Adressage covalent par chimie « classique »

Selon cette voie de greffage des sondes, une pré-fonctionnalisation du support est nécessaire afin de rendre celui-ci réactif vis-à-vis d'un ou de plusieurs groupements chimiques portés par la sonde. De nombreuses chimies de surface ont été mises au point pour l'immobilisation de peptides (figure 23), à l'image des supports en verre commerciaux déjà fonctionnalisés par des terminaisons aldéhydiques. En effet, les amines primaires des protéines et des peptides peuvent alors se condenser pour former une base de Schiff ^[59]. D'autres matériaux support ont aussi été adaptés à cette approche de greffage ; en employant le 3-glycidopropyltriméthylsiloxane (GTPS), Zhu et al ont activé le polydiméthylsiloxane (PDMS) afin de rendre le matériau réactif vis-à-vis des amines primaires de peptides ou de protéines ^[60]. De la même façon, ces dernières fonctions chimiques peuvent se coupler à un support en aminopropyltriméthylsiloxane (APTS) initialement activé par un ester du *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ^[61] ou à un dendrimère porteur de fonctions isocyanates ^[61]. Autre que la fonction amine primaire, la fonction thiol peut aussi servir de point d'ancrage grâce à la chimie du maléimide ^[62]. Alternativement, suivant cette chimie, soit la sonde est porteuse de thiols, soit le support en verre est lui-même thiolé. En conclusion, la chimie de couplage des amines primaires et des thiols employée dans ces procédés est néanmoins peu régiosélective et peut avoir des conséquences néfastes sur l'activité de la sonde vis-à-vis de son partenaire biologique.

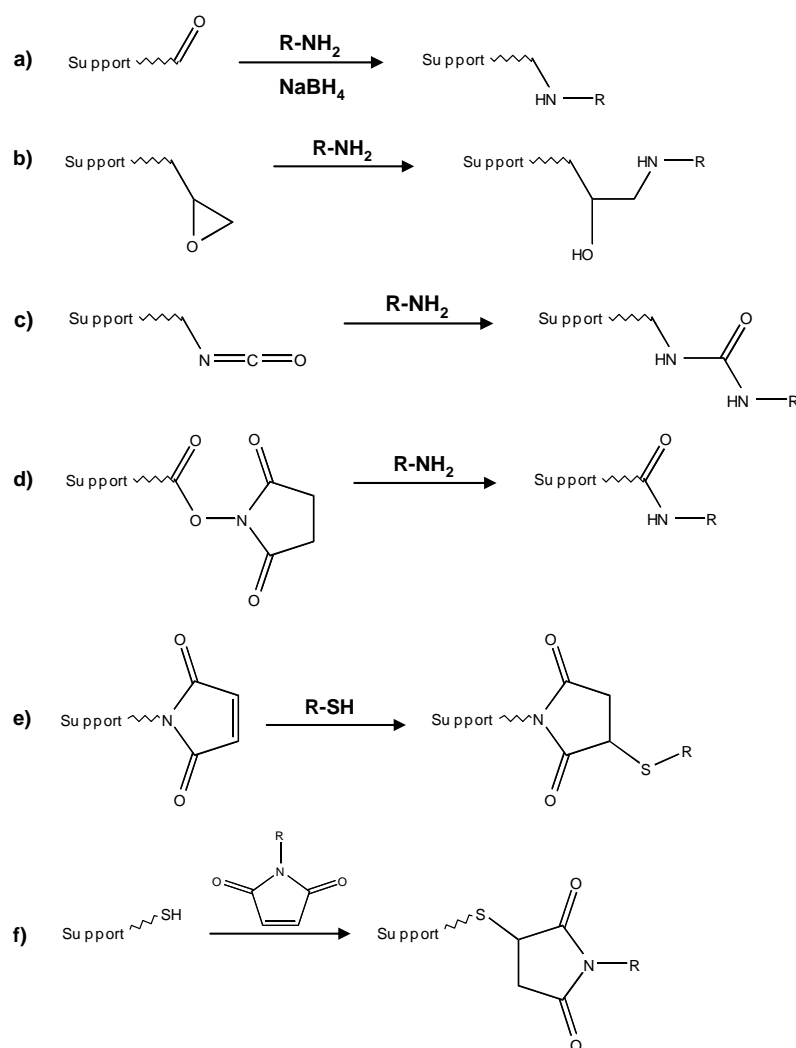


Figure 23 : Différentes chimies de greffage covalentes « non régio-sélectives » développées pour les peptides et les protéines – a) par aldéhyde ^[59] – b) par GTPS ^[60] – c) par isocyanate ^[61] – d) *N*-hydroxysuccinimide ^[61] – e) par maléimide ^[62] – f) par thiol

C'est pourquoi d'autres procédés plus récents font appel à des chimies de greffage impliquant des groupements plus spécifiques (figure 24). Carlson et al ont en effet mis au point une chimie de greffage sur verre faisant intervenir des terminaisons de type glyoxylyle ^[63]. Celles-ci peuvent en effet réagir uniquement avec les cystéines positionnées en *N*-terminal de peptides pour former un hétérocycle type thiazolidine. Aussi, selon les travaux menés par Lesaichere et al, les cystéines *N*-terminales de peptides peuvent aussi former un lien covalent de type amide par condensation avec des fonctions thioesters créées sur support en verre ^[56]. Enfin, une dernière voie chimique pour l'immobilisation de peptides a été référencée par Houseman et al où une quinone obtenue après oxydation d'une hydroquinone subit une réaction de Diels-Alders avec une fonction cyclopentadiène préalablement introduite sur la

fonction thiol d'une cystéine en position *N*-terminale ^[64]. Grâce au même procédé, l'équipe de Mrksich et al a pu immobiliser des oligosaccharides ^[65].

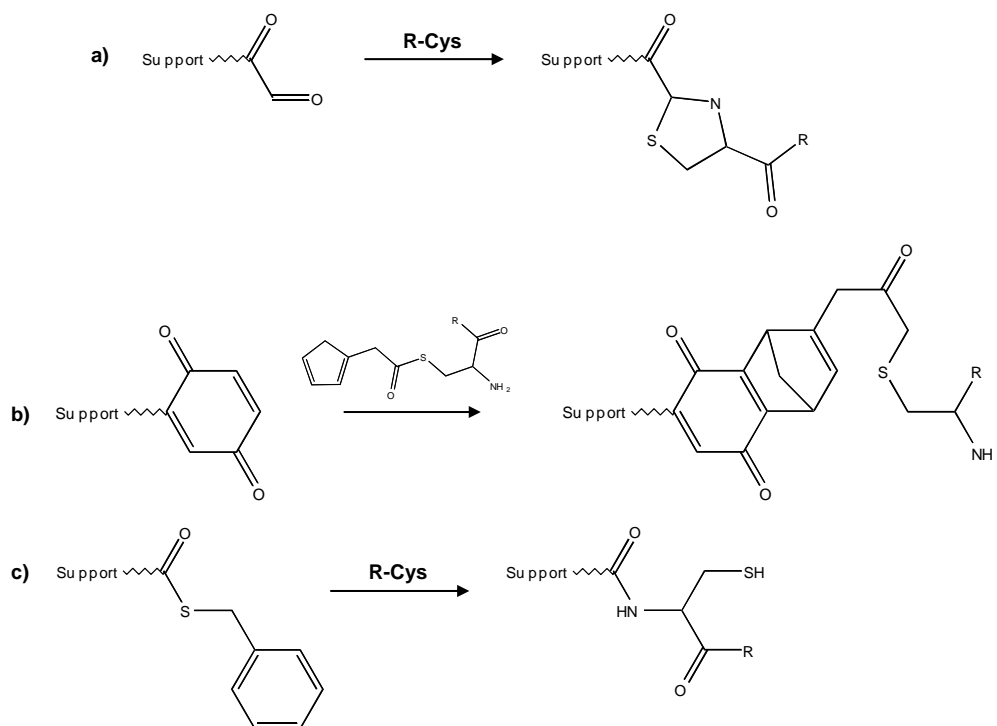


Figure 24 : Différentes chimies de greffage covalentes « régiosélectives » développées pour les peptides et les protéines – a) par aldéhyde glycolique ^[63] – b) par quinone ^[64, 65] – c) par thioester de benzyle ^[56]

De toutes ces chimies de fonctionnalisation, certaines ont été reprises et appliquées à la production de puces à « petits ligands » issus de chimiothèques pourvu que lesdits composés soient porteurs de la fonction adéquate. En effet, depuis 1999 et les travaux de McBeath sur les premières réelles « puces à chimiothèques » ^[62], des procédés de greffage adaptés à l'immobilisation de ce type de sonde ont été mis au point (figure 25). Etant donnée la grande variété des sondes produites par synthèse combinatoire, il s'agit de fonctionnaliser le support par une terminaison chimique capable de réagir spécifiquement avec un groupement commun installé sur l'ensemble des composés de la chimiothèque. Par exemple, Köhn et al ont développé une chimie basée sur le diphenylphosphane ; le support en verre pré-fonctionnalisé s'engage avec le groupe azide porté par la sonde suivant une réaction de Staudinger ^[66]. L'équipe de Schreiber et al a elle aussi mis au point plusieurs procédés de fonctionnalisation de surface du verre adaptés aux petits ligands chimiques ; le diazobenzylidène pour les molécules porteuses d'une fonction phénol ou acide carboxylique ou sulfonamide ^[67], le maléimide pour les molécules porteuses d'une fonction thiol, le chlorosilane pour les molécules porteuses d'une fonction alcool ^[68]. Par ailleurs, une éventuelle adaptation des méthodes citées précédemment pour les séries peptidiques a été nécessaire ; en effet, les

fonctions glyoxylyles ont été utilisées pour immobiliser une série de petits composés chimiques porteurs d'une fonction oxamine ^[69].

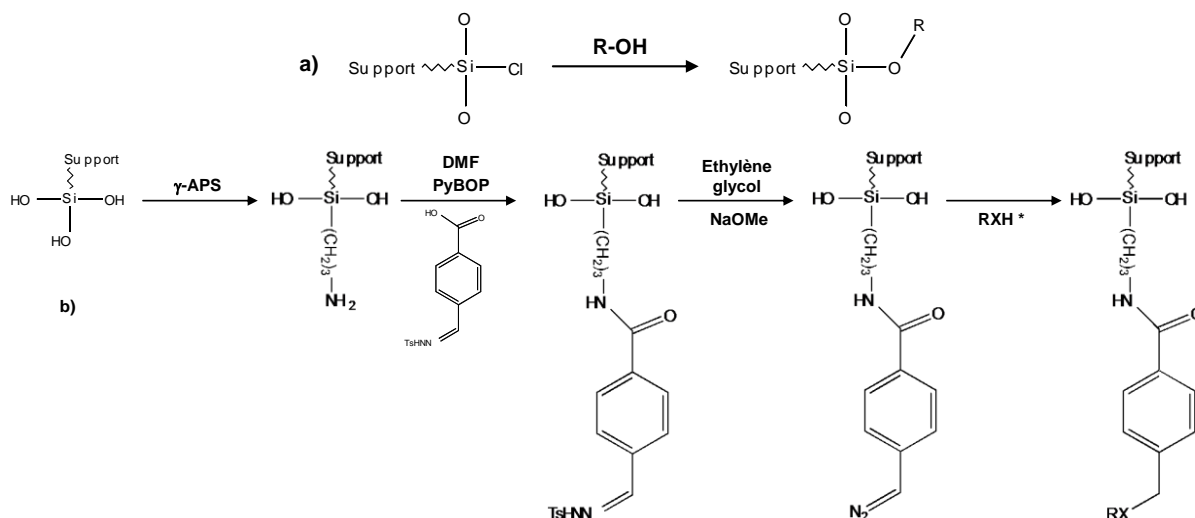


Figure 25 : Différentes chimies de greffage covalentes « régiosélectives » développées pour les puces à petits composés organiques – a) par chlorosilane ^[68] – b) par diazobenzilidène (* XH : ArOH, COOH ou SO₂NH₂ – NNHTs : 4-sulfonyltoluènehydrazone) ^[67]

3.1.4. Adressage covalent par photochimie

A la différence du procédé décrit pour la synthèse *in situ*, ici, une seule étape photochimique entre dans le processus de fabrication des puces. Suivant les travaux de Kanoh et al schématisés en figure 26 ^[70], le support en verre est d'abord modifié de telle sorte à accueillir un groupement chimique photoactivable, le 4-[(3-trifluorométhyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoyle. Les petits composés en solution sont adressés spatialement par un robot. Enfin, sous irradiation ultraviolette, les groupements photoactifs réagissent avec tout atome porteur de proton situé à proximité. Cette fixation non-sélective des sondes permet de s'affranchir de la compatibilité fonctionnelle ligand / support, et place donc cette technique comme la plus simple à mettre en œuvre pour des produits naturels complexes ^[70]. Enfin, Mrksich et al ont adapté leur procédé de couplage quinone / cyclopentadiène par libération de l'hydroquinone protégée par un groupement NVOC ^[71].

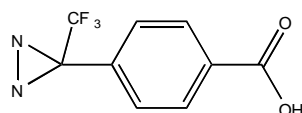


Figure 26 : Groupement photoactivable de type diazirine ^[70]

A chacune de ces stratégies chimiques correspond un type de matériau support, lui-même intervenant dans le choix du mode de transduction du signal. Pour les puces à « petits ligands » organiques, deux types de méthodes de lecture des puces ont été employées : la microscopie de fluorescence pour son écrasante majorité et la résonance de plasmons de surface.

3.2. Les systèmes de détection

3.2.1. La microscopie de fluorescence

Le procédé fait appel à un marquage de la protéine cible pharmacologique par un agent fluorescent tel que le Cy-3, le Cy-5 ou le FITC (figure 27) [72]. Barnes-Seeman et al ont ainsi pu isoler à partir des 6336 composés immobilisés, 16 ligands pour la calmoduline couplée au Cy-5. Plus exactement, parmi ces 16 composés, seuls 13 ont démontré leur réelle efficacité suite à un contrôle ultérieur par résonance de plasmon de surface (BIAcore®) [67]. Selon cette même méthode de révélation, Uttamchandani et al ont criblé 2688 produits chimiques de type triazine vis-à-vis d'IgG humaines afin de remplacer la protéine A dans les procédés chromatographiques de purification des anticorps. De là, plusieurs composés se sont révélés actifs, le meilleur d'entre eux possédant une constante d'équilibre de 2,02 μM déterminée par BIAcore® [73].

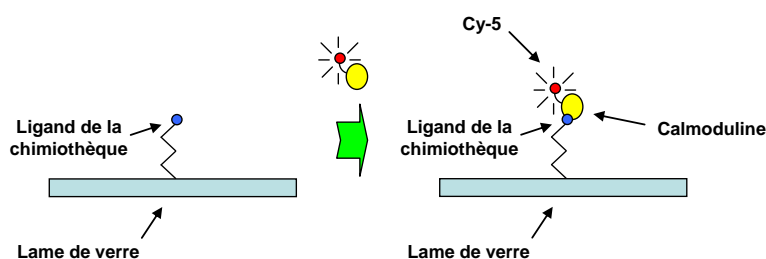


Figure 27 : Principe de révélation en 1 étape [67]

Plus complexe, un protocole de révélation en deux étapes a été adopté par l'équipe de Schreiber et al ; un domaine de type GST fusionné à la cible est reconnu dans un deuxième temps par un anticorps anti-GST lui-même marqué par un fluorophore Cy-5 (figure 28). Ces auteurs ont ainsi découvert au cours du criblage de 12 396 composés obtenus par « Diversity Oriented Synthesis », 2 molécules capables de lier Hap3p, un facteur de transcription chez la levure. Cependant, un seul d'entre eux s'est révélé capable d'en inhiber sa fonction lors de tests *in vitro* [74].

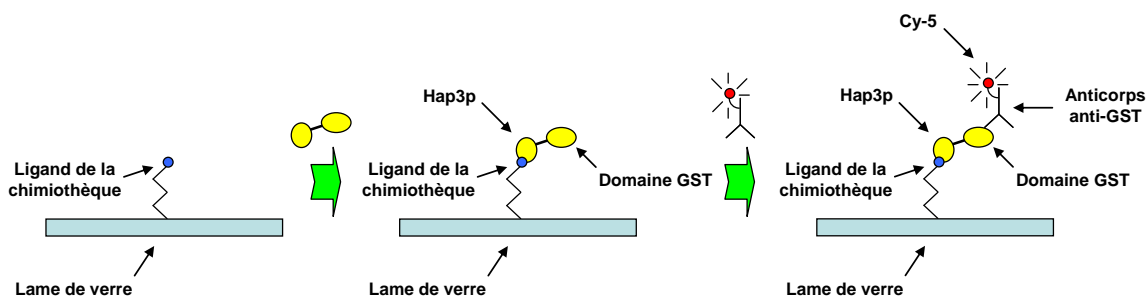


Figure 28 : Principe de révélation en 2 étapes ^[74]

Enfin, les puces à « petits ligands » chimiques ont été utilisées selon un principe assez original. En effet, Zhu et al proposent de baser leur détection sur les propriétés fluorescentes de la coumarine ^[75] (figure 29). Plus précisément, le noyau coumarinique est couplé à une séquence peptidique faisant office de « sonde » pour des cibles enzymatiques de type époxyde hydrolase, estérase, protéase et phosphatase ; sous cette forme, aucune fluorescence n'est détectée. Or, après clivage de la partie peptidique par l'enzyme, la construction immobilisée sur support devient capable d'émettre un signal fluorescent.

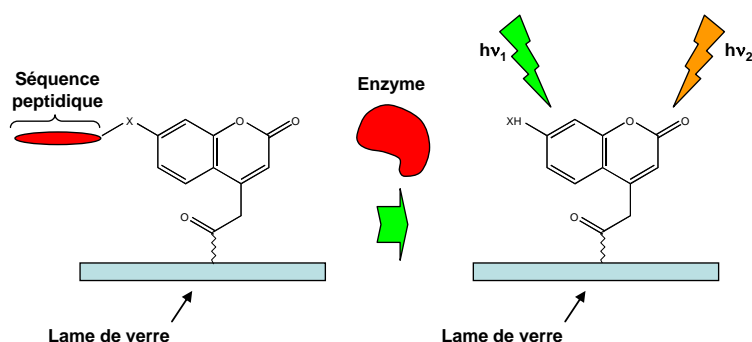


Figure 29 : Exemple d'utilisation des propriétés de « petits ligands » chimiques pour la détection en fluorescence ^[75]

Bien que très sensible, le principe de la fluorescence se heurte cependant à plusieurs limitations. D'une part, cette technique fait systématiquement appel à un « marqueur », ce qui peut induire un biais quant à la structure de la cible criblée. D'autre part, le phénomène de photoblanchiment lié à la dégradation chimique du fluorophore et intrinsèque à la lecture de la puce est gênant pour des interprétations cinétiques. De ces faits, une technique de révélation « sans marqueur » et capable d'acquérir des données en temps réel émerge actuellement : la résonance de plasmon de surface.

3.2.2. La résonance de plasmon de surface

Comme décrite en introduction, cette technique a été initialement commercialisée par la société BIAcore® (Suède). De façon générale, la chimie employée par cette société fait appel au polymère de dextran. Cette société commercialise des puces « CM5 » capables de réagir simultanément avec des fonctions thiols, amines primaires, aldéhydes, alcools, et acide carboxyliques. Suivant cette technique, cette entreprise certifie donc la compatibilité de cette méthode avec l'immobilisation de petites sondes organiques. Associé à cette chimie de greffage, un procédé microfluidique permettant une augmentation du nombre de mesures en parallèle a été élaboré ; sur l'appareil A100, 16 composés peuvent être immobilisés grâce à 4 canaux microfluidiques incluant chacun 5 zones d'immobilisation (dont une zone « référence »). Cependant, pour profiter pleinement de toutes ces opérations, pas moins de 32 injections de fonctionnalisation sont nécessaires... A l'évidence, d'autres techniques fluidiques que celles de BIAcore® doivent donc être mises au point pour permettre une évolution vers un réel criblage « haut-débit ».

Ainsi, une première tentative de « multiplexage » a été tentée par la société Bio-Rad® avec son récent appareil ProteOn XPR36. Ici, 6 canaux microfluidiques permettent l'immobilisation de composés par la chimie des thiols. Grâce à 6 autres canaux orientés de manière perpendiculaire où les analytes sont injectés, une matrice de 36 zones d'interaction peut être suivie quasiment en temps réel (figure 30). En effet, à la différence de l'appareil BIAcore®, Bio-Rad® a opté pour un système de lecture alternatif illuminant indépendamment chaque zone d'interaction. Cependant, l'utilisation de la stratégie microfluidique présente de nouveau des limites techniques importantes pour une évolution vers le criblage haut débit via la résonance de plasmon de surface.

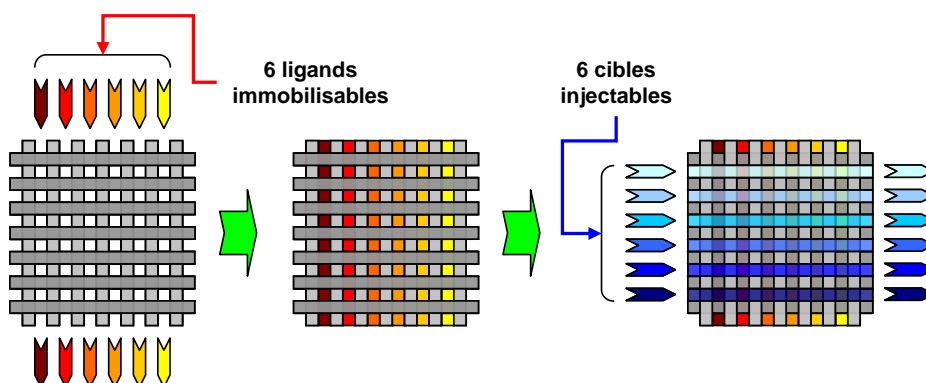


Figure 30 : Stratégie de multiplexage mise en œuvre par Bio-Rad® autorisant le suivi de 36 interactions

Plus récemment, la société Graffinity Pharmaceuticals® (Allemagne) a développé selon la même chimie de greffage un appareillage plus adapté au criblage haut-débit de composés

pharmaceutiques ^[76]. En effet, leur procédé permet, *via* le procédé ChemTag[®], d'immobiliser jusqu'à 10 000 composés sur un seul support SPR préalablement structuré. Leur système d'imagerie SPR commercialisé sous le nom de Plasmon Imager[®] repose sur une mesure de la variation de l'angle de plasmon ^[77-79]. Récemment, leur partenariat avec le groupe pharmaceutique Boehringer Ingelheim[®] démontre clairement l'intérêt que portent ces industriels envers ces nouvelles technologies couplant le format biopuce et la SPR.

Cependant, la chimie employée dans ces deux derniers systèmes commerciaux est relativement sensible à l'oxydation (air) ^[80]. Par conséquent, ceci est un paramètre gênant pour une utilisation à long terme du support fabriqué. Or, à ce jour, bien peu de chimies de surface sur or compatibles avec une utilisation en SPR ont été décrites. Seules des stratégies d'immobilisation par polymérisation sur surface dorée plus fiables à long terme pourraient être une alternative à la chimie des thiols. En ce sens, Kienle et al ont proposé l'électropolymérisation de phénols en polyphénols pour la fabrication de puces à peptides ^[81]. Au laboratoire, un autre polymère capable de se former sur surface dorée est étudié, le polypyrrole. Sachant que cette chimie de surface a déjà été appliquée avec succès pour la production de puces à ADN, à peptides, à protéines (anticorps), ou à oligosaccharides, un élargissement aux sondes « petits ligands » chimiques est envisageable.

4. Cribler des chimiothèques par imagerie SPR

4.1. La cible pharmacologique

4.1.1. L'ARN polymérase bactérienne

Décrite pour la première fois en 1961 et isolée en 1962 par l'américain Jerard Hurwitz ^[82], l'ARN polymérase bactérienne est une enzyme dont la fonction biologique est de procéder à la transcription de l'ADN en ARN messenger (ARN_m). Ces derniers sont ensuite pris en charge par le ribosome lors de l'étape de traduction où la séquence peptidique néoformée permet, une fois correctement repliée, l'obtention de protéines biologiquement fonctionnelles. L'ARN polymérase bactérienne est par conséquent une cible « clé » de la voie générale de régulation de l'expression génique ^[83, 84].

D'un point de vue structural, l'ARN polymérase bactérienne est extrêmement bien conservée ; elle est constituée d'un « core » de 5 sous-unités nommées α , β , β' , ω et organisées invariablement sous la forme $\alpha_2\beta\beta'\omega$. A chacun de ces monomères correspond un

gène respectivement appelé *rpoA*, *rpoB*, *rpoC* et *rpoZ*. La résolution à 3 angströms de la structure du « core » de l'enzyme d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus*, a été effectuée après cristallisation ^[85] et a permis d'identifier le rôle fonctionnel de chacune des sous-unités. Pour la partie α , le côté C-terminal est impliqué dans la liaison à différents facteurs de transcription alors que le côté N-terminal est responsable de l'assemblage de l'ensemble β/β' . Ces deux dernières sous-unités constituent le site actif de l'enzyme, site renfermant un ion Mg^{2+} ; β serait en charge de la fixation des NTPs tandis que β' , pourvue d'un ion Zn^{2+} constitutif, serait responsable de la fixation du brin matrice. Quant à ω , elle n'a aucun rôle direct dans la machinerie transcriptionnelle ; on lui attribue un rôle de protéine chaperonne dans le processus de repliement de la sous-unité β' ^[86]. De façon globale, l'architecture tridimensionnelle du « core » présente d'une part, un sillon profond dans lequel vient s'insérer la double hélice d'ADN et d'autre part, un canal d'approvisionnement en nucléotides triphosphates. Afin de placer ces derniers en face du brin d'ADN matrice, l'enzyme procède à l'ouverture de la double hélice entre les sites -9 et $+2$ par rapport au site actif (figure 31).

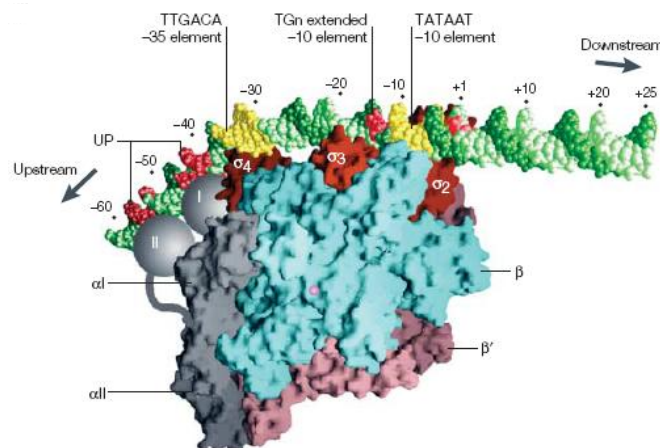


Figure 31 : Structure de l'ARN polymérase bactérienne selon Murakami et al ^[87, 88]

Le processus de traduction se décompose en trois étapes principales : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Brièvement, le « core » de l'ARN polymérase bactérienne va s'associer à un facteur d'initiation de la famille des protéines σ ^[89]. Le complexe d'initiation $\alpha_2\beta\beta'\omega\sigma$ ou « holoenzyme » va alors reconnaître spécifiquement la région promotrice du gène à transcrire. Plus précisément, dans le cas général où le facteur d'initiation est σ_{70} , la région promotrice est reconnue au niveau des sites -35 pb (séquence TTGACA) et -10 pb (séquence TATAA) par rapport à la première base transcrite. Dès lors, l'ARN polymérase bactérienne catalyse de manière processive la synthèse de l'ARN_m à une vitesse de 50 nucléotides par seconde (37°C)

dans le sens 3' – 5' par condensation de nucléotides triphosphates (NTPs) à partir du brin transcrit dit « non codant » [87, 88]. Pour se faire, elle utilise les propriétés de complémentarité des bases A/U, A/T et C/G. Lorsque l'oligoribonucléotide atteint 8 à 10 bases, le facteur σ se détache du « core » de l'enzyme pour laisser place à un autre facteur de transcription dit facteur d'élongation : NusA [90]. Au niveau de la séquence de terminaison, l'ARN polymérase se bloque et attend la plupart du temps le facteur de terminaison protéique Rho [91], parfois accompagné du co-facteur NusG. Plus précisément, en présence du facteur Rho, le complexe hybride ADN/ARN au niveau du site actif de l'enzyme est dénaturé, poussant ainsi à la libération de l'ARN_m.

Chez les bactéries, les ARN messagers transcrits ont une taille variable comprise entre 300 et 5000 nucléotides suivant sont s'ils sont ou non polycistroniques, c'est-à-dire s'ils codent pour une seule ou plusieurs protéines. A la différence des ARN pré-messagers (ARN_{pm}) synthétisés par l'ARN polymérase II eucaryote, les ARNm procaryotes ne possède ni de coiffe 7-méthylguanine, ni de queue polyadénylée. Ceci explique la relative faible durée de vie des ARNm procaryotes, durée évaluée entre 2 et 4 minutes.

4.1.2. Les systèmes biologiques de régulation

Plusieurs systèmes biologiques de régulation de l'ARN polymérase bactérienne ont été décrits au sein de la littérature, et ce aux différents stades du processus. Parmi ces systèmes, une première voie de contrôle de l'activité transcriptionnelle consiste à modifier la spécificité de lecture de la séquence promotrice *via* l'accrochage de différents types de sous-unités σ (tableau 3) [89]. Chez *E. coli*, en complément des facteurs σ , toujours au stade de l'initiation, 7 facteurs de transcription spécifiques à certains gènes ont été découverts. D'une part, y figurent des facteurs « répresseurs » (CRP, λ CI, Fis, MerR), c'est-à-dire inhibant la transcription, et d'autre part, des facteurs « activateurs » (GalR, LacI, CytR) ayant un rôle inverse.

Gène / Protéine σ	Masse	Situation	Séquence – 35	Espacement	Séquence – 10
rpoD (σ_{70})	70 kD	Général	TTGACA	16-18 pb	TATAAT
rpoS (σ_S)	38 kD	Stress/Stat	TTGACA	16-18 pb	CTATACT
rpoH (σ_{32})	32 kD	Stress T°C	TCTCNCCCTTGAA	13-17 pb	CCCCATNT
rpoE (σ_E)	24 kD	Stress extra	GAACT	15-19 pb	GTCA/TAA
fliA (σ_{28})	28 kD	Flagelle	CTAA	15 pb	GCCGATAA
fecI (σ_I)	19 kD	Fer	GAAAAT	15 pb	TGTCCT
rpoN (σ_{54}) *	54 kD	Azote	CTGGNA **	6 pb	TTGCA ***

Tableau 3 : Spécificité de la reconnaissance du site promoteur liée à la nature du facteur σ associé au « core » de l'ARN polymérase (* nécessite l'ATP pour se fixer – ** séquence – 24 – *** séquence – 12) [89]

Une seconde voie de modulation de la transcription consiste à leurrer l'ARN polymérase bactérienne grâce à des ARN 6S capables de se lier au complexe d'élongation puis d'avorter la synthèse de l'ARN messager ^[92]. Une troisième possibilité consiste à détruire l'ARN_m durant l'élongation suite à la fixation des protéines GreA ou GreB ^[93] ; ces dernières induisent une pause transcriptionnelle ainsi qu'une coupure de l'ARN_m. Enfin, pour des gènes spécifiques, certains ARN_m sont capables de lier une molécule précise et peuvent en conséquence adopter une conformation particulière type « hairpin » ; ce système de régulation est le « riboswitch » ^[94].

4.1.3. Les molécules actives

A partir de l'ensemble de ces données, l'ARN polymérase semble être une cible de choix pour une future molécule à activité antibiotique. En effet, sa haute conservation au travers du règne bactérien ainsi que son rôle essentiel dans l'expression du génome en font une cible privilégiée pour la recherche pharmaceutique.

Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs molécules ont démontré une activité inhibitrice envers le fonctionnement de l'ARN polymérase bactérienne. Parmi ces composés, seule la rifampicine (figure 32) est actuellement commercialisée – mise sur le marché en 1968 – avec pour indication principale le traitement des infections à mycobactéries, c'est-à-dire la lèpre (association avec la dapsonne) et la tuberculose (association avec l'isoniazide). En association avec d'autres antibiotiques, la rifampicine est utilisée pour lutter contre les souches SAMR (*Staphylococcus aureus* méthicillino-résistant) et les légionelles. Cependant, des études récentes ont montré que de plus en plus de souches de *Mycobacterium tuberculosis* sont devenues résistantes à la thérapeutique. En effet, alors que la tuberculose tue entre 8 et 10 millions de personnes par an ^[95], 1 % des germes ont acquis une résistance face à la rifampicine, sachant que 10 % d'entre eux sont déjà résistants à l'isoniazide ^[10]. Selon Campbell et al, le mécanisme de résistance est lié à la mutation de la cible, l'ARN polymérase bactérienne, sur plusieurs sites à proximité de la poche de fixation de l'antibiotique ^[96], elle-même située à 12 Å du site actif catalytique. Concrètement, suite à la fixation de ces molécules, la progression de l'enzyme après 3 nucléotides sur le brin d'ADN est rendue impossible du fait de la gêne stérique occasionnée ^[96]. Plus précisément, sur les 12 acides

aminés de la sous-unité β susceptibles de créer des liaisons entre la protéine et la rifampicine, la mutation de 11 d'entre eux a été rapportée au sein de la littérature [96].

Devant cet « échappement thérapeutique », la recherche académique et industrielle se tourne vers la découverte de nouveaux composés capables d'interférer le fonctionnement de la machinerie transcriptionnelle. Cependant, les travaux menés depuis plusieurs années n'ont apporté que bien peu de nouveaux composés : ansamycines [97], sorangicine [98], streptovaricine, GE 23077 [99]. Bien que ces molécules soient chimiquement très différentes (figure 32), elles présentent l'inconvénient soit d'interagir au même site de fixation que la rifampicine, soit d'avoir une pénétration intracellulaire limitée.

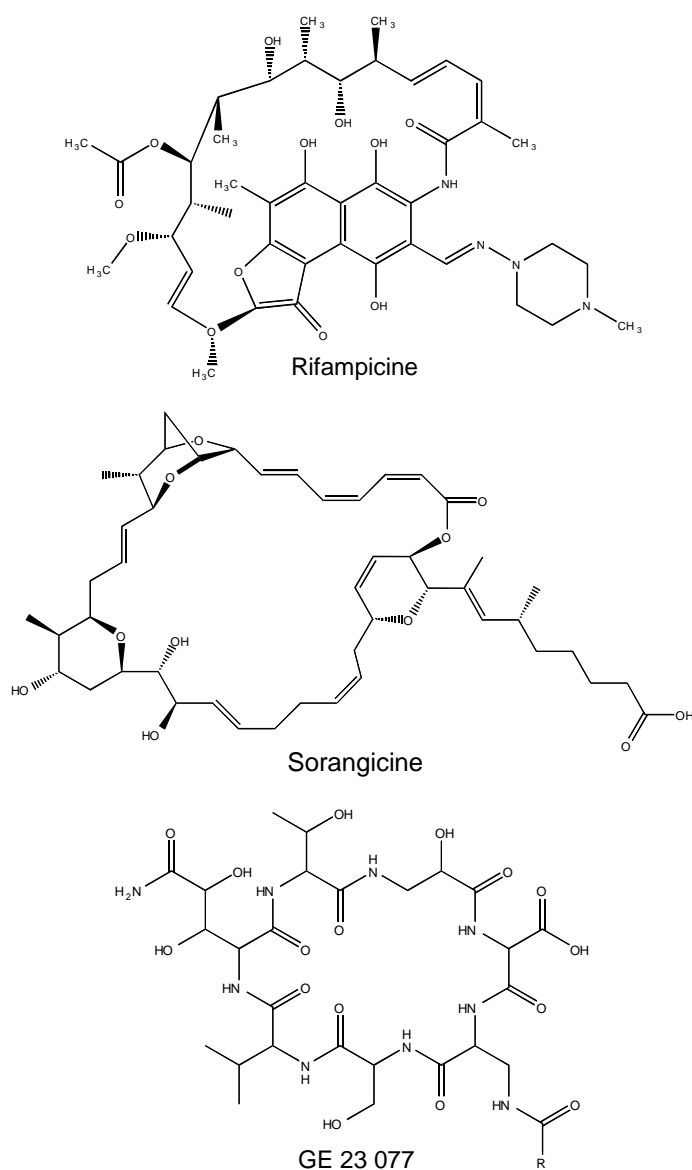


Figure 32 : Structure de petits composés bloquant l'ARN polymérase au stade de l'initiation

Récemment, un antibiotique peptidique naturel, la microcine J25, a été isolé de souches intestinales d'*E. coli*. Différemment de la rifampicine, cet antibiotique s'installe et obstrue le canal secondaire d'approvisionnement en NTPs ^[100]. Cependant, des mécanismes naturels de résistances existent : pompes membranaires refoulant le composé, et mutation du gène *rpoC* codant pour β' au niveau du site de fixation ^[100]. Ainsi, de façon ingénieuse et pour limiter ces problèmes de résistance, Ebricht et al ont proposé dans leur brevet d'associer de manière covalente *via* un bras chimique adapté, deux molécules bioactives entre elles ; l'une est la rifampicine et l'autre la microcine ^[101]. Ce principe élégant permet de réaliser une pseudo « multithérapie » avec une seule molécule. Pour autant, cette approche nécessite une caractérisation fine des sites actifs de chacune des molécules appariées.

En dehors des stratégies consistant à inhiber stériquement le fonctionnement du « core » de l'enzyme, la transcription peut être interrompue en empêchant l'assemblage des différents complexes décrits en I.4.1.1. Selon cette approche, André et al ont découvert une nouvelle série de petits composés capables d'interférer avec la fixation du facteur σ sur le « core » de l'enzyme *in vitro* et *in vivo* ^[36, 37]. La série de molécule isolée montre une IC_{50} de 2 à 15 μ M. Par extension, compte-tenu du nombre important de partenaires biologiques décrits dans la régulation du processus de transcription, des interactions entre petits ligands et l'ARN polymérase, même en surface, pourraient suffire à gêner la fixation de facteurs de transcription. Pour ces raisons, les travaux menés ci-après ont fait appel à cette cible pharmacologique.

4.2. Description de la chimiothèque

La chimiothèque à synthétiser puis à immobiliser se décompose en deux groupes de sondes. Le premier fait référence à la série chimique apparentée aux dicétopipérazines, aussi appelées cyclodipeptides ^[102], alors que le second groupe fait appel à la structure quinazoline-2,4-dione. Pour la partie synthèse de ces sondes, l'approche par chimie combinatoire sur support solide a été développée par Muriel Amblard (Université de Montpellier, Faculté de Pharmacie).

4.2.1. Les 2,5-dicétopipérazines

Les 2,5-dicétopipérazines sont des composés issus de la condensation de deux acides aminés. Ainsi, la combinaison d'acides aminés, naturels ou non, par paires permet l'obtention d'une grande variété structurale (figure 33). Associée à cette diversité structurale, le spectre d'activité biologique de ces produits est très large selon la littérature. En effet, plusieurs propriétés pharmacologiques associables à des domaines d'application en thérapeutique leurs ont été attribuées : inhibiteur du PAF (Platelet Activating Factor) pour le traitement des thromboses ^[103, 104], antagonistes des récepteurs δ aux opioïdes pour le traitement de la douleur ^[105], inhibiteur du PAI-1 (Plasminogen Activating Inhibitor – 1) pour la protection cardiovasculaire ^[106], inhibiteur de l'ARN topoisomérase II pour le traitement anti-tumoral ^[107], inhibiteur de la synthèse des microtubules pour le traitement anti-tumoral ^[108], antagonistes des récepteurs à l'ocytocine ^[108], inhibiteur du récepteur P2Y pour la neuroprotection ^[109-111]. Pour cette dernière application, un dérivé synthétique de la cyclo[His-Pro] est en cours de validation pré-clinique chez le rat ^[112].

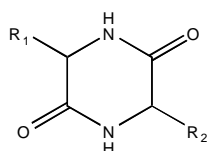


Figure 33 : Squelette chimique générique des cyclodipeptides ou dicétopipérazines ; R₁ et R₂ représentent les chaînes latérales des acides aminés

Aussi, des propriétés antibactériennes et antifongiques ont été découvertes sans élucidation claire de leur mécanisme d'action. Ces composés ont été principalement obtenus après extraction sur culture. A titre non exhaustif, les espèces suivantes ont permis l'isolement de dicétopipérazines antibiotiques : le champignon *Aspergillus ochraceus* ^[113], l'algue marine *Fusarium species* ^[114], le champignon *Pseudallescheria* ^[115], le champignon *Gymnoascus reessii* ^[116]. Très récemment, les travaux de Zheng et al ont indiqué que des composés du type 2,5-dicétopipérazine provenant de *Bionectra byssicola*, présentent un fort potentiel antibiotique envers des souches SAMR (*Staphylococcus aureus* méthicillino-résistant) et SAQR (*Staphylococcus aureus* quinolo-résistant). En effet, la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) a ici été estimée entre 10 et 30 $\mu\text{g/mL}$ ^[117]. De même, Huberman et al ont extrait à partir d'une culture de *Lucilia sericata* le cyclodipeptide c[Pro-Pro] ayant une activité antibiotique envers les germes *Pseudomonas aeruginosa* et *Micrococcus luteus* (figure 34) ^[118].

Outre l'extraction de ces produits par culture, la synthèse de 2,5-dicétopipérazines *via* la chimie combinatoire a été utilisée par Hirano et al ^[119]. Cette approche haut-débit leur a permis de découvrir de nouvelles molécules antibiotiques ayant une CMI de 12,5 à 50 µg/mL.

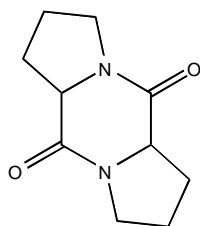


Figure 34 : Cyclodipeptide ayant une activité antibiotique selon Huberman et al ^[118]

Devant le fort engouement lié à cette série chimique, il a été décidé d'intégrer des analogues structuraux proches de cette dernière au sein de la chimiothèque. Sachant que la nature des chaînes latérales est cruciale pour la spécificité de l'activité biologique, l'exploration chimique a consisté à faire varier ces groupements. Compte-tenu des possibilités qu'offre la chimie combinatoire, l'étude s'est restreinte au criblage de structures associant deux acides aminés d'origine naturelle.

4.2.2. Les quinazoline-2,4-diones

A l'exception de la phéromone 1,3-diméthylquinazoline-2,4-dione produite chez l'insecte *Phillopertha diversa* (figure 35b) ^[120], les quinazoline-2,4-diones sont des produits issus de la synthèse organique. Leur structure chimique générale est exposée en figure 35a. Au sein de la littérature, des travaux récents ont indiqué que certains composés appartenant à cette famille possèdent des activités anti-inflammatoires et analgésiques ^[121]. D'autres dérivés sont décrits comme antagonistes spécifiques des récepteurs 5-HT₂ à la sérotonine ainsi que comme antagonistes aux récepteurs α -adrénergiques à l'acétylcholine ^[122] ; ces propriétés vasodilatatrices leur confère une éventuelle indication dans le traitement de l'hypertension artérielle. D'autres cibles pharmacologiques leur ont été découvertes telles que l'inhibition de l'aminopeptidase, enzyme impliquée dans la dégradation des barrières cellulaires au cours de la prolifération tumorale ^[123], ou encore l'inhibition de la recapture de l'adénosine ^[124]. Cette dernière activité a été mise à profit dans le traitement de la glomérulonéphrite et de la pancréatite aigüe.

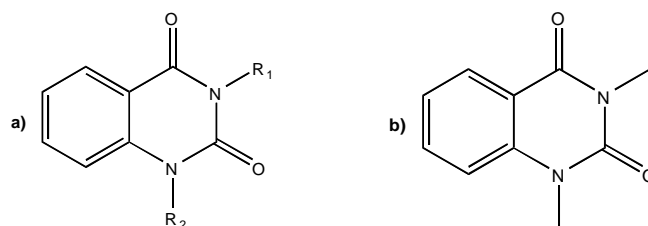


Figure 35 : a) Squelette chimique générique pour les quinazoline-2,4-diones ; R₁ et R₂ sont des substituants – b) Formule chimique de la phéromone sexuelle produite chez l'insecte *Phyllopertha diversa* ^[120]

Enfin, plus récemment, Ellsworth et al ont découvert que les 3-aminoquinazolinédiones ont des vertus antibactériennes envers des germes multirésistants ^[125]. Selon Tran et al, cette activité antibactérienne serait liée à l'activité inhibitrice de la topoisomérase de type II ^[126].

Devant la grande variété d'activités biologiques des séries 2,5-dicétopipérazines et quinazoline-2,4-diones, il paraît sensé dans le cadre du projet biopuce à « petits ligands » de mener un criblage de l'activité de ces composés ou de leurs dérivés vis-à-vis de l'ARN polymérase bactérienne d'*E. coli*, cible pharmacologique de choix pour un éventuel candidat antibiotique.

4.3. Le criblage biologique par imagerie SPR

4.3.1. Application des principes de la SPR

Comme décrit en introduction, le principe de la détection par résonance de plasmon de surface fait appel à un changement d'indice optique du milieu liquide dans un espace très proche de la surface du biocapteur. Or, l'indice optique local est corrélé avec la quantité de matière, c'est-à-dire la présence d'une molécule biologique. Ainsi, plus la molécule cible a une taille importante, plus la variation de réflectivité enregistrée va être conséquente. Suivant ce principe, il est envisagé, dans le cadre du criblage pharmaceutique, d'immobiliser des sondes « petits ligands » de faible poids moléculaire et de faire interagir ces dernières avec une molécule biologique de haut poids moléculaire ; ici, la cible choisie est l'ARN polymérase II, une protéine de 480 kDa (figure 36).

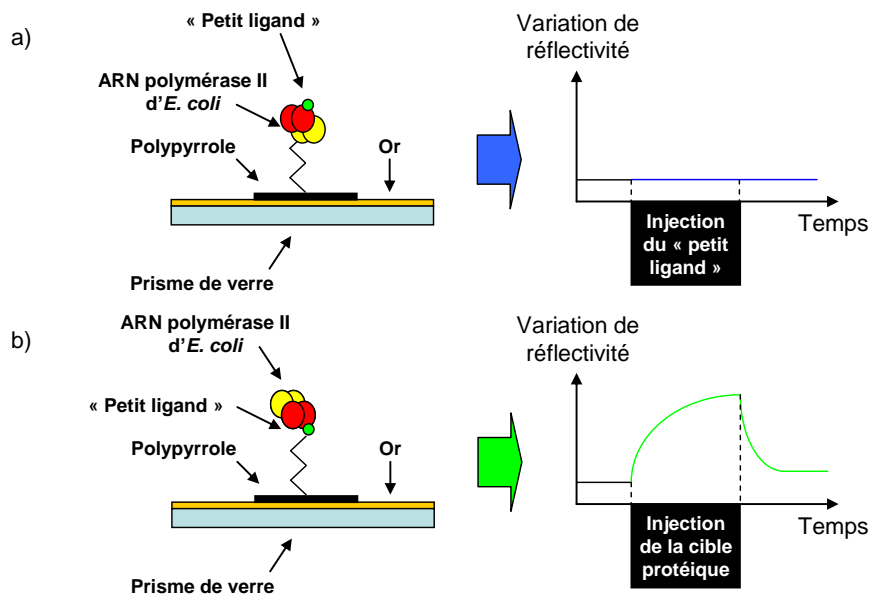


Figure 36 : a) Stratégie où la sonde est la cible biologique – b) Stratégie où la sonde est le « petit ligand » chimique

4.3.2. La stratégie d'immobilisation

Afin de réaliser l'immobilisation de la bibliothèque de petits ligands, le principe a été de s'appuyer sur le savoir-faire du laboratoire pour ancrer ces sondes par électropolymérisation du pyrrole ou électrospotting [2, 9]. Or, cette stratégie nécessite un « design » particulier des sondes puisqu'elles doivent toutes incorporer une fonction pyrrole. D'autre part, pour que les sondes soient correctement reconnues à la surface du biocapteur, un « bras espaceur » reliant ces dernières et le noyau pyrrole doit être inséré. Enfin, sachant que l'étude menée a été réalisée en parallèle avec un appareil BIAcore® (Uppsala, Suède), la chimie du bras espaceur a été adaptée afin de la rendre compatible avec la chimie de greffage sur polymère de dextran [127]. Suivant ce cahier des charges, une représentation schématique de la structure générale des sondes pyrrolées est indiquée en figure 37.

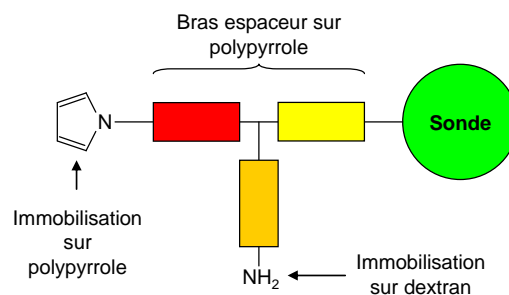


Figure 37 : Structure schématique des sondes pyrrolées issues de la chimie combinatoire ; l'immobilisation sur polypyrrole permet la détection en imagerie SPR (Genoptics®, France) alors que l'immobilisation sur dextran permet la détection en SPR « classique » (BIAcore®, Suède)

Aussi, outre la grande diversité structurale accessible par la chimie combinatoire, cette technique de synthèse ne permet pas l'obtention de quantités de sondes importantes, c'est-à-dire de l'ordre du milligramme. D'autre part, compte-tenu de la faible probabilité d'avoir un composé actif (1 / 10 000), il est nécessaire d'immobiliser un maximum de sondes par support biopuce. C'est pourquoi dans le cadre de ce projet, une miniaturisation des dépôts de polymère doit être envisagée.

4.3.3. Les tests d'interaction par SPRi

Après préparation des biopuces, le test d'activité envisagé consiste à détecter par imagerie SPR l'interaction entre chacune de ces sondes et la cible biologique décrite en 4.1., l'ARN polymérase bactérienne. En effet, sachant qu'il est actuellement techniquement très difficile de produire un appareil fluide multicanaux, seule l'imagerie SPR est compatible avec autant de mesures en parallèle. Théoriquement, l'acquisition en temps réel de la réflectivité sur chacune des zones où sont immobilisées ces sondes permet de prédire une éventuelle interaction spécifique avec la cible pharmacologique. Enfin, suivant la figure 38, le suivi des phénomènes biologiques par résonance de plasmon de surface permet d'accéder à une analyse cinétique et par conséquent contribue à la meilleure caractérisation des interactions détectées.

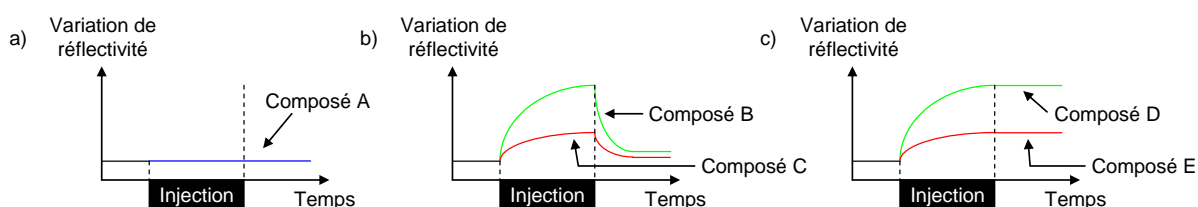


Figure 38 : Différents cas de figure envisagés durant l'injection de la cible par imagerie SPR ; a) Cas typique d'une sonde n'interagissant pas avec la cible protéique – b) Cas où la sonde interagit avec la cible suivant une vitesse de dissociation élevée – c) Cas où la sonde interagit avec la cible suivant une vitesse de dissociation faible

Les biopuces à « petits ligands » présentent un fort potentiel du fait de leur stabilité chimique et offrent donc la possibilité de régénérer le capteur sous des conditions biologiquement dénaturantes. Suivant ce principe, grâce à l'imagerie SPR, l'objectif est de pouvoir tester rapidement, pour chacune des molécules de la chimiothèque, plusieurs partenaires biologiques.

Pour se faire, ce projet s'est scindé en plusieurs étapes. En effet, dans un premier temps, une étude préalable portant sur la faisabilité d'une telle approche a nécessité une validation grâce à des composés dont l'interaction avec une cible biologique est connue et facilement caractérisable au laboratoire. C'est pourquoi les travaux décrits ci-après ont d'abord porté sur l'immobilisation de sondes « modèles ». Une fois les conditions opératoires établies pour ces dernières, une sonde dite « témoin positif » pour la cible finale, l'ARN polymérase d'*Escherichia coli* a été greffée : un dérivé structurellement proche de la rifampicine. Enfin, dans un dernier temps, l'ensemble de la chimiothèque synthétisée a été immobilisée sur support puis testée en parallèle par imagerie SPR.

II. DEVELOPPEMENT D'UNE PUCE A PETITS LIGANDS

1. Etude de systèmes « modèles » de petits ligands

La fabrication d'un tel capteur nécessite d'être validée au moyen de sondes « modèles », c'est-à-dire des petits composés chimiques pour qui un partenaire biologique bien caractérisé est disponible.

Les anticorps étant des entités biologiques facilement manipulables, et ayant déjà été utilisées par imagerie SPR sur des puces à protéines [7], ce type de cible a été retenu. Par suite, le choix des sondes biotine, fluorescéine et dinitrophényle, c'est-à-dire des sondes faisant office de petites molécules « modèles », a été envisagé. En effet, à chaque sonde correspond un anticorps monoclonal commercial (Sigma) permettant d'obtenir des réponses spécifiques. D'autre part, pour la sonde biotine, une autre cible biologique est disponible : la streptavidine.

Concrètement, les sondes ont été modifiées pour accueillir une chaîne nommée « bras espaceur » muni d'une fonction type pyrrole. Les positions d'attache de ces bras sont mentionnées en figure 39.

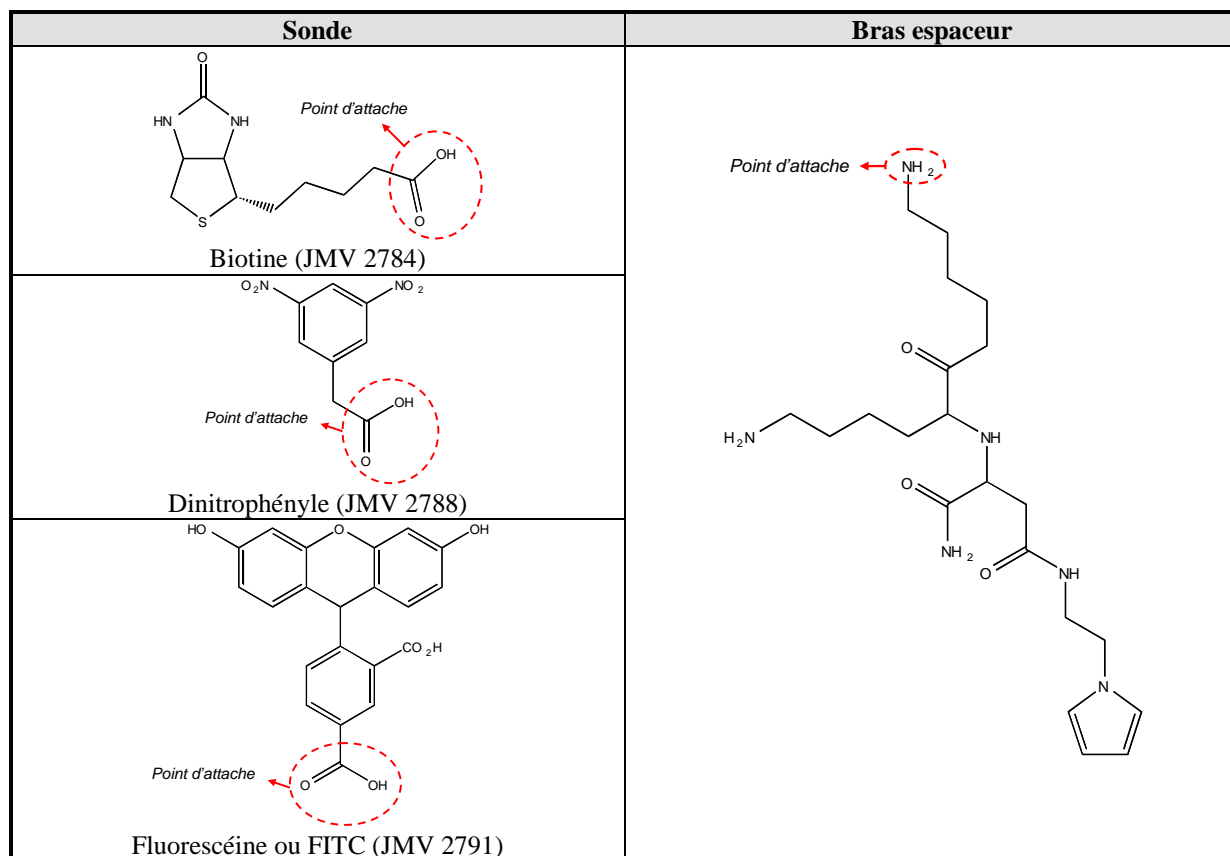


Tableau 4 : Structure des trois sondes « petits ligands » et du bras espaceur pyrrole-sonde retenus pour l'étude préliminaire

1.1. Etude initiale de faisabilité

Pour cette étude, les conditions de synthèse des films de polypyrrole-sonde suivent les modes opératoires classiquement adoptés au laboratoire. Plus précisément, le milieu de polymérisation retenu est un mélange constitué de glycérol (10 % v/v), de NaH₂PO₄, de chlorure de sodium et d'eau à pH 6,8^[7, 9] dans lequel est placée la sonde pyrrolée ainsi que 20 mM de pyrrole. La séquence d'électrospotting permettant l'électropolymérisation sur surface dorée est celle décrite en paragraphe introduction générale. Les supports néo-synthétisés grâce au robot Polypotter II ont ensuite été systématiquement rincés à l'eau déminéralisée et filtrée 0,22 µM.

De par la fiabilité de la méthode de révélation, l'imagerie par épifluorescence a été employée dans un premier temps pour valider le greffage correct des sondes. Puis, la compatibilité des dépôts a été testée par imagerie SPR.

1.1.1. Validation du greffage par microscopie de fluorescence

Comme l'indique la figure 40, la biotine est la sonde la plus simple à mettre en évidence par la technique de fluorescence (1 étape). C'est pourquoi cette sonde a été étudiée en premier.

Dans ce premier essai, une gamme large de concentrations initiales en sonde biotine a été testée. La limite inférieure de la gamme a été fixée à 10 µM, ce qui correspond aux conditions classiquement utilisées pour le greffage d'oligonucléotides sur polypyrrole au laboratoire^[4, 9]. Quant à la borne supérieure de cette gamme, 1 mM, elle a été régie par la solubilité de la sonde dans le milieu de polymérisation. Ajoutées à ces dépôts, deux zones de contrôle sans séquence électrochimique ont été introduites.

Afin de mettre en évidence la disponibilité de la biotine greffée sur le polymère, la révélation a fait appel à la streptavidine couplée à la *R*-phycoérythrine (SAPE) (figure 40). Suivant l'image du support obtenue et présentée en figure 40, l'intensité du signal fluorescent est croissante avec la quantité de sonde greffée. D'autre part, pour une même condition de greffage – 1 mM de biotine –, l'intensité du signal recueillie est identique. Cette expérience montre par ailleurs la nécessité de procéder à l'immobilisation par électrospotting de la sonde

sur la surface dorée ; le faible signal observé pour la zone sans activation électrochimique peut s'expliquer soit par une absorption de la sonde à la surface, soit par une réaction de l'hétéroatome de soufre sur l'or ^[128]. Après régénération du support au SDS 1%, une seconde révélation a donné des résultats similaires à ceux présentés en figure 1, sans perte notable de signal (*données non montrées*).

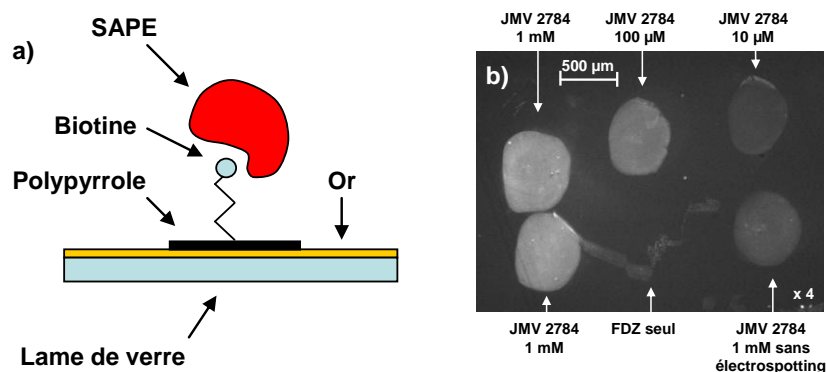


Figure 40 : a) Représentation schématique de la révélation de la sonde biotine par microscopie de fluorescence –
 b) Image de fluorescence d'une puce biotine révélée par la SAPE

Suite aux données obtenues avec la sonde biotine, une étude similaire a été effectuée sur les deux autres sondes modèles : le dinitrophényle et la fluorescéine. Afin de mettre en évidence ces sondes sur le polymère, trois étapes de révélation sont nécessaires (figure 41). Tout d'abord, l'anticorps anti-sonde réagit avec la sonde greffée. Puis un anticorps biotinylé anti-anticorps anti-espèce vient reconnaître la construction. Finalement, la SAPE s'installe là où l'anticorps biotinylé est présent. Pour le FITC, l'isotype de l'anticorps anti-sonde est une IgG de souris alors que pour le dinitrophényle, c'est une IgE de chèvre. En figure 41 sont reportées les images obtenues pour les deux types de dépôts. Brièvement, pour chacune des sondes, un signal fluorescent apparaît uniquement lorsque ces dernières ont été introduites dans la solution à électropolymériser. D'autre part, la fluorescéine étant une molécule fluorescente, il a été vérifié, avant le protocole de révélation, qu'aucune fluorescence ne provient directement de la sonde immobilisée (*données non montrées*). Enfin, suivant l'image en figure 41b, les dépôts de FITC sont reproductibles, ce qui n'est pas le cas de la sonde dinitrophényle pour qui les résultats sont bien plus aléatoires d'un support doré à l'autre.

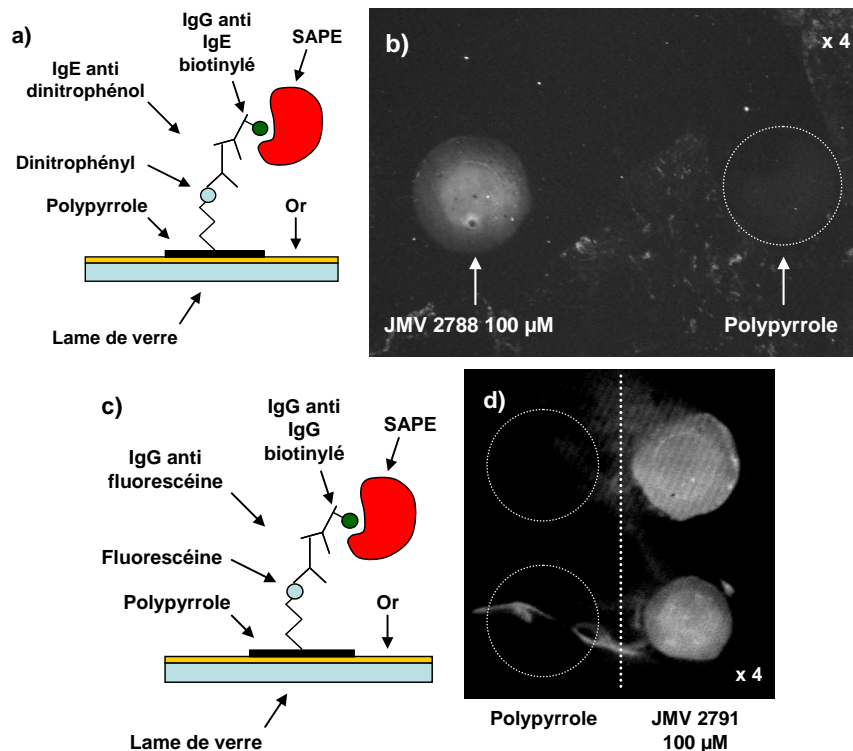


Figure 41 : a) Représentation schématique de la révélation de la sonde dinitrophényle par microscopie de fluorescence – b) Image de fluorescence d’une puce dinitrophényle révélée en 3 étapes – c) Représentation schématique de la révélation de la sonde FITC par microscopie de fluorescence – d) Image de fluorescence d’une puce FITC révélée en 3 étapes

De même que pour l’expérience menée avec la sonde biotine, des signaux identiques ont été observés après un deuxième protocole de révélation.

1.1.2. Validation du greffage par imagerie SPR

A partir des conditions de greffage retenues dans l’étude ci-dessus, la réactivité des dépôts a été testée par imagerie SPR. Aussi, de la même manière que précédemment, la sonde biotine a été étudiée en premier. Dans un deuxième temps, les deux autres sondes ont été introduites dans l’étude.

L’étude par SPR a permis de vérifier la réactivité de la biotine vis-à-vis de deux partenaires biologiques : l’anticorps anti-biotine et l’avidine. Plusieurs concentrations initiales en sondes ont été introduites dans la matrice. En conséquence, après blocage de la puce à la BSA 1% (m/v), le signal spécifique recueilli est croissant avec la quantité de sonde immobilisée pour disparaître à une concentration initiale de 10 μM en biotine (figures 42a et 42b). Aussi, l’allure des courbes cinétiques suit un modèle pour lequel la vitesse d’association est rapide alors que celle de dissociation est extrêmement lente. Ceci correspond aux caractéristiques

types des couples biologiques testés. Ces résultats confirment donc ceux obtenus *via* l'imagerie par épifluorescence (figure 40) excepté une régénération au SDS 1% peu efficace (*données non montrées*).

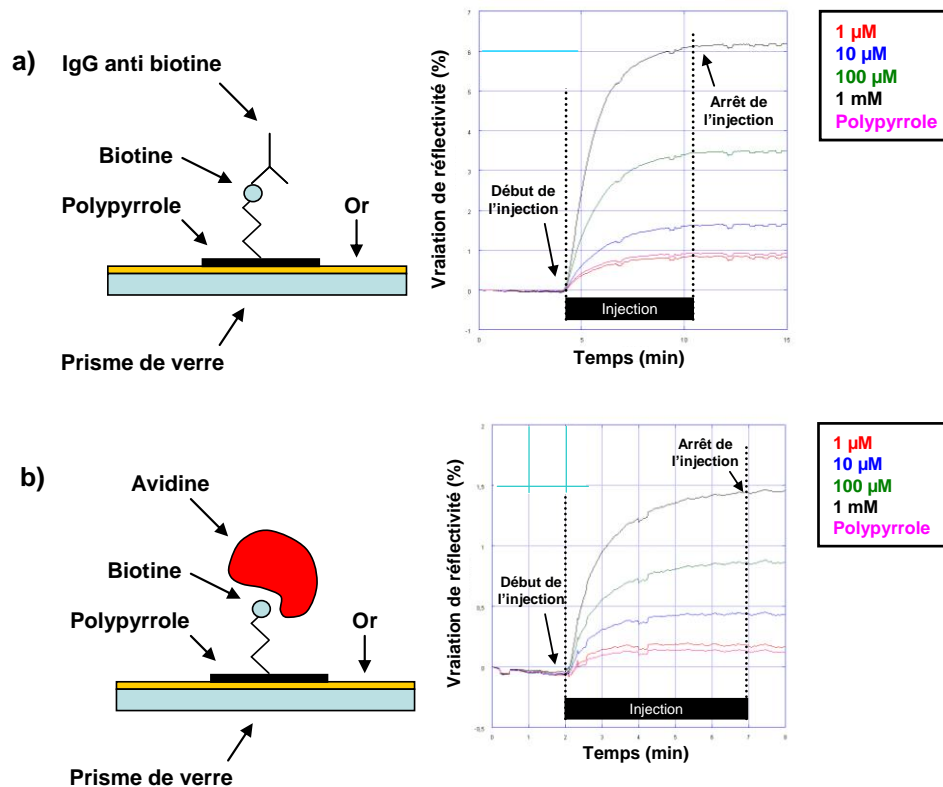


Figure 42 : a) Représentation schématique de la révélation de la sonde biotine par imagerie SPR *via* l'anticorps anti-sonde (100 nM) et la cinétique correspondante – b) Représentation schématique de la révélation de la sonde biotine par imagerie SPR *via* l'avidine (100 nM) et la cinétique correspondante

Afin de vérifier la réelle spécificité des interactions précitées avec la biotine, les sondes FITC et dinitrophényle ont été insérées dans la matrice de la puce SPR (figure 43). Ici, l'injection de l'anticorps anti-biotine induit une variation de réflectivité uniquement sur le plot comportant la biotine. De même, l'injection de l'anticorps monoclonal anti-fluorescéine provoque une variation positive de signal uniquement sur la zone greffée au FITC. La quantité de signal spécifique (0,7%) est cependant bien plus faible que celle observée pour la sonde biotine à concentration initiale d'électrospotting équivalente. Sachant qu'une injection d'anticorps supérieure à 100 nM n'apporte pas davantage de signal spécifique (*données non montrées*), l'explication peut venir d'un rendement d'incorporation faible de la sonde dans le film de polymère ou d'une solubilité limitée du FITC pyrrolé dans le milieu électrochimique permettant l'immobilisation. Quant à la sonde dinitrophényle, aucun signal SPR n'a été décelé après injection de l'anticorps monoclonal correspondant, probablement pour des raisons

similaires à celles décrites pour la sonde fluorescéine. La méthode par fluorescence étant plus sensible que l'imagerie SPR ^[9], des quantités faibles de dinitrophényle immobilisées ont pu être révélées durant la première étude.

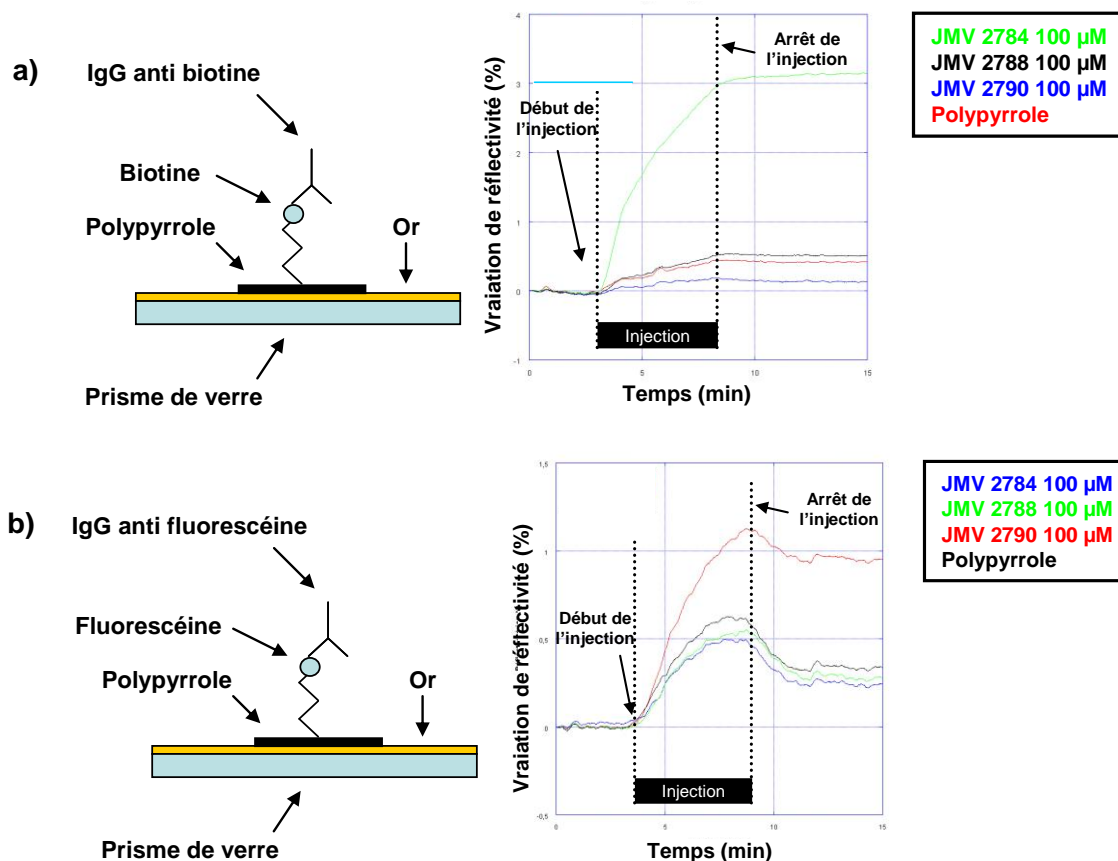


Figure 43 : a) Représentation schématique de la révélation de la sonde biotine par imagerie SPR via l'anticorps anti-sonde (100 nM) et la cinétique correspondante – b) Représentation schématique de la révélation de la sonde FITC via l'anticorps anti-sonde (100 nM) et la cinétique correspondante

Malgré ces différences de réactivité des sondes, cette première étude a pu démontrer la faisabilité d'une telle approche par « petits ligands » sur polymère de polypyrrole. Pour obtenir un signal intéressant, les concentrations initiales dans la solution de spotting sont relativement plus élevées que celles utilisées pour les sondes de type oligonucléotidiques ^[4], mais restent comparables à celles employées pour l'immobilisation de peptides ou de sucres ^[3, 5].

Ayant utilisé le même type de bras espaceur pour l'ensemble des trois sondes, une différence d'électroactivité du noyau pyrrole ne peut expliquer les différences de réactivité observées pour ces sondes. En dehors de cette éventualité, deux paramètres régissent la quantité de sonde disponible pour une bonne reconnaissance biologique : d'une part, la longueur du bras

espaceur reliant la sonde au polymère de polypyrrole, et d'autre part, la solubilité de ces sondes pyrrolées dans le milieu de polymérisation. Ces paramètres ont respectivement fait l'objet des travaux présentés dans les paragraphes ci-après.

1.2. Choix du bras espaceur sonde-polymère

Afin de vérifier si la longueur du bras espaceur peut jouer un rôle sur la biodisponibilité des sondes envers leur cible, plusieurs analogues ont été synthétisés par l'équipe de Jean Martinez (LAPP, Faculté de Pharmacie de Montpellier) puis immobilisés sur support doré. De plus, dans le cadre d'une étude comparative entre l'appareil Biacore et l'imagerie SPR, le bras espaceur devait permettre l'immobilisation de la sonde suivant les deux chimies de greffage employées respectivement par ces deux techniques. C'est pourquoi systématiquement une lysine portant une amine primaire libre a été insérée dans la structure des bras.

1.2.1. Série n°1

Par extension, une première série de composés a été produite en suivant la même stratégie de synthèse que celle employée pour les sondes testées au cours des études initiales de faisabilité. Le produit de couplage liant l'unité pyrrole à la sonde est ici le *N*-(2-aminoéthyl)pyrrole. Comme indiqué en figure 44, le point de variation réside dans la longueur de la chaîne alkyle introduite au niveau de la sonde. Chacun de ces composés a été purifié par HPLC, analysé par spectrométrie de masse, puis lyophilisé sous forme de sel d'acide trifluoroacétique. L'ensemble des molécules de cette série sont répertoriées dans le tableau 5.

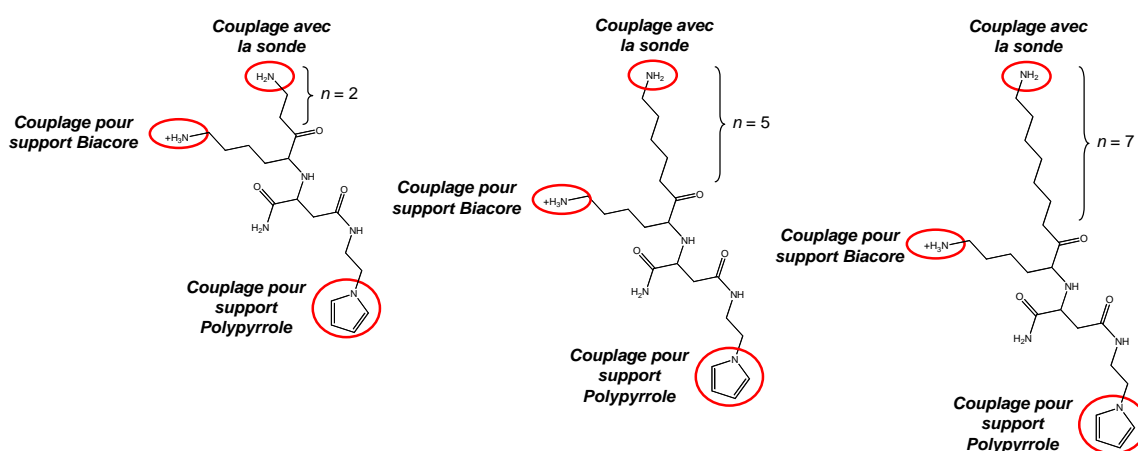


Figure 44 : Structure des bras espaceurs sonde-polymère suivant la stratégie de synthèse *via* pyrrole aminé

Code de la molécule	Longueur de bras	Type de sonde
JMV 2784 *	5	Biotine
JMV 2785	7	Biotine
JMV 2789	2	Biotine
JMV 2786	2	Dinitrophényle
JMV 2787	5	Dinitrophényle
JMV 2788 *	7	Dinitrophényle
JMV 2790	2	Fluorescéine **
JMV 2791 *	7	Fluorescéine **

Tableau 5 : Différentes sondes testées appartenant à la série n°1 (* : sondes utilisées dans l'étude initiale de faisabilité – ** : le composé en n = 5 n'a pu être isolé)

Suite à l'immobilisation des trois sondes de type biotine, la révélation par microscopie de fluorescence a été effectuée suivant le principe décrit en figure 40. L'image du support obtenue en figure 45 démontre qu'il n'existe pas d'influence de la dimension du bras sonde-pyrrole sur la disponibilité de la biotine. Une étude parallèle par imagerie SPR (figure 45b) tend à confirmer ces résultats. Indépendamment de la nature de la sonde injectée (avidine ou anticorps) (*données non montrées*), aucune variation significative entre les différents composés n'a été décelée.

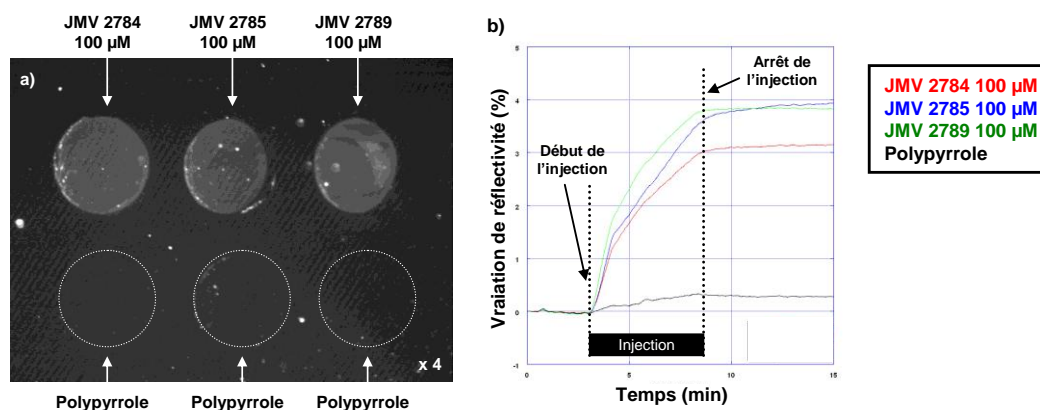


Figure 45 : a) Image de fluorescence d'une puce biotine révélée à la SAPE – b) Cinétiques obtenues après injection de 100 nM d'anticorps monoclonal anti-biotine sur une puce biotine

De manière analogue aux produits biotinylés, les composés porteur de l'antigène type FITC ont été immobilisés puis testés par microscopie de fluorescence et par imagerie SPR (figure 46). Clairement, selon les deux modes de détection employés, il apparaît que le composé ayant le bras le plus long soit le meilleur répondeur ; un signal spécifique supplémentaire de 50 % est obtenu par ajout de 5 atomes de carbone.

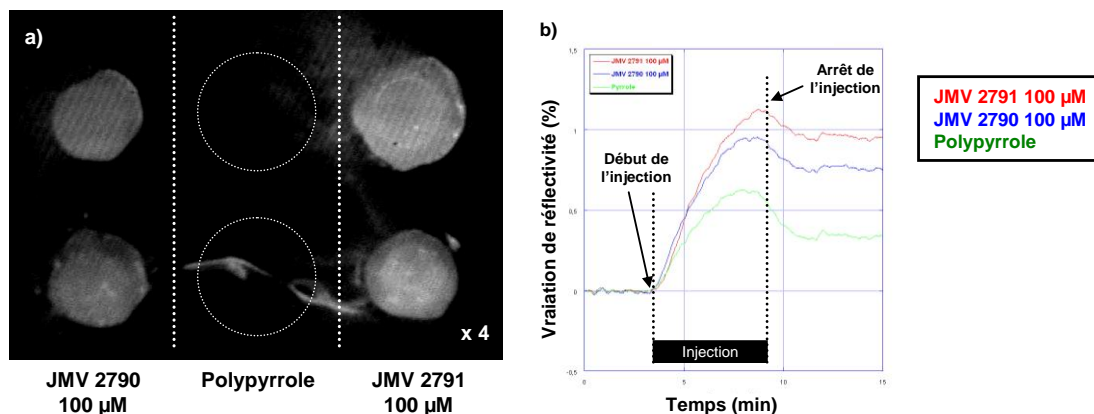


Figure 46 : a) Image de fluorescence d'une puce FITC révélée en 3 étapes – b) Cinétiques obtenues après injection de 100 nM d'anticorps monoclonal anti-FITC sur une puce FITC

Quant aux résultats obtenus avec les composés à sonde dinitrophényle (figure 47), ils mettent en évidence que la longueur de chaîne alkyle est un facteur influençant la quantité d'antigène disponible pour la reconnaissance biologique. Plus précisément, le bras le plus long ($n = 7$) est celui qui fournit le meilleur signal fluorescent. Enfin, comme mentionné dans l'étude préliminaire, l'essai en imagerie SPR n'a pas été concluant.

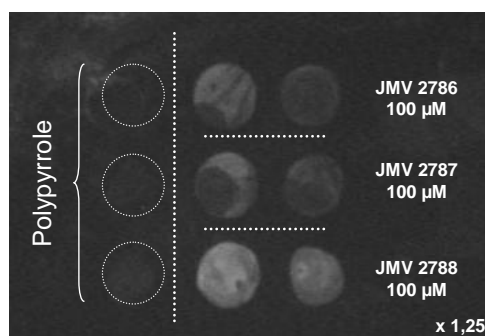


Figure 47 : Image de fluorescence d'une puce dinitrophényle révélée en 3 étapes

Au final, l'éloignement des sondes par rapport à la surface du polymère est un facteur ayant une influence variable en fonction de l'antigène étudié. Aussi, la tendance montre que les chaînes les plus longues semblent favoriser la biodisponibilité des sondes en surface.

1.2.2. Série n°2

Suite aux remarques exposées ci-avant, une seconde série de composés a été synthétisée, l'objectif étant d'augmenter la longueur totale du bras sonde-polymère (figure 48). Pour se faire, une autre stratégie de synthèse faisant appel à un couplage *via* l'acide 6-(*N*-pyrrol)hexanoïque a été mise au point. La plus grande facilité d'obtention a permis de pallier

aux difficultés de synthèse rencontrées dans la première série et de potentiellement l'appliquer à une large galerie de molécules sondes. A noter que compte-tenu de la non reproductibilité des résultats obtenus avec la sonde dinitrophényle, le composé analogue n'a pas été intégré dans l'étude.

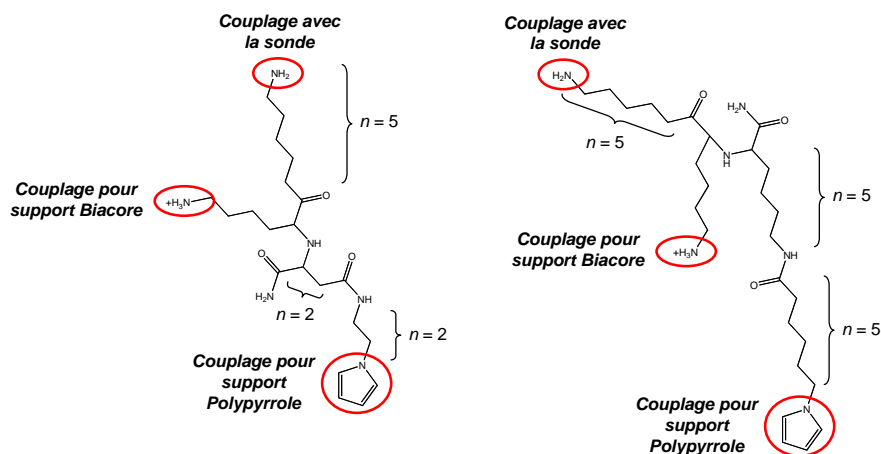


Figure 48 : Etude comparative de la structure des bras espaceurs sonde-polymère suivant les stratégies de synthèse *via* pyrrole amine (a) et *via* pyrrole acide (b)

Code de la molécule	Longueur de bras	Type de sonde
JMV 2981	5	Biotine
JMV 3088	5	Fluorescéine

Tableau 5 : Différentes sondes testées appartenant à la série n°2

De la même manière que pour les essais figurant en série n°1, après immobilisation sur support doré, la disponibilité de la biotine a été évaluée par microscopie de fluorescence ainsi que par imagerie SPR (figure 49). A l'évidence, la nouvelle stratégie d'immobilisation est nettement plus efficace que la précédente ; pour les deux méthodes de transduction, on observe qu'il faut une concentration dix fois plus faible en sonde pour obtenir un résultat équivalent à l'analogue ($n = 5$) de l'ancienne série. A priori, la longueur du bras espaceur pourrait être responsable de cette meilleure réponse. Cependant, à ce stade de l'étude, on ne peut exclure le rôle éventuel de la charge positive de la lysine, alors ancrée plus loin du polymère ; le polypyrrole étant un polymère conducteur chargé positivement ^[1], la fonction amine primaire de la lysine pourrait servir d'écarteur par rapport à ce polymère.

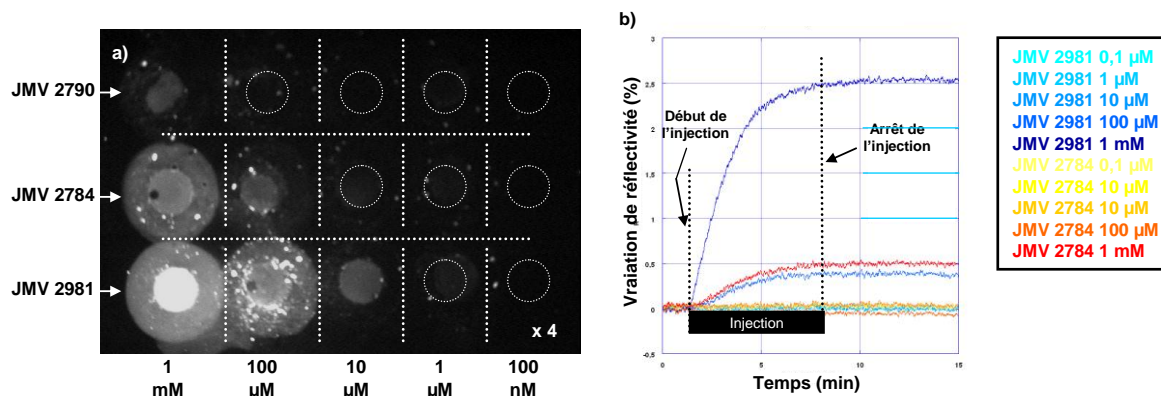


Figure 49 : a) Image de fluorescence d'une puce biotine / FITC révélée par la SAPE – b) Cinétiques obtenues après injection de 100 nM d'anticorps monoclonal anti-biotine sur une puce biotine

Quant aux essais menés avec l'analogue porteur de la sonde FITC, les résultats sont reportés en figure 50. L'imagerie SPR indique clairement que la nouvelle stratégie d'immobilisation n'apporte pas davantage de sensibilité au niveau du capteur pour des concentrations initiales en sondes identiques. L'hypothèse décrite précédemment concernant la position de la lysine peut par conséquent être écartée. D'autre part, la spécificité de l'interaction sonde-cible est relativement importante puisqu'aucune variation de signal n'est observée sur la zone pourvue de biotine.

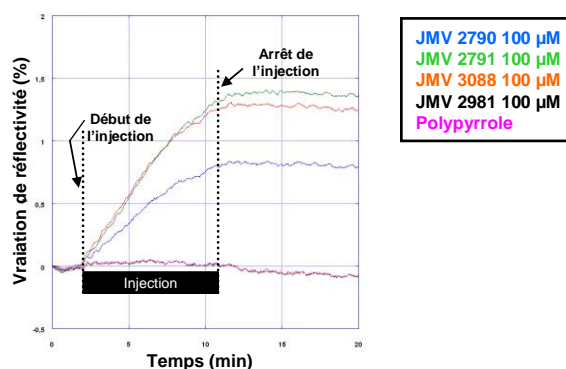


Figure 50 : Cinétiques obtenues après injection de 100 nM d'anticorps monoclonal anti-FITC sur une puce FITC/biotine

1.2.3. Bilan des essais

L'exploration de deux séries de bras espaceurs a mis en évidence deux évolutions distinctes du signal en fonction de la sonde étudiée. La solubilité ayant a priori peu changé entre les deux séries testées, la différence de réactivité est directement liée à la nature de l'interaction antigène-anticorps. Plus précisément, on peut attribuer cette différence à l'encombrement

stérique spécifique aux partenaires biologiques, la biotine nécessitant alors plus d'espace pour être reconnue par son anticorps que la sonde fluorescéine. Aussi, la sonde dinitrophényle nécessite une longueur de bras minimale de 17 liaisons (figure 44) afin d'être reconnue efficacement par son anticorps. Ceci confirme l'intérêt d'un bras espaceur adapté entre le polymère et la sonde afin d'écarter cette dernière du support.

Parallèlement, des mesures cinétiques avec ces sondes ont été enregistrées avec l'appareil commercial Biacore[®]. Les données recueillies n'ont indiqué aucune différence de réactivité entre les différents bras proposés dans l'étude ci-dessus. De fait, le bras de la série n°2, c'est-à-dire le plus long, a été intégré à l'ensemble des composés de la future chimiothèque à cribler.

1.3. Formulation d'un nouveau milieu de polymérisation

Outre la longueur de l'espaceur sonde-polymère, la solubilité des sondes pyrrolées pose un problème dans l'électrosynthèse du capteur à « petits ligands ». En effet, les composés pyrrolés ne sont solubles en milieu aqueux que jusqu'à une concentration de l'ordre de 100 μM ; au-delà, un précipité se forme après centrifugation de la solution. Or, de par la diversité chimique des sondes à cribler ultérieurement, un milieu « générique » capable de surmonter ces variations de propriétés a dû être formulé.

1.3.1. Critères chimiques

Jusqu'ici, le milieu de polymérisation employé a été le mélange classiquement utilisé au laboratoire. Compatible avec les oligonucléotides, les sucres, les peptides, et les protéines, ce milieu aqueux ne permet qu'une solubilisation des produits hydrophiles. Afin d'obtenir la solubilisation des composés hydrophobes ainsi qu'un meilleur rendement d'incorporation de ces derniers dans les films synthétisés, le principe a consisté en l'ajout de solvants organiques dans la formulation du milieu de polymérisation.

Etant donné que les étapes de synthèse chimique sur support se font dans le diméthylsulfoxyde (DMSO), un solvant dipolaire ($\mu = 4,3 \text{ D}$) aprotique ($\epsilon_r = 49$) très puissant, le choix d'intégrer ce dernier dans la formulation du milieu d'immobilisation a été retenue. Or, à ce jour, l'influence de la présence de DMSO durant l'électrospotting n'avait encore jamais été étudiée. Cela se justifie d'autant plus que les quantités obtenues par chimie

combinatoire restent relativement faibles, de l'ordre du milligramme ; par conséquent, vu les concentrations efficaces nécessaires pour détecter une interaction, la proportion de DMSO à intégrer va devenir non négligeable (10 % pour un greffage 1 mM).

1.3.2. Critères physiques

Tout comme le milieu de référence préalablement utilisé, le futur milieu de polymérisation doit permettre d'obtenir de façon reproductible un biocapteur sensible *via* l'imagerie SPR. Concrètement, conjointement à la mise en place de la formulation, la vitesse d'électrosynthèse du polypyrrole peut être affectée. Or, comme schématisé en figure 51, l'épaisseur des dépôts est un paramètre régissant la sensibilité en imagerie SPR. Afin de maîtriser la quantité de matière déposée, le temps de polymérisation (*cf. introduction*) sera modulé.

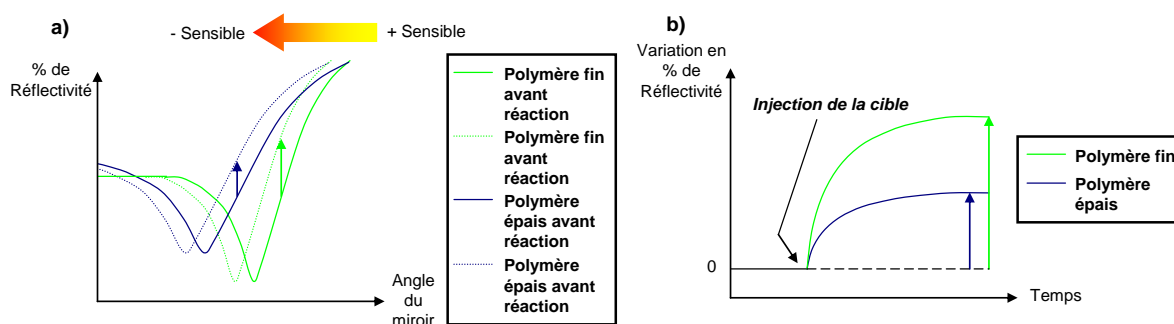


Figure 51 : Représentation schématique de l'influence de l'épaisseur des dépôts de polymère à la surface du prisme doré – a) Courbes de plasmon – b) Cinétiques correspondantes

De plus, la quantité de polymère déposée doit être suffisamment similaire d'une zone à l'autre afin de pouvoir regrouper, à angle de travail fixe, toutes les zones d'analyse dans la fenêtre sensible de l'imageur SPR (25 à 45 % de réflectivité).

En dehors de la compatibilité des dépôts avec l'imageur SPR, la morphologie de ces derniers nécessite d'être homogène, et la plus plane possible. Enfin, la suroxydation du film de polymère ne doit pas se produire auquel cas la structure du film de polypyrrole risque d'être endommagée^[129].

Toujours pour préserver la qualité du polymère néoformé, le séchage du milieu de spotting doit se faire lentement et de manière limitée ; la cristallisation du sel support pour l'électrochimie sur le polymère risquerait alors de « craqueler » les plots.

1.3.3. Les sondes utilisées

La mise au point d'un nouveau milieu de polymérisation étant suffisamment complexe à gérer, les sondes « petits ligands » préalablement utilisées n'ont pas été retenues au profit de sondes oligonucléotidiques (ODN) disponibles en grandes quantités. Aussi, l'expertise acquise au sein du laboratoire permet d'avoir un recul suffisant pour évaluer la qualité des dépôts ainsi produits ^[4, 9]. De plus, tout comme les sondes « petits ligands », les ODN sont des molécules ne se dénaturant pas au contact de solvants organiques. Enfin, avec les sondes ODN, le principe de spécificité est facilement accessible puisqu'il repose simplement sur la notion de complémentarité entre la séquence sonde et la séquence cible.

Les principes de détection de l'hybridation suivant les deux techniques majeures employées au laboratoire sont présentés en figure 52. Brièvement, pour l'imagerie SPR, le support fonctionnalisé avec la sonde ODN réagit avec la cible ODN de séquence complémentaire. Pour l'imagerie par épifluorescence, la séquence ODN complémentaire biotinylée en position 5' est incubée sur le biocapteur. Dans une dernière étape, la SAPE va s'accrocher si la cible biotinylée est présente à la surface.

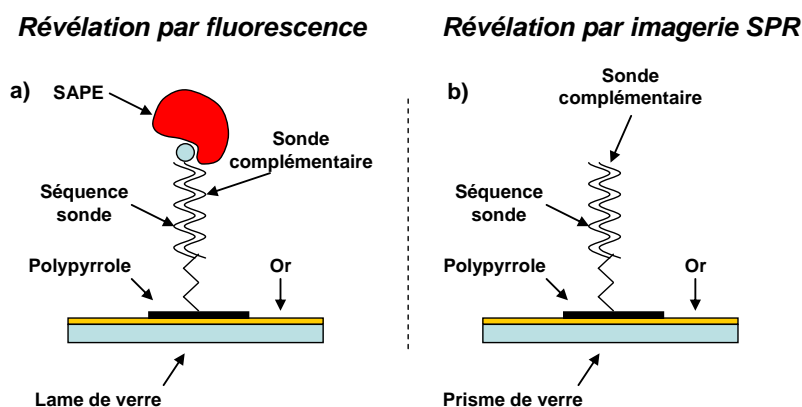


Figure 52 : Représentation schématique des procédés de révélation d'une puce à ADN *via* la microscopie de fluorescence (a), et *via* l'imagerie SPR (b)

1.3.4. Influence des solvants organiques

Etant donné que les produits issus de la chimie combinatoire vont être dissous dans le DMSO, la conséquence de l'ajout de ce solvant dans le milieu d'immobilisation doit être évaluée. Plus exactement, comme mentionné en II.1.3.1., une concentration initiale de greffage à 1 mM induit une teneur de 10 % (v/v) en DMSO dans le milieu de polymérisation. Ainsi, l'expérience reportée en figure 13a a consisté, pour une même sonde ODN, en l'ajout de 10 % DMSO dans le milieu initialement utilisé. Comparativement à l'intensité observée pour le milieu sans DMSO, l'introduction du solvant organique provoque une perte de signal

importante, de l'ordre de 30 % (figure 53b). Une expérience ultérieure a montré par ailleurs que cette perte de signal spécifique est décroissante avec l'augmentation de la teneur en DMSO (*données non montrées*). A 60 % (v/v), aucun polymère n'a été déposé sur la surface dorée.

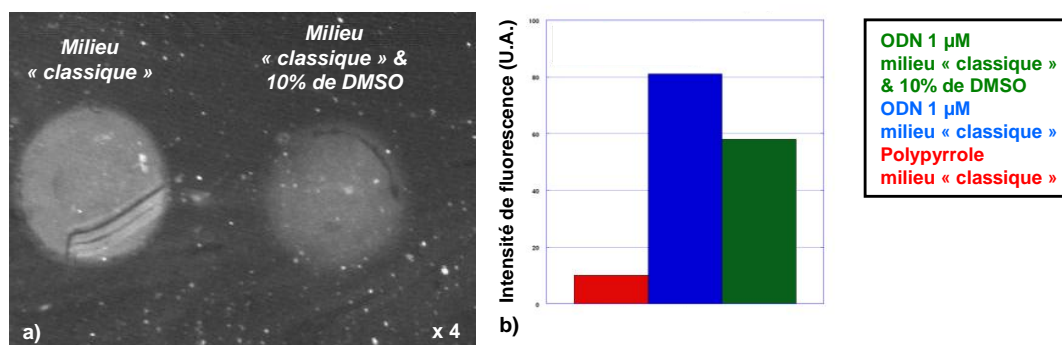


Figure 53 : a) Image de fluorescence d'une puce ADN indiquant l'influence du DMSO sur la qualité des dépôts, la sonde ODN étant la même pour chacune des zones – b) Graphique comparatif de l'intensité de fluorescence (en U.A.) des différentes zones de la puce

Devant ces résultats, plusieurs paramètres ont alors été explorés pour déterminer la raison d'une telle diminution de la sensibilité du film ainsi produit. Les charges enregistrées au cours de l'électrospotting sont décroissantes avec l'augmentation de la proportion de DMSO ajoutée. Outre une permittivité plus faible du DMSO ($\epsilon_r = 49$) par rapport à l'eau ($\epsilon_r = 80$), l'explication pourrait tenir d'une cinétique d'électrosynthèse amoindrie. Or, dans le cas de solutions isorésistives, pour un même temps de polymérisation, des charges identiques à celles observées dans le milieu originel ont été recueillies (*données non montrées*). En conclusion, ceci tend à indiquer que les amorces de polymérisation localisées à proximité de la surface sont probablement davantage solubilisées dans le milieu de polymérisation, empêchant ainsi le dépôt de se produire correctement.

De cette première étude, il ressort que le DMSO est un solvant assez problématique pour obtenir un biocapteur efficace. Ainsi, la formulation finale du milieu de polymérisation ne contiendra que des quantités minimisées en DMSO. Or, afin de pallier à cette limitation quantitative, l'ajout d'un second solvant organique polaire aprotique a été décidé : l'acétonitrile. Le choix de celui-ci repose à la fois sur sa capacité à dissoudre des produits organiques variés et sur la compatibilité avec l'électrosynthèse du pyrrole^[1]. D'autre part, les stocks de pyrrole étant conservés dans ce solvant pur, après dilution, les milieux d'immobilisation finaux en contiennent systématiquement 2 % (v/v).

Telle que l'indique l'expérience en figure 54, l'addition de 20 % (v/v) d'acétonitrile dans le milieu de polymérisation ne provoque pas de variation de la quantité de signal après visualisation par microscopie de fluorescence.

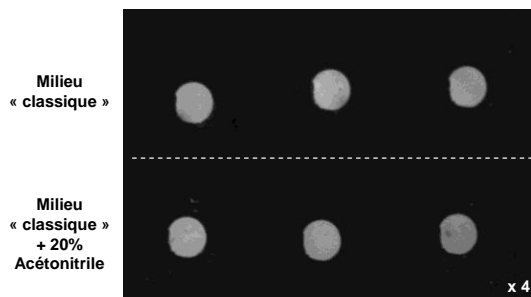


Figure 54 : Image de fluorescence d'une puce ADN comportant la même sonde ODN dans chacune des zones ; l'acétonitrile n'influe pas sur le signal fluorescent observé

Pour autant, l'acétonitrile ne représente pas le solvant idéal car de par sa très faible tension vapeur (9,71 kPa à 25°C) il induit le séchage de la goutte déposée sur le support doré après électrosynthèse et par suite la détérioration du polymère. A contrario, le DMSO possède une tension vapeur relativement plus élevée (59,4 kPa à 25°C) ce qui peut suffire à contrecarrer le séchage trop rapide de la solution.

Par conséquent, l'obtention d'une formulation comportant une quantité maximale de solvant organique passe par l'addition simultanée d'acétonitrile et de DMSO dans le milieu aqueux originel. Des mélanges « ternaires » eau / DMSO / acétonitrile ont donc été constitués afin de déterminer les proportions finales en chacun de ces solvants.

Durant les essais menés, dès lors que la quantité d'acétonitrile et de DMSO dépassent conjointement 30 %, la solution devient biphasique à température ambiante. De fait, la quantité maximale totale de solvant organique ne pourra donc pas dépasser 60 % (v/v).

En figure 55, après immobilisation d'une sonde ODN puis révélation de celle-ci, l'expérience menée par microscopie de fluorescence permet de comparer les différentes solutions d'intérêt pour la formulation finale. De même que précédemment, l'ajout croissant de DMSO induit une diminution de l'intensité de fluorescence observée sur le plot de polypyrrole-ODN. D'autre part, par comparaison entre les figures 55a et 55b, l'addition de 30 % (v/v) en acétonitrile semble aussi jouer un rôle délétère sur la sensibilité du capteur. De façon assez surprenante, les plots de polypyrrole synthétisés dans le milieu 20 % DMSO / 20 % acétonitrile fournissent un signal plus élevé que ceux produit dans le milieu initial servant de référence. Enfin, morphologiquement parlant, la fluorescence apparaît plus granuleuse pour

les polymères synthétisés dans les nouvelles formulations. Probablement les plots de polypyrrole obtenus sont plus rugueux du fait de la quasi-absence de glycérol dans la solution de spotting, suite à la dilution du milieu initial.

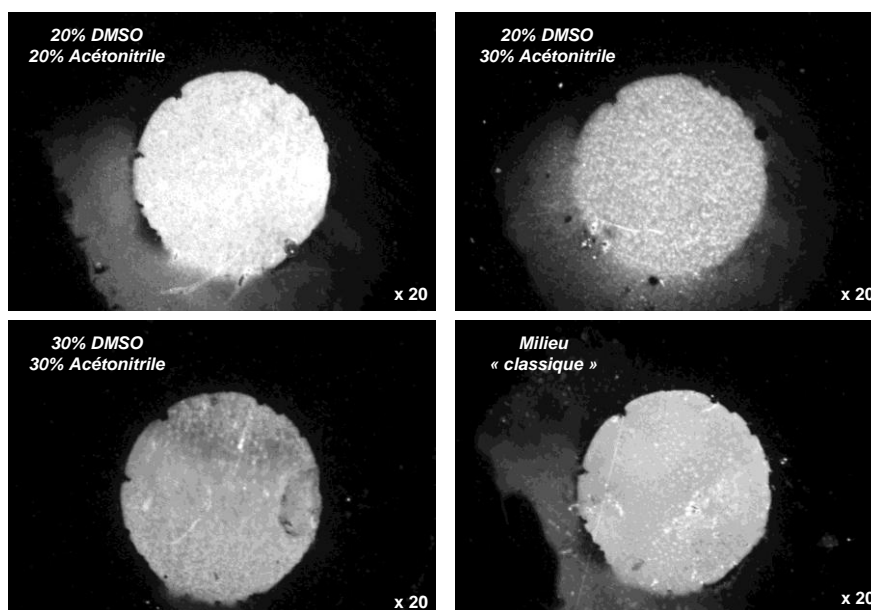


Figure 55 : Images de fluorescence sur une puce ADN ; comparatif entre les différentes proportions relatives en solvants organiques

1.3.5. Incorporation d'additif

L'épaisseur et la planéité du polymère étant nécessaires pour une détection sensible *via* l'imagerie SPR, l'incorporation de quantités adéquates de glycérol dans la solution d'immobilisation a été étudiée. En effet, le glycérol possède un coefficient de viscosité élevé, ce qui contribue à limiter la diffusion des espèces au voisinage de la surface dorée durant l'électrosynthèse du polymère^[130]. Selon les résultats de la figure 56, l'addition de 20 % (v/v) en glycérol provoque d'une part une nette diminution de la sensibilité du capteur, et d'autre part une disparition de la granulation observée ci-avant.

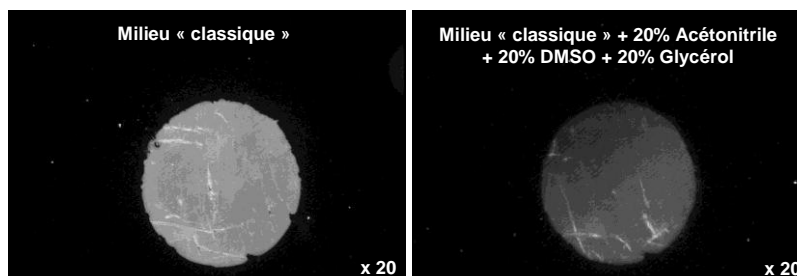


Figure 56 : Images de fluorescence sur une puce ADN ; influence de l'addition de 20 % de glycérol

20 % de glycérol représentant une quantité néfaste à l'élaboration du biocapteur, il a été envisagé de diminuer celle-ci afin de pouvoir homogénéiser le dépôt sans pour autant léser de manière trop importante la biodisponibilité des sondes. Ainsi, suivant l'expérience reportée en figure 57, avec 1 % (v/v) de glycérol ajouté au milieu originel, ces critères ont été remplis.

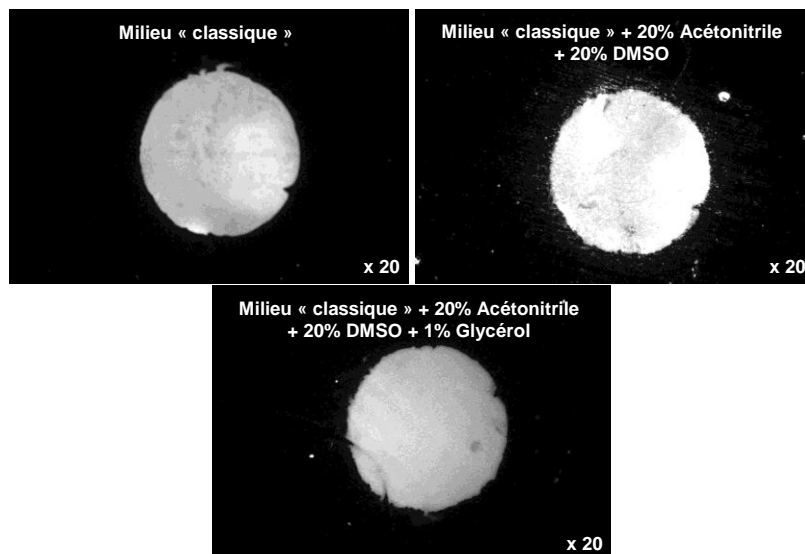


Figure 57 : Images de fluorescence sur une puce ADN ; influence de l'ajout de 1 % de glycérol

Par ailleurs, le glycérol a une tension vapeur très élevée et est donc un constituant qui limite l'évaporation de la solution d'immobilisation.

1.3.6. Sels support

En dehors des solvants, le milieu de polymérisation nécessite la présence d'un électrolyte support pour réaliser la réaction électrochimique à la surface d'or. Lors de la polymérisation du pyrrole, l'anion de l'électrolyte vient s'insérer dans la chaîne de polypyrrole alors chargée positivement sous forme de polarons (figure 58) ^[131]. Or, l'influence de la nature de l'anion ou « dopant » n'a encore jamais été étudiée jusque-là au laboratoire.

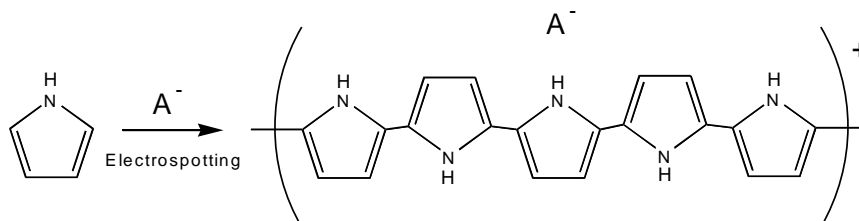


Figure 58 : Intégration de l'anion de l'électrolyte support (A^-) dans la chaîne de polypyrrole ^[131]

Ainsi, une large variété de paires d'ions (tableau 6) non électroactifs a été utilisée afin d'identifier les paramètres pertinents pour l'obtention d'un biofilm le plus sensible possible.

Anion	Cation
Cl ⁻	Li ⁺ / Na ⁺ / K ⁺ / Ca ²⁺ / Mn ²⁺ / Et ₄ N ⁺
ClO ₄ ⁻	Li ⁺ / K ⁺ / Et ₄ N ⁺
SO ₄ ^{2-*}	NH ₄ ⁺ / Met ₄ N ⁺
BF ₄ ⁻	Met ₄ N ⁺ / Et ₄ N ⁺ / But ₄ N ⁺
PF ₆ ⁻	Na ⁺
BPh ₄ ^{-*}	Na ⁺
Tosylate ^{-*}	Na ⁺

Tableau 6 : Inventaire des différents sels support testés au cours de l'étude (* : aucun dépôt de polymère obtenu sur la surface dorée)

A partir de cette exploration, il ressort que l'encombrement stérique de l'anion joue un rôle majeur sur la morphologie des films synthétisés ; en effet, les courbes de plasmon obtenues respectivement pour chacune des ces combinaisons d'ions montre que plus l'anion est volumineux, plus l'épaisseur du plot synthétisée est importante (*données non montrées*). Les films les plus « compacts » sont ceux obtenus en présence d'anions chlorure, suivi des ions perchlorate. En présence d'ions sulfate, le polymère adopte une hétérogénéité de surface assez importante. Enfin, lorsque l'anion devient très encombrant (*i.e.* tosylate et tétraphénylborate) aucun dépôt de polypyrrole ne se produit à la surface dorée. L'exploration par microscopie de fluorescence montre que la nature de l'anion ne paraît cependant pas déterminante vis-à-vis la disponibilité des sondes oligonucléotidiques.

Outre l'importance de l'anion, le cation lui aussi influe sur l'épaisseur du polymère de façon croissante avec sa valence ; les films les plus épais sont ceux obtenus avec le calcium et le manganèse (*données non montrées*). De plus, contrairement à l'anion, la nature du cation est déterminante sur la biodisponibilité des sondes ODN à la surface du polymère. Plus précisément, les ions de type ammonium et le lithium sont ceux fournissant le meilleur signal (figure 59). Au final, les couples d'ions retenus sont alors le chlorure de tétraéthylammonium, le perchlorate de tétraéthylammonium et le perchlorate de lithium.

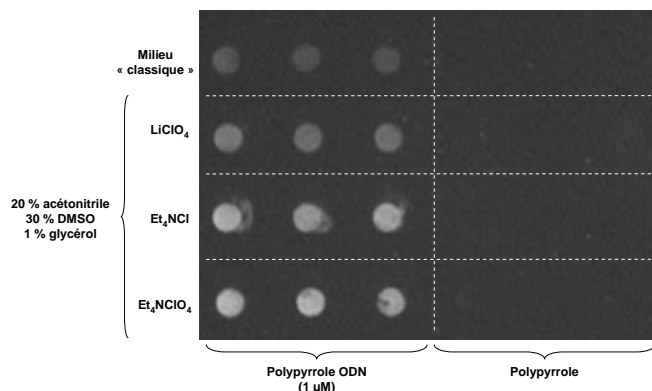


Figure 59 : Image de fluorescence d'une puce à ADN avec la même sonde ODN ; comparatif entre les formulations les plus performantes pour l'imagerie SPR

D'autre part, l'électrolyte support se doit d'être compatible avec une miniaturisation, inévitable avec l'augmentation de la parallélisation sur les puces à « petits ligands ». Or, selon les travaux d'Emeline Descamps, la miniaturisation du procédé d'immobilisation en présence d'ions chlorure provoque parfois la solubilisation de l'électrode d'or, par formation de chlorure d'or AuCl_3 . C'est pourquoi le chlorure de tétraéthylammonium a été écarté des choix restants. Quant au perchlorate de tétraéthylammonium, il a été employé avec succès dans ces mêmes essais d'immobilisation miniaturisés par plumes ^[132]. Pour ce sel ainsi que pour le perchlorate de lithium, les solutions conservées à -20°C fournissent des signaux stables un an après leur reconstitution (*données non montrées*).

La sélection finale s'est donc portée sur le perchlorate de lithium car il est largement utilisé en électrochimie et a indiqué une bonne reproductibilité. Ainsi, selon les critères préétablis, la composition du nouveau milieu d'immobilisation est donc constituée de 20 % d'acétonitrile, de 30 % de DMSO, de 1 % de glycérol, de 49 % d'eau et de 100 mM de LiClO_4 .

1.3.7. Validation finale par SPRi

La composition du milieu étant fixée, une adaptation finale de la séquence d'électrospotting doit être effectuée de sorte à obtenir des épaisseurs de polymères adéquates pour l'imagerie SPR, la technique de détection finale dans le cadre du projet de criblage à « petits ligands ». Pour ce faire, différents temps de polymérisation ont été testés, variant de 50 à 400 ms (figure 60). Ici, en supplément du polypyrrole seul, une deuxième séquence ODN (M5) a été insérée dans la matrice afin de vérifier la spécificité du signal biologique lu. D'après les images de fluorescence en figure 60a et 60b, le signal d'hybridation dépend de la nature de la sonde

immobilisée et son intensité varie de manière croissante avec les concentrations initiales en ODN pyrrolés. De la même manière, plus le temps de polymérisation appliqué est long, plus l'intensité de fluorescence lue est importante, ce qui correspond à une quantité totale de sondes immobilisée supérieure.

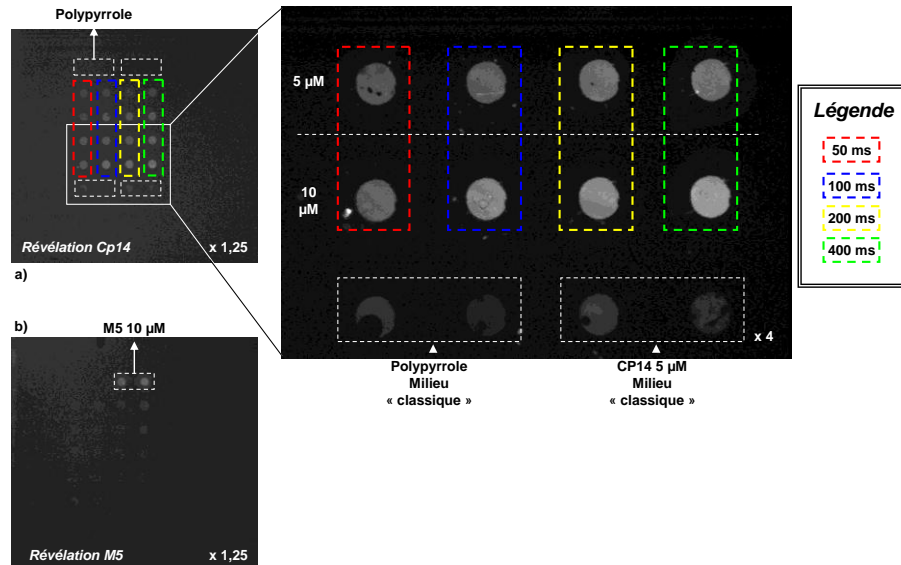


Figure 60 : Image de fluorescence d'une puce à ADN avec deux sondes ODN ; vérification de la spécificité des signaux biologiques sur le capteur – a) Révélation de la sonde Cp14 observée sous deux grossissements b) Révélation de la sonde M5

Le même support utilisé pour l'imagerie SPR a fourni l'image différentielle présentée en figure 61 après injection de la cible Cp14 à 250 nM. Tout comme pour la détection par fluorescence, plus la concentration initiale en sonde est élevée, plus le biocapteur est sensible. D'autre part, la variation de réflectivité est plus importante pour les zones ayant reçu un temps de polymérisation de 100 ms ; comme décrit en II.1.3.2, la sensibilité en imagerie SPR est, entre autres paramètres, dominée par l'épaisseur du polymère déposé. L'expérience confirme par ailleurs que la nouvelle formulation apporte une sensibilité supérieure à celle observée par rapport au « milieu classique » utilisé jusqu'alors au laboratoire ; la variation maximale de signal observée est de 1 %, soit le double de celle enregistrée avec le milieu originel.

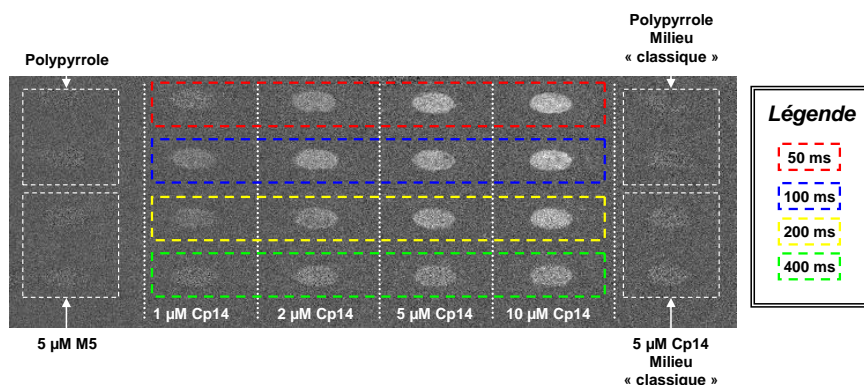


Figure 61 : Image différentielle obtenue par imagerie SPR d'une puce ADN après injection de la cible ODN Cp14 à 250 nM ; confirmation de la spécificité du signal d'hybridation, et comparatif de la sensibilité entre le milieu « classique » et le nouveau milieu d'immobilisation

Cette étude montre donc sans ambiguïté que la formulation du nouveau milieu d'immobilisation a atteint les objectifs précités en II.1.3.1 et II.1.3.2 : sensibilité par l'imagerie SPR, reproductibilité, bonne conservation, le tout avec la teneur maximale possible en solvants organiques. Cependant, la possibilité de miniaturisation avec ce milieu doit être envisagée dans le cadre d'une augmentation de la densité des plots sur le support SPRi.

1.4. Densification des puces

Techniquement, l'augmentation du nombre de plots de polymère sur une même superficie nécessite soit une diminution de l'espacement des zones les unes par rapport aux autres, soit une miniaturisation des dépôts synthétisés.

1.4.1. Problèmes posés

Dans un premier temps, il a été décidé de diminuer l'intervalle entre chaque plot au moyen de l'automate Polypotter II. Or, rapidement, un problème de mouillage de la surface est survenu (figure 62), limitant ainsi toute densification sous risque d'une contamination entre plots. A priori, l'agent mouillant responsable est l'acétonitrile. D'autre part, après prélèvement de la solution à immobiliser, celle-ci a tendance à « fuir » de la cellule électrochimique. En conséquence, la contre-électrode de platine n'est plus immergée dans la solution, empêchant l'impulsion électrique d'être appliquée.

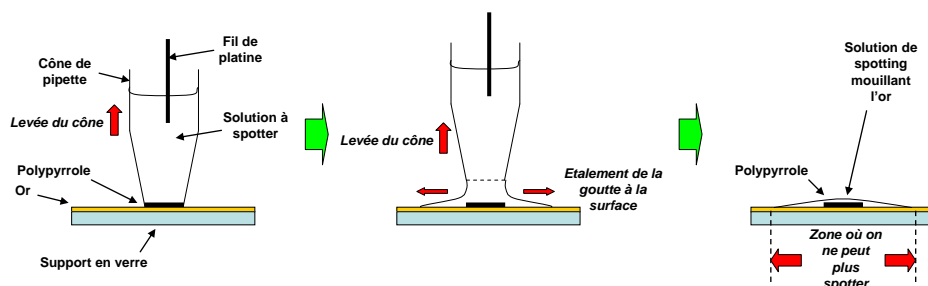


Figure 62 : Représentation schématique du principe de mouillage du milieu à polymériser sur la surface dorée ; cas d'une surface non traitée

1.4.2. Fonctionnalisation par les alcane-thiols

Pour pallier au souci de mouillage aléatoire, l'idée a été de rendre la surface dorée uniformément moins mouillable. C'est pourquoi une fonctionnalisation chimique préalable de la surface a été proposée (figure 63). Concrètement, une solution de piranha vient d'abord décaper toute trace de produit organique sur l'or. Puis, le support est immergé dans une solution de dodécane-thiol dilué dans l'éthanol. Dès lors, les atomes de soufre viennent complexer les atomes d'or localisés à la surface du support ^[133]. Enfin, le support est rincé abondamment à l'eau.



Figure 63 : Fonctionnalisation préalable de la surface dorée

La surface ainsi obtenue est très hydrophobe, à l'image de la forme arrondie que prennent les gouttes d'eau lors de l'étape finale de rinçage. Au cours de l'électrospotting, les liaisons or / soufre se clivent ^[80, 134], laissant place à une électrode de travail fonctionnelle pour l'accrochage du polymère. Grâce à cette stratégie, la zone d'étalement de la goutte est confinée à la zone hydrophile néo-synthétisée, c'est-à-dire au polymère de polypyrrole (figure 64).

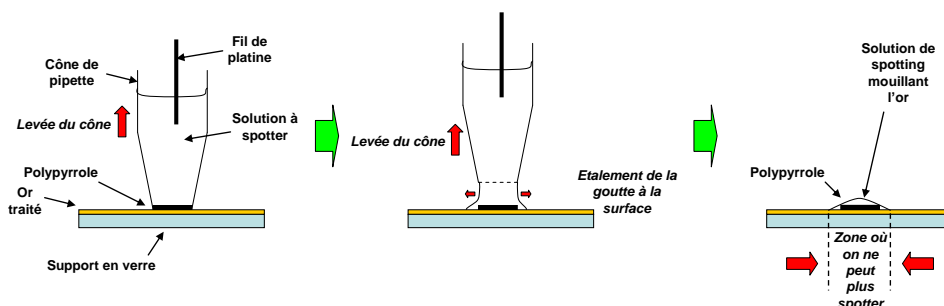


Figure 64 : Représentation schématique du principe de mouillage du milieu à polymériser sur la surface dorée ; cas d'une surface traitée par alcane-thiols

Aussi, ce traitement de surface n'influence ni la morphologie ni la sensibilité des dépôts (figure 65). Enfin, la couche d'alcane-thiols ne gêne pas la visualisation du polymère par imagerie SPR (*données non montrées*). Aucune contamination entre zones adjacentes n'a été observée jusqu'à un écartement centre à centre de 700 μm , ce qui correspond à la limite matérielle du procédé en cône de micropipette. En effet, au-deçà, le chevauchement des zones de dépôts peut endommager mécaniquement les plots voisins.

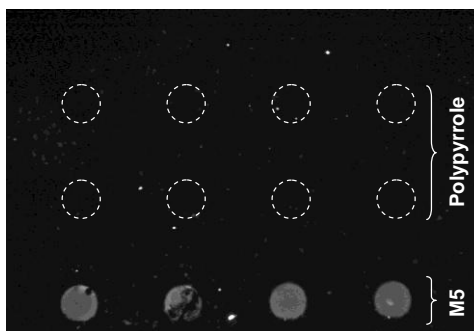


Figure 65 : Image de fluorescence d'une puce ADN préalablement traitée par alcane-thiols

1.4.3. Limites de la cellule électrochimique en cône

En termes de densité, avec cet appareillage, il est possible de créer des puces comportant 7 x 7 plots, soit 49 zones par support SPRi. Or, les futures chimiothèques à cribler comporteront davantage de composés. D'autre part, pour obtenir de telles matrices, le temps de manipulation est relativement long et les étapes manuelles, sujettes à des erreurs, sont nombreuses (3 par zone créée). Une automatisation alliée à une miniaturisation du procédé d'immobilisation a donc dû être mise en place afin de pallier à ces problèmes techniques.

1.4.4. L'automate à aiguilles

Pour se faire, un automate développé par la société Genoptics a été employé (figure 66). Brièvement, les déplacements de la cellule électrochimique mobile sont pilotés par ordinateur *via* un logiciel (AxSys). De manière analogue à l'automate de première génération, Polypotter II, la solution à polymériser est récupérée au niveau d'une zone de prélèvement puis est amenée à une zone de dépôt. Plus précisément, la zone de prélèvement ici est un support de type microplaque en plastique de 96 puits (8 x 12). Une fois l'électrospotting effectué, la cellule électrochimique est rincée dans un courant d'eau puis séchée sous un flux d'air comprimé. L'ensemble des opérations se déroulent sous atmosphère à humidité contrôlée ; ceci limite le séchage des gouttes présentes sur le polymère. Le temps nécessaire à l'exécution d'un cycle de synthèse est approximativement d'une minute.

La cellule électrochimique dessinée pour cet automate a été développée au laboratoire. Elle consiste en un tige métallique à embout creux ; c'est dans cette cavité que le liquide à polymériser vient se placer au moment du prélèvement ^[135]. Le diamètre de la cellule déterminant la taille des dépôts de polypyrrole synthétisés, ces derniers adoptent ici un diamètre de 200 μm contre 350 μm pour les cônes de p10 précédemment utilisés. Au final, il est possible de disposer jusqu'à 72 zones (8 x 8) de polymère sur un seul support SPRi.

Outre la densification des puces, la miniaturisation de la cellule permet de diminuer de manière importante la consommation en solution à immobiliser (200 fL / plot) ; ceci permet d'envisager plus d'essais par composé.

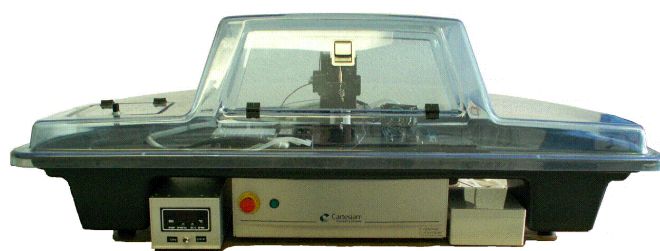


Figure 66 : Automate à aiguilles (Genoptics®) utilisé pour la miniaturisation des dépôts

La compatibilité du nouveau milieu de polymérisation avec ce procédé d'adressage a été testée. Suivant la figure 67, l'image SPR du support indique à la fois une bonne homogénéité et une bonne reproductibilité des dépôts de polymère pour un temps de polymérisation de 100 ms.

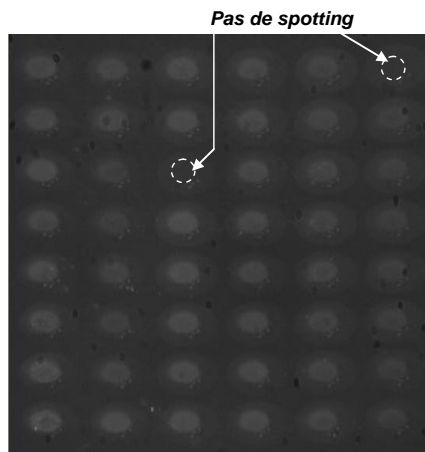


Figure 67 : Image brute par imagerie SPR d'une puce ADN comportant 46 plots de polymère ; le procédé d'adressage par aiguille avec le nouveau milieu d'immobilisation est reproductible

Du point de vue de la sensibilité à l'hybridation, les variations de réflectivité enregistrées sont comparables à celles obtenues *via* la technique d'immobilisation en cône (*données non montrées*). Aussi, la spécificité du signal lu est très élevée puisque qu'aucun signal parasite n'est apparu sur les zones « contrôles » après amplification du signal d'hybridation par la streptavidine (figure 68). Par conséquent, cette méthode d'adressage des sondes par aiguilles sera utilisée pour l'immobilisation de sondes « petits ligands ».

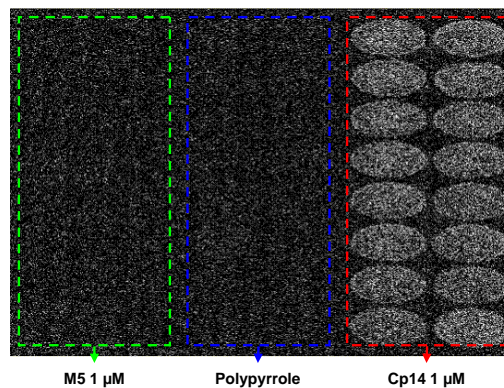


Figure 68 : Image différentielle obtenue par imagerie SPR d'une puce ADN après injection de la cible ODN Cp14 à 250 nM suivi d'une amplification par la streptavidine

1.4.5. Procédé en cours de développement

Toujours dans l'optique d'augmenter la parallélisation, deux possibilités sont envisageables. D'une part, il s'agit de travailler avec une cellule d'interaction SPRi d'un diamètre plus important. L'agrandissement de la surface immergée permettrait alors d'insérer davantage de zones de dépôt. Or, l'optique de l'appareillage SPRi devant être modifiée pour faire l'acquisition sur une telle superficie, une telle évolution est longue à mettre en place.

L'autre possibilité est de miniaturiser les dépôts de polymère de polypyrrole. Suivant les travaux de Descamps et al, cette approche a été explorée au moyen de plumes servant de contre-électrode ^[132]. Grâce à ce procédé, les dépôts obtenus ont un diamètre de l'ordre du micron. Par ailleurs, le milieu de polymérisation nouvellement formulé s'est montré adapté à l'immobilisation de sondes ODN *via* cette technologie. Ainsi, à moyen terme, des puces constituées de 1000 zones de dépôt voire davantage peuvent être envisagées. Malheureusement, cette technologie qui reste en cours de développement n'a pas pu être intégrée à aux essais figurant dans la suite de ce manuscrit.

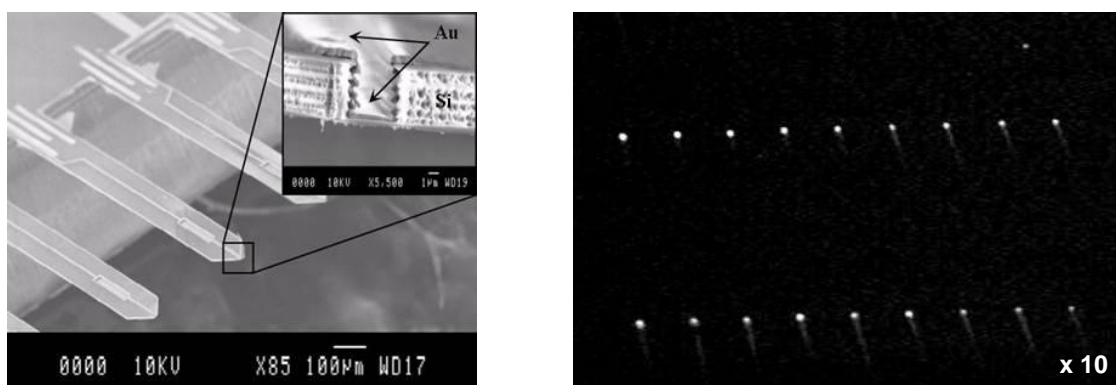


Figure 69 : a) Image MEB d'une plume électrochimique – b) Image par fluorescence d'une puces à ADN obtenue selon le procédé par plumes ^[132]

1.5. Etude finale de faisabilité

1.5.1. Comparatif de sensibilité

Après formulation du nouveau milieu d'immobilisation et vérification de sa compatibilité avec la nouvelle technologie d'adressage électrochimique, il s'agit maintenant de vérifier le gain éventuel de sensibilité des dépôts obtenus par imagerie SPR pour des composés modèles « petits ligands ». Comme l'indique l'étude comparative en figure 70, les variations de signal spécifique observées sur la puce fabriquée avec le nouveau milieu (figure 70b) sont bien supérieures à celles préalablement acquises dans le milieu originel (figure 70a) et ceux, pour une concentration en anticorps injectée dix fois plus faible. Grâce au nouveau procédé, 10 nM d'anticorps suffisent à obtenir une quasi-saturation du signal (4 à 5 % de variation de réflectivité). D'autre part, la hiérarchie de réactivité en fonction des bras est respectée entre les deux techniques employées. Enfin, contrairement au milieu originel, des essais de solubilisation jusqu'à 1 mM en sonde ont été possibles (*données non montrées*).

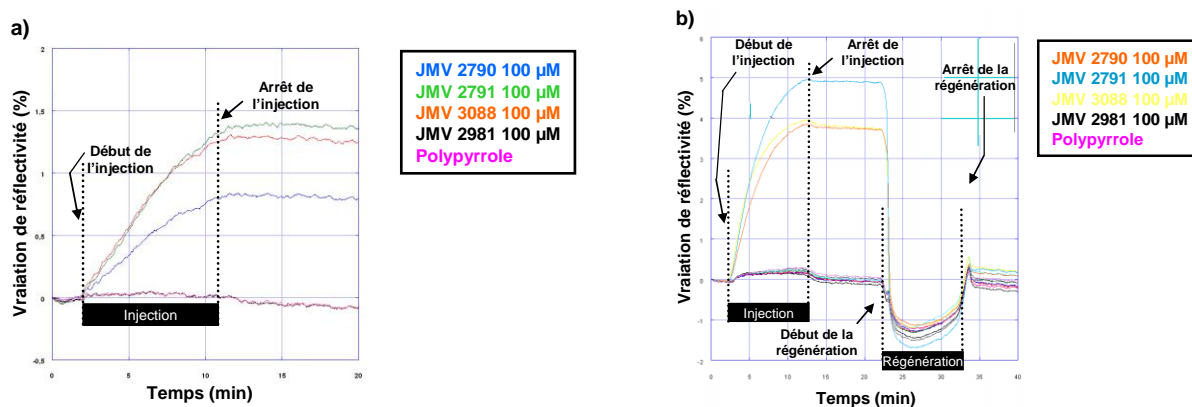


Figure 70 : a) Cinétiques obtenues après injection de 100 nM d'anticorps monoclonal anti-FITC sur une puce FITC/biotine fabriquée dans le milieu FDZ avec la cellule en cône – b) Cinétiques obtenues après injection de 10 nM d'anticorps monoclonal anti-FITC sur une puce FITC/biotine avec la cellule en aiguille

Une étude parallèle avec la biotine a donné des résultats similaires (*données non montrées*). Par conséquent, le problème de solubilisation des sondes « petits ligands » ne semble plus être un facteur limitant à l'élaboration du biocapteur.

1.5.2. Essais de dosage de la cible

Afin de compléter l'étude de sensibilité du capteur à « petits ligands », des essais de dosage en direct ont été menés avec la biotine. Les cinétiques observées en figure 71 indiquent d'une part que la quantité de signal SPR croît avec l'augmentation de la quantité de cible injectée. Aussi, suivant cette méthode directe de révélation de l'analyte (ici, l'anticorps monoclonal anti-biotine), la limite de détection sous ce format est de 5 nM. Or, une telle sensibilité permettrait d'envisager l'utilisation d'un tel capteur pour le dosage d'éléments biologiques dans les liquides biologiques. Pour cela, il suffirait d'immobiliser une sonde « petit ligand » ayant pour cible pharmacologique le produit à doser.

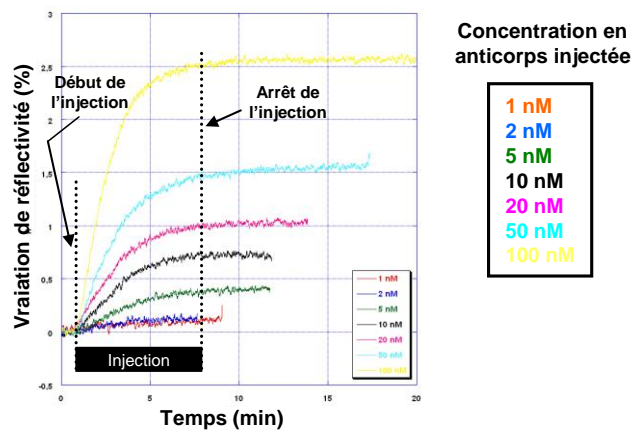


Figure 71 : Superposition des signaux cinétiques enregistrés selon différentes concentrations en cible anticorps monoclonal anti-biotine injectées sur une puce biotine

1.5.3. Essais de dosage de la sonde

Ici, le principe a été de mélanger 15 minutes avant injection une quantité fixe de cible pour une quantité de sonde variable. Ainsi, plus la sonde est concentrée dans le mélange initial, plus la quantité d'anticorps disponible pour réagir sur le capteur sera faible. Par conséquent, la variation de signal SPR évolue de manière inverse à l'augmentation de la quantité de sonde introduite dans l'échantillon. Suivant le modèle de Langmuir (figure 72), sous ce format analytique, pour obtenir un maximum de sensibilité, la quantité d'anticorps doit être typiquement faible, mais suffisamment élevée pour détecter un signal SPR analysable (0,5 à 1 %). Ainsi, la quantité d'anticorps adéquate estimée est de 8 nM dans le cas du dosage de la biotine. Les différents essais menés ont été reportés en figure 73. Suivant ces données cinétiques, par le biais d'un dosage indirect, 100 nM de biotine peuvent être détectés par imagerie SPR.

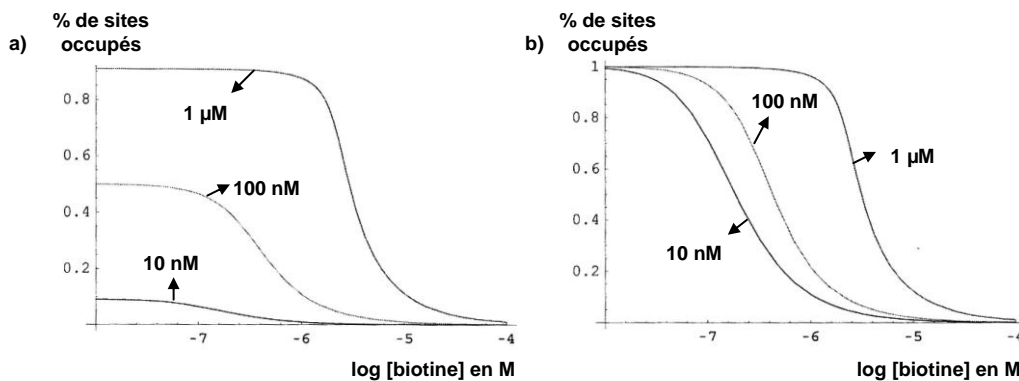


Figure 72 : Simulations suivant la théorie de Langmuir avec différentes concentrations en anticorps initiales (1 μM , 100 nM, 10 nM) considérant une constante d'équilibre de 10 nM entre antigène/anticorps (modélisation selon Arnaud Buhot) ; a) Représentation absolue – b) Représentation normalisée

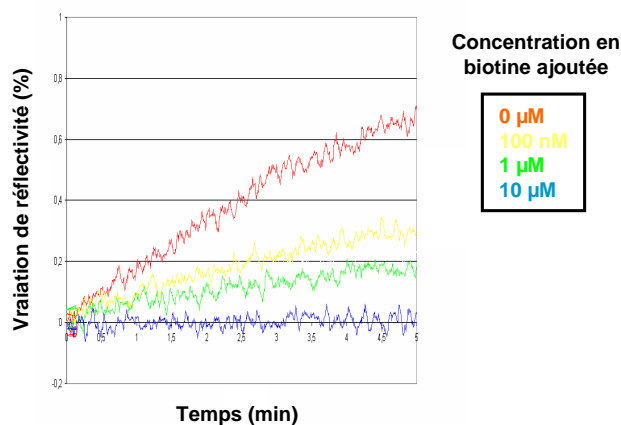


Figure 73 : Superposition des signaux cinétiques enregistrés selon différentes concentrations en sonde biotine injectées sur une puce biotine après incubation avec 8 nM d'anticorps anti-biotine

Bien que la sensibilité de ce type d'approche soit moins sensible, elle permet de doser par imagerie SPR des composés de bas poids moléculaire. En effet, l'imagerie SPR agissant telle une « balance », l'interaction de petites molécules à la surface du capteur resterait invisible. Une telle approche pourrait être élargie au dosage de molécules chimiques telles que les polluants de l'environnement ^[136] ou encore aux cas d'investigations toxicologiques dans des prélèvements biologiques.

En conclusion, l'ensemble des travaux réalisés jusque-là ont permis de démontrer la faisabilité d'une approche par « petits ligands » après immobilisation de ces derniers sur support doré suivant des modèles typiques antigène / anticorps. La deuxième étape du projet va consister à démontrer la faisabilité de l'approche « petits ligands » avec le modèle final d'étude, l'ARN polymérase II bactérienne. Pour se faire, la rifampicine, un composé hémisynthétique utilisé en thérapeutique comme antibiotique, va être employée comme sonde « modèle » pour cette cible pharmacologique.

2. Immobilisation d'un antibiotique « modèle », la rifampicine

Afin de démontrer la possibilité de détecter des interactions par imagerie SPR entre un composé analogue de la rifampicine et l'ARN polymérase II procaryote, il s'agit, dans un

premier temps, de valider les conditions expérimentales pour l'emploi de la cible pharmacologique en tant que cible. Une fois cette caractérisation effectuée, l'immobilisation de la sonde antibiotique a été envisagée.

2.1. Validation par SPRi de la cible pharmacologique

2.1.1. L'ARN polymérase « sonde »

Ici, le principe a été de choisir un modèle le plus proche possible de celui développé dans le chapitre II.1, c'est-à-dire une interaction de type antigène / anticorps (figure 74). Par analogie, l'antigène immobilisé est l'enzyme ARN polymérase II d'*Escherichia coli*. L'anticorps monoclonal anti-ARN polymérase utilisé, nommé 11D11, provient d'une collaboration avec Jean-Paul Léonetti (Université de Montpellier, Faculté de Pharmacie). Par ailleurs, la réactivité de cet anticorps vis-à-vis de la cible pharmacologique a été démontrée par des études menées par Martine Pugnère (Université de Montpellier, CPBS) ^[137, 138].

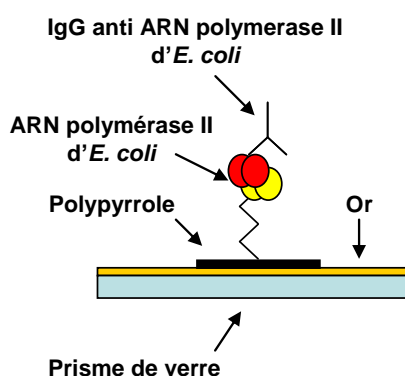


Figure 74 : Principe de la caractérisation de l'ARN polymérase II d'*E. coli* suivant le modèle antigène / anticorps

Pour immobiliser l'enzyme, celle-ci a été mélangée dans une solution de pyrroleundécanoate de *N*-hydroxysuccinimidyle en excès d'un rapport 20. Le mélange réactionnel a ensuite été filtré sur une colonne Vivaspin[®] MWCO 30 000 afin d'éliminer l'excès de bras pyrrolé n'ayant pas réagi avec l'enzyme fonctionnalisée. Cette dernière a alors été placée en présence de 20 mM de pyrrole dans le milieu classiquement utilisé au laboratoire pour l'électrospotting, compatible avec l'immobilisation de protéine. Conjointement, des zones « contrôle négatif » ont été ajoutées à la biopuce suivant la même stratégie de couplage et d'immobilisation : d'une part, l'anticorps 11D11 et d'autre part, le facteur σ_{70} fourni par Jean-Paul Léonetti (Université de Montpellier, Faculté de Pharmacie), un partenaire biologique naturel formant un complexe lors de l'étape d'initiation de la transcription. Après synthèse du

biocapteur, le support prisme a été placé dans l'imageur SPR. Suite à l'injection de l'anticorps anti-ARN polymérase II bactérienne, l'acquisition cinétique a fourni les courbes reportées en figure 75.

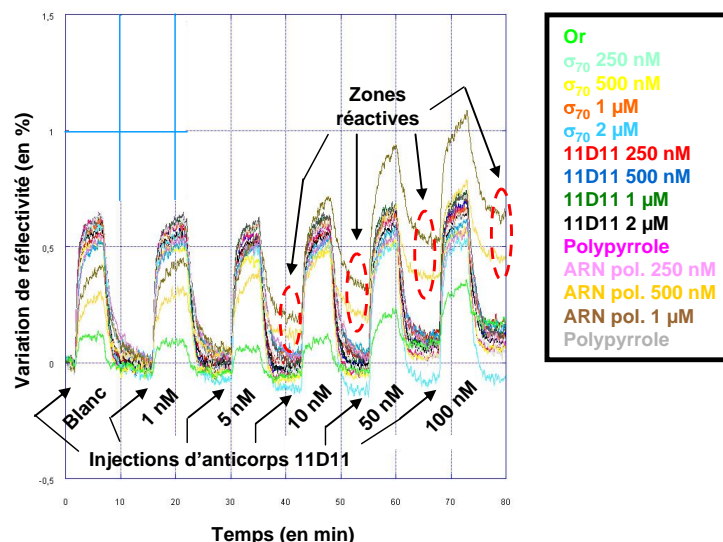


Figure 75 : Cinétique SPRi enregistrées lors d'injections successives en anticorps 11D11 sur une puce portant l'ARN polymérase II d'*E. coli*

Clairement, à partir de 5 nM d'anticorps injecté, seules les zones de polymères porteuses de l'ARN polymérase indiquent une variation positive de signal de réflectivité après rinçage de la puce par le milieu sans anticorps. A noter que les cinétiques « en créneau » sur chacune des zones correspondent au changement d'indice optique entre le milieu expérimental et le milieu d'injection. Outre la confirmation du modèle antigène / anticorps pour l'ARN polymérase, cette expérience prouve par ailleurs la possibilité d'immobiliser de façon efficace par électrospotting une protéine multimérique^[85] sans en modifier sa structure.

2.1.2. L'ARN polymérase « cible »

A contrario de l'étude précédente, l'ARN polymérase II d'*E. coli* va constituer la cible pharmacologique à tester vis-à-vis de la rifampicine et plus tard vis-à-vis l'ensemble de la chimiothèque (figure 76). Dans ce paragraphe, il s'agit par conséquent de vérifier que celle-ci est belle et bien active dans les conditions expérimentales d'utilisation de l'appareil SPRi. En effet, l'enzyme disponible commercialement (Epicentre®) étant stabilisée dans un milieu incorporant du glycérol, une filtration sur colonne Vivaspine® MWCO 30 000 de l'enzyme a été nécessaire afin d'éviter tout signal non spécifique durant l'injection (*données non*

montrées). Suite à cette opération de filtration, une quantification de l'enzyme a ensuite été menée par spectrophotométrie UV à 280 nm. Finalement, les échantillons ont été reconstitués dans le milieu expérimental pour éviter tout « saut d'indice » optique durant l'acquisition cinétique.

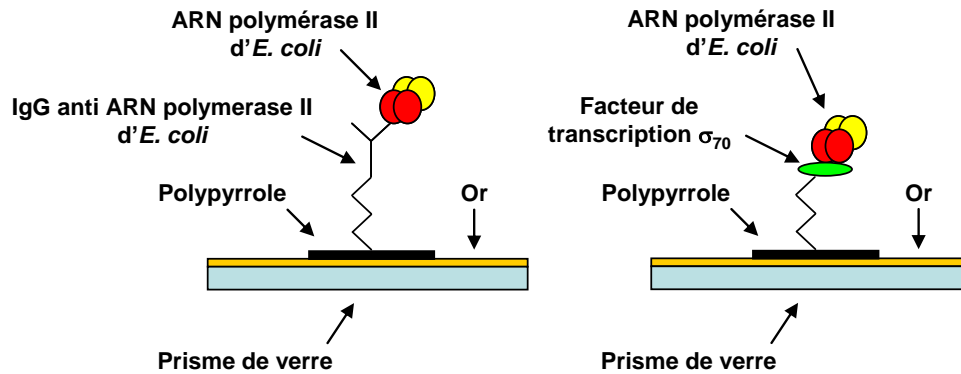


Figure 76 : Principe de la caractérisation de l'ARN polymérase II d'*E. coli* suivant le modèle antigène / anticorps et le modèle du complexe initial de transcription

L'injection de concentrations croissantes en ARN polymérase II d'*E. coli* ont permis de mettre en évidence des interactions spécifiques typiques des partenaires biologiques mis en jeu. En effet, pour les zones porteuses de l'anticorps 11D11, suite à la phase d'association, aucune dissociation notable ne se produit lors de la phase de rinçage de la puce. Comme déjà décrit précédemment avec les sondes petits ligands « modèle » biotine et FITC, l'allure de ces courbes est caractéristique d'une interaction antigène / anticorps. De plus, la quantité de signal est croissante avec l'augmentation de la concentration initiale en sonde immobilisée, ce qui confirme l'origine biologique de l'interaction. Enfin, la fixation de l'enzyme se produit à partir de 5 nM d'enzyme injectée, ce qui est totalement cohérent avec les résultats décrits en figure 75. Aussi, à concentration en cible équivalente, la quantité de signal est supérieure dans le cas où l'ARN polymérase constitue la cible et non la sonde. Cette différence s'explique par le fait que l'anticorps n'a qu'un poids moléculaire de 150 kDa contre 400 kDa pour l'enzyme puisque la SPR agit comme une « balance optique ».

Toujours selon la figure 77, sur la zone porteuse de la protéine σ_{70} , une variation de réflectivité a été visualisée à partir de 5 nM en cible injectée. Cependant, différemment des partenaires ARN polymérase / anticorps, une phase de dissociation prononcée s'est systématiquement produite, plus typique d'un complexe protéique. Ici aussi, la quantité de signal obtenue est croissante avec la densité de sondes protéique immobilisée en surface.

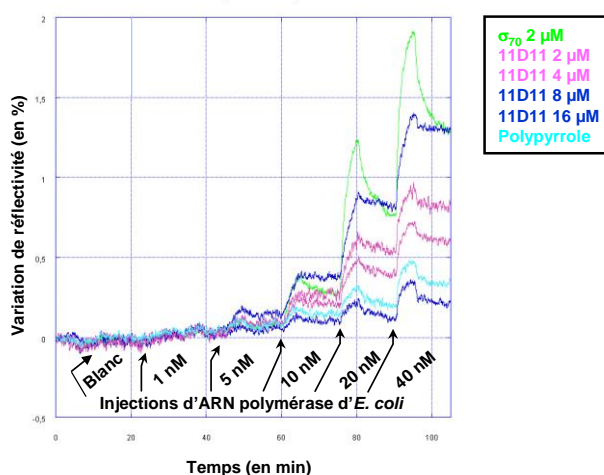


Figure 77 : Cinétique SPRi enregistrées lors d'injections successives en ARN polymérase II d'*E. coli* sur une puce comportant simultanément l'anticorps 11D11 et le facteur σ_{70}

Grâce à ces deux approches antigène / anticorps et facteur / enzyme, il est possible de certifier que l'enzyme est dans une conformation viable durant l'expérimentation en imagerie SPR. Les conditions expérimentales étant validées avec ces sondes protéiques, ces dernières serviront de « témoins positifs » pour le test de l'interaction rifampicine / ARN polymérase. A ce stade, il a donc été possible d'envisager l'immobilisation de l'antibiotique sur polypyrrole.

2.2. Propriétés chimiques de la rifampicine

2.2.1. Structure et dérivés

Découverte en 1957 par Sensi et al ^[139, 140], la série chimique des rifamycines a été isolée chez le champignon *Amycolatopsis mediterranei*, un champignon trouvé le long des côtes de St-Raphaël (France). Ces molécules appartiennent à une famille plus large appelée « ansamycines ». Plusieurs dérivés structuraux naturels et hémisynthétiques ont été caractérisés au sein de la littérature : rifamycines A, B, C, D, E, S, SV, W, rifampicine, rifabutine, rifapentine, rifalazine, rifaximin. Concernant les produits d'hémisynthèse, la variation structurale est portée sur la nature de la chaîne située en position 3 du cycle β -naphthol, ce qui permet de moduler l'hydrophilie globale de ces composés. Parmi ces molécules, la plus communément utilisée en thérapeutique est la rifampicine, une molécule hémisynthétique créée en 1966 par Lepetit et al à partir de la rifamycine SV ^[139]. Les structures respectives de ces produits sont indiquées en figure 78.

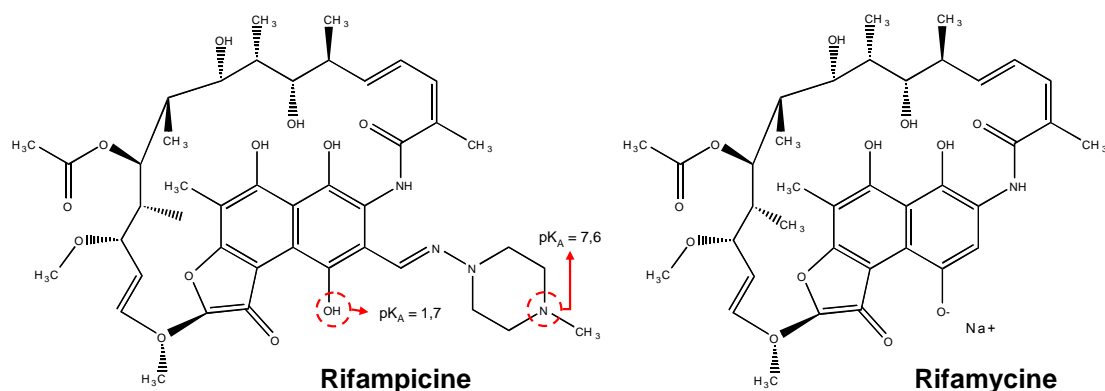
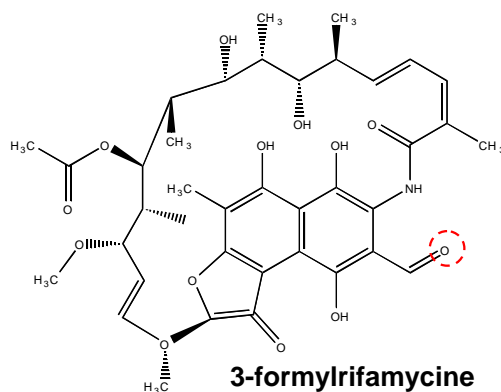


Figure 78 : Structure chimique de la rifampicine (hémisynthétique) et de la rifamycine SV (naturel)

2.2.2. Stabilité chimique

La rifampicine est soluble dans le DMSO à une concentration de 100 mg/mL ^[141]. Dans l'eau, en milieu phosphate tamponné à pH 7,4, elle ne peut cependant se solubiliser davantage qu'à 2,5mg/mL pour 25°C et qu'à 9,9 mg/mL pour 37°C ^[141]. D'autre part, la rifampicine est un zwitterion portant une charge négative sur la fonction 4-hydroxyle du noyau β -naphtol ($pK_A = 1,7$) et une charge positive sur l'azote en position 4 du cycle pipérazine ($pK_A = 7,9$) (Index Merck[®]). Plus précisément, le pH_i de la molécule est de 4,8 ^[141], ce qui explique sa plus grande solubilité (200 mg/mL) en milieu aqueux acide HCl 0,1 N.

Cependant, selon les travaux de Shishoo et al ^[142], la rifampicine est sensible au pH. En effet, elle subit une hydrolyse à pH acide donnant alors naissance à la 3-formylrifamycine (figure 79). Par ailleurs, ce produit de dégradation reste actif *in vitro*, mais plus *in vivo* ^[142]. De l'autre côté de l'échelle pH métrique, en présence d'air, l'antibiotique se transforme en deux produits d'oxydation : la rifampicine quinone et la 25-désacétylrifampicine (figure 79), totalement inactive *in vitro* ^[141].



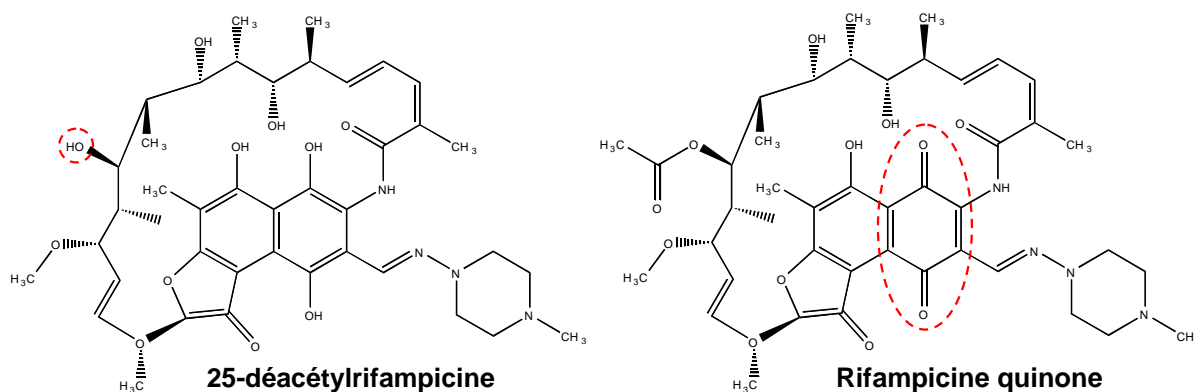


Figure 79 : Structure chimique des produits de dégradation de la rifampicine suivant le pH ; a) milieu à pH 2,3 – b) milieu à pH 8,2

Enfin, selon les travaux de Karlson et al ^[143], *a contrario* des milieux aqueux, la rifampicine est un composé relativement stable puisqu'il reste intact après 8 mois à 15°C dans le DMSO. C'est pourquoi les solutions stocks de l'ensemble des produits cités par la suite au cours de ce chapitre 2 ont été solubilisées à 10 mM dans le DMSO désaéré, puis placées à -20°C.

2.2.3. Réactivité électrochimique

Devant la grande fragilité de cette molécule, une étude bibliographique concernant sa stabilité électrochimique en vue de son immobilisation par électrochimie a été nécessaire. En effet, au sein de la littérature, plusieurs méthodes de dosage redox de la rifampicine ont été décrites. La plupart d'entre elles quantifient l'antibiotique *via* l'oxydation du noyau β -naphtol transformant ainsi la rifampicine en rifampicine quinone (figure 79) ^[144-146]. Le potentiel d'oxydation généralement relevé en milieu aqueux est de + 0,4 V *vs* ECS ^[146]. Or, le principe d'immobilisation par électrospotting repose sur une oxydation portée à un potentiel minimal de + 0,7 V *vs* ECS pour amorcer la polymérisation du pyrrole ^[147, 148]. Sachant que la forme rifampicine quinone est inactive vis-à-vis de l'ARN polymérase, il est indispensable de vérifier si ce processus d'oxydation de l'antibiotique se produit bel et bien dans le milieu d'immobilisation nouvellement formulé. D'autre part, s'il y a production de rifampicine quinone, il faut vérifier si la sonde est chimiquement « régénérable », c'est-à-dire s'il est envisageable de la réduire.

2.3. Caractérisation électrochimique de la rifampicine

Pour l'ensemble des études voltampérométriques, l'électrode de travail choisie a été un disque de platine, ceci afin d'obtenir une sensibilité élevée pour la détection. La contre-électrode est ici un fil de platine et l'électrode de référence choisie est du type Ag / AgCl_{saturée} KCl. Enfin, la caractérisation a été effectuée dans une microcellule en Téflon de 500 μ L.

2.3.1. Etude préliminaire par voltamétrie cyclique

Pour débiter, une étude exploratoire de la réactivité électrochimique de la rifampicine a été menée. La méthode de caractérisation employée ici est la voltamétrie cyclique, technique permettant d'isoler les couples redox à la différence de la chronoampérométrie à deux électrodes ou « électrospotting ». La zone de potentiel balayée couvre l'ensemble de la fenêtre explorable du milieu organique nouvellement formulé, c'est-à-dire de -1 V à $+1$ V (figure 80).

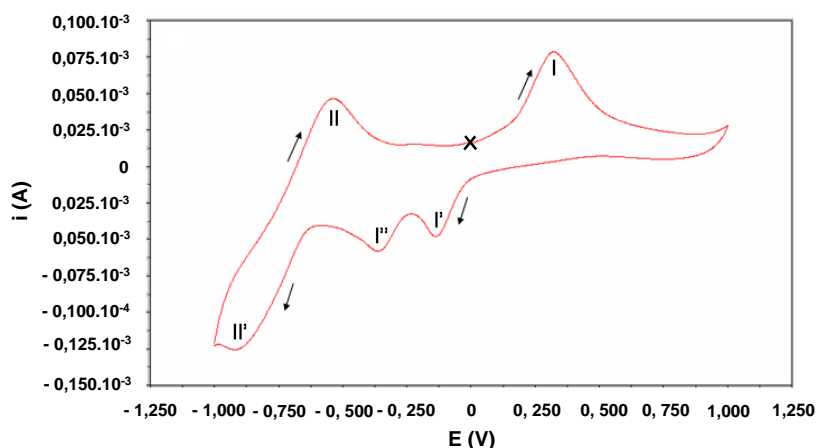


Figure 80 : Voltampérogramme ($100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) d'une solution de rifampicine 10 mM dans le milieu nouveau milieu d'immobilisation

Le voltampérogramme obtenu indique la présence de plusieurs fonctions électro-actives. En effet, comme l'indique la figure 80, le balayage des potentiels en oxydation fournit deux vagues, nommées I et II, centrées respectivement à $+0,395$ V et $-0,545$ V. Quant au balayage en réduction, il a indiqué trois vagues, nommées I', I'' et II', centrées respectivement sur $-0,085$ V, $-0,495$ V et $-0,910$ V. Ces signaux restent identiques après plusieurs cycles de voltamétrie (*données non montrées*). Devant la multiplicité des signaux enregistrés lors de cette étude préliminaire, l'attribution de ces derniers nécessite l'étude électrochimique de dérivés à structure simplifiée. Par ce biais, on espère pouvoir isoler plus facilement la nature de chacun d'entre eux.

2.3.2. Etudes voltampérométriques sur des analogues structuraux simples

Compte-tenu des données de la littérature, un centre redox bien connu de la rifampicine est le noyau β -napthoquinone ^[146]. C'est pourquoi deux composés représentatifs de ce site électro-actif ont été sélectionnés : la 1,4-napthoquinone et la juglone ou 5-hydroxy-1,4-napthoquinone (figure 81).

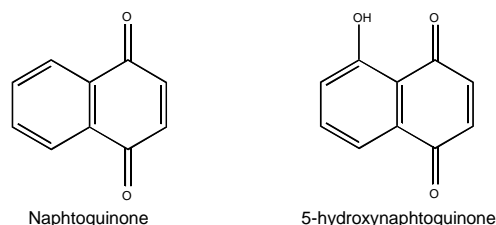


Figure 81 : Structure des analogues structuraux simples du centre redox actif de la rifampicine

L'exploration par voltamétrie cyclique a donné les résultats reportés en figure 82. Concernant le modèle structural le plus simple, la 1,4-napthoquinone, un système quasi-réversible est détecté ($E_{ox} = -0,230$ V, $E_{red} = -0,620$ V, $\Delta E = 0,390$ V) avec un léger épaulement au niveau de la vague de réduction. Pour la 5-hydroxy-1,4-napthoquinone, contrairement à la 1,4-napthoquinone, l'étude montre clairement que le système quinone / hydroquinone se découple en deux étapes électrochimiques quasi-réversibles distinctes ($E_{ox1} = -0,130$ V, $E_{red1} = -0,560$ V, $\Delta E_1 = 0,430$ V et $E_{ox2} = -0,300$ V, $E_{red2} = -0,390$ V, $\Delta E_2 = 90$ mV), ce qui est cohérent avec le mécanisme ECEC généralement admis pour ce type de fonction. Ceci se justifie d'autant plus qu'une étude en voltamétrie pulsée normale a montré que la quantité d'électrons échangés pour chacune des deux vagues est identique (*données non montrées*).

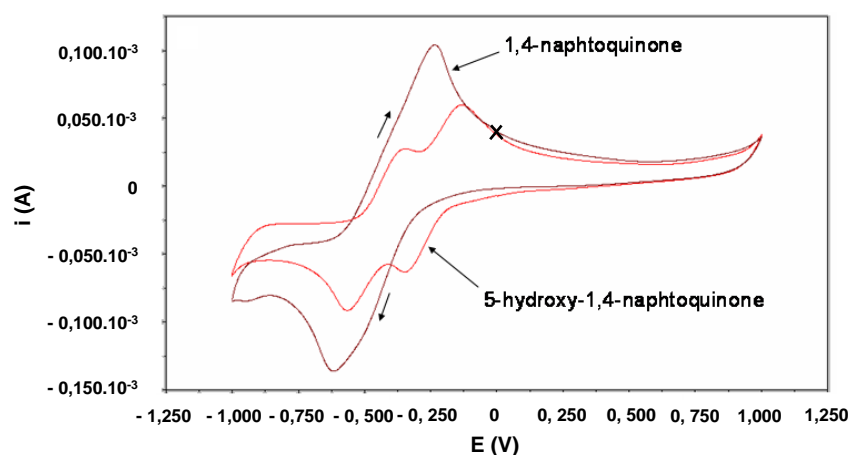


Figure 82 : Superposition de voltampérogrammes (100 mV.s⁻¹) obtenus dans une solution de naphthoquinone 10 mM et de 5-hydroxy-1,4-napthoquinone 10 mM dans le nouveau milieu d'immobilisation

A priori, le découplage des étapes du processus redox est attribuable à la présence de la fonction hydroxyle en position β du cycle quinonique, rendant alors la molécule dissymétrique. En effet, selon une étude RPE menée par Inbaraj et al, pour la 5-hydroxy-1,4-naphtoquinone, un équilibre tautomère céto-énolique existe entre les fonctions hydroxyles en positions 4 et 5 du noyau (figure 83) ^[149]. En conséquence, le radical semi-quinone formé lors de la première étape d'oxydation du système étant stabilisé en position 1, l'énergie nécessaire à l'oxydation sur cette position est plus faible que celle en position 4. De manière inverse, la position 4 est plus facilement réductible que la position 1.

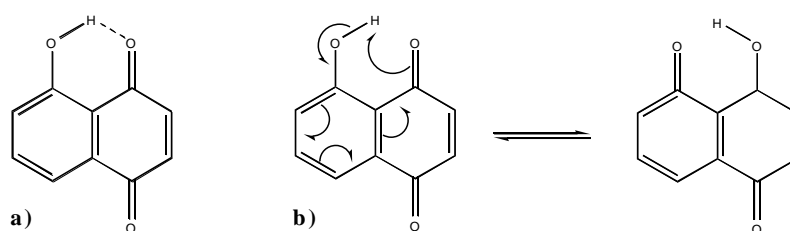


Figure 83 : a) Liaison intramoléculaire entre l'hydrogène porté en position 5 et la cétone en position 4 – b) Equilibre tautomère céto-énolique de la 5-hydroxy-1,4-naphtoquinone selon Inbaraj et al ^[149]

L'ensemble de ces observations correspondent aux caractéristiques électrochimiques du système quinone / hydroquinone dans un milieu aprotique tel que le DMSO ^[150]. Finalement, cette étude sur des composés « modèles » simples montre clairement l'influence des groupements chimiques sur la réactivité du système. Ayant maintenant caractérisé ce système, il est dorénavant envisageable de procéder à la caractérisation d'une molécule intermédiaire plus complexe : la rifamycine SV (figure 78).

2.3.3. Etudes voltamétriques de la rifamycine SV

Plus précisément, la rifamycine SV est l'analogue de la rifampicine excepté l'absence de la chaîne latérale [(4-méthyl-1-pipérazinyl)imino]azométhine en position 3 du cycle β -naphtol. Son étude par voltamétrie cyclique en figure 84 a mis en évidence une vague d'oxydation nommée I centrée sur + 0,395 V et deux vagues de réduction nommées I' et I'' centrées respectivement sur - 0,495 V et - 0,085 V.

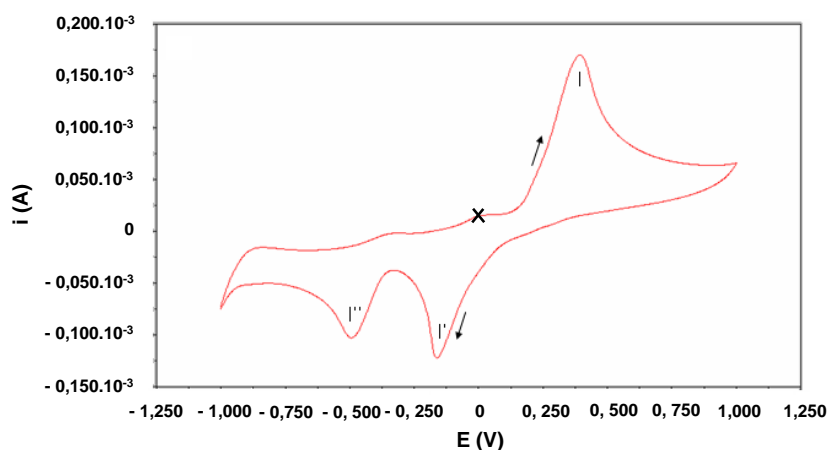


Figure 84 : Voltampérogramme ($100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) d'une solution de rifamycine SV 10 mM dans le nouveau milieu d'immobilisation

Afin de vérifier si les vagues I, I' et I'' constituent un seul système électrochimique, une étude voltamétrique balayant différentes fenêtres de potentiel a été mise en place (figure 85). Plus précisément, la borne en réduction a été fixée à $-0,6 \text{ V}$, puisqu'aucun signal n'a été détecté en-deçà en figure 84, alors que la borne en oxydation a varié de $-0,2 \text{ V}$ à $+0,7 \text{ V}$.

Selon la figure 85, la vague de réduction I'' apparaît dès lors que la borne d'oxydation atteint la partie ascendante de la vague d'oxydation I, soit à partir $+0,1 \text{ V}$. Quant à la vague de réduction I', elle se déclare lorsque la fenêtre de potentiel atteint une borne d'oxydation située dans la partie descendante de la vague d'oxydation I, soit à partir $+0,3 \text{ V}$. Par conséquent, sachant qu'à la vague d'oxydation I correspondent deux vagues de réduction I' et I'', ces données indiquent clairement l'existence d'un seul système redox au sein de la rifamycine. Aussi, selon la figure 85, pour une borne d'oxydation fixée à $+0,7 \text{ V}$ et après correction du signal de fond, il s'avère que la quantité d'électrons échangée en oxydation (I) est identique à celle échangée en réduction (I' + I''). Mieux, une analyse coulométrique montre que la charge lue pour la vague I' est égale à la charge lue pour la vague I'', ce qui semble cohérent avec le mécanisme ECEC décrit précédemment avec la 5-hydroxy-1,4-naphtoquinone. Quant à la vague I, elle regroupe les deux étapes élémentaires en oxydation. Ici, le moindre découplage des deux étapes élémentaires peut s'expliquer par l'influence complexe des substituants directement liés au noyau β -naphtol. Enfin, selon la littérature, la vague d'oxydation à $+0,395 \text{ V}$ correspond à l'oxydation du centre naphtohydroquinone ^[146].

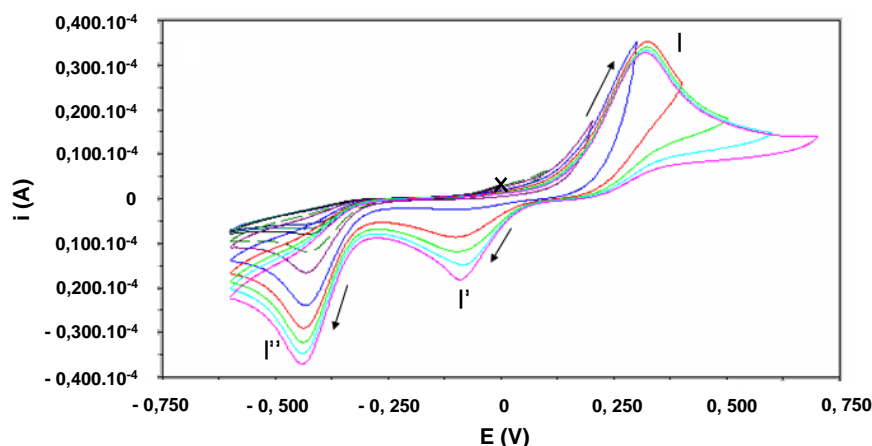


Figure 85 : Superposition de voltampérogrammes (100 mV.s^{-1}) d'une solution de rifamycine SV 10 mM dans le nouveau milieu d'immobilisation ; seule la borne en oxydation a varié passant de $-0,2 \text{ V}$ à $+0,7 \text{ V}$ par incréments de $+0,1 \text{ V}$ entre chaque expérience

L'étude voltamétrique de la rifamycine ayant permis d'identifier le système naphtoquinone / naphtohydroquinone au sein d'un analogue proche de la rifampicine, il est désormais possible de procéder à l'identification de l'ensemble des vagues redox caractéristiques indiquées en figure 80.

2.3.3. Etudes voltamétriques finales de la rifampicine

Dans un premier temps, il s'agit de confirmer que les vagues I, I' et I'' sont corrélées. Pour se faire, le même principe que celui exposé pour la rifampicine a de nouveau été mis en place. Ainsi, selon les voltampérogrammes en figure 86, un comportement électrochimique analogue à la rifamycine est obtenu. Par conséquent, les vagues I, I' et I'' sont attribuables à la réponse du système naphtoquinone / naphtohydroquinone.

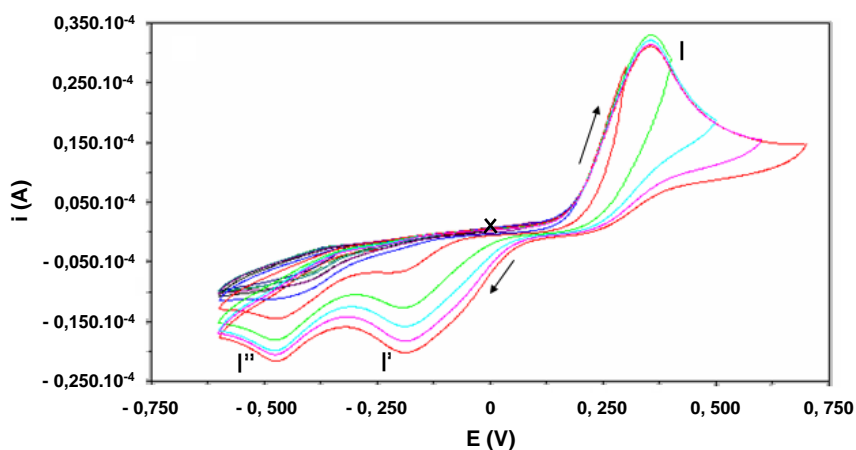


Figure 86 : Superposition de voltampérogrammes ($100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) d'une solution de rifampicine 10 mM dans le nouveau milieu d'immobilisation ; seule la borne en oxydation a varié passant de $-0,2 \text{ V}$ à $+0,7 \text{ V}$ par incréments de $+0,1 \text{ V}$ entre chaque expérience

Or, selon la figure 80, le balayage dans une fenêtre de potentiels plus large induit la détection de deux vagues supplémentaires formant le système II / II'. De plus, un balayage entre -1 V et 0 V a par ailleurs indiqué que ces signaux sont indépendants de l'oxydation de la rifampicine en sa forme quinonique (*données non montrées*). Ainsi, par différence avec la structure de la rifamycine, l'attribution de ces vagues redox supplémentaires est liée à la chaîne [(4-méthyl-1-pipérazinyl)imino]azométhine selon un mécanisme irréversible décrit par Smyth et al pour le 4(4-méthylpipérazin-1-ylimino)phénol ^[151].

Pour ce système redox, l'intensité des signaux est fortement dépendante du pH de la solution. En effet, contrairement au système I / (I' + I''), plus la solution est basique, moins le système est électro-actif (figure 87). Ceci semble cohérent avec le pK_A de l'atome d'azote en position 4 de l'hétérocycle pipérazine ; le processus redox nécessite probablement la protonation de l'azote pour avoir lieu.

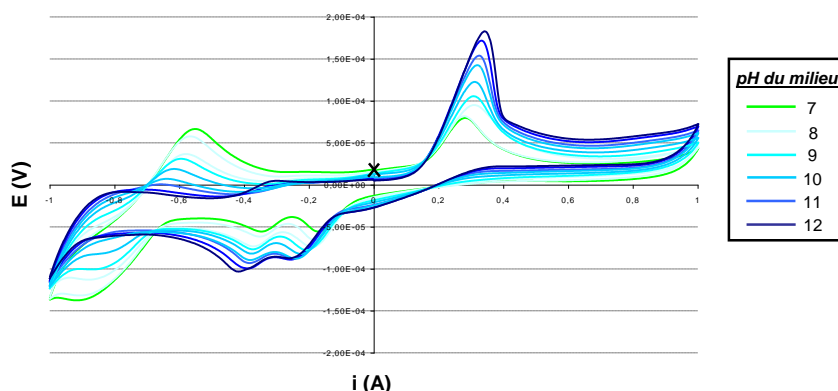


Figure 87 : Superposition de voltampérogrammes ($100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$) d'une solution de rifampicine 10 mM dans le nouveau milieu d'immobilisation ajustée à différents pH ($7 < \text{pH} < 12$)

En conclusion, pour l'électrospotting, lors du processus d'oxydation du pyrrole, cette étude suggère que la rifampicine s'oxyde à l'électrode. Pour autant, compte-tenu de la réversibilité du système I / I'-I'', il est paraît vraisemblable de récupérer la forme réduite active de l'antibiotique. Ainsi, le chapitre suivant va consister en l'étude des conditions d'électrospotting à mettre en place pour effectuer l'immobilisation de la sonde antibiotique sous sa forme bioactive.

2.3.4. Approches chronopotentiométriques

Pour l'ensemble des expériences chronopotentiométriques, afin de se mettre dans des conditions similaires à l'électrosporting, l'électrode de travail utilisée a été une lame de verre recouverte de 50 nm d'or. Pour la même raison, la cellule électrochimique choisie ici a été un cône de micropipette type p10. Dans un premier temps, les essais ont fait appel à un montage à 3 électrodes où une pseudo-référence (fil d'argent) et une contre-électrode (fil de platine) ont été insérées dans la cellule électrochimique. Suivant ce montage, pour une concentration de 10 mM en rifampicine, lors de l'application d'un potentiel de + 0,7 V, c'est-à-dire le potentiel permettant l'électropolymérisation du pyrrole, une charge supplémentaire est détectée (*données non montrées*). Cette quantité de courant est directement attribuée à la vague I décrite par voltamétrie cyclique.

A partir de ce résultat et afin de se placer dans les conditions réelles de l'électrosporting, une expérience menée avec un montage à 2 électrodes, où seule une contre-électrode (fil de platine) figure dans le cône de micropipette, a été envisagée. Ici, la tension appliquée entre les deux électrodes a été modulé de + 1,8 V à + 2,6 V, sachant qu'une tension minimale de + 1,6 V est nécessaire pour amorcer la polymérisation du pyrrole (figure 88a) ^[147, 148]. L'ensemble des résultats reportés en figure 88b explicitent clairement que pour tous ces voltages, une quantité de courant supplémentaire est lue par rapport au signal de fond de l'électrolyte. Ceci implique donc qu'une réaction électrochimique de la rifampicine se produit durant l'impulsion en oxydation à l'électrode de travail (palier β). Par ailleurs, le temps caractéristique de la réaction est modulé suivant le voltage appliqué ; plus le voltage est élevé, plus l'épaulement est écourté. D'autre part, la charge supplémentaire dégagée liée à la rifampicine est égale à celle attribuée à l'antibiotique avec le premier montage (*données non montrées*). Ainsi, cette expérience permet de conclure sans ambiguïté que l'oxydation de la rifampicine en sa forme rifampicine quinone se produit bel et bien durant la phase de polymérisation du pyrrole. Dès lors, sachant que l'oxydation de l'antibiotique est inévitable, la séquence d'électrosporting initiale doit être modulée afin de récupérer la forme réduite du centre redox naphthohydroquinone.

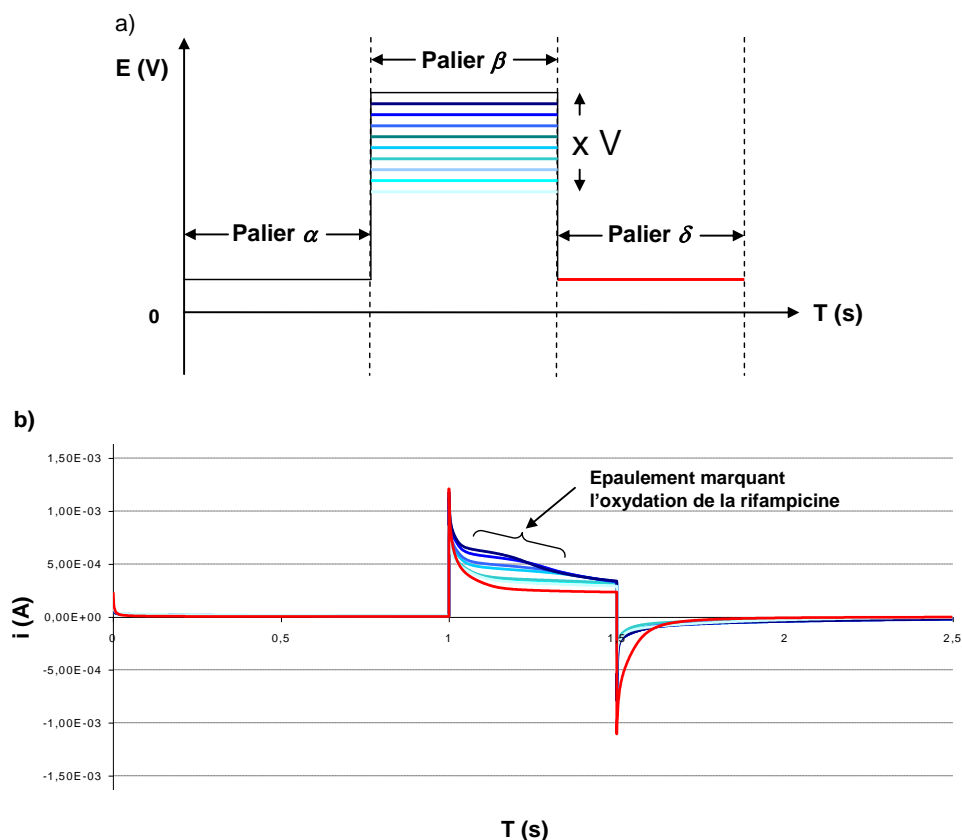


Figure 88 : a) Principe expérimental des séquences d'électrospotting envisagées pour vérifier l'oxydation du système naphtoquinone / naphtohydroquinone durant le « processus classique » (+ 1,8 V < x < + 2,6 V) – b) Superposition de chronoampérogrammes obtenus à partir d'une solution de rifampicine 10 mM dans le nouveau milieu d'immobilisation suivant le protocole établi en a)

Pour se faire, après l'application d'une tension « classique » de + 2,4 V, différentes tensions de signe opposé ont été testées (figure 89a). Ici, la gamme de tensions envisagée a été de – 0,4 V à – 1,2 V. En effet, selon la figure 88b, pour une tension de + 0,4 V (palier δ), aucun signal électrique supplémentaire n'a été détecté, ce qui est cohérent avec les données recueillies par voltamétrie cyclique. Aussi, la limitation en réduction à + 1,2 V se justifie par le fait que l'on veuille d'une part, éviter de procéder à toute polymérisation du pyrrole sur la contre-électrode et d'autre part, limiter le risque d'électrolyse du milieu afin de ne pas endommager l'antibiotique. L'ensemble des chronoampérogrammes ainsi enregistrés sont indiqués en figure 89b. De manière analogue à l'expérience précédente, pour des voltages inférieurs à – 0,7 V, la courbe I(t) décrit un épaulement caractéristique d'une réaction électrochimique avec appauvrissement interfacial. Sachant qu'aucun épaulement n'est visible en figure 88b pour une tension de + 1,8 V (palier β), le signal en réduction (palier δ) lu en figure 89b peut être attribué au passage de la forme naphtoquinone à naphtohydroquinone de la rifampicine. De

cette expérience, les conditions d'électrospotting suivantes ont été retenues : palier α à + 0,4 V, palier β à + 2,4 V, et palier δ à - 1 V.

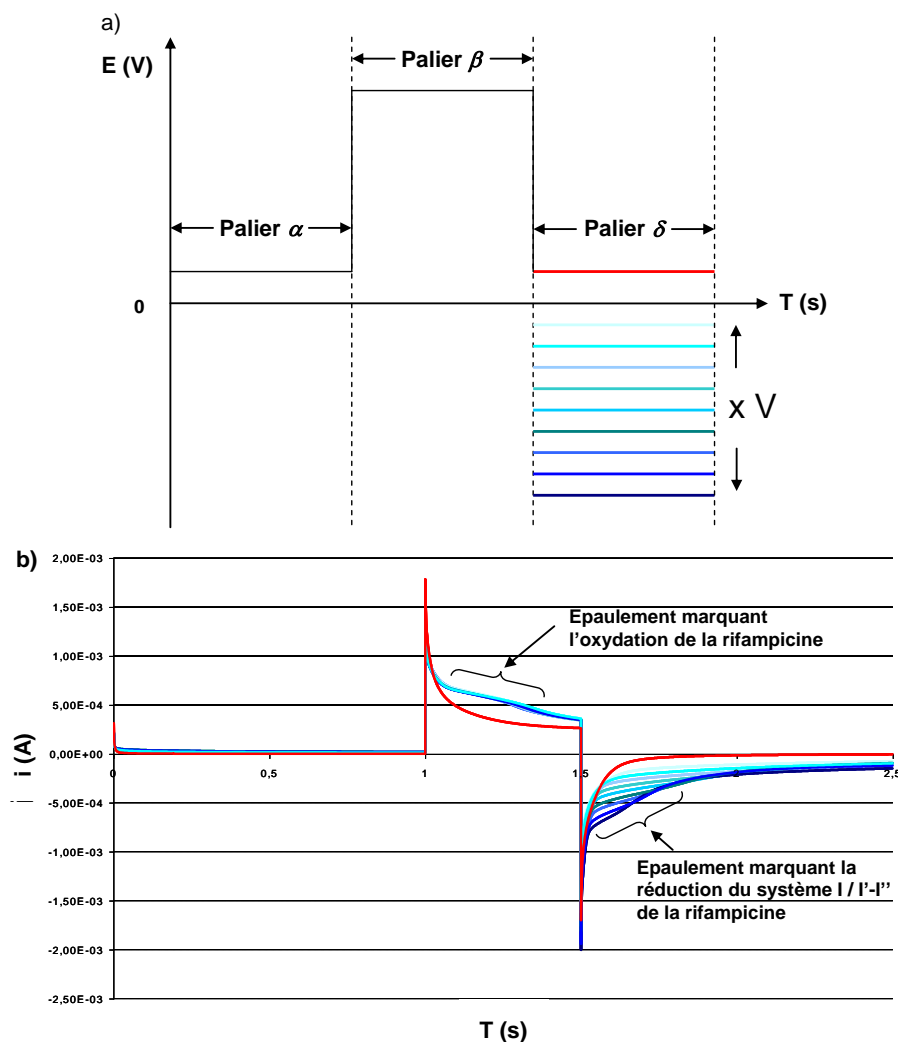


Figure 89 : a) Principe expérimental des séquences d'électrospotting envisagées pour réduire le système naphthoquinone / naphthohydroquinone (-0,4 V < x < - 1,2 V) – b) Superposition de chronoampérogrammes obtenus à partir d'une solution de rifampicine 10 mM dans le nouveau milieu d'immobilisation suivant le protocole établi en a)

Des expériences complémentaires ont par ailleurs indiqué qu'avec 1 mM de rifampicine, la technique de chronoampérométrie n'est pas suffisamment sensible pour détecter les courants électriques correspondants aux processus redox ayant cours lors de l'électrospotting. Enfin, suivant les conditions d'immobilisation retenues ci-dessus, le chronoampérogramme enregistré pour un mélange de rifampicine 10 mM et de pyrrole 20 mM présente une charge supplémentaire à la fois en phase β et δ , ce qui confirme bel et bien la concomitance du phénomène de polymérisation du pyrrole en surface et des réactions redox de l'antibiotique.

En conclusion, l'ensemble des études voltamétriques et chronoampérométriques réalisées jusqu'ici ont permis de sélectionner les conditions adéquates pour la future immobilisation de la sonde antibiotique. Pour vérifier si le composé est réellement actif, son immobilisation suivie de son étude par imagerie SPR a été envisagée.

2.4. Analyse de l'interaction rifampicine / ARN polymérase par SPRi

2.4.1. Stratégie d'ancrage

Afin d'immobiliser la rifampicine sur polymère de polypyrrole, il est nécessaire de fonctionnaliser la sonde antibiotique par un groupement chimique incluant un pyrrole. Or, cette modification structurale ne doit pas détériorer l'activité biologique de la sonde vis-à-vis de sa cible, l'ARN polymérase. S'appuyant sur la structure des composés hémisynthétiques disponibles commercialement (cf. II.2.2.1), il apparaît qu'une modification de la chaîne latérale en position 3 du cycle β -naphtol ne soit pas préjudiciable à l'activité de la molécule. Par conséquent, le point d'ancrage retenu pour la modification de la rifampicine a été la substitution du groupement [(4-méthyl-1-pipérazinyl)imino]azométhine par le bras espaceur de la série n°2 (cf. II.1.2.2). Brièvement, la synthèse de la sonde pyrrolée menée par Muriel Amblard (Université de Montpellier, Faculté de Pharmacie) a consisté en une amination réductrice permettant la condensation de la 3-formylrifamycine et du bras espaceur aminé [152]. La structure du produit final est indiquée en figure 90.

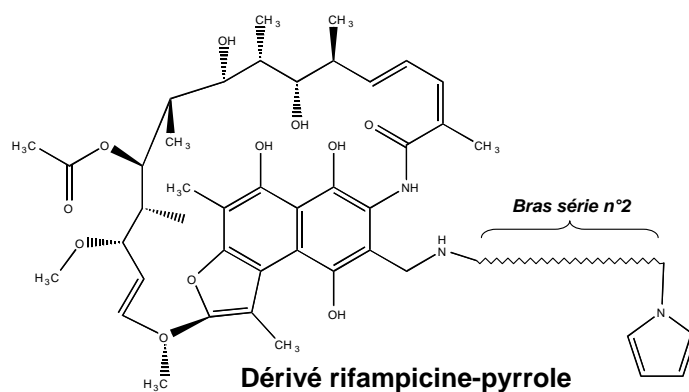


Figure 90 : Sonde « petit ligand » dérivée de la structure de la rifampicine

2.4.2. Acquisition cinétique

Suite aux conditions opératoires d'électrospotting retenues dans le chapitre II.2.3, une biopuce portant la sonde dérivée de la rifampicine a été fabriquée puis testée par imagerie SPR suivant le principe décrit en figure 91.

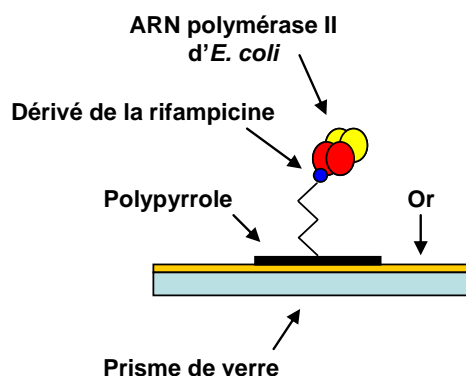


Figure 91 : Principe de détection de l'interaction entre l'ARN polymérase bactérienne et la sonde rifampicine

Plus précisément, différentes concentrations initiales en sonde antibiotique ont été incluses dans la matrice (figure 92a). De plus, à ces plots de rifampicine ont été ajoutées des zones de « contrôles positifs » (σ_{70}) pour l'ARN polymérase ainsi que deux zones de « contrôle négatif » représentée par le polymère seul (figure 92b). Les données cinétiques obtenues suite à l'injection de concentrations croissantes en ARN polymérase sont reportées en figure 92.

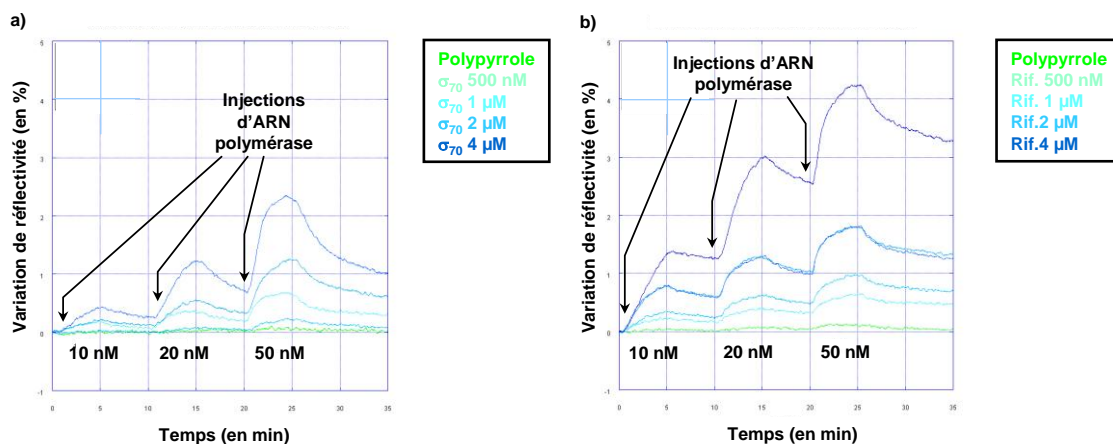


Figure 92 : Cinétiques SPRi obtenues durant l'injection successive de concentrations croissantes en ARN polymérase II d'*E. coli* sur une puce comportant des zones fonctionnalisées avec la rifampicine (b) et le facteur σ_{70} (a)

L'expérience indique ici très clairement que l'ARN polymérase est biologiquement fonctionnelle puisqu'elle lie spécifiquement le facteur de transcription σ_{70} , et ce, de manière croissante avec la densité en sonde protéique immobilisée. En effet, aucun signal non spécifique n'a été détecté sur les zones de « contrôle négatif ». De la même manière, les zones incluant la sonde dérivée de la rifampicine présentent des variations positives de réflectivité durant chaque injection. Compte-tenu de la dépendance du signal par rapport à la quantité de sonde immobilisée, ces variations ont été attribuées à l'interaction spécifique avec l'enzyme.

Ces résultats permettent aussi de valider définitivement la chimie du bras espaceur sonde-pyrrole pour la cible pharmacologique initialement choisie. Enfin, par comparaison au signal obtenu avec la sonde protéique, la réactivité des zones incluant la sonde « petit ligand » confirme potentiellement la grande sensibilité de cette approche avec l'immobilisation de la chimiothèque.

De façon plus générale, cette étude de la rifampicine en tant que sonde électrolabile élargit le spectre des molécules pouvant être immobilisées par électrospotting sous réserve de vérifier leur réactivité électrochimique et d'adapter en conséquence l'impulsion électrique.

3. Immobilisation et criblage d'une chimiothèque par SPRi

3.1. Immobilisation de la chimiothèque

3.1.1. Synthèse combinatoire

Comme indiqué en paragraphe I.4.2., la chimiothèque synthétisée se divise en deux groupes de molécules : les 2,4-imidazolidinediones (hydantoïnes) et les quinazoline-2,4-diones. Or, pour chacune de ces séries, compte-tenu de la chimie d'immobilisation envisagée, un point d'ancrage du bras espaceur sur le squelette de la molécule doit être défini.

Pour la série hydantoïne, par analogie à la série des 2,5-dicétopipérazines, sachant que la spécificité de l'interaction avec la cible dépend directement de la nature des chaînes latérales (cf. I.4.2.1), ces dernières ne peuvent constituer un lieu d'ancrage fiable, c'est-à-dire sans répercussion sur l'activité de la sonde. Ainsi, la seule position réellement utilisable pour une fixation de la sonde sur le bras espaceur pyrrolé correspond à la fonction acide libre (figure 93). Pour la série quinazoline, à l'instar de la phéromone de *Phyllopertha diversa*, les composés bioactifs présentent généralement une substitution sur au moins l'un des atomes d'azote (positions 2 et 4) de l'hétérocycle (cf. I.4.2.2). Sachant qu'en position 2, pour la chimiothèque envisagée, le groupement est systématiquement un acide aminé, la fonction carboxylique de ce dernier a été utilisée pour l'attacher au bras espaceur pyrrolé (figure 93).

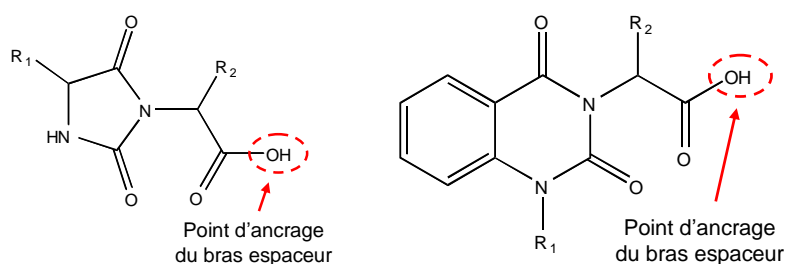


Figure 93 : Structure et lieux d'attaches respectifs du bras espaceur pour chacune des deux séries de la chimiothèque envisagée ; R₁ et R₂ représentent les chaînes latérales d'acides aminés (sauf CH₂-CH₃ pour R₂)

Afin d'accéder à une grande diversité structurale, une stratégie de synthèse combinatoire automatisée sur support résine a été développée par Muriel Amblard (Université de Montpellier, Faculté de Pharmacie). Pour chaque composé une analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée afin de vérifier la pureté des produits de synthèse (*données non montrées*). Au total, 37 composés ont été obtenus dont 20 pour la série hydantoïne (notés JMV 3084-x, JMV 3112, JMV 3113, JMV 3114, JMV 3115 et JMV 3116), et 17 pour la série quinazolinedione (notés de JMV 3076-y, 3077-z).

Analogue cyclopeptidique		Quinazoline-2,4-dione	
R ₁ (chaîne latérale de)	R ₂ (chaîne latérale de)	R ₁ (chaîne latérale de)	R ₂ (chaîne latérale de)
Alanine	Alanine	Glycine	Alanine
Phénylalanine	Phénylalanine	Phénylalanine	Phénylalanine
Lysine	Lysine	Acide aspartique	Acide aspartique
Valine	Valine	CH ₂ -CH ₃	Arginine
Acide aspartique	Acide aspartique		Sérine
Histidine	Histidine		Cystéine
Sérine	Sérine		
Tryptophane	Tryptophane		

Tableau 7 : Différents groupements envisagés au cours du criblage

3.1.2. Production et caractérisation de biopuces à « petits ligands »

Du fait que les quantités disponibles pour chaque sonde « petit ligand » soient de l'ordre du milligramme, les produits lyophilisés ont été dissous dans le DMSO à une concentration de 10 mM. Après avoir mélangé chacune de ces sondes avec 20 mM de pyrrole dans le nouveau milieu de polymérisation, l'immobilisation de l'ensemble de la chimiothèque a été réalisée sur 4 prismes dorés au moyen de la station robotisée Omnigrad (Genoptics, France) décrite précédemment en II.1.4.4. Chaque puce a ensuite été séchée sous courant d'argon puis conservée à + 4°C jusqu'à utilisation.

Un exemple d'image SPR « brute » de la surface d'une puce à « petits ligands est reportée en figure 94. Les zones de dépôt y sont clairement identifiables et relativement homogènes. En effet, pour l'angle de travail choisi, l'ensemble des zones se situent dans la fenêtre sensible de l'appareil d'imagerie SPR, soit entre 25 et 45 % de réflectivité. Les puces à « petits ligands » fabriquées suivant ce procédé semblent donc physiquement compatibles avec la technique de détection.

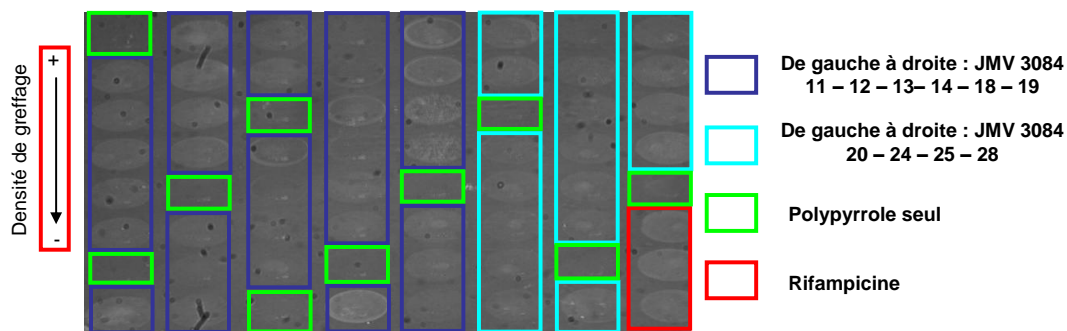


Figure 94 : Image brute d'une puce à « petits ligands » observée par imagerie SPR

3.2. Acquisition cinétique par imagerie SPR

Compte-tenu de la quantité d'informations générée par la technique et par souci de clarté, les résultats présentés ci-après n'exposent pas la totalité de la chimiothèque testée. En effet, seule l'étude cinétique des zones accueillant les molécules présentant les meilleures propriétés vis-à-vis de l'ARN polymérase figurent dans ce manuscrit.

3.2.1. Interactions directes

Les biopuces étant « lisibles » par imagerie SPR, le test des capacités de chacune des sondes immobilisées à se lier à l'ARN polymérase bactérienne a été envisagé (figure 95a). Comme indiqué en figure 95b, lors d'un premier essai, suite à l'injection de la cible pharmacologique, l'acquisition cinétique a permis de mettre en évidence que 8 composés captent l'enzyme pour une concentration injectée de 10 nM. L'allure des cinétiques obtenues sur les zones « (sensibles) répondeuses » est proche du comportement observé entre la rifampicine et l'ARN polymérase en figure 92. Plus précisément, la vitesse de dissociation est intermédiaire entre celle analysé entre le modèle ARN polymérase / 11D11 et le modèle ARN polymérase / σ_{70} . De plus, à partir de l'image différentielle reportée en figure 95c, il apparaît très clairement que la variation de réflectivité enregistrée dépend directement de la concentration en sonde initialement introduite dans la solution d'immobilisation ; ces résultats sont donc cohérents avec l'existence d'une interaction spécifique entre la sonde et la cible protéique.

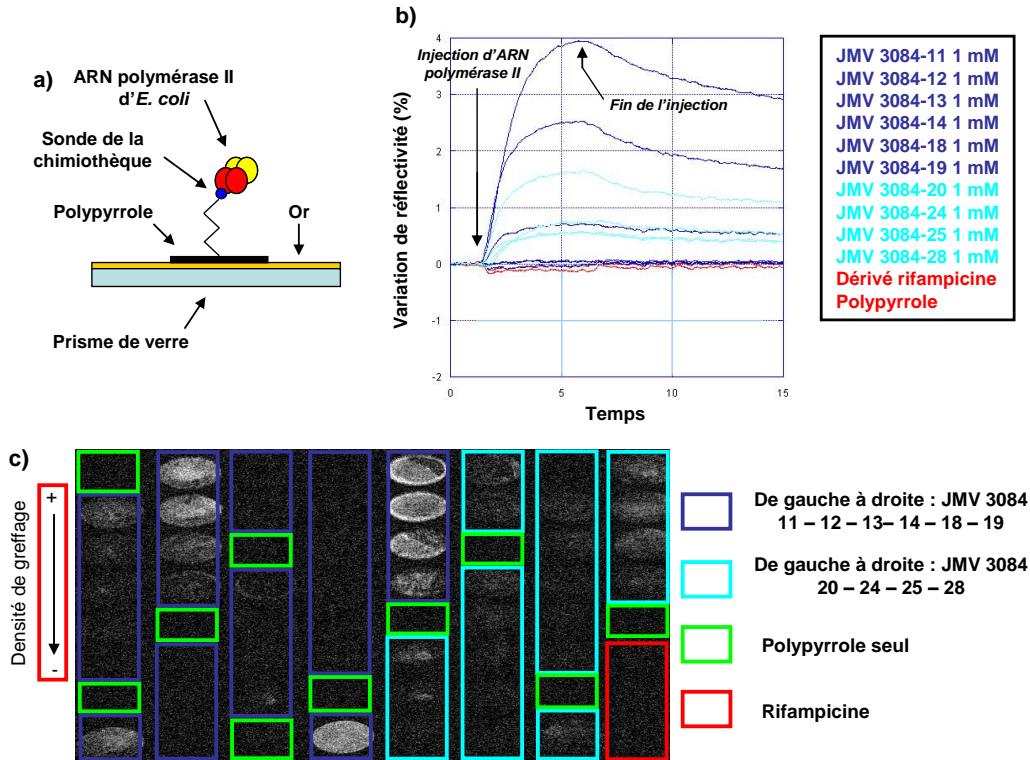


Figure 95 : a) Représentation schématique du mode d'interaction entre la sonde « petit ligand » et la cible pharmacologique – b) Analyse cinétique de la réflectivité de chaque zone d'une puce à « petits ligands » durant l'injection de l'ARN polymérase bactérienne – c) Image différentielle observée après injection de l'ARN polymérase bactérienne sur la puce à « petits ligands » suivie en a)

Cependant, pour la sonde dérivée de la rifampicine, aucun signal n'a été enregistré au cours de cette étude, ce qui suggère soit une dénaturation de l'enzyme suffisante pour détériorer le site de fixation de l'antibiotique, soit un mauvais greffage de la sonde rifampicine. Ainsi, afin d'écarter la première hypothèse, il s'agit de vérifier l'intégrité de l'enzyme ayant réagi en surface. Pour se faire, 10 nM de l'anticorps monoclonal 11D11 ont été injectés consécutivement à l'enzyme (figure 96a). Le suivi de la réflectivité indique que l'anticorps 11D11 se fixe aux zones où l'enzyme s'est préalablement fixée. Mieux, plus la fixation initiale de l'enzyme par la sonde « petit ligand » est élevée, plus l'anticorps 11D11 réagit en surface (figure 96b). Enfin, la très lente cinétique de dissociation enregistrée en phase de lavage correspond exactement au modèle d'interaction présenté avec la biotine et le FITC lors de l'étude initiale de faisabilité (cf. II.1.5.2).

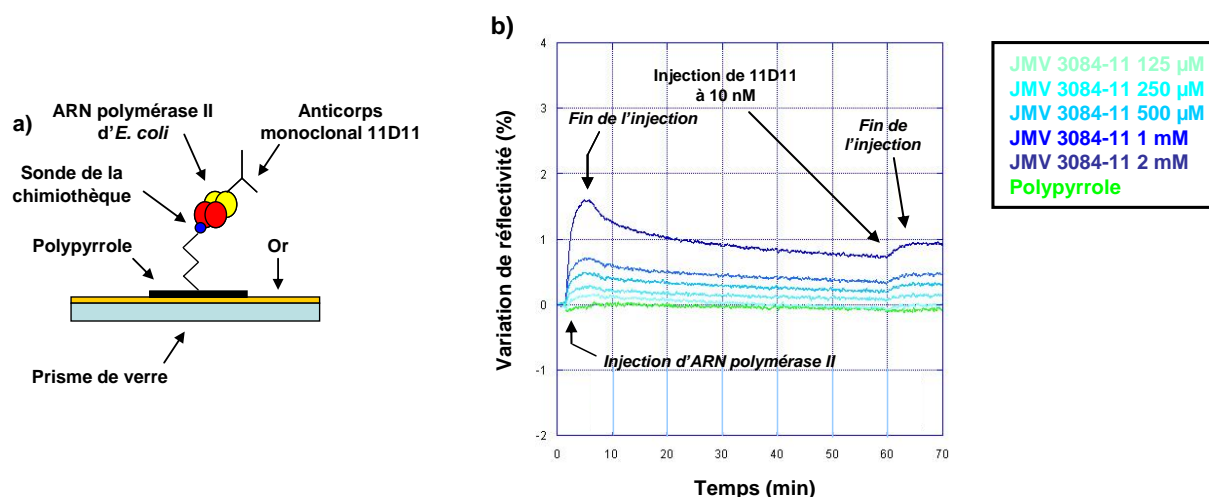


Figure 96 : a) Principe de vérification de l'intégrité structurale de l'ARN polymérase bactérienne – b) Analyse cinétique de la réflectivité sur des zones portant un ligand « positif »

Cette expérience permet donc de conclure que l'ARN polymérase conserve, *a priori*, une conformation naturelle une fois fixée à la surface. Cependant, bien que cette expérience valide une réelle interaction biologique entre les sondes « répondeuses » et la cible thérapeutique, une expérience complémentaire a été nécessaire pour conclure définitivement.

A l'instar du protocole utilisé en II.2.4.2, il s'agit de procéder à l'injection de concentrations successivement croissantes en enzyme. A titre d'exemple, les signaux enregistrés pour un ligand « non répondeur » et un ligand « répondeur » sont respectivement montrés en figure 97a et 97b. On observe en effet que pour le composé 3076-4, aucun signal spécifique n'est détecté quelque soit la concentration en enzyme injectée. *A contrario*, pour le composé 3076-6, la variation de réflectivité est d'autant plus importante que la quantité de polymérase injectée est élevée. Par ailleurs, pour une concentration de 10 nM, la cinétique d'association semble ralentir, signe indicatif que l'on se situe proche de la saturation de la surface du biocapteur lié à l'encombrement stérique des cibles. A noter que pour la concentration d'immobilisation 2 mM en sonde, une atténuation du signal est détectée ; cet effet est attribuable à un phénomène d'encombrement stérique en surface décrit préalablement au laboratoire^[153].

Enfin, la régénération au SDS 1 % (m/v) employée permet de décrocher efficacement l'enzyme puisqu'après retour dans le milieu tamponné phosphate, l'ensemble des zones d'acquisition présente approximativement la même variation finale de réflectivité. L'injection d'une nouvelle gamme de concentration en polymérase fournissant les mêmes signaux

(données non montrées), ceci confirme matériellement la possibilité de tester successivement différentes sondes pour un seul support biopuce à « petits ligands ».

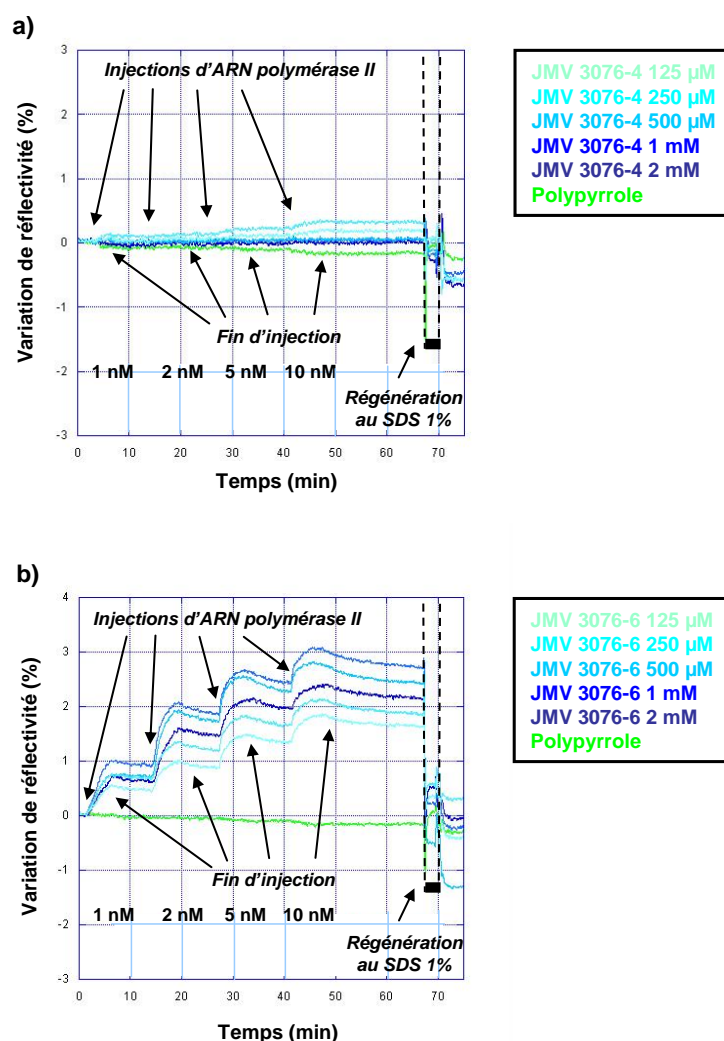


Figure 97 : Cinétiques obtenues durant l'injection d'une gamme croissante d'ARN polymérase bactérienne d'*E. coli* – a) Cas d'un composé « négatif » – b) Cas d'un composé « positif »

En conclusion, cette première étude a mis en évidence une ou plusieurs interactions biologiques entre des sondes « petits ligands » issues de la chimiothèque et l'ARN polymérase bactérienne. Cependant, afin de mieux les caractériser, une étude cinétique complémentaire a été mise en place.

3.2.2. Caractérisation par compétition

Le principe ici a été de caractériser les interactions décrites ci-dessus *via* un test par compétition avec la rifampicine. La stratégie est analogue à celle mise au point avec la sonde

« modèle » biotine dans le paragraphe II.1.5.3., à la différence près que la sonde immobilisée et la sonde en solution ne sont pas identiques. D'autre part, dans le cas présent, ne connaissant pas le lieu de fixation de la sonde sur l'enzyme, plusieurs cas de figure peuvent se présenter à l'issue de cette expérience (figure 98a et 98b). En effet, si le site de fixation de la rifampicine diffère, ou plus largement n'influe pas le site de fixation de la sonde, aucun phénomène de compétition ne sera observé. A l'opposé, si la rifampicine gêne la reconnaissance sonde « petit ligand » / protéine, une compétition aura lieu avec pour conséquence des signaux analogues à ceux rencontrés avec la sonde biotine.

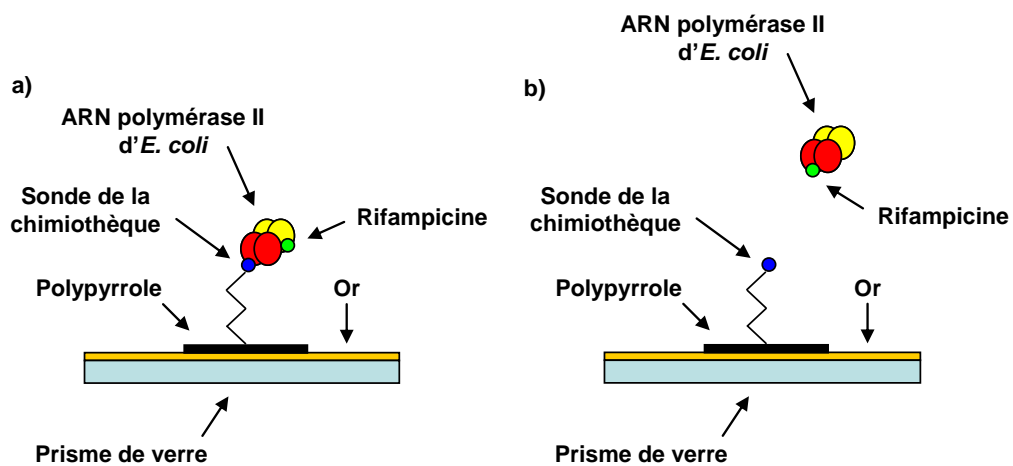


Figure 98 : a) Représentation schématique du cas où la rifampicine et la sonde immobilisée ne présentent pas le même site de fixation, d'où l'absence de compétition – b) Représentation schématique où la rifampicine et la sonde immobilisée présentent le même site de fixation, d'où un déplacement par compétition

Brièvement, 10 nM d'ARN polymérase ont été mis à incuber avec 2 mM de rifampicine durant 15 minutes à 37°C, c'est-à-dire dans des conditions permettant l'atteinte de l'équilibre entre les deux partenaires. Ensuite, le mélange réactionnel a été injecté dans l'appareil fluide de l'imageur SPR. A titre comparatif, l'expérience « témoin » a ici consisté en l'injection de 10 nM d'ARN polymérase sans antibiotique. La superposition des données cinétiques obtenues sur des ligands « répondeurs » est présentée en figure 99a et 99b.

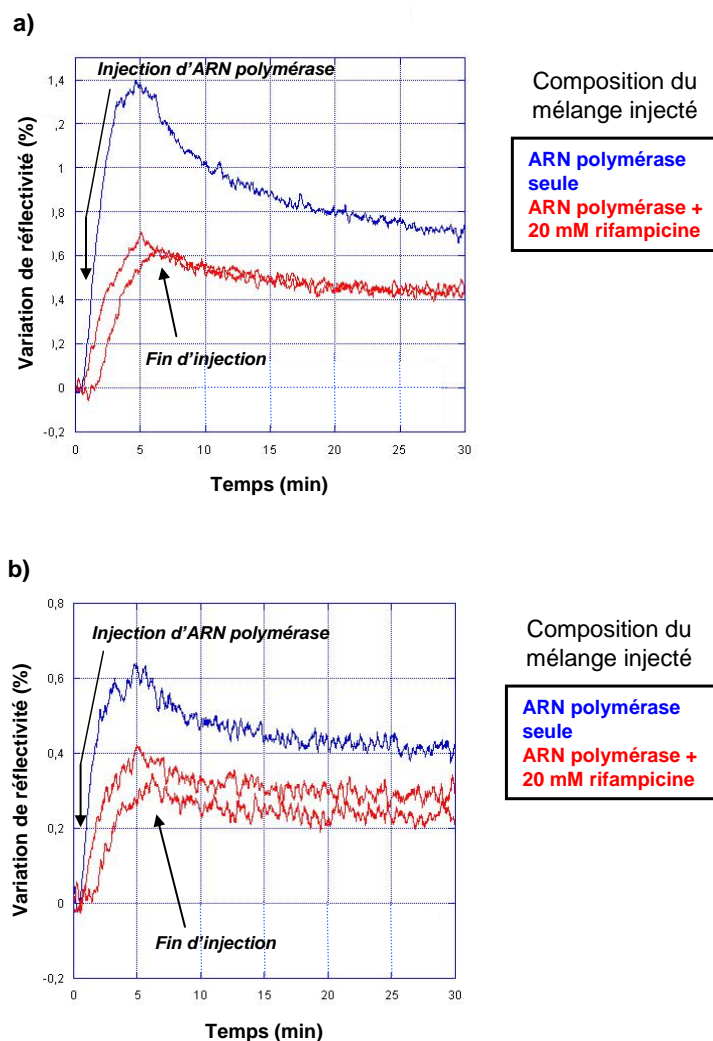


Figure 99 : Superposition de signaux cinétiques obtenus durant l'injection d'ARN polymérase à 10 nM seule ou pré-incubée avec 2 mM de rifampicine (rapport 1/2 000) – a) Cas de JMV 3076-6, un « répondeur » fort – b) Cas de JMV 3077-4, un répondeur « faible »

Pour chacune des sondes « positives », de façon assez franche, l'ajout de 2 mM de rifampicine dans l'échantillon injecté induit une diminution de moitié de la variation de réflectivité au cours de l'acquisition cinétique, et ce de manière reproductible. L'expérience montre par conséquent que la fixation préalable de la rifampicine gêne la liaison entre les sondes « petits ligands » et l'enzyme. Deux hypothèses peuvent permettre d'expliquer ce phénomène ; d'une part, soit l'enzyme change de conformation au niveau du site de fixation de la sonde « petit ligand », soit le site de fixation de la sonde immobilisée recouvre au moins partiellement celui de la rifampicine. Or, selon les travaux de Campbell et al, le complexe rifampicine / ARN polymérase de *Thermus thermophilus* ^[96] présente très peu de différences structurales par rapport à l'enzyme seule. Ainsi, les données recueillies à ce jour laissent

supposer, sans toutefois pouvoir le certifier, que les sites de la rifampicine et des sondes immobilisées se recouvrent.

3.3. Analyse structure / activité

L'ensemble des données cinétiques a clairement mis en évidence que 8 composés issus de la chimiothèque sont capables d'interagir avec la cible pharmacologique ; 4 appartiennent à la série quinazoline-2,4-dione, et 4 à la série des hydantoïnes. Or, sachant que l'approche combinatoire fournit généralement un produit « positif » sur 10 000, ce résultat paraît très surprenant. Afin de comprendre le pourquoi de ce nombre élevé, une étude comparative de la structure générale des composés bioactifs avec ceux décrits récemment dans la littérature est nécessaire.

Selon les travaux d'André et al ^[36, 37], des molécules aux structures chimiques apparentées à celle utilisée dans la chimiothèque se sont montrées actives envers l'ARN polymérase par inhibition de la formation du complexe initial de transcription. Plus précisément, les auteurs ont pu démontrer que ces produits de synthèse sont capables de bloquer spécifiquement l'association du facteur σ au « core » de l'ARN polymérase bactérienne. Parmi ces molécules, la structure de la plus active d'entre elles est dessinée en figure 100. Aussi, de manière analogue à l'expérience portée en figure 96, ces mêmes auteurs ont aussi démontré que l'anticorps 11D11, dont l'épitope se situe sur la sous-unité β' , peut toujours s'accrocher à l'enzyme après que le composé SB2 ait interagit avec sa cible.

D'un point de vue structural, d'après la figure 101, la ressemblance est assez frappante. En effet, pour la série quinazoline-2,4-dione, SB2 partage en commun le motif « diformylamide » ainsi que deux hétéroatomes au sein de l'hétérocycle à 6 sommets. Cette comparaison de structure se justifie d'autant plus qu'une hydantoïne commerciale, la phénytoïne (Dilantin[®]), possède des propriétés pharmacologiques analogues à un barbiturique commercial, le phénobarbital (Luminal[®]), alors que ce dernier est pourvu d'un cycle à 6 sommets (figure 100).

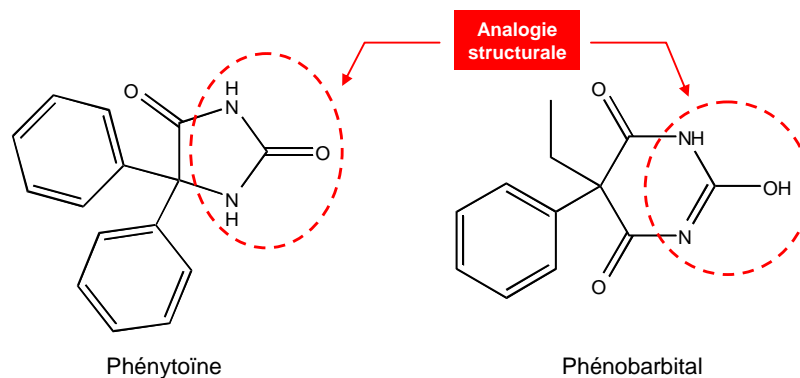


Figure 100 : Analogies de structures entre un anti-épileptique, la phénytoïne, et un anesthésique, le phénobarbital ; les deux composés possèdent un centre type « diformylamide » sans pour autant avoir le même nombre d'atome constituant l'hétérocycle

Pour la série hydantoïne, l'ensemble de la structure du noyau est quasiment superposable avec celle du composé SB2. En effet, seule la nature de 2 hétéroatomes diffère. Cette homologie paraît être un facteur clé pour expliquer l'obtention de 8 sondes « positives » au cours de la campagne de criblage de la chimiothèque.

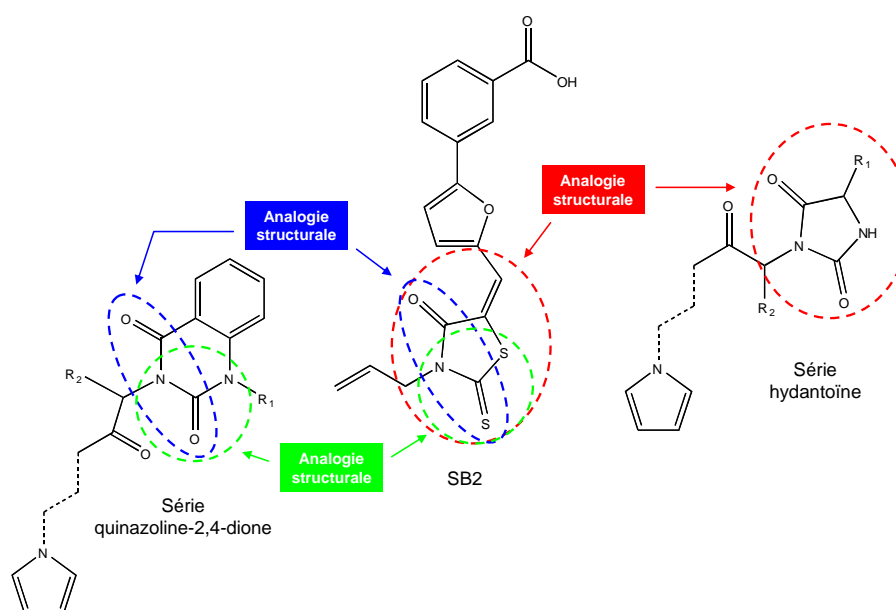


Figure 101 : Mise en évidence des analogies de structure entre les différents composés criblés et le composé SB2 ^[36, 37]

L'étude de la relation structure / activité individuelle de chacun des composés « positifs » révèle par ailleurs des analogies intéressantes avec le produit SB2. En effet, pour la série hydantoïne, l'association d'un groupement hydrophobe (Trp ou Val) en position R₂ et d'un groupement hydrophile (Asp, His) en position R₁ est nécessaire. Ceci correspond aux résultats exprimés par André et al suivant l'importance de l'hydrophilie du groupement R₁.

En conclusion, cette étude a permis de démontrer la faisabilité d'une telle approche consistant à immobiliser des sondes « petits ligands » et de détecter des interactions spécifiques vis-à-vis d'une cible pharmacologique, l'ARN polymérase bactérienne.

D'autre part, la comparaison de structure entre les produits immobilisés et ceux existant dans la littérature souligne la plausibilité de tels résultats « positifs » lors du criblage de la chimiothèque. Cependant, une exploration plus fine ne peut être effectuée compte-tenu de la trop faible diversité de sondes ici immobilisées.

III. EVOLUTION FUTURE DU PROJET

1. A court terme

1.1. Détermination fine de la structure active

Le principe analytique employé dans le paragraphe II.3.2.2. peut être étendu à chaque composé « positif », c'est-à-dire en remplaçant la rifampicine par la sonde « petit ligand » cette fois mise en solution. Dans ce type d'expérience, deux cas de figure peuvent être envisagés. En effet, la sonde « petit ligand » en solution peut correspondre soit à la sonde seule, soit à la sonde couplée au bras espaceur pyrrolé (figure 102). Théoriquement, pour chacune des sondes « positives », en fonction des éventuelles différences de comportement enregistrées entre les expériences précitées, il sera possible d'affirmer définitivement quelle(s) partie(s) de la sonde immobilisée induisent une réelle interaction biologique spécifique avec l'ARN polymérase bactérienne.

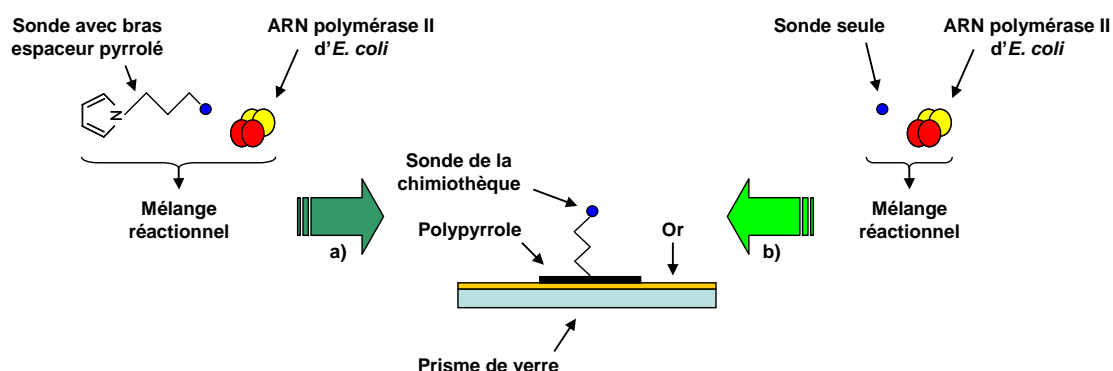


Figure 102 : a) Essai par compétition entre l'ARN polymérase bactérienne et la sonde seule – b) Essai par compétition entre l'ARN polymérase bactérienne et la sonde munie du bras espaceur pyrrolé

1.2. Localisation du site de fixation

Afin de mieux localiser le ou les sites de fixation entre les sondes « petits ligands » et l'enzyme, il est envisageable dans un premier temps d'étendre la méthode décrite en II.3.2.1. via l'utilisation, à la fois, d'autres anticorps monoclonaux anti-ARN polymérase que l'anticorps 11D11, mais aussi de différents facteurs de transcription dont fait partie σ_{70} . Si après la reconnaissance préalable par la sonde « petit ligand » la fixation du partenaire protéique sur l'enzyme est inhibée ou éventuellement décroche celle-ci du support, il est hautement probable que la zone d'interaction entre ces deux couples se recouvre (figure 103).

A titre d'exemple, l'expérience menée avec 11D11 indique qu'*a priori*, le site de fixation des sondes « petits ligands » répondeurs n'est pas situé sur la sous-unité β '.

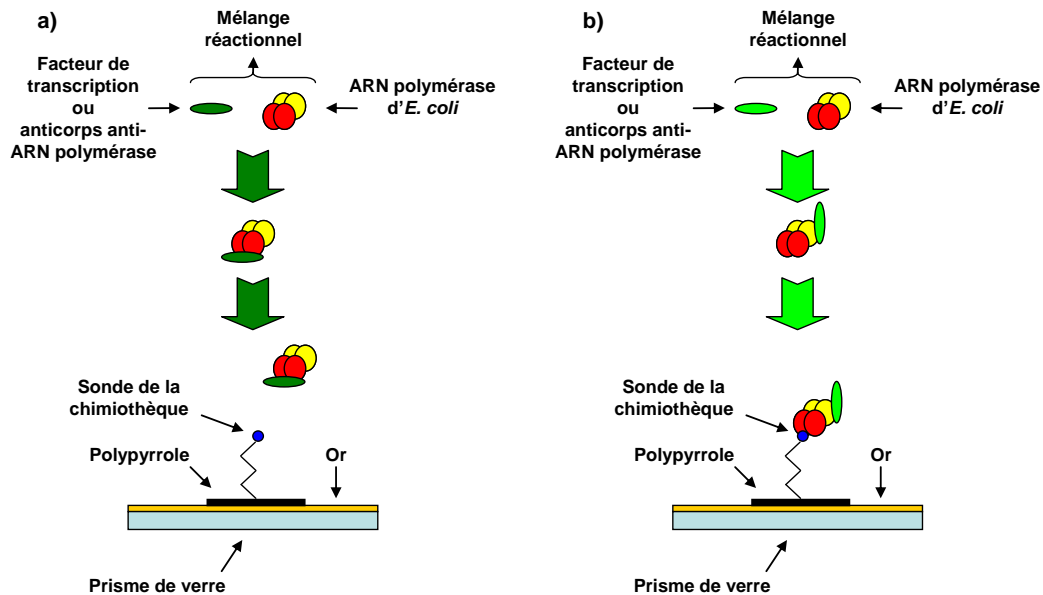


Figure 103 : Différents cas de figure envisageable d'après la méthode par compétition – a) Recouvrement partiel ou total entre les zones d'interaction de la sonde « petit ligand » et le ligand protéique – b) Aucun recouvrement des zones d'interaction pour les deux couples mis en jeu (cas de l'anticorps 11D11)

Dans un deuxième temps, une seconde façon de cartographier l'interaction sonde « petit ligand » / ARN polymérase est de procéder à l'incubation en solution du « core » de l'enzyme avec le partenaire protéique ; ceci correspond à une approche parallèle à celle citée dans le paragraphe précédent (figure 102). Là aussi, l'inhibition de la fixation du complexe protéique peut signifier un domaine de recouvrement, même partiel, entre les deux couples mis en jeu.

Cependant, l'utilisation de facteurs de transcription ainsi que d'anticorps monoclonaux ne peut qu'étendre l'étude à des surfaces disponibles « à l'extérieur » de l'enzyme. Ainsi, pour cartographier le site si celui-ci se situe dans le grand canal par exemple, une dernière approche consiste à employer des cibles pharmacologiques localement modifiées, c'est-à-dire des « core » d'ARN polymérase mutants.

1.3. Test d'activité en solution

L'étude des interactions par imagerie SPR ne permet cependant pas d'accéder directement aux conséquences biologiques sur le fonctionnement de l'enzyme. La méthode traditionnelle de transcription en solution ^[36, 37] doit alors être utilisée pour quantifier l'intérêt biologique

des interactions détectée par SPRi. C'est pourquoi il est prévu, dans un proche avenir, de procéder à un criblage complémentaire des différents composés « positifs » suivant cette technique plus classique.

1.4. Autres cibles pharmacologiques

Suivant les résultats indiqués en figure 97b, la biopuce à « petits ligands » peut être régénérée par l'utilisation d'une solution de détergent puissant, le dodécylsulfate de sodium (SDS), tout en conservant les sondes actives et disponibles pour une nouvelle série d'injection de cible protéique (*données non montrées*). Or, l'avantage d'une telle robustesse peut être mis à profit pour tenter de cribler une large série de cibles pharmacologiques, qu'elles aient une visée antibiotique ou non. Suivant ce principe, d'une part, la probabilité de récupérer un composé « positif » sera multipliée par le nombre de cibles analysées, et d'autre part, le gain de temps sera considérable par rapport à l'approche « classique » qui consiste à procéder au test en solution du type « un composé pour une cible ».

Par extension, cette technique de détection pourrait accueillir des échantillons « complexes », c'est-à-dire des extraits cellulaires bactériens dans le cas de la mise au point d'un antibiotique.

2. A long terme

2.1. Extension de la chimiothèque

Après confirmation du réel intérêt de ces molécules vis-à-vis de l'enzyme (cf. III.1.3.), il s'agit dans un premier temps de synthétiser des analogues structuraux proches de la série ici testée. En effet, grâce à la technique mise en œuvre dans le cadre de cette étude, il est possible de procéder à un « affinage » plus précis de la structure la mieux adaptée pour interagir avec l'enzyme.

Plus largement, au stade actuel de développement du projet de criblage de « petits ligands » sur support puce, les travaux ci-avant ont pu montrer la faisabilité d'une telle méthode pour une galerie de 32 composés. Or, compte-tenu de la faible probabilité d'obtenir un produit bioactif, ce travail s'inscrit comme la première étape poussant vers une augmentation de nombre de composés à immobiliser par support puce SPRi.

Le nombre de zones de dépôt étant limité à 64 zones (8 x 8) avec le procédé par aiguilles (cf. II.1.4.4.), une nouvelle technique d'immobilisation par plume électrochimique est en cours de validation au laboratoire (figure 69) ^[132]. Grâce à ce procédé, des puces à « petits ligands » à très haute densité peuvent être envisagées ; en effet, récemment, jusqu'à 10 000 zones de dépôts ont pu être créées sur une seule lame de microscope (*travaux non publiés*).

2.2. Couplage avec la spectrométrie de masse

Le principe de détection par résonance de plasmon de surface est avantageux dans le sens où il fait partie du cercle très fermé des méthodes « sans marqueur » et permet une acquisition en temps réel. Suivant les approches analytiques décrites ci-avant, il a aussi été démontré la possibilité d'accéder à des données structurales sur le lieu des interactions ainsi que sur l'intégrité de la cible biologique.

Cependant, dans le cadre d'un criblage sur un mélange « complexe » (cf. III.1.4.), ces données n'offrent pas assez de renseignements pour identifier une cible inconnue. C'est pourquoi l'idée d'associer en ligne l'imagerie SPR à la spectrométrie de masse serait un moyen rapide d'obtenir des informations complémentaires utiles à une meilleure définition des partenaires protéiques ayant potentiellement réagi dans l'échantillon injecté. Actuellement, plusieurs équipes travaillent sur le couplage de ces techniques, mais systématiquement par SPR « classique » ^[154, 155]. Grâce au support biopuce, la mise au point d'une telle méthodologie par imagerie SPR augmenterait de manière conséquente la puissance de l'approche développée au cours de ces travaux.

PARTIE II : UN OUTIL POUR DETECTER LES TOXINES

Cette deuxième partie a trait à la mise au point d'une méthode analytique de détection ultrasensible d'une toxine, la ricine, par imagerie SPR à partir d'un immunocapteur au format de type biopuce. Après avoir défini le bioterrorisme dans le contexte international, les différentes propriétés de la ricine, ainsi que les méthodes de détection préexistantes, seront présentés les développements ayant eu cours au sein du CREAB. A partir des résultats obtenus, plusieurs axes de recherche seront discutés.

I. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

1. Le bioterrorisme

A la différence de la « guerre biologique », le bioterrorisme se définit par l'utilisation ou la menace d'utilisation d'agents biologiques, sans déclaration de guerre officielle par un Etat ou un groupe criminel, afin d'induire intentionnellement une maladie ou le décès d'êtres vivants. En 100 ans d'histoire, 222 cas à caractère bioterroriste ont été référencés, dont seulement 24 ont réellement été attribués à un acte de bioterrorisme ^[156].

1.1. Les agents utilisés à des fins bioterroristes

Les agents biologiques peuvent être de nature très variable : virus, bactérie, protozoaire, champignon, ou protéine toxique. Par ailleurs, les instances de santé publique américaines (C.D.C., *i.e.* Centers for Disease Control and Prevention) ^[157] ont défini un classement en trois catégories de ces armes biologiques en fonction de leur morbidité et de leur facilité de dissémination.

En catégorie A figurent les agents ayant le plus « haut potentiel » d'impact sur la santé publique, c'est-à-dire ayant les caractéristiques nécessaires pour une dissémination / transmission aisée, et une mortalité / morbidité élevée. Plus précisément sont regroupés dans cette catégorie les éléments suivants : l'anthrax ou maladie du charbon (*Bacillus anthracis*), la variole (*Variola major*), les fièvres hémorragiques (Ebola, Marburg, Lassa, ...), la peste noire (*Yersinia pestis*), la tularémie ou fièvre du lapin (*Francisella tularensis*), et le botulisme (toxine botulique produite chez *Clostridium botulinum*). Pour chacun de ces agents, les voies de contamination et les éventuels traitements associés sont reportés dans le tableau 8.

Agent	Type	Maladie	Voie de contamination	Traitement
<i>Variola major</i>	Virus	Variole ou petite vérole	Muqueuses, peau, ...	Pas de traitement spécifique, mais vaccination
<i>Yersinia pestis</i>	Bactérie	Peste pulmonaire	Piqûre de puce, poumons	Antibiothérapie (streptomycine, gentamycine, tétracyclines)
<i>Clostridium botulinum</i>	Bactérie / toxine	Botulisme	Plaies, aliments	Antitoxine
<i>Francisella tularensis</i>	Bactérie	Tularémie	Peau, poumons	Antibiothérapie
<i>Bacillus anthracis</i>	Bactérie	Charbon	Aliments, peau, poumons	Antibiothérapie
Arenaviridae, Bunyaviridae, Filoviridae, Flaviviridae, Paramyxoviridae	Virus enveloppés à ARN	Fièvres hémorragiques virales (Argentine, Bolivienne, Vénézuélienne, de Lassa, de Marburg, Ebola, ...)	Piqûre par arthropodes, moustiques, et réservoirs non systématiquement identifiés	Pas de traitement spécifique (sauf Ribavirin pour Lassa)

Tableau 8 : Les agents biologiques de catégorie A ^[157]

En catégorie B sont inscrits les agents de plus « faible potentiel » en terme de danger pour la population, c'est-à-dire ayant une moindre facilité de dissémination / transmission ainsi qu'une mortalité basse et une morbidité modérée. Néanmoins, ces armes potentielles nécessitent une surveillance accrue de la part des services de santé. Se retrouvent dans cette catégorie les différents éléments : les brucelles (*Brucella*), les salmonelles (*Salmonella*), les shigelles (*Shigella*), la souche bactérienne dysentérique *Escherichia coli* O157:H7, le typhus (*Rickettsia*), la toxine epsilon de *Clostridium perfringens*, le virus du choléra (*Vibrio cholerae*), le virus de la fièvre Q (*Coxiella burnetii*), le virus de la psittacose (*Chlamydia psittaci*), le virus de la mélioidose (*Burkholderia pseudomallei*), le virus de la morve (*Burkholderia mallei*), la ricine ou toxine du ricin, l'entérotoxine B du staphylocoque (*Staphylococcus*), les virus responsables d'encéphalites telles que l'encéphalite équine vénézuélienne, les encéphalites équines orientale et occidentale, la cryptosporidiose (*Cryptosporidium parvum*).

Enfin, en catégorie C sont recensés les agents émergents ; faciles à obtenir en grandes quantités et aisément disséminables, ils ont un fort potentiel en terme de morbidité / mortalité sur la santé publique. Actuellement, cette catégorie renferme par exemple les virus de la famille des Henipavirus (*Handravirus*, *Nipahvirus*). En plus de ces maladies récemment découvertes, des souches naturellement saprophytes sont rendues pathogènes par génie génétique suite à l'insertion dans leur génome de gènes de résistance aux antibiotiques, de gène d'échappement au système immunitaire, ...

1.2. Les méthodes et voies de contamination des populations

Les attaques bioterroristes peuvent potentiellement viser deux types de cibles ; d'une part, la population de manière directe et d'autre part, l'agriculture / élevage du pays. L'objectif dans les deux cas est de provoquer une panique de la population visée avec pour conséquence une désorganisation économique du pays concerné. Pour y parvenir, quatre voies de contamination existent : la voie par injection, la voie cutanée, la voie par aérosol et la voie alimentaire.

Historiquement, la voie par injection a été utilisée en Chine dans les années 1930, au cours d'un programme sur les armes biologiques mené par le Pr Ishii ; différentes souches bactériennes telles le charbon, et la peste ont été inoculées à des milliers de prisonniers.

La voie cutanée est utilisable pour des agents tels que le bacille du charbon, *Francisella tularensis*, *Variola major* et les virus responsables de fièvres hémorragiques. Outre les fièvres hémorragiques, le virus de la variole est le seul agent pouvant se transmettre aisément par simple contact cutané. Récemment, le 18 septembre 2001, sept enveloppes « piégées » contenant le bacille du charbon (*Bacillus anthracis*) ont été envoyées aux médias ainsi qu'à deux sénateurs américains. L'attaque menée par les terroristes a provoqué le décès de cinq personnes ^[158].

Quant à la dissémination par aérosol, son utilisation pourrait être applicable aux agents respectifs de la tularémie, de la fièvre Q, du typhus, de la variole, de la peste ainsi qu'à un certain nombre de toxines comme la toxine botulinique ^[159]. Afin de répandre dans l'atmosphère l'agent toxique, le vecteur utilisé peut être une bombe, un épandage massif par hélicoptère ou par avion, un système d'aération tel qu'un climatiseur. Ainsi, dans les années 1990, la technique de l'épandage a été choisie par la secte Aum, au Japon, lors d'une tentative d'attentat à l'anthrax durant le mariage du prince héritier.

La contamination des ressources en eau et des aliments est, elle, encore plus problématique. L'injection de substances toxiques telles que la toxine botulinique ou la ricine dans les réseaux d'adduction en eau est une menace pour une population importante en nombre. En effet, une épidémie de fièvre typhoïde (*Salmonella typhimurium*) ayant fait 700 victimes a été enregistrée en 1984 dans l'état de l'Oregon puis attribuée à un acte bioterroriste (secte Rajneeshee) ^[158]. De même, le secteur alimentaire peut être concerné par ce risque par une contamination de lots de boissons (jus de fruits, aliments lactés).

L'agriculture peut aussi être la cible d'actions bioterroristes ; en 1977, la presse américaine a révélé qu'en 1971, une épidémie de peste porcine africaine fut importée par des organisations anti-castristes soutenues par la CIA. En conséquence, les Cubains durent euthanasier la moitié de leurs porcs pour enrayer la maladie. De même, d'autres épisodes de bioterrorisme contre Cuba ont été attribués aux américains selon une enquête internationale : la dengue (1981), le smut de la canne à sucre (*Ustilago sitamania*) et le mycète du tabac ^[160].

1.3. Les difficultés de mise au point

Contrairement aux armes conventionnelles, les armes biologiques peuvent être obtenues facilement, en grande quantité et pour de faibles coûts. Pour autant, rendre de telles armes efficaces n'est pas chose aisée ; par exemple, la bactérie *Yersinia pestis* ne peut survivre qu'en milieu humide, ce qui limite l'efficacité de son épandage en fonction des conditions atmosphériques ^[157]. Outre la stabilité dans le milieu extérieur, la formulation de l'agent toxique doit être adaptée à la voie d'entrée dans l'organisme ; une contamination par aérosol nécessite une taille appropriée de particule ^[161]. Enfin, à la différence des armes conventionnelles, un « temps d'incubation » variable suivant l'agent employé est nécessaire pour obtenir les effets escomptés par les terroristes. Ce délai est généralement plus court pour les toxines (entre 12 et 36 heures avec la toxine botulique) ^[162].

1.4. Les instances luttant contre le bioterrorisme

Historiquement, en décembre 1971, l'Assemblée des Nations Unies a ratifié une Convention sur l'« interdiction de la mise au point, de la fabrication et du stockage des armes bactériologiques ou à toxines et sur leur destruction » (CIAC) ^[163]. Entrée en vigueur dès 1975, aucune organisation n'est cependant chargée de vérifier son application sur le terrain. Plus tard, en novembre 2002, à Ottawa, la Communauté Internationale (G7) a signé un accord international décrétant la mise en place de mesures de protection des populations face à la menace type NRBC (Nucléaire, Radiologique, Biologique, Chimique).

Aux Etats-Unis, le CDC, une agence dépendante du Département du Service de Santé, est responsable de la mise en place des stratégies de prévention face aux menaces bioterroristes ainsi que de l'élaboration de plans d'urgence.

Au niveau européen, des dispositions en matière de recherche, d'organisation, etc., ont été prises pour tenir compte de la menace bioterroriste. Selon une communication de la Commission Européenne ^[164] (pas au JO), depuis les attentats de Septembre 2001 aux Etats-Unis, l'Union Européenne a demandé la mise en place d'un plan actif de coopération pour prévenir et réagir efficacement face à cette nouvelle menace. Concrètement, il s'agit d'instaurer un « mécanisme d'alerte et d'échange d'informations », de créer des capacités de détection et d'identification » des agents employés, et de créer une « base de données relative aux stocks de médicaments ». Pour cette dernière mesure, un stock de vaccin antivariolique est en cours de constitution au niveau national et européen.

Au niveau national, un plan d'urgence spécifique en cas d'attaque bioterroriste a été mis en place : Biotox ^[165]. Brièvement, celui-ci consiste à la fois à déceler au plus vite une épidémie naissante (Afssaps), à identifier l'agent en cause, à former les personnels pré-hospitaliers / hospitaliers, et à gérer les stocks nationaux de médicaments.

Dans ce contexte, les autorités nationales, européennes ^[164] et mondiales demandent aux laboratoires de recherche de mettre au point des méthodes analytiques simples, sensibles et rapides pour détecter toute présence d'agent à usage potentiellement bioterroriste.

2. La ricine : une protéine toxique

2.1. L'origine naturelle

La ricine est une glycoprotéine toxique de 66 kDa produite chez un arbrisseau de la famille des Euphorbiacées, le ricin (*Ricinus communis*) (figure 104) ; cette plante originaire de l'Afrique tropicale est actuellement répandue dans le monde entier sous des climats subtropicaux et tempérés. Sa culture est assez facile moyennant un drainage suffisant du sol.



Figure 104 : Planche botanique du ricin (*Ricinus communis*)

Les graines (figure 105) sont utilisées pour la production, par pression à froid, d'huile de ricin (jusqu'à 60 % de la masse de la graine) ; l'acide ricinoléique, le principe actif de l'huile, est responsable des propriétés purgatives de cette préparation par une altération de la muqueuse intestinale et une perte hydrique ainsi qu'en électrolytes. Actuellement, l'utilisation à des fins thérapeutiques est vivement déconseillée de par la présence d'autres principes actifs allergisants capables d'induire des chocs anaphylactiques. L'huile de ricin a aussi d'autres utilisations pour la production de plastiques (Rilsan), de surfactants et de peintures grâce à ses propriétés lubrifiantes. Actuellement, selon l'ONU, la production des graines de ricin est majoritairement effectuée en Chine (66 % de la production mondiale), suivie par l'Inde (21 %) et le Brésil (6 %) ^[166].



Figure 105 : Les graines de ricin contiennent la toxine ricine

La toxine ricine est principalement trouvée dans les graines de ricin (entre 1 et 10 % de leur poids) et peut éventuellement contaminer l'huile de ricin insuffisamment purifiée. Cependant, le passage des graines dans une atmosphère à 125°C durant 15 minutes suffit à détruire l'activité de la toxine. Les données cliniques issues d'intoxications accidentelles à la ricine par voie orale indiquent que seules 3 graines suffisent pour gravement intoxiquer un enfant alors qu'il en faut 6 pour provoquer le décès d'un adulte ^[161].

2.2. Le mécanisme d'action

2.2.1. Caractérisation moléculaire

La ricine est une protéine hétérodimère hydrosoluble ; elle est constituée de deux sous-unités différentes notées A et B reliées par un pont disulfure nécessaire à l'activité toxique (figure 106). La sous-unité B permet l'accrochage à la paroi cellulaire *via* les saccharides de surface ; c'est une lectine ^[167] liant préférentiellement les sucres porteurs de terminaisons type

galactose ou *N*-acétylgalactosamine. Quant à la sous-unité A responsable de l'effet toxique, elle a pour rôle d'inhiber la synthèse des protéines en bloquant l'activité synthétique du ribosome (EC 3.2.2.22). Plus précisément, l'ARN ribosomal 28 S est altéré par dépurination de l'adénosine de la séquence GAGA, elle-même appartenant à une boucle très conservée [168, 169]. L'inhibition de la traduction conduit alors à la mort cellulaire. La protéine ricine purifiée peut être dénaturée par chauffage à 80°C durant 10 minutes ou par chauffage à 50°C durant 1 heure.



Figure 106 : Structure moléculaire de la ricine obtenue par analyse cristallographique aux rayons X [170]

2.2.2. Stratégies de traitement

La compréhension des mécanismes de pénétration intracellulaire aboutit actuellement à l'élaboration de différentes stratégies thérapeutiques ; la plus connue est la vaccination passive par l'emploi d'anticorps monoclonaux neutralisants pour lesquels les essais en culture cellulaire et *in vivo* semblent prometteurs [171]. Des essais de vaccination active ont été tentés avec la toxoïde de la ricine [172] et des protéines recombinantes immunogènes dépourvues de toxicité dérivant de la ricine – RiVax[®] (DOR BioPharma Inc[®], Etats-Unis), essais en phase I [173]. D'autres approches sont aussi à l'étude comme l'utilisation d'analogues du substrat de la ricine, c'est-à-dire des polynucléotides éventuellement modifiés [174, 175], et la découverte d'un inhibiteur direct de l'activité catalytique de la chaîne A, l'acide ptéroïque [176].

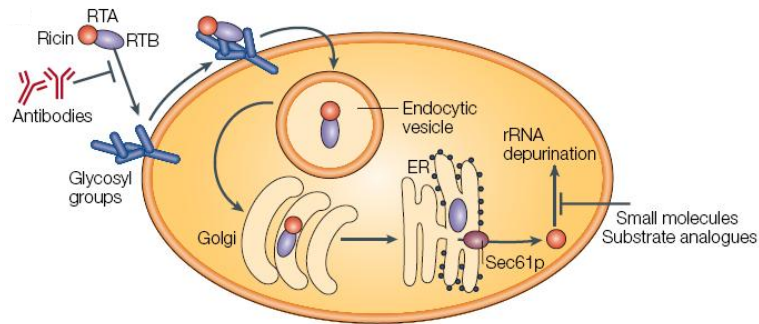


Figure 107 : Mécanismes d'entrée cellulaire de la toxine ricine et stratégies anti-toxine en cours de validation

[177]

2.2.3. Utilisation à des fins thérapeutiques

D'un point de vue applicatif, les propriétés de reconnaissance d'oligosaccharides de surface cellulaire par la chaîne B de la ricine ne peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques pour l'élaboration d'un vecteur. En effet, ces terminaisons saccharidiques ne sont pas spécifiques d'un type de lignée cellulaire. Quant à la chaîne A de la toxine, elle a trouvé son utilisation dans le traitement de maladies myéloïdes – lymphomes non-Hodgkiniens à cellules B ou T, lymphomes de Hodgkin, leucémie lymphocytaire chronique, leucémie myéloïde aigüe, cancer métastatique du liquide cébrospinal – en tant qu'immunotoxine, c'est-à-dire sous la forme d'une protéine conjuguée entre la sous-unité A de la toxine et une protéine « vecteur » type immunoglobuline ou facteur de croissance [178]. La chaîne A de la ricine étant capable de reconnaître des antigènes de surface principalement hépatiques (mannose) *via* sa partie glycosylée, une altération chimique de cette dernière partie a permis une amélioration de l'adressage cellulaire de l'immunotoxine [171].

2.3. Les données toxicologiques

2.3.1. Symptomatologie

L'intoxication par inhalation ou parentérale est nettement plus dangereuse que par voie digestive (rapport 1000) où la toxine est partiellement absorbée puis inactivée par les enzymes protéolytiques. Par voie perlinguale, les quantités absorbées peuvent cependant être supérieures à la voie *per os*. Selon l'Institut National de Veille Sanitaire (INVS), chez l'homme, les doses létales reconnues sont de l'ordre de 1 mg/kg *per os*, de 1 à 3 mg/kg en voie parentérale, et de moins de 3 mg/kg en voie sous-cutanée.

Consécutivement à l'inhalation de la toxine, des symptômes caractéristiques apparaissent au bout de quelques minutes à quelques heures : irritations oculaires (brûlures, larmoiements, conjonctivites), irritations pharyngées, irritations respiratoires (toux, dyspnée, œdème pulmonaire). L'atteinte des voies respiratoires peut aboutir à un syndrome de détresse respiratoire aigu ^[179].

L'intoxication *per os* induit un tableau clinique différent : vomissements, gastralgies, crampes abdominales, hypotension, diarrhée sévère entraînant une importante perte hydrique. Consécutivement à ces pertes hydro-électrolytiques, des signes neurologiques apparaissent : faiblesse musculaire, troubles de la vision, altération de la conscience, convulsions. Habituellement, le décès survient par collapsus réfractaire. La mort de la personne intoxiquée peut survenir dans un délai de 36 à 72 heures suivant la quantité et le mode de contamination.

2.3.2. Toxicocinétique

La ricine est faiblement absorbée lorsqu'elle est administrée *per os*. Son hydrosolubilité traduit une distribution proche de celle de l'albumine ; la toxine est par ailleurs capable de traverser la barrière placentaire. Plus précisément, selon Cook et al ^[180], après administration orale de ricine, la toxine est retrouvée dans différents tissus en des proportions variables (tableau 9). Après métabolisation, son élimination est principalement fécale et secondairement urinaire.

Nature de l'échantillon	Ricine (ng.g ⁻¹)	% de la dose
Sang	---	0,7.10 ⁻⁴
Foie	9,5	26,9.10 ⁻⁴
Intestin	31,725	3,3.10 ⁻⁴
Rate	39,45	8,6.10 ⁻⁴
Reins	10,875	3,5.10 ⁻⁴

Tableau 9 : Analyse ELISA de la répartition tissulaire en ricine après ingestion de 8 mg *per os* chez le rat ^[180]

Les protocoles biologiques officiels pour la détection de la ricine reposent sur des échantillons de plasma sanguin et/ou d'urine *via* la méthode ELISA ; la fixation tissulaire de la toxine biaise l'évaluation de la charge totale reçue. Par cette méthode, la demi-vie plasmatique de la ricine a été évaluée entre 2 et 8 jours. Enfin, la détection urinaire est retardée de plusieurs jours.

2.4. Les cas d'intoxication

Devant un tableau clinique aspécifique (syndrome gastro-entéritique brutal et sévère), le diagnostic étiologique est difficile à poser. C'est pourquoi, selon les instances de santé publique, la définition d'un cas d'intoxication nécessite une confirmation biologique (présence de ricine dans le sang et/ou les urines) ainsi qu'une évaluation de la plausibilité d'exposition. Plusieurs niveaux d'exposition sont définis selon les critères rassemblés dans le tableau 10.

Signes cliniques avec ou sans confirmation biologique	Plausibilité de l'exposition			
	Exposition avérée	Exposition potentielle	Cas appartenant à un groupe cible (bioterrorisme)	Aucun indice de plausibilité
Signes cliniques AVEC confirmation biologique	Certain	Certain	Certain	Certain
Signes cliniques de type gastro-entéritique SANS confirmation biologique	Probable	Possible	Possible	Non cas

Tableau 10 : Définitions des cas suivant les critères d'évaluation de l'INVS ^[181]

L'exposition est dite « avérée » lorsqu'une contamination à la ricine a été observée (réseau d'eau, aliments, ...) et qu'un cas préalable d'intoxication s'est produit à la suite de celle-ci. L'exposition n'est que « potentielle » lorsque l'annonce d'une éventuelle contamination n'est ni confirmée analytiquement, ni repérée par la déclaration d'un autre cas d'intoxication. Enfin, lorsque deux personnes « cibles » (militaires, ...) présentent les signes cliniques, l'origine bioterroriste doit être envisagée.

2.5. La ricine, agent du bioterrorisme

La ricine est un agent utilisé à des fins bioterroristes car facile à obtenir ; d'une plante facilement cultivable, une « simple » pression à froid permet de récupérer les tourteaux riche en toxine. Mieux, les protocoles d'obtention et de purification de la toxine à partir de la plante sont disponibles en libre accès sur internet ^[182]. D'autre part, le caractère hydrosoluble de cet agent rend possible son utilisation dans les milieux liquides tels que l'eau (réseaux d'adduction, eaux mises en bouteille), et les aliments liquides (jus, ...) par lesquels une large population est « accessible ». C'est pourquoi devant deux cas suspects, qu'ils soient probables, possibles, ou certains, l'INVS considère comme première source de contamination à envisager l'eau du robinet. Si celle-ci n'est pas confirmée, une origine alimentaire doit être mise au jour en considérant les sources communes d'alimentation des cas précités, les aliments ayant subi un chauffage devant être écartés.

Enfin, la ricine constitue une réelle menace car son intoxication est difficile à traiter. En effet, la prise en charge du patient consiste actuellement en un traitement symptomatique des troubles gastro-entériques et le maintien des fonctions vitales associés à une absorption de charbon *per os* en cas d'ingestion. Aucun traitement spécifique à grande échelle n'existe ; plusieurs stratégies vaccinales par anticorps monoclonaux et par ingénierie moléculaire – mutagenèse dirigée – (RiVax[®], DOR BioPharma Inc[®], Etats-Unis) sont en cours de validation mais n'en sont encore qu'au stade de la recherche académique et préclinique ^[173, 183].

Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs attaques qualifiées de bioterroristes ont eu recours à la toxine ricine. Divers moyens d'inoculation ont été employés. La méthode du « parapluie bulgare » (figure 107) a été utilisée en 1978 pour l'assassinat de l'écrivain Georgi Markov par les services secrets bulgares ; l'extrémité du parapluie renferme une seringue chargée en ricine (0,5 mg) ^[184] et l'injection est déclenchée par un système de déclenchement à air comprimé.

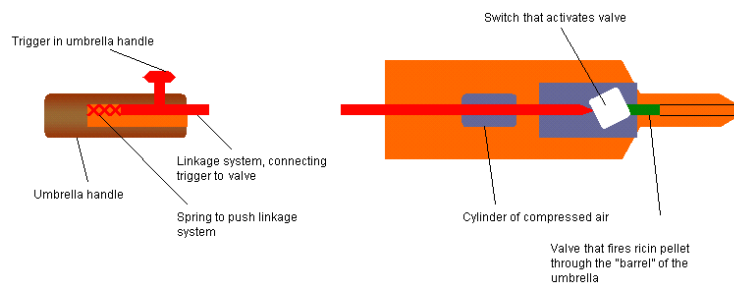


Figure 107 : Représentation schématique du fonctionnement d'un « parapluie bulgare »

D'autres tentatives d'attentat ont eu recours à l'usage de la ricine ; en 2002, un groupe islamiste a essayé d'utiliser ce poison dans le métro parisien. Encore plus récemment, en Janvier 2003, à Londres, une perquisition chez un Nord-Américain a révélé la présence de cette toxine. Enfin, en février 2004, une poudre suspecte contenant de la ricine a été découverte dans la chambre des sénateurs des Etats-Unis ^[185].

Pour autant, la militarisation de la ricine dans le but d'en faire une arme n'est pas simple. Par exemple, pour être efficace, l'aérosolisation de la toxine doit respecter un diamètre de particule bien défini (1 μm) ^[186, 187]. Aussi, la taille des particules permet d'augmenter le temps de suspension de l'agent toxique dans l'air.

2.6. Les méthodes de détection de la ricine

2.6.1. Par suivi de l'activité

Cette première catégorie de tests repose sur l'activité catalytique de la sous-unité A de la toxine ricine ; le principe de la méthode est reporté en figure 108. Brièvement, la prise d'essai est ajoutée dans un milieu *in vitro* capable de procéder aux étapes de transcription de l'ADN et de traduction de l'ARN de la luciférase. En présence de toxine ricine, l'étape de traduction ne se produit pas et le signal fluorescent de la luciférase est absent. Par quantification de l'intensité lumineuse, Mei et al. ont pu obtenir une sensibilité de l'ordre de 5 pM (0,3 ng/mL) ^[188]. Suivant le même principe, mais *in cellulo*, l'équipe de Zhao et al. ont obtenu une sensibilité de 20 fM (1 pg/mL) ^[189].

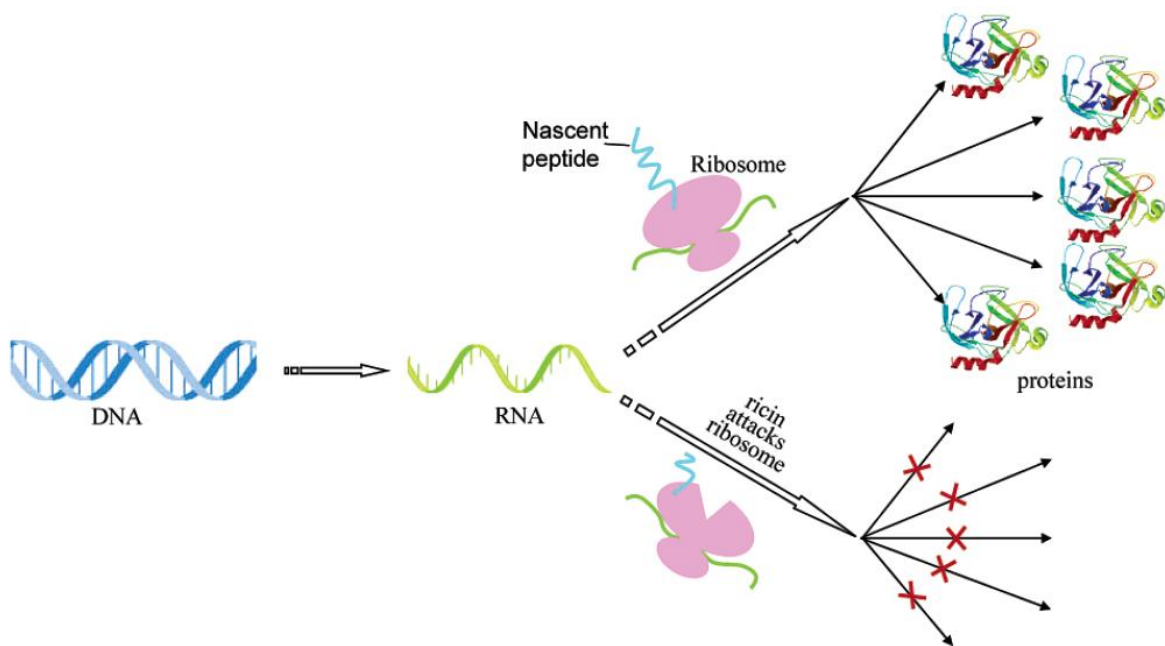


Figure 108 : Principe de détection utilisé pour un dosage selon l'activité de la ricine ^[188]

D'autres stratégies exploitant l'activité enzymatique de la ricine ont été mises au point au travers du dosage en solution d'un produit de réaction : l'adénine. Pour se faire, différents artifices ont été utilisés tels que le radiomarquage de la base au ^3H ^[190], l'isolement par chromatographie / spectrométrie de masse ^[191], ou encore le suivi par fluorescence après condensation éthénoadénine ^[192]. Bien que sensibles, ces méthodes ont pour inconvénient d'être peu spécifiques car influencées par la teneur en adénine libre dans la matrice de l'échantillon.

Afin d'y remédier, Becher et al. ^[193] ont mis en place une première étape de « capture » spécifique de la toxine au moyen de particules magnétiques recouvertes d'anticorps anti-ricine. Le mélange de billes incubant dans le milieu de transcription, la détection de l'adénine libre est finalement quantifiée par chromatographie / spectrométrie de masse. Grâce à cette

approche concentrant la ricine dans l'échantillon, jusqu'à 1,5 pM (0,1 ng/mL) de ricine peut être détectée.

Une dernière approche plus récente repose sur l'utilisation d'aptamères ; ces derniers sont des séquences oligonucléotidiques mimant le substrat naturel de la toxine ciblée. Le principal avantage des sondes réside dans leur faible coût de production et leur robustesse face aux agents de régénération. Grâce à une approche originale indiquée en figure 6, Keener et al. ont mis au point un test capable de détecter jusqu'à 1,5 pM (0,1 ng/mL) ^[194]. Brièvement, un ARN aptamère biotinylé en 5' et en forme de tête d'épingle sert de substrat à la ricine qui enlève l'adénine au site prévu à cet effet. Après réaction, les éventuels sites abasiques instables conduisent à une rupture du brin d'ARN en présence de *N,N*-diméthyléthylènediamine (Me₂ED). Enfin, des billes recouvertes de streptavidine captent toutes les séquences d'ARN biotinylés puis sont incubées en présence d'une séquence d'ODN situé en 3' et marqué au ruthénium. La détection est effectuée par électrochimiluminescence.

L'avantage majeur de ces approches est qu'elle permet une estimation de la quantité active de toxine dans l'échantillon analysé.

2.6.2. Par reconnaissance sur biocapteurs

Pour cette stratégie de détection, des sondes interagissant avec la ricine ont été immobilisées sur support (microplaque, fibres optiques, microsphères, ...). Plus précisément, trois catégories distinctes de sondes à ricine ont été développées ; les aptamères précédemment cités, les sucres et les anticorps.

Au moyen d'aptamères, l'équipe de Kirby et al. ^[195] a utilisé un mode de détection hybride ; une première étape de capture de l'échantillon repose sur la reconnaissance entre l'aptamère et la toxine. Dans une seconde étape de révélation, un anticorps « sandwich » couplé à un marqueur fluorescent est utilisé. La méthode analytique ainsi développée peut détecter jusqu'à 5 nM (320 ng/mL) de ricine, ce qui reste assez modeste comparativement aux autres techniques existantes.

Par ailleurs, selon les travaux de Stine et al. ^[196], une méthode possible de capture de la toxine repose sur les propriétés lectine de la chaîne B de la ricine ^[167]. Concrètement, des glycosphingolipides ont été immobilisés sur un cristal de quartz recouvert d'or *via* la chimie des thiols. Ensuite, l'analyse sur microbalance à quartz (QCM) a permis d'analyser l'échantillon. Ces travaux indiquent cependant qu'une méthode utilisant des sucres en tant

que sonde pour biocapteurs présente une sensibilité assez faible (25 µg/mL). En effet, selon Gustafson et al., les constantes d'équilibres K_D mesurées par résonance de plasmon de surface sont de l'ordre du micromolaire ^[197].

De fait, comme l'indique le tableau 11, les immunocapteurs, bien que plus labiles, ont été plus largement développés. Ici, la sensibilité obtenue dépend de la qualité de l'anticorps utilisé, et de la méthode de transduction du signal.

Support / Méthode utilisée	Limite de détection (ng/mL)	Référence
Microplaque / ELISA	5	[198]
Microsphères / FRET	1	[199]
Bandelettes / ICT-nanoparticules d'or	0,6	[200]
Biopuce / Fluorescence	0,5	[201]
Biopuce / Electrochimie	0,18	[202]
Biopuce (gel) / Fluorescence	0,1	[203]
Microplaque / ELISA chimiluminescence	0,1	[204]
Biopuce (microtubes) / ELISA	0,1	[205]
Microplaque / iPCR	0,00001	[206]

Tableau 11 : Différentes méthodes de transduction existantes basées sur les immunocapteurs

Actuellement, la technique analytique la plus sensible repose sur l'immunoPCR (Polymerase Chain Reaction). Cependant, cette technique a deux limites importantes ; d'une part, une difficulté pratique de mise en œuvre (nombreuses étapes avant la révélation), et d'autre part, un temps de révélation très long (9 heures) ^[206]. Parallèlement, les techniques dérivées de l'ELISA ^[198, 204] nécessitent plusieurs étapes de rinçages, augmentant par là le temps de dosage. D'autre part, ces méthodes sont assez limitées car elles n'explorent qu'une seule toxine par essai de dosage. Une alternative à l'ELISA reposant sur une technique immunochromatographique a été mise au point par l'équipe de Thullier et al ^[200] ; cette méthode simple d'emploi permet d'obtenir une sensibilité de 10 pM (0,6 ng/mL). Cependant, ici aussi, l'automatisation et la lecture de plusieurs dosages de toxines n'est techniquement pas possible.

Afin d'y remédier, des méthodes basées sur le format biopuce ont été développées ^[199] ; Taitt et al. ont pu ainsi doser 9 toxines différentes en parallèle ^[201]. La transduction du signal est soit optique par émission de fluorescence ou par coloration, soit électrochimique par couplage d'un anticorps à la HRP (Horse Radish Peroxydase) ^[202, 205]. Suivant le tableau 4, les sensibilités obtenues *via* ces biocapteurs sont comparables à la méthode de référence, l'ELISA. Enfin, du fait de la labilité des immunoglobulines immobilisées, Rubina et al. ont pensé inclure les anticorps sonde dans un gel maintenant un milieu hydraté ^[203]. Bien que cet

artifice ait permis une amélioration de la stabilité du biocapteur, la matrice induit une augmentation beaucoup trop longue de la durée de révélation.

3. Détecter des traces de toxines par imagerie SPR

3.1. Vers une approche « multitoxines »

3.1.1. Avantages des biopuces

Contrairement aux méthodes chromatographiques, les techniques reposant sur le principe des biopuces présentent l'avantage de pouvoir tester de manière parallélisée plusieurs paramètres pour un seul échantillon ; dans le format mis au point dans ce projet, le « paramètre » d'intérêt est la toxine ricine. Ainsi, l'objectif à terme est de faire « varier » ce paramètre en concevant une puce capable de détecter la présence de plusieurs toxines à la fois ; la mise en place d'une détection « multitoxines » va alors nécessiter autant de couples antigène / anticorps que l'on voudra tester de toxines. La densité maximale de plots synthétisables sur support SPR grâce à l'automate Omnigrad étant de 80 zones, jusqu'à 80 toxines seront potentiellement testées en parallèle sur une seule puce ; ceci semble suffisant pour couvrir la majeure partie des agents pouvant être utilisés à des fins bioterroristes ^[207].

3.1.2. Principes analytiques

Concrètement, le principe de l'immunodosage peut reposer sur les explications indiquées en figure 109 ; dans un premier temps, l'échantillon réagit avec le capteur. Le signal est alors amplifié *via* l'accrochage d'un mélange d'anticorps polyclonaux IgG de lapin anti-toxine (A, B, etc.). Enfin, la dernière étape d'amplification du signal sera réalisée *via* l'accrochage d'un marqueur pour l'imagerie SPR : des nanoparticules d'or fonctionnalisées par un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin. En effet, les billes d'or suscitent un intérêt particulier pour la détection d'analytes variés par SPR à la fois de par leur masse mais aussi pour leurs propriétés optiques ^[208, 209].

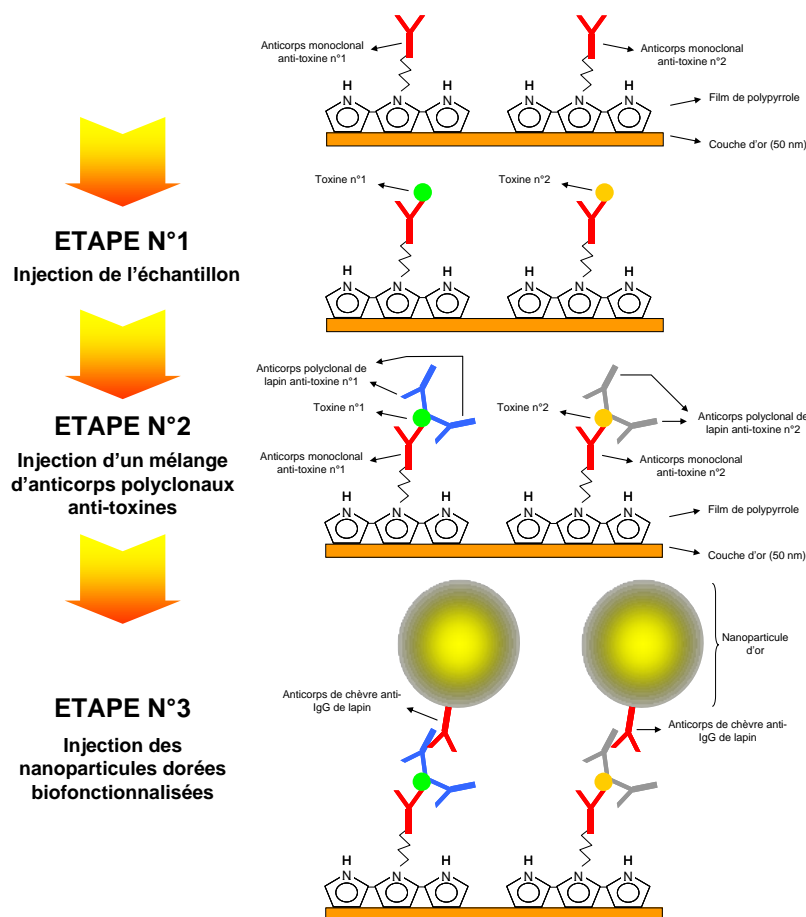


Figure 109 : Représentation schématique du procédé de révélation dans le cas d'un capteur « multitoxines »

3.1.3. Intérêt pratique

L'obtention d'un tel capteur à toxines permettrait à l'utilisateur de diagnostiquer rapidement la présence ou l'absence de ces molécules dans l'échantillon inspecté. Ainsi, grâce au format biopuce, en cas d'intoxication, l'utilisateur pourra identifier rapidement quelle est la molécule incriminée sous réserve qu'elle figure dans le « répertoire » de la puce. De plus, le protocole de révélation décrit en figure 109 étant unique pour l'ensemble des toxines, le risque d'erreur de manipulation est amoindri.

3.2. Contraintes associées au projet

3.2.1. Sensibilité et rapidité

Compte-tenu des faibles quantités nécessaires pour intoxiquer un humain ou une souris ^[203], la méthode de détection doit pouvoir détecter des quantités infimes de toxine. D'autre part, les toxines ayant un temps d'incubation court (quelques heures), le système doit être capable de

fournir des résultats rapidement afin qu'un traitement approprié puisse être mis en place lorsqu'il existe.

3.2.2. La ricine

Le travail présenté ci-après s'inscrit dans une étape de faisabilité du projet. Pour se faire, l'étude du capteur a été limitée à une seule toxine, la ricine. Des témoins négatifs ont cependant été rajoutés sur la puce afin de contrôler la spécificité de signal détecté.

Pour des raisons de sécurité, la technique d'immunodosage a été mise au point pour l'antigène « chaîne B de la ricine ». En effet, comme indiqué en I.2.1, la ricine est une protéine constituée de deux sous-unités, leur association rendant la protéine toxique. Or, afin de finaliser la mise en place de la méthode, des essais menés avec l'antigène « complet » devront être faits ; l'étude avec la chaîne B de la ricine a permis de démontrer la faisabilité d'une telle méthode pour une toxine quelconque.

II. MISE AU POINT D'UNE METHODE ANALYTIQUE POUR LA DETECTION DE LA RICINE

1. Fabrication d'un immunocapteur

1.1. L'anticorps utilisé pour l'immunocapteur

L'anticorps utilisé pour fabriquer un immunocapteur à ricine est un anticorps monoclonal dirigé contre la chaîne B de la ricine fourni par le Dr Philippe Thullier (*Groupe de technologie des anticorps, Département de biologie des agents transmissibles, Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, La Tronche, France*). Cet anticorps est produit chez la souris selon les modalités décrites par ailleurs ^[210]. Des essais par immunochromatographie (ICT) indiquent que l'affinité de cet anticorps est suffisante pour permettre la détection de ricine jusqu'à une teneur en ricine de 0,6 ng/mL ^[200].

Le choix de la sonde s'est porté sur un anticorps monoclonal car la spécificité des anticorps monoclonaux est beaucoup plus contrôlable que celle des polyclonaux. Or, outre sa forte réactivité pour la cible, le capteur demandé pour le projet nécessite une très grande spécificité afin d'éviter de faux positifs. Enfin, le coût de ces tests étant principalement lié à l'utilisation de cet anticorps monoclonal, il est préférable de le positionner en tant que sonde.

L'anticorps a été couplé avec le bras pyrrolylundécanoate de *N*-hydroxysuccinimidyle selon un protocole préalablement décrit au laboratoire ^[7]. Plus précisément, les fonctions aminées terminales libres (extrémité *N*-terminale de la chaîne peptidique, chaînes latérales des lysines) vont réagir avec la fonction ester activé du bras espaceur pour donner un lien covalent de type amide.

Les proportions de bras pyrrolé / anticorps monoclonal (mole à mole) ont été fixées à 20 ce qui permet un greffage plus reproductible. Après réaction, le mélange a été filtré sur une colonne Vivaspin[®] MWCO 30 000 afin d'éliminer l'excès de bras pyrrolé n'ayant pas réagi avec l'anticorps. L'anticorps fonctionnalisé est alors placé dans une solution de spotting formulée pour l'immobilisation de protéines ^[7] en présence de 20 mM de pyrrole. Afin d'optimiser les conditions de greffage, différentes densités de greffage en anticorps ont été testées en faisant varier la concentration de sonde dans la solution à spotter.

1.2. Le choix des références

Associées à ces zones sensibles à la ricine, des zones « contrôle négatif » ont dû être choisies. En effet, compte-tenu du mode d'immobilisation, un premier type de « contrôle négatif » correspond au polymère de pyrrole nu.

D'autre part, étant donnée la nature de la sonde anti-ricine, la deuxième référence choisie est une zone de polymère comportant une sonde de type anticorps non dirigée contre la chaîne B de la ricine. De plus, ces anticorps ne doivent pas provenir du lapin afin de ne pas interférer avec la construction envisagée ; il y aurait un faux positif durant la dernière étape de révélation.

Pour ces raisons, le choix s'est porté sur des anticorps polyclonaux humains de type IgG purifiés où aucun croisement inter espèce n'est envisagé. D'autre part, le coût de ces anticorps est bien plus faible qu'un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope quelconque.

Tout comme pour l'anticorps monoclonal anti-ricine, différentes densités de greffage en anticorps polyclonal humain ont été disposées dans la matrice. Ce principe permet en outre de vérifier que le polymère de pyrrole est ou non réactif vis-à-vis de la chaîne B de la ricine par simple « masquage » du polymère par l'anticorps polyclonal.

L'électrospotting a été fait dans des conditions classiques avec l'appareil semi-automatique Polypotter II. Une fois synthétisée, la matrice a été rincée au PBS puis plongée dans cette solution à 4°C. La puce a ensuite été introduite dans la cellule fluide ronde schématisée en figure 128 (III.1.1.1.) de l'imageur SPR.

1.3. Le milieu expérimental

Le tampon expérimental choisi est le PBS supplémenté au tween 0,05% ; le tween est reconnu pour améliorer la détection d'une interaction d'un anticorps pour un antigène, probablement par limitation des liaisons non spécifiques faibles. Selon Brogan et al, l'ajout de tween permet une augmentation de la spécificité et donc de la sensibilité de la technique ^[211]. De plus, il a été démontré que le tween 20 favorise la désorption des protéines sur les polymères ^[212], permettant à terme de ne conserver que la partie réellement « greffée » sur les plots de polypyrrole.

Le mélange a été systématiquement filtré sur deux membranes montées en série de porosités respectives 0,8 μm / 0,2 μm (Minisart[®] / Acrodisc[®]) juste avant l'expérience pour rendre le milieu stérile mais aussi pour limiter les dépôts dans le circuit fluidique. Compte-tenu de la présence du tensio-actif dans le milieu expérimental, l'utilisation d'un dégazeur en ligne devient réellement obligatoire pour éviter l'apparition de bulles d'air dans la cellule, ce qui empêcherait la bonne mesure du signal SPR.

2. L'imagerie SPR à haute sensibilité

2.1. Faisabilité sous un format de détection « classique »

2.1.1. Réglages optiques pour l'imagerie SPR

L'hétérogénéité des zones de la matrice produite pour l'immunocapteur (densités de greffage en anticorps variables) a induit un réglage de l'angle de travail « centré » sur la plage la plus sensible pour l'ensemble des plots de la puce. En effet, plus la densité de greffage en protéine est importante pour un plot de polypyrrole fonctionnalisé, plus la courbe de plasmon de ce plot se décale vers la gauche, de la même manière que lorsqu'on fait interagir la cible sur ledit plot (figure 110a). Par cette approche, ces différences de réactivité physique entre les plots sont alors nivelées. D'autre part, si l'on désire plus de précision dans la mesure, il est possible de faire pour chaque plot, une normalisation de l'ensemble des signaux cinétiques grâce au nombre dérivé de la courbe plasmon pour chacun des plots à l'angle de travail choisi (figure 110b).

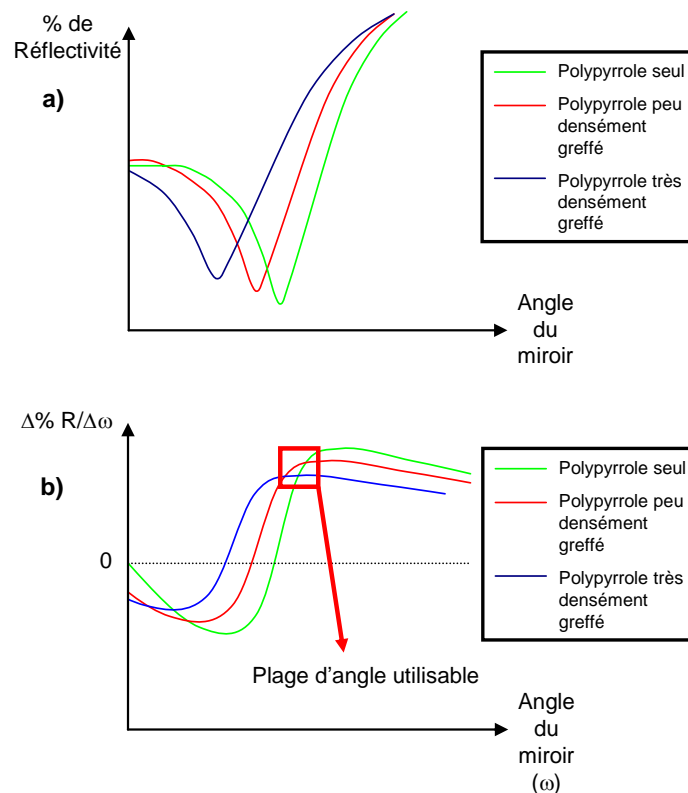


Figure 110 : a) Différentes courbes de plasmon observables en fonction des densités de greffage – b) Signaux dérivés des courbes de plasmon en fonction des densités de greffage

2.1.2. Traitement de l'échantillon

La cible biologique à doser est la chaîne B de la ricine ; plutôt que d'utiliser la protéine entière dont la toxicité est gênante à l'utilisation, nous avons décidé de n'utiliser que l'une des deux sous-unités de la toxine (33 kDa), la rendant ainsi non toxique ^[161]. La chaîne B de la ricine provient d'une collaboration avec Dr Philippe Thullier (*Groupe de technologie des anticorps, Département de biologie des agents transmissibles, Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, La Tronche, France*).

La conservation de la solution mère en chaîne B de ricine se fait à 4°C dans un milieu stabilisant (présence de glycérol). Les échantillons de chaîne B de ricine ont été reconstitués dans le milieu expérimental en début d'expérimentation. Les dilutions obtenues ont été conservées à 4°C jusqu'à l'injection.

2.1.3. Acquisition cinétique

Le débit expérimental a été fixé à 3 mL/h, ce qui est assez lent (classiquement fixé à 5 mL/h). Ceci permet d'augmenter au maximum et dans des proportions raisonnables le temps d'incubation de l'échantillon à doser (10 min pour 500 μ L d'échantillon). En effet, une augmentation du temps d'incubation se traduit par une augmentation du rendement de capture de l'échantillon lorsque la vitesse de réaction et de diffusion à la surface ne sont pas limitantes. Pour l'ensemble des expériences, la température de l'enceinte a été réglée à 25°C afin de limiter la dérive du signal impartie aux variations de la température ambiante durant le dosage.

Les courbes cinétiques obtenues après l'injection de 10 nM de protéine ricine indiquent que la réaction atteint la saturation au niveau des plots greffés avec l'anticorps monoclonal anti-ricine chaîne B (figure 111) avant la fin du temps d'injection. Ceci confirme qu'un débit de 3 mL/h convient pour une détection sous ce format analytique.

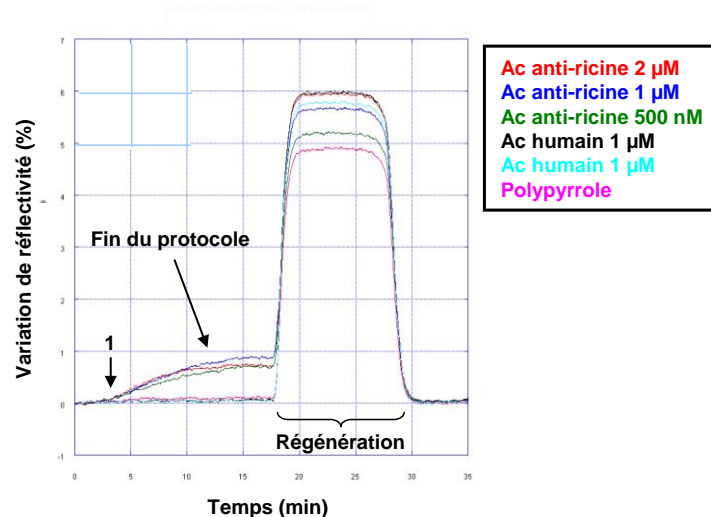


Figure 111 : Cinétique obtenue après l'injection de 10 nM de la chaîne B de ricine (1 : injection de l'échantillon)

De plus, sous ces conditions d'injection, nous déterminons que la densité de greffage donnant le meilleur signal est fixée entre 500 nM et 1 μ M d'anticorps monoclonal dans la solution de spotting. Peu d'amélioration du signal apparaît pour des concentrations de greffage supérieures (2 μ M). L'explication provient d'un effet d'encombrement de la cible sur la surface – chaque protéine possédant son propre volume en surface –, soit d'une saturation du nombre de sites accessibles due à l'encombrement des sondes en surface.

Par ailleurs, on peut observer que durant la phase de rinçage, aucune dissociation n'est enregistrée en surface ; ceci est typique d'une interaction de nature antigène/anticorps. Concernant la phase de régénération, une solution classique pour anticorps / antigène

(Glycine – HCl pH 2,3) a été utilisée ^[213]. A priori, la régénération du support est totale ; on observe un retour à la ligne de base du capteur après dosage de l'échantillon (figure 111).

Suite aux injections alternées et répétées de l'analyte à la même concentration et de la solution de régénération, une évaluation de la stabilité du support « à l'usage » a pu être faite. A ce stade, il a été envisagé de procéder à la détection directe d'une gamme large de protéine ricine.

2.1.4. Détermination de la sensibilité

Suivant la figure 112, on observe que la quantité de signal atteint son maximum lorsque celle-ci sature à 0,7% de variation de réflectivité. Or, il a été montré par ailleurs que pour une interaction de nature antigène / anticorps (cf. Partie I chapitre II.1.1.2), le maximum de signal en réflectivité obtenu par imagerie SPR avoisine les 5%. Compte-tenu du rapport de 5 / 1 entre le poids moléculaire des anticorps et celui de la chaîne B de la ricine, ce résultat de 0,7% semble en accord avec les données obtenues précédemment.

Pour des concentrations allant de 10 nM à 1 nM, on observe une diminution progressive du signal SPR. En dessous de 1 nM, aucun signal SPR suffisant n'est enregistré pour déterminer la présence ou l'absence de ricine dans l'échantillon.

Par définition, la limite de sensibilité correspond à la concentration minimale en analyte, ici la chaîne B de la ricine, pour laquelle le signal doit être supérieur ou égal à 3 fois la valeur du bruit de fond (biologique & physique). Dans le cas présent, une évaluation de la limite de sensibilité revient à une concentration en chaîne B de ricine de 1 nM, ce qui est relativement conforme aux données de la littérature pour une technique telle l'imagerie SPR ^[214]. Cependant, à ce stade, nous restons bien moins sensibles que la majorité des techniques existantes ^[206] pour la détection de la ricine.

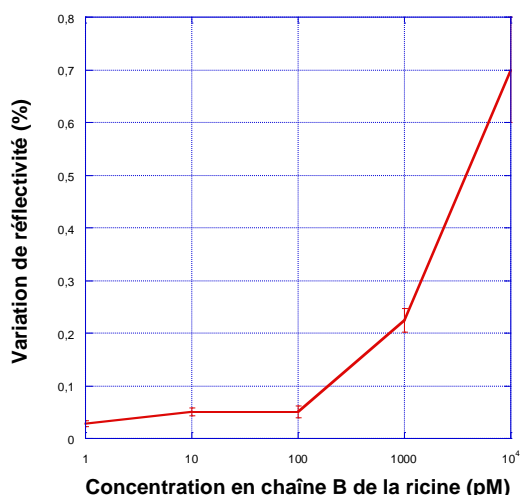


Figure 112 : Signaux obtenus sur une zone Ac anti-ricine 1 μ M après l'injection d'une gamme de concentration en chaîne B de la ricine

2.2. Mise en place d'un mode « sandwich »

2.2.1. Choix du type d'anticorps secondaire

Afin de pallier au manque de sensibilité inhérent à la technique de détection, une étape de révélation supplémentaire a été mise en place pour prendre en « sandwich » la chaîne B de la ricine et ainsi augmenter de manière fictive le poids de l'analyte ; cette méthode a déjà été décrite et utilisée avec succès en résonance de plasmons de surface (SPR) pour doser des molécules de faible poids moléculaire ^[208]. Dans le cas présent, le choix de l'amplificateur de signal est un anticorps polyclonal (IgG) anti-chaîne B de la ricine ; alors que la chaîne B de la ricine ne pèse que 33 kDa, l'anticorps de type IgG pèse 150 kDa, soit cinq fois la masse de l'analyte.

A la différence de l'anticorps monoclonal servant de sonde sur le capteur, l'anticorps « sandwich » est produit chez le lapin. Aussi, contrairement à la première étape, l'utilisation d'un anticorps polyclonal semble plus judicieuse dans le cas d'un anticorps « sandwich ». En effet, la difficulté ici est d'obtenir un anticorps secondaire pouvant reconnaître un épitope différent de celui reconnu par l'anticorps primaire. Idéalement, il ne devrait y avoir aucun recouvrement entre les épitopes. Ainsi, l'emploi d'un anticorps polyclonal permet d'avoir « statistiquement » une probabilité non négligeable d'anticorps efficaces pour l'amplification. Enfin, l'injection d'anticorps monoclonal rendrait la technique de révélation assez onéreuse compte-tenu du coût de production de ce type d'anticorps.

De même que pour les anticorps monoclonaux, les anticorps polyclonaux proviennent d'une collaboration avec Dr Philippe Thullier (*Groupe de technologie des anticorps, Département de biologie des agents transmissibles, Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, La Tronche, France*).

2.2.2. Acquisition cinétique

L'anticorps polyclonal anti-chaîne B de la ricine a été dilué dans le milieu expérimental juste avant l'injection. Suite aux travaux préliminaires réalisés par Pascal Torregrossa et Emilie Mercey, une concentration efficace en anticorps secondaire a été fixée à 75 nM. Comme on peut le constater sur la figure 113, suite à l'injection d'anticorps polyclonal, une variation de réflectivité supplémentaire attribuée à la fixation de l'anticorps « sandwich » sur le support se produit. De même que précédemment, l'allure des courbes cinétiques après l'injection de l'anticorps polyclonal montrent que la cinétique de dissociation de cette construction est très lente ; entre la fin de l'injection de l'anticorps polyclonal et l'injection de la solution de régénération, aucune « perte » de signal n'est enregistrée.

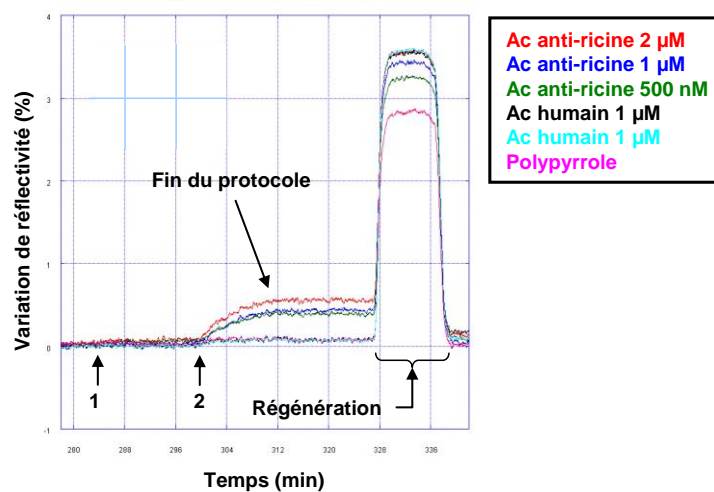


Figure 113 : Cinétiques obtenues lors d'une révélation en deux étapes (1 : injection de l'échantillon – 2 : injection des anticorps polyclonaux anti-ricine)

D'autre part, sous ces conditions, l'accrochage de l'anticorps polyclonal se stabilise pour un temps d'injection de 10 minutes ce qui confirme l'utilisation d'un débit de 3 mL/h pour l'expérience. Enfin, après régénération (milieu Glycine 100 mM – pH 2,3) et retour dans le milieu expérimental, l'ensemble des plots récupèrent leur niveau initial (hors dérive) (figure

113). Il est alors possible de procéder au dosage d'un nouvel échantillon. Sous ce format, l'ensemble du dosage prend alors 30 minutes, régénération incluse.

2.2.3. Evaluation de la sensibilité

Suivant la figure 113, l'injection de l'anticorps polyclonal ne provoque pas d'augmentation visible du bruit de fond biologique ; le signal acquis pour les zones de contrôle négatif reste au niveau de la ligne de base initiale ($\leq 0,05$ % de réflectivité). Cette seconde étape de révélation permet ainsi d'obtenir un « contraste » optimal tout en étant plus sensible. En effet, suivant les données de la figure 114, le mode de révélation en deux étapes augmente d'un ordre de grandeur la sensibilité de la méthode ; il est désormais possible de détecter la présence de 100 pM de chaîne de ricine dans un échantillon de 500 μ L, soit $30 \cdot 10^8$ molécules. Consécutivement, la gamme dynamique de la méthode analytique s'est élargie d'un ordre de grandeur.

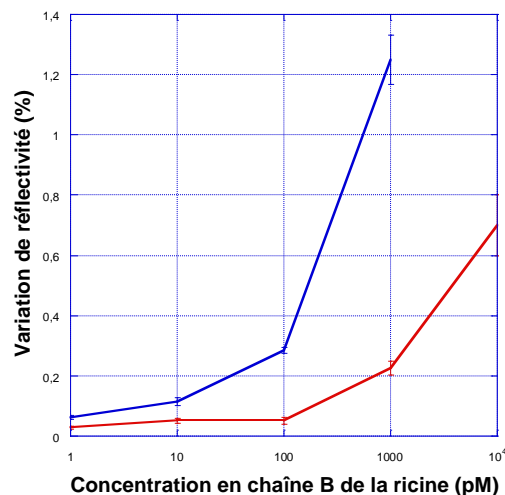


Figure 114 : Signaux obtenus sur une zone Ac anti-ricine 1 μ M après l'injection d'une gamme de concentration en chaîne B de la ricine ; l'ajout de l'anticorps polyclonal permet d'améliorer la limite de détection d'un facteur

10

Du point de vue de l'utilisateur, l'emploi de cette deuxième étape d'amplification est donc utile d'une part si la première injection ne donne aucun signal biologique (inférieur à 1 nM) et d'autre part pour déterminer si l'échantillon à doser contient au moins 100 pM de la toxine. Une approximation semi-quantitative de la concentration de cette dernière sera alors possible à partir des courbes étalons obtenues en figure 114.

Cependant, cette sensibilité n'est toujours pas aussi compétitive par rapport à celles obtenues avec d'autres méthodes analytiques [206].

2.3. L'amplification finale par nanoparticules d'or

2.3.1. Choix du type de nanoparticules

La solution envisagée ici pour pallier au manque de sensibilité est d'utiliser un marqueur pour l'imagerie SPR, c'est-à-dire des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec un anticorps IgG anti-IgG de lapin produit chez la chèvre (BBInternational®). De cette manière, les billes d'or réagissent spécifiquement en surface en interagissant avec la construction où figure déjà l'anticorps polyclonal « sandwich ». De nouveau, il s'agit ici d'augmenter de manière fictive la masse molaire de l'analyte afin que l'imageur SPR soit capable de le détecter [215, 216]. En effet, la masse d'une nanoparticule d'or est réellement beaucoup plus importante que celle de la chaîne B de la ricine :

$$\text{Volume d'une particule : } V_p = \frac{4}{3} \pi r^3 = 3,3351 \cdot 10^{-27} \text{ cm}^3$$

(r : rayon de la particule, ici de 20 nm)

$$\text{Poids d'une particule : } m_p = d V_p = 6,467 \cdot 10^{-16} \text{ g}$$

(d : densité de l'or, soit 19,3 g/cm³)

$$\text{Poids d'une molécule de chaîne B de ricine : } m_r = \frac{M}{N_A} = 5,48 \cdot 10^{-20} \text{ g}$$

(M : masse molaire de la chaîne B de la ricine et N_A : nombre d'Avogadro)

$$\text{Rapport de masse particule / analyte : } R = \frac{m_p}{m_r} = 11,80 \cdot 10^3$$

D'autre part, le choix précis de nanoparticules métalliques présente un deuxième avantage par rapport à des billes de latex par exemple ; tout comme la surface d'or du prisme, les nanoparticules d'or possèdent leur propre onde évanescente issue des plasmons de surface. Or, lorsque les billes d'or viennent à proximité de la surface ($z < 100$ nm), un couplage entre leur champ et celui de surface se produit et aboutit à une variation franche du signal SPR lu en TIR. De plus, selon He et al, cet effet est d'autant plus important que la distance entre la surface et la nanoparticule est petite [217-219].

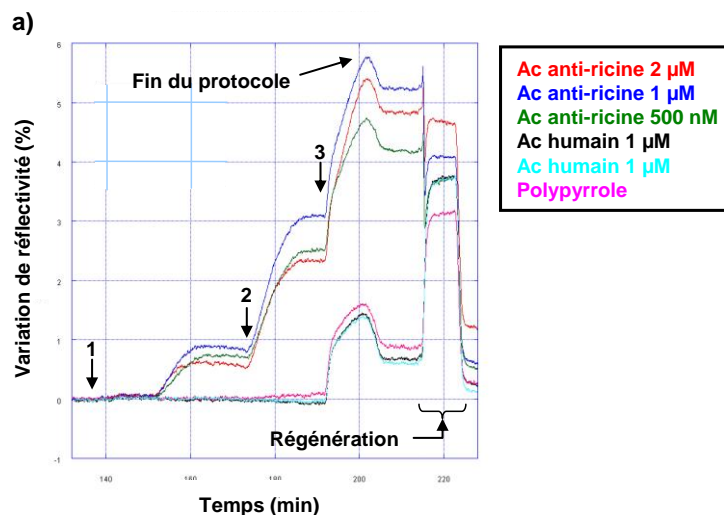
Arbitrairement, le choix du diamètre des particules d'or a été fixé à 40 nm ; ce sont les seules disponibles commercialement sous les critères requis. En effet, deux qualités de

nanoparticules ont été testées ; un premier lot où le mode de synthèse incorpore un blocage de la surface dorée par la BSA (billes pour utilisation en « *microscopie électronique* ») et un second lot où le mode de synthèse n'inclue pas cette étape (billes pour utilisation en « *immunodosage* »). De plus, la composition du milieu de conservation pour ces deux lots diffère ; les billes pour « *microscopie électronique* » sont baignées dans un milieu incluant de la BSA et du glycérol alors que le milieu baignant l'autre type de bille ne contient aucun de ces deux produits.

2.3.2. Les nanoparticules saturées à la BSA

Une première approche de l'amplification par billes d'or a été conduite avec des nanoparticules saturées à la BSA. L'objectif ici a été de montrer le potentiel d'amplification attendu par ce type de marqueur en imagerie SPR. Le débit est toujours fixé à 3 mL/h (soit 10 minutes pour injecter l'ensemble de la boucle d'injection). La concentration des billes choisie est celle indiquée par le fournisseur, c'est-à-dire de 0,1 OD à 520 nm (1/100^e de la solution commerciale).

Comme attendu, il apparaît très clairement que suite à l'injection des billes d'or conjuguées avec l'anticorps anti-IgG de lapin, une importante variation de réflectivité supplémentaire se produit par rapport à celle obtenue sur l'ensemble des deux premières étapes du dosage (figures 115a et 115b).



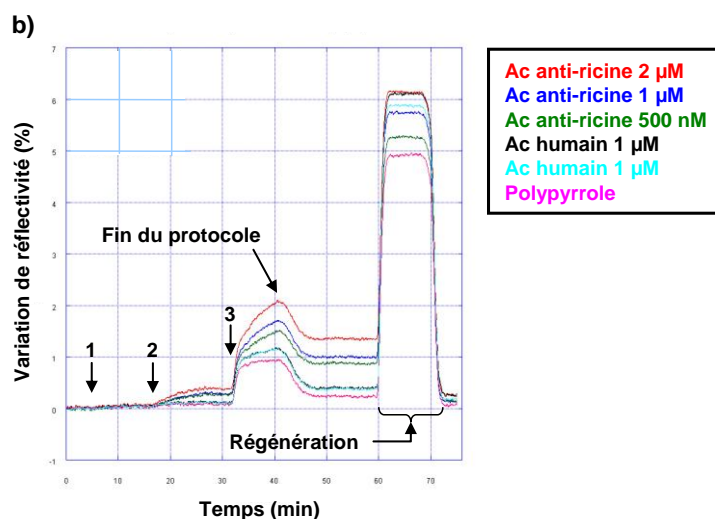


Figure 115 : Cinétiques obtenues lors d'un dosage de 10 nM (a) et de 500 pM (b) de chaîne B de ricine avec le protocole en 3 étapes (1 : injection de l'échantillon – 2 : injection des anticorps polyclonaux anti-ricine – 3 : injection des nanoparticules d'or fonctionnalisées par l'anticorps anti-IgG de lapin)

Malgré les avantages décrits ci-dessus, l'utilisation de ces billes reste limitante pour plusieurs critères. En effet, de par la présence d'albumine de sérum de bœuf dans le milieu de conservation, il nous est apparu nécessaire de bloquer la surface de la puce par le même agent bloquant, la BSA. Pour autant, comme indiqué en figures 115a et 115b, ce blocage n'est pas suffisant pour éliminer le signal « non spécifique » enregistré lors des injections de ces billes d'or ; soit le glycérol influe sur le collage physico-chimique de ces billes à la surface, soit les billes d'or elles-mêmes ont une capacité à lier la surface par des interactions non définies. Ce signal parasite est croissant avec le temps d'injection et est exacerbé lorsque la concentration en billes est augmentée (*données non montrées*). De plus, un nouveau blocage est nécessaire après 4 essais de dosage, régénération incluse.

Enfin, le milieu de conservation des billes ayant un indice optique très différent du milieu expérimental, une variation de signal dit « saut d'indice » se produit durant l'acquisition. Ce « saut d'indice » inévitable est gênant à la lecture en ligne du résultat du dosage, surtout pour de faibles concentrations en chaîne B de ricine dosées (figure 115b).

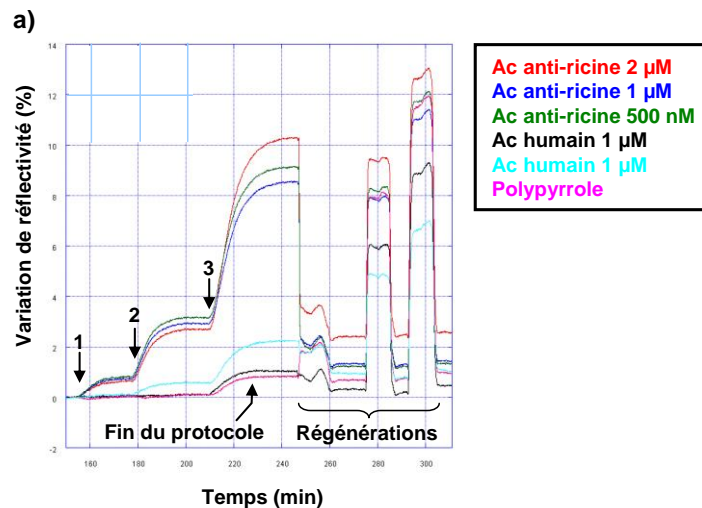
Par conséquent, du fait de leurs propriétés, ces billes présentent l'inconvénient de limiter la sensibilité de la technique d'immunodosage et ne sont pas adaptées pour une utilisation en imagerie SPR dans le cadre de ce projet. Aussi, plutôt que de dialyser ces nanoparticules pour les placer dans un nouveau milieu sans BSA ni glycérol, il a été choisi de continuer l'étude avec des billes d'or « non bloquées ».

2.3.3. Les nanoparticules non saturées à la BSA

Etant donné les résultats prometteurs obtenus en termes d'amplification du signal avec l'autre type de nanoparticules, les conditions expérimentales (débit de 3 mL/h, concentration des billes de 0,1 DO) ont été conservées.

Contrairement aux figures 115a et 115b, avec ce type de nanoparticules d'or, aucun « saut d'indice » n'apparaît au moment de l'injection ce qui facilite la lecture du résultat *in situ* (figures 116a et 116b). Aussi, de même qu'en figures 115a et 115b, l'amplification médiée par les nanoparticules dorées n'atteint pas de plateau avant l'arrêt de l'injection du marqueur SPR.

En figure 116a, où aucun agent bloquant n'a été employé, la fixation « non spécifique » des billes d'or intervient de la même manière qu'en figure 115a ; environ 1 % de variation de réflectivité est obtenue sur les zones de contrôle négatives. Ce signal de 1 % est attribuable au bruit de fond biologique de la méthode d'amplification puisqu'il varie en fonction de la quantité d'analyte dosée (figure 116) ; plus précisément, ce signal peut provenir soit d'un accrochage non spécifique de l'analyte / l'anticorps polyclonal / billes d'or fonctionnalisées, soit d'une contamination entre les zones de dépôt lors de la fabrication et du rinçage de la puce après synthèse, soit de l'addition de ces deux phénomènes.



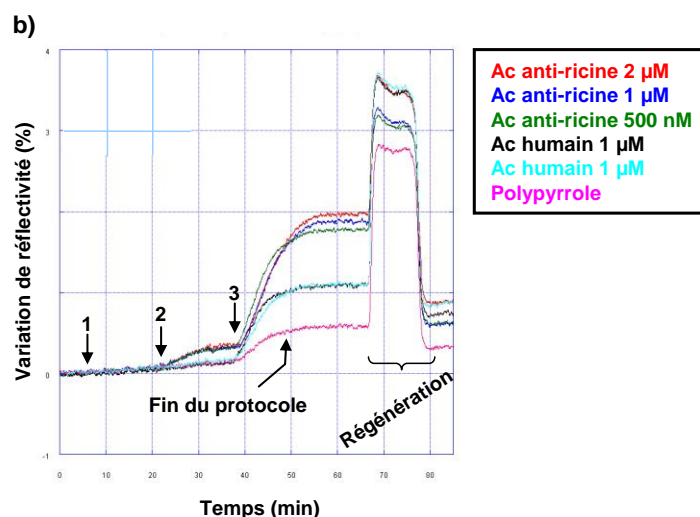


Figure 116 : Cinétiques obtenues lors d'un dosage de 10 nM (a) et de 500 pM (b) de chaîne B de ricine avec le protocole en 3 étapes (1 : injection de l'échantillon – 2 : injection des anticorps polyclonaux anti-ricine – 3 : injection des nanoparticules d'or fonctionnalisées par l'anticorps anti-IgG de lapin)

D'autre part, la figure 116a montre que la variation finale de réflectivité obtenue lors du dosage d'une même quantité d'analyte est bien supérieure ; d'un signal de 4,5 à 5,5 % obtenu avec l'utilisation de billes saturées à la BSA, celui-ci atteint les 8,5 à 10,5 % avec les billes non saturées à la BSA.

Cette amélioration de sensibilité de la méthode de dosage reste cependant limitée par l'efficacité moyenne du protocole de régénération de la puce (figures 116a et 116b). Sous ce format, le nombre d'essais possibles avec le même immunocapteur est trop restreint ; 4 cycles maximum avec une diminution progressive de la sensibilité envers la chaîne B de la ricine (*données non montrées*).

2.3.4. Optimisation de la régénération du capteur

Jusqu'à la mise au point de la méthode analytique de révélation en deux étapes, le milieu de régénération utilisé était le tampon Glycine 100 mM ajusté à pH 2,3 ^[213]. Or, comme constaté sur les figures 115a, 115b, 116a et 116b, après l'injection de ce milieu, seule une partie de la construction est éliminée ; le retour à la ligne de base du capteur n'est pas atteint, indiquant un manque d'efficacité du protocole de régénération.

Ainsi, d'autres milieux de régénération ont été testés à partir de ceux décrits dans la littérature afin d'obtenir la régénération la plus efficace possible ; Glycine 100 mM pH 2,3 avec DMSO

1 % ou DMSO 5 % (milieux plus apolaires), Acide formique 1 % (milieu polaire acide), NaOH 50 mM (milieu polaire basique).

L'utilisation de tampons Glycine 100 mM pH 2,3 supplémentés en DMSO n'a pas permis l'obtention d'une régénération totale du capteur (figure 116a). La même constatation a été faite pour le milieu de type acide formique 1 % (*données non montrées*). En revanche, suite à l'injection de soude à 50 mM le retour du signal SPR au niveau de la ligne de base a pu se produire (figure 117). Cependant, par mesure de précaution, l'injection du milieu tamponné Glycine pH 2,3 a été conservée afin d'être sûr que le capteur soit totalement régénéré ; en effet, le point isoélectrique de la chaîne B de la ricine est de 4,8 ^[161]. Aussi, suite à cette double injection, le dosage d'une concentration identique en chaîne B de ricine a fourni des signaux équivalents à ceux obtenus lors du dosage précédent.

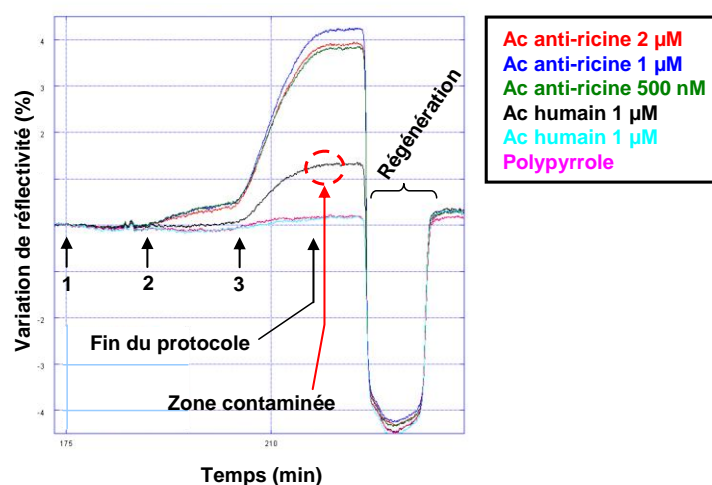


Figure 117 : Cinétiques obtenues lors d'un dosage de 500 pM de chaîne B de ricine suivi d'une régénération avec NaOH 50 mM (1 : injection de l'échantillon – 2 : injection des anticorps polyclonaux anti-ricine – 3 : injection des nanoparticules d'or fonctionnalisées par l'anticorps anti-IgG de lapin)

Dès lors, dans le cas d'une révélation en 3 étapes, la régénération du capteur a été faite par l'emploi du couple soude 50 mM / Glycine pH 2,3. Ce procédé de régénération en deux étapes suit un ordre strict ; la solution de soude 50 mM doit être nécessairement injectée avant celle de tampon Glycine 100 mM à pH 2,3. En effet, l'utilisation de soude à 50 mM (même 1 M) n'est pas efficace lorsque l'injection d'une solution de Glycine 100 mM pH 2,3 la précède (*données non montrées*) ; probablement les billes d'or précipitent irréversiblement à la surface du capteur. L'ensemble de la méthode de dosage s'étale ainsi au maximum sur 50 minutes, régénération incluse.

2.3.5. Sensibilité finale de la méthode analytique

Afin de déterminer la sensibilité de la technique, un essai « à blanc », c'est-à-dire sans analyte, a été mis en place (figure 118a) ; une injection d'anticorps polyclonal anti-chaîne B de la ricine a été suivie d'une injection de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec les anticorps anti-IgG de lapin. Sous ces conditions, on observe que le signal SPR « non spécifique » enregistré est relativement limité (maximum 0,2 % de réflectivité). Comparativement, pour une teneur de 10 pM en chaîne B de ricine dans l'échantillon, le signal obtenu est d'environ 0,4 %, soit un rapport signal / bruit de 2. Le même essai mené avec un échantillon renfermant 5 pM de chaîne B de ricine ne fournit pas un signal suffisant pour être interprété comme « positif » (*données non montrées*).

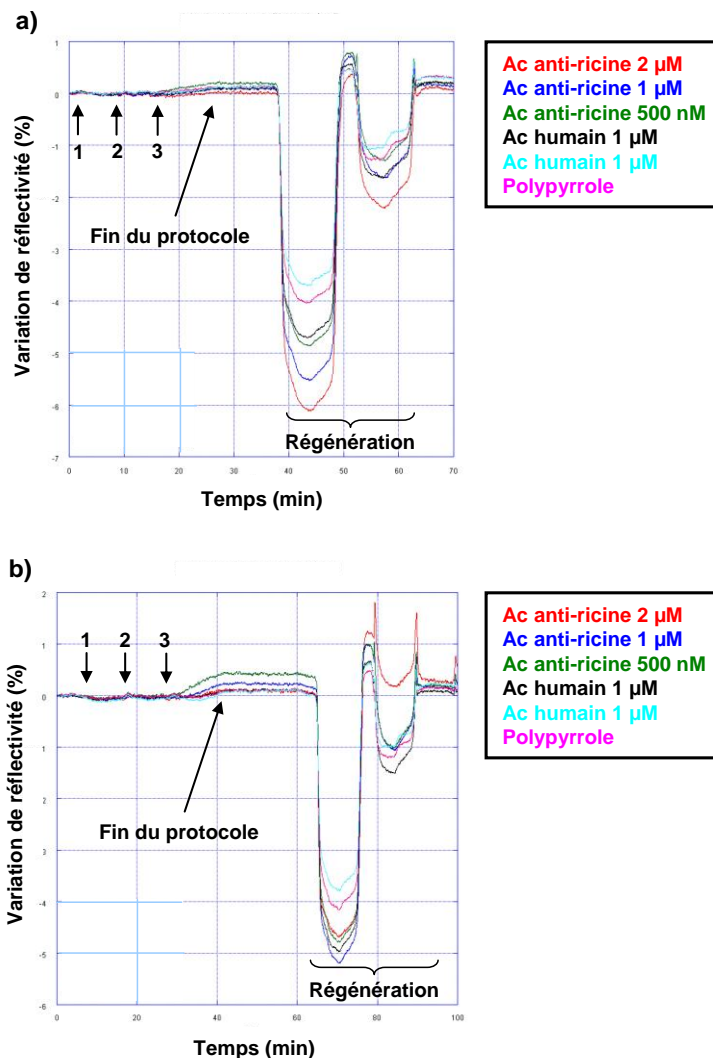


Figure 118 : Cinétiques obtenues lors d'un dosage à blanc (a) et de 10 pM de chaîne B de ricine (b) suivant la méthode en 3 étapes (1 : injection de l'échantillon – 2 : injection des anticorps polyclonaux anti-ricine – 3 : injection des nanoparticules d'or fonctionnalisées par l'anticorps anti-IgG de lapin)

Ainsi, sous la forme actuelle, l'essai d'immunodosage a une sensibilité comprise entre 5 et 10 pM en analyte, soit une fourchette respective de 0,16 à 0,33 ng.mL⁻¹. Cette limite de détection est comparable aux méthodes les plus sensibles décrites dans la littérature [210, 220].

2.3.6. Mode d'emploi pour l'utilisateur

Concrètement, pour un échantillon « inconnu », le manipulateur pourra procéder à un dosage semi-quantitatif en 3 étapes (figure 119). En effet, suite à l'injection de l'échantillon, si une variation de réflectivité spécifique de 0,7 % est enregistrée, l'échantillon contient au minimum 10 nM en toxine. Si cette même variation de signal est comprise entre 0 et 0,7 %, la teneur en ricine est estimée entre 0 nM et 10 nM. Enfin, l'injection de l'échantillon n'induit aucune variation, d'une part, le titre en ricine est inférieur à 1 nM, et d'autre part, une injection d'anticorps « sandwich » est nécessaire. Suivant le même raisonnement tenu pour la première injection, il est alors possible de définir si l'échantillon contient entre 100 pM et 1 nM en analyte. Pour finir, lorsqu'aucune variation de signal n'est visible, l'injection de nanoparticules d'or fonctionnalisée est effectuée. Encore une fois, lorsqu'une variation de signal est détectée, l'analyse semi-quantitative indique une fourchette comprise entre 10 pM et 100 pM pour la teneur en ricine.

Si après ces trois étapes de révélation aucune variation de signal n'est visualisée, la méthode ne permet pas de conclure sur l'absence de toxine dans le prélèvement ; la réelle affirmation correspond à une concentration inférieure au seuil de détection qui est ici de 10 pM.

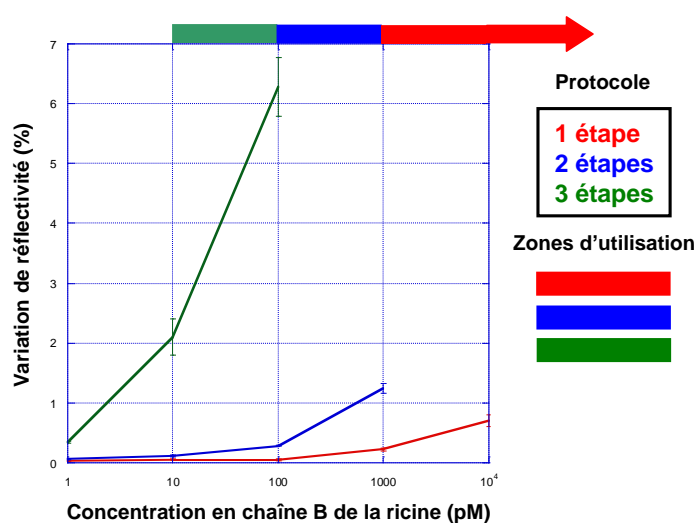


Figure 119 : Quantité de signal détecté sur une zone Ac anti-ricine 1 μM pour différentes concentrations en toxine suivant les 3 protocoles décrits ; les zones d'utilisation correspondent aux fourchettes de concentration en analyte pour lesquelles le protocole donne une estimation semi-quantitative

2.4. Améliorations du procédé de détection

Les paragraphes qui suivent fournissent des indications sur la manière d'améliorer à court terme la sensibilité de la technique existante ; ceci passe d'un changement de procédé de synthèse du capteur à l'extension des caractéristiques cinétiques de l'amplification par nanoparticules d'or.

2.4.1. Evolution du procédé de synthèse du capteur

Les études menées jusque-là pour mettre au point la méthode analytique ont été faites sur un immunocapteur fabriqué *via* le robot Polypotter II ; sa fiabilité reconnue au laboratoire a justifié ce choix. Or, dans le cadre de ce projet, ce robot présente une limite importante ; le mode d'électrosynthèse du film de polypyrrole en cône de micropipette ne permet pas l'obtention de films extrêmement fins de polymère, limitant ainsi la sensibilité de la détection physique en résonance de plasmon de surface.

Afin d'obtenir de telles caractéristiques, nous avons fait appel à la plateforme automatisée Omnigrad (cf. Partie I chapitre II.1.4.4) ; un exemple type d'image plasmon d'une puce à ricine est visible en figure 120a. On peut par ailleurs constater qu'il se produit un décalage de la courbe plasmon en fonction de la densité de greffage des plots (cf. chapitre II.2.1.1) ; pour l'angle de travail choisi en figure 120a, plus les plots sont densément greffés en anticorps plus ils apparaissent pâles.

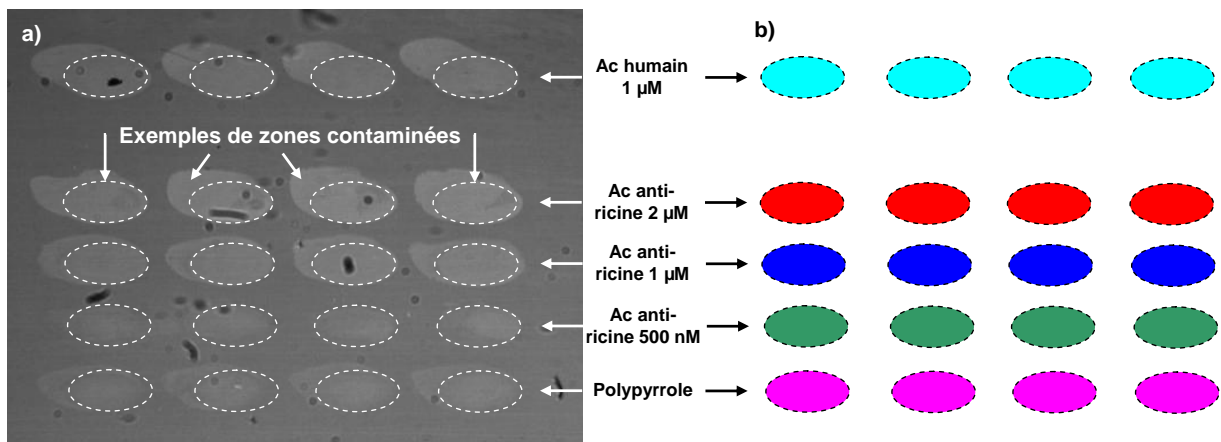


Figure 120 : Image plasmon en mode TM d'une puce à ricine (a) et schéma de dépôt correspondant (b)

En figures 121a et 121b sont reportées les cinétiques enregistrées lors d'une étude comparative suivant un dosage en 3 étapes de 100 pM en chaîne B de ricine ; les conditions opératoires sont identiques à celles décrites précédemment. Comparativement, la quantité de signal passe de 2 % à 6 % de variation de réflectivité, soit une augmentation d'un facteur 3 du rapport signal / bruit.

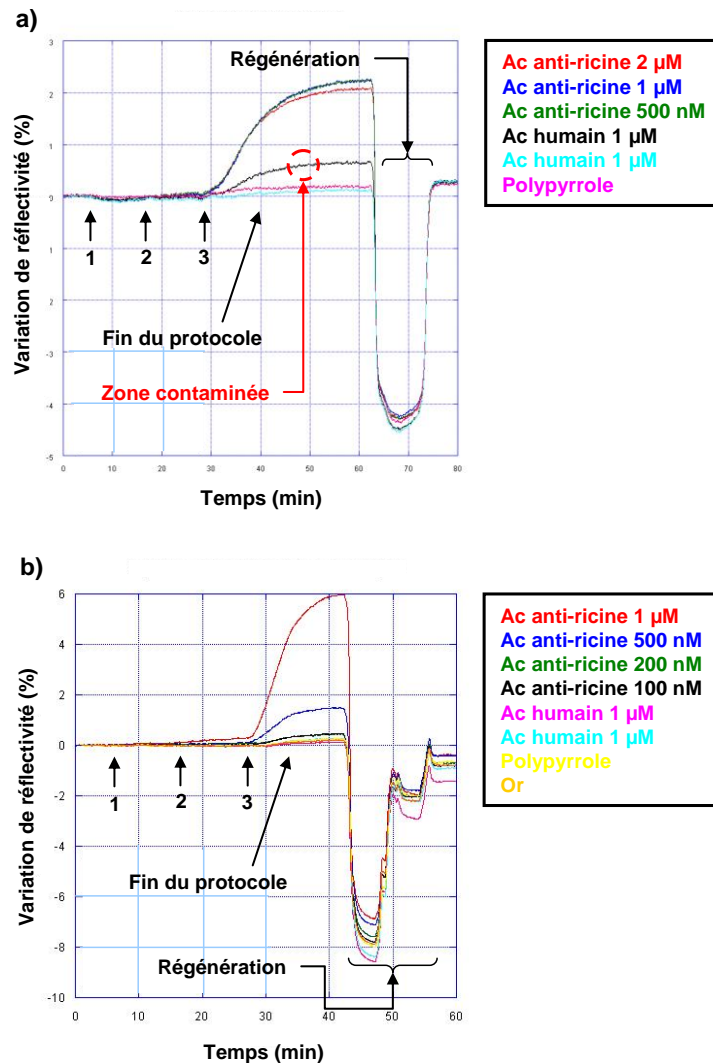


Figure 121 : Signal cinétique obtenu pour le dosage de 100 pM de chaîne B de ricine avec une puce fabriqué via Polypotter II (a) et Omnigrad (b)

Cette augmentation de la quantité de signal observée est attribuable à la conjugaison de deux phénomènes. D'une part, comme indiqué plus haut, l'épaisseur plus faible des plots de polymère fabriqué avec les aiguilles donne une meilleure sensibilité aux variations locales de l'indice optique ; à l'issue de la deuxième étape de dosage en figure 121b, le signal SPR est déjà significatif contrairement à ce qui a été observé avec l'autre technique de fabrication

(figure 121a). D'autre part, les nanoparticules d'or interagissent elles-mêmes plus facilement en tant que résonateur avec la surface dorée ^[217] ; la résultante en est une augmentation de l'efficacité du marqueur SPR.

2.4.2. Quantification de l'apport du marqueur SPR

Pour vérifier le réel apport des marqueurs SPR à la méthode de détection, il a été envisagé de procéder au dosage en 3 étapes en utilisant l'anticorps anti-IgG de lapin non couplé à des nanoparticules dorées (BBInternational[®], Royaume-Uni) (figure 122) dans des conditions « saturantes » ; l'anticorps anti-IgG de lapin est ici 100 fois plus concentré que dans la méthode avec marqueur. Afin de limiter tout biais, le milieu de conservation de ce dernier est identique aux billes d'or « non saturées ». Enfin, la puce utilisée pour cette expérience a été fabriquée avec le robot Omnigrad (même puce qu'en figure 121b).

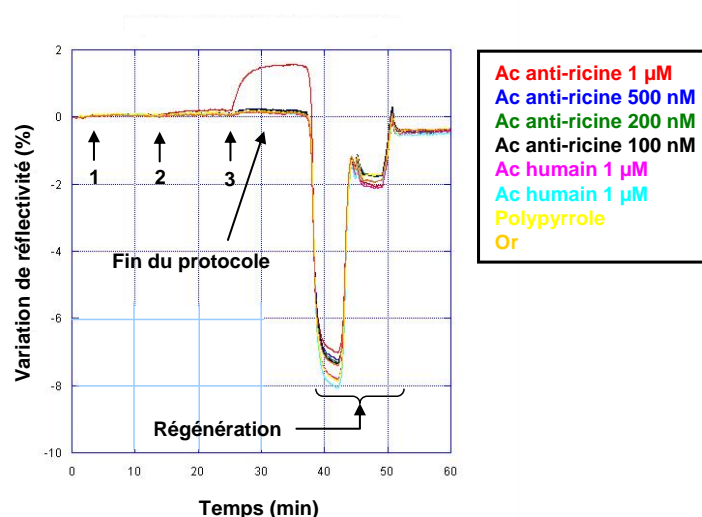


Figure 122 : Signal cinétique obtenu pour le dosage de 100 pM de chaîne B de ricine en 3 étapes sans marqueur

Clairement, le signal recueilli lors de l'amplification avec les nanoparticules dorées (figure 121b) est nettement supérieur à celui obtenu sans le recours à ce marqueur (figure 122) ; alors que le signal observé sans marqueur est de 1,5 %, celui acquis avec marqueur atteint les 6 % de variation de réflectivité. De plus, avec la technique sans marqueur (figure 122), l'équilibre est atteint bien avant la fin de l'injection de l'anticorps anti-IgG de lapin ; ceci implique que 1,5 % correspond au plus grand signal observable avec une méthode sans marqueur, même en augmentant la concentration de travail de l'anticorps anti-IgG de lapin.

Cette étude comparative montre clairement l'utilité des particules dorées dans l'augmentation du rapport signal / bruit et par conséquent une amélioration de la lecture des résultats. Cependant, une étude approfondie de la cinétique d'amplification durant l'injection des billes d'or est nécessaire ; en figures 121a et 121b, le signal n'atteint pas son équilibre avant la fin de la révélation.

2.4.3. Caractérisation de la cinétique d'amplification des billes d'or

Comme constaté en figures 116a, 116b, 117, 118b, 121a et 121b, la cinétique d'accrochage des billes dorées sur le support présente des caractéristiques particulières. En effet, aucun état d'équilibre n'est atteint durant l'injection du marqueur et ce, quelque soit la quantité d'analyte dosée. A partir de cette constatation, afin de vérifier si la technique de révélation est cinétiquement « limitante », des essais de « suramplification », c'est-à-dire d'injections successives de billes d'or, ont été menés (figure 123). Pour favoriser la survenue de l'état d'équilibre, il a été choisi d'injecter les billes d'or à des débits plus lent que précédemment, soit $0,75 \text{ mL.h}^{-1}$ pour les deux premières amplifications et $0,15 \text{ mL.h}^{-1}$ pour la troisième.

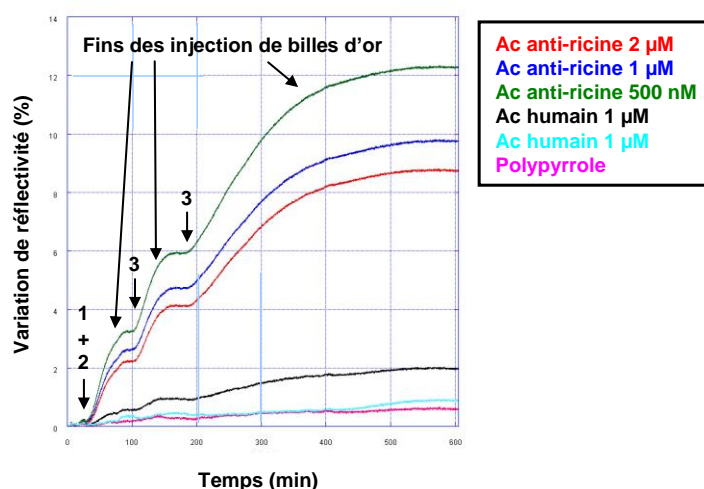


Figure 123 : Signal cinétique obtenu pour le dosage de 500 pM de chaîne B de ricine avec une triple injection de billes d'or

Comme attendu, l'accrochage des billes d'or est augmenté avec une injection supplémentaire de billes dorées et n'atteint par ailleurs toujours pas son état d'équilibre. Plus précisément, on observe un facteur 2 entre les signaux cumulés obtenus respectivement après la première et la deuxième amplification. Or, selon le modèle de Langmuir, ceci traduit que la cinétique de réaction se situe à ce stade encore loin de l'état d'équilibre.

Pour vérifier cette hypothèse, une troisième et dernière injection de billes d'or a été mise en place avec un débit 20 fois plus faible qu'habituellement (figure 123). A la lecture du résultat, il apparaît que l'équilibre réactionnel n'est toujours pas atteint ; l'inflexion de la courbe cinétique est attribuable au gradient de concentration en marqueur sur le front de fin d'injection^[3]. De plus, la diminution du débit par 5 par rapport aux deux premières injections induit une variation de réflectivité doublée ; par exemple, une injection à 0,75 mL.h⁻¹ sur la zone nommée « Acm RCA B 500 nM » donne un signal d'environ 3 % alors qu'une injection à 0,15 mL.h⁻¹ sur cette même zone donne un signal de 6 %. Au final, les trois amplifications permettent d'obtenir une variation de réflectivité maximale de près de 12,5 % (signal stabilisé), ce qui correspond à une variation de l'angle de plasmon de la zone d'environ 0,75°. Aucune amplification supplémentaire n'a été apportée suite à la troisième amplification car les zones les plus réactives de la puce ont atteint la limite supérieure de la plage de réflectivité sensible sur l'imageur SPR.

Une seconde caractéristique de la cinétique d'amplification concerne leur allure « biphasique », très visible en figures 118b et 121a. Plus précisément, une première phase de d'injection se distingue avec une vitesse d'accrochage des billes augmentant progressivement jusqu'à atteindre une valeur limite. Dès lors, le processus entre dans une deuxième phase où l'augmentation du signal se produit de manière linéaire avec le temps d'injection. De plus, la durée de la première phase dépend de la quantité d'anticorps polyclonal anti-chaîne B de la ricine présent sur la zone ; en figure 118b, on peut constater que le signal d'amplification est « retardé » pour le plot « Acm RCA B 1 µM » par rapport au plot « Acm RCA B 500 nM ». En effet, cet aspect est exagéré dès que l'on aborde des concentrations en analyte proches de la limite de détection de la méthode ; par exemple, il n'est pas discernable en figure 121b.

Ce phénomène assez inattendu peut avoir plusieurs origines. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces faits. La première repose sur un phénomène physique coopératif entre les billes d'or à la surface ; l'augmentation locale de la rugosité de la surface due aux billes pourrait, passée un seuil, encourager un accrochage spécifique des nanoparticules d'or. La deuxième hypothèse repose sur une cinétique d'accrochage sur la construction préexistante en deux étapes (figure 124). Dans un premier temps, la nanoparticule se fixe *via* l'interaction anticorps polyclonal anti-chaîne B de la ricine / anticorps anti-IgG de lapin. Puis, dans un deuxième temps, un réarrangement / rapprochement de la surface de la couche de billes d'or se produit ; de par l'avidité des anticorps et sachant qu'il y a probablement plusieurs molécules d'anticorps polyclonal par molécule de chaîne B de ricine, les billes d'or sont

« tirées » physiquement vers la surface à partir d'un même échafaudage initial. Une autre voie de réarrangement considère cette fois-ci qu'il y a plusieurs molécules d'anticorps anti-IgG de lapin par nanoparticule ; ici, le rapprochement vers la surface se fait *via* deux échafaudages différents. En termes de quantité de signal SPR, ces hypothèses ont des conséquences opposées. En effet, la première induit une augmentation de l'efficacité du signal par molécule d'analyte reconnu tandis que la seconde tend à réduire ce signal.

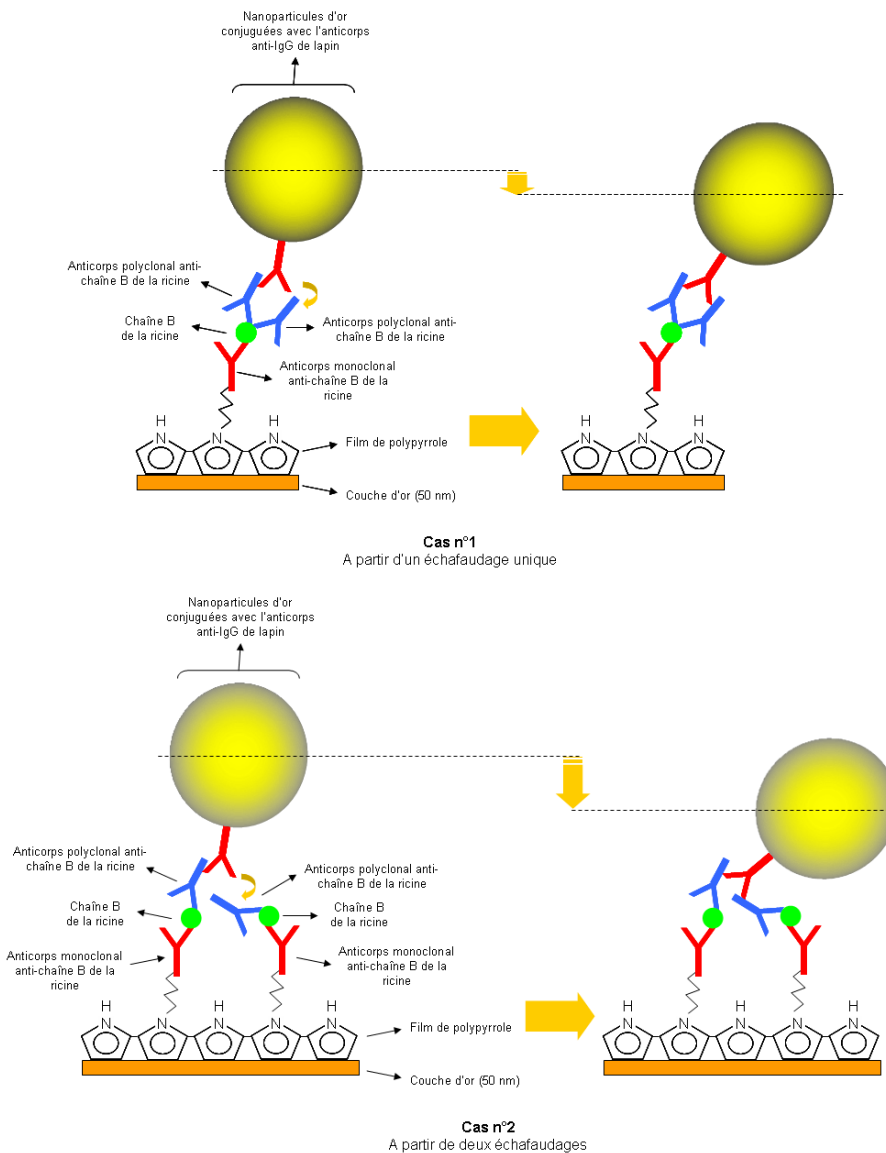


Figure 124 : Représentation schématique du comportement des nanoparticules à la surface du capteur

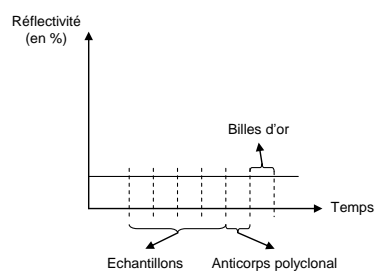
Une troisième caractéristique remarquable du signal d'amplification est son effet « retard » par rapport à la fin de l'injection du marqueur ; comme montré sur l'ensemble des données cinétiques du manuscrit, après arrêt de l'apport de billes d'or dans la cellule, une variation supplémentaire positive de réflectivité a lieu. Celle-ci est proportionnelle à la quantité de signal final obtenu avec le dosage et représente environ 25 % de réflectivité du signal total

(figures 121a et 121b). L'attribution de ce signal s'explique principalement par l'addition des phénomènes décrits en figure 124.

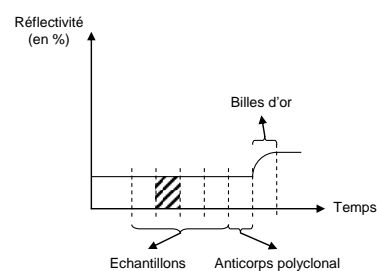
2.4.4. Effets cumulatifs

L'allure des courbes cinétiques indique que pour chaque étape de la construction établie durant la méthode de révélation, la vitesse de dissociation est très lente ; en figures 111, 113 et 117, on peut constater qu'aucune perte de signal n'est observée après retour en milieu expérimental. De même, l'expérience reportée en figure 123 démontre une réelle stabilité de l'échafaudage ; plusieurs heures (500 minutes) après la fin du protocole de révélation, aucune perte de signal n'a été constatée (*données non montrées*).

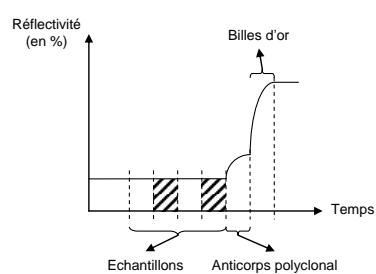
Ces propriétés cinétiques peuvent être utilisées dans le but de « cumuler » les signaux comme représenté en figure 125. En effet, il est possible de procéder à l'injection successive de plusieurs échantillons dans l'appareil fluïdique avant de débiter le protocole d'amplification du signal. En principe, si l'un des échantillons est contaminé par l'agent toxique avec une concentration supérieure ou égale à 10 pM, un signal SPR significatif sera obtenu après amplification. Les différents cas de figure envisageables suivant une telle approche sont répertoriés en figure 125.



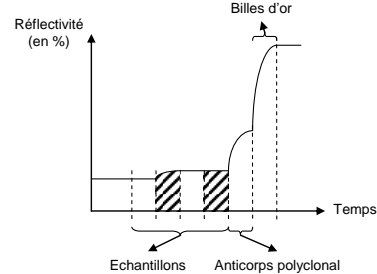
Cas avec 4 échantillons négatifs



**Cas avec 2 échantillon positifs
(entre 10 pM et 1 nM)**



**Cas avec 2 échantillons
positifs identiques
(entre 10 pM et 100 pM)**



**Cas avec 2 échantillons
positifs différents
(n°1 entre 10 pM et 100 pM et
n°2 ≥ 1 nM)**

Figure 125 : Représentation schématique des effets « cumulatifs » obtenus après l'injection de plusieurs échantillons

D'un point de vue pratique, si l'on considère que plusieurs personnes ont été exposées à l'agent toxique, la révélation individuelle systématique des échantillons va conduire à une augmentation beaucoup trop importante du temps nécessaire au diagnostic biologique ; ce temps sera proportionnel au nombre de patient soupçonnés de contamination, soit :

$$t_{\text{diagnostic}} = t_{\text{cycle}} \times n_{\text{patients}}$$

(t_{cycle} : temps nécessaire pour le dosage et la régénération du capteur, soit 1 heure)

(n_{patients} : nombre de patients à diagnostiquer)

Afin de limiter ce temps de dépistage, deux possibilités sont théoriquement possibles. La première consiste à faire fonctionner plusieurs appareils d'imagerie SPR en parallèle. Cependant, économiquement, cette solution n'est pas envisageable.

La seconde possibilité repose sur l'utilisation des propriétés évoquées en figure 125. Selon cette méthode, il serait possible de procéder au dépistage d'un groupe de personne tout en conservant des temps de révélation réduits :

$$t_{\text{diagnostic}} = (t_{\text{échantillon}} \times n_{\text{patients}}) + t_{\text{amplification}}$$

($t_{\text{échantillon}}$: temps d'incubation par échantillon à doser, soit 10 minutes)

(n_{patients} : nombre de patients à diagnostiquer)

($t_{\text{amplification}}$: temps nécessaire pour procéder à l'amplification du signal, soit 20 minutes)

L'inconvénient d'une telle approche est qu'elle ne détermine pas directement quel(s) patient(s) sont potentiellement contaminés par la toxine. Néanmoins, par dichotomie, il est possible d'identifier ces individus ; le groupe est divisé en n parties, et chaque sous-groupe est testé. Le sous-groupe positif est alors redivisé et ainsi de suite...

2.4.5. Effets d'encombrement en surface

En figure 126 sont indiqués les signaux observés lors du dosage en 3 étapes de 10 pM en chaîne B de ricine grâce à une puce fabriquée avec le robot Omnigridd.

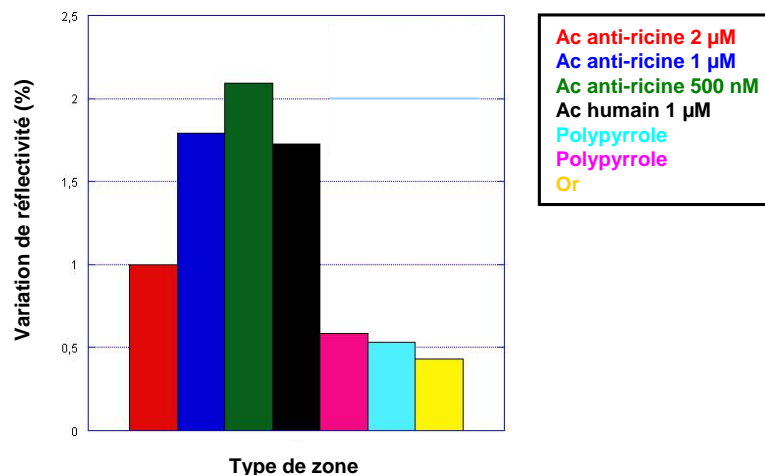


Figure 126 : Signaux SPR recueillis après le dosage de 10 pM en chaîne B de ricine

Il apparaît clairement que la quantité de signal enregistrée est dépendante de la densité de greffage en anticorps monoclonal anti-chaîne B de la ricine sur le polymère. Plus précisément, pour des concentrations initiales en sonde croissantes dans la solution à immobiliser, le signal SPR croît et finit par atteindre un optimum pour une densité de 500 nM en anticorps. Au-delà de cette densité de greffage (1 µM), le capteur indique une sensibilité moindre, inférieure même à celle lue avec les zones greffées à 200 nM en anticorps monoclonal. De manière équivalente, les mêmes constatations peuvent être portées sur les résultats présentés en figure 123 ; la perte de sensibilité du capteur se mesure davantage pour une densité de greffage en anticorps fixée à 2 µM. Cette réactivité en « cloche » est attribuable à un effet d'encombrement stérique de l'ensemble de la construction sur le capteur ; ce phénomène a par ailleurs déjà été décrit avec les puces à ADN pour la détection de la protéine p53^[153]. Dans le cas présent, une manière de s'affranchir du phénomène d'encombrement de surface serait d'employer des nanoparticules d'un diamètre plus petit (10 nm par exemple).

2.4.6. Amélioration de la capture de l'échantillon

Selon le modèle de Langmuir, plus la concentration en analyte est faible, plus la vitesse de réaction l'est aussi. Par conséquent, pour 10 pM en analyte, le temps de contact avec l'immunocapteur devient un paramètre non négligeable. Il a donc été envisagé de diminuer le débit d'injection de la chaîne B de la ricine (10 pM à 0,75 mL.h⁻¹) tout en conservant le protocole mis au point pour les étapes de révélation suivantes (figure 127).

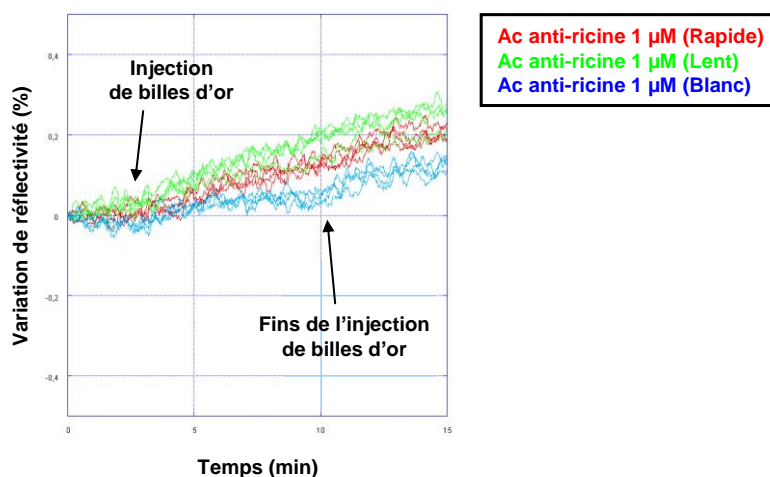


Figure 127 : Cinétiques indiquant l'influence du temps de contact de l'échantillon sur le signal final pour un échantillon contenant 10 pM en toxine (protocole lent à $0,75 \text{ mL.h}^{-1}$ – protocole rapide à 3 mL.h^{-1} – le « blanc » correspond à l'essai de dosage sans ricine dans l'échantillon)

L'expérience indique clairement que le gain de signal obtenu n'est pas proportionnel au temps d'exposition de l'échantillon sur le capteur ; une multiplication par 4 de ce temps induit un gain d'approximativement 50 %. Par ailleurs, cette valeur est comparable à celle obtenue suivant la figure 123. Une augmentation du temps d'exposition ne semble donc pas adaptée aux contraintes du projet pour améliorer aisément le contraste signal / bruit de fond ; l'ensemble de la méthode de révélation deviendrait trop longue pour fournir un résultat (supérieur à 1 heure).

Néanmoins, une augmentation de la durée d'incubation de l'anticorps polyclonal et des nanoparticules dorées fonctionnalisées pourrait améliorer d'autant plus la sensibilité de la méthode analytique comme en attestent les cinétiques indiquées en figure 123.

Devant cet échec, une autre stratégie d'injection de l'échantillon a été pensée. En effet, la théorie suivant le modèle de Langmuir prévoit qu'une augmentation du débit permet une augmentation de la vitesse de réaction. Or, comme décrit en II.2.4.5., le temps d'incubation a une influence, bien que faible, sur la quantité de signal recueillie. De plus, étant donné l'appareillage fluïdique actuellement mis en place pour la technique, seuls 500 μL de prise d'essai peuvent être injectés dans la cellule SPR. Par conséquent, pour « simuler » un débit élevé et obtenir un temps de contact constant avec l'échantillon à doser, il est envisagé de faire circuler le milieu expérimental par « allers-retours » (poussée / aspiration) au moyen de

la pompe pousse-seringue durant l'ensemble de la méthode analytique. Plus exactement, l'échantillon est poussé progressivement par incréments ; le principe est de faire pousser plus de liquide à la seringue qu'elle n'en aspire. Ici, le débit est alors fixé par l'équation :

$$\text{Débit du milieu expérimental : } D = \frac{V_{\text{poussé}} - V_{\text{aspiré}}}{t_{\text{cycle}}}$$

(t_{cycle} : durée d'exécution d'un cycle de poussée / aspiration par la pompe)

A priori, ce protocole permettrait d'obtenir une meilleure agitation des espèces en solution, limitant ainsi un éventuel problème de diffusion de l'analyte sur le capteur ; pour une concentration et une constante de diffusion d'analyte faibles, la déplétion locale de celui-ci à proximité des zones réactives pourrait freiner la réaction avec l'anticorps monoclonal.

III. DEVELOPPEMENTS FUTURS

1. Amélioration de la détection de l'analyte

1.1. Le système fluïdique

Une autre approche pour augmenter le rendement de capture de l'analyte consisterait en la mise au point d'une nouvelle cellule de fluïdique pour l'imageur SPR. Plus précisément, de manière analogue à la technique d'immunochromatographie (ICT), le principe serait alors de n'exposer que les surfaces d'intérêt, autrement dit de mieux gérer les flux de matière dans la cellule fluïdique. Pour cela, on peut envisager de concevoir une cellule contenant un canal – en forme de spirale, ou de serpentín – structuré dans le fond (figure 128).

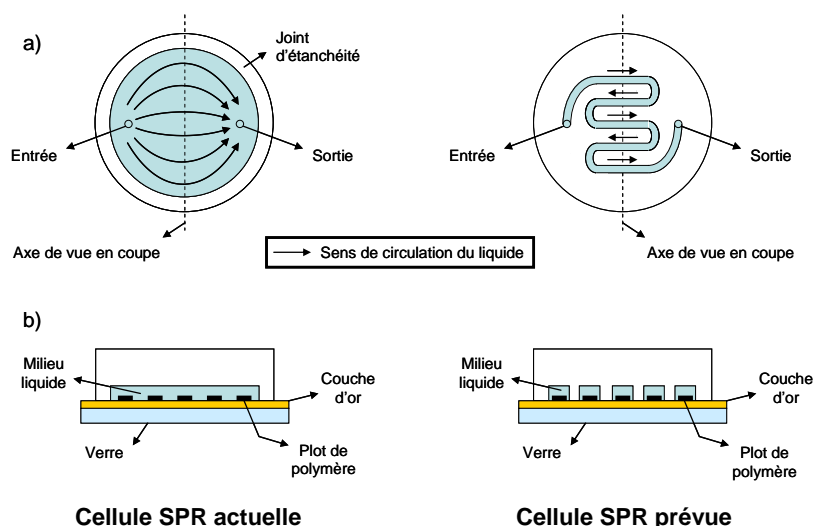


Figure 128 : Représentations schématiques vues du dessous (a) et vues en coupe (b) d'une cellule d'interaction simple et d'une cellule d'interaction de type « canal fluïdique »

Consécutivement à cette nouvelle approche, le sens de circulation du liquide aurait alors un rôle important dans la disposition spatiale des zones réactives à l'analyte ; afin de ne pas biaiser la quantification du signal sur les zones de « contrôle négatif », celles-ci doivent se situer en amont du flux dans le canal fluïdique par rapport aux zones sensibles à l'analyte. En effet, pour une disposition contraire, la déplétion en analyte occasionnée par les zones sensibles à la chaîne B de la ricine va systématiquement « masquer » la présence de la toxine sur les zones positionnées en aval dans le circuit.

1.2. L'analyte

Comme mentionné précédemment, l'analyte dosé est une partie de la toxine. Or, à terme, la toxine doit être utilisée dans sa totalité, ce qui pourrait avoir des conséquences sur les réactifs pour la détection.

En effet, sur le plan pratique, si l'épitope de l'anticorps monoclonal anti-chaîne B n'est pas « masqué » par la structure complète de la ricine, il peut être conservé en tant que sonde pour l'immunocapteur. A priori, suivant la figure 129, le même raisonnement ne peut être tenu avec les anticorps polyclonaux anti-chaîne B de la ricine ; étant donné la diminution du nombre d'épitopes disponibles sur la protéine complète, le rendement global de la première étape d'amplification risque d'être moins élevé. Une voie alternative est l'utilisation d'anticorps polyclonaux anti-ricine ou d'un mélange d'anticorps anti-chaîne A (disponibles) et anti-chaîne B de la ricine ; l'effet d'encombrement stérique serait alors moins marqué et par conséquent le nombre d'épitopes accessibles amélioré.

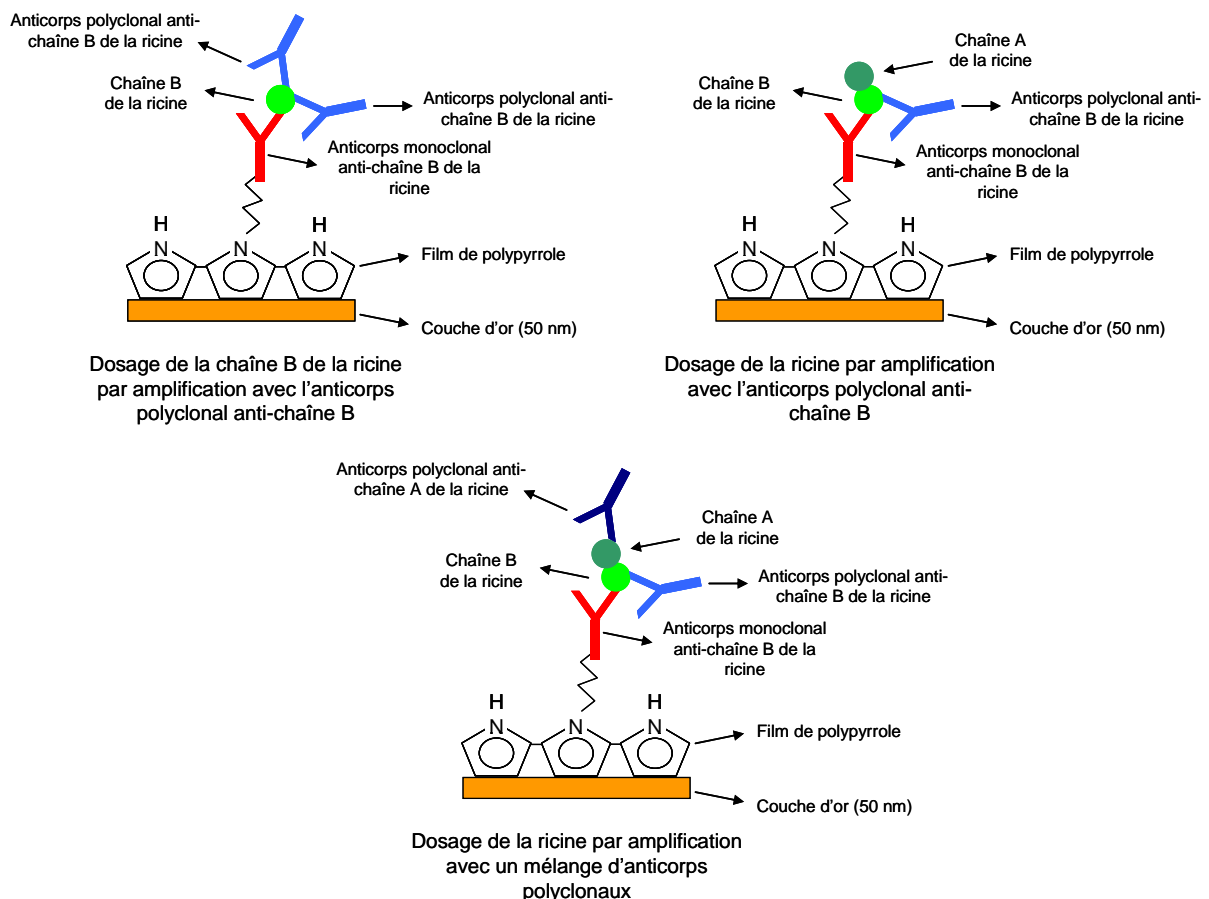


Figure 129 : Représentation schématique des effets de la structure de l'analyte sur la qualité de l'amplification

1.3. Différents types de prélèvements envisagés

Les essais d'immunodosage mis au point ici n'ont été pratiqués que sur des échantillons « simples », c'est-à-dire dans un milieu aqueux en l'absence d'autres espèces biologiques (tampon PBS). Or, les différents modes de contamination par l'agent toxique induisent la nécessité de pouvoir tester une grande variété de types de prélèvements ^[161] ; en effet, les prélèvements peuvent être d'origine environnementale ou d'origine animale / humaine.

A l'avenir, la technique analytique sera testée dans des milieux de plus en plus complexes. A priori, le premier type de prélèvement à tester, c'est-à-dire le plus proche de celui mis au point au laboratoire est l'eau du robinet. Puis viendront les milieux alimentaires liquides tels que le lait de vache, les jus de fruits ^[198]. Enfin, les urines, les prélèvements nasaux, le plasma sanguin étant d'une complexité bien plus importante, ils seront testés en dernier ; toutefois, selon les travaux menés par Bouthéina Cherif ^[5], et malgré les difficultés inhérentes à ce type de prélèvement, il est envisageable d'effectuer de tels dosages en milieux biologiques quasiment non-dilués.

Enfin, contrairement aux méthodes chromatographiques du type ICT ^[200] et aux méthodes en microplaques ^[204], la technique par imagerie SPR offre la possibilité d'injecter des volumes d'échantillon très variables en adaptant simplement le volume de la boucle d'injection ; ceci est particulièrement intéressant pour la détection de toxines dans l'eau et les aliments où la limitation volumique n'est pas une contrainte. Mieux, on pourrait envisager utiliser ce type de dispositif en mode « continu », c'est-à-dire pour de la surveillance dans les usines de traitement des eaux.

2. Autres applications possibles

2.1. Les médicaments & les polluants de l'environnement

De la même manière que pour les protéines toxiques, ces méthodes d'investigation sont aussi envisageables pour d'autres catégories d'analytes. En effet, l'analyte à doser peut être une petite molécule chimique telle qu'un médicament, un produit polluant de l'environnement. De telles méthodes ont par ailleurs déjà été décrites avec un appareillage Biacore[®] ; reposant toujours sur une technique d'immunodosage, Mitchell et al ^[208] ont été capables de détecter la progestérone, un dérivé de type corticoïde.

2.2. Un système embarqué

La nécessité d'obtenir des résultats dans les plus courts délais induit aussi un raccourcissement de l'acheminement des prélèvements vers l'outil de dosage. Un moyen pour y parvenir serait d'adapter le matériel afin qu'il devienne « transportable » sur le terrain. Pour y parvenir, une miniaturisation de la machine serait nécessaire.

De tels concepts sont déjà mis en œuvre par Stead et al ^[221] pour le dosage d'antibiotiques dans l'environnement au moyen d'un appareil Spreeta[®] (National Instruments[®], Etats-Unis) basé sur la résonance de plasmon de surface.

CONCLUSION GENERALE

Les systèmes d'analyses classiques miniaturisés ou non s'adressent généralement à un dosage ou une détection d'événements à forte probabilité. Dans le cadre de ce travail et à partir de l'expertise du laboratoire acquise avec les puces à ADN [2, 4, 9], à peptides [5], à oligosaccharides [3, 6] et à protéines [7, 8], nous avons axé nos recherches sur deux applications bio-analytiques distinctes de l'imagerie SPR pour lesquelles la probabilité d'obtenir un signal reste relativement faible. En effet, lors du criblage pharmaceutique, il est estimé qu'une molécule sur 1 000 voire sur 10 000 se révèle active alors que, pour la détection de toxines, pour la grande majorité des prélèvements, ceux-ci sont théoriquement non contaminés. Ainsi, afin d'augmenter les chances de visualiser un signal biologique, des stratégies adaptées aux applications ont été envisagées.

D'une part, pour le criblage pharmaceutique, les solutions apportées ont consisté à la fois, à immobiliser une librairie de sondes issues de la chimie combinatoire, puis de rendre compatible les procédés de production vers la synthèse de puces à haut débit, c'est-à-dire comprenant un nombre très important de molécules sondes. Les travaux menés ont permis de valider une telle approche et ont conduit à la découverte de sondes capables d'interagir spécifiquement avec une cible pharmacologique pour des candidats antibiotique, l'ARN polymérase bactérienne. Des projets d'ultra-miniaturisation permettant d'immobiliser beaucoup plus de candidats sont en cours de conception et validation.

D'autre part, pour la détection de toxines, le principe a été d'augmenter la sensibilité de la détection de l'imagerie SPR grâce à l'emploi d'anticorps « sandwich » et surtout d'un marqueur SPR : les nanoparticules d'or. Le travail original ici présenté a abouti à une méthode bio-analytique fiable et rapide capable de mettre en évidence la présence de 10 nM en toxine ricine, ce qui constitue la meilleure sensibilité connue à ce jour pour la détection de protéines par imagerie SPR. Ce projet se poursuit actuellement dans le cadre NRBC avec comme objectifs l'économie de réactifs et l'efficacité de la reconnaissance biologique.

Finalement, les propriétés intrinsèques à ces deux applications – le haut débit pour l'un et la sensibilité pour l'autre – pourront à terme s'additionner afin de rendre la technique d'imagerie SPR extrêmement compétitive dans des domaines d'application aussi variés que la génomique

chimique on encore la détection d'un large spectre de toxines dans des milieux biologiques complexes.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Fabrication des puces

1. Préparation des solutions d'immobilisation

1.1. Cas des sondes ODN

L'ensemble des sondes oligonucléotidiques (ODN) pyrrolées ou biotinylées employées au cours de ces travaux a été synthétisé et purifié au laboratoire par André Roget selon un protocole établi par ailleurs.

1.1.1. Milieu de polymérisation « classique »

Le milieu de polymérisation initialement utilisé au laboratoire est constitué comme suit :

- 50 mM NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄
- 450 mM NaCl
- Glycérol 10 % (m/v)
- Eau 90 % (m/v) ajustée à pH 6,8

Aliquotés et conservés à – 20°C, les lots utilisés ont été décongelés juste avant utilisation. Un contrôle macroscopique de la turbidité permet d'évaluer rapidement l'utilisation sans risque de la solution. Les sondes ODN-pyrrole préalablement concentrées à 100 µM (Absorbance mesurée à 260 nm avec le spectromètre UV-visible Uvikon de Biotech Instruments®) sont alors diluées à une concentration de x µM ($1 \mu\text{M} < x < 10 \mu\text{M}$ suivant la concentration initiale fixée) dans ce milieu en présence de 20 mM de pyrrole, lui-même initialement préparé à 1 mM dans l'acétonitrile anhydre.

1.1.2. Nouveau milieu de polymérisation

Afin de produire le nouveau milieu d'immobilisation adapté aux puces à « petits ligands », les différents produits suivants ont été employés :

- Fiole jaugé de 20 mL
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) min 99,5 % pour analyses (*Riedel de Hën*)
- Acétonitrile pour HPLC (*Fluka*)
- Glycérol (*Sigma*)

- y mg de sel support pour une concentration finale de 100 mM (tous issus de *Sigma* ou *Fluka*)
- Eau mQ filtrée 0,22 μm

20 mL du nouveau milieu de polymérisation a été fabriqué juste avant utilisation et ajusté de telle sorte à ce que les pourcentages respectifs en DMSO, en acétonitrile, en glycérol et en eau soient systématiquement de 30 % (m/v), 20 % (m/v), 1 % (m/v) et 49 % (m/v) après ajout de la sonde organique. L'ordre dans lequel les différents réactifs ont été introduits dans une fiole jaugée est le suivant : eau, DMSO, acétonitrile, glycérol, sel support, eau QSP 20 mL.

Les sondes ODN-pyrrole préalablement concentrées à 100 μM sont alors diluées à une concentration de x μM ($1 \mu\text{M} < x < 10 \mu\text{M}$ suivant la concentration initiale fixée) dans ce milieu en présence de 20 mM de pyrrole, lui-même initialement préparé à 1 mM dans l'acétonitrile anhydre. Dans un dernier temps, les solutions reconstituées ont été placées à + 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation pour l'électrospeaking.

1.2. Cas des sondes « petits ligands »

1.2.1. Etude initiale de faisabilité

A partir de la forme lyophilisée fournie par Muriel Amblard, chaque sonde a été dissoute à une concentration de 10 mM dans l'acétonitrile. Ensuite, les mêmes opérations que celles décrites pour les sondes ODN dans le milieu de polymérisation « classique » ont été effectuées. Ici, x est compris entre 100 μM et 1 mM.

1.2.2. Immobilisation de la rifampicine et de la chimiothèque

A partir de la forme lyophilisée fournie par Muriel Amblard (IAMM, Montpellier), chaque sonde a été dissoute à une concentration de 10 mM dans le DMSO. Ensuite, les mêmes opérations que celles décrites pour les sondes ODN dans le nouveau milieu de polymérisation où le sel support est le LiClO_4 ont été effectuées à l'exception près que le volume final préparé n'excède pas 15 μL pour des raisons d'économies en réactif sonde. Ici, x est compris entre 125 μM et 2 mM. Toutes les solutions ont été disposées dans une microplaque de 96 puits. Dans un dernier temps, les solutions reconstituées ont été placées à + 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation pour l'électrospeaking.

1.3. Cas des sondes protéiques

Les réactifs suivants ont été nécessaires au couplage de protéines avec le bras espaceur pyrrolé :

- Pyrrolylundécanoate de *N*-hydroxysuccinimidyle produit préparé et purifié au laboratoire par André Roget
- Tampon phosphate salé 1 X, 10 mM pH 7,4 (PBS, *Sigma*)
- Protéine sonde diluée dans le milieu commercial
- *Sigma* 3K15 (Bioblock Scientific®)
- Spectrophotomètre UV-visible Nanodrop®

Les protéines sont mélangées durant 2 heures à température ambiante au pyrrolylundécanoate de *N*-hydroxysuccinimidyle dans le tampon PBS (*Sigma*) avec un rapport 1 / 20 en faveur en bras pyrrolé. Le milieu réactionnel est alors filtré 3 fois avec le milieu de polymérisation « classique » sur colonne capillaire Vivaspin MWCO 30 000 (Vivascience®) (10 000 tour.min⁻¹) afin d'éliminer l'excès de bras pyrrolé n'ayant pas réagi. En récupérant le liquide retenu par la colonne, un dosage des protéines par absorbance à 280 nm est effectué avec le spectrophotomètre Nanodrop®. A partir de ce stade, les mêmes opérations que celles décrites pour les sondes ODN dans le milieu de polymérisation « classique » ont été effectuées. Ici, *x* est compris entre 100 nM et 16 µM.

2. Etudes voltamétriques

2.1. Solutions analysées

Pour les études voltamétriques, plusieurs produits ont été employés :

- 1,4-dihydroxynaphtoquinone (*Sigma*)
- Naphtoquinone (*Sigma*)
- 5-hydroxy-1,4-naphtoquinone (*Sigma*)
- Rifamycine SV (*Fluka*)
- Rifampicine (*Sigma*)

A partir de leur forme pulvérulente, chacun de ces composés a été introduit à une concentration de 10 mM dans le nouveau milieu de polymérisation où le sel support est le LiClO₄. Des essais de co-oxydation pyrrole / rifampicine ont nécessité l'ajout de 20 mM de pyrrole à la solution pré-décrite.

2.2. Appareillage

Le potentiostat utilisé au cours des investigations voltamétriques (voltamétries cycliques, voltamétrie à ondes carrées – SWV –, voltamétrie pulsée différentielle – DPV –, chronoampérométrie à potentiel fixe, chronopotentiométrie à courant imposé, électrospotting) est l'Autolab[®] PGSTAT30.

2.2.1. Montage à 3 électrodes

Pour les études « classiques » (à trois électrodes), une cellule électrochimique en Téflon[®] d'une contenance de 500 μL a été employée. L'électrode de travail consiste en un disque de platine préalablement rincé à l'eau. Quant à la contre-électrode, le modèle utilisé est la Radiometer[®] munie d'un embout en platine. Enfin, l'électrode de référence est du type Ag / AgCl [KCl]_{saturée} ; un fil d'argent trempe dans une solution saturée de KCl, le tout dans une enceinte en verre munie d'un embout capillaire. Le logiciel utilisé pour ces études est GPES, commercialisé avec le potentiostat par Autolab[®].

2.2.2. Montage à 2 électrodes

Pour les études de type « électrospotting » (à deux électrodes), une cellule électrochimique de type micropipette p10 d'une contenance de 10 μL a été employée. L'électrode de travail consiste en une lame de verre recouverte d'une couche d'or de 50 nm. Quant à la contre-électrode, elle correspond ici à un fil de platine de diamètre 125 μm . Les essais sous le format « électrospotting » ont été menés dans 2 μL de solution.

3. Electrospotting

Le support employé ici est soit un prisme de verre à haut indice recouvert d'une couche de chrome de 1 nm et de 48 nm d'or, soit une lame de verre pour microscope recouverte d'une couche de 1 nm de titane et de 50 nm d'or.

3.1. Fonctionnalisation par les alcane-thiols

Les produits couramment employés pour effectuer cette fonctionnalisation de surface sont les suivants :

- Piranha préalablement reconstitué au laboratoire
- Ethanol (*Sigma*)
- Dodécane-thiol (*Fluka*)

La surface dorée peut éventuellement être rendue hydrophobe après fonctionnalisation par le dodécane-thiol. Pour se faire, le support est mis une heure dans une solution de piranha (mélange H_2O_2 / H_2SO_4) fraîchement reconstituée afin de détruire tout résidu organique polluant la surface d'or. Après rinçage à l'eau mQ, le support est alors introduit dans une solution de dodécane-thiol dilué dans l'éthanol durant 10 minutes. Enfin, le support est rincé abondamment à l'éthanol pour éliminer l'excès de thiols. Après séchage, le support peut finalement être destiné à l'électrospotting.

3.2. Séquences imposées

3.2.1. Cas général

La séquence généralement admise pour l'immobilisation des sondes pyrrolées au laboratoire est la suivante : (DDP pour Différence de potentiel)

- Palier α : DDP imposée de + 0,4 V durant 1 s
- Palier β : DDP imposée de + 2,4 V durant z s ($100 \text{ ms} < z < 500 \text{ ms}$)
- Palier δ : DDP imposée de + 0,4 V durant 1 s

3.2.2. Cas particulier de la rifampicine pyrrolée

A la différence de la séquence précitée, l'immobilisation de la sonde rifampicine pyrrolée a suivi les conditions opératoires suivantes : (DDP pour Différence de potentiel)

- Palier α : DDP imposée de + 0,4 V durant 1 s
- Palier β : DDP imposée de + 2,4 V durant 100 ms
- Palier δ : DDP imposée de - 1,0 V durant 1 s

3.3. Appareillage

3.3.1. Polypotter II

Afin d'adresser spatialement le polypyrrole éventuellement modifié par une sonde, un automate a été mis au point au laboratoire. Des moteurs pilotés par informatique suivant une interface LabView (National Instruments[®]) permettent de déplacer la même cellule

électrochimique que celle décrite précédemment en 2.2.2 suivant 3 axes (x, y, z). L'électrode de travail en or ainsi que l'électrode de platine sont reliées à un potentiostat modèle EGG 263 commercialisé par Princeton Applied Research[®]. Ce dernier procède à l'enregistrement de I(t) durant les trois paliers composant l'électrospotting. Parallèlement, une table traçante Schlumberger[®] 8300 écrit les données correspondantes.

3.3.2. Omnigrad

Afin d'adresser spatialement le polypyrrole éventuellement modifié par une sonde, un automate commercialisé par la société Genoptics[®] a été utilisé. Des moteurs pilotés par informatique suivant le logiciel AxSys (Genomic Solutions[®]) permettent de déplacer une cellule électrochimique au format aiguille (tige en acier creusée à son extrémité et recouverte d'un manchon en Téflon[®]) suivant 3 axes (x, y, z). L'électrode de travail en or ainsi que l'électrode de platine sont reliée à un module LabJack[®]. Ce dernier procède à l'enregistrement de I(t) durant les trois paliers composant l'électrospotting et renvoie les informations à un logiciel sous interface LabView[®]. Pour la sonde type rifampicine, étant donné que les polarités imposées par le module électrochimique ne peuvent être inversées, le potentiostat Autolab[®] PGSTAT30 l'a remplacé. L'ensemble des opérations se fait sous atmosphère à humidité contrôlée *via* un boîtier électronique ; ici, 80 % d'humidité relative a été fixée pour limiter l'évaporation du milieu de polymérisation et le séchage des gouttes sur le support fonctionnalisé.

Après synthèse des puces, ces dernières sont systématiquement rincées à l'eau mQ puis séchées sous un courant d'argon avant d'être mises à + 4^{°C} jusqu'à leur utilisation par microscopie de fluorescence ou par imagerie SPR.

II. ANALYSE PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

1. Par type de puce

1.1. Puces à ADN

Le protocole de révélation employé classiquement au laboratoire pour la révélation de puces à ADN fait appel aux réactifs suivants :

- « Milieu de blocage » : tampon phosphate 50 mM contenant du sperme de saumon soniqué
- « Milieu d'hybridation » : tampon phosphate enrichi en NaCl (450 mM)
- Streptavidine-R-phycoérythrine (SAPE, *Molecular Probes*)
- « Milieu de rinçage » : tampon phosphate pH 7,4

Aliquotés et conservés à -20°C , les lots utilisés ont été décongelés juste avant utilisation. Après synthèse de la puce, celle-ci reçoit un marquage hydrophobe (DakoPen[®]) sur son pourtour afin de confiner le dépôt des gouttes lors des étapes d'incubation. La première étape consiste à bloquer la surface durant 15 minutes à température ambiante par 100 μL du « milieu de blocage ». Une fois rincée par 3 fois 1 mL d'eau mQ, la puce placée à $+45^{\circ}\text{C}$ (étuve Eppendorf[®]), accueille 100 μL d'une solution de 100 nM de sonde ODN diluée dans le « milieu d'hybridation ». Une nouvelle fois, 3 fois 1 mL d'eau mQ permettent d'éliminer la cible ODN n'ayant pas réagi. Enfin, dans une dernière étape, le support est mis à incuber durant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, avec 100 μL d'une solution de SAPE diluée au 10° de la solution commerciale. L'excès de SAPE est éliminé par 3 rinçages successifs de 1 mL en « milieu de rinçage ». Avant d'installer l'échantillon sur la platine du microscope, une lamelle et une lame entière de microscope lui sont posées respectivement par-dessus et par-dessous.

1.2. Puces à « petits ligands »

1.2.1. Révélation directe

Pour les puces à « biotine », des opérations similaires à celles décrites dans le paragraphe précédent ont été mises en place, excepté la nature de l'agent bloquant et l'absence d'étape d'hybridation. Ici, le « milieu de blocage » est constitué d'un tampon phosphate supplémenté

par 1 % (m/v) en albumine de sérum de bœuf (BSA, *initial fractionation by heat shock*, min 98 %, *Sigma*).

1.2.2. Révélation indirecte

Ici, plusieurs réactifs ont été employés en fonction de la nature du « petit ligand » à révéler :

- IgG monoclonal de souris anti-biotine (clone BN-34, *Sigma*)
- IgG monoclonal de souris anti-fluorescéine (clone B13-DE1, *Sigma*)
- IgE monoclonal de souris anti-dinitrophényle (clone SPE-7, *Sigma*)
- IgG polyclonaux de chèvre anti-IgG de souris (*Sigma*)
- IgG polyclonaux de chèvre anti-IgE de souris (*Sigma*)

De façon similaire au mode de révélation directe décrit dans le paragraphe précédent, l'agent bloquant utilisé est la BSA. Aussi, ici, les cibles anticorps-anti sonde correspondantes aux sondes employées ont été diluées à une concentration de 100 nM dans le milieu phosphate pH 7,4. 100 µL de ce mélange est mis à incuber durant 15 minutes avec le support puce. Ensuite, la puce est rincée par 3 fois 1 mL de milieu phosphate pH 7,4. C'est alors que 100 µL en anticorps biotinylé anti-espèce à 100 mM ont été déposés sur la puce. Dans une dernière étape, la SAPE a été employée suivant le même protocole que celui décrit pour les puces à ADN.

2. Lecture et analyse des données

Le microscope par épifluorescence utilisé est muni de différents filtres (Olympus®) ; ici, le filtre vert spécifique de la SAPE (absorption dans le vert, réémission dans le rouge orangé) a été systématiquement employé. La source de lumière est une lampe à argon. Le signal de fluorescence est recueilli par une caméra CCD (Sony®), elle-même connectée à un module électronique d'acquisition (Hamamatsu®). Les informations sont finalement renvoyées à un ordinateur *via* un logiciel de traitement d'image nommé Image ProPlus®. La quantification des intensités de fluorescence a été faite avec ce dernier logiciel.

Les grossissements utilisés ont été les suivant : x 1,2 pour une puce entière, x 4 pour 6 zones de dépôt par image, x 10 pour 2 zones de dépôt par image et x 20 pour 1 zone de dépôt par image.

III. ANALYSE PAR IMAGERIE SPR

1. Appareillage

1.1. Optique

L'imageur SPR est initialement commercialisé par la société Genoptics[®]. Son bâti est constitué de plusieurs modules ; une source de type LED polie émettant à 653 nm, un polariseur (2 positions en butée, soit TE, soit TM), une lentille convergente pour focaliser le faisceau sur un miroir mobile monté sur un vernier, une lentille divergente pour illuminer l'ensemble de la surface dorée à travers le prisme en verre, une lentille convergente pour faire la mise au point sur une caméra CCD (jAi[®]), lieu où se termine le trajet optique. La caméra est elle-même reliée à un ordinateur qui en reçoit et interprète les données au travers du logiciel Genovision 3 développé par Genoptics[®]. L'ensemble de l'appareillage optique est placé dans une enceinte à l'obscurité et sous régulation thermique ; classiquement, les interactions ont été mesurées à + 20°C.

1.2. Microfluidique

La circulation des échantillons se fait au travers d'un système microfluidique constitué des éléments suivants : une réserve de tampon expérimental (usuellement PBS, ou PBS Tween 0,5 %) dans une fiole de grande contenance (évite l'évaporation et pour le même coup une variation de l'indice optique de la solution durant l'expérimentation), un système de dégazage (chambre à vide) limitant l'apparition de bulles d'air dans le système aval, une pompe péristaltique (pour l'étude initiale de faisabilité, Gilson[®]) ou une pompe pousse-seringue de 5 mL (pour toutes les autres expériences, Cavro[®]), une boucle d'injection dont le volume est défini par la taille de la tuyauterie associée (500 µL pour l'ensemble des expériences menées au cours de ces travaux), une cellule d'interaction ronde en PTFE d'un diamètre d'un centimètre, d'une fiole de grande contenance pour récupérer les effluents. L'ensemble de la tuyauterie utilisée pour joindre ces différents modules est en peek (imperméable à l'air).

Toutes les mesures de réflectivité se font avec un débit fixe ; suivant l'application, celui-ci a été mesuré à 5 mL.h⁻¹ (cas général), à 3 mL.h⁻¹ (dosage normal de la ricine) ou à 0,75 mL.h⁻¹ (dosage lent). Pour la pompe Cavro[®], ce paramètre est pilotable par ordinateur au travers

d'une interface LabView® créée au laboratoire par Sébastien Dumenil. Pour la pompe péristaltique, la mesure du débit consiste à estimer le volume à la sortie de l'appareil microfluidique récupéré dans un intervalle de temps donné ; cette opération est nécessaire car le serrage de la tuyauterie souple sur la pompe péristaltique définit le débit. Or, ce type de tuyauterie perd partiellement ses propriétés élastiques à long terme (écrasement).

2. Suivi des interactions

2.1. Acquisition des courbes de plasmon

La biopuce fabriquée sur support prisme est placée dans une encoche prévue à cet effet de sorte que la chambre d'interaction vient se centrer à l'endroit où les dépôts de polymère ont été synthétisés. Une calibration préalable de la caméra CCD est nécessaire ; le bruit de fond électronique est obtenu en coupant le faisceau alors que le 100 % est obtenu en positionnant le polariseur en mode TE. Pour effectuer l'enregistrement des courbes de plasmon, l'angle du miroir est positionné à différentes valeur d'inclinaison ; la fourchette balayée est de + 49,10° à + 57,10° selon un incrément de + 0,40°. Pour chaque valeur de l'angle du miroir, une image en position TE (100 % du signal réfléchi – pas d'effet plasmon) et une image en mode TM (< 100 % du signal – effet plasmon) sont enregistrées.

Une fois les différentes images enregistrées, les zones d'acquisition cinétique, c'est-à-dire les zones de polymère, sont définies graphiquement. A partir de là, le logiciel calcule pour chaque zone, l'intensité moyenne de réflectivité pour chacun des angles balayés ; ce sont les courbes de plasmon. Le choix de l'angle de travail repose sur l'allure des courbes de plasmon ; il faut d'une part que l'on se situe dans la partie ascendante de la courbe et, d'autre part, que l'on soit capable de se situer dans une « zone sensible » de l'appareil pour l'ensemble des zones suivies (signal dérivé > 15 % / ° d'angle). Classiquement, l'angle de travail se situe aux environs de + 53,10°.

2.2. Acquisition cinétique et traitement des données

L'acquisition cinétique se fait une fois l'angle de travail déterminé est réglé physiquement sur l'appareil SPRi. Suivant une fréquence déterminée par l'utilisateur (1 mesure.s⁻¹ dans le cadre des travaux présentés ici), la mesure de l'intensité réfléchie est effectuée par le logiciel

Genovision 3. D'autre part, un affichage de l'image acquise en direct ainsi qu'une image différentielle entre une image « référence » et l'image en cours d'acquisition est possible.

Enfin, après l'expérience cinétique les données numériques peuvent être récupérées sur un tableur du type Kaleidagraph[®]. L'ensemble des données cinétiques présentées dans ce manuscrit ont alors subi un alignement ainsi qu'un filtrage du bruit « haute-fréquence » ; ce système mathématique de filtre passe-bas est obtenu par la moyenne des pourcentages de réflectivité sur une plage de 5 mesures consécutives. En effet, compte-tenu de l'absence de phénomène biologique à haute vitesse, au cours des travaux présentés, cette approche est bien adaptée. Enfin, pour certaines expériences, un alignement temporel a été effectué (ex : dosage direct de la biotine).

3. Analytes

3.1. Préparation

Les dilutions ont été systématiquement faites dans un milieu ayant été systématiquement filtré au moyen de deux membranes montées en série de porosités respectives 0,8 μm / 0,2 μm (Minisart[®] / Acrodisc[®]). Les différents analytes employés dans l'appareillage microfluidique sont les suivants :

- Série des anticorps anti-sonde décrits en II.1.2.2
- IgG monoclonal 11D11 et facteur σ_{70} (collaboration Jean-Paul Léonetti, Montpellier)
- Chaîne B de la ricine, IgG polyclonal de lapin anti-chaîne B de la ricine, nanoparticules d'or 40 nm fonctionnalisées par l'IgG de chèvre anti-IgG de lapin (collaboration Philippe Thullier, Grenoble)
- IgG de chèvre anti-IgG de lapin (BBInternational[®], Royaume-Uni)
- Biotine (*Sigma*), rifampicine (*Sigma*)

Pour la grande majorité des protéines cibles injectées (IgG monoclonal anti-fluorescéine, IgG monoclonal anti-biotine, IgG monoclonal 11D11, facteur σ_{70} , chaîne B de la ricine, IgG polyclonal de lapin anti-chaîne B de la ricine, nanoparticules d'or fonctionnalisées par l'IgG de chèvre anti-IgG de lapin), aucun traitement préalable n'a été nécessaire en dehors de leur dilution à la concentration injectée adéquate.

Pour l'ARN polymérase bactérienne, une filtration préalable sur colonne Vivaspin® MWCO 30 000 selon le procédé indiqué en 1.3 a été effectuée, le milieu final correspondant au milieu expérimental.

Pour les expériences par compétition, une incubation préalable de 15 minutes à température ambiante entre cible et molécule compétitrice de la sonde a été menée.

3.2. Injection

Avant toute injection, la boucle reçoit une première injection de SDS 1 % (m/v), puis une deuxième injection de tampon expérimental. Le chargement de l'échantillon dans la boucle d'injection nécessite un volume préparé de 1 mL afin de rincer.

Pour le projet « puces à petits ligands », un blocage de la surface par une injection de BSA 1 % (m/v) a été envisagée. Pour le projet « puces pour la détection de toxines », l'injection consécutive des différents réactifs de révélation nécessite un délai de 2 minutes au débit de 3 mL.h⁻¹ afin qu'il n'y ait pas de chevauchement dans l'appareillage microfluidique entre les réactifs injectés.

BIBLIOGRAPHIE

1. Genies EM, Bidan G, Diaz AF. SPECTROELECTROCHEMICAL STUDY OF POLYPYRROLE FILMS. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1983;149(1-2):101-113.
2. Livache T, Maillart E, Lassalle N, et al. Polypyrrole based DNA hybridization assays: study of label free detection processes versus fluorescence on microchips. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003;32(4-5):687-696.
3. Mercey, E., *Mesures parallélisées d'interactions oligosaccharides / protéines au moyen de biopuces*. 2005, Université Joseph Fourier: Grenoble. p. 239.
4. Fiche JB, Buhot A, Calemczuk R, Livache T. Temperature effects on DNA chip experiments from surface plasmon resonance imaging: Isotherms and melting curves. *Biophysical Journal*. 2007;92(3):935-946.
5. Cherif B, Roget A, Villiers CL, et al. Clinically related protein-peptide interactions monitored in real time on novel peptide chips by surface plasmon resonance imaging. *Clinical Chemistry*. 2006;52(2):255-262.
6. Livache, T., et al., *NOVEL SACCHARIDE-GRAFT POLYMERS AND THE USE THEREOF FOR SCREENING PROCESSES*, in *PATENT COOPERATION TREATY APPLICATION*. 2005.
7. Grosjean L, Cherif B, Mercey E, et al. A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process. *Analytical Biochemistry*. 2005;347(2):193-200.
8. Suraniti E, Sollier E, Calemczuk R, et al. Real-time detection of lymphocytes binding on an antibody chip using SPR imaging. *Lab on a Chip*. 2007;7(9):1206-1208.
9. Livache T, Maillart E, Lassalle N, et al. Polypyrrole based DNA hybridization assays: study of label free detection processes versus fluorescence on microchips. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003;32(4-5):687-696.
10. ONERBA. 2007, Site Web : www.onerba.org.
11. l'Onerba. Bacterial resistance to antibiotics. Data from the National Observatory of Bacterial Resistance Epidemiology (ONERBA). *Medecine Et Maladies Infectieuses*. 2005;35(3):155-169.12. Mariani-Kurkdjian P, Bingen E. Pseudomonas aeruginosa: resistance to antibiotics. *Archives De Pédiatrie*. 2006;13:S5-S9.
13. Schmidt-Ioanas M, de Roux A, Lode H. New antibiotics for the treatment of severe staphylococcal infection in the critically ill patient. *Current Opinion in Critical Care*. 2005;11(5):481-486.
14. Lentino JR, Narita M, Yu VL. New antimicrobial agents as therapy for resistant gram-positive cocci. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2008;27:3-15.
16. [Trovaflaxine--a new quinolone with expanded action spectrum]. *Internist (Berl)*. 1998;39(6 Suppl Trovaflaxa):1-4.
17. Pichichero ME, Arguedas A, Dagan R, et al. Safety and efficacy of gatifloxacin therapy for children with recurrent acute otitis media (AOM) and/or AOM treatment failure. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;41(4):470-478.
18. Croisier D, Etienne M, Piroth L, et al. In vivo pharmacodynamic efficacy of gatifloxacin against Streptococcus pneumoniae in an experimental model of pneumonia: impact of the low levels of fluoroquinolone resistance on the enrichment of resistant mutants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004;54(3):640-647.
19. Gradelski E, Kolek B, Bonner D, Fung-Tomc J. Bactericidal mechanism of gatifloxacin compared with other quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002;49(1):185-188.

20. Schlech BA, Alfonso E. Overview of the potency of moxifloxacin ophthalmic solution 0.5% (VIGAMOX (R)). *Survey of Ophthalmology*. 2005;50:S7-S15.
21. Pestova E, Millichap JJ, Noskin GA, Peterson LR. Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000;45(5):583-590.
22. Scheinfeld N. Dalbavancin: A review. *Drugs of Today*. 2007;43(5):305-316.
23. Ward KE, Mersfelder TL, LaPlante KL. Oritavancin - an investigational glycopeptide antibiotic. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2006;15(4):417-429.
24. Katsu M, Saito A. ISEPAMICIN. *Japanese Journal of Antibiotics*. 1989;42(3):543-566.
25. Tod M, Padoin C, Petitjean O. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of isepamicin. *Clinical Pharmacokinetics*. 2000;38(3):205-223.
26. Manfredi R. A re-emerging class of antimicrobial agents: Streptogramins (quinupristin/dalfopristin) in the management of multiresistant gram-positive nosocomial cocci in hospital setting. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2005;5(12):1075-1081.
27. Muller-Serieys C. Ketolides and oxazolidinones: mechanism of action and antibacterial spectrum. *Presse Medicale*. 2000;29(37):2061-2064.
28. Vacek, V., [Antibacterial chemotherapy--are we really at the end of the antibiotic era?]. *Cas Lek Cesk*, 2001. 140(19): p. 592-5.
29. Habich D, von Nussbaum F. Platensimycin, a new antibiotic and "superbug challenger" from nature. *Chemmedchem*. 2006;1(9):951-4.
30. Singh SB, Phillips JW, Wang J. Highly sensitive target-based whole-cell antibacterial discovery strategy by antisense RNA silencing. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. 2007;10(2):160-166.
31. Wilkinson B, Micklefield J. Mining and engineering natural-product biosynthetic pathways. *Nature Chemical Biology*. 2007;3(7):379-386.
32. Laszlo A, Rahman M, Espinal M, Raviglione M, Ref WINS. Quality assurance programme for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994-1998. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 2002;6(9):748-756.
33. Edrington TS, Harvey RB, Farrington LA, Nisbet DJ. Determination of MICs of streptomycin for resistant Salmonella isolates in swine and poultry using a micro-broth dilution system. *Journal of Food Protection*. 2002;65(3):563-566.
34. Lalitha MK, Manayani DJ, Priya L, Jesudason MV, Thomas K, Steinhoff MC. E test as an alternative to conventional MIC determination for surveillance of drug resistant Streptococcus pneumoniae. *Indian Journal of Medical Research*. 1997;106:500-503.
35. Macias EA, Mason EO, Ocera HY, Larocco MT. COMPARISON OF E-TEST WITH STANDARD BROTH MICRოდILUTION FOR DETERMINING ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITIES OF PENICILLIN-RESISTANT STRAINS OF STREPTOCOCCUS-PNEUMONIAE. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994;32(2):430-432.
36. Andre E, Bastide L, Vullian-Guillot P, Latouche J, Roubly J, Leonetti JP. A multiwell assay to isolate compounds inhibiting the assembly of the prokaryotic RNA polymerase. *Assay and Drug Development Technologies*. 2004;2(6):629-635.
37. Andre E, Bastide L, Michaux-Charachon S, et al. Novel synthetic molecules targeting the bacterial RNA polymerase assembly. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;57(2):245-251.

38. Artsimovitch I, Chu C, Lynch AS, Landick R. A new class of bacterial RNA polymerase inhibitor affects nucleotide addition. *Science*. 2003;302(5645):650-654.
39. Gosalia DN, Diamond SL. Printing chemical libraries on microarrays for fluid phase nanoliter reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(15):8721-8726.
40. Xu QC, Lam KS. Protein and chemical microarrays - Powerful tools for proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2003(5):257-266.
41. Geysen HM, Meloen RH, Barteling SJ. USE OF PEPTIDE-SYNTHESIS TO PROBE VIRAL-ANTIGENS FOR EPITOPES TO A RESOLUTION OF A SINGLE AMINO-ACID. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*. 1984;81(13):3998-4002.
42. Frank R. The SPOT synthesis technique - Synthetic peptide arrays on membrane supports - principles and applications. *Journal of Immunological Methods*. 2002;267(1):13-26.
43. Laune D, Molina F, Ferrieres G, et al. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. *Journal of Immunological Methods*. 2002;267(1):53-70.
44. Molina F, Laune D, Gougat C, Pau B, Granier C. Improved performances of spot multiple peptide synthesis. *Peptide Research*. 1996;9(3):151-155.
45. Fodor SPA, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. LIGHT-DIRECTED, SPATIALLY ADDRESSABLE PARALLEL CHEMICAL SYNTHESIS. *Science*. 1991;251(4995):767-773.
46. Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SPA. LIGHT-GENERATED OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS FOR RAPID DNA-SEQUENCE ANALYSIS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(11):5022-5026.
47. McGall G, Labadie J, Brock P, Wallraff G, Nguyen T, Hinsberg W. Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(24):13555-13560.
48. Li SW, Bowerman D, Marthandan N, et al. Photolithographic synthesis of peptoids. *Journal of the American Chemical Society*. 2004;126(13):4088-4089.
49. Pellois JP, Wang W, Gao XL. Peptide synthesis based on t-Boc chemistry and solution photogenerated acids. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 2000;2(4):355-360.
50. LeProust E, Pellois JP, Yu PL, et al. Digital light-directed synthesis. A microarray platform that permits rapid reaction optimization on a combinatorial basis. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 2000;2(4):349-354.
51. Scharn D, Wenschuh H, Reineke U, Schneider-Mergener J, Germeroth L. Spatially addressed synthesis of amino- and amino-oxy-substituted 1,3,5-triazine arrays on polymeric membranes. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 2000;2(4):361-369.
52. Wang DN, Liu SY, Trummer BJ, Deng C, Wang AL. Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells. *Nature Biotechnology*. 2002;20(3):275-281.
53. Martin BD, Gaber BP, Patterson CH, Turner DC. Direct protein microarray fabrication using a hydrogel "stamper". *Langmuir*. 1998;14(15):3971-3975.
54. Fang Y, Frutos AG, Lahiri J. Membrane protein microarrays. *Journal of the American Chemical Society*. 2002;124(11):2394-2395.
55. Bailey SN, Sabatini DM, Stockwell BR. Microarrays of small molecules embedded in biodegradable polymers for use in mammalian cell-based screens. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(46):16144-16149.
56. Lesaichere ML, Uttamchandani M, Chen GYJ, Yao SQ. Developing site-specific immobilization strategies of peptides in a microarray. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2002;12(16):2079-2083.
 57. Zhu H, Bilgin M, Bangham R, et al. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*. 2001;293(5537):2101-2105.
 58. Winssinger N, Harris JL, Backes BJ, Schultz PG. From split-pool libraries to spatially addressable microarrays and its application to functional proteomic profiling. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2001;40(17):3152-5.
 59. MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science*. 2000;289(5485):1760-1763.
 60. Zhu H, Klemic JF, Chang S, et al. Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nature Genetics*. 2000;26(3):283-289.
 61. Benters R, Niemeyer CM, Wohrle D. Dendrimer-activated-solid supports for nucleic acid and protein microarrays. *ChemBiochem*. 2001;2(9):686-694.
 62. MacBeath G, Koehler AN, Schreiber SL. Printing small molecules as microarrays and detecting protein-ligand interactions en masse. *Journal of the American Chemical Society*. 1999;121(34):7967-7968.
 63. Xu QC, Lam KS. An efficient approach to prepare glyoxylyl functionality on solid-support. *Tetrahedron Letters*. 2002;43(25):4435-4437.
 64. Houseman BT, Huh JH, Kron SJ, Mrksich M. Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity. *Nature Biotechnology*. 2002;20(3):270-274.
 65. Houseman BT, Mrksich M. Carbohydrate arrays for the evaluation of protein binding and enzymatic modification. *Chemistry & Biology*. 2002;9(4):443-454.
 66. Kohn M, Wacker R, Peters C, et al. Staudinger ligation: A new immobilization strategy for the preparation of small-molecule arrays. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2003;42(47):5830-5834.
 67. Barnes-Seeman D, Park SB, Koehler AN, Schreiber SL. Expanding the functional group compatibility of small-molecule microarrays: Discovery of novel calmodulin ligands. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2003;42(21):2376-2379.
 68. Hergenrother PJ, Depew KM, Schreiber SL. Small-molecule microarrays: Covalent attachment and screening of alcohol-containing small molecules on glass slides. *Journal of the American Chemical Society*. 2000;122(32):7849-7850.
 69. Falsey JR, Renil M, Park S, Li SJ, Lam KS. Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjugate Chemistry*. 2001;12(3):346-353.
 70. Kanoh N, Kumashiro S, Simizu S, et al. Immobilization of natural products on glass slides by using a photoaffinity reaction and the detection of protein-small-molecule interactions. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2003;42(45):5584-5587.
 71. Dillmore WS, Yousaf MN, Mrksich M. A photochemical method for patterning the immobilization of ligands and cells to self-assembled monolayers. *Langmuir*. 2004;20(17):7223-7231.
 72. Kuruvilla FG, Shamji AF, Sternson SM, Hergenrother PJ, Schreiber SL. Dissecting glucose signalling with diversity-oriented synthesis and small-molecule microarrays. *Nature*. 2002;416(6881):653-657.
 73. Uttamchandani M, Walsh DP, Khersonsky SM, Huang X, Yao SQ, Chang YT. Microarrays of tagged combinatorial triazine libraries in the discovery of small-molecule ligands of human IgG. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 2004;6(6):862-868.

74. Koehler AN, Shamji AF, Schreiber SL. Discovery of an inhibitor of a transcription factor using small molecule microarrays and diversity-oriented synthesis. *Journal of the American Chemical Society*. 2003;125(28):8420-8421.
75. Zhu Q, Uttamchandani M, Li DB, Lesaichere ML, Yao SQ. Enzymatic profiling system in a small-molecule microarray. *Organic Letters*. 2003;5(8):1257-1260.
76. Vetter D. Chemical microarrays, fragment diversity, label-free imaging by plasmon resonance--a chemical genomics approach. *J Cell Biochem Suppl*. 2002;39:79-84.
77. Dickopf S, Frank M, Junker HD, et al. Custom chemical microarray production and affinity fingerprinting for the S1 pocket of factor VIIa. *Analytical Biochemistry*. 2004;335(1):50-57.
78. Besenbruch, R., et al., *LOW AFFINITY SCREENING METHOD*, in *EUROPEAN PATENT APPLICATION*. 2003.
79. Metz, G., et al., *SCREENING METHOD USING SOLID SUPPORTS MODIFIED WITH SELF-ASSEMBLED MONOLAYERS*, in *EUROPEAN PATENT APPLICATION*. 2003.
80. Hutt DA, Leggett GJ. Influence of adsorbate ordering on rates of UV photooxidation of self-assembled monolayers. *Journal of Physical Chemistry*. 1996;100(16):6657-6662.
81. Kienle S, Lingler S, Kraas W, Offenhausser A, Knoll W, Jung G. Electropolymerization of a phenol-modified peptide for use in receptor-ligand interactions studied by surface plasmon resonance. *Biosensors & Bioelectronics*. 1997;12(8):779-786.
82. Kresge N, Simoni RD, Hill RL. The discovery and isolation of RNA polymerase by Jerard Hurwitz. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(15).
83. Artsimovitch I, Vassylyev DG. Is it easy to stop RNA polymerase? *Cell Cycle*. 2006;5(4):399-404.
84. Villain-Guillot P, Bastide L, Gualtieri M, Leonetti JP. Progress in targeting bacterial transcription. *Drug Discovery Today*. 2007;12(5-6):200-208.
85. Zhang GY, Campbell EA, Minakhin L, Richter C, Severinov K, Darst SA. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 angstrom resolution. *Cell*. 1999;98(6):811-824.
86. Minakhin L, Bhagat S, Brunning A, et al. Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 ave sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(3):892-897.
87. Murakami KS, Masuda S, Campbell EA, Muzzin O, Darst SA. Structural basis of transcription initiation: An RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science*. 2002;296(5571):1285-1290.
88. Murakami KS, Masuda S, Darst SA. Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 angstrom resolution. *Science*. 2002;296:1280-1284.
89. Paget MSB, Helmann JD. Protein family review - The sigma(70) family of sigma factors. *Genome Biology*. 2003;4(1).
90. Vassylyev DG, Vassylyeva MN, Perederina A, Tahirov TH, Artsimovitch I. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature*. 2007;448(7150):157-U153.
91. Banerjee S, Chalissery J, Bandey I, Sen RJ. Rho-dependent transcription termination: More questions than answers. *Journal of Microbiology*. 2006;44(1):11-22.
92. Wassarman KM, Saecker RM. Synthesis-mediated release of a small RNA inhibitor of RNA polymerase. *Science*. 2006;314(5805):1601-1603.

93. Borukhov S, Lee J, Laptenko O. Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Molecular Microbiology*. 2005;55(5):1315-1324.
94. Tucker BJ, Breaker RR. Riboswitches as versatile gene control elements. *Current Opinion in Structural Biology*. 2005;15(3):342-348.
95. Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. GLOBAL EPIDEMIOLOGY OF TUBERCULOSIS - MORBIDITY AND MORTALITY OF A WORLDWIDE EPIDEMIC. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 1995;273(3):220-226.
96. Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*. 2001;104(6):901-912.
97. Rothstein DM, Shalish C, Murphy CK, Sternlicht A, Campbell LA. Development potential of rifalazil and other benzoxazinorifamycins. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2006;15(6):603-623.
98. Campbell EA, Pavlova O, Zenkin N, et al. Structural, functional, and genetic analysis of sorangicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Embo Journal*. 2005;24(4):674-682.
99. Sarubbi E, Monti F, Corti E, Miele A, Selva E. Mode of action of the microbial metabolite GE23077, a novel potent and selective inhibitor of bacterial RNA polymerase. *European Journal of Biochemistry*. 2004;271(15):3146-3154.
100. Semenova E, Yuzenkova Y, Peduzzi J, Rebuffat S, Severinov K. Structure-activity analysis of microcin J25: Distinct parts of the threaded lasso molecule are responsible for interaction with bacterial RNA polymerase. *Journal of Bacteriology*. 2005;187(11):3859-3863.
101. Ebright, R.H., et al., *NON-MCCJ25-RELATED LARIAT-PEPTIDE INHIBITORS OF BACTERIAL RNA POLYMERASE*, in *PATENT COOPERATION TREATY APPLICATION*. 2007.
102. Fischer PM. Diketopiperazines in peptide and combinatorial chemistry. *Journal of Peptide Science*. 2003;9(1):9-35.
103. Shimazaki N, Shima I, Okamoto M, Yoshida K, Hemmi K, Hashimoto M. PAF INHIBITORY ACTIVITY OF DIKETOPIPERAZINES - STRUCTURE-ACTIVITY-RELATIONSHIPS. *Lipids*. 1991;26(12):1175-1178.
104. Lucietto FR, Milne PJ, Kilian G, Frost CL, Van De Venter M. The biological activity of the histidine-containing diketopiperazines cyclo(His-Ala) and cyclo(His-Gly). *Peptides*. 2006;27(11):2706-2714.
105. Balboni G, Guerrini R, Salvadori S, et al. Opioid diketopiperazines: Synthesis and activity of a prototypic class of opioid antagonists. *Biological Chemistry*. 1997;378(1):19-29.
106. Einholm AP, Pedersen KE, Wind T, et al. Biochemical mechanism of action of a diketopiperazine inactivator of plasminogen activator inhibitor-1. *Biochemical Journal*. 2003;373:723-732.
107. Bernard J, Wennemers H. Macrocyclic diketopiperazine receptors: Effect of macrocyclization on the binding properties of two-armed receptors. *Organic Letters*. 2007;9:4283-4286.
108. Borthwick AD, Davies DE, Exall AM, et al. 2,5-Diketopiperazines as potent, selective, and orally bioavailable oxytocin antagonists. 3. Synthesis, pharmacokinetics, and in vivo potency. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006;49(14):4159-4170.

109. Prakash KRC, Tang Y, Kozikowski AP, Flippen-Anderson JL, Knoblach SM, Faden AI. Synthesis and biological activity of novel neuroprotective diketopiperazines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2002;10(9):3043-3048.
110. Besada P, Mamedova L, Thomas CJ, Costanzi S, Jacobson KA. Design and synthesis of new bicyclic diketopiperazines as scaffolds for receptor probes of structurally diverse functionality. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2005;3(10):2016-2025.
111. Guan J, Mathal S, Harris P, et al. Peripheral administration of a novel diketopiperazine, NNZ 2591, prevents brain injury and improves somatosensory-motor function following hypoxia-ischemia in adult rats. *Neuropharmacology*. 2007;53:749-762.
112. Guan J, Mathal S, Harris P, et al. Peripheral administration of a novel diketopiperazine, NNZ 2591, prevents brain injury and improves somatosensory-motor function following hypoxia-ischemia in adult rats. *Neuropharmacology*. 2007;53:749-762.
113. Sugie Y, Hirai H, Inagaki T, et al. A new antibiotic CJ-17,665 from *Aspergillus ochraceus*. *Journal of Antibiotics*. 2001;54(11):911-916.
114. Usami Y, Aoki S, Hara T, Numata A. New dioxopiperazine metabolites from a *Fusarium* species separated from a marine alga. *Journal of Antibiotics*. 2002;55(7):655-659.
115. Li XF, Kim SK, Nam KW, Kang JS, Choi HD, Son BW. A new antibacterial dioxopiperazine alkaloid related to gliotoxin from a marine isolate of the fungus *Pseudallescheria*. *Journal of Antibiotics*. 2006;59(4):248-250.
116. Clark B, Capon RJ, Lacey E, Tennant S, Gill JH. Roquefortine E, a diketopiperazine from an Australian isolate of *Gymnoascus reessii*. *Journal of Natural Products*. 2005;68(11):1661-1664.
117. Zheng CJ, Kim YH, Kim WG. Glioperazine B, as a new antimicrobial agent against *Staphylococcus aureus*, and glioperazine C: Two new dioxopiperazines from *Bionectra byssicola*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2007;71(8):1979-1983.
118. Huberman L, Gollop N, Mumcuoglu KY, Breuer E, Bhusare SR, Shai Y. Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. *Medical and Veterinary Entomology*. 2007;21(2):127-131.
119. Hirano, S., S. Ichikawa, and A. Matsuda, *Design and synthesis of diketopiperazine and acyclic analogs related to the caprazamycins and liposidomycins as potential antibacterial agents*. *Bioorg Med Chem*, 2007.
120. Wojtasek H, Picimbon J-F, Leal WS. Identification and cloning of odorant binding proteins from the scarab beetle *Phyllopertha diversa*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1999;263(3):832-837.
121. Baraka MM. Synthesis of novel 2,4 (1H, 3H)-quinazolinedione derivatives with analgesic and anti-inflammatory activities. *Boll Chim Farm*. 2001;140(2):90-96
122. Villalobosmolina R, Ibarra M, Hong E. THE 5-HT₂ RECEPTOR ANTAGONIST, PELANSERIN, INHIBITS ALPHA(1)-ADRENOCEPTOR-MEDIATED VASOCONSTRICTION IN-VITRO. *European Journal of Pharmacology*. 1995;277(2-3):181-185.
123. Kakuta H, Tanatani A, Nagasawa K, Hashimoto Y. Specific nonpeptide inhibitors of puromycin-sensitive aminopeptidase with a 2,4(1H,3H)-quinazolinedione skeleton. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 2003;51(11):1273-1282.
124. Noji T, Nan-ya K, Mizutani M, et al. KF24345, an adenosine uptake inhibitor, ameliorates the severity and mortality of lethal acute pancreatitis via endogenous adenosine in mice. *European Journal of Pharmacology*. 2002;454(1):85-93.

125. Ellsworth EL, Tran TP, Showalter HDH, et al. 3-aminoquinazolinediones as a new class of antibacterial agents demonstrating excellent antibacterial activity against wild-type and multidrug resistant organisms. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006;49:6435-6438.
126. Tran TP, Ellsworth EL, Sanchez JP, et al. Structure-activity relationships of 3-aminoquinazolinediones, a new class of bacterial type-2 topoisomerase (DNA gyrase and topo IV) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2007;17(5):1312-1320.
127. Lofas S, Johnsson B. A NOVEL HYDROGEL MATRIX ON GOLD SURFACES IN SURFACE-PLASMON RESONANCE SENSORS FOR FAST AND EFFICIENT COVALENT IMMOBILIZATION OF LIGANDS. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*. 1990(21):1526-1528.
128. Yam CM, Pradier CM, Salmain M, Marcus P, Jaouen G. Binding of biotin to gold surfaces functionalized by self-assembled monolayers of cystamine and cysteamine: Combined FT-IRRAS and XPS characterization. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2001;235(1):183-189.
129. Otero TF, Marquez M, Suarez IJ. Polypyrrole: Diffusion coefficients and degradation by overoxidation. *Journal of Physical Chemistry B*. 2004;108(39):15429-15433.
130. Diaz AF, Hall B. MECHANICAL-PROPERTIES OF ELECTROCHEMICALLY PREPARED POLYPYRROLE FILMS. *Ibm Journal of Research and Development*. 1983;27(4):342-347.
131. Salmon M, Diaz A, Goitia J. CHEMICALLY MODIFIED CONDUCTING POLYPYRROLE FILM ELECTRODES. *Acs Symposium Series*. 1982;192:65-70.
132. Descamps E, Leichle T, Corso B, et al. Fabrication of oligonucleotide chips by using parallel cantilever-based electrochemical deposition in picoliter volumes. *Advanced Materials*. 2007;19(14):1816-21.
133. Suraniti E, Tumolo T, Baptista MS, Livache T, Calemczuk R. Construction of hybrid bilayer membrane (HBM) biochips and characterization of the cooperative binding between cytochrome-c and HBM. *Langmuir*. 2007;23(12):6835-6842.
134. Pavlovic E, Quist AP, Gelius U, Nyholm L, Oscarsson S. Generation of thiolsulfonates/thiolsulfonates by electrooxidation of thiols on silicon surfaces for reversible immobilization of molecules. *Langmuir*. 2003;19(10):4217-4221.
135. Livache, T. and F. Lesbre, *Method for producing addressed ligands matrixes on a support*, in **UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE GRANTED PATENT**. 2005.
136. Meulenberg, E., et al., *Immunochemical detection methods for bioactive pollutants*, in **IAEAC**. 2004: Rome.
137. Pau, B., J.-P. Leonetti, and J. Rouby, **NOVEL METHOD FOR SCREENING BACTERIAL TRANSCRIPTION MODULATORS**, in **EUROPEAN PATENT APPLICATION**. 2003.
138. Rouby J, Pugniere M, Mani JC, et al. Characterization of monoclonal antibodies against Escherichia coli core RNA polymerase. *Biochemical Journal*. 2002;361:347-354.
139. Sensi P. HISTORY OF THE DEVELOPMENT OF RIFAMPIN. *Reviews of Infectious Diseases*. 1983;5:S402-S406.
140. Oppolzer W, Prelog V, Sensi P. KONSTITUTION DES RIFAMYCINS B UND VERWANDTER RIFAMYCINE. *Experientia*. 1964;20(6):336-9.
141. Pelizza G, Allievi GC, Gallo GG. SURFACE-ACTIVITY OF DRUGS - OXIMES OF 3-FORMYL RIFAMYCIN SV. *Farmaco-Edizione Scientifica*. 1976;31(1):31-40.

142. Shishoo CJ, Shah SA, Rathod IS, Savale SS, Kotecha JS, Shah PB. Stability of rifampicin in dissolution medium in presence of isoniazid. *International Journal of Pharmaceutics*. 1999;190(1):109-123.
143. Karlson AG, Ulrich JA. STABILITY OF RIFAMPIN IN DIMETHYLSULFOXIDE. *Applied Microbiology*. 1969;18(4):692-3.
144. Lomillo MAA, Renedo OD, Martinez MJA. Resolution of ternary mixtures of rifampicin, isoniazid and pyrazinamide by differential pulse polarography and partial least squares method. *Analytica Chimica Acta*. 2001;449(1-2):167-177.
145. Yao-Dong Liang, Jun-Feng Song, and M. Xu, *Electrochemiluminescence from successive electro- and chemo-oxidation of rifampicin and its application to the determination of rifampicin in pharmaceutical preparations and human urine. Spectrochimica Acta*, 2006.
146. Hahn Y, Shin S. Electrochemical behavior and differential pulse polarographic determination of rifampicin in the pharmaceutical preparations. *Archives of Pharmacol Research*. 2001;24(2):100-104.
147. P. Mailley, T. Livache, and A. Roget, *Conducting polymers for DNA sensors and DNA chips; from fabrication to molecular detection*. Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics - Elsevier Publishing, 2005. **1**: p. 297-344.
148. Szunerits S, Bouffier L, Calemczuk R, et al. Comparison of different strategies on DNA chip fabrication and DNA-sensing: Optical and electrochemical approaches. *Electroanalysis*. 2005;17(22):2001-2017.
149. Inbaraj JJ, Chignell CF. Cytotoxic action of juglone and plumbagin: A mechanistic study using HaCaT keratinocytes. *Chemical Research in Toxicology*. 2004;17(1):55-62.
150. Gomez M, Gonzalez FJ, Gonzalez I. Intra and intermolecular hydrogen bonding effects in the electrochemical reduction of alpha-phenolic-naphthoquinones. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2005;578(2):193-202.
151. Smyth MR, Smyth WF, Palmer RF, Clifford JM. ACID-BASE EQUILIBRIA OF SOME BENZHYDRYL PIPERAZINE DERIVATIVES. *Analytica Chimica Acta*. 1976;86(OCT):185-194.
152. Taguchi M, Yamane Y, Aikawa N, Tsukamoto G. H-1-NUCLEAR MAGNETIC-RESONANCE AND C-13-NUCLEAR MAGNETIC-RESONANCE SPECTRA OF RIFAMPICIN AND 3-[(DIMETHYLHYDRAZONO)METHYL]RIFAMYCIN SV. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 1988;36(10):4157-4161.
153. Maillart E, Brengel-Pesce K, Capela D, et al. Versatile analysis of multiple macromolecular interactions by SPR imaging: application to p53 and DNA interaction. *Oncogene*. 2004;23(32):5543-5550.
154. Nedelkov D. Development of surface plasmon resonance mass spectrometry array platform. *Analytical Chemistry*. 2007;79:5987-5990.
155. Nedelkov D, Nelson RW. Surface plasmon resonance mass spectrometry: recent progress and outlooks. *Trends in Biotechnology*. 2003;21(7):301-305.
156. Parker, H., *Agricultural bioterrorism: a federal strategy to meet the threat*. INSS McNair Papers, 2003(65): p. 113.
157. CDC. *Bioterrorism* <http://www.bt.cdc.gov/bioterrorism/>.
158. Wikipedia - *Biological warfare*, 2005.
159. Zapor M, Fishbain JT. Aerosolized biologic toxins as agents of warfare and terrorism. *Respir Care Clin N Am*. 2004;10(1):111-122.
160. Mora Godoy, I., *Cuba et sa défense de la totalité des droits de l'homme pour tous*, Cuba, Editor. 2004.

161. Audi J, Belson M, Patel M, Schier J, Osterloh J. Ricin poisoning - A comprehensive review. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 2005;294(18):2342-2351.
162. Madsen JM. Toxins as weapons of mass destruction - A comparison and contrast with biological-warfare and chemical-warfare agents. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2001;21(3):593-605.
163. ONU, *Convention on the prohibition of the development, production and stockpiling of bacteriological (biological) and toxin weapons and on their destruction*, 1972.
164. Communauté Européenne, *Communication de la commission au conseil et au parlement européen relative à la coopération dans l'Union européenne concernant la préparation et la réaction aux attaques par des agents biologiques et chimiques*, 2003.
165. DGS, Ministère de la Santé - *Biotox*, 2001 www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/biotox/.
166. Wikipedia. *Ricin commun* http://fr.wikipedia.org/wiki/Ricin_commun.
167. Steeves RM, Denton ME, Barnard FC, Henry A, Lambert JM. Identification of three oligosaccharide binding sites in ricin. *Biochemistry*. 1999;38(36):11677-11685.
168. Amukele TK, Roday S, Schramm VL. Ricin A-chain activity on stem-loop and unstructured DNA substrates. *Biochemistry*. 2005;44(11):4416-4425.
169. Lord JM, Roberts LM, Robertus JD. RICIN - STRUCTURE, MODE OF ACTION, AND SOME CURRENT APPLICATIONS. *Faseb Journal*. 1994;8(2):201-208.
170. Rutenber E, Katzin BJ, Ernst S, et al. CRYSTALLOGRAPHIC REFINEMENT OF RICIN TO 2.5-Å. *Proteins-Structure Function and Genetics*. 1991;10(3):240-250.
171. Fulton RJ, Uhr JW, Vitetta ES. INVIVO THERAPY OF THE BCL1 TUMOR - EFFECT OF IMMUNOTOXIN VALENCY AND DEGLYCOSYLATION OF THE RICIN-A CHAIN. *Cancer Research*. 1988;48(9):2626-2631.
172. Kende M, Yan CH, Hewetson J, Frick MA, Rill WL, Tammariello R. Oral immunization of mice with ricin toxoid vaccine encapsulated in polymeric microspheres against aerosol challenge. *Vaccine*. 2002;20(11-12):1681-1691.
173. Smallshaw JE, Richardson JA, Pincus S, Schindler J, Vitetta ES. Preclinical toxicity and efficacy testing of RiVax, a recombinant protein vaccine against ricin. *Vaccine*. 2005;23(39):4775-4784.
174. Hesselberth JR, Miller D, Robertus J, Ellington AD. In vitro selection of RNA molecules that inhibit the activity of ricin A-chain. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(7):4937-4942.
175. Tanaka KSE, Chen XY, Ishikawa Y, Tyler PC, Furneaux RH, Schramm VL. Ricin A-chain inhibitors resembling the oxacarbenium ion transition state. *Biochemistry*. 2001;40(23):6845-6851.
176. Yan XJ, Hollis T, Svinth M, et al. Structure-based identification of a ricin inhibitor. *Journal of Molecular Biology*. 1997;266(5):1043-1049.
177. Rainey GJA, Young JAT. Antitoxins: Novel strategies to target agents of bioterrorism. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2(9):721-726.
178. Kreitman RJ. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *Aaps Journal*. 2006;8(3):E532-E551.
179. Challoner KR, McCarron MM. CASTOR BEAN INTOXICATION. *Annals of Emergency Medicine*. 1990;19(10):1177-1183.
180. Cook DL, David J, Griffiths GD. Retrospective identification of ricin in animal tissues following administration by pulmonary and oral routes. *Toxicology*. 2006;223(1-2):61-70.
181. INVS, *Guide pour l'investigation épidémiologique - Ricine*, 2001 http://www.invs.sante.fr/publications/guides_biotox/guide_ricine.pdf.
182. Hanson, D, *Ricin toxin: law enforcement's new challenge*, 2007 <http://www.policeandsecuritynews.com/marApr04/RicinToxin.htm>.

183. Vitetta ES, Smallshaw JE, Coleman E, et al. A pilot clinical trial of a recombinant ricin vaccine in normal humans (vol 103, pg 2268, 2006). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(11):4328-4328.
184. Franz, D.R., et al., *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. Textbook of Military Medicine Part I*. 1997, Washington, DC.
185. Ember, L., *Toxin found in senate mail room*, Chem Eng News, 2004. **82(6): p. 11.**
186. Doebler JA, Wiltshire ND, Mayer TW, et al. THE DISTRIBUTION OF [I-125] RICIN IN MICE FOLLOWING AEROSOL INHALATION EXPOSURE. *Toxicology*. 1995;98(1-3):137-149.
187. Roy CJ, Hale M, Hartings JM, Pitt L, Duniho S. Impact of inhalation exposure modality and particle size on the respiratory deposition of ricin in balb/c mice. *Inhalation Toxicology*. 2003;15(6):619-638.
188. Mei Q, Fredrickson CK, Lian W, Jin SG, Fan ZH. Ricin detection by biological signal amplification in a well-in-a-well device. *Analytical Chemistry*. 2006;78(22):7659-7664.
189. Zhao LY, Haslam DB. A quantitative and highly sensitive luciferase-based assay for bacterial toxins that inhibit protein synthesis. *Journal of Medical Microbiology*. 2005;54(11):1023-1030.
190. Brigotti M, Barbieri L, Valbonesi P, Stirpe F, Montanaro L, Sperti S. A rapid and sensitive method to measure the enzymatic activity of ribosome-inactivating proteins. *Nucleic Acids Research*. 1998;26(18):4306-4307.
191. Hines HB, Brueggemann EE, Hale ML. High-performance liquid chromatography-mass selective detection assay for adenine released from a synthetic RNA substrate by ricin A chain. *Analytical Biochemistry*. 2004;330(1):119-122.
192. Zamboni M, Brigotti M, Rambelli F, Montanaro L, Sperti S. HIGH-PRESSURE-LIQUID-CHROMATOGRAPHIC AND FLUORIMETRIC METHODS FOR THE DETERMINATION OF ADENINE RELEASED FROM RIBOSOMES BY RICIN AND GELONIN. *Biochemical Journal*. 1989;259(3):639-643.
193. Becher F, Duriez E, Volland H, Tabet JC, Ezan E. Detection of functional ricin by immunoaffinity and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2007;79(2):659-665.
194. Keener WK, Rivera VR, Young CC, Poli MA. An activity-dependent assay for ricin and related RNA N-glycosidases based on electrochemiluminescence. *Analytical Biochemistry*. 2006;357(2):200-207.
195. Kirby R, Cho EJ, Gehrke B, et al. Aptamer-based sensor arrays for the detection and quantitation of proteins. *Analytical Chemistry*. 2004;76(14):4066-4075.
196. Stine R, Pishko MV. Comparison of glycosphingolipids and antibodies as receptor molecules for ricin detection. *Analytical Chemistry*. 2005;77(9):2882-2888.
197. Gustafson I. Investigating the interaction of the toxin ricin and its B-chain with immobilised glycolipids in supported phospholipid membranes by surface plasmon resonance. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2003;30(1-2):13-24.
198. Garber EAE, Eppley RM, Stack ME, McLaughlin MA, Park DL. Feasibility of immunodiagnostic devices for the detection of ricin, amanitin, and T-2 toxin in food. *Journal of Food Protection*. 2005;68(6):1294-1301.
199. Wang L, Cole KD, Gaigalas AK, Zhang YZ. Fluorescent nanometer microspheres as a reporter for sensitive detection of simulants of biological threats using multiplexed suspension arrays. *Bioconjugate Chemistry*. 2005;16(1):194-199.
200. Guglielmo-Viret V, Spletstoesser W, Thullier P. An immunochromatographic test for the diagnosis of ricin inhalational poisoning. *Clinical Toxicology*. 2007;45(5):505-511.

201. Taitt CR, Anderson GP, Lingerfelt BM, Feldstein MJ, Ligler FS. Nine-analyte detection using an array-based biosensor. *Analytical Chemistry*. 2002;74(23):6114-6120.
202. Dill K, Montgomery DD, Ghindilis AL, Schwarzkopf KR, Ragsdale SR, Oleinikov AV. Immunoassays based on electrochemical detection using microelectrode arrays. *Biosensors & Bioelectronics*. 2004;20(4):736-742.
203. Rubina AY, Dyukova VI, Dementieva EI, et al. Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips. *Analytical Biochemistry*. 2005;340(2):317-329.
204. Poli MA, Rivera VR, Hewetson JF, Merrill GA. DETECTION OF RICIN BY COLORIMETRIC AND CHEMILUMINESCENCE ELISA. *Toxicol*. 1994;32(11):1371-1377.
205. Huelseweh B, Ehricht R, Marschall HJ. A simple and rapid protein array based method for the simultaneous detection of biowarfare agents. *Proteomics*. 2006;6(10):2972-2981.
206. Lubelli C, Chatgililoglu A, Bolognesi A, Strocchi P, Colombatti M, Stirpe F. Detection of ricin and other ribosome-inactivating proteins by an immuno-polymerase chain reaction assay. *Analytical Biochemistry*. 2006;355(1):102-109.
207. Bossi P, Garin D, Guihot A, et al. Bioterrorism: management of major biological agents. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2006;63:2196-2212.
208. Mitchell JS, Wu YQ, Cook CJ, Main L. Sensitivity enhancement of surface plasmon resonance biosensing of small molecules. *Analytical Biochemistry*. 2005;343(1):125-135.
209. Cao C, Sim SJ. Signal enhancement of surface plasmon resonance immunoassay using enzyme precipitation-functionalized gold nanoparticles: A femto molar level measurement of anti-glutamic acid decarboxylase antibody. *Biosensors & Bioelectronics*. 2007;22(9-10):1874-1880.
210. Guglielmo-Viret V, Splettstoesser W, Thullier P. An immunochromatographic test for the diagnosis of ricin inhalational poisoning. *Clinical Toxicology*. 2007;45(5):505-511.
211. Brogan KL, Shin JH, Schoenfish MH. Influence of surfactants and antibody immobilization strategy on reducing nonspecific protein interactions for molecular recognition force microscopy. *Langmuir*. 2004;20(22):9729-9735.
212. Feng MH, Morales AB, Poot A, Beugeling T, Bantjes A. EFFECTS OF TWEEN-20 ON THE DESORPTION OF PROTEINS FROM POLYMER SURFACES. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*. 1995;7(5):415-424.
213. Andersson K, Hamalainen M, Malmqvist M. Identification and optimization of regeneration conditions for affinity-based biosensor assays. A multivariate cocktail approach. *Analytical Chemistry*. 1999;71(13):2475-2481.
214. Lee KH, Su YD, Chen SJ, Tseng FG, Lee GB. Microfluidic systems integrated with two-dimensional surface plasmon resonance phase imaging systems for microarray immunoassay. *Biosensors & Bioelectronics*. 2007;23:466-472.
215. Teramura Y, Iwata H. Label-free immunosensing for alpha-fetoprotein in human plasma using surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry*. 2007;365(2):201-207.
216. Teramura Y, Arima Y, Iwata H. Surface plasmon resonance-based highly sensitive immunosensing for brain natriuretic peptide using nanobeads for signal amplification. *Analytical Biochemistry*. 2006;357(2):208-215.

217. He L, Musick MD, Nicewarner SR, et al. Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of DNA hybridization. *Journal of the American Chemical Society*. 2000;122(38):9071-9077.
218. Hayashida M, Yamaguchi A, Misawa H. High sensitivity and large dynamic range surface plasmon resonance sensing for DNA hybridization using Au-nanoparticle-attached probe DNA. *Japanese Journal of Applied Physics Part 2-Letters & Express Letters*. 2005;44(50-52):L1544-L1546.
219. Li XH, Tamada K, Baba A, Knoll W, Hara M. Estimation of dielectric function of biotin-capped gold nanoparticles via signal enhancement on surface plasmon resonance. *Journal of Physical Chemistry B*. 2006;110:15755-15762.
220. Lubelli C, Chatgililoglu A, Bolognesi A, Strocchi P, Colombatti M, Stirpe F. Detection of ricin and other ribosome-inactivating proteins by an immuno-polymerase chain reaction assay. *Analytical Biochemistry*. 2006;355(1):102-109.
221. Stead, S.L., et al., *Development and validation of SPR biosensor assay for the detection of antibiotics in foods of animal origin and environmental samples*, in IAEC. 2004: Rome.