



HAL
open science

Mesures parallélisées d'interactions oligosaccharides / protéines au moyen de biopuces

Emilie Mercey

► **To cite this version:**

Emilie Mercey. Mesures parallélisées d'interactions oligosaccharides / protéines au moyen de biopuces. Sciences pharmaceutiques. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00011160

HAL Id: tel-00011160

<https://theses.hal.science/tel-00011160>

Submitted on 7 Dec 2005

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 I

Ecole Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement

THESE

Présentée et soutenue publiquement par

Emilie MERCEY

Le 17 Novembre 2005

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : Biotechnologie, Santé et Management

**MESURES PARALLELISEES
D'INTERACTIONS OLIGOSACCHARIDES / PROTEINES
AU MOYEN DE BIOPUCES**

Composition du Jury :

M. Malcolm BUCKLE	Directeur de recherche CNRS – ENS Cachan	Rapporteur
M. Neso SOJIC	Maître de conférences – E.N.S.C.P.Bordeaux	Rapporteur
M. Marco MASCINI	Professeur Università di Firenze	Examineur
M. Alain FAVIER	Professeur UJF Grenoble	Examineur
M. Hugues LORTAT-JACOB	Directeur de recherche CNRS IBS Grenoble	Examineur
Mme Roberta COLLINO	Responsable chargée d'affaires - Thalès	Invité industriel
M. Thierry LIVACHE	Ingénieur CEA Grenoble	Directeur de thèse

Thèse préparée au sein du Groupe Chimie de la Reconnaissance et Etude des Assemblages
Biologiques UMR 5819- Structures et Propriétés des Architectures Moléculaires
Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée- CEA Grenoble.

« La science consiste à oublier ce qu'on croit savoir, et la sagesse à ne pas s'en soucier. » Nodier (Charles)

A ma petite Famille...

Remerciements :

Ce travail a été réalisé au sein du groupe Chimie pour la Reconnaissance et l'Etude des Assemblages Biologiques, au laboratoire SPrAM (UMR 5819), au département de la recherche fondamentale sur la matière condensée au CEA Grenoble et avec la collaboration du laboratoire d'Enzymologie Moléculaire de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble et du laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique d'Orsay.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du Jury M. Alain FAVIER, M. Marco MASCINI et M^{me} Roberta COLLINO d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse, ainsi que M. Neso SOJIC et M. Malcolm BUCKLE qui ont en plus accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Que ces personnes sachent qu'elles ont toute ma reconnaissance.

Mon travail de thèse a été effectué sous la direction de Thierry Livache et de André Roget, que je tiens à remercier sincèrement pour leur encadrement. Soyez assurés tous deux de ma vive reconnaissance, car vous m'avez permis de réaliser cette thèse pluridisciplinaire à vos côtés. Vous m'avez donné cette chance. Une pensée toute particulière pour André, qui, malgré son départ du labo pour d'autres horizons, a accepté de relire mon manuscrit d'un œil averti et a toujours trouvé les mots pour me calmer, me rassurer...

Cette thèse n'aurait pu aboutir sans l'aide précieuse, les conseils avisés et les discussions lors de mes manips de couplage à l'IBS avec Rabia Sadir et Hugues Lortat-Jacob. Je garde un grand souvenir de votre accueil toujours aussi chaleureux...

Je remercie Yves Lévy de m'avoir accueillie dans son laboratoire à Orsay, pour mes premières expériences en SPRi. Mais il ne faut pas non plus oublier Emmanuel Maillart, ancien thésard de l'Institut d'Optique, mon acolyte lors ma 1^{ere} année de thèse ; combien d'heures à rester enfermés au 2^e deuxième sous-sol, si glauque et si noir, en souhaitant que nos manips marchent sans bulles ou autres désagréments.

Je tiens à remercier Jean-Jacques Allegrau, pour sa collaboration, lors des manips au MEB, pour caractérisation de tous les plots et aussi Mathieu Monville et Frédéric Chandézou, de m'avoir accueillie pour les manips AFM.

Un grand merci à Colette Lebrun du SCIB pour avoir bien voulu passer tous mes échantillons en spectroscopie de masse.

J'associe à ce témoignage tous les membres permanents du CREAB et du LEMOH (anciennement GEM) qui m'ont permis d'avancer jour après jour dans cette thèse, que ce soit scientifiquement ou humainement ; je pense ainsi à : Alexandre Thaumoux (toujours là pour réparer nos petits problèmes info, désolée si je n'ai pas été toujours très attentive), Pascal Mailley (gérant du café), Bernadette Divisia-Blohorn (toujours des mots gentils), Martial Billon (si gentil, chose rare), Stéphane Guillerez (le grand sportif), Roberto Calemczuk (toujours plein d'idées et de questions) et à tous ceux que j'oublie et qui ont de près ou de loin permis l'aboutissement de ce travail.

Mes remerciements vont également aux « non-permanents » du labo avec une mention spéciale pour JB Fiche (mon « faux jumeau », toujours là pour moi, dans les bons ou mauvais moments) et aussi pour Manu Suraniti (Ma « patte de lapin » préférée...). Je n'oublie pas non plus Elodie Fortin à qui j'adresse toutes mes félicitations pour son courage et pour son prochain mariage et avec qui j'étais embarquée dans la même galère durant ces trois ans. Une pensée amicale à Solenn (bon courage pour assurer la relève...).

Merci à Mike pour avoir été toujours là pour moi, lors de péripéties bonnes ou mauvaises, (un deuxième grand frère, mais qu'est-ce que je vais devenir ?) et à Nicolas Charvet dont je regrette le trop rapide départ du labo.

Durant ces trois années, j'ai aussi rencontré des personnes vraiment sympathiques ; mon quotidien s'est déroulé notamment aux sons des plaisanteries de Bruno (et oui, je suis Zoubida !), de la musique (de « ouf » parfois) de Yann et au rythme des pauses-café entre « jeunes » de différents labos (Christophe, Violaine, Eirini, Laurent, ... = les vrais moments de détente).

Je tiens aussi à saluer mes cop's de la troupe de danse, et en particulier ma petite Pauline (merci d'être comme tu es, ne change pas !).

Je souhaite aussi remercier mes amis Parisiens qui me sont toujours fidèles malgré ma désertion pour Grenoble : merci à Eric, Laurent L, Nicolas, Laurent C, Nadia, Emilie, Danielle et j'en oublie. Maintenant c'est à votre tour de vivre la troisième année de thèse avec les joies de la rédaction...

Il y a une personne que je tiens tout particulièrement à remercier : c'est Alexandre, il a toujours été présent, attentionné, patient et a su supporter mes états de stress...

Et pour finir une pensée particulière à mes parents et à mon grand frère (merci pour la relecture si attentive...), pour votre soutien sans relâche, votre écoute et votre amour...

SOMMAIRE

<u>Liste des abréviations :</u>	15
--	----

<u>Introduction</u>	17
----------------------------------	----

<u>CHAPITRE I : CHAPITRE BIBLIOGRAPHIE : LES PUCES A SUCRES : UN OUTIL POUR LA MESURE D'INTERACTIONS SUCRES - PROTEINES</u>	19
--	----

1. INTRODUCTION :	21
-------------------	----

2. LA FABRICATION DES « PUCES A SUCRES »	23
--	----

2.1. Les sucres sources pour la fabrication des puces.....	24
--	----

2.1.1. Les sucres synthétiques ou biosynthétiques.....	24
--	----

2.1.2. Les sucres issus de sources naturelles	26
---	----

2.2. La fonctionnalisation des surfaces.....	26
--	----

2.2.1. Les premiers systèmes de mesures d'interactions sucre - protéine : Immobilisation grâce au système biotine / streptavidine	27
--	----

2.2.2. Premier support permettant une immobilisation covalente de sucres : le dextran	30
---	----

2.2.3. Les puces à polysaccharides	31
--	----

a) Immobilisation non covalente de sucres sur membrane de nitrocellulose	31
--	----

b) Immobilisation non covalente de sucres sur une surface de polystyrène.....	31
---	----

2.2.4. Immobilisation non covalente d'oligosaccharides sur support	32
--	----

a) Création d'un néoglycolipide à immobiliser	32
---	----

b) Fixation sur microplaques en polystyrène	33
---	----

c) Fixation sur surface de verre fonctionnalisée par des phosphanes	35
---	----

2.2.5. Fixation covalente d'oligosaccharides sur support	36
--	----

a) Immobilisation de sucres-maléimides sur support de verre thiolé.....	36
---	----

b) Les travaux de Mrksich : construction de monocouches auto-assemblées	37
---	----

c) Oligosaccharide fonctionnalisé par un phospholipide	39
--	----

d) Le développement des monocouches auto-assemblées	40
---	----

e) Immobilisation par pont disulfure	40
--	----

f) Fonctionnalisation par la réaction Oligosaccharide - thiol sur support maléimide : trois exemples de supports différents	42
--	----

f.1) Sur fibre optique	42
------------------------------	----

f.2) Utilisation de monocouches auto-assemblées.....	43
--	----

f.3) Support protéique BSA	44
----------------------------------	----

g) Glycochip, produit de Glycominds.....	44
2.3. Les systèmes de dépôt des saccharides sur un support.....	45
2.4. Récapitulatif des différents moyens de fonctionnalisation d'une surface par un sucre :.....	46

3. LES DIFFERENTS MOYENS D'ETUDE DES INTERACTIONS BIOLOGIQUES SUR LES PUCES A SUCRES.....	48
---	----

3.1. Les détections des interactions sucre - protéine utilisant un traceur	49
3.1.1. Les techniques directes de détection avec marqueurs :	50
3.1.2. Les techniques indirectes de détection avec marqueurs	52
3.2. Les techniques optiques de détection sans traceurs.....	54
3.2.1. Introduction au phénomène optique : l'onde évanescente.....	55
3.2.2. Le procédé IAsys	56
a) Le guide d'onde.....	57
b) Miroir résonant.....	57
3.2.3. La résonance des Plasmons de Surface (la SPR)	60
a) Historique de la résonance des plasmons de surface :	60
b) Théorie de la SPR :	61
3.2.4. Procédé Biacore	63
3.2.5. Applications de la technique SPR : Montages utilisés pour la mesure d'interactions sucres - protéines	64
3.3. Conclusion	65

4. LES SUCRES : LES GLYCOSAMINOGLYCANES SULFATES.....	67
---	----

4.1. Les Glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs).....	68
4.2. Les Héparanes sulfates.....	70
4.2.1. Biosynthèse de l'héparine et des héparanes sulfates	71
4.2.2. Structures chimiques de l'héparine et de l'héparane sulfate.....	72
4.3. Réactivité de l'héparine et des héparanes sulfates avec les protéines.....	75
4.4. Principales interactions étudiées entre HP/HS et des protéines	75
4.4.1. Régulation des protéases et des estérases	75
4.4.2. Interactions avec des molécules du système extracellulaire	76
a) Interactions avec les facteurs de croissance	76
b) Interactions avec les chimiokines.....	77
4.4.3. Interactions avec des protéines se liant aux lipides et aux membranes	78
4.4.4. Héparanes sulfates : récepteurs à agents pathogènes.....	78

4.4.5. Interactions avec les protéines d'adhésion.....	79
4.4.6. Enzymes dégradant les HP/HS	79
4.4.7. Nouvelles applications cliniques de ces sucres	80
4.5. Les moyens mis en œuvre pour l'étude des interactions HP/ HS avec les protéines	81
4.6. Conclusion	83
5. CONCLUSION	84

CHAPITRE II : DEVELOPPEMENT D'UNE PUCE A OLIGOSACCHARIDES..... 85

1. ETAT DE L'ART : LES BIOPUCES DEVELOPPEES AU LABORATOIRE	87
1.1. <i>Choix du polypyrrole</i>	88
1.1.1. Un polymère conducteur électronique : le polypyrrole	88
1.1.2. Electrosynthèse du polymère	89
1.1.3. Couplage.....	92
1.1.4. Structuration en plots.....	93
1.1.5. Avantages	94
1.2. <i>Conception de la puce à oligosaccharides</i>	95
1.2.1. Paramètres et étapes de conception de la puce.....	96
1) Le choix du support :	97
2) Choix du polymère sur lequel sera immobilisé l'oligosaccharide:.....	98
3) Préparation de l'oligosaccharide « sonde » :	98
4) Technique d'immobilisation : Electrospotting :	99
5) Techniques de détection : la Fluorescence et l'imagerie SPR :	100
1.2.2. Choix du modèle biologique.....	100
2. PREPARATION DE LA MOLECULE SONDE « SUCRE ».....	101
2.1. <i>Synthèse des « bras espaceurs – pyrrole »</i>	102
2.1.1. Choix des fonctions terminales	102
2.1.2. Les différents « bras espaceurs - pyrrole » synthétisés.....	103
a) Synthèse des monomères pyrrole - hydrazides :	104
a.1. Synthèse des pyrroles acides	105
a.2. Synthèse des pyrrole - esters activés.....	106
a.3. Synthèse des pyrroles - hydrazides	106
a.3.1. Formation du produit V , le pyrrole-[10]-hydrazide : PUH	106

a.3.2. Formation des produits VI et VII : le pyrrole-[5]-adipate-hydrazide PCAH et le pyrrole-[10]-adipate-hydrazide PUAH	107
b) Synthèse du monomère « pyrrole - amine », produit IX.....	107
c) Synthèse du monomère « pyrrole - maléimide »	108
c.1. Synthèse du composé X : l'acide maléamique N-substitué.....	109
c.2. Synthèse de l'ester activé du maléimide : produit XI	109
c.3. Fonctionnalisation du pyrrole-[13]-amine = produit XII	110
2.1.3. Propriétés des bras espaceurs.....	110
2.2. <i>Couplages entre l'oligosaccharide et les « bras espaceurs – pyrrole »</i>	111
2.2.1. Estimations des rendements de couplage	112
a) Détermination de la quantité d'oligosaccharides.....	113
b) Estimation qualitative de la pyrrolylation des oligosaccharides	113
c) Détermination de la quantité de pyrrole.....	114
2.2.2. Stratégie I : Couplage direct « pyrrole – bras espaceur » / Sucre	115
a) Couplage direct avec les « pyrrole-hydrazide »	115
a.1. Couplage en solution des « pyrrole-hydrazide » sur les oligosaccharides.	115
a.2. Couplage sur support des « pyrrole - hydrazide » sur les oligosaccharides	117
a.3. Couplage direct des « pyrrole-amine » sur le sucre HP6	118
a.4. Couplage direct du « pyrrole - maléimide » sur l'oligosaccharide thiolé.....	119
b) Couplage séquentiel avec les « pyrrole - hydrazide »	120
2.2.3. Bilan sur les différents couplages effectués.....	121
a) Problèmes rencontrés	121
b) Séparation par Chromatographie en phase liquide	122
2.3. <i>Immobilisation de la molécule « sonde » : Technique de l'Electrospotting</i>	124
2.4. <i>Caractérisations structurales des films polymère formés</i>	127
2.4.1. La Microscopie Electronique à Balayage (MEB)	127
a) Description simple du principe.....	127
b) Résultats obtenus	129
2.4.2. Caractérisation complémentaire au MEB : l'AFM	133
a) Son principe	133
b) résultats obtenus et comparaison avec la littérature	134
3. MISE AU POINT ANALYTIQUE	140
3.1. <i>Interactions sucre HP6–protéine SDF-1 révélée par microscopie de fluorescence</i> 140	
3.1.1. Principe du microscope à épifluorescence.....	141
3.1.2. Première détection de l'interaction biologique modèle.....	142
3.1.3. Optimisation des paramètres pour la détection en fluorescence	146

3.1.4. La fluorescence : un moyen de valider la purification des oligosaccharides par HPLC	149
3.1.5. Bilan	153
3.2. <i>Interactions sucre HP6 – protéine SDF-1 suivies par imagerie SPR</i>	153
3.2.1. Présentation du système d'imagerie SPR	153
a) Montage optique	153
b) Fluidique	155
b.1. La pompe	156
b.2. Injection des échantillons	156
b.3. Cellules d'interactions	157
3.2.2. Spécificité / comparaison avec la détection par fluorescence	159
3.2.3. Optimisation des tampons utilisés	164
3.2.4. Régénération et Stabilité	167
3.2.5. Optimisation de la fluidique	167
a) Influence du débit et de la forme de la cuve	168
b) Rôle de la boucle d'injection	171
4. CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES	173
4.1. <i>Sensibilité de l'interaction oligosaccharide HP6 – protéine SDF-1</i>	173
4.2. <i>Etude de la dissociation du complexe HP6 / SDF-1</i>	176
4.3. <i>Comparaison des bras espaceurs utilisés grâce à deux oligosaccharides HP6 et dp12</i>	177
5. BILAN	180
CHAPITRE III :APPLICATIONS BIOLOGIQUES	181
1. INFLUENCE DE LA LONGUEUR DE LA CHAÎNE OLIGOSACCHARIDIQUE DANS LA RECONNAISSANCE BIOLOGIQUE	183
1.1. <i>Etat de l'art</i>	183
1.2. <i>Etude de l'influence de la longueur de chaîne de sucre</i>	185
1.2.1. Couplage « pyrrole –oligosaccharide »	186
1.2.2. résultats obtenus par imagerie SPR	186
1.3. <i>Bilan</i>	189
2. EXTENSION DE L'USAGE DE LA PUCE DEVELOPPEE A L'ETUDE DE DIFFERENTS OLIGOSACCHARIDES DE LA FAMILLE DES GAGs	190

2.1. Couplage des oligosaccharides aux « pyrrole – bras espaceurs ».....	191
2.2. Premiers résultats	192
2.3. Etudes de sensibilité.....	195
2.3.2. Etude de l'interaction entre IgM anti-CS et CS	196
2.4. Bilan	198
3. AUTRES DEVELOPPEMENTS.....	198

CONCLUSION..... 201

PARTIE EXPERIMENTALE..... 203

1. MATERIELS.....	205
1.1. Produits	205
1.1.1. Synthèses chimiques.....	205
1.1.2. Modifications biochimiques.....	205
1.1.3. Détections	205
1.2. Matériels.....	206
1.2.1. Chimie – “construction de la molécule sucre-sonde”	206
1.2.2. Fabrication de la puce et caractérisations	206
1.3. Fabrication des différents tampons.....	207
2. METHODES	207
2.1. Synthèses organiques	207
2.1.1. Synthèses des monomères « pyrrole- hydrazides ».....	207
a) Synthèses des pyrrole-acides.....	207
a.1. Acide 5-pyrrolyl-caproïque PC-COOH (produit I) :.....	207
a.2. Acide 10-pyrrolyl-undécanoïque PU-COOH (produit II):	208
b) Synthèse des pyrrole-esters activés	208
b.1. Pyrrole-[6]- N-hydroxysuccinimide : PC-NHS (produit III) :	208
b.2. Pyrrole-[11]- N-hydroxysuccinimide : PU-NHS (produit IV):	209
c) Synthèse des pyrrole-Hydrazides	209
c.1. Pyrrole Undecanoyl Hydrazide : PUH (produit V).....	209
c.2. Pyrrole Caproyl Adipate Hydrazide : PCAH (produit VI)	210
c.3. Pyrrole Undecanoyl Adipate Hydrazide : PUAH (produit VII)	211
2.1.2. Synthèse du pyrrole-amine	211
a) pyrrole-trioxatridecane-acétamide (produit VIII):.....	211

b) pyrrole-trioxatridecane-amine, produit IX : Déprotection de l'acétylamino-pyrrole	212
2.1.3. Synthèse du pyrrole-maléimide	212
a) Acide maléamique N-substitué produit X:.....	212
b) Ester activé du Maléimide Produit XI:	213
c) Pyrrole-trioxatridecane-maléimide produit XII:.....	213
2.2. <i>Obtention d'oligosaccharides à partir de l'Héparine HP6</i>	214
2.2.1. Préparation d'oligosaccharides d'héparine.....	214
2.2.2. Préparation d'oligosaccharides dp12 thiolés : couplage de la cystamine	214
2.3. <i>Couplage entre les « Bras espaceur - pyrrole » synthétisés et l'oligosaccharide..</i>	215
2.3.1. Stratégie I : Couplages directs	215
a) Réaction de couplage 1 : Couplage par réaction entre l'hydrazide et l'aldéhyde.....	215
b) Réaction de couplage 2 : Couplage par réaction entre l'amine et l'aldéhyde = Amination réductrice.....	216
c) Réaction de couplage 3 : Couplage par réaction entre le maléimide et le thiol greffé sur l'oligosaccharide	216
2.3.2. Stratégie II : couplage séquentiel du bras espaceur-sucre	217
a) Première réaction de couplage.....	217
b) Deuxième réaction de couplage	217
2.3.3. Couplage sur billes (couplage direct).....	218
2.3. <i>Quantification du pyrrole et dosage de l'acide uronique du sucre</i>	218
2.3.1. Dosage du couplage par la biotine-LC-Hydrazine	218
2.3.2. Dosage de l'acide uronique du sucre.....	219
2.3.3. Détermination de la quantité de pyrroles couplés aux sucres	219
2.3.4. Purification par HPLC.....	220
2.4. <i>Synthèse électrochimique du polypyrrole fonctionnalisé : Electrospeaking</i>	220
2.5. <i>Phase de détection en fluorescence</i>	221
2.6. <i>Phase de détection, en SPR (résonance de plasmons de surface)</i>	222

Liste des Abréviations :

ADN : Acide désoxyribonucléique
AFM : *Atomic force microscope* - microscope à force atomique
AT-III : Antithrombine III
BSA : Sérum Albumine Bovine
CCM : Chromatographie sur couche mince
CO₂⁻ : Groupements carboxylates
CS : Chondroïtine Sulfate
CXC, CC, C et CX₃C : Cystéines proches du domaine N-terminal d'une protéine séparées ou non par X, des acides aminés quelconques.
Cy-5 : Fluorochrome
DCC : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DMAB : (Diméthylamino)-benzaldéhyde
DMF : Diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde
dp " x " : Degré de polymérisation, x représentant le nombre de disaccharides constituant la chaîne.
DS : Dermatane Sulfate
DTT : Dithio-DL-threitol
ELISA : *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*, test immunologique destiné à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique.
FGFs : *Fibroblast growth factor* = facteurs de croissance
FGFRs : Récepteurs de facteurs de croissance
FRET : Fluorescence par transfert d'énergie
GAG : Glycosaminoglycanes sulfatés
Gal : Galactose
GalNAc : Galactosamine N-acétylée
GlcA : Acide glucuronique
GlcNAc : N-acétyl-glucosamine
GlcNS : N-sulfo-glucosamine
GPI : Glycosylphosphatidylinositol
HEPES : Tampon fait avec l'Acide (N-[2-hydroxyéthyl]-piperazine-N'-[2-éthane]-sulfonique
HexA : Acide hexuronique
HP : Héparine
HP6 : Héparine de 6 kDa, commerciale
HPLC : Chromatographie haute pression en phase liquide
HS : Héparane sulfate
HSV : Virus herpex simplex
IC₅₀ : *Inhibitory concentration 50 %*, concentration requise pour avoir 50 % d'inhibition.
IdoA : Acide L-iduronique
IFN γ : Interféron gamma
IgG : Immunoglobuline de type G, composant majoritaire des anticorps
IgM : Immunoglobuline de type M
ITC : *Isothermal titration Calorimetry* ou microcalorimétrie
K_a : Constante d'association
kDa : 10³ Dalton
K_d : Constante de dissociation
KS : Keratane sulfate

MEB : Microscope à balayage électronique
MUAM : 11-Mercaptoundécylamine
NA : Domaines sur les HP / HS fortement acétylés
NGL : néoglycolipide
NHS : N-hydroxysuccinimide
NS : Domaines sur les HP / HS fortement sulfatés
PAMAM : Polyamidoamine
PF-4 : Facteur plaquettaire 4
PC-COOH : Acide 5-pyrrolyl-caproïque
PC-NHS : Pyrrole-caproyl-N-hydrosuccinimide
PCAH : Pyrrole caproyl adipate hydrazide
PDMS : Poly-(diméthylsiloxane)
POPC : Phosphatidylcholine
PVDF : Polyfluore de vinylidène
PU-COOH : Acide 10-pyrrolyl undécanoïque
PU-NHS : Pyrrole-undécanoyl-N-hydrosuccinimide
PUAH : Pyrrole undécanoyl adipate hydrazide
PUH : Pyrrole undécanoyl hydrazide
Py~maléimide : Pyrrole-trioxatridecane-maléimide
Py~NH₂ : Pyrrole-trioxatridecane-amine
RANTES : Chimiochine de la famille CC, *Regulated on Secretion normal T-cell expressed and secreted*.
RMI : Ratio molaire initial
RMN : Résonance magnétique nucléaire
RU : Unités de résonance utilisés dans les appareils Biacore
SDF-1 : Stromal cell-derived factor 1
Ser : Acide aminé Sérine
SLe^x : Sucre Sialyl Lewis X
SO₃⁻ : groupements sulfates
SPR : *Surface plasmon resonance*, résonance des plasmons de surface
TE : Transversale électrique
Tp : Tampon
TM : transversale magnétique
THF : Tétrahydrofurane
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine (SIDA)
Xyl : Xylose

Introduction

Les progrès enregistrés dans la connaissance du génome humain au cours des deux décennies écoulées ont rendu possibles, parmi de nombreuses autres retombées, l'analyse d'un nombre toujours croissant de gènes. Parallèlement, le domaine de la protéomique, qui est l'étude de l'ensemble des protéines fabriquées par les gènes, a émergé. Compte tenu du grand nombre de fonctionnalités qui vont devoir être criblées, le défi technologique récemment relevé est considérable, puisqu'il s'agit de substituer à des techniques du type "un test par protéine étudiée" telles que les analyses ELISA, des méthodes efficaces permettant le criblage à grande échelle des variations individuelles. Des outils tels que les puces à protéines (pour revue : ¹) et les procédés à haut débit ont ainsi émergé.

Plus récemment, un champ d'étude s'est ouvert dans le domaine de la « glycomique », c'est-à-dire l'étude systématique des interactions sucres / protéines². En effet, il a été montré que les sucres, outre leurs fonctions classiques structurales (cellulose...) ou énergétiques (amidon...) sont très impliqués dans des phénomènes de reconnaissances biologiques très fines ; on peut citer par exemple leurs rôles dans les modifications post-traductionnelles des protéines (glycosylation) qui leur apportent de nouvelles propriétés dans le domaine de l'immunologie ou, plus généralement, dans les processus de reconnaissance, d'adhésion ou de transfert d'informations entre des cellules³: ils sont impliqués par exemple dans la reconnaissance de chimiokines lors de la réponse inflammatoire ou dans le mécanisme d'entrée de certains virus dans la cellule (comme le HIV ou l'Herpes simplex). Chimiquement, ces sucres (ou poly / oligo saccharides) sont des polymères très complexes, qui peuvent être d'origine naturelle (et éventuellement fractionnés) ou d'origine synthétique lorsqu'ils sont suffisamment simples et courts. Les méthodes d'études d'interactions entre ce type de molécules et par exemple des protéines sont relativement limitées.

Afin d'obtenir une analyse systématique des interactions sucres / protéines, une approche a été testée consistant à fixer un certain nombre de polysaccharides différents sur une surface sous forme de plots (ou spots) puis à conduire l'interaction avec une protéine sur l'ensemble de la dite surface. Ces systèmes ont été nommés "carbohydate array"^{4, 5} ou "oligosaccharide array", puisqu'il s'agit de l'évolution du concept de puces à protéines ou à ADN vers l'analyse parallélisée d'interactions entre des sucres et d'autres composés ; on peut

appeler au sens général ces objets des puces à sucres, et dans ce cas, les sucres sont les sondes liées à la surface du substrat⁶.

Sur un plan plus général, ces techniques multiparamétriques constituent un apport important à la biologie moléculaire. En revanche, il reste souvent nécessaire de marquer les molécules cibles par un traceur fluorescent ou de les associer à un système enzymatique afin de pouvoir les détecter. Ce marquage rajoute une étape au procédé et permet difficilement de suivre la réaction en temps réel ; même si le suivi en temps réel est possible, la mesure d'interactions sera effectuée avec une molécule marquée, ce qui peut induire des différences notables de comportement.

Le système de puces à sucres que nous proposons, but du projet, associe une chimie du pyrrole et un procédé de détection faisant intervenir l'imagerie de la résonance des plasmons de surface (SPRi). Elle permet d'acquérir, en parallèle, sur chaque plot, la réponse cinétique des interactions biologiques mesurées, et de surcroît, sans avoir recours à des marqueurs. Bien sûr, la réalisation de tels systèmes, de plus en plus perfectionnés et possédant des fonctionnalités multiples, nécessite la contribution d'acteurs d'origines différentes, conférant au projet un caractère pluridisciplinaire. Les différentes disciplines complémentaires mises en jeu sont entre autres : chimie, biochimie, biologie, informatique, électronique, mécanique et optique.

Nous nous efforcerons, à partir des connaissances et compétences du laboratoire en matière de puces à ADN, de concevoir un procédé de fabrication de puces à sucres et de le valider afin d'être utilisable de manière plus générale.

Ce travail s'articulera autour des points suivants : nous étudierons, tout d'abord, dans le chapitre bibliographique, les différents modes de fixation de sucres sur une surface et les procédés de détection utilisés sur ces puces.

Après avoir décrit les sucres utilisés pour nos puces, nous nous intéresserons, dans le deuxième chapitre, à la fabrication de la puce : la modification de la molécule « sucre sonde » et son dépôt sur une surface. Nous étudierons enfin les interactions biologiques suivies par imagerie SPR.

Pour finir, nous nous attacherons, dans le troisième chapitre, à illustrer les possibilités d'applications d'une telle puce à sucres dans des problématiques plus concrètes.

Chapitre I :
Chapitre BIBLIOGRAPHIE :

Les puces à sucres :
Un outil pour la mesure
d'interactions sucres -
protéines

1. Introduction :

Les sucres, également appelés hydrates de carbone sont composés d'atomes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène (figure 1) ; ils sont nommés monosaccharides, disaccharides, *etc.*, selon le nombre d'unités de sucre qu'ils contiennent. Les oligosaccharides sont constitués de chaînes plus longues, les molécules les plus longues étant des polysaccharides. Enfin, les associations d'hydrates de carbone et de protéines, de lipides ou de petites molécules sont des glycoconjugués, plus précisément des glycoprotéines ou des glycolipides⁷.

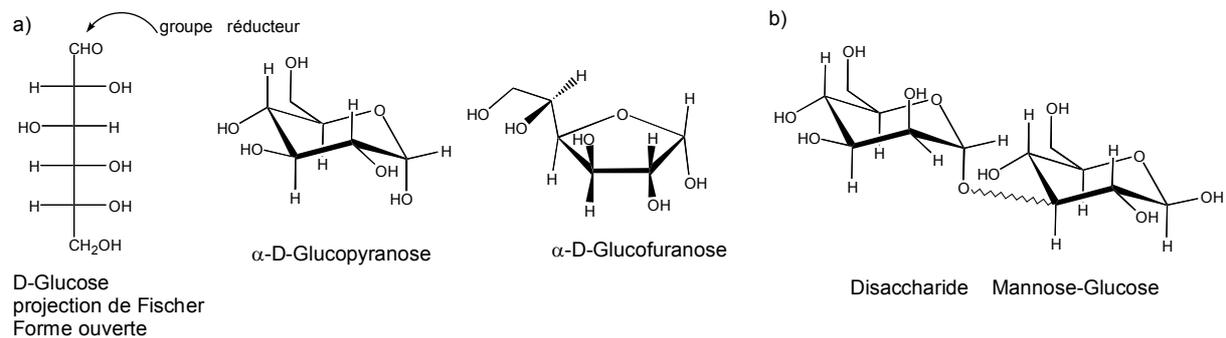


Figure 1: a) Exemple d'un monosaccharide, le D-Glucose, sous forme ouverte, forme pyranose (cycle à 6 atomes) et forme furanose (cycle à 5 atomes); b) exemple d'un disaccharide constitué d'un monomère mannose et d'un glucose.

La recherche sur les sucres s'est heurtée à l'absence d'outils permettant de déchiffrer la structure des molécules complexes et de synthétiser les sucres de façon reproductible et en quantité suffisante. Les sucres ont des structures bien plus compliquées que celles des chaînes d'ADN et des protéines. Les 4 nucléotides qui constituent l'ADN et les 20 acides aminés que contiennent les protéines sont associés les uns aux autres, telles des perles sur un fil ; en outre, ils sont toujours reliés par la même liaison chimique. Au contraire, les quelques dix sucres simples que l'on retrouve dans les hydrates de carbone des mammifères se lient les uns aux autres en des points différents et constituent des structures aux ramifications complexes. Les 4 nucléotides de l'alphabet de l'ADN peuvent être combinés et former 256 structures différentes de tétranucléotides, et les 20 acides aminés des protéines mènent à environ 16000 tétrapeptides. En revanche, les sucres les plus simples de l'organisme peuvent s'assembler sous plus de 15 millions de tétrasaccharides. Même si toutes ces combinaisons n'existent pas dans la nature, le nombre de possibilités est considérable.

Le développement des technologies liées aux puces à ADN a permis une avancée notable des programmes liés à la génomique fonctionnelle. En effet, la miniaturisation des techniques de dépôt ou de synthèse d'ADN a conduit à la réalisation d'analyses parallélisées, donc multiparamétriques, d'ADN sur les puces⁸. Plus récemment, l'émergence de la protéomique a donné naissance au concept de puces à protéines, qui permettent l'analyse parallélisée d'interactions de types protéines / protéines ou plus généralement protéines / ligands.

Parallèlement à ces développements, le champ d'étude de la « glycomique » s'est largement développée ; mais les études d'interactions sont réalisées une par une, et les moyens d'études restent assez limités (fluorescence, électrophorèse). Alors l'idée de développer de nouveaux systèmes inspirés des techniques des puces à protéines ou à ADN, afin d'obtenir des études plus systématiques de reconnaissance sucre/protéine, a vu le jour. Ces systèmes permettent de déposer un certain nombre de sucres différents sur une surface et de conduire l'interaction avec une protéine sur l'ensemble de la surface.

Les particularités chimiques des sucres généreront des contraintes spécifiques lors de l'adaptation des technologies développées pour les puces à ADN. Nous analyserons dans ce chapitre les solutions proposées pour d'une part fabriquer des « puces à sucres » et d'autre part les moyens de détection associés. Nous décrirons dans une dernière partie la famille d'oligosaccharides étudiés dans ce travail.

2. La Fabrication des « puces à sucres »

Les sucres sont les composants clés des glycolipides et des glycoprotéines se trouvant sur la membrane cellulaire et participant à des processus tels que la reconnaissance, l'adhésion et les signaux entre cellules. Ces phénomènes sont nécessaires pour la croissance et la réparation tissulaire, les invasions virales et bactériennes d'organismes pathogènes⁹. Une meilleure compréhension des interactions sucres / protéines pourrait aider de façon notable dans l'élucidation des mécanismes de signalisation inter-cellulaire, pouvant aussi mener à une amélioration des diagnostics et au développement d'outils thérapeutiques^{10,11}.

Les puces à ADN ainsi que les puces à protéines, préparées par une immobilisation de ces biomolécules sur une surface avec une localisation précise, ont permis de mettre en œuvre une méthodologie à faible coût pour le criblage d'interactions impliquant ces molécules.

Les sucres sont par nature des structures chimiquement complexes ; c'est pour cela que les approches conventionnelles pour étudier les interactions sucres - ligands ne suffisent plus. Les techniques de puces, analogues à celles développées pour l'ADN¹² et celles développées pour les protéines¹³ s'avèrent être un complément utile pour pallier à ce besoin.

Pour véritablement assigner une séquence oligosaccharidique à une reconnaissance de protéines, il est nécessaire d'avoir des séquences oligosaccharidiques connues purifiées. Comme les techniques modernes analogues à celles de la biologie moléculaire et à l'expression de protéines recombinantes ne sont pas applicables pour générer des oligosaccharides, de multiples stratégies ont été mises au point pour obtenir des sucres utilisables sur puces, soit par des approches de synthèse (chimiques ou enzymatiques)¹⁴ soit par purification de sources naturelles. Parmi les autres aspects à prendre en considération lors de la réalisation de puces, il y a la nature du support solide, les moyens de fixer les sucres à la surface (covalent ou non covalent) et les méthodes analytiques de détection, permettant la caractérisation des oligosaccharides immobilisés.

Ici, nous allons brièvement résumer les différents moyens d'obtention de sucres avant de décrire les développements réalisés dans le domaine émergent des puces à oligosaccharides.

2.1. Les sucres sources pour la fabrication des puces

Contrairement aux oligonucléotides et aux protéines, les oligosaccharides sont difficiles à obtenir par des synthèses chimiques. Cette difficulté est liée à leur structure complexe : d'une part, les chaînes peuvent être linéaires ou ramifiées, et d'autre part, les blocs monosaccharides ont des configurations anomériques α ou β et les monosaccharides adjacents peuvent se lier par différents atomes. Pour ces raisons, de multiples étapes de protection et déprotection sélectives sont nécessaires sur les groupes hydroxyles des monosaccharides pendant la synthèse chimique ; la synthèse « manuelle » d'oligosaccharides reste la technique la plus pratiquée. Néanmoins, malgré les difficultés rencontrées, les synthèses d'un nombre considérable d'oligosaccharides complexes ont été réalisées [pour exemple :¹⁵] et les produits obtenus ont été extrêmement utiles dans les études sur la spécificité de reconnaissance avec des anticorps et d'autres protéines interagissant avec les sucres.

2.1.1. Les sucres synthétiques ou biosynthétiques

L'application de la chimie combinatoire à la synthèse des collections de composés sucrés a reçu beaucoup d'attention depuis quelques années. Cette approche est en fait dérivée de la synthèse automatisée d'ADN¹⁶ mais aussi de peptides¹⁷. Ainsi de nouvelles stratégies pour l'obtention de bibliothèques d'oligosaccharides par synthèse en phase liquide sont apparues, et l'utilisation de monosaccharides comme briques de synthèse dans la génération de bibliothèques d'oligosaccharides a été décrite¹⁸.

Parallèlement, le développement de la synthèse automatique de sucres a considérablement accéléré la production en quantité de composés bien définis pour les études biologiques^{19, 20} (figure 2a).

L'approche de synthèse en phase solide a l'avantage d'éviter l'isolement des produits intermédiaires et les différentes étapes de purification²¹ (figure 2b et c). Une méthode automatisée en phase solide qui inclut les étapes de protection et de déprotection sélectives a été développée et appliquée à la synthèse d'oligosaccharides contenant du glucose et du mannose²². Une alternative à la synthèse d'oligosaccharides est l'approche d'une synthèse « one-pot » programmable (figure 2c), dans laquelle l'oligosaccharide d'intérêt est réalisé par

additions séquentielles de blocs de construction soit totalement protégés, soit proposant un seul groupement hydroxyle²³.

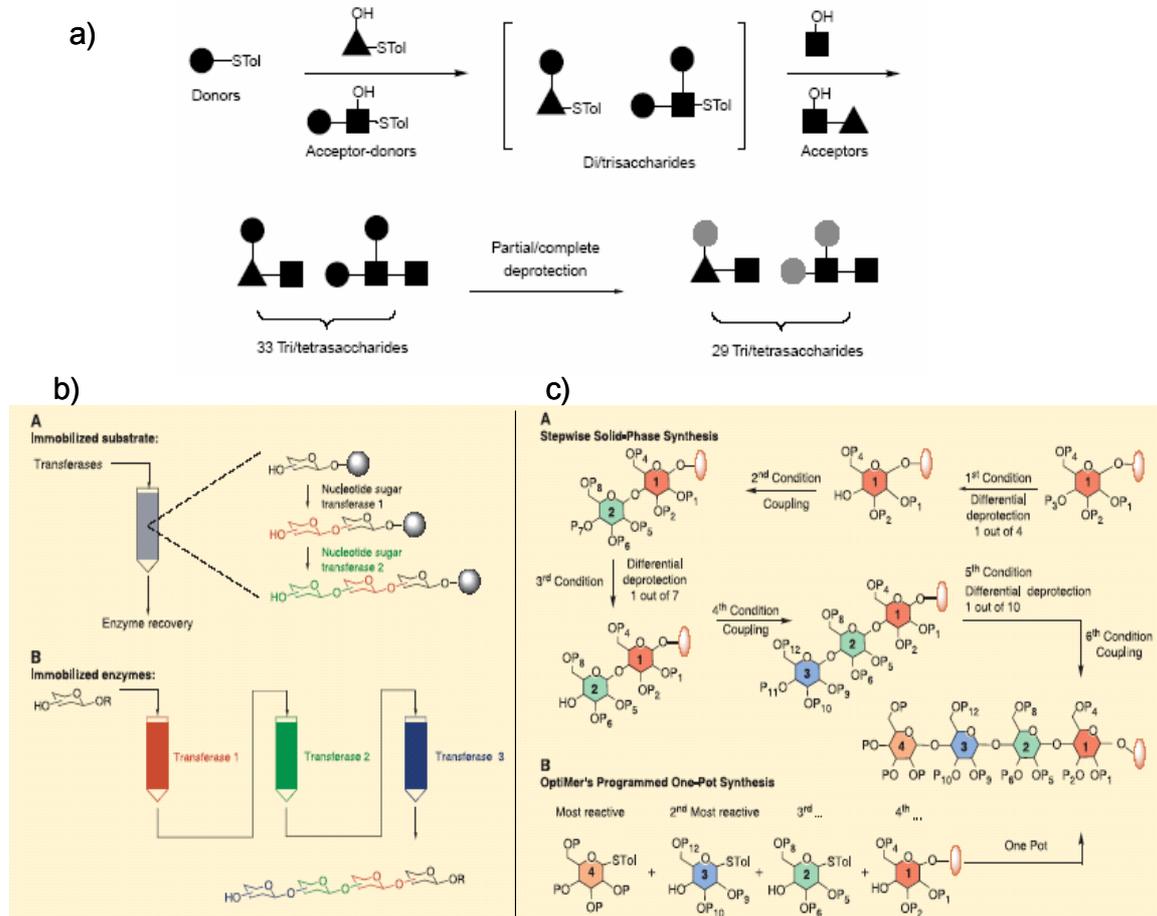


Figure 2 : (figures issues des publications^{19,20}) : **a)** Approche de Wong¹⁹, consistant en l'assemblage « one-pot » d'une librairie de tri- et tétrasaccharides linéaires ou branchés ; **b)** Approches de synthèse automatisée par voies enzymatiques (**A**) : les enzymes sont laissées en solution, et le saccharide à allonger est fixé sur le support²² (représenté par la bille grise). Cette approche simplifie la purification mais nécessite une étape de récupération de l'enzyme afin de ne pas gaspiller ce catalyseur cher, (**B**) : le saccharide à allonger est attaché à un polymère hydrosoluble¹⁸, qui est passé à travers des colonnes contenant des enzymes immobilisées, le produit final est récupéré soit en précipitant le polymère soit par des techniques d'affinité si le polymère est marqué (par de la biotine par exemple). **c)** (**A**) : Etapes traditionnelles de synthèse en phase solide nécessitant la manipulation des groupes protecteurs sur résine, pouvant devenir très compliquées quand le nombre de liens glycosidiques augmente, (**B**) : Approche one-pot « OptiMer »²³ c'est un programme permettant de prévoir le type et l'ordre optimal de l'addition de sucres partiellement protégés, sur la base d'une banque de données de réactivités relatives.

Parallèlement à ces synthèses chimiques, les oligosaccharides peuvent être préparés par des réactions catalysées par des enzymes²⁴ (figure 2b). Dans la nature, il existe deux classes pouvant être étroitement liées à la construction d'oligosaccharides : les glycosyltransférases et les glycosidases. Les premières catalysent la formation de chaînes

glycosidiques et les secondes les hydrolysent. Le plus grand avantage de la synthèse enzymatique de sucres est que les substrats sont utilisés dans leur forme naturelle. Aucun groupement protecteur n'est requis pour former des liaisons glycosidiques de manière régio- et stéréo-spécifique.

2.1.2. Les sucres issus de sources naturelles

Les oligosaccharides peuvent être isolés à partir d'extraits humains (sérum, cellules, ...), du lait animal ou de l'urine. Les fragments d'oligosaccharides peuvent être issus de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes par digestion de lyases²⁵ ou par dégradation à l'acide nitrique²⁶. De nombreuses méthodes chimiques sont aussi utilisées pour obtenir des fragments oligosaccharidiques à partir de polysaccharides bactériens ou végétaux, telles que les oxydations par le périodate (NaIO_4)²⁷.

De multiples étapes en chromatographie sont souvent nécessaires pour isoler / purifier les oligosaccharides ; sont inclus la filtration sur gel, les chromatographies échangeuses d'ions ou encore la chromatographie HPLC en phase normale ou inverse. Ces produits, possédant une terminaison réductrice se révèlent être bien adaptés à une modification ou à une fixation sur support.

2.2. La fonctionnalisation des surfaces

Dans ce paragraphe, les techniques majeures de modification de surface par des sucres vont être décrites. Les modes de fonctionnalisation changent en fonction de différents paramètres tels que le support, l'immobilisation covalente ou non du sucre, l'interaction à mesurer, le mode de détection.

Pour analyser des interactions biomoléculaires à l'aide d'un biocapteur, un des réactifs impliqués dans l'interaction doit être fixé sur la surface. Il existe de nombreux moyens de fixer cette espèce, que nous pouvons appeler *sonde*, à la surface, allant de la simple adsorption passive, à l'élaboration d'une structure chimique de liaison (matrices d'hydrogel, couches auto-assemblées, etc.). Cette chimie va permettre une fixation stable des sondes sur la surface. Il faudra cependant essayer de limiter son influence sur la reconnaissance en éloignant le sucre du substrat (notion de « bras espaceur »).

Une fois la sonde fixée par l'une de ces méthodes, la surface ainsi fonctionnalisée doit : **1-** réagir spécifiquement avec la cible avec efficacité, ce qui implique une limitation des interactions non spécifiques, et **2-** être réutilisable, c'est-à-dire que la surface doit résister à toutes les procédures utilisées lors de la détection et de la régénération. Il faut donc que l'impact de l'environnement immédiat de la sonde (y compris la chimie de fixation) sur ses propriétés soit maîtrisé afin d'adapter la méthode de réalisation du biocapteur pour chaque type d'interaction étudiée, voire pour chaque application. Par exemple, la densité des sondes doit être judicieusement choisie pour limiter l'encombrement stérique et favoriser l'accessibilité des sites de réaction sur chaque molécule, la couche intermédiaire entre la surface et les sondes ne doit pas adsorber non spécifiquement les cibles, la localisation du greffage sur la sonde et la longueur du bras espaceur ne doivent pas perturber la fonctionnalité de la sonde, *etc.*

Mais avant de décrire les différentes méthodes utilisées pour fonctionnaliser des surfaces par des sucres, il faut préciser, pour la suite du travail, notre définition du mot « puces » ; actuellement, la plupart des auteurs d'articles relevant de systèmes avec des oligosaccharides fonctionnalisés nomment ces procédés « oligosaccharide microarrays » ou « oligosaccharide chips », mais tous ne répondent pas véritablement au concept de système multiparamétrique spécifique des puces. Notons la différence entre la fonctionnalisation d'une surface par n spots (ou plots) « puce multiparamétrique » et la fonctionnalisation de n surfaces par 1 plot « monocapteur ». La fonctionnalisation de n surfaces correspond à l'utilisation de n monocapteurs, du type microplaques (96 puits) ou du type « Biacore » possédant 4 canaux distincts (*cf.* I.3.2.4.).

2.2.1. Les premiers systèmes de mesures d'interactions sucre - protéine : Immobilisation grâce au système biotine / streptavidine

Depuis le début des années 1980, les propriétés du complexe avidine / biotine, et plus particulièrement son rôle de connexion biologique entre deux biomolécules, ont été largement exploitées dans les domaines de la biologie, de la biochimie et de la médecine. L'abondante littérature sur ce sujet²⁸ témoigne de la popularité de l'interaction avidine / biotine.

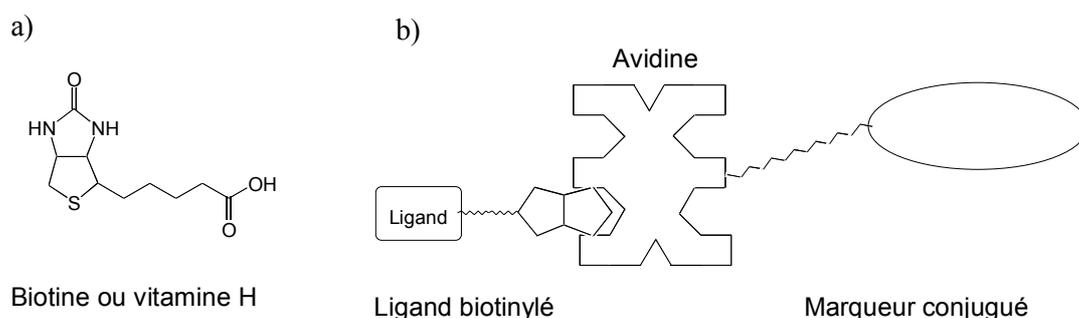


Figure 3 : a) Structure de la biotine ; b) Représentation schématique de l'interaction biologique avidine / biotine.

L'avidine est une glycoprotéine ($M = 66$ kDa) issue du blanc d'œuf composée de quatre sous unités identiques, chacune capable de former un complexe avec une molécule de biotine. La biotine est une petite molécule également connue sous le nom de vitamine H (figure 3a).

Bien que non covalente, la liaison entre l'avidine et la biotine est très forte ($K_a = 10^{15} M^{-1}$) en solution et donne un complexe extrêmement stable qui résiste même à des conditions de pH extrêmes, aux solvants organiques, ainsi qu'à des milieux contenant certains agents dénaturants. La présence de chaînes oligosaccharidiques sur l'avidine ainsi que la valeur élevée de son point isoélectrique (pI 10) sont souvent la cause d'adsorptions non spécifiques et d'un bruit de fond important. C'est pourquoi l'avidine tend à être substituée par la streptavidine, qui possède les mêmes propriétés de complexation à l'égard de la biotine. Avec un point isoélectrique plus faible (pI 5-6), cette protéine d'origine bactérienne n'est pas glycosylée et permet de réduire les adsorptions non spécifiques et contribue à améliorer les performances des systèmes analytiques.

Comme le résume la figure 3b, le complexe avidine / biotine joue essentiellement un rôle de charnière entre une biomolécule et une sonde ou un support solide donné en vue d'amplifier la réponse analytique (quatre molécules de biotine par avidine) et d'améliorer les conditions d'immobilisation du système.

Les premiers efforts pour comprendre les interactions protéines / oligosaccharides ont permis de développer les premières puces à sucres^{29,30}, utilisant comme moyen de fixation l'association Streptavidine - Biotine. Le principe est simple : les sucres sont couplés à une biotine par leur extrémité réductrice. Afin de permettre l'accessibilité du sucre fixé, les différents groupes de recherche ont intercalé un bras espaceur entre la biotine et

l'oligosaccharide. Shao *et al.*²⁹ déposent la streptavidine sur une microplaque de 96 puits (figure 4), sachant que cette protéine s'adsorbe fortement et de manière irréversible sur le polystyrène de cette plaque ; ensuite il met en contact avec cette couche protéique les oligosaccharides biotinylés. Shinohara *et al.*³⁰ utilisent quant à eux, une puce commerciale Biacore où la streptavidine est déjà déposée.

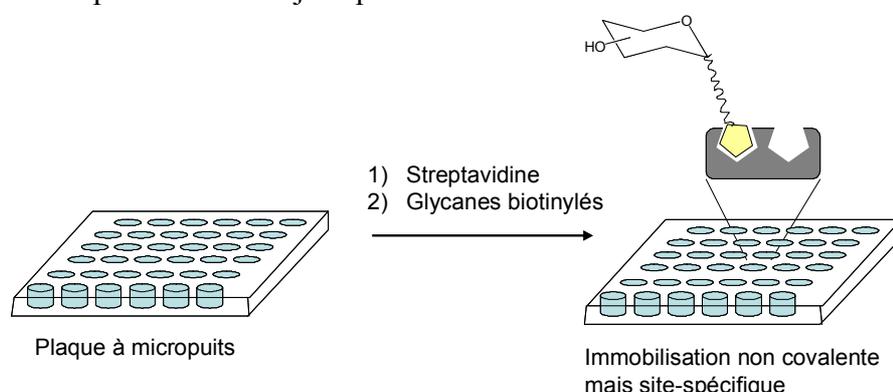


Figure 4 : Puces à sucres de type microplaques, préparés par immobilisation de glycanes biotinylés sur des plaques recouvertes de streptavidine.

Plus récemment, un troisième groupe est allé plus loin dans l'utilisation du bras espaceur ; Leteux *et al.* ont intégré dans ce bras deux propriétés supplémentaires : l'absorbance UV (permettant le suivi en HPLC lors des étapes de synthèse) et une propriété de fluorescence³¹ (permettant de mesurer par un fluorimètre le sucre déposé). La puce est réalisée sur une microplaque commerciale de 96 puits préfonctionnalisée avec de la streptavidine, les oligosaccharides y sont déposés dans chaque puits.

Ces études ont bien illustré le potentiel de l'interaction streptavidine - biotine pour immobiliser des sucres afin de développer un criblage des interactions protéines - oligosaccharides.

D'autres groupes de recherche se sont alors penchés sur l'immobilisation directe de sucres sur une surface, comprenant qu'il devenait essentiel de mettre au point un procédé afin de minimiser notamment les quantités de sucres à consommer lors de la mesure d'interactions, puisque, contrairement à l'ADN ou aux protéines aucun moyen technique biologique pour exprimer les sucres n'existe. Forts des connaissances sur les moyens d'immobiliser des molécules chimiques sur une surface (verre, or, polymère), d'autres systèmes de fixation ont vu le jour.

2.2.2. Premier support permettant une immobilisation covalente de sucres : le dextran

L'un des premiers moyens d'immobilisation covalente des sucres sur un support a été le dextran³² ; celui-ci est un polymère hydrophile linéaire, composé d'unités glucose répétées. Ce polymère est largement utilisé depuis une quinzaine d'années, comme moyen de fixation de biomolécules sur une surface d'or, faisant partie du procédé mis au point par la société Biacore (procédé décrit dans le paragraphe I.3.2.4.). Le dextran est immobilisé sur une surface hydroxylée, puis il est lui-même carboxylé (figure 5a). Les chaînes flexibles mesurent ~ 100 nm dans des solutions aqueuses, formant une surface hautement hydrophile sur laquelle les protéines ou d'autres biomolécules ne peuvent que faiblement s'adsorber. Ainsi, seuls les groupements carboxyliques du dextran sont utilisables pour immobiliser des sucres, ils peuvent être convertis en esters activés, en fonction amine, en fonction hydrazide ou en fonction thiol³³ (figure 5b).

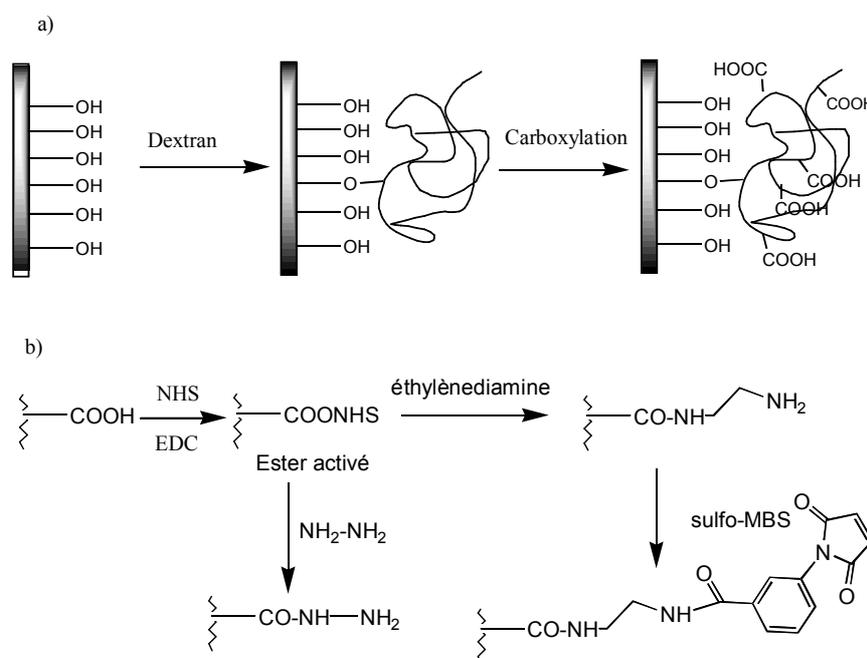


Figure 5 : a) les différentes étapes de fonctionnalisation de la surface par le dextran. b) Obtention des différentes fonctions utilisables pour fixer une biomolécule ; NHS : N-hydroxysuccinimide ; EDC : N-éthyl-N'-(3-diéthylaminopropyl)-carbodiimide ; $\text{NH}_2\text{-NH}_2$: hydrazine ; sulfo-MBS : m-maléimido-benzoyl-N-hydroxy-sulfo-succinimide ester.

Par exemple, l'équipe de Kiessling³⁴ a utilisé cette surface fonctionnalisée -NH_2 afin d'y fixer des ligands sucres multivalents, évitant l'immobilisation aléatoire des ligands sur la surface.

2.2.3. Les puces à polysaccharides

Jusqu'à présent, les puces à polysaccharides, c'est-à-dire de très longues chaînes de sucre, n'utilisent que la fixation non covalente.

a) Immobilisation non covalente de sucres sur membrane de nitrocellulose

Wang *et al.* ont décrit des puces de polysaccharides et de glycoprotéines immobilisés sans conjugaison chimique sur une surface de verre modifiée par une couche de nitrocellulose³⁵ (figure 6a). Ils utilisent un robot de haute précision pour le dépôt qui a été développé pour l'ADNc et les spots sont générés sans modification du sucre et donc sans orientation spécifique du sucre. Le diamètre des spots est de ~150 µm avec un espacement de 375 µm (centre à centre). Par cette procédure, à peu près 20000 spots sont créés. Ils sont séchés afin de permettre l'adsorption (immobilisation non covalente) sur la surface hydrophile. De plus, l'efficacité de cette immobilisation est influencée par la taille du sucre, les sucres plus courts sont moins bien retenus sur la membrane après lavage que les plus longs.

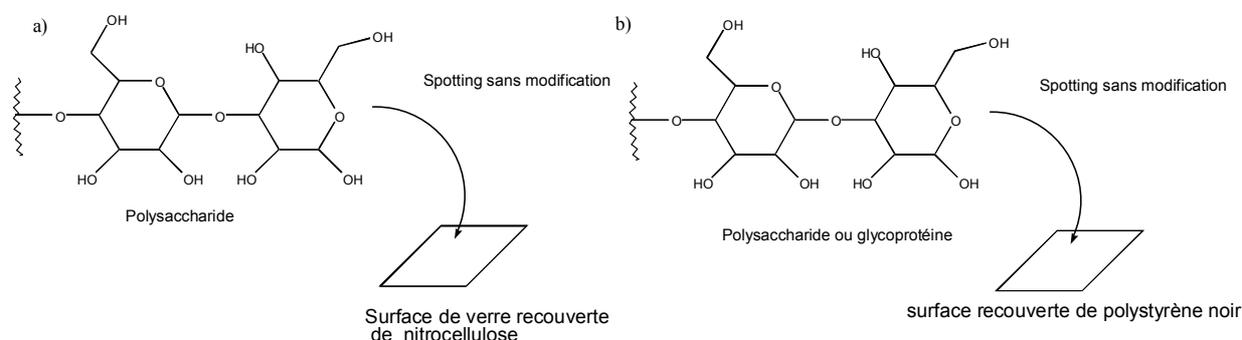


Figure 6: a) schéma de principe du dépôt selon la méthode de Wang *et al.* ; b) schéma de principe du dépôt selon la méthode de Willats *et al.*

b) Immobilisation non covalente de sucres sur une surface de polystyrène

Willats et ses collègues ont développé une procédure pour fabriquer des puces à polysaccharides³⁶ (figure 6b) en utilisant des surfaces de polystyrène noir, préparées par injection, moulage et modification oxydative de la surface, permettant d'améliorer la surface disponible pour une adsorption passive. Les échantillons déposés sont issus de cellules, avec parmi eux, des néoglycoprotéines complexes, des protéoglycanes et des polysaccharides. Ces

sucres sont directement déposés de façon non covalente sur les surfaces par liaisons hydrogène, interactions ioniques et/ou hydrophobes, leur conférant une orientation aléatoire (spots de 150 µm de diamètre avec un espacement de 375 µm entre les plots).

2.2.4. Immobilisation non covalente d'oligosaccharides sur support

La nature hydrophile de la plupart des oligosaccharides ainsi que leur faible poids moléculaire n'en font pas des échantillons idéaux pour l'immobilisation non covalente sur des supports matrices ; c'est pourquoi, des modifications sont souvent nécessaires.

a) Création d'un néoglycolipide à immobiliser

Fukui *et al.* ont développé un système de puces sur membrane de nitrocellulose, dans lequel l'oligosaccharide est lié à un lipide, appelé néoglycolipide³⁷ (NGL). Ces oligosaccharides contenant entre 2 et 20 unités saccharidiques, sont reliés par une réaction d'amination réductrice à un amino-phospholipide : la 1,2-dihexadecyl-*sn*-glycero-3-phospho-éthanol-amine, pour donner un néoglycolipide (figure 7). Ces NGLs (10 pmol) sont alors déposés sur la membrane (figure 7) par une technique jet d'encre avec un déposeur d'échantillons (spots de 300 µm). Par cette technique, les oligosaccharides sont bien ancrés sur la membrane par adsorption non covalente et orientés spécifiquement, contrairement aux polysaccharides de Wang *et al.* Le format de leur puce permet de mettre 48 plots différents sur une surface de 20 x 50 mm² et d'épaisseur de nitrocellulose de 0,45 µm. Ils estiment que la densité en plots sur la surface peut être optimisée jusqu'à 1000 spots par un équipement de spotting adapté.

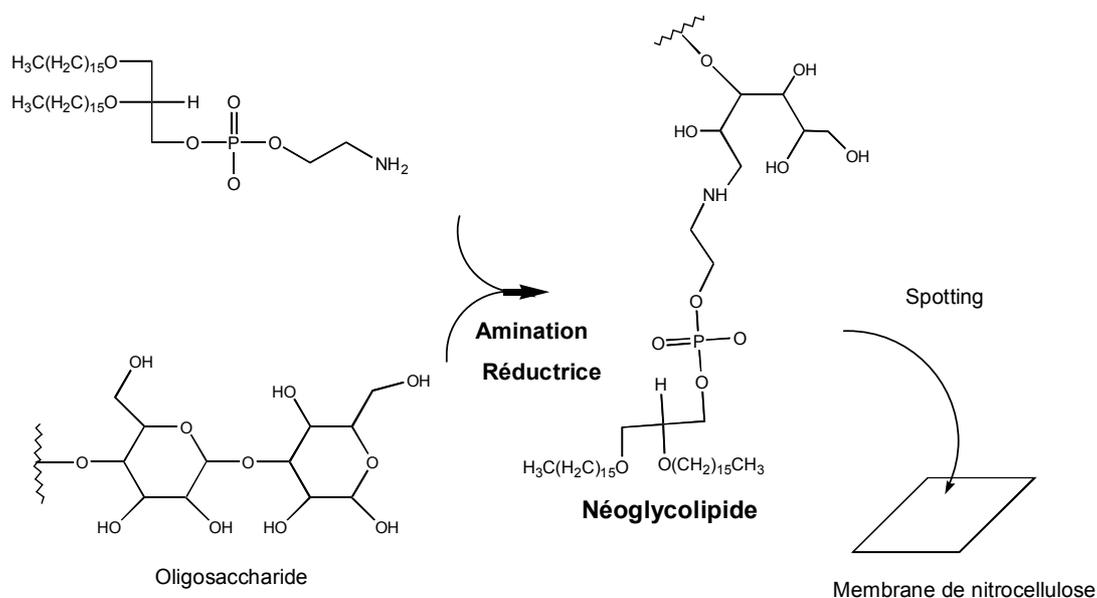


Figure 7 : Couplage de l'oligosaccharide au phospholipide par réaction d'amination réductrice ; dépôt par adsorption sur la membrane de nitrocellulose.

b) Fixation sur microplaques en polystyrène

Wong *et al.* ont développé une méthode alternative pour fabriquer des puces à mono- et oligosaccharides par fixation non covalente sur des microplaques en polystyrène³⁸. Ils ont débuté leur étude sur un monosaccharide, le galactose ; celui-ci est d'abord fonctionnalisé par un groupement allyle. Ce monosaccharide est lié *via* sa position anomérique, sous des conditions stéréochimiquement contrôlées, à une chaîne aliphatique (entre 3 et 21 carbones). La surface en polystyrène des microplaques est utilisée comme support solide pour la fixation non covalente de ces sucres modifiés. Quand la chaîne carbonée est comprise entre 13 et 15 carbones en longueur, le monosaccharide est totalement retenu dans les puits après plusieurs lavages aqueux. Ainsi, la chaîne aliphatique en 14 carbones a été choisie pour étendre le modèle à des oligosaccharides synthétiques neutres possédant de 2 à 6 monosaccharides ; seule contrainte imposée : le dernier monosaccharide doit être un galactose, un fucose ou un glucose.

Parallèlement à cette étude, ce groupe a mis en œuvre une nouvelle technique d'immobilisation non covalente d'oligosaccharides^{39,40}. La chaîne aliphatique de 14 carbones sélectionnée précédemment est immobilisée de façon non covalente sur la surface plastique des microplaques et elle est couplée *in situ* aux oligosaccharides-azides préparés préalablement (figure 8).

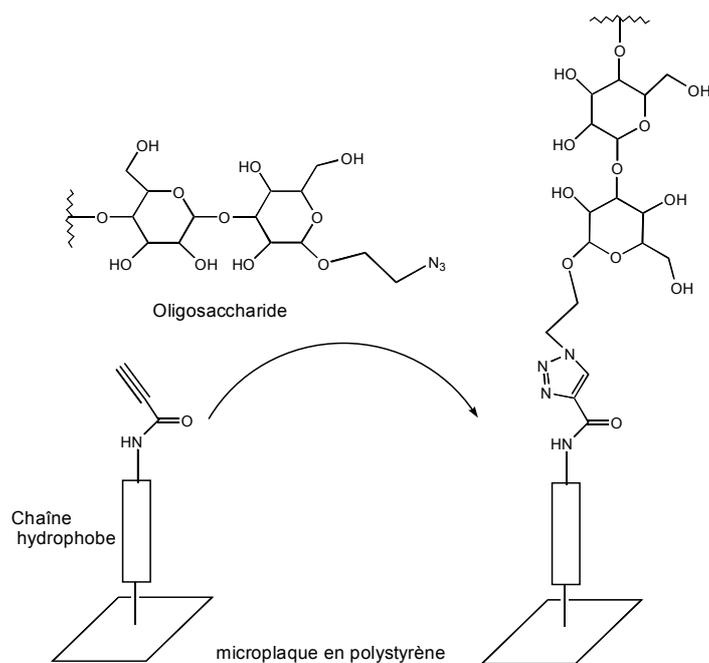


Figure 8 : Représentation du mode d'immobilisation des oligosaccharides selon Wong.

Ces sucres sont couplés par une réaction de [3+2] cyclo addition catalysée par du cuivre, sous les conditions de Sharpless entre le groupement azide du sucre et le groupement alcyne en bout de la chaîne aliphatique. Cette méthode simplifie la préparation et la purification des oligosaccharides fonctionnalisés par un lipide. Cette fixation non covalente à la surface permet une modification enzymatique des sucres fixés mais aussi une caractérisation des produits liés au lipide par spectroscopie de masse.

Plus récemment, cette équipe a mis au point, avec la même technique d'immobilisation par réaction azide-alcyne, d'autres surfaces susceptibles d'avoir cette réactivité⁴¹. Ils voulaient en plus de l'alcyne terminal pour la capture des oligosaccharides-azides, un site de clivage dans le bras espaceur pour faciliter l'analyse du lien covalent par des techniques standard d'analyses que sont la RMN ou la spectroscopie de masse. Ils ont donc choisi d'intercaler un pont disulfure dans le bras espaceur, car cette liaison est stable vis-à-vis de nombreuses applications biologiques mais aussi facilement clivable par réduction pour donner des thiols. Ainsi, deux bras espaceurs ont été synthétisés, l'un pouvant se fixer par réaction avec la surface fonctionnalisée par des esters activés NHS, l'autre par réaction avec une amine fonctionnalisée sur la surface (figure 9).

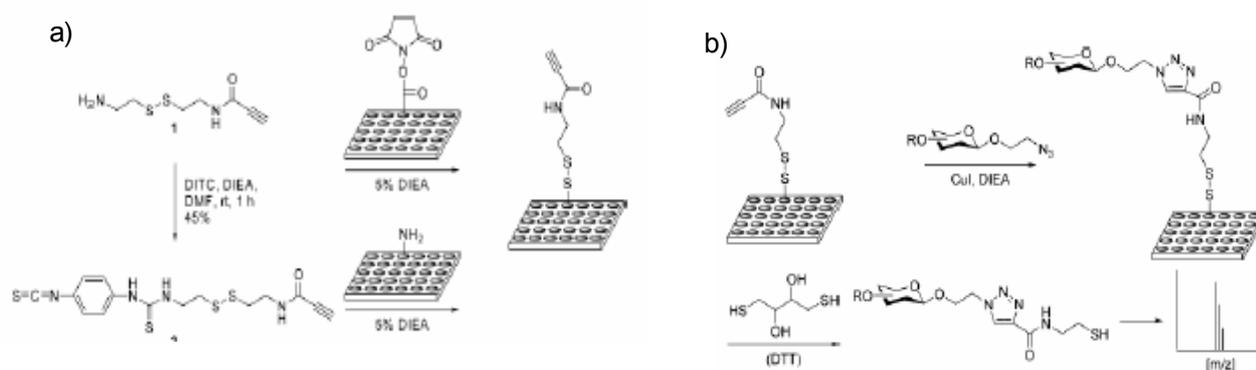


Figure 9 : Figures issues de la publication 41 a) Structures des bras espaceurs possédant le pont disulfure. La molécule 1 est fixée sur une surface fonctionnalisée par des esters activés NHS ; la molécule 2 est fixée sur une surface fonctionnalisée par des amines ; b) Réaction entre l'alcyne du support et l'azide du sucre ; coupure du pont disulfure par le DTT pour permettre l'analyse en spectroscopie de masse.

c) Fixation sur surface de verre fonctionnalisée par des phosphanes

Le groupe dirigé par Waldmann a préparé des puces à petites molécules, dont des sucres, en utilisant les réactions de Staudinger entre un composé comprenant un azide et des surfaces de verre fonctionnalisées par des phosphanes⁴². Ils souhaitent développer une nouvelle stratégie de couplage répondant aux critères suivants : employer un unique groupement chimique qui devait notamment réagir de manière efficace dans une atmosphère contenant de l'oxygène et de l'eau, et qui devait être compatible avec les stratégies de chimie combinatoire en phase solide.

Contrairement au groupe de Wong, leur stratégie de couplage ne nécessite pas l'usage d'un métal (le cuivre), elle est basée sur la réaction entre des azides et des phosphanes substitués de manière appropriée, donnant une liaison stable amide.

Tout d'abord, la surface en verre est fonctionnalisée avec des dendrimères de polyamidoamine de 4^e génération (PAMAM), pour maximiser les sites réactifs sur le support (figure 10). Des surfaces de ce type ont déjà été décrites pour la préparation de puces à ADN ou à protéines⁴³.

Ensuite, la surface réagit avec de l'anhydride glutarique pour introduire des groupements acides carboxyliques ; des phosphanes réagissant avec des azides sont alors introduits en réagissant avec le 2-(diphénylphosphinyl)phénol. Parallèlement, les azides organiques sont préparés en synthèse en phase solide par la stratégie du « safety-catch linker ». Les azides sont alors immobilisés de manière efficace sur les surfaces-phosphanes (taille du spot : 400 µm de diamètre, volume du spot : 0,25 nL) (figure 10).

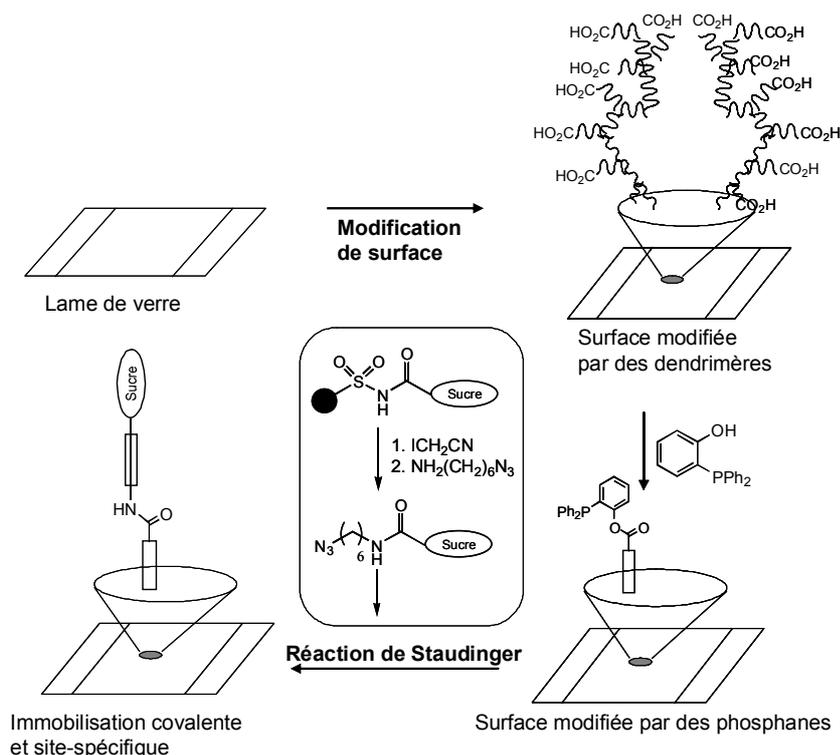


Figure 10: Représentation schématique de la chimie de fonctionnalisation de surface de Waldmann ; préparation de puces à sucres par la réaction de Staudinger entre des sucres contenant une fonction azide et une surface comportant des groupes phosphanes.

2.2.5. Fixation covalente d'oligosaccharides sur support

a) Immobilisation de sucres-maléimides sur support de verre thiolé

Le groupe de recherche de Shin a créé une nouvelle approche pour la fabrication de puces à sucres, immobilisant des sucres fonctionnalisés par un groupe maléimide sur des surfaces thiolées⁴⁴. Ils utilisent donc comme support solide des lames de verre fonctionnalisées par des groupes thiols (Biometrix technology, Korea) qui peuvent être recyclées, sans cliver les produits sucrés de la surface. Ce procédé d'immobilisation a été précédemment utilisé pour préparer des néoglycoprotéines ou des néoglycopeptides⁴⁵ par la réaction de sucres-maléimides avec des peptides ou des protéines possédant une cystéine (fonction thiol). Dans cette étude, un monosaccharide ainsi que trois disaccharides ont été couplés par leurs terminaisons réductrices à un maléimide en une réaction 'one-pot', où le sucre est aminé puis réagit sur un ester activé penta(fluoro)phényl⁴⁵ (figure 11 étapes (1) et (2)). Ensuite, les sucres fonctionnalisés peuvent se fixer de façon covalente à la surface, par une réaction d'addition Hétéro-Michaël entre le groupe thiol du support et le maléimide couplé au sucre (figure 11 étape (3)). Ces sucres conjugués au maléimide (d'une

concentration de 0,1 à 5 mM) sont spottés par un microarrayer de type aiguille, avec un diamètre de plot de ~100 μm et espacés de 200 μm centre à centre. Une fois la matrice dessinée, une solution d'éthyl-maléimide est déposée afin de bloquer toutes les fonctions thiol restantes (figure 11 étape (4)). Dans leur étude la plus récente, ils ont réappliqué cette stratégie mais cette fois-ci pour 22 monosaccharides ou disaccharides⁴⁶.

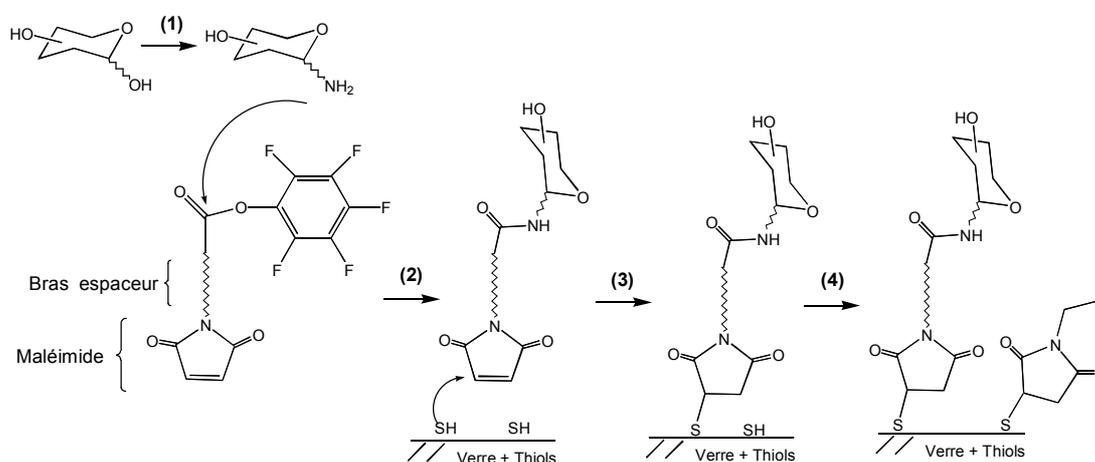


Figure 11 : les étapes clés de la préparation des puces à sucres selon la méthode de Park et Shin ; (1) formation d'un glycosylamine par traitement des sucres avec un mélange d'hydrogénocarbonate d'ammonium et d'hydroxyde d'ammonium ; (2) couplage de la glycosylamine avec l'ester de pentafluorophényl-maléimide (le bras espaceur comprend entre 2 et 24 carbones) ; (3) addition de Michaël des thiols de la surface sur la double liaison du fragment maléimide (5h de réaction) ; (4) les thiols restants, après réaction, sont masqués par l'ajout d'un excès de N-éthyl-maléimide.

b) Les travaux de Mrksich : construction de monocouches auto-assemblées

Les monocouches auto-assemblées ont été développées pour la fonctionnalisation de surface, parce qu'elles possèdent un avantage par rapport à la surface de dextran, la nitrocellulose ou le polystyrène : les biomolécules déposées peuvent être spécifiquement orientées sur la surface.

Mrksich *et al.*⁴⁷ ont développé une technique pour préparer des puces à sucres qui utilisent les réactions de Diels-Alder entre des saccharides liés à un cyclopentadiène et des groupes benzoquinones immobilisés sur un support de verre recouvert d'or. Ils ont développé une stratégie chimique pour réaliser une puce comportant dix monosaccharides sur une lame de verre recouverte d'or, fonctionnalisée par des couches auto-assemblées d'alcanes-thiols. Cette procédure d'immobilisation a déjà été employée par ce groupe pour fabriquer des puces à peptides⁴².

La première étape consiste à préparer la couche auto-assemblée⁴⁸ ; ainsi, la surface d'or est immergée dans un mélange contenant deux alcanes-thiols, dont l'un possède un groupe hydroquinone exposé et le deuxième est substitué par du penta (éthylène glycol) (figure 12). Les concentrations relatives des deux alcanes-thiols sont ajustés afin de donner des couches possédant les groupes hydroquinone à 1% en densité.

Lors de la deuxième étape, les groupes hydroquinones sont oxydés chimiquement ou électrochimiquement en benzoquinones⁴⁹ (figure 12).

D'autre part, les monosaccharides, attachés par leur extrémité réductrice à un groupement cyclopentadiène conjugué, sont obtenus à partir d'un monosaccharide substitué par un brome ou un allyle.

La troisième étape consiste à réaliser une réaction de Diels-Alder entre la benzoquinone et le diène conjugué (volume de spot : 1 μ L à 2 mM dans H₂O) pour immobiliser de manière covalente le ligand à une densité avoisinant 10 pmol/cm². Cette réaction convient véritablement à cette immobilisation car elle est rapide, quantitative et sélective^{50,51,52}, les sucres sont alors efficacement et solidement attachés à la surface. Les groupes benzoquinones n'ayant pas réagi restants sont alors inactivés par la réaction avec du tri(éthylène glycol)-cyclopentadiène.

Un autre avantage de cette immobilisation vient du fait que la quinone peut être réduite de façon réversible⁵¹ afin de contrôler la densité de ligands immobilisés. De plus, le penta (éthylène glycol) permet de limiter les adsorptions non spécifiques avec les protéines⁵³. Ils ont montré aussi, qu'une fois le monosaccharide fixé, celui-ci pouvait réagir avec une enzyme afin de le transformer en disaccharide.

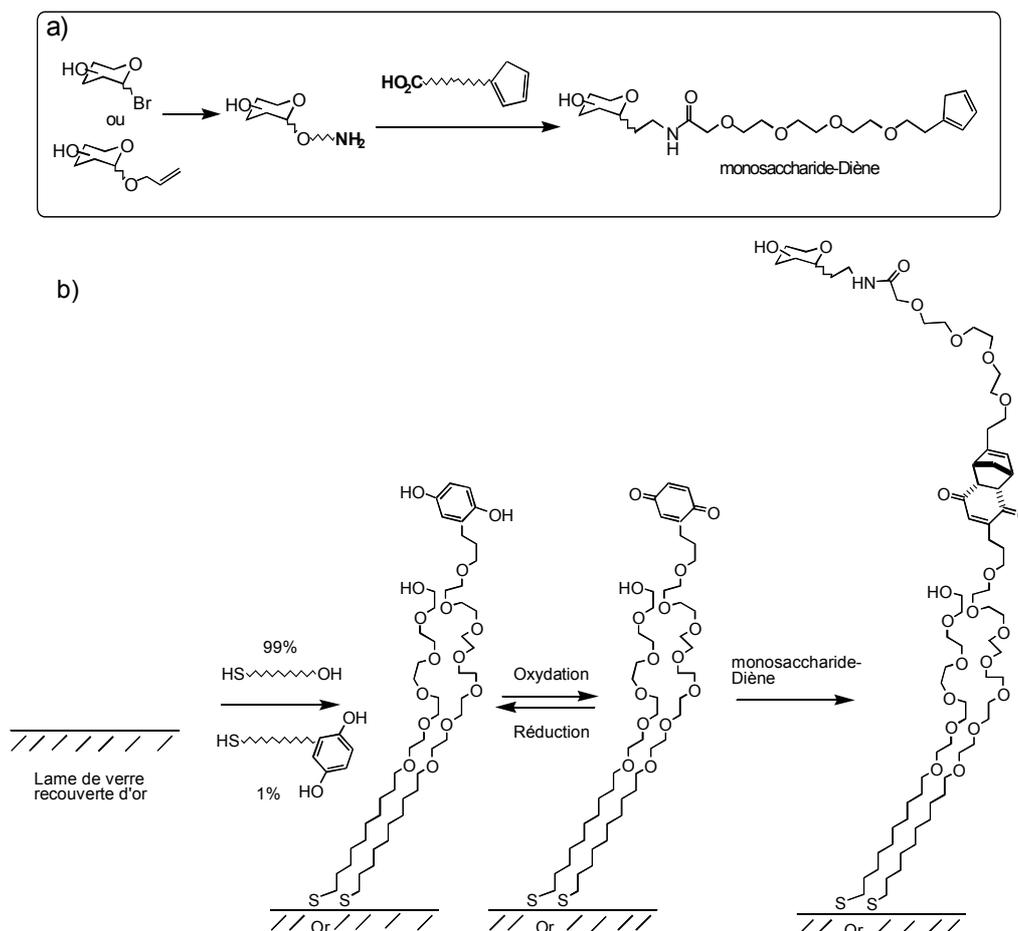


Figure 12 : Approche chimique de Mrksich. a) Schéma de synthèse de l'oligosaccharide fonctionnalisé ; b) Pour la préparation de puces à monosaccharides ; 1ere étape : formation de la couche auto-assemblée, 2° étape : Oxydation des hydroquinones en benzoquinones ; 3° étape : Immobilisation des monosaccharides fonctionnalisés par un diène par réaction de Diels-Alder.

c) Oligosaccharide fonctionnalisé par un phospholipide

Un autre modèle a été réalisé par construction d'une couche lipidique synthétique dans laquelle est insérée un monosaccharide, le glucose, substitué par un phospholipide (figure 13a). La première étape consiste à générer sur une surface d'or une couche d'alcane à longues chaînes attachés par un groupement thiol ; sur celle-ci est construite une deuxième couche composée de glucoses-phospholipides et de phospholipides simples⁵⁴ (POPC : phosphatidylcholine) (figure 13 b).

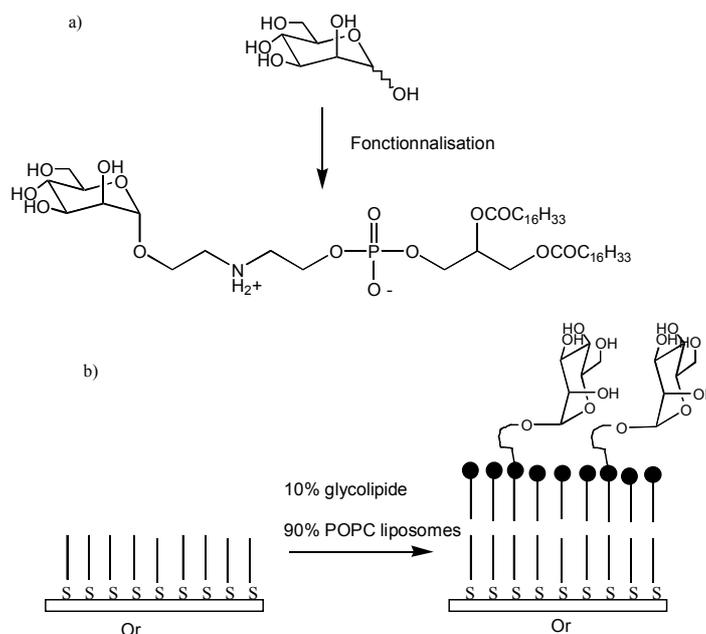


Figure 13 : a) Fonctionnalisation multi-étapes du glucose en glucose phospholipide ; b) schéma illustrant la couche auto-assemblée, la première est la formation de la couche alcanes, la deuxième est la construction de la couche d'intérêt.

d) Le développement des monocouches auto-assemblées

D'autres groupes de recherche se sont penchés sur l'utilisation de couches auto-assemblées sur surface d'or, mais de manière différente par rapport à celle de Mrksich *et al.*

Revell *et al.* ont montré qu'il était possible de fixer un monosaccharide fonctionnalisé par un thiol sans bras espaceur sur une surface d'or, cette étude a permis de comprendre que l'orientation des sucres sur chaque couche auto-assemblée dépendait de la position anomérique du thiol⁵⁵.

Horan *et al.* ont, quant à eux, décidé d'insérer directement un disaccharide fonctionnalisé en bout de chaîne par un thiol, en construisant la couche par un mélange alcanes-thiols simples / alcanes-thiols substitués par un sucre⁵⁶.

e) Immobilisation par pont disulfure

Afin de fixer du mannose et du galactose sur une surface d'or, une nouvelle méthode est apparue, elle consiste à fixer ces monosaccharides thiolés en utilisant des microcanaux de poly (diméthylsiloxane) (PDMS). Smith *et al.* ont opté pour une fixation par un pont

disulfure, déjà efficace pour fixer des oligonucléotides⁵⁷ ou des peptides⁵⁸ sur des surfaces d'or. Le schéma de réaction est décrit dans la figure 14. Une monocouche dense d'alcane-thiols fonctionnalisés par une amine est d'abord construite (11-mercaptopundécylamine, MUAM ; figure 14 à gauche, step 1). La monocouche subit alors différentes étapes (figure 14, à gauche, step 2-3-4) afin de présenter au final un pont disulfure. Un système microfluidique PDMS est ensuite placé sur la surface (figure 14 à droite, étape 2). Ce système est composé d'une série de canaux parallèles de 300 μm de large ; ils possèdent à leurs extrémités des réservoirs d'entrée et de sortie pour permettre l'introduction des échantillons de sucres. L'immobilisation des sucres se fait dans les canaux par l'ajout de 1 μL de solution dans ceux-ci. Comme chaque canal est indépendant, différents sucres ou différents mélanges de sucres peuvent ainsi être déposés (figure 14 à droite, étape 3). Au maximum 150 microcanaux peuvent être formés sur une surface totale de 1.8 x 1.8 cm^2 .

Après avoir fixé les sucres, les microcanaux sont retirés. Afin de minimiser les adsorptions non spécifiques des protéines sur la monocouche, celle-ci est exposée à un ester de poly (éthylèneglycol) succinimide, afin de masquer toutes les fonctions amines du MUAM n'ayant pas réagi⁵⁹.

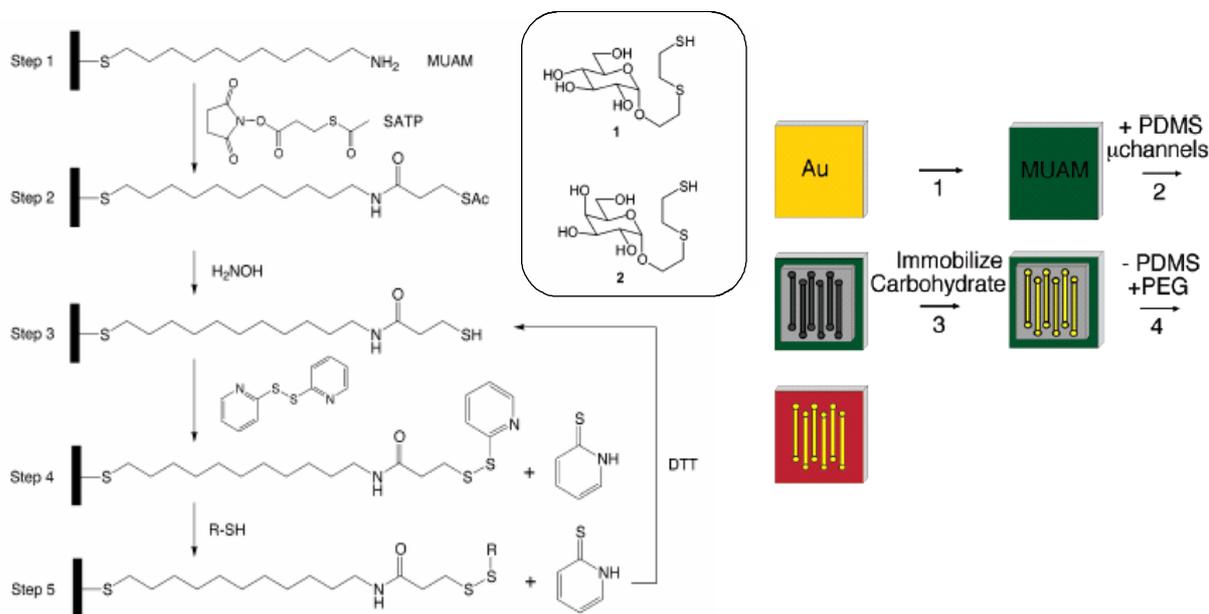


Figure 14 : Figures issues de la publication 54 ; à gauche, le schéma de réaction et de formation de la monocouche fonctionnalisée ; dans l'encadré, les structures des deux monosaccharides dérivés : α -mannose (1) et α -galactose (2) ; à droite : présentation schématique du procédé en 5 étapes pour former la puce à sucres en utilisant les microcanaux en PDMS.

f) Fonctionnalisation par la réaction Oligosaccharide - thiol sur support maléimide : trois exemples de supports différents

La fonctionnalisation de surface basée sur la réaction entre un thiol et un maléimide a été aussi utilisée par deux autres groupes que celui de Shin; seulement, cette fois-ci, c'est l'oligosaccharide qui est thiolé et le maléimide attaché à la surface.

Trois supports ainsi que trois techniques différentes de construction de puces sont alors utilisés.

f.1) Sur fibre optique

L'équipe de Seeberger⁶⁰ a décrit l'utilisation d'un système de puces à sucres sur fibres optiques où sont déposées aléatoirement des microsphères, afin d'analyser rapidement les interactions oligosaccharides – protéines. Ces puces à fibre optique avec dépôt aléatoire de microsphères ont été décrites en détail pour la détection de l'hybridation d'ADN^{61,62}.

Les auteurs utilisent ici des puces avec différentes populations de microsphères (diamètre 4.5 μm) où chacune contient une structure de sucre unique attachée de façon covalente à sa surface et possédant une signature spectrale précise (marqueur fluorescent) (figure 15). Ce traceur permet de reconnaître quel sucre est déposé sur la bille ainsi que la position de chaque microsphère sur la puce.

Ce format de puce à fibre optique développé notamment par la société Illumina⁶³, permet une détection par fluorescence simultanée jusqu'à 24000 micropuits (= fibres optiques).

Pour immobiliser l'oligosaccharide sur la microsphère (figure 15 haut), le sucre est d'abord fonctionnalisé par un bras espaceur possédant une fonction thiol terminale ; celle-ci réagit ensuite sur une protéine BSA activée par un maléimide. La néoglycoprotéine formée peut alors se fixer sur la bille ; cette stratégie de conjugaison permet de réaliser un espacement adéquat entre le support polymère et les sucres.

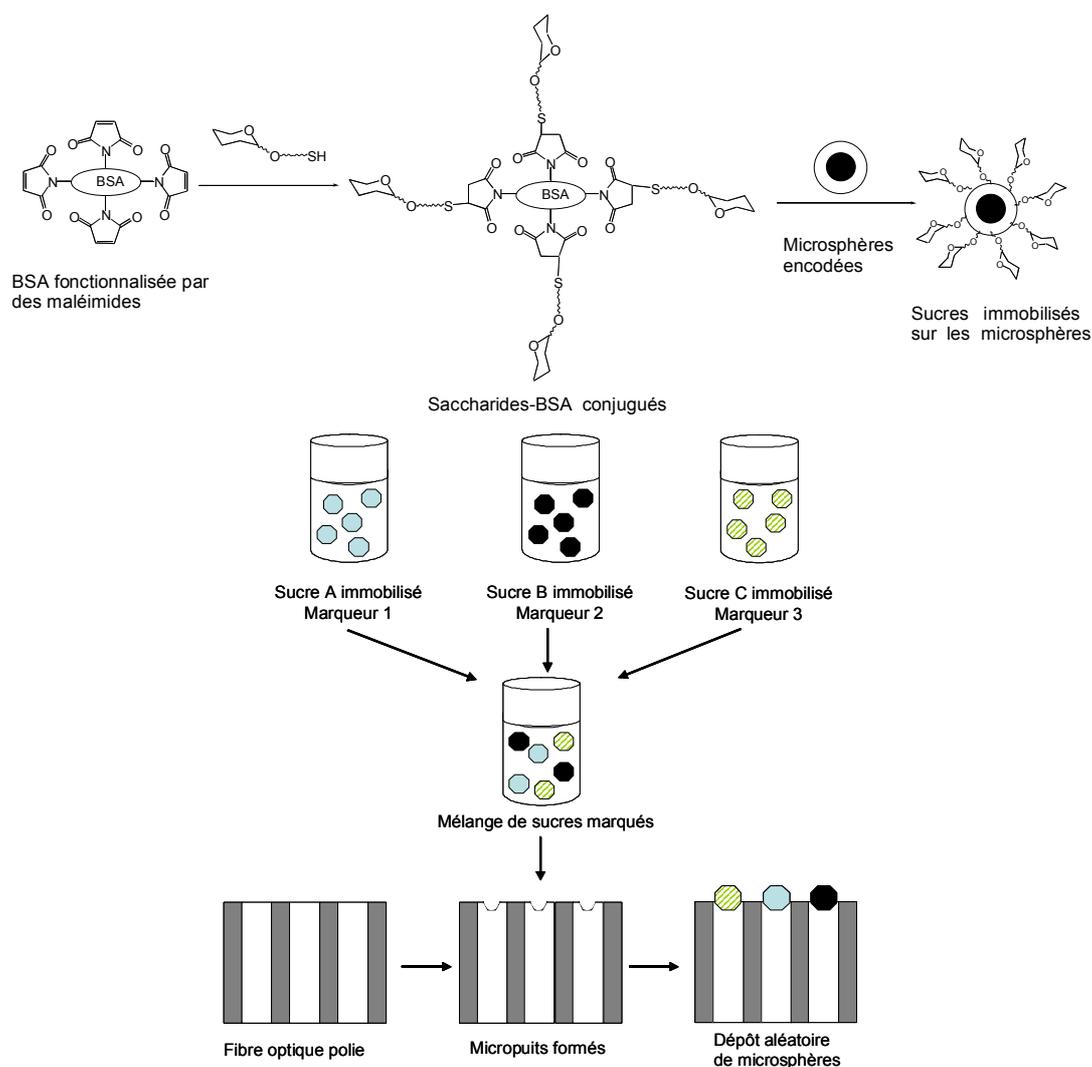


Figure 15 : Schéma du dépôt des microsphères sur les fibres optiques ; haut : schéma de fonctionnalisation des microsphères par les sucres ; Bas : étape 1 : fixation des différents sucres sur les microsphères ; étape 2 : mélange des microsphères fonctionnalisées ; étape 3 : dépôt des microsphères de façon aléatoire sur les micropuits des fibres optiques.

f.2) Utilisation de monocouches auto-assemblées

L'équipe de Mrkisch a déjà mis au point une technique d'immobilisation par réaction Diels-Alder, mais il s'avère que cette méthode possède le désavantage que chaque oligosaccharide-cyclopentadiène doit être synthétisé avant chaque immobilisation. Cette nécessité de couplage donne des limitations dans la taille et la complexité des puces qui pouvaient être préparées par cette chimie. L'utilisation de monocouches auto-assemblées fonctionnalisées par un maléimide terminal (sur surfaces d'or) (figure 16) semble être une bonne alternative : ce système possède les mêmes avantages que celui utilisant l'immobilisation par Diels-Alder, mais ne nécessite pas de lourde post-fonctionnalisation de l'oligosaccharide⁶⁴.

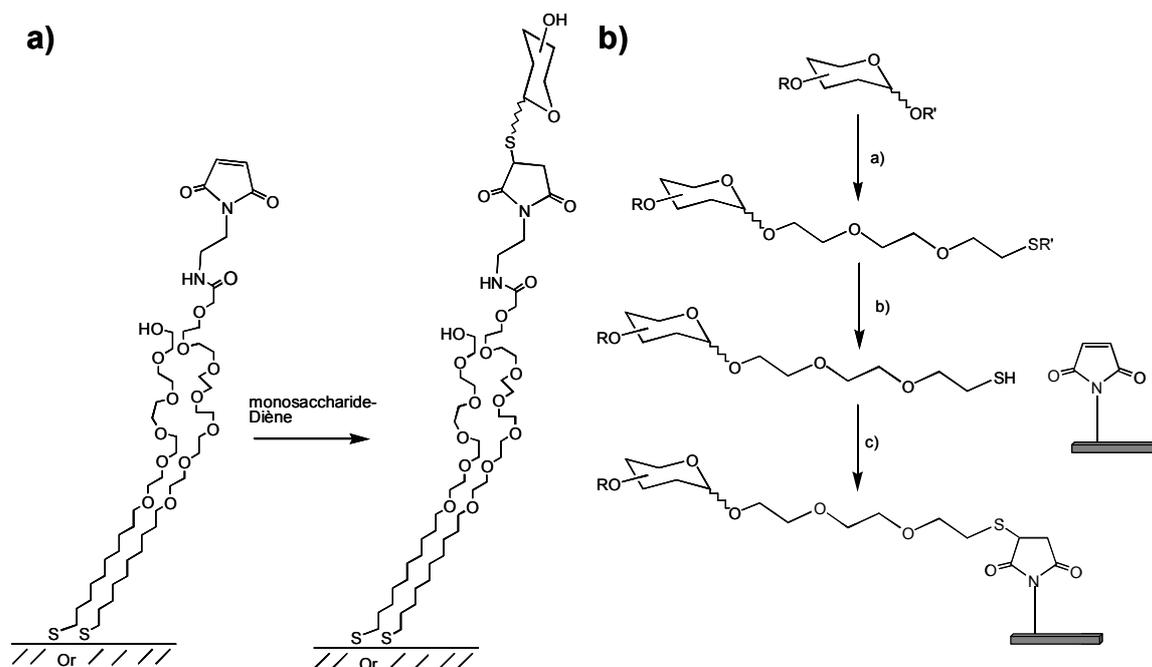


Figure 16: a) Structure d'une monocouche auto-assemblée utilisée pour immobiliser des oligosaccharides possédant en fonction terminale un thiol. Les groupes maléimide réagissent sélectivement avec les groupes Thiols dans une solution de contact, alors que les groupes pentaéthylène glycol évitent l'adsorption non spécifique de protéines sur la monocouche; b) Représentation schématique de la puce réalisée par Mrksich et Seeberger pour l'immobilisation d'oligosaccharides synthétiques thiolés.

f.3) Support protéique BSA

Plus récemment, Seeberger et Mrksich se sont associés pour développer un système utilisant aussi la réaction maléimide thiol⁶⁵ (autre exemple :⁶⁶). Une fois encore, le support change ; ici, une surface commerciale fonctionnalisée par des aldéhydes (SuperAldehyde slides ; Telechem International) est recouverte d'une couche protéique de serum albumine bovine (BSA), immobilisée de manière covalente. A son tour, la BSA supportée est modifiée pour contenir des groupes maléimide (figure 16). Ensuite les oligosaccharides synthétiques thiolés sont déposés par un spotteur (MicroGrid TAS) formant des plots de 120 μm espacés de 300 μm .

g) Glycochip, produit de Glycominds

Glycominds⁶⁷ est une société privée israélienne, créée en 1999 et dont le directeur est le docteur A. Dukler. Sa plateforme R&D a développé trois technologies complémentaires et

propose à ses clients, une gamme de nouvelles cibles thérapeutiques efficaces dont elle a évalué le potentiel en développement.

L'une des trois technologies développées par Glycominds, nous intéressant, est celle des puces à sucres (Figure 17a), appelées « Glycochip » : ce sont les premières puces commerciales complexes permettant d'analyser les interactions protéine / glycane^{68,69}.

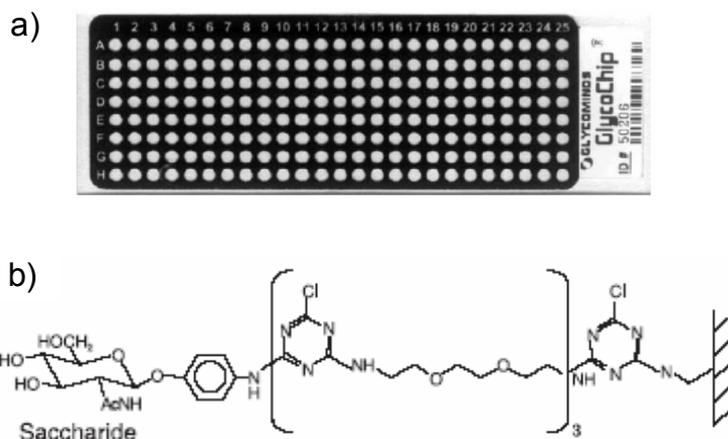


Figure 17: a) la puce à sucres “Glycochip” de Glycominds; b) structure du sucre relié à la surface *via* son bras espaceur.

La synthèse des puces à sucres est réalisée *in situ*, par des procédés chimio-enzymatiques parallélisés et des séquences parallélisées ; la surface définissant l'emplacement des plots est constituée de 8 lignes et 25 colonnes de spots de 1.7 mm de diamètre séparés par un masque en Téflon. La variété et la complexité des puces à sucres sont modélisées pour mimer les sucres naturels. Les sucres sont couplés de manière covalente entre leur extrémité réductrice et la surface *via* un bras espaceur flexible (figure 17b), qui permet une accessibilité physique des sucres liant des protéines.

2.3. Les systèmes de dépôt des saccharides sur un support

Maintenant que les différents supports possibles pour l'immobilisation de sucres ont été décrits, on remarque qu'en fonction de la fixation et du support, le mode de dépôt peut être différent. Ainsi la plupart des puces à sucres ont été réalisées par des robots de dépôt par contact déjà développés pour les puces à ADN (par exemple : Willats³⁶, Seeberger⁶⁰, Mrksich et Seeberger⁶⁵). Ces robots de dépôt par contact délivrent des échantillons de très faible volume (de l'ordre du nanolitre) directement sur la surface de la puce à l'aide d'aiguilles ou de capillaires. Il faut savoir que le mode de dépôt par contact a l'inconvénient de pouvoir

endommager la surface. C'est pourquoi d'autres équipes préfèrent utiliser des robots de dépôt par jet d'encre (Fukui³⁷) qui ne nécessite généralement aucun contact. Pour les supports de type microplaques, aucun « microarrayer » sophistiqué n'est requis. De plus, quel que soit le mode de dépôt (automatisé ou non), il faut savoir qu'une fois le faible volume mis sur le support, la puce n'est pas immédiatement utilisable : en fonction de la fonctionnalisation de surface souhaitée, le temps de réaction (goutte / support) peut varier entre 2 et 18 heures, à une température précise et sous un certain degré d'humidité.

Néanmoins, le dépôt utilisant un système fluïdique suscite un intérêt croissant : tout d'abord mis en place dans le cadre du procédé Biacore (fonctionnalisation du dextran), l'équipe de Corn a mis au point une technique de dépôt *via* des canaux en PDMS sur leur surface thiolée, qui permet de s'affranchir de certaines contraintes comme le temps ou la température (*cf* figure 14).

2.4. Récapitulatif des différents moyens de fonctionnalisation d'une surface par un sucre :

Le tableau suivant (tableau 1) permet de visualiser les principales techniques d'immobilisation d'un sucre (déjà décrites dans les paragraphes précédents), par les différents groupes réactionnels pouvant être fixés au sucre et les groupes réactifs de la surface. Si cela est possible, le diamètre, l'espacement inter-spots ainsi que le nombre de spots compris sur la puce sont donnés. De plus, il faut savoir qu'en fonction des supports utilisés, le mode de détection des interactions biologiques diffère, mais on remarque que seulement trois modes de détection sont utilisés : la fluorescence, la catalyse enzymatique mesurée par l'absorbance UV et la SPR (surface plasmon resonance)⁷⁰.

Nous nous attacherons donc dans la prochaine partie à étudier les modes de détection adaptées à la lecture de ces "puces à sucres" précédemment décrits.

Chapitre I : les puces à sucres : un outil pour la mesure d'interactions sucres-protéines

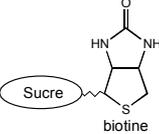
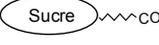
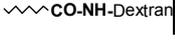
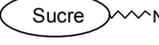
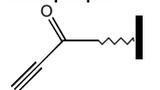
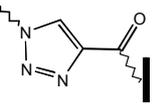
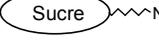
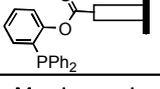
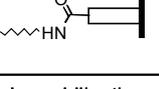
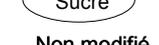
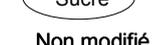
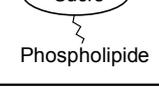
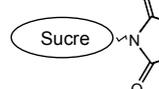
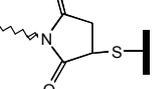
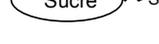
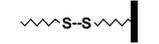
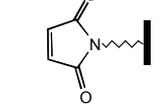
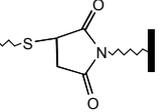
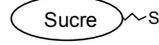
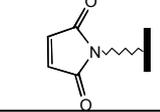
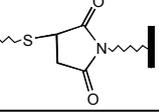
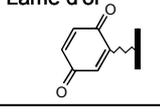
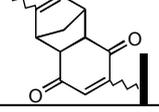
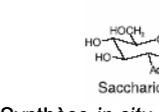
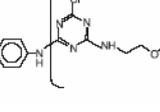
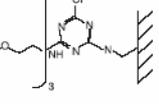
sucre	Groupe Fonctionnel	Groupe réactif surface	Immobilisation/ liaison formée	Diam. Spots Espacement nombre de spots	Conser- vation	Modes de détection Interactions	Réf.
m o		SA support	Complexe irréversible Biotine/Strep-tavidine	—	—	Détection enzymatique SPR (Biacore 1000)	29 30 31
m		Puce Biacore CM5 H ₂ N-Dextran		Pas de plots ; 4 canaux Indépendants	NON	SPR (Biacore)	34
o		Microplaque 		— 96 puits	—	Détection enzymatique	38- 41
o				D : 400µm 48 plots	OK	Fluorescence	42
p	 Non modifié	Membrane de nitrocellulose	Immobilisation NON covalente	20000 spots	OK	Fluorescence	35
p	 Non modifié	Polystyrène	Immobilisation NON covalente	D : 150µm Esp: 375µm 42 spots	OK	Fluorescence	36
m		Lame d'or Monocouche d'alcane-thiols	Immobilisation NON covalente	—	—	SPR (Biacore)	54
m o		Lame de verre HS		D : 100 200µm Esp : 200µm 384 spots	OK	Fluorescence	44 45 46
m		Lame d'or HS	Pont disulfure 	Canaux 3µm de large 10 canaux	Dégradé Après 20 cycles	SPR	59
m o				D : 4.4µm billes 24000 puits	OK	Fibre optique Fluorescence	60
m o				D : 120µm Esp.: 300µm 576 spots	OK	Fluorescence SPR (Biacore)	63 64 65
m		Lame d'or 		D : 800µm 10 spots	—	Fluorescence SPR (Biacore)	47- 53
m o				D : 1.7 mm 200 spots	—	Fluorescence	68 69

Tableau 1 : récapitulatif de toutes les fonctions utilisées pour la fixation de sucres sur support ; m : monosaccharide ; o : oligosaccharide ; p : polysaccharide ; — : non divulgué dans la littérature ; D : diamètre ; esp : espacement centre à centre ; SPR : surface plasmon resonance.

3. Les différents moyens d'étude des interactions biologiques sur les puces à sucres.

Dans un système d'analyse biologique, la détection est un procédé qui consiste à transformer un signal physico-chimique (la présence d'une molécule d'intérêt réagissant spécifiquement avec une molécule connue) en un signal physique qui peut être de nature variée : optique, mécanique, électrique, *etc.* *In fine*, ce signal physique est toujours lui-même affiché et enregistré par l'intermédiaire d'un signal électrique numérisé par un système électronique. La détection est un élément essentiel de tout système d'analyse biologique. Elle en conditionne fortement les performances, en particulier en terme de sensibilité (on aurait même parfois tendance, à tort, à considérer que la sensibilité n'est qu'un problème de détection). Elle en conditionne également fortement l'architecture physique et le protocole mis en œuvre⁷¹.

Actuellement, les modes de détection utilisés pour les puces à sucres sont assez limités et déjà connus pour leur utilisation dans la technologie des puces à ADN. Tout de même, deux types de méthodes de détection des interactions sucre / protéine sur support prédominant : la première utilisant un marqueur et la deuxième ne nécessitant aucun marquage de biomolécules (figure 18). Ces deux techniques se distinguent donc par la présence ou l'absence de marqueurs mais aussi par l'utilisation faite : contrairement à la technique avec traceurs qui a une lecture de l'interaction en point final (à l'instant t), celle sans traceur permet, en plus de savoir si l'interaction a lieu, de suivre la dynamique de l'interaction permettant notamment de remonter jusqu'à la mesure des constantes d'affinité.

Dans ce paragraphe, nous allons recenser et expliquer les différentes techniques mises en œuvre pour la mesure des interactions sucre / protéine, sur puces ou plus largement sur support solide. Rappelons ainsi que tous les systèmes de « puces » à sucres vus dans le paragraphe précédent ne sont pas multiparamétriques : dans ces systèmes, au moins un sucre est attaché à une surface, mais il faut bien différencier les systèmes présentant sur une même surface N spots de sucre des systèmes où ces N sucres sont déposés dans N « petits réservoirs » séparés, comme les microplaques par exemple.

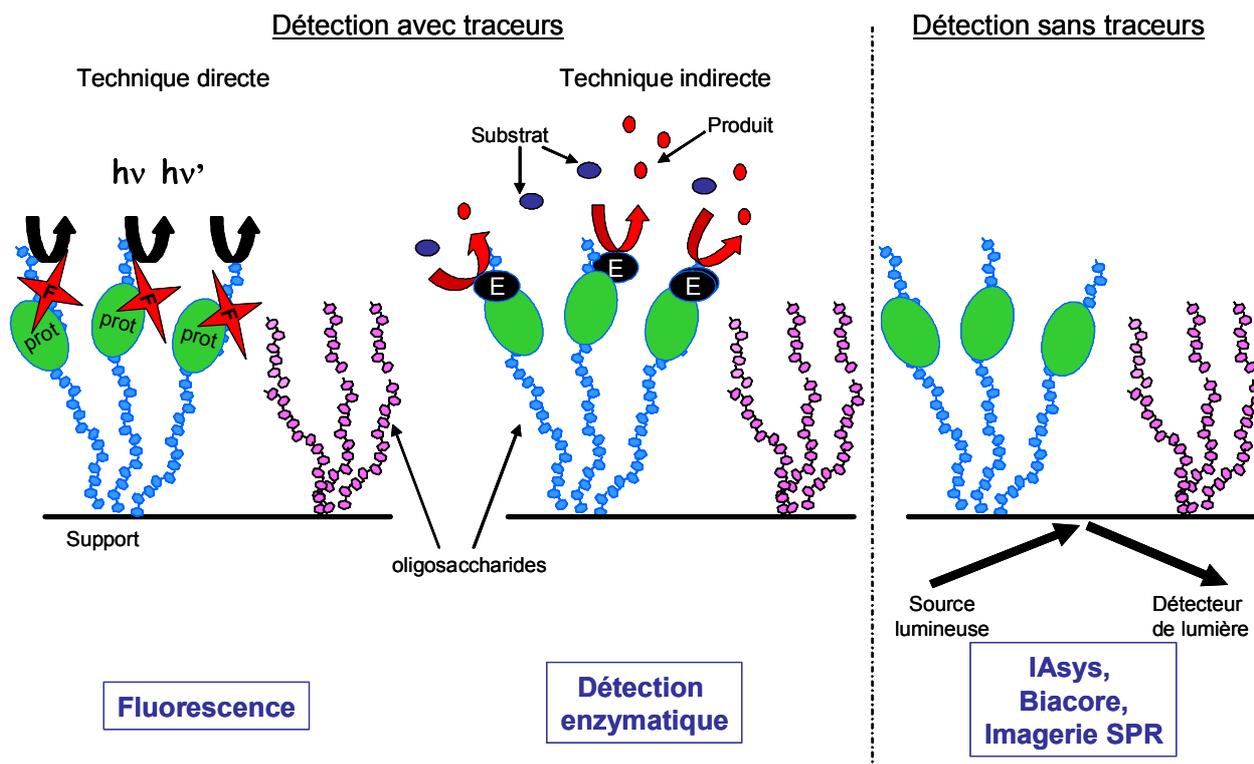


Figure 18 : les différentes techniques de détection utilisées avec la technologie d'immobilisation sur support d'un sucre. Sur le schéma, « prot » signifie protéine, « F » : le fluorophore, « E » : Enzyme ; l'enzyme transforme son substrat en un produit : quand l'oligosaccharide est compartimenté, par exemple dans les puits de microplaques, le produit formé est coloré permettant sa détection (très souvent par mesure d'absorbance. $h\nu$: lumière émise), l'autre possibilité est que les N sucres sont déposés sur la même surface, ce qui entraîne que le produit formé par l'enzyme précipite localement (mesures par densitométrie sur puces).

3.1. Les détections des interactions sucre - protéine utilisant un traceur

Les traceurs, comme leur nom l'indique, permettent de suivre une interaction. Comme les biomolécules mises en jeu dans l'interaction n'ont, à la base, aucune propriété spécifique pour le suivi de celle-ci, une des deux biomolécules impliquées doit subir une première étape de marquage. Un marqueur doit si possible répondre aux exigences suivantes :

- il doit être détectable de façon sensible par des instruments analytiques de faible coût et de manipulation aisée ;
- il doit être stable et permettre à la molécule marquée de rester soluble dans le milieu de dosage ;
- il doit autoriser un marquage simple, efficace, peu coûteux et conduire à un produit ayant une réactivité proche de la molécule non marquée ;

- il doit posséder une durée de vie élevée et être sans risque pour la santé du manipulateur ;
- il doit conduire à un bruit de fond minimal.

Il existe aujourd'hui de nombreux marqueurs performants et commercialisés comme les radio-isotopes, les molécules fluorescentes, les systèmes chimiluminescents ou encore les enzymes. Ceux-ci peuvent être répartis en deux classes : les marqueurs directement détectés et les marqueurs qui ne sont pas directement détectés.

3.1.1. Les techniques directes de détection avec marqueurs :

Bien qu'il existe d'autres techniques utilisables avec la technologie des puces, comme par exemple la radioactivité, celles-ci ne sont pas encore répertoriées dans la littérature, à l'heure actuelle, pour la détection sur puces des interactions sucre - protéine.

Ici, nous nous intéresserons seulement aux marqueurs fluorescents, utilisés dans la technologie des puces à sucres.

Les marqueurs possédant une propriété de fluorescence, développés dans le courant des années 1970, regroupent tous les marqueurs qui sont à l'origine d'une émission de lumière par le processus de fluorescence ; ils sont généralement non toxiques, stables et leur détection, qui nécessite un appareillage sophistiqué, est très sensible. La microscopie à fluorescence exploite la capacité qu'ont certaines molécules d'émettre de la lumière quand on les éclaire à une certaine longueur d'onde (*cf.* figure 18). Dans son principe, la lumière émise par une source de lumière blanche est filtrée pour isoler la longueur d'onde qui va exciter la préparation puis focalisée sur la zone d'observation par l'objectif. La lumière émise par l'échantillon excité est captée par l'objectif, filtrée pour isoler les longueurs d'ondes parasites qui pourraient brouiller le signal (comme la lumière incidente par exemple) puis observée.

Les techniques de fluorescence peuvent être 10 à 1000 fois plus sensibles que les méthodes spectrophotométriques (colorimétrie, absorbance). C'est grâce à la sensibilité de ces techniques, la facilité de manipulation et la compatibilité avec les scanners standard commerciaux que les fluorophores ont connu un développement rapide en tant que marqueurs dans les puces à ADN. Actuellement plusieurs compagnies, dont les plus connues sont Affymetrix⁷², Agilent⁷³ et Nanogen⁷⁴, commercialisent des instruments pour la détection par fluorescence et faciles à manipuler.

Typiquement, une puce à sucres peut être révélée par l'utilisation directe d'une protéine marquée par une molécule fluorescente. Par exemple les interactions réalisées par l'équipe de Mrksich⁴⁷ (figure 19a) utilisent la rhodamine, qui est préalablement fixée sur leur protéine d'intérêt ; ils détectent leurs interactions sur des puces à 8 spots en utilisant un scanner confocal. La détection par fluorescence leur permet de montrer la spécificité de l'interaction entre les différents oligosaccharides et les protéines (les endroits non modifiés par des sucres ne « brillent » pas sous la lumière du lecteur de fluorescence) ; notons simplement que cette étude ne conclut pas sur la sensibilité de détection de l'interaction.

L'équipe de Waldmann⁴², quant à elle, utilise la ligation de Staudinger afin d'immobiliser les sucres sur une surface de verre. Afin de détecter l'interaction avec un anticorps, ils déposent sur leur puce deux sucres : **1** (positif) et **2** (témoin négatif) à différentes concentrations, 7 lignes possédant chacune 8 fois le même plot. La lecture en fluorescence du marqueur Cy-5 fixé à la protéine d'intérêt montre la spécificité de reconnaissance, mais grâce à une gamme en concentrations de sucre déposé, ils peuvent conclure sur la sensibilité de la détection de l'interaction (histogramme de la figure 19b).

L'équipe de Shin⁴⁴ (figure 19c) montre par ses études en fluorescence la possibilité d'étudier sur les puces à sucres plusieurs interactions avec des protéines différentes, ayant des résultats comparables avec une technique de mesure des interactions en solution. Ils vont même plus loin en montrant que les interactions de trois protéines marquées par des fluorophores différents de façon simultanée sur une puce de 12000 microspots sont réalisables, et même si aucune valeur en sensibilité n'est donnée, cette équipe arrive à obtenir par cette étude des valeurs d'IC₅₀ (Inhibition de l'interaction de 50% à la concentration c).

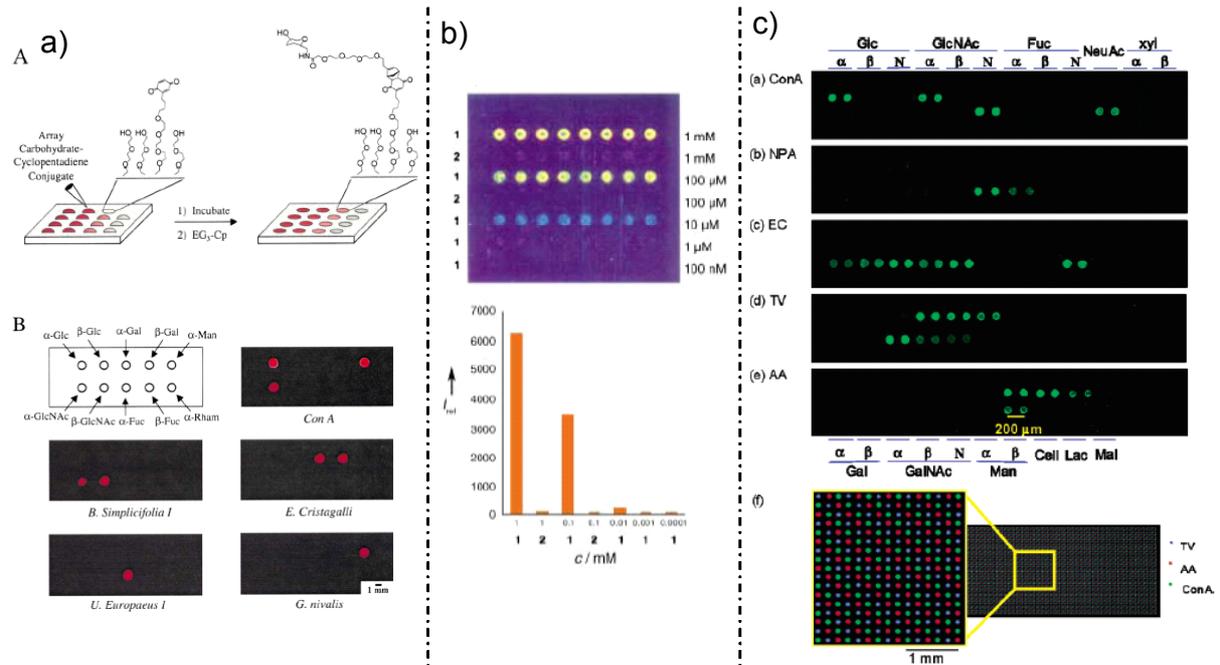


Figure 19 : Figures issues des trois publications données en exemple : **a)** Equipe de Mrksich⁴⁷ : étude de la fixation spécifique d'une lectine sur la puce à sucres, (A) : les puces à sucres sont préparées en spottant les différentes solutions de sucres modifiés par un diène, en des régions particulières de la monocouche présentant des groupes benzoquinone. Une fois la réaction faite, les benzoquinones n'ayant pas réagi sont désactivées par un traitement de la surface ; (B) : les mêmes puces à sucres séparément incubées pendant 30 min avec chacune des lectines marquées par la Rhodamine, puis rincées et lues grâce à un microscope à fluorescence confocale. Les images en fluorescence des cinq interactions montrent que les protéines s'associent de façon spécifique à leurs ligands sucres connus. **b)** Equipe de Waldmann⁴² : fixation des anticorps IgG marqués par la Cy-5 sur les composés sucrés **1** et **2** (témoin négatif) immobilisés sur une surface de verre par la ligation de Staudinger. L'histogramme représente les intensités du signal par quantification de la fluorescence de Cy-5. **c)** Equipe de Shin⁴⁴ : Images obtenues par fluorescence de puces à sucres contenant 22 sucres différents, en interaction avec cinq protéines différentes : (a), (b), (c), (d) et (e) ; (f) : image en fluorescence d'une puce de 12000 microspots (60x200), contenant trois sucres et interagissant avec un mélange de trois protéines marquées par trois fluorophores différents. Les symboles a et b signifient que les sucres sont reliés à la surface au travers d'un atome d'oxygène par leur position anomérique, N pour les sucres reliés *via* un azote.

Ces trois exemples de détection directe avec marqueurs fluorescents confirment le potentiel d'utilisation de tels traceurs. Mais l'inconvénient de telles détections reste la lecture par des machines sophistiquées et par point final des interactions.

3.1.2. Les techniques indirectes de détection avec marqueurs

Les enzymes font partie des principaux représentants de cette classe de marqueurs essentiellement utilisés à des fins d'amplification du signal. Dans ce cas, ce n'est pas le marqueur lui-même qui est détecté mais le produit fabriqué en grande quantité à partir du substrat de l'enzyme (*cf.* figure 18).

Les marqueurs enzymatiques (apparus en même temps que les marqueurs fluorescents) sont aujourd'hui les traceurs les plus répandus en immunoanalyse. Leur popularité résulte de leurs propriétés catalytiques exceptionnelles et de leur polyvalence vis-à-vis des différents modes de détection.

Les enzymes sont en effet des catalyseurs biologiques qui convertissent efficacement un substrat en un produit (une seule enzyme peut catalyser en une minute plus de 10^7 molécules de substrats).

Contrairement aux marqueurs à détection directe, les enzymes ne sont pas liées à une technique particulière. Ainsi il est possible d'envisager pour une même enzyme plusieurs modes de détection (fluorescence, luminescence, ampérométrie, colorimétrie, densitométrie) en fonction des différentes variétés de substrats qu'elle admet. Actuellement, en mode de détection enzymatique des interactions sucre - protéine sur support, l'équipe de Wong³⁹ utilise sur son format de microplaques, la capacité qu'a une enzyme marquant la protéine, qui interagit avec le sucre fixé, pour transformer un substrat en un produit soluble coloré. Ils exploitent ce système pour déterminer la quantité optimale de sucres liés dans chaque puit de la microplaque (ayant une bonne reconnaissance avec la protéine marquée) et terminent en réalisant une étude d'inhibition de l'interaction et d'en déduire une valeur d'IC₅₀, comparable à celle trouvée par une étude en solution.

L'équipe de Fukui³⁷, qui développe des puces à sucres sur membrane de nitrocellulose, réalise des études d'interactions avec 5 anticorps et 4 protéines : premièrement, il y a reconnaissance protéine / sucre suivie d'un rinçage, puis ajout d'un anticorps marqué (reconnaissant la protéine précédente) par une enzyme suivi d'un deuxième rinçage. Une fois le « sandwich » de biomolécules construit, le substrat spécifique de l'enzyme est rajouté et transformé par l'enzyme en produit insoluble, qui précipite sur les zones précises où a eu lieu l'interaction ; cette réaction est stoppée et la puce est lue sous un densitomètre. Peu de valeurs sont publiées dans cet article : ils ont essentiellement travaillé sur la spécificité et non sur la sensibilité.

Cependant, les marqueurs enzymatiques ont, eux aussi, leurs propres inconvénients : ce sont des protéines, donc des molécules de grande taille relativement fragiles et de durée de vie limitée ; certaines substances présentes dans l'échantillon peuvent être inhibitrices ; le bruit de fond peut être important (présence d'enzymes dans l'échantillon à doser ou existence d'adsorption non spécifique).

Quelques équipes étudiant les interactions sucre - protéine sur puces utilisent une détection en fluorescence en deux étapes : la première consiste en l'utilisation d'une protéine marquée par une molécule non fluorescente qui sera ensuite détectée par un élément fluorescent se fixant sur celle-ci (exemple : streptavidine marquée reconnaissant la biotine : Glycominds^{68,69}). L'équipe de Willats³⁶ utilise la détection indirecte sur ses puces à sucres faites sur polystyrène (115 plots = 23 sucres reproduits 5 fois à la même densité), la première étape est l'interaction proprement dite, entre l'anticorps cible et le sucre immobilisé ; la deuxième étape consiste à faire réagir un anticorps marqué par fluorescence sur le premier anticorps. Ils comparent leurs résultats (limite de détection en concentrations, en quantité et format d'utilisation) à ceux généralement obtenus par la technique ELISA ou par l'« immunodot assay ».

Cependant, la fluorescence présente un inconvénient majeur : elle nécessite une étape de marquage de la protéine, qui est longue, onéreuse et pouvant entraîner la modification des propriétés du matériel biologique utilisé, comme par exemple, la modification de la structure ou la capacité de reconnaissance.

En résumé, ces techniques de détection directe ou indirecte avec traceurs sont très sensibles (mais chers) et nécessitent des étapes préliminaires de marquage, risquant de dénaturer ou du moins de modifier l'interaction sucre-protéine étudiée. C'est pour ces raisons que, de nouvelles techniques optiques, cette fois-ci sans traceurs, ont été développées. Elles évitent ainsi le marquage de biomolécules au préalable et elles permettent de suivre en temps réel la dynamique des interactions étudiées.

Dans le paragraphe suivant, ces techniques optiques sans traceurs vont être explicitées, leurs principes physiques décrits et leurs applications développées succinctement.

3.2. Les techniques optiques de détection sans traceurs

Bien qu'il existe d'autres méthodes qui ne requièrent aucun traceur et permettent de suivre en temps réel les interactions, comme la microbalance à quartz, la microcalorimétrie ou l'électrochimie, celles-ci semblent être moins développées que les **techniques optiques** pour l'application à la détection d'interactions biologiques analysant en temps réel. De plus, comme les méthodes avec traceurs nécessitent une mise en place longue et parfois complexe et chère, les techniques optiques de détection sans traceurs suscitent un nouvel intérêt depuis une quinzaine d'années.

Elles permettent d'analyser en temps réel de nombreuses interactions en évitant les étapes de marquage pouvant dénaturer la protéine ou du moins modifier l'interaction, un autre avantage est que les mesures sont réalisées sans contact, ce qui n'affecte pas les propriétés intrinsèques des molécules. Ces techniques optiques se basent (comme le montre la figure 20) sur la mesure d'une interaction entre un ligand immobilisé et des biomolécules en solution non modifiées ; l'information issue du phénomène biologique est transmise *via* la surface du capteur vers le détecteur optique, qui à son tour va transmettre l'information sous forme de signal électronique vers un ordinateur collectant toutes les données utiles pour l'expérimentateur. Ces techniques donnent donc des informations sur la dynamique de l'interaction mesurée : la cinétique de l'association et de la dissociation. Nous allons maintenant détailler les techniques optiques qui permettent d'apporter cette solution, celles-ci étant généralement basées sur des phénomènes de propagation d'ondes évanescentes.

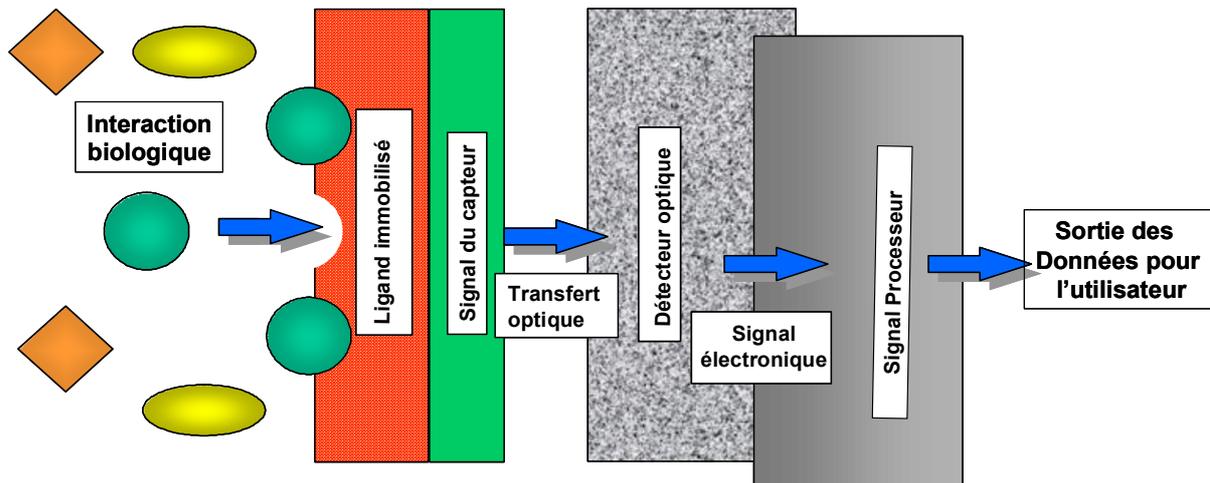


Figure 20 : Diagramme schématique d'un capteur optique

3.2.1. Introduction au phénomène optique : l'onde évanescente

Une onde évanescente est obtenue lorsque une onde incidente, issue du milieu le plus réfringent (verre) et se déplaçant vers un milieu moins réfringent (air ou eau), arrive sur l'interface sous un angle d'incidence supérieur à l'angle de réfraction limite. On a donc dans ce cas, une réflexion totale accompagnée de la propagation d'une onde évanescente de surface. L'amplitude de l'onde évanescente décroît exponentiellement en fonction de sa distance à l'interface (sur une profondeur Δz_c , figure 21) siège des interactions biomoléculaires ; elle n'est pas, de ce fait, sensible aux perturbations situées hors de cette

limite. L'utilisation des champs évanescents permet donc de sonder en temps réel les changements d'indice de réfraction, d'épaisseur de couche, d'adsorption et de fluorescence causés par des réactions se produisant à une distance d'au plus quelques centaines de nanomètres de la surface. L'adsorption de molécules sur l'interface va perturber la propagation de l'onde évanescente, entraînant des variations de phase et d'amplitude du faisceau réfléchi. Aucun marqueur n'est nécessaire pour effectuer ces mesures, ce qui permet une approche dynamique de la réaction étudiée. De plus, ces mesures ne perturbent pas l'interaction et les interactions peuvent donc être suivies en temps réel.

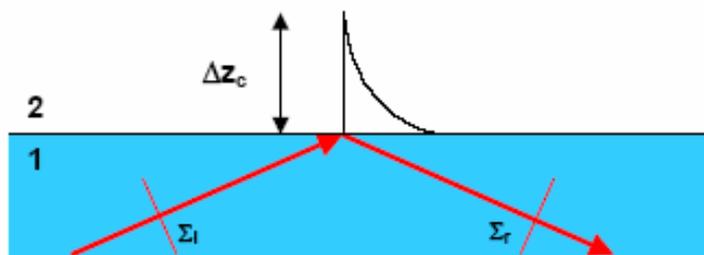


Figure 21: Onde évanescente. Le faisceau lumineux (plan d'onde Σ_i), totalement réfléchi à l'interface entre deux milieux crée une onde évanescente confinée sur une profondeur Δz_c dans le milieu 2 ($\Delta z_c \approx$ quelques centaines de nanomètres)

3.2.2. Le procédé IAsys

La société Affinity Sensors s'intéresse aux biocapteurs à ondes évanescentes depuis le milieu des années 1980. En 1987, la compagnie a débuté une collaboration scientifique avec GEC-Marconi et l'Institut de Biotechnologie (Université de Cambridge), afin de développer une nouvelle génération de biocapteurs à ondes évanescentes, le miroir résonant, donnant lieu à la technologie unique IAsys® (figure 24 b).

Les biocapteurs à miroir résonant ont pour but de combiner la sensibilité améliorée des capteurs à guide d'onde avec la facilité d'utilisation des capteurs SPR (Résonance des Plasmons de Surface, cf. II.3.2.3.) pour analyser en temps réel et sans marqueurs les interactions biologiques. Nous allons maintenant décrire le phénomène de guide d'onde servant à ce procédé.

a) Le guide d'onde

Un guide d'onde diélectrique est composé d'un film mince de réfraction élevé n_f (structure guidante) encadré de deux milieux diélectriques d'indices de réfraction plus faibles. Lorsqu'un guide d'onde est utilisé en tant que biocapteur, les deux milieux encadrant la structure guidante sont les suivants : le premier, d'indice n_s , est le substrat sur lequel est déposé le film mince tandis que le second, d'indice n_c , constitue le milieu couvrant dans lequel vont se produire les interactions biomoléculaires (figure 22).

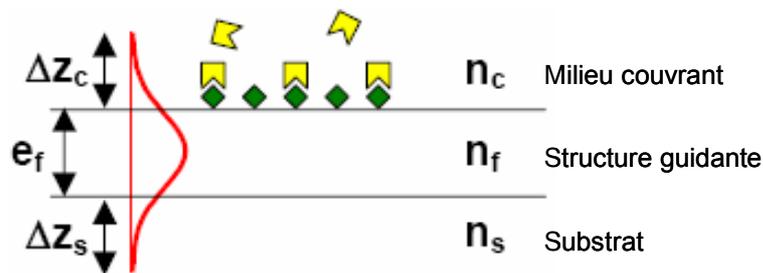


Figure 22 : Propagation d'une onde lumineuse dans un guide d'épaisseur e_f et d'indice de réfraction n_f . En rouge est représenté le profil d'amplitude du mode 0 en polarisation TE (profil sinusoïdal). Δz_s et Δz_c représentent la profondeur de pénétration de cette onde respectivement dans le substrat d'indice n_s et dans le milieu couvrant d'indice n_c , lieu des interactions entre les sondes (vert) et les cibles (jaune)

b) Miroir résonant

Un biocapteur à miroir résonant consiste en un guide d'onde diélectrique où l'onde lumineuse est couplée par un prisme. En pratique, nous avons un prisme sur lequel est déposée une structure guidante du type de la figure 23. Généralement, ce guide d'onde est composé d'une couche de quelques centaines de nanomètres de SiO_2 faisant office de milieu de faible indice n_s et d'une couche d'une centaine de nanomètres de TiO_2 (milieu guidant d'indice de réfraction n_f plus élevé) recouverte du milieu couvrant biologique. Le principe des biocapteurs à miroir résonant est le suivant⁷⁵ : un faisceau lumineux, polarisé à 45° du plan d'incidence pour que ses composantes TM (transversale magnétique) et TE (transversale électrique) soient de même amplitude, est réfléchi totalement sur un prisme. Un couplage efficace dans le guide se produit lorsqu'il y a accord de phase entre le faisceau incident et les modes résonants de la couche d'indice de réfraction élevé (signalons que les conditions de couplage sont différentes en polarisation TE et TM).

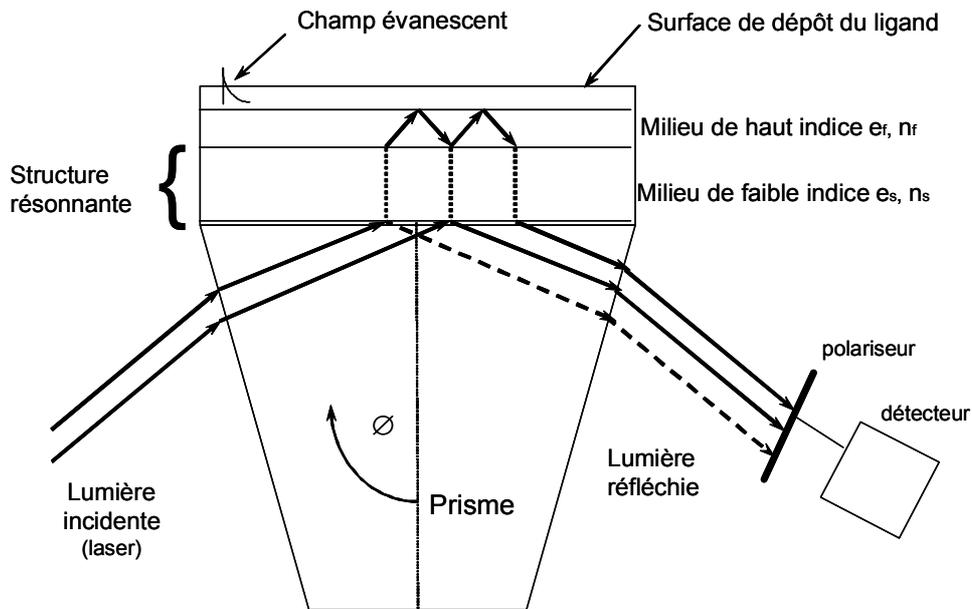


Figure 23 : Biocapteur basé sur les miroirs résonnants. Un faisceau incident polarisée à 45° du plan d'incidence (décomposé en polarisation TE et TM) est couplé à un guide d'onde *via* un prisme. Ce faisceau est réfléchi puis le signal issu de l'interférence entre les composantes est mesuré (analyseur + détecteur). Si l'angle d'incidence est différent de l'angle de résonance TE ou TM, le faisceau est réfléchi directement par le prisme (rayon en pointillés). Si l'angle d'incidence est celui de résonance, une des deux composantes se propage dans le guide puis est réfléchie, ce qui se traduit par un retard de phase de cette composante (rayons en trait plein).

Ce couplage dans la couche d'indice de réfraction élevé s'effectue par un transfert de l'énergie du faisceau incident au travers de la couche de faible indice de réfraction grâce à l'onde évanescente résultante de la réflexion totale. L'épaisseur e_s , de la couche de faible indice, qui forme une barrière entre le prisme et le guide, va donc influencer directement sur le rendement de couplage. Bien sûr, le principe de retour inverse de la lumière explique que plus l'énergie de faisceau passe facilement dans le guide, plus l'énergie contenue dans le guide peut retourner facilement dans le prisme.

Comme le miroir résonnant est un système sans perte (en réalité un système à faibles pertes en raison de sa rugosité et de son absorption résiduelle), la résonance ne se traduit pas par un pic d'absorption dans la courbe de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence mais par un saut de phase de la lumière réfléchie à la résonance. Physiquement, en dehors des conditions de résonance, le faisceau est totalement réfléchi par le prisme sans être influencé par le guide tandis que, dans les conditions de résonance, il est aussi totalement réfléchi par le prisme mais après s'être propagé très brièvement dans le guide, d'où le déphasage (figure 23). La phase du faisceau incident subit un changement de 2π en passant par la résonance. La

position de ce saut de phase peut alors être mesurée de manière interférentielle pour suivre les changements au niveau du milieu extérieur.

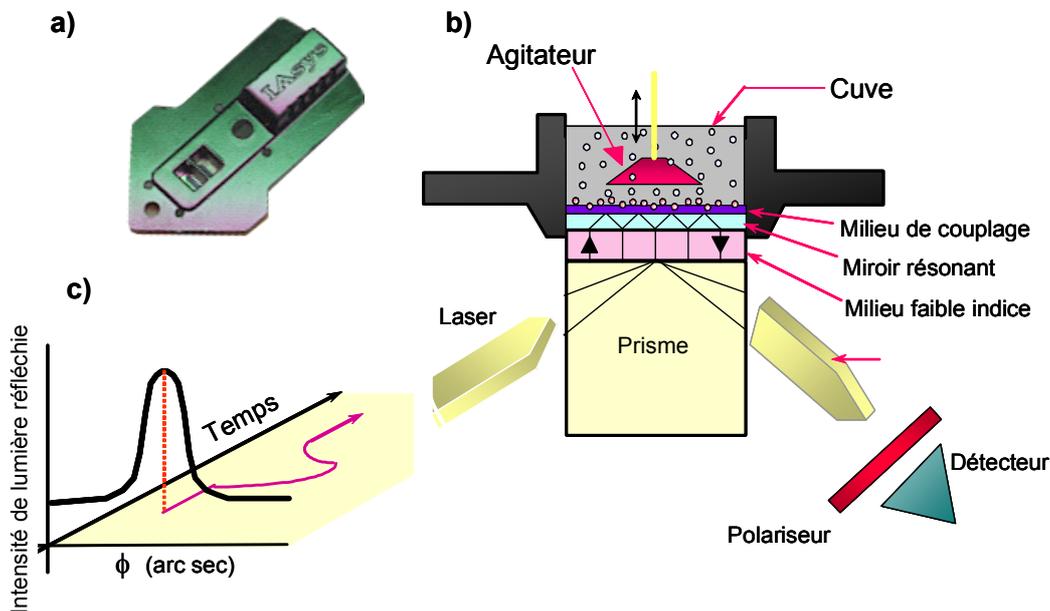


Figure 24 : a) Photo d'une puce du procédé IAsys ; b) Principe de la technologie IAsys avec le prisme, le guide d'onde et la cuve au-dessus du montage permettant de réaliser des interactions biomoléculaires ; c) L'analyseur à 45° du plan d'incidence donne un signal nul en dehors de la résonance et des pics de lumière étroits autour de la résonance, ensuite la position de ces pics évolue en fonction du temps.

Ces changements de phase sont habituellement mesurés par des méthodes interférométriques. Comme les résonances TM et TE sont largement séparées, ces deux polarisations peuvent servir de référence l'une pour l'autre⁸³. De plus, ces deux ondes suivent un chemin identique, ce qui annule les autres causes possibles de variation et ont la même amplitude, ce qui maximise le contraste. Un simple analyseur à 45° du plan d'incidence nous donne un signal nul en dehors de la résonance et des pics de lumière étroits autour de la résonance (figure 24c).

La résolution pouvant être obtenue est déterminée par la largeur de la résonance et donc par les pertes intrinsèques du système (absorption, diffusion, couplage au prisme,...).

Les miroirs résonants dont le principe physique semble tout aussi intéressant que celui de la SPR démontrent une sensibilité au moins équivalente et une utilisation aussi aisée que les capteurs SPR (exemples d'utilisation du IAsys :^{76,77}). Les applications biologiques ont cependant été moins développées ; cela semble dû en grande partie, au manque de moyens existant pour fonctionnaliser des couches d'oxyde de titane avec des biomolécules, mais également à cause des difficultés de parallélisation de ce procédé.

3.2.3. La résonance des Plasmons de Surface (la SPR)

La résonance des plasmons de surface est une méthode optique exploitant les ondes électromagnétiques de surface pour sonder les variations de masse, d'indice et d'épaisseur survenant à l'interface entre un métal et un diélectrique. Rappelons que cette technique, tout comme le procédé IAsys, ne nécessite pas le marquage des biomolécules (traceur fluorescent ou radioactif), pouvant les dénaturer.

De ce fait, les interactions spécifiques entre les molécules sondes et les molécules cibles peuvent être détectées directement dans des mélanges complexes, sans aucune transformation préalable. En outre, l'analyse des cinétiques d'interactions biomoléculaires apporte des informations essentielles sur la dynamique de ces interactions. Les champs d'application actuels couverts par cette technique concernent : les associations ligand / récepteur, ADN / protéine, ADN / ADN incluant la détection des mutations, ainsi que la caractérisation des anticorps monoclonaux et polyclonaux.

a) Historique de la résonance des plasmons de surface :

En 1902, Wood, en observant le spectre d'une source continue de lumière blanche en utilisant un réseau de diffraction en réflexion, remarque de fines bandes sombres dans le spectre diffracté⁷⁸. Des analyses théoriques entreprises par Fano⁷⁹, en 1941, ont abouti à la conclusion que ces anomalies étaient associées aux ondes de surface (plasmons de surface) supportées par le réseau. C'est en 1968 qu'Otto⁸⁰ montre que ces ondes de surface peuvent être excitées en utilisant la réflexion totale atténuée. Dans la même année, Kretschmann et Raether⁸¹ obtiennent les mêmes résultats à partir d'une configuration différente de la méthode de réflexion totale atténuée. Suite à ces travaux, l'intérêt pour les plasmons de surfaces a considérablement augmenté, en particulier pour caractériser les films minces et pour l'étude de processus se déroulant sur des interfaces métalliques. Marquant un tournant dans les applications des plasmons de surface, Nylander et Liedberg, ont exploité pour la première fois, en 1983, la configuration de Kretschmann pour la détection des gaz et de biomolécules⁸². Les nombreuses possibilités ouvertes dans ce domaine et le besoin de plus en plus important d'appareils robustes et fiables permettant la compréhension des phénomènes biomoléculaires ont donné naissance à des entreprises spécialisées dans la vente d'appareils SPR (tableau 2), telles que Biacore International⁸³ créée dès 1990.

Entreprises développant la SPR Adresses Internet	Nom de la machine	Systèmes
BIAcore AB (Suède) http://www.biacore.com	BIAcore	monocapteur, 4 canaux indépendants
Affinity Sensors (USA) http://www.affinity-sensors.com	IAsys	monocapteur, 1 cuvette
Artificial Sensing Instruments (Suisse) http://www.microvacuum.com/products/biosensor	OWLS	monocapteur
IBIS technologies BV (Pays-Bas) http://www.ibis-spr.nl	IBIS	Imagerie SPR / multiparamétrique
Texas Instruments (USA) http://www.ti.com/spreeta	TISPR-Spreeta	Monocapteur / 1 ou 3 canaux
Genoptics (France) http://www.genoptics-spr.com	Interactor / SPRiLab	Imagerie SPR / multiparamétrique
GWC Technologies (USA) http://www.gwctechnologies.com/	SPRimager ® II	Imagerie SPR / multiparamétrique

Tableau 2 : tableau récapitulant toutes les entreprises s'investissant dans la technique des capteurs optiques sans marqueurs.

Depuis l'introduction sur le marché de ces instruments SPR, BIAcore a un quasi monopôle du marché grâce à la matrice de dextran comme support et les surfaces fonctionnalisées par la streptavidine⁸⁴.

Même si des milliers de publications⁸⁵ démontrent la polyvalence et la robustesse de ces surfaces, il s'avère que certains systèmes ne sont tout simplement pas compatibles avec ces stratégies d'immobilisation. Par conséquent, plusieurs procédés commerciaux de puces (nouvelles surfaces et / ou nouvelles chimies d'immobilisation) sont apparus depuis quelques années, permettant de nouvelles applications basées sur la SPR⁸⁶ (cf. tableau 2). Remarquons que dans ce tableau récapitulant les différentes machines optiques mises sur le marché, peu d'entre elles sont capables d'obtenir des mesures multiparamétriques.

Ces techniques permettent l'analyse des interactions biomoléculaires avec une large gamme de poids moléculaires, d'affinités et de vitesses d'association, et elles sont compatibles avec un grand nombre d'environnements chimiques possibles.

b) Théorie de la SPR :

Un plasmon de surface est une onde de densité de charge longitudinale le long de l'interface de deux milieux, où l'un est un métal et l'autre un diélectrique. Les métaux

appropriés peuvent être l'argent, l'or, le cuivre et l'aluminium ; les plus communément utilisés sont l'or et l'argent : l'argent pour son pic de résonance pointu et l'or pour sa grande stabilité⁸⁷.

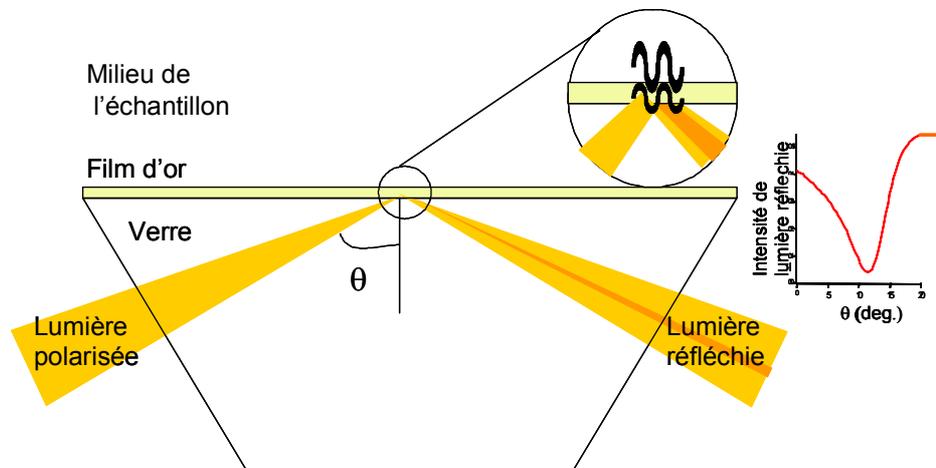


Figure 25 : Schéma de la configuration de Kretschmann pour la SPR. La résonance d'un plasmon de surface a lieu à l'interface métal / milieu de l'échantillon, pour un certain angle d'incidence θ de la lumière polarisée.

La configuration la plus développée pour les instruments SPR est celle de Kretschmann. Celle-ci repose sur le phénomène de réflexion interne totale. Elle a lieu quand la lumière traversant un milieu optiquement dense (exemple le verre) atteint une interface entre ce milieu et un autre de plus bas indice (comme l'air ou l'eau), et est réfléchié dans le milieu dense. Alors que la lumière incidente est totalement réfléchié, un composant de cette lumière, l'onde ou champ évanescent, pénètre l'interface vers le milieu le moins dense à une distance d'une longueur d'onde ; cette onde diminue exponentiellement à partir de l'interface dans le milieu moins dense. En SPR, une source de lumière monochromatique, polarisée p (= TM) est utilisée et l'interface entre les deux milieux est recouverte par un film mince métallique (d'une épaisseur inférieure à celle d'une longueur d'onde de la lumière) ; l'intensité de la lumière réfléchié est réduite à un angle incident spécifique (appelée angle de résonance des plasmons de surface), extinction due au transfert de l'énergie de résonance entre l'onde évanescente et les plasmons de surface. Les conditions de résonance sont sous l'influence du matériel adsorbé sur le film métallique (figure 25), ou plus exactement une relation linéaire a été trouvée entre l'énergie de résonance et la concentration en masse des molécules d'intérêt biologique, comme les protéines, l'ADN ou les sucres⁸⁸. Le signal SPR exprimé en réflectivité (ou unités de résonance : RU) est en fait une mesure indirecte de la concentration en masse à la surface de la puce. Cela signifie que l'association et la

dissociation du complexe analyte / ligand peuvent être observées et qu'ultérieurement, les constantes comme celle de l'équilibre peuvent être calculées.

3.2.4. Procédé Biacore

De par sa mise en œuvre simple et sa sensibilité, le phénomène de plasmons de surface a été appliqué, dès le début des années quatre-vingt, à la reconnaissance d'interactions biologiques. Les années quatre-vingt dix ont vu naître un grand nombre de capteurs biochimiques alliant la résonance des plasmons de surface à une chimie préparant la couche réceptrice biosensible. Cette technologie a débouché sur une instrumentation notamment commercialisée par Pharmacia sous le nom de BIACore⁸⁹ (cf. figure 26). Cette société a réalisé des capteurs performants mais qui, malheureusement, ne permettent de réaliser que trois mesures (et un témoin) à la fois.

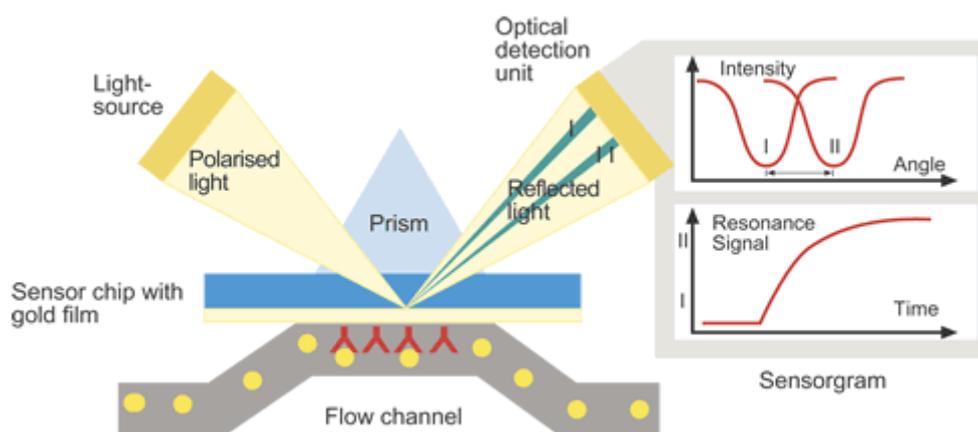


Figure 26 : principe de l'appareil BIACore® : gauche : principe du montage, à droite : en haut : courbe de plasmons, en bas : « sensorgram » en fonction du temps.

L'instrument Biacore a pour fonction la visualisation en temps réel des interactions entre des biomolécules non marquées, allié à un système fluide, permettant de faire passer sur la puce un flux de solutions diverses à débit continu (exemples :⁹⁰). Un des réactifs, le ligand, est retenu de manière spécifique sur l'interface appelée « sensor chip ». Les « chips » Biacore les plus utilisés sont constituées d'un support de verre recouvert d'or fonctionnalisé par un biopolymère, le dextran carboxyméthylé (cf. méthode dépôt sur dextran I.2.2.2.). Les analytes sont, eux, injectés à débit constant par un circuit microfluidique au contact de cette interface. Les changements de masse induits par l'association ou la dissociation des complexes modifient la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle de résonance. L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance permet de

suivre en temps réel la fixation de molécules injectées sur la puce. L'enregistrement de ce signal s'appelle un sensorgramme⁹¹.

3.2.5. Applications de la technique SPR : Montages utilisés pour la mesure d'interactions sucres - protéines

Plusieurs équipes de recherche ont développé leur propre système de détection par SPR (non commercial). Les premiers articles mentionnant l'imagerie SPR datent de 1988⁹² et le nombre de publications utilisant ce dispositif dans une grande variété d'applications n'a cessé d'augmenter depuis^{93,94,95,96,97}.

Rappelons que la condition de résonance de plasmons de surface donne une relation entre l'angle d'incidence et la longueur d'onde. Lorsqu'une interaction biomoléculaire se produit, elle provoque une perturbation locale de l'indice du milieu diélectrique et va donc changer les conditions de résonance. La méthode de mesure la plus répandue en imagerie SPR consiste à suivre, pour un angle d'incidence et une longueur d'onde fixés, les variations de la réflectivité dues au déplacement du pic d'absorption de la SPR, méthode appelée interrogation en réflectivité. En effet, il existe aussi l'imagerie en configuration d'interrogation angulaire qui consiste à réaliser un balayage au rythme de la vitesse de d'acquisition de la caméra, mais la difficulté de mise en œuvre de cette méthode rend cette technique incompatible avec la durée des interactions mesurées.

Actuellement, seulement quelques équipes semblent utiliser la technique de l'imagerie SPR (non commerciale) pour réaliser des études sur des interactions sucre - protéine : l'équipe de R.M. Corn⁵⁵ et celle de Russell⁵¹ utilisant le montage de Knoll^{98,99}.

Le groupe de Russell développe des couches auto-assemblées sur surface d'or, sur lesquelles sont immobilisées des sucres de manière covalente, aucune caractéristique sur une formation de matrices de plots n'est donnée. Il démontre cependant qu'une telle surface est capable d'interagir sélectivement avec une protéine spécifique grâce notamment à leurs expériences faites avec le montage SPR. Cette technique leur permet de mesurer, par la mesure en réflectivité, les épaisseurs de chaque couche : avant et après la formation de la couche auto-assemblée avec des sucres et après l'interaction entre la protéine et les sucres fixés (figure 27a).

L'équipe dirigée par Corn qui travaille déjà avec l'imagerie SPR depuis plusieurs années, s'est attachée à développer sa propre fonctionnalisation de surface pour y attacher

des sucres (après avoir fixé de l'ADN, des peptides...). Ils sont allés jusqu'à développer deux systèmes fluidiques couplés à leur montage SPR, l'un pour le dépôt des sucres, l'autre pour la circulation des produits lors de l'étude en imagerie SPR. Comme le rappelle la figure 27b, le système fluidique permet lors de l'étape 3 d'immobiliser les sucres, l'étape 4 sert à enlever le moule des canaux et rendre inerte le reste de la surface, et ensuite l'imagerie SPR permet de visualiser (en jaune) les sucres déposés reconnaissant une protéine. Constatons tout de même que ce type d'imagerie SPR ne possède pas réellement un format puce portant des plots. Par leurs études, ils arrivent à construire des isothermes d'adsorption pour l'interaction sucre - protéine étudiée, ils enregistrent la fixation des protéines sur la surface de façon spécifique et obtiennent des valeurs de constante de dissociation.

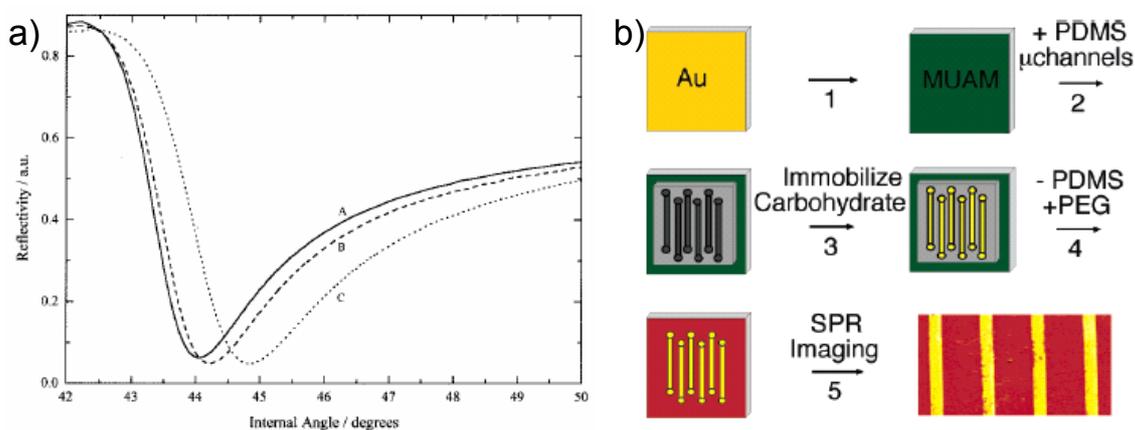


Figure 27 : Figures issues des deux articles présentés en exemple : **a)** Résultats en SPR obtenus par Russell *et al.* ; courbes de réflectivité en SPR pour (A) le substrat d'or seul, (B) le substrat d'or + la couche auto-assemblée avec les sucres, (C) la surface après l'interaction avec la protéine. **b)** Rappel de la technique d'immobilisation utilisée par Corn *et al.* ; partant d'une surface d'or, celle-ci est recouverte d'amine thiols (1), ensuite le film est recouvert d'un moule en PDMS où sont dessinés des microcanaux fluidiques (2) ; les solutions de sucres à immobiliser traversent les canaux, et les sucres se fixent (3) ; le moule est retiré et les amine-thiols n'ayant pas réagi sont protégés par une couche de PEG (4) ; visualisation des sucres immobilisés ainsi que leur interaction en imagerie SPR (5).

3.3. Conclusion

Dans cette partie, nous avons pu voir les différents modes de détection utilisés par les équipes réalisant des études sur les interactions sucre / protéine avec immobilisation du sucre sur un support. Les modes de détection sans traceur commencent à supplanter les techniques utilisant des traceurs, pour des raisons de suivi en cinétique plus simple (même s'il existe la possibilité de suivre la dynamique des interactions par fluorescence).

Depuis plus d'une dizaine d'années, les biologistes étudiant les sucres ont énormément eu recours au procédé BIAcore (procédé fonctionnant avec quatre canaux

indépendants comme quatre capteurs monopoints). Depuis peu, leurs objectifs d'études devenant de plus en plus pointus (comme par exemple trouver les séquences spécifiques d'interaction avec une protéine), ils essaient de développer de nouveaux systèmes leur permettant d'étudier la dynamique de nombreuses interactions simultanément et il s'avère que la technique optique sans traceur qu'est la SPR ou plutôt l'imagerie SPR leur permet d'atteindre leurs objectifs. Tout de même l'imagerie SPR développée par Corn *et al.* reste cependant limitée par la microfluidique utilisée et la chimie de couplage et, malgré son principe, aucune donnée cinétique n'est indiquée.

Il y a encore du chemin à parcourir pour développer des systèmes de détection aussi performants pour la "glycomique" que pour l'ADN ou les peptides/protéines ; actuellement les scientifiques académiques tout comme les industriels, travaillant dans les secteurs pharmaceutiques du diagnostic ou des sciences de la vie, développent de plus en plus des techniques optiques sans traceur pour l'analyse de petites molécules, des protéines, des oligonucléotides, des bactériophages, des virus, des bactéries et des cellules¹⁰⁰. Ces nouvelles techniques de détection permettent la prédiction de certains paramètres pharmacocinétiques d'une molécule (adsorption, distribution, toxicité...) mais encore trop souvent à l'échelle d'un seul échantillon par test, il devient donc judicieux de développer un capteur qui répond aux exigences suivantes : immobilisation de biomolécules sur une surface, détection directe, sans traceur et multipoints (N échantillons sur un seul substrat).

4. Les Sucres : les Glycosaminoglycanes sulfatés

Depuis que le génome humain a été décodé, le domaine de la protéomique a émergé, la protéomique étant l'étude de l'ensemble des protéines fabriquées par les gènes. Les protéines sont les acteurs essentiels des mécanismes cellulaires, et leur dysfonctionnement entraîne de nombreuses maladies. Pour les traiter, on peut soit corriger le gène incriminé, mais les premières tentatives ont été décevantes, soit tenter de normaliser la protéine qu'il code. La protéomique ouvre ainsi la voie à de nouveaux traitements. Toutefois, si les gènes et les protéines jouent un rôle capital, deux autres catégories de molécules, les sucres et les lipides, sont aussi essentielles. Pour comprendre comment fonctionne la « machinerie » humaine et pour la réparer si nécessaire, de plus en plus d'études sont réalisées afin de connaître et comprendre ces substances. Nous allons maintenant nous intéresser à décrire les sucres ou plus exactement une classe de sucres jouant un rôle important au niveau physiologique.

Dans le domaine du vivant, les carbohydrates ou sucres constituent un domaine dont l'importance et l'étude ne cessent de s'accroître depuis plusieurs années¹⁰¹. Cette classe de molécules est en effet l'une des plus abondantes, des plus largement réparties et fonctionnellement, des plus diverses. De façon générale, les carbohydrates sont caractérisés par leur très grande diversité structurale.

Les sucres remplissent des fonctions très variées. Autrefois, ils étaient seulement considérés comme des molécules pourvoyeuses d'énergie, libérant du glucose immédiatement consommé ou stocké sous forme de glycogène, remplissant aussi un rôle structural, comme par exemple dans le cartilage. A l'heure actuelle, il est avéré que les sucres sont associés aux protéines et aux lipides au niveau de la surface cellulaire, qu'ils participent aux fonctions physiologiques et pathologiques⁹. Ces sucres sont ubiquitaires, présents à la surface de toutes les cellules de l'organisme.

Dans ce paragraphe, nous allons nous intéresser à une famille de sucres, les glycosaminoglycanes sulfatés, dont fait partie l'héparine, possédant une activité anti-coagulante reconnue et exploitée depuis plus d'une soixantaine d'années.

4.1. Les Glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs)

Il existe, notamment chez les mammifères, une catégorie de sucres possédant un rôle physiologique important, ce sont les glycosaminoglycanes sulfatés (GAGs), qui comprennent six types de polysaccharides trouvés sur la plupart des surfaces cellulaires animales et des matrices extracellulaires¹⁰². Ces chaînes polysaccharidiques sont liées par une liaison covalente à une protéine centrale (ou « core protein »), formant ainsi les protéoglycanes, qui constituent une famille hétérogène de macromolécules. Dans la matrice extracellulaire, ils sont associés à d'autres composants, tels que les collagènes et les glycoprotéines, participant à l'édification et permettant à la matrice extracellulaire de contrôler la migration, l'adhésion, la prolifération, la différenciation et une multitude d'autres aspects de la vie cellulaire. A la surface des cellules, deux motifs de localisation cellulaire pour les protéoglycanes sont décrits : lorsque la protéine centrale possède une partie hydrophobe, les protéoglycanes vont s'insérer dans la bicouche lipidique de la membrane cellulaire, dans le second cas, la protéine centrale contient un site d'attachement à un glycosylphosphatidylinositol (GPI) membranaire par le biais d'un pont « éthanolamine-mannose ». La localisation stratégique des protéoglycanes en fait des candidats idéaux pour réguler les interactions entre les cellules juxtaposées ou entre les cellules et la matrice extracellulaire environnante¹⁰³.

La structure de ces polysaccharides est connue et elle est constituée d'une succession linéaire d'unités disaccharides, composées alternativement d'acides hexuroniques HexA (acide D-glucuronique GlcA ou acide L-iduronique IdoA) et d'hexosamines qui sont variablement sulfatés, d'où la dénomination actuelle : glyco pour l'acide hexuronique, amino pour l'hexosamine, et glycane pour signifier qu'il s'agit de chaînes glucidiques en général greffées sur une protéine. La nature des sucres formant le motif disaccharide tout comme la nature et le degré de sulfatation permettent de classer les différents GAGs (figure 26):

- les *galactosaminoglycanes* : (peau, cartilage, os, vaisseaux sanguins,...), qui comprennent la Chondroïtine Sulfate (CS) et le Dermatan Sulfate (DS), sont caractérisés par une Galactosamine N-Acétylee (GalNAc) attachée à GlcA (pour CS) ou à GlcA/IdoA (pour DS). Les groupes sulfates se trouvent en général sur la galactosamine sur les carbones C-4 et C-6 et pour DS sur les carbones C-2 des iduronates.

- les *glucosaminoglycanes*, qui sont divisés en trois catégories :

○ L'*Hyaluronate* (HA, présence dans le cartilage), le seul GAG non sulfaté, qui possède une structure homogène d'unités répétées GlcA-GlcNAc.

○ Le *Keratane Sulfate* (KS, cartilage articulaire), GAG dépourvu d'acides uroniques qui est constitué d'une alternance galactose / glucosamine N-acétylée. KS se distingue des autres GAGs à cause de séquences spécifiques, se trouvant à l'extrémité non réductrice du polysaccharide et de son lien à la « protein core » par des liaisons -O- et -N-. Les groupes sulfates se situent généralement en C-6 de la glucosamine et occasionnellement en C-6 du galactose.

○ Les *Héparanes Sulfates* (HS, constituants des surfaces cellulaires) et l'*Héparine* (HP, produit par les mastocytes). Ce sont les formes les plus complexes et les plus sulfatées de la famille des GAGs. Ils ont été énormément étudiés à cause de leur implication dans de multiples fonctions biologiques^{104,105} et de l'immense application thérapeutique de l'HP comme anticoagulant¹⁰⁶ (leurs structures et leur biosynthèse seront détaillées dans le prochain paragraphe). Leur diversité structurale est une conséquence de la multitude de sites sulfatés présents sur une chaîne d'HS et de leur position sur la chaîne. A cause de leur caractère très anionique, ces polysaccharides ont été relégués historiquement à un rôle structural, une sorte de gel d'hydratation, dans la matrice extracellulaire.

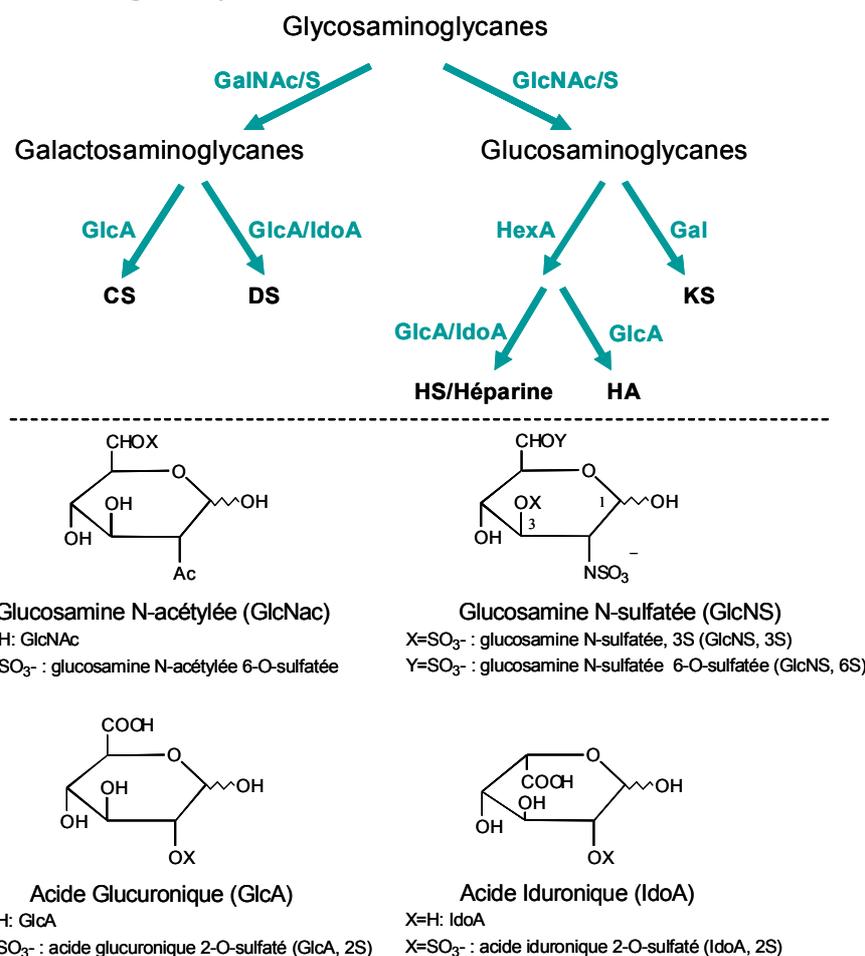


Figure 26 : la famille des GAGs ; Gal : galactose ; HexA : acide hexuronique ; pour les autres abréviations, voir la figure en dessous sur la structure des monosaccharides HS.

4.2. Les Héparanes sulfates

Les HS sont des polysaccharides linéaires, se trouvant sur les surfaces cellulaires et dans la matrice extracellulaire de la plupart des tissus animaux. L'isolation de HS remonte à 1948, quand Jorpes *et al.* identifient une nouvelle macromolécule, « l'héparine acide monosulfurique », pensant qu'il s'agissait d'une forme peu sulfatée de l'Héparine¹⁰⁷. Depuis, le concept indiquant que HS et HP sont deux membres distincts de la famille des GAGs a été clarifié¹⁰⁸. Les deux polysaccharides sont tous les deux attachés par liaison covalente à des « core proteins » de la famille des protéoglycanes. Le nom « protéoglycane » fait référence à une structure dichotomique, une protéine (« core protein ») couplée à une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes. Le produit final est un composé sophistiqué, qui peut fluctuer en poids moléculaire, dans sa structure fine et dans son rôle biologique¹⁰⁹. La complexité d'une chaîne d'héparane sulfate peut, par exemple, facilement dépasser celle des acides nucléiques¹¹⁰. Les 4 nucléotides de l'alphabet de l'ADN peuvent être combinés et former 256 structures différentes de 4 unités ; en revanche, pour l'héparane sulfate, il existe 48 disaccharides possibles, dont la combinaison aléatoire permet de générer une infinité de structures. On peut en effet "construire" $48^2 = 2304$ tétrasaccharides, $48^3 = 110592$ hexasaccharides, ... douze milliard de dodécasaccharides... *etc.*

Les HS ont un rôle dynamique important dans de nombreux processus biologiques essentiels, dont le développement embryonnaire, la réparation et l'apoptose. Certaines conditions pathologiques particulières comme le cancer¹¹¹, l'inflammation, le diabète, l'angiogenèse, certaines maladies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose et les infections microbiennes¹¹² sont souvent associées à des altérations structurelles et fonctionnelles des chaînes d'héparane sulfate. Ainsi, les protéoglycanes de HS, se trouvant soit sur la surface cellulaire soit dans la matrice extracellulaire, jouent un rôle dans le signal et la communication intercellulaire, en modulant la biodisponibilité et la distribution spatio-temporelle des facteurs de croissance, des cytokines et des morphogènes, en plus de nombreux récepteurs et des molécules d'adhésion extracellulaires¹¹³ (*cf.* I.4.4). Leur grande hétérogénéité structurale peut être générée par la modification spécifique des chaînes d'héparanes sulfates durant la biosynthèse, tout comme par la nature diversifiée des « core proteins ». La majorité des activités biologiques de ces protéoglycanes ont lieu au travers des interactions de leurs chaînes de HS avec des ligands protéiques extracellulaires.

4.2.1. Biosynthèse de l'héparine et des héparanes sulfates

A cause de la ressemblance structurale entre HS et HP, il a été suggéré que la biosynthèse de ces deux polysaccharides est dirigée par la même « machinerie ».

La biosynthèse des GAGs^{109,110} sulfatés est un processus multi-étapes qui a lieu dans l'appareil de Golgi. Un polysaccharide précurseur est formé contenant des unités répétées d'acide glucuronique et de glucosamine.

La première étape implique l'attachement d'un fragment tétrasaccharidique unique à un acide animé spécifique, une sérine, d'une « core protein » (figure 28). Le tétrasaccharide toujours rencontré est β -GlcA(1 \rightarrow 3)- β -Gal(1 \rightarrow 3)- β -Gal(1 \rightarrow 4)- β -Xyl-1 \rightarrow Ser. Ce processus est catalysé par quatre enzymes qui ajoutent les monosaccharides de manière séquentielle à l'extrémité non réductrice de la chaîne en croissance. Ensuite, il y a élongation de la chaîne (ajout d'unités saccharidiques) et modification (sulfatation, épimérisation...) de la chaîne polysaccharidique par un système enzymatique spécifique.

La réaction d'initiation, catalysée par la xylosyltransférase, a lieu en des sites spécifiques, définis par des résidus Ser-Gly (acides animés sérine et glycine¹¹⁴). Le nombre de sites d'attachement de chaînes varie en fonction de la nature de la « core protein », mais typiquement il y en a entre deux et quatre pour HS et beaucoup plus pour HP.

Au tétrasaccharide précurseur alors formé, est ajouté comme premier monosaccharide une N-acétyl-glucosamine GlcNAc ou une N-acétyl-galactosamine GalNAc (celui-ci est utilisé dans la biosynthèse de CS). Ainsi cette addition décide si la chaîne sera un glucosaminoglycane (HP, HS) ou un galactosaminoglycane (CS, DS). Il a été suggéré que les motifs de la séquence peptidique proche du site d'attachement du tétrasaccharide jouent un rôle de signal pour l'addition de l'un ou l'autre des monosaccharides¹¹⁵.

Après le premier saccharide attaché, un transfert alternatif de GlcA et de GlcNAc à partir de leurs nucléotides UDP-sucres correspondants, à l'extrémité non réductrice des chaînes en croissance, forme le reste de la chaîne GAG. Approximativement, 300 monosaccharides sont additionnés au polysaccharide linéaire avant la fin de synthèse.

Une fois la chaîne formée, les disaccharides subissent une série de modifications. Cette modification du polymère est initiée par une N-désacétylation et une N-sulfatation des GlcNAc par une enzyme N-désacétylase/N-sulfotransférase. Les étapes suivantes ont lieu de façon séquentielle sur les résidus adjacents des N-sulfoglucosamines (GlcNS). Une C5-épimérase catalyse alors la transformation de certains acides D-glucuroniques en acides L-

iduroniques. Ensuite a lieu une O-sulfatation des acides iduroniques en position C-2 par une 2-O-sulfotransférase. Cette sulfatation est suivie par l'action d'une glucosamine 6-O-sulfotransférase, qui transfère un groupe O-sulfate sur la position C-6 de GlcNac ou de GlcNS. Finalement, une 3-O-sulfotransférase agit sur le polymère et modifie certains GlcNS6S (figure 28).

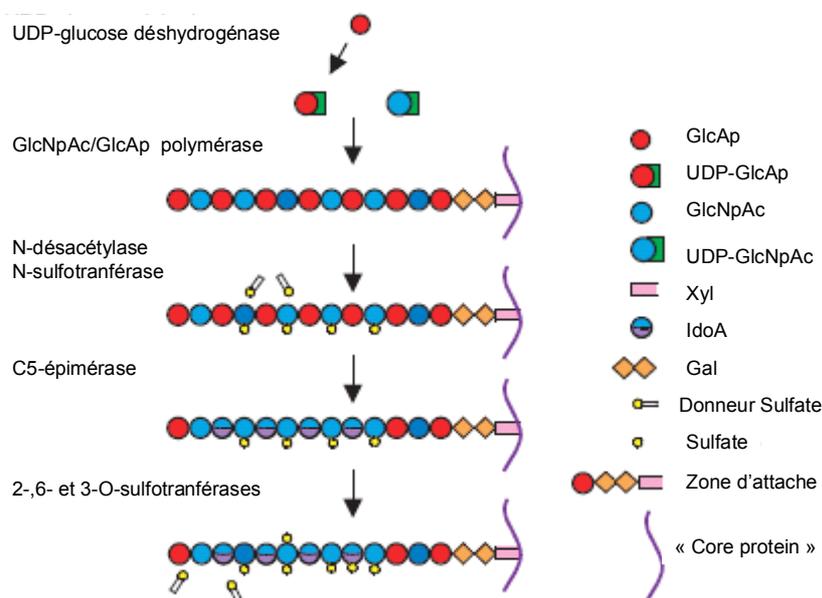


Figure 28 : Schéma de la biosynthèse des HS protéoglycanes, issu de la publication 109. Les chaînes sont synthétisées à partir de la « core protein », par actions séquentielles de glycotransférases. Un tétrasaccharide est formé sur la zone d'attache, suivi par une addition alternée de GlcA et GlcNac, produisant une chaîne précurseur. La chaîne est ensuite modifiée par voie enzymatique, produisant des désacétylations, N-sulfatations, épimérisations, O-sulfatations, menant à des chaînes différentes les unes des autres.

Le hasard apparent et la nature incomplète de la N-désacétylation initiale sont responsables de l'introduction de l'hétérogénéité structurale dans le polymère à un stade précoce de la biosynthèse. Les spécificités de ces enzymes après leurs modifications sont responsables de la structure rencontrée dans les HS, où des domaines très sulfatés alternent avec des domaines peu ou pas sulfatés.

4.2.2. Structures chimiques de l'héparine et de l'héparane sulfate

L'héparine (HP) et l'héparane sulfate (HS) sont des polymères linéaires, ayant comme unité de base répétée un disaccharide, constitué d'un acide uronique et d'une glucosamine N-acétylée. Pour HP, les résidus d'acide uronique sont composés à 90 % d'IdoA et 10 % de GlcA. Ce sucre possède la plus grande densité de charges négatives de toutes les

macromolécules biologiques connues. Cela est le résultat de sa haute teneur en groupes sulfate ($-\text{SO}_3^-$) et en groupes carboxylate ($-\text{CO}_2^-$) chargés négativement^{116,117}. En effet, en moyenne le disaccharide de l'HP contient 2,7 groupes sulfate. La structure plus commune rencontrée dans l'HP est le disaccharide trisulfaté (figure 27 [haut]).

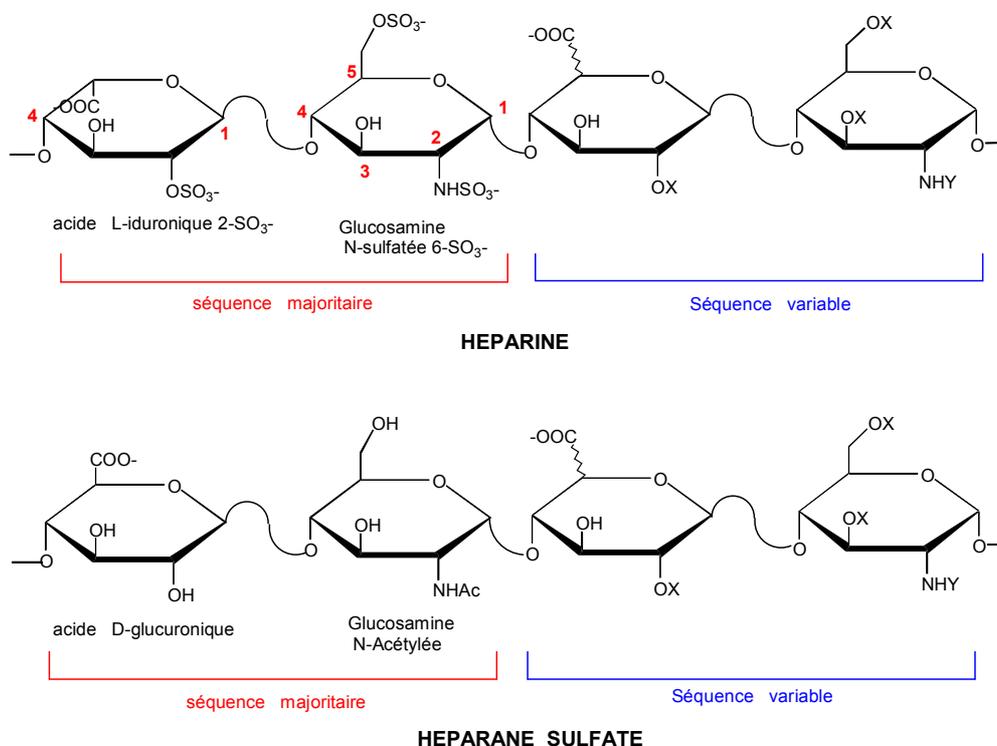


Figure 27: Unités disaccharidiques répétées (majoritaire et minoritaire) dans l'héparine et l'héparane sulfate (X = H ou SO₃⁻, Y = Ac, SO₃⁻ ou H)

Cependant, un nombre important de variations structurales de ce disaccharide existe, menant à la micro hétérogénéité de l'HP. Les groupes amine de la glucosamine peuvent être substitués ou non avec un groupe acétyle ou sulfate. Les positions 3 et 6 de la glucosamine peuvent être substituées ou non par un groupe O-sulfate (figure 27). L'acide uronique, qui peut soit être L-iduronique soit D-glucuronique, peut aussi contenir un groupe 2-O-sulfate. L'HP possède un poids moléculaire variant de 5 à 40 kDa, avec un poids moyen à 15 kDa et une charge négative moyenne d'approximativement -75¹¹⁶.

La complexité structurale de l'héparine peut être considérée à plusieurs niveaux. Au niveau du protéoglycane, un nombre différent de chaînes de glycosaminoglycanes (avec des séquences possédant différents saccharides) peut être attaché à de nombreuses sérines présentes dans la « core protein » de l'HP. De plus, la plupart des propriétés chimiques et physiques de l'HP sont dues à la structure ou séquence du GAG, sa conformation, la flexibilité de sa chaîne, son poids moléculaire et sa densité de charges.

Les héparanes sulfates (HS) (*cf.* figure 27 [bas]) ont une structure similaire à celle de l'héparine mais sont moins substitués par des groupes sulfate et possèdent une plus grande partie variable. Comme l'héparine, les héparanes sulfates sont des copolymères linéaires composés d'unités répétées d'acide uronique fixées par un lien 1→4 à la glucosamine. Alors que l'acide D-glucuronique prédomine dans les HS (contrairement à l'héparine), il peut quand même contenir, par endroits, de grandes quantités d'acide L-iduronique ; ainsi, pour HS, les résidus IdoA sont présents à des proportions variant entre 30 et 80 %.

HS contient en moyenne un seul groupe sulfate par disaccharide. En fait, les chaînes de HS sont composées de grandes séquences ayant des degrés de sulfatation variable. Même si HS contient toutes les mêmes variations structurales que celles faites sur HP (et vice versa), la fréquence de présence de ces variations sur la séquence minoritaire est plus grande que dans l'HP, faisant de la structure de l'HS une structure et une séquence plus complexe que celle de l'héparine. Leurs chaînes sont en général plus longues, avec une masse moléculaire moyenne de 30 kDa, la masse pouvant varier entre 5 et 70 kDa.

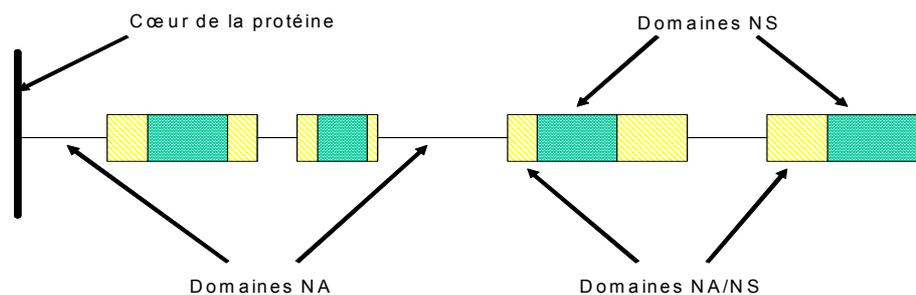


Figure 28 : Structure de l'Héparane Sulfate : Les domaines NS représentent les séquences d'unités disaccharides N-sulfatées, riches en Résidus IdoA et groupés O-sulfatés. Les domaines NA/NS sont composés d'une alternance d'unités disaccharides N-acétylées et N-sulfatées qui contiennent GlcA, IdoA et des groupes O-sulfatés en C6 des GlcN. Les domaines NA sont des séquences en grande majorité non modifiées avec des unités disaccharides GlcA-GlcNAc répétées.

Il faut savoir qu'en fin de biosynthèse, la protéine reste fixée dans le cas des HS (figure 28) car elle est constitutive de la structure même du protéoglycane, alors qu'elle est coupée pour l'héparine^{114,118}.

Des séquences d'unités de base, homogènes et faiblement modifiées, appelées domaines NA, alternent avec des séquences sulfatées hypervariables, appelées Domaine S ou NS (figure 28). L'héparine diffère de l'héparane sulfate sur deux points : l'homogénéité et la sulfatation. Pour HP, la N-sulfatation est plus importante (80 % de glucosamines substitués contre 40 % à 50 % pour l'HS). HP contient beaucoup plus de IdoA et de groupes O-sulfatés, donnant une organisation de type domaine NS plus homogène, alors que les domaines NS de l'HS alternent avec des régions peu modifiées : GlcA-GlcNAc.

4.3. Réactivité de l'héparine et des héparanes sulfates avec les protéines

Les interactions entre HP/HS et les protéines dépendent généralement de la présence des groupes sulfate. Alors que cette propriété a déjà été démontrée par des préparations chimiques de GAG désulfatés¹¹⁹, il est encore très difficile de déterminer avec précision quels groupes sulfates sont finalement essentiels à la fixation.

Ainsi ces interactions sont la plupart du temps ioniques, électrostatiques et impliquent la présence de charges positives sur une séquence d'acides aminés de la protéine¹⁰⁵. En plus du facteur de sulfatation des domaines de HS interagissant avec des protéines, des paramètres tels que le positionnement des domaines sur la chaîne de HS, le nombre et le lieu des chaînes de HS sur la core protein¹²⁰ affectent les propriétés d'interaction avec une molécule de protéoglycane. La plupart des domaines de HS spécifiques d'interactions avec des protéines se sont révélés être relativement courts, 5-10 monosaccharides, situés dans un domaine NS du polysaccharide. Cependant, quelques protéines multimériques (exemple : Interféron- γ ¹²¹) se fixent à des domaines plus complexes, comprenant deux domaines NS séparés par une région d'HS pauvre en groupes sulfates. Les propriétés de fixation des domaines NA/NS, constitués de disaccharides N-acétylés et N-sulfatés en alternance, ne sont pas bien connues à ce jour par manque de méthodes permettant de purifier ce genre de séquences de HS.

4.4. Principales interactions étudiées entre HP/HS et des protéines

La grande diversité structurale de l'héparine ou des HS leur permet d'exercer un éventail de fonctions très diverses, essentiellement par le biais d'interactions directes avec de nombreuses protéines¹²². Ces interactions ont de nombreux effets et permettent par exemple de concentrer localement une molécule donnée, mais aussi de modifier son activité.

Dans ce paragraphe, les différentes actions biologiques étudiées à ce jour, où les HS et HP sont impliqués, vont être brièvement expliqués.

4.4.1. Régulation des protéases et des estérases

L'interaction de HP avec l'antithrombine III (AT-III) est le premier exemple, le plus étudié à l'heure actuelle, d'une interaction héparine - protéine. Il a été montré que HP fonctionne comme un anticoagulant, grâce à son interaction avec AT, en augmentant

l'inhibition médiée par AT-III sur les facteurs de la coagulation du sang, incluant la thrombine et le facteur Xa¹⁰⁶. La fixation de l'héparine à l'antithrombine se fait au moyen d'une séquence spécifique pentasaccharidique, caractérisée essentiellement par une unité 3-O-sulfatée (la GlcNSO₃). Cette séquence seule ne s'avère pas être suffisante pour toute l'activité inhibante de l'héparine, qui en fait nécessite un oligosaccharide de 18 monosaccharides. Ce saccharide actif contient la séquence de fixation de l'antithrombine mais aussi une séquence qui fixe la thrombine. Le pentasaccharide seul est cependant capable d'induire un changement conformationnel de l'antithrombine, augmentant ainsi son pouvoir inhibiteur des protéases à sérine.

4.4.2. Interactions avec des molécules du système extracellulaire

a) Interactions avec les facteurs de croissance

Les Facteurs de croissance, *Fibroblast growth factors* (FGFs) appartiennent à une grande famille de protéines impliquées dans des processus physiologiques, incluant la prolifération cellulaire, la différenciation, la morphogenèse et l'angiogenèse (actuellement 21 membres)¹²³. Les FGFs sont des protéines interagissant avec une grande affinité avec les HS des protéoglycanes de la membranaire cellulaire. Les FGFs de vertébrés possèdent dans leur structure 28 acides aminés hautement conservés et 6 invariants, leur poids moléculaire varie entre 17 et 34 kDa.

Le FGF acide (FGF-1) et le FGF basique (FGF-2) sont les premiers membres de cette famille à avoir été découverts, et les paramètres thermodynamiques et cinétiques de l'interaction avec le sucre ont été largement étudiés^{124,125}. Ces facteurs de croissance exercent un effet biologique en interagissant avec différents récepteurs cellulaires spécifiques, appelés *fibroblast growth factor* récepteurs (FGFR-1 et FGFR-4). Ces FGFRs, qui sont des récepteurs transmembranaires à tyrosine kinase, sont aussi des protéines s'associant à l'HP; ainsi, les trois composés FGF, FGFR et l'HS doivent interagir de façon simultanée pour initier un signal de transduction. Plusieurs modèles d'interaction ont été développés : un premier consiste à ce que les HS de la membrane cellulaire se fixent avec de multiples molécules de FGF pour permettre la dimérisation des récepteurs FGFR et le signal de transduction dans la cellule, tandis qu'un deuxième propose un changement de conformation de la protéine au contact de HS afin de reconnaître avec une meilleure affinité son récepteur.

b) Interactions avec les chimiokines

Les chimiokines sont une sous famille des cytokines, possédant une grande variété de fonctions, notamment le recrutement sélectif et l'activation cellulaire durant l'inflammation. Ainsi de nombreuses protéines de cette famille, intervenant dans les mécanismes de défense de l'hôte ont une activité qui nécessite et/ou qui est améliorée par une interaction avec les glycosaminoglycanes sulfatés¹²⁶. Le premier membre de cette famille à avoir été découvert est le *platelet factor 4* (le facteur plaquettaire 4 PF-4, appelé maintenant ligand chimiokine CXC 4 ou CXCL 4). Actuellement, plus de 40 chimiokines ont été répertoriées et classées en fonction de la distribution des résidus Cystéine proches du domaine NH₂-terminal en quatre familles : CXC, CC, C et CX₃C (X étant un acide aminé quelconque entre les résidus Cystéine)¹²⁷. L'interaction des chimiokines avec des populations spécifiques de cellules se fait *via* les récepteurs associés à la protéine G ayant 7 domaines transmembranaires. Les récepteurs à chimiokines sont aussi connus pour jouer un rôle important dans la métastase du cancer du sein et dans l'entrée du virus VIH-1 dans les cellules. Les chimiokines interagissent aussi avec HP et les GAGs de la surface cellulaire dans l'endothélium et dans la matrice extracellulaire. Cette interaction est connue pour jouer un rôle dans la formation de gradients haptotactiques à la surface des cellules endothéliales et pour augmenter la concentration des chimiokines au voisinage des récepteurs de la membrane cellulaire.

PF-4¹²⁸, issu des plaquettes, est connu pour posséder un certain nombre de propriétés liées notamment à l'inflammation, dues à sa capacité à neutraliser les activités des protéoglycanes d'HP et des HS. PF-4 existe essentiellement sous forme d'un tétramère sous des conditions physiologiques et s'associe à HP et aux HS avec une grande affinité dans un rapport 1 : 1. D'autres cytokines oligomériques telles que l'interféron- γ ¹²¹ (connue pour son activité antivirale et l'interleukine 8, IL-8¹²⁹) se fixent aux HS *via* des interactions entre leurs composés monomériques et différents domaines NS du polysaccharide. Par exemple, dans la région de fixation de l'IL-8, les domaines NS peuvent être séparés par un domaine NA composé d'une dizaine de monosaccharides. Le domaine NA séparant les deux domaines NS pour l'interaction avec l'IFN- γ est, quant à lui, composé d'une trentaine de monosaccharides.

Ces sites de fixation assez larges dans PF-4, IL-8 et SDF-1 (stromal cell-derived factor, une autre chimiokine) semblent être le résultat de l'oligomérisation de la chimiokine. Un motif consensus protéique du type BBXB, où B un acide aminé basique et X un acide aminé neutre ou hydrophobe a été identifié comme ayant une participation importante dans la fixation avec le sucre.

Ce motif est aussi reconnu comme étant le site principal d'interaction avec HP pour une chimiokine de la famille CC, appelée RANTES¹³⁰ (*regulated on secretion, normal T-cell expressed and secreted*). Il a été montré que RANTES tout comme d'autres chimiokines de cette même famille se lient à l'HP avec des affinités et des spécificités variables¹³¹. Ces chimiokines ayant une faible concentration circulante, les HS protéoglycanes semblent jouer un rôle important en retenant ces molécules à la surface cellulaire, augmentant, de ce fait, leur concentration effective (gradient de concentration au voisinage de la membrane) au voisinage des sites récepteurs de forte affinité.

4.4.3. Interactions avec des protéines se liant aux lipides et aux membranes

Alors qu'il existe de très nombreuses publications sur les interactions de l'HP avec de nombreuses familles de protéines, l'interaction de l'HP avec les protéines se liant aux lipides et aux membranes est moins connue. Les annexines sont une famille de protéines homologues (actuellement 32 membres) existant chez les eucaryotes. Le trait de distinction des annexines est leur fixation calcium-dépendant à la surface des membranes de phospholipides. Ces protéines sont impliquées dans un grand nombre de fonctions chez les eucaryotes, incluant les rôles dans la signalisation cellulaire, la coagulation du sang, la circulation membranaire et l'inflammation. La fixation calcium-dépendant des GAGs aux annexines a été rapportée et caractérisée dans la littérature¹³². Alors qu'il existe à l'heure actuelle plus de 100 protéines se liant à l'HP, seulement quelques interactions sont calcium-dépendantes, comme c'est le cas pour certaines annexines, les P- et L-sélectines.

4.4.4. Héparanes sulfates : récepteurs à agents pathogènes

La fixation initiale d'un virus à une cellule cible représente souvent l'étape critique dans la pathogenèse¹³³. Cette fixation résulte d'une interaction entre une protéine de l'enveloppe du virus avec une chaîne de glycosaminoglycane d'un protéoglycane exprimé à la surface des cellules cibles. Les HS se trouvent sur la surface externe de la plupart des tissus de mammifères ; ainsi, il n'est pas surprenant que les virus utilisent ces molécules comme des récepteurs, pour se fixer et atteindre l'entrée dans les cellules cibles. L'interaction entre les protéines de l'enveloppe du VIH-1 et les HP/HS a fait l'objet de

nombreuses études à cause de leur potentiel d'utilisation dans la thérapie et la prévention de l'infection par le VIH-1¹³⁴.

Un autre virus, l'herpes simplex (HSV) cause par exemple des lésions de muqueuses ou des encéphalites. Ces diverses manifestations cliniques reflètent la capacité du virus à infecter les cellules endothéliales et neuronales. Ainsi le virus HSV utilise les HS protéoglycanes pour cibler et infecter les cellules¹³⁵.

4.4.5. Interactions avec les protéines d'adhésion

L'interaction de HP et des HS avec les protéines d'adhésion a des implications dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques, incluant l'inflammation, la croissance des tissus nerveux et l'invasion de cellules tumorales.

Les sélectines (L-, E- et P-sélectines) sont une famille de glycoprotéines transmembranaires situées dans l'endothélium, les plaquettes et les leucocytes¹³⁶. Elles interviennent notamment dans les événements d'adhésion, permettant l'entrée des lymphocytes dans les organes lymphoïdes et les interactions des leucocytes avec l'endothélium pendant l'inflammation. Alors que le ligand situé sur l'endothélium responsable de l'interaction des leucocytes avec les sélectines est l'antigène sucre Sialyl Lewis X (SLe^X), les HS peuvent aussi jouer un rôle dans cette interaction¹³⁷. Les HS interagissent avec les L- et P-sélectines et non avec les E-sélectines¹³⁸. L'interaction de HP avec la L-sélectine est calcium dépendante et nécessite la présence de calcium libre de l'ordre du micromolaire. La L-sélectine se lie aux oligosaccharides contenant des régions modifiées, hautement sulfatées, riches en IdoA et aux chaînes de HS de l'endothélium possédant un certain nombre de groupes amines libres. Les HS se liant à la P-sélectine doivent être moins modifiés (que pour la L-sélectine)¹³⁷. De plus, des tétrasaccharides de HP peuvent bloquer spécifiquement les interactions entre les L- et P-sélectines et les ligands contenant SLe^X, permettant ainsi une activité anti-inflammatoire *in vivo*, mais aussi d'éviter l'adhésion entre des cellules du cancer du colon et les L- et P-sélectines¹³⁹.

4.4.6. Enzymes dégradant les HP/HS

Deux types d'enzymes agissent sur HP/HS, les lyases procaryotiques de polysaccharides (agissant à travers un mécanisme d'élimination) et les hydrolases

eucaryotiques d'acide glucuronique (mécanisme d'hydrolyse). Les héparines Lyases dépolymérisent le polysaccharide en donnant des oligosaccharides insaturés. La spécificité de substrat pour chacune des enzymes a été bien étudiée en utilisant des oligosaccharides issus de l'héparine et des héparines chimiquement modifiées¹⁴⁰.

Ces enzymes sont essentielles dans la préparation d'oligosaccharides définis à partir de l'HP et des HS, nécessaires pour la caractérisation structurale des HP/HS¹⁴¹. Elles ont aussi un rôle clinique important et ont été utilisées dans la mesure des taux d'héparine dans le sang et la neutralisation de l'héparine dans le sang.

4.4.7. Nouvelles applications cliniques de ces sucres

L'interaction de l'héparine avec des protéines variées, jouant un rôle important aussi bien dans la régulation de processus physiologiques normaux que dans certains états cliniques, a mené les chercheurs à s'intéresser à l'utilisation de l'héparine, pour d'autres applications que pour son activité anticoagulante. Par exemple, les patients atteints de cancer, qui sont traités par de l'héparine de faible poids moléculaire pour leur thrombose, ont vu leur espérance de vie s'accroître de 3 mois, par rapport aux patients traités avec de l'héparine non fractionnée. HP peut potentiellement exercer une action à différentes étapes de la progression de cancer : affecter la prolifération des cellules, interférer avec l'adhérence des cellules cancéreuses sur l'endothélium vasculaire, réguler le système immunitaire et avoir des effets inhibants et stimulants dans l'angiogenèse¹⁴².

Un grand nombre de protéines ayant une action importante au niveau physiologique interagissent avec HS/HP, comme nous l'avons vu jusqu'à présent. Cela offre donc de nombreuses applications thérapeutiques potentielles pour HP et HS. La limitation majeure de cette utilisation est le fort pouvoir anticoagulant qui risque dans certaines applications d'amener des complications hémorragiques. L'apparition d'HP de faible poids moléculaire et la préparation d'oligosaccharides de HP¹⁴³ et d'analogues synthétiques^{144,145}, dénués de toute activité anticoagulante, offrent une grande variété d'applications thérapeutiques dans le traitement du cancer, des infections virales et bactériennes, dans la maladie d'Alzheimer ou dans le rejet de greffons.

4.5. Les moyens mis en œuvre pour l'étude des interactions HP/HS avec les protéines

Plusieurs méthodes sont mises en oeuvre pour l'étude des interactions HS/protéines, en termes thermodynamiques, structuraux et cinétiques. Signalons qu'à l'heure actuelle, peu de séquences saccharidiques entrant en jeu dans les interactions avec les protéines sont connues. Nous allons voir dans ce paragraphe quelles sont les principales techniques utilisées aujourd'hui :

- Avec la *Chromatographie d'affinité*, la technique la plus communément utilisée, le sucre ou la protéine interagissant avec le sucre, est immobilisé dans une matrice solide et son partenaire d'interaction est quant à lui injecté dans la colonne. Ensuite, le partenaire d'interaction est sorti avec du sel et la quantité requise pour l'élution est une mesure quantitative de la composante ionique de l'affinité d'interaction. Néanmoins, cette technique est difficile à utiliser dans les études des interactions dépendantes de cations divalents¹³².
- La *Microcalorimétrie* ou *L'Isothermal Titration Calorimetry ITC* permet d'obtenir des informations thermodynamiques sur des interactions HS - protéines¹⁴⁶. Dans cette technique, une des espèces interagissantes est placée en solution dans une cellule thermostatée et l'autre espèce est injectée dans cette cellule. La chaleur libérée (liée à l'interaction) après chaque injection est mesurée, donnant une courbe de titrage d'allure sigmoïdale. En retravaillant la courbe, les valeurs d'enthalpie (ΔH), la constante d'association (K_a) et la stœchiométrie d'interactions sont obtenues. L'ITC nécessite néanmoins d'avoir en quantité de l'ordre de quelques milligrammes les espèces participant à l'étude ; de plus, elle est limitée dans la mesure de constantes d'association entre 10^4 et 10^8 et requière des concentrations d'espèces très élevées, menant souvent à la précipitation.
- La *Spectroscopie RMN* permet d'obtenir des informations extrêmement importantes sur ces interactions¹⁴⁷. L'analyse RMN offre des données sur la structure primaire et les conformations, très utiles dans l'identification des points de contact précis entre les molécules interagissant. Alors que les expériences RMN donnent une image relativement détaillée de l'interaction entre HP et la protéine, la faible sensibilité de cette méthode demande l'utilisation des quantités de l'ordre du milligramme des espèces utilisées à des

fortes concentrations, provoquant des problèmes de solubilité et rendant difficile la détermination de la constante d'association.

- La *Spectroscopie de Fluorescence* est une méthode très sensible permettant d'avoir une multitude d'informations à partir de très faibles quantités d'échantillons. Les changements conformationnels de la protéine, qui ont souvent lieu dans l'interaction avec HS/HP, peuvent être mesurés grâce aux changements de l'environnement des fluorophores intrinsèques tels que la tyrosine ou le tryptophane¹⁴⁸. La constante d'association peut être obtenue en mesurant les changements en fluorescence lorsque l'une des espèces est dosée dans une solution de l'autre espèce mise en jeu. Cette technique est tout de même limitée à la mesure d'interactions HS/HP – protéines résultant en un changement de fluorescence.
- La *Fluorescence par Transfert d'Energie* (FRET) entre un fluorophore intrinsèque de la protéine et un fluorophore extrinsèque du sucre (HP/HS marqué par un fluorophore) peut mener à la mesure du K_a et à des informations sur la distance entre les deux fluorophores jusqu'à une distance de 80 Å. L'inconvénient de cette méthode est que le sucre modifié (particulièrement un oligosaccharide court) par un fluorophore extrinsèque peut perturber sa conformation mais aussi l'interaction avec la protéine.
- La *Résonance des plasmons de surface* (SPR) est une technique puissante pour étudier les interactions. Ici, une des espèces est immobilisée sur la surface d'une puce (chip) et l'autre est injectée sur cette puce. L'interaction résultante change l'indice de réfraction de la puce, qui est mesuré comme un changement de l'intensité et de l'angle de la lumière réfléchi sur la surface de la puce. L'amplitude de ce changement est directement proportionnelle à la masse de l'espèce en solution liée à celle immobilisée, permettant ainsi une mesure en temps réel des vitesses d'association et de dissociation, à partir desquelles la constante de dissociation peut être mesurée. Les signaux sont facilement obtenus pour des quantités d'espèces inférieures au microgramme. Alors que cette technique permet d'obtenir des informations importantes sur les cinétiques d'interactions, elle souffre de quelques artéfacts expérimentaux liés à l'immobilisation du ligand.
- Il existe d'autres techniques pouvant être utilisées pour l'étude d'interactions HS/HP-protéines, notamment la *coélectrophorèse d'affinité* (ACE)¹⁴⁹, l'*électrophorèse d'affinité*

à résolution bidimensionnelle (2-DARE)¹⁵⁰, la dialyse à l'équilibre¹⁵¹, les techniques de fixation par compétition¹⁵², la centrifugation analytique¹⁵³ et le dichroïsme circulaire¹⁵⁴. La cristallographie aux rayons X des oligosaccharides d'HP dans des complexes avec des protéines, donne des informations structurales à haute résolution¹⁵⁵, mais nécessite de grandes quantités des espèces purifiées mises en jeu.

4.6. Conclusion

Depuis quelques décennies, il a été montré que HP et HS interagissent avec une multitude de protéines ayant un grand rôle biologique, jouant ainsi un rôle essentiel dans la régulation de nombreux processus physiologiques (figure 29). La compréhension de ces interactions à l'échelle moléculaire est capitale notamment pour la conception de nouveaux agents thérapeutiques hautement spécifiques. De plus, une connaissance précise de HP et de HS s'avère être nécessaire à la compréhension des processus normaux physiologiques et pathologiques. Ces processus sont essentiels là où l'interaction cellule-cellule joue un rôle important, comme dans le développement cellulaire, le cancer, la réparation, les maladies infectieuses ou l'inflammation.

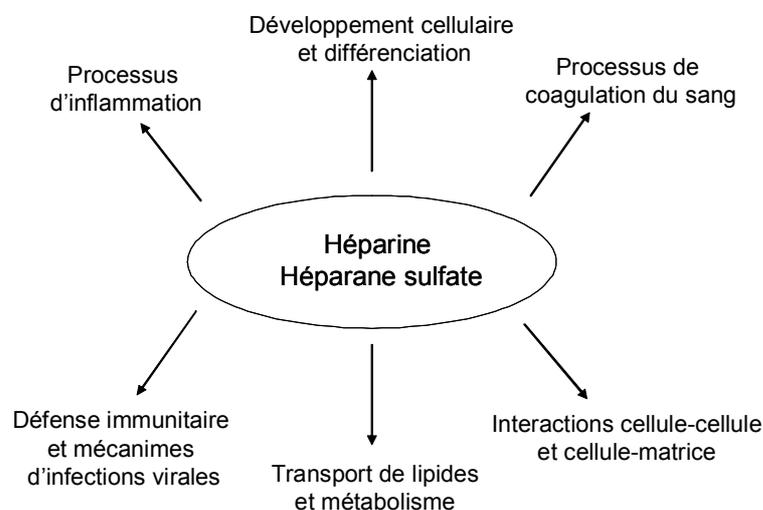


Figure 29 : Implication de l'HP et HS dans les processus physiologiques.

En raison de cette très grande hétérogénéité de structure et de sa complexité, il n'existe pas actuellement de méthode générale pour séquencer les héparanes sulfates et les étudier. Contrairement à leurs ligands protéiques qui sont très bien caractérisés, il reste beaucoup à faire du côté de la caractérisation de l'héparane sulfate. Ainsi, le développement de nouveaux outils pour la détermination des motifs oligosaccharidiques spécifiques et des mécanismes d'action est indispensable. Il permettra la compréhension de nombreux

phénomènes physiologiques et pathologiques mettant en jeu ces molécules dont l'intérêt scientifique est grandissant.

5. Conclusion

Les approches conventionnelles biochimiques et biophysiques ont été essentiellement utilisées pour l'étude des interactions sucre-protéine. Cependant, dans l'ère post-génomique, un besoin pressant existe, un souhait de développer des outils analytiques de criblage à haut débit pour les recherches en glycomique fonctionnelle. Durant ces dernières années, plusieurs groupes ont étudié les techniques des puces à sucres, qui peuvent donc être utilisées afin d'atteindre ce but. Alors que la technologie des puces à sucres n'est qu'au début de son développement, elle a déjà un grand potentiel dans le domaine de la recherche en biologie aussi bien qu'en « drug discovery ». Par exemple, à terme, ces puces pourront : **1-** être utilisées pour réaliser des mesures à haut débit des interactions de protéines avec des sucres ; **2-** être utiles dans la recherche d'inhibiteurs potentiels pour les protéines interagissant avec des saccharides, inhibiteurs qui sont requis pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques ; **3-** être employées pour identifier et/ou caractériser de nouvelles protéines reconnaissant des sucres ou des enzymes participant à la biosynthèse des saccharides, comme les glycosyltransférases, les glycosidases et les sulfotransférases ; **4-** comme le mode d'infection des cellules humaines par des bactéries ou des virus se fait la plupart du temps par des interactions sucres / membranaires ou protéines (bactériennes ou virales), ces puces pourraient être applicables à l'identification des épitopes de sucres responsables de l'adhésion, et pour sélectionner les petites molécules permettant d'éviter cette adhésion.

Finalement, ces « carbohydrate microarrays » ont le potentiel de jouer un rôle majeur dans le diagnostic de maladies, qui sont corrélées à la présence ou l'absence de biomolécules interagissant avec des sucres. Il est donc clair que ces puces deviendront des outils performants utiles à la compréhension des fonctions biologiques des saccharides et dans le développement de nouveaux médicaments.

Nous proposons ainsi dans la suite de cette thèse une nouvelle approche, complémentaire aux techniques présentées dans ce chapitre bibliographique.

Chapitre II :

Développement d'une puce à oligosaccharides

L'objectif de cette thèse est de développer une puce à oligosaccharides, utilisant comme point de départ la technologie des puces à ADN développées dans notre laboratoire depuis une dizaine d'années. Cette puce doit nous permettre d'étudier les interactions entre des protéines et les oligosaccharides fixés sur la puce, en temps réel et sans traceurs. Le procédé d'imagerie SPR permettra alors l'analyse de l'interaction de toutes les séquences oligosaccharidiques étudiées avec la protéine en solution. Le procédé BIAcore® est, à l'heure actuelle, l'un des seuls à utiliser la SPR pour étudier ces interactions. Mais le problème est que cet appareil ne permet pas d'analyser simultanément un grand nombre de séquences, il appartient à la classe des capteurs « monopoint ». Il est donc plus intéressant d'opter pour l'utilisation de l'imagerie SPR, capteur « multipoint », qui permet d'obtenir des mesures parallélisées d'interactions biologiques. Ce système de puce sera développé grâce à un dépôt réalisé par électrocopolymérisation (dit électrospotting) d'échantillons sur une surface d'or, technique développée initialement au laboratoire dans le cadre de la fabrication de puces à ADN. Les données obtenues permettront sûrement de mieux comprendre les relations structures/activités dans le domaine des interactions oligosaccharides/protéines.

Nous nous efforcerons, dans ce chapitre, de décrire et caractériser les différentes étapes nécessaires à la conception d'une puce à oligosaccharides, tout en soulignant les problèmes rencontrés et les améliorations apportées.

1. Etat de l'Art : Les biopuces développées au laboratoire

Dérivé du procédé MICAM™^{156,157,158}, le procédé de fabrication de biopuces propre au laboratoire permet une fonctionnalisation simple d'une surface d'or homogène. Ainsi, une nouvelle méthodologie de préparation de capteurs ou puces à ADN a été développée par Livache *et coll.*¹⁵⁹. Cette réalisation de puces est basée sur une électrocopolymérisation directe de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé par une biomolécule sur un substrat d'or et par l'utilisation d'une micro cellule électrochimique mobile (le procédé pratique sera détaillé plus loin). Pour les puces à ADN, les ODN (oligodésoxyribonucléotides) synthétisés sont greffés au pyrrole *via* un bras espaceur. En une seule étape, les brins d'ADN sont donc immobilisés de manière covalente à la surface d'une électrode par l'intermédiaire d'un film conducteur adhérent.

De plus, cette technique permet d'adresser en des localisations précises des plots de polypyrrole. Ces spots de polypyrrole ainsi obtenus sont caractérisés en terme d'épaisseur et

d'efficacité pour les réactions de reconnaissance biologique (hybridation pour l'ADN ou reconnaissance protéine - ligand)¹⁶⁰.

Dans un premier temps, nous expliquerons le choix du polymère, puis nous décrirons brièvement son électrosynthèse : son mécanisme, ses caractéristiques et ses avantages.

1.1. Choix du polypyrrole

1.1.1. Un polymère conducteur électronique : le polypyrrole

Depuis la première publication faite en 1977 sur la conductivité électrique dans un polymère conducteur (polyacétylène) par Shirakawa, Heeger et MacDiarmid¹⁶¹, le domaine des polymères conducteurs a largement attiré des chercheurs académiques et industriels. Ces nouveaux matériaux présentant des propriétés électroniques et semi-conductrices ont permis le développement de nombreuses applications, notamment les surfaces anti-statiques et anti-corrosion, les capteurs, les batteries, les LEDs (light emitting diodes) ou encore pour les matériaux d'électrodes transparents. Ces polymères conducteurs électroniques (PCE) sont formés à partir de certains précurseurs aromatiques (tels que l'aniline, le thiophène ou le pyrrole) et conduisent à des structures π -conjuguées. A la différence des polymères classiques, ils peuvent être utilisés comme matériaux d'électrode grâce à leur structure conjuguée qui leur donne la capacité de conduire du courant ; les PCE sont aussi considérés comme un moyen de transférer une information (transducteurs) d'une molécule biologique vers l'électrode.

Ces polymères peuvent être préparés par polymérisation chimique ou électrochimique. Cette dernière est généralement préférée parce qu'elle permet d'obtenir un meilleur contrôle de l'épaisseur de film et de sa morphologie ainsi que des polymères directement déposés sur support, qu'avec une oxydation chimique¹⁶².

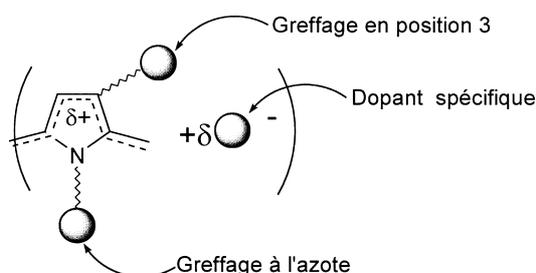


Figure 30 : différentes positions de greffage du polypyrrole

Un des avantages du polypyrrole (ppy) par rapport aux autres PCE est la possibilité de le synthétiser en milieu aqueux à pH neutre, condition qui est compatible avec la manipulation des biomolécules. Le polypyrrole se révèle donc être un matériau de choix pour l'immobilisation des molécules biologiques comme les anticorps, les protéines et les acides nucléiques¹⁶³. De plus, le monomère pyrrole est facilement oxydable, hydrosoluble et disponible commercialement. Ainsi le procédé développé au laboratoire est basé sur le phénomène d'électrocopolymérisation, utilisant donc des monomères pyrroles simples et des monomères fonctionnalisés de manière covalente par des biomolécules.

D'autre part, l'incorporation de monomères fonctionnalisés dans une matrice de polymères par voie électrochimique implique que la biomolécule soit stable au potentiel positif nécessaire pour générer le polymère. Or le potentiel de polymérisation du pyrrole est relativement bas (typiquement 0,6V / ECS dans une solution aqueuse). Un autre argument de choix est la facilité de fonctionnalisation du pyrrole, principalement sur l'azote¹⁶⁴ (figure 30). Ainsi, les molécules sondes réalisées au laboratoire, sont toutes reliées au pyrrole par l'atome d'azote.

Les hétérocycles de type pyrrole sont plus facilement fonctionnalisés par substitution sur l'azote¹⁶⁵, mais celle-ci peut entraîner une diminution de leur conductivité. Par contre une substitution en position 3 par rapport à l'azote est chimiquement plus difficile à mettre en œuvre mais modifie peu les propriétés de conduction électronique du polymère¹⁶⁶ (figure 30), ce qui est important lors de la réalisation des homopolymères. Pour notre part, le monomère pyrrole substitué à l'atome d'azote est en proportion très faible par rapport au pyrrole non substitué (typiquement 1/2000) et ceci ne modifie que très peu les propriétés de conductivité du polymère. C'est pourquoi, les polymères développés dans le cadre de la fabrication des puces au laboratoire seront fonctionnalisés sur l'atome d'azote.

1.1.2. Electrosynthèse du polymère

La synthèse du polypyrrole par électropolymérisation du monomère aboutit à la formation d'un film électroactif directement à la surface de l'électrode ; le monomère subit une oxydation à la surface de l'électrode par l'application d'un potentiel anodique. Plusieurs méthodes électrochimiques peuvent être utilisées pour l'électrodéposition du polymère : à courant constant, à double saut de courant (méthodes galvanostatiques), à différence de

potentiel contrôlée (méthode potentiostatique) ou encore voltamétrie cyclique (méthode potentiodynamique).

L'électropolymérisation réalisée au laboratoire nécessite l'application d'un potentiel approprié dans une solution aqueuse contenant des monomères pyrrole. Contrairement aux montages classiques électrochimiques comportant 3 électrodes (travail, référence, contre-électrode), notre procédé n'en possède que deux : l'absence d'électrode de référence est due notamment au faible volume de travail (quelques nL à quelques μL) et à l'utilisation de temps très courts de polymérisation.

Au niveau de l'électrode de travail, polarisée positivement, le pyrrole est oxydé puis polymérisé (figure 31). Le polymère obtenu sur l'électrode est dopé et stabilisé par un anion qui est inséré dans le polymère formé. La nature des anions va influencer sur les propriétés du film du polypyrrole formé¹⁶⁷. Le perchlorate (ClO_4^-) de lithium peut être utilisé par exemple².

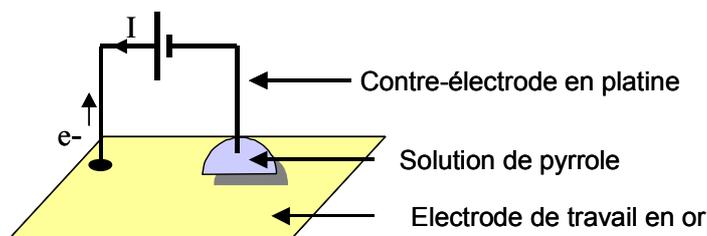


Figure 31 : Principe du dispositif d'électropolymérisation. Une source de tension oxyde, entre les deux électrodes métalliques, les pyrroles présents dans la solution, qui polymérisent au niveau de la surface de contact entre l'électrode de travail et le liquide.

Le mécanisme d'électrosynthèse du pyrrole, décrit dès 1979 par Diaz *et al.*¹⁶⁸, fait intervenir un radical lors de la croissance du polymère. La réaction débute par un transfert électronique suivi par une succession de réactions chimiques et de transferts électroniques¹⁶⁹.

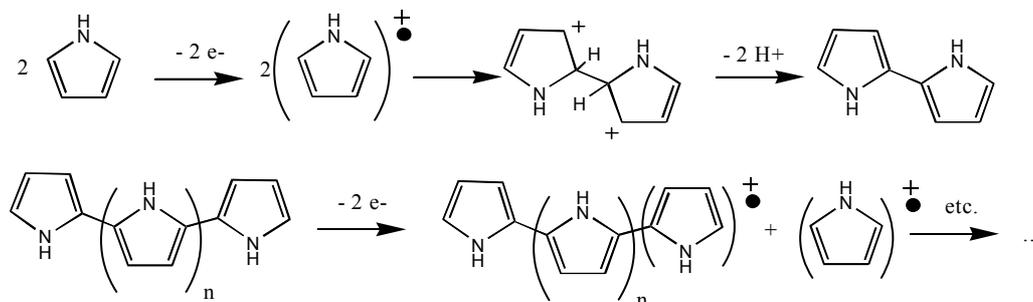


Figure 32 : Schéma du mécanisme d'électropolymérisation du pyrrole, phénomène ayant lieu au niveau de la surface d'or.

A la surface de l'électrode, le monomère est oxydé en un radical cation (figure 32) dont le couplage radicalaire, suivi de l'élimination de 2 protons ($-2 H^+$), conduit au dimère du pyrrole. Ce dernier s'oxyde légèrement plus facilement que le monomère selon le même mécanisme. Après de multiples itérations de ce principe, nous nous retrouvons en présence de filaments de polypyrrole enchevêtrés. La longueur de l'oligomère formé augmente, devenant insoluble à partir d'une certaine longueur de chaîne et précipite alors sur la surface de l'électrode. La structure exacte du polypyrrole, comme pour tout polymère en général, est difficile à déterminer. Il en résulte que la synthèse de films de polypyrrole ayant des propriétés spécifiques demeure un travail empirique^{170,171}.

Habituellement, l'électrolyte permettant l'électropolymérisation du pyrrole était le perchlorate de lithium ($LiClO_4$). Cette molécule ne pose pas de problème pour synthétiser des biopolymères comme des brins d'ADN, car ces derniers sont très résistants, ce qui n'est pas le cas des protéines, qui peuvent être dénaturées sous ces conditions de polymérisation du pyrrole. En effet, une protéine est une molécule composée d'acides aminés et repliée sur elle-même selon une configuration tridimensionnelle liée à son activité. Dans une protéine, se trouvent de petites cavités hydrophobes dues à ce repliement. Or, les ions perchlorates sont attirés par les zones hydrophobes et vont s'y fixer. Cette fixation va changer la configuration de la protéine et donc provoquer sa perte d'activité. De plus, la solution de perchlorate de lithium n'est pas tamponnée. La libération de protons lors de la polymérisation va donc acidifier le milieu, ce qui entraîne une dénaturation de la protéine qui n'est plus à son pH optimum. C'est pour cela qu'un nouveau milieu de dilution du pyrrole a été développé par notre équipe, la solution doit servir de tampon, sans ions perchlorate et pouvoir servir de solution de dilution à toute biomolécule possible sans la dénaturer. Ainsi, ce milieu est composé, entre autres, d'un tampon phosphate ($H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$) et de chlorure de sodium ($pK_a = 7,2$). Le domaine de pouvoir tampon de cette solution se situe entre $pH = 6$ et $pH = 8,4$. Sachant que le domaine d'activité de la plupart des biomolécules est généralement compris entre $pH = 6$ et $pH = 7,5$ et que le pyrrole polymérise plus facilement en milieu acide (en effet, quand le pH augmente, le pyrrole libère les anions et devient moins conducteur). Le choix d'un tampon phosphate légèrement acide paraît judicieux, par conséquent le pH choisi pour le tampon de spotting est de 6,8. Le problème de l'acidification de la solution avec le perchlorate n'existe plus avec ce tampon. Le rôle du contre-ion est maintenant tenu par les ions $H_2PO_4^-$ et HPO_4^{2-} .

1.1.3. Couplage

Pour utiliser ce principe d'électrocopolymérisation dans le cadre de la fonctionnalisation de surface de biocapteurs, différents procédés de couplages entre une molécule biologique et une molécule de pyrrole ont été développés. Contrairement aux molécules biologiques greffées à une biotine qui sont disponibles commercialement, le greffage de pyrrole sur une biomolécule est à réaliser en laboratoire. Bien qu'il nous soit possible d'utiliser des pyrroles biotinylés¹⁷² et la fixation d'avidine sur une couche de polypyrrole couplés à la biotine¹⁷³ et que cette couche d'avidine peut, par la suite être fonctionnalisée par des biomolécules biotinylées comme des oligonucléotides, il reste préférable de greffer directement la molécule à un groupe pyrrole, car cette liaison directe covalente est plus solide et il y a moins de risques de contamination entre les plots formés.

L'avantage de l'électrocopolymérisation est la fonctionnalisation de surface en une seule étape. Il suffit pour cela de greffer directement de manière covalente sur la molécule sonde une fonction pyrrole. Aujourd'hui, notre groupe est capable de greffer un groupe pyrrole sur, entre autres, des oligonucléotides¹⁷⁴, des peptides et des protéines.

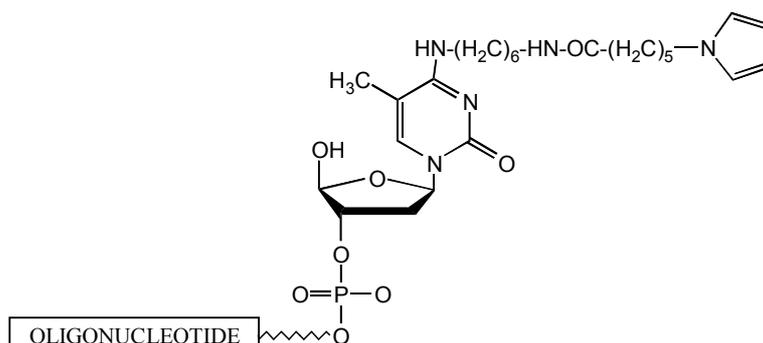


Figure 33 : Structure d'un dérivé d'oligonucléotide électropolymérisable composé d'un monomère de pyrrole (cycle de droite) lié de manière covalente à un oligonucléotide selon Livache¹⁵⁹

Un exemple de structure ODN/pyrrole est décrit dans la figure 33 obtenue selon le protocole de Livache et al.¹⁵⁹. Cette structure particulière a été validée et a fait l'objet de nombreuses études^{159, 160, 174, 175} que ce soit en fluorescence, en SPR ou avec la microbalance à quartz.

La faculté du pyrrole d'être électropolymérisable alliée à la possibilité de lier de manière covalente à un monomère pyrrole diverses biomolécules nous permet de construire des puces, utilisables en détection SPR et fluorescence. Reste maintenant à déterminer les paramètres spécifiques à chaque biomolécule, et dans notre cas, les oligosaccharides.

1.1.4. Structuration en plots

Le procédé d'électrodéposition de polypyrrole développé au laboratoire¹⁷⁶ permet de structurer une surface d'or homogène (sur l'électrode de travail). Cette structuration de la surface est basée sur l'électrocopolymérisation du pyrrole et de pyrroles fonctionnalisés par une biomolécule, à l'aide d'une cellule électrochimique mobile. Celle-ci est constituée d'une micropipette réglable de 200 μL (P200 Gilson) munie de son cône contenant une dizaine de microlitres de solution pyrrole / pyrrole fonctionnalisé (figure 34).

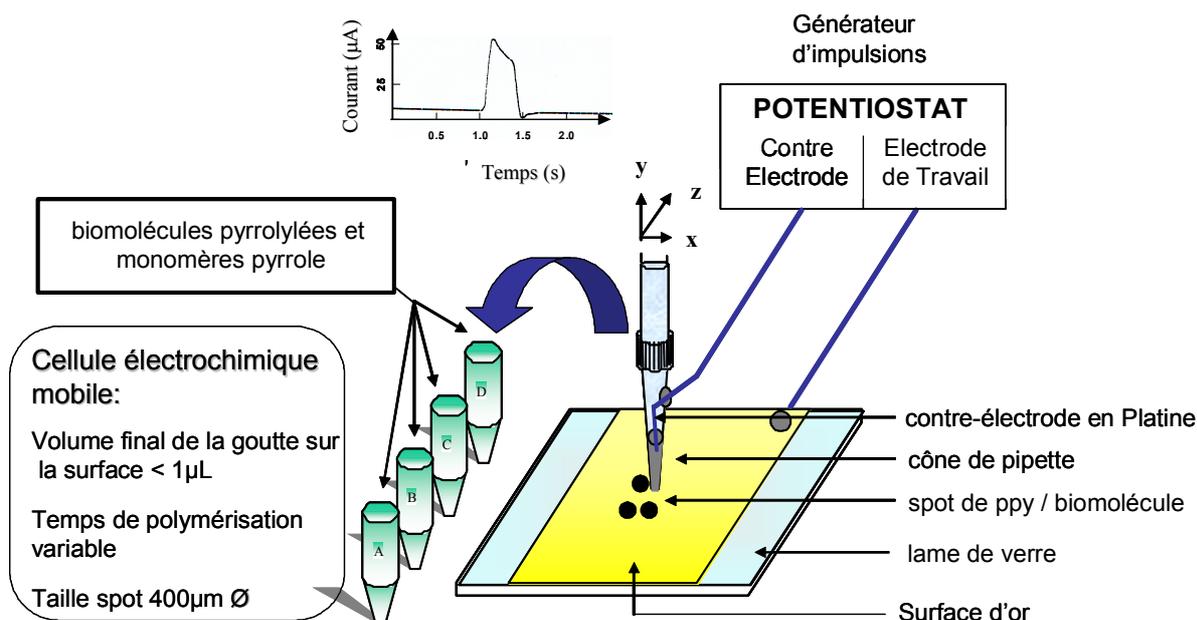


Figure 34 : Principe de la microstructuration électrochimique en plots, composée d'un cône de pipette dans lequel est inséré un fil de platine (contre-électrode), la surface d'or est l'électrode travail ; le potentiostat permet notamment de moduler le temps de polymérisation. Le graphe en haut à gauche montre l'impulsion électrique provoquant la copolymérisation.

Ce cône est modifié par l'introduction d'un fil de platine (contre électrode) mis en contact avec la solution de tampon phosphate, pyrrole (conditions standard de 20 mM) et les biomolécules pyrrolylées. Seul est en contact avec la surface d'or le ménisque de liquide formé au bout du cône. Les déplacements de la pipette par rapport à la surface d'or sont pilotés par trois moteurs permettant un positionnement micrométrique dans les trois dimensions de l'espace et dirigés par le logiciel Polypotter (logiciel développé au laboratoire). Lorsque le contact est établi entre le ménisque à l'extrémité du cône et la surface d'or, une impulsion électrique de 2V durant un temps variable (choix de l'expérimentateur), générée par le potentiostat, permet la réaction de copolymérisation¹⁷⁷ (cf. le schéma de l'impulsion électrique de la figure 34). Une fois l'impulsion terminée, le cône quitte la surface, laissant une goutte au-dessus du plot de moins d' $1\mu\text{L}$; puis le cône est déplacé et rincé entre chaque

greffage de molécules biologiques, afin d'éviter toute contamination d'échantillons entre les différents dépôts.

1.1.5. Avantages

Les avantages de l'électropolymérisation du pyrrole sont nombreux. Un des principaux avantages de cette méthode est sa simplicité de mise en œuvre : les films peuvent être préparés en une seule étape très rapide. Un autre avantage de la fonctionnalisation électrochimique sur d'autres méthodes est la possibilité de générer le polymère sur une petite surface correspondant à la partie mouillée de l'électrode de travail. Ensuite, la reproductibilité de l'électrocopolymérisation est très bonne car la surface est exactement délimitée par les électrodes et l'épaisseur contrôlée par la charge injectée selon la relation suivante¹⁵⁶, cette équation tient compte du dopage par les électrolytes:

$$l = \frac{M \cdot Q}{2,2 \cdot A \cdot F \cdot \rho}$$

avec l l'épaisseur du polymère en mètres, $M = 0,0067 \text{ kg.mol}^{-1}$ la masse molaire du pyrrole, Q la charge de synthèse en Coulombs, A l'aire de l'électrode en mètres carrés, $F = 9,64.10^4 \text{ C.mol}^{-1}$ la constante de Faraday, $\rho = 1580 \text{ kg.m}^{-3}$ la densité du polypyrrole.

De plus, la densité de fixation des biomolécules peut, elle aussi, être contrôlée par le choix du ratio initial, dans le tampon phosphate, entre la concentration en pyrroles et celle en biomolécules pyrrolylées. Enfin, un avantage précieux pour les biocapteurs utilisés en imagerie SPR est le contraste important de l'image acquise (figure 35) lors de l'expérience entre les zones non fonctionnalisées du biocapteur (or nu) et les plots constitués du copolymère de pyrrole autorisant une localisation très simple des plots.

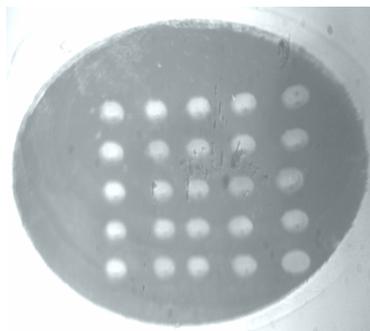


Figure 35: Image SPR d'une surface d'or fonctionnalisée selon une matrice 5x5 plots de copolymères de pyrrole, cette matrice est immergée dans une solution de rinçage.

En résumé, la fonctionnalisation 2D par électropolymérisation de pyrroles et de biomolécules pyrrolylées est une méthode simple, rapide, conduisant à la formation de plots très solidement fixés sur l'or dont de nombreux paramètres physiques (forme, épaisseur, densité de greffage de biomolécules) peuvent être contrôlés de manière reproductible.

Nous avons donc vu dans ce paragraphe le procédé de fabrication de biopuces développé au laboratoire, tel qu'il était au commencement de cette thèse. Ces puces ont l'avantage de pouvoir être utilisées pour la détection des interactions biologiques en fluorescence mais aussi en imagerie SPR. Nous savons que les biomolécules utilisables jusqu'à présent peuvent être des monobrins d'ADN, des peptides ou des protéines. Maintenant les acquis du laboratoire dans la fabrication de puces connus, il faut connaître à quel degré cette technique est transposable à notre projet de puces à oligosaccharides.

1.2. Conception de la puce à oligosaccharides

Fort des connaissances et des compétences du laboratoire dans le domaine des biopuces à ADN, nous avons décidé de réaliser une puce à oligosaccharides sur le même principe. Comme il a été décrit au chapitre I.4., les héparanes sulfates sont des sucres jouant un rôle très important au niveau physiologique. Cette famille de sucres est largement étudiée à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble dans le laboratoire d'Enzymologie Moléculaire, équipe dirigée par M. Hugues Lortat-Jacob. Un de leurs projets concerne la compréhension du rôle joué par les héparanes sulfates dans divers processus biologiques. Ils cherchent donc à comprendre comment ces sucres peuvent reconnaître de façon spécifique autant de protéines (au moins 200 identifiées à ce jour) appartenant à des familles structurales différentes (criblage de bibliothèques et séquençage oligosaccharidique). La réponse à cette question passe par la mise au point d'une nouvelle approche analytique permettant la mesure simultanée des interactions d'un certain nombre d'oligosaccharides avec un ligand en solution. Cela implique une approche multidisciplinaire du développement d'un système analytique mettant en œuvre des compétences variées dans les domaines de **(i)** la préparation de banques naturelles ou synthétiques d'oligosaccharides, **(ii)** leur modification (chimie) et leur fixation sur support solide (puce) et **(iii)** la mesure de leur interaction avec des produits en solution (fluidique / optique)...

La transposition directe des compétences de notre laboratoire dans le domaine des puces à ADN à base de polypyrrole à notre étude s'avère être impossible. Ainsi, dans ce paragraphe, nous allons détailler les étapes de conception d'une puce à oligosaccharides (tous les critères auxquels elle doit répondre : similaires ou différents du procédé déjà mis en place), puis le modèle biologique sur lequel seront faites les études sera décrit.

1.2.1. Paramètres et étapes de conception de la puce

Les différentes étapes à réaliser lors de la conception d'une puce à sucres sont décrites sur la figure 36, puis elles seront détaillées point par point, afin de comprendre les choix que nous avons faits. Dans une première étape, les oligosaccharides doivent être reliés à un groupe pyrrole. Puis le dépôt de différents oligosaccharides pyrrolylés sur la surface en des localisations précises est effectué, par le procédé d'électrosporting. Une fois la matrice de plots de polymère construite, les détections des interactions biologiques peuvent être réalisées : soit par la microscopie de fluorescence, nécessitant le marquage de la protéine cible ajoutée, soit par imagerie SPR qui utilise simplement une protéine native.

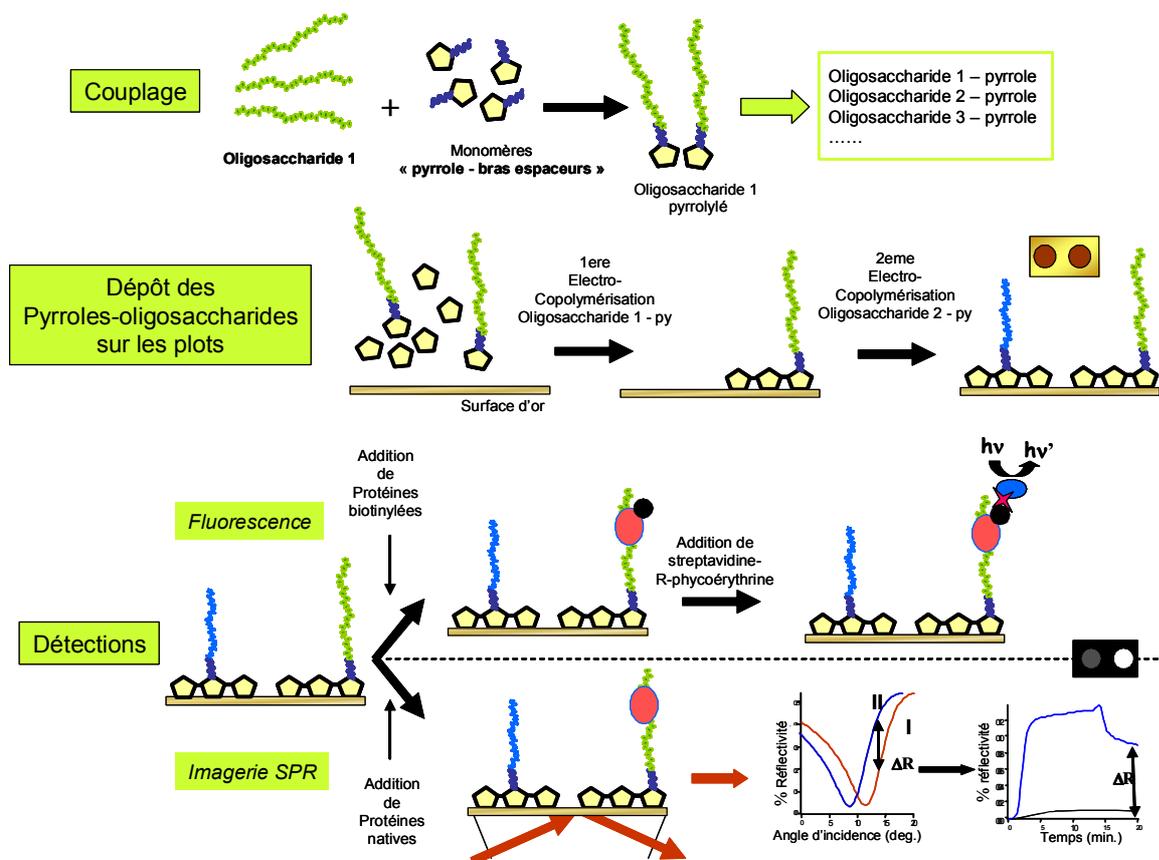


Figure 36 : Schéma de principe de réalisation d'une puce par électrosporting. *Etape 1* : le couplage entre la biomolécule et un monomère pyrrole fonctionnalisé par un bras espaceur ; *Etape 2* : Dépôt par Electrospotting sur la surface d'or ; *Etape 3* : Détections soit par fluorescence soit par imagerie SPR.

1) Le choix du support :

Etant donné que l'objectif du travail est de réaliser une mesure des interactions par imagerie SPR, le support reste inchangé par rapport aux puces à ADN développées, à ce jour, au laboratoire.

Il faut savoir que la technique SPR nécessite une couche métallique entre le support prisme en verre et le milieu où résident les interactions biologiques. Il faut donc que le métal choisi puisse se fixer sur le verre et devienne ainsi une partie intégrante du capteur. Toutefois, certains métaux, comme l'or, n'adhèrent pas bien aux surfaces composées d'oxydes comme le verre ou le quartz. Afin de faciliter l'adhésion du métal sur le verre, une couche ultrafine de chrome (1 à 2 nm Cr¹⁷⁸) par exemple peut être déposée sur le prisme. La fonction de ce métal (le chrome) est, d'un côté, de se lier de manière covalente aux oxydes à l'interface avec le verre et, de l'autre, de s'allier avec le métal choisi. Cette insertion de couche ultrafine n'est cependant pas une obligation, puisque le métal peut être directement déposé sur le prisme¹⁷⁹ mais elle est conseillée car la couche d'or seule se détache facilement.

De plus, la couche métallique choisie va être en contact avec les solutions contenant les produits biologiques intervenant dans les interactions mesurées. Le métal doit donc être stable et ne pas se détériorer au cours du temps suite aux contacts répétés avec les milieux liquides (exemple : métal ne s'oxydant pas, contrairement à l'argent). Ce métal va aussi être le lieu de la fonctionnalisation de la surface et de greffage des sondes et doit donc avoir des propriétés physico-chimiques compatibles avec cette nécessité. Le métal de choix répondant à tous ces critères est l'**or**. La couche d'adhésion de l'or peut être du Chrome ou du Titane, sur le verre.

Enfin, le rôle principal de la couche métallique reste de rendre possible la résonance des plasmons de surface. Le choix de ce métal est fonction de cette sensibilité (en variation de réflectivité) qu'il permet d'obtenir. Cette sensibilité est en fait fonction de l'indice de réfraction du métal. Emmanuel Maillart du Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique à Orsay, a étudié, durant sa thèse, de nombreux paramètres entrant en jeu pour le développement de l'imagerie SPR. Il a notamment défini et justifié quelle était la couche métallique, son empilement et son épaisseur¹⁸⁰. Notre choix se base sur ses résultats : notre support est donc un **prisme** en verre sur lequel est déposé **1 nm de chrome recouvert par 48 nm d'or**.

En résumé, le support retenu sur lequel sera construit la matrice de plots sera une couche d'or (électrode de travail pour l'électrodéposition) déposée sur une surface de verre : lames de

microscope en verre pour les études de détection en fluorescence ou prismes recouverts d'or pour l'imagerie SPR.

2) Choix du polymère sur lequel sera immobilisé l'oligosaccharide:

Celui-ci reste inchangé vis-à-vis des puces à ADN déjà étudiées. La technologie du laboratoire est basée sur le polypyrrole (cf. paragraphe II.1.1), la capacité à immobiliser des brins d'ADN comme des peptides ou des protéines dans les films de polypyrrole suggère que cette immobilisation est aussi possible pour les oligosaccharides. De précédentes études menées au laboratoire (Livache et al.) ont permis de définir la concentration minimale en pyrrole nécessaire à l'électrocopolymérisation de pyrrole dans de bonnes conditions.

En résumé, la **concentration choisie** (pour notre étude) **en monomères de pyrrole sera de 20mM**, mélangée à une concentration d'oligosaccharides fonctionnalisés par un pyrrole, qui devrait être la plus basse possible.

3) Préparation de l'oligosaccharide « sonde » :

Tout comme les brins d'ADN ou les protéines, **(i)** l'oligosaccharide doit être attaché de manière covalente au monomère de pyrrole, **(ii)** le lien entre le pyrrole et l'oligosaccharide doit être réalisé de telle sorte que l'oligosaccharide puisse toujours reconnaître les protéines ; on essaiera de le modifier sur une de ses deux extrémités, dans des conditions non oxydantes afin de ne pas couper l'oligosaccharide linéaire et **(iii)** il faut que ces oligosaccharides, une fois immobilisés dans le film de polypyrrole, restent toujours accessibles aux protéines ; en résumé, concevoir le système adéquat pour ne pas masquer la reconnaissance.

Nous constatons donc qu'il existe trois points clés auxquels il faut absolument répondre afin de réaliser les meilleures interactions possibles.

Par analogie avec ce qui a déjà été mis en place au laboratoire avec les brins d'ADN, les oligosaccharides HS possèdent une structure linéaire (tout comme les brins d'ADN) ; comme le montre la figure 33, les ODN sont **liés par une liaison** au pyrrole par une de leurs extrémités, donc nous supposons que la fixation covalente du sucre à un groupe pyrrole se fera par une de ses deux extrémités.

Il reste à déterminer sur quelle extrémité du sucre le pyrrole peut être fixé. De nombreuses études sur les interactions entre HS/HP – protéines ont été réalisées par le

procédé Biacore (*cf.* I.3.2.3.), et notamment, par l'équipe de Osmond¹⁸¹ qui a étudié l'effet de la fonctionnalisation de l'héparine par une biotine : une fois le sucre modifié par la biotine, il était immobilisé sur la surface de streptavidine (*cf.* interaction biotine-streptavidine I.2.2.1.). Trois points d'ancrage covalent de la biotine ont été testés : sur les groupes carboxylate, sur les amines non substituées et sur l'aldéhyde en bout de chaîne d'héparine (extrémité réductrice) ; l'autre extrémité, dite non réductrice, ne permet pas de fonctionnalisation. Par détection SPR, ils ont comparé les réactivités de l'héparine en fonction de son site de fixation, et la fonctionnalisation sur l'aldéhyde s'est révélée être le meilleur point d'ancrage, car cette fonction est unique sur la chaîne et de surcroît à une extrémité. Signalons aussi que, contrairement à l'extrémité réductrice, il existe sur chaque chaîne de HP un nombre conséquent d'amines et de carboxylates ; ainsi il est plus judicieux de fixer une seule biotine, qu'une dizaine, évitant un phénomène d'encombrement stérique, pouvant ainsi empêcher l'interaction. Nous souhaitons donc fonctionnaliser cette chaîne en un seul point d'ancrage du sucre, d'où le choix de l'aldéhyde sur l'extrémité réductrice.

Il est aussi souhaitable que les oligosaccharides, une fois immobilisés dans la matrice de polypyrrole, restent accessibles à la solution, c'est-à-dire qu'ils puissent reconnaître les protéines. Mais l'héparine, comme les autres GAGs, peuvent jouer eux-mêmes le rôle d'électrolytes lors de la formation du polymère de pyrrole¹⁸² (*cf.* électrosynthèse du ppy II.1.1.2.), c'est-à-dire que cette catégorie de sucres, à cause de leurs groupes sulfates, peut rester « collée à la surface » ou « piégée dans le film ». Pour contrecarrer cet effet négatif, nous décidons de glisser entre l'extrémité du sucre et l'atome d'azote du monomère de pyrrole une molécule chimique assez linéaire, servant de « bras espaceur ».

Ainsi, nous nous inspirons d'une technique très connue de création de liaison covalente entre une biomolécule et une molécule chimique : la technique de marquage de biomolécules par la biotine. De nombreuses biotines prolongées par des bras espaceurs, eux-mêmes fonctionnalisés en bout de chaîne par des fonctions chimiques réactives différentes sont disponibles commercialement et peuvent servir de modèle pour notre étude.

4) Technique d'immobilisation : Electrospeckling :

La technique d'immobilisation utilisée est l'électrospeckling, procédé déjà décrit dans un paragraphe précédent (*cf.* II.1.1.4.). Nous voulons par cette copolymérisation électrochimique, déposer sur la surface d'or, les oligosaccharides fonctionnalisés. Rappelons que jusqu'à présent, aucune puce à sucres n'utilise un procédé d'électrodéposition de

polymère sur une surface. Les paramètres de structuration des brins d'ADN ou peptides par plots sont connus, or, nous ne savons pas si ces oligosaccharides, peuvent subir l'impulsion électrochimique de 2V, durant un temps compris entre quelques millisecondes et des centaines de millisecondes ou s'ils resteront accessibles par rapport à la protéine en solution grâce à la fixation en bout de chaîne ajoutée à la présence d'un bras espaceur. Il reste donc ces nouveaux paramètres à définir.

5) Techniques de détection : la Fluorescence et l'imagerie SPR :

Ces deux techniques sont déjà utilisées pour la mesure d'interactions ADN-ADN ou protéine / protéine, au laboratoire, mais aussi pour les interactions oligosaccharides / protéines (cf. I.3.5.). Remarquons que seule une équipe travaillant dans le domaine des puces à sucres a recours à l'imagerie SPR (équipe de Corn).

En bref, la puce que nous souhaitons concevoir va pouvoir être ébauchée grâce aux techniques déjà maîtrisées dans notre laboratoire (même support, même principe de structuration par plots de polypyrrole, mêmes modes de détection), mais beaucoup de points sont à définir, notamment dans le cadre de la préparation de la molécule sonde, avec de nouvelles molécules chimiques possédant un pyrrole, lié à une chaîne « espaceur », elle-même terminée par une fonction chimique précise lui permettant de réagir avec une fonction aldéhyde (ou aldéhyde modifié) à l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide.

1.2.2. Choix du modèle biologique

Dans ce paragraphe, va être abordé et expliqué le modèle biologique sur lequel nous allons baser notre travail pour toute la suite de l'étude.

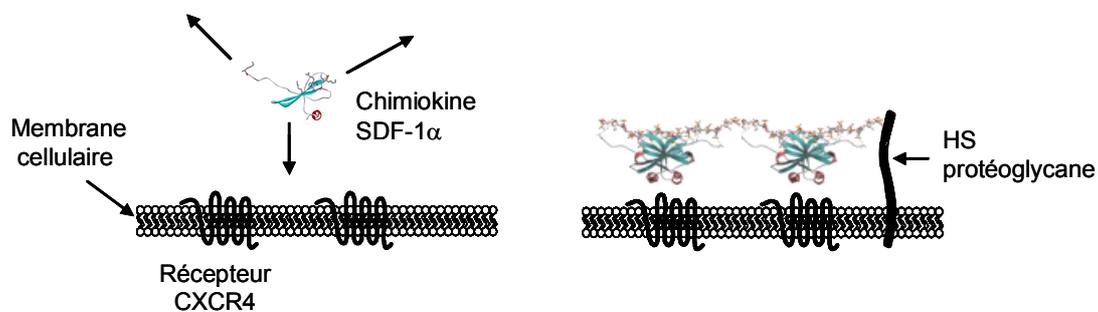


Figure 37 : *Modèle d'étude biologique* : l'interaction entre la chimiokine SDF-1 α et HS fixé à la membrane cellulaire. L'oligosaccharide permet la constitution de gradients de concentration locale de la chimiokine à la surface de l'endothélium vasculaire conduisant notamment au recrutement localisé de populations cellulaires circulaires au cours de l'inflammation

La chimiokine SDF-1 α (*stromal cell-derived factor*) est un autre membre de la famille des CXC chimiokines (famille définie dans le paragraphe I.3.3.2.b). C'est un médiateur pro inflammatoire, mais elle est aussi considérée comme un inhibiteur potentiel de l'entrée du VIH dans la cellule (figure 37). En effet, au cours d'un des processus d'infection par le VIH¹⁸³, les récepteurs des chimiokines (notamment CCR5 et CXCR4, R = Récepteur), jouent le rôle de co-récepteur pour le virus¹⁸⁴ (figure 37). L'interaction du VIH avec le co-récepteur CXCR4 peut être inhibée par son ligand naturel : la chimiokine SDF-1 α . Cette inhibition s'explique par deux mécanismes dynamiquement liés et dépendants de la liaison spécifique entre la chimiokine et le récepteur. Le premier est la compétition entre la chimiokine et le virus vis-à-vis de CXCR4. Le deuxième est la résultante de la diminution de CXCR4 à la surface cellulaire par un mécanisme d'internalisation du co-récepteur par endocytose¹⁸⁵.

Cette chimiokine SDF-1 α possède une affinité importante pour certains glycosaminoglycanes sulfatés (Kd # 40nM)¹⁸⁶. Cette interaction est spécifique des héparanes sulfatés¹⁸⁷, et la forte constante d'association de SDF-1 α avec les HS suggère que c'est sous la forme d'un complexe protéine / HS que l'activité anti-VIH de la chimiokine est optimale (interaction avec CXCR4), permettant la protection de la cellule contre le virus¹⁸⁸. De plus, il a été montré qu'une fois le sucre reconnu par la protéine, celle-ci va se dimériser sur le site de fixation.

Des études ont montré que l'HS est impliqué dans la fixation et la localisation de SDF-1 α à la surface cellulaire^{189,190} ; d'autres ont prouvé que certains acides aminés de la protéine étaient essentiels à cette interaction¹⁹¹ et une étude en modélisation a suggéré qu'un dodécasaccharide ou un tétrasaccharide de HP était nécessaire à la fixation¹⁸⁸.

2. Préparation de la molécule sonde « sucre »

Le greffage de l'héparine HP6 (héparine de 6 kDa) sur le monomère de pyrrole est précédé d'une étape importante de fonctionnalisation du pyrrole. Dans ce paragraphe, nous allons tout d'abord nous pencher sur les moyens utilisables pour fixer le monomère de pyrrole au sucre par une liaison covalente. Puis les propriétés des différentes molécules « bras espaceur – pyrrole » seront exposées, justifiant le choix de telles molécules. Enfin, nous décrirons la synthèse par voie chimique de cinq monomères pyrrole fonctionnalisés à l'azote par différentes entités : différentes longueurs de chaîne pour le bras espaceur et plusieurs fonctions terminales.

2.1. Synthèse des « bras espaceurs - pyrrole »

2.1.1. Choix des fonctions terminales

Afin de lier le monomère de pyrrole à l'oligosaccharide en bout de chaîne, toutes les fonctions réactives doivent être recensées et étudiées au préalable. Le nombre d'étapes nécessaires lors de la préparation sera un facteur déterminant pour le choix des fonctions réactives à préparer, permettant d'obtenir les « HP6 - bras espaceurs - pyrrole » avec les meilleurs rendements de couplage possibles.

Pour cela, nous nous inspirons des couplages connus réalisés entre les protéines et de petites molécules chimiques¹⁹² (marquage de fluorophores, de biotine,...). Le tableau suivant (tableau 3) résume les méthodes principales :

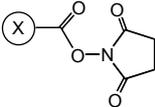
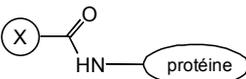
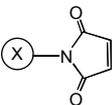
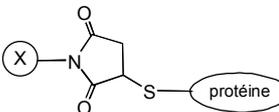
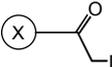
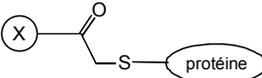
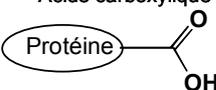
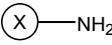
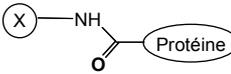
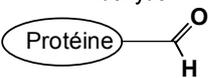
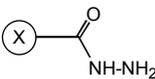
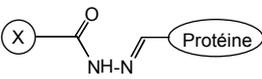
Groupe fonctionnel	Groupe réactif	Liaison formée
Amine primaire 	Ester-NHS / Ester-sulfoNHS 	Liaison Amide 
Thiol 	Maléimide 	Liaison Thioéther 
	Iodoacétyle 	Liaison Thioéther 
Acide carboxylique 	Amine 	Liaison Amide 
Aldéhyde 	Hydrazide 	Liaison Hydrazone 

Tableau 3 : Récapitulatif (d'après Pierce) des différentes méthodes de couplages entre une protéine et une molécule chimique (pour un marquage).

D'après ce tableau, nous pouvons coupler notre biomolécule à une petite molécule notée X, par des fonctions telles que l'amine, le thiol, l'acide carboxylique ou l'aldéhyde. Il reste cependant à définir les fonctions véritablement utilisables sur l'oligosaccharide HP6.

L'une des propriétés du dernier cycle pyranose d'une chaîne oligosaccharidique est qu'il s'interconvertit pour donner une forme ouverte présentant un groupe alcool et un groupe aldéhyde. Ainsi à l'équilibre thermodynamique, ce cycle se trouve sous trois formes : deux formes fermées, l'une étant anomère α (1/3), l'autre anomère β (2/3) et la forme ouverte en faible quantité présentant un aldéhyde (<1%).

La fonction aldéhyde s'avère donc être la meilleure fonction utilisable pour le couplage ; par conséquent, au vu du tableau 3, il est souhaitable de synthétiser des molécules « pyrrole - bras espaceur » possédant un groupe réagissant sélectivement avec un aldéhyde : le choix se porte donc sur l'hydrazide. Il est aussi possible de synthétiser des molécules possédant une amine terminale, afin de réaliser une amination réductrice sur l'aldéhyde. De plus, la transformation de l'aldéhyde du sucre en groupe thiol étant connue et déjà utilisée pour fonctionnaliser l'oligosaccharide (HS ou HP) par une fonction thiol terminale, une molécule « pyrrole - bras espaceur » pourrait être fabriquée avec un maléimide en fonction terminale.

En résumé, les molécules « bras espaceurs – pyrrole » qui seront synthétisées dans le but de relier le sucre au groupe pyrrole posséderont comme fonction terminale : l'hydrazide, l'amine ou le maléimide.

2.1.2. Les différents « bras espaceurs - pyrrole » synthétisés

Maintenant que les fonctions terminales possibles ont été définies, nous allons décrire la synthèse des différents « bras espaceurs – pyrrole » ; ces molécules, une fois synthétisées, seront fixées à l'oligosaccharide.

Il est souhaitable de séparer par une chaîne linéaire d'atomes le monomère de pyrrole de l'extrémité de l'oligosaccharide. A la différence des espaceurs utilisés pour les brins d'ADN (quelques thymidines), nous voulons insérer dans le cas des sucres une chaîne carbonée. Nous basons notre synthèse sur la longueur de chaîne utilisable, nécessaire à un éloignement efficace de l'oligosaccharide par rapport au film de polypyrrole.

Ces chaînes doivent tenir compte du schéma de synthèse permettant l'obtention de monomères pyrrole, fonctionnalisés sur l'azote par une chaîne linéaire d'atomes. La réaction de formation du pyrrole fonctionnalisé sur l'azote est connue, cette synthèse a été réalisée

pour la première fois par Jirkovsky et coll.¹⁹³, cette réaction consiste à faire réagir le diméthoxy-tétrahydrofurane avec une molécule contenant une amine primaire (figure 38).

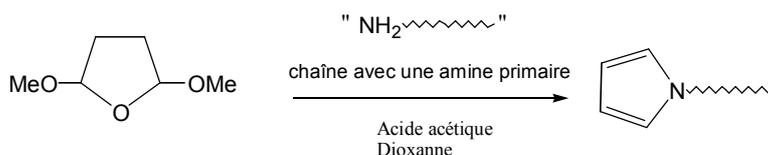


Figure 38 : Schéma réactionnel de la formation d'un composé pyrrole fonctionnalisé sur l'azote.

Nous allons maintenant décrire la synthèse par voie chimique de cinq monomères de pyrrole fonctionnalisés à l'azote, comportant nécessairement à leur extrémité l'une des trois fonctions terminales choisies précédemment (figure 39).

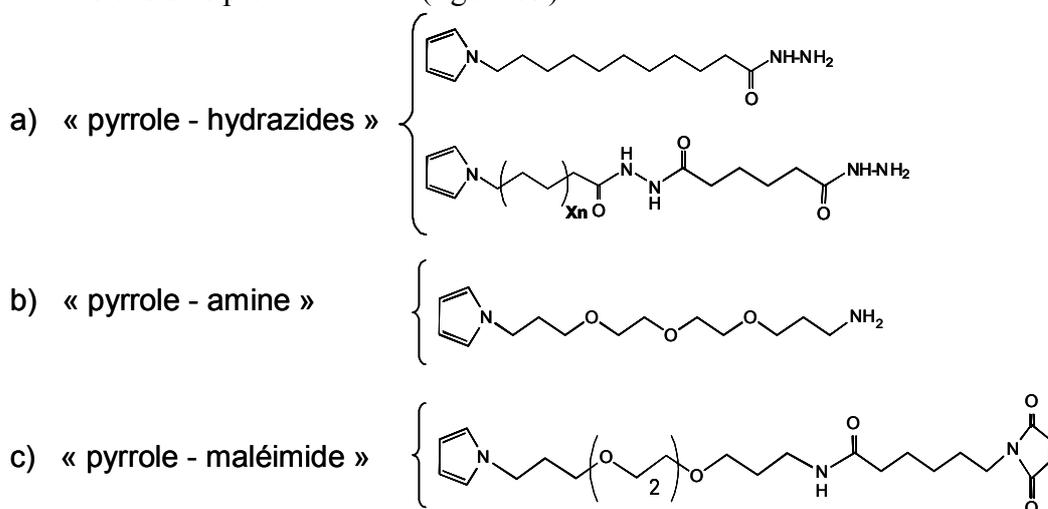


Figure 39 : Représentation des molécules « pyrrole – bras espaceurs » synthétisées ; $X_n = -(CH_2)_5-$ ou $-(CH_2)_{10}-$

a) Synthèse des monomères pyrrole - hydrazides :

Pour la synthèse de ces molécules « pyrrole - hydrazide », nous avons opté pour l'utilisation de chaînes carbonées simples, comprenant à une extrémité une fonction amine primaire (formation du pyrrole) et à l'autre une fonction acide carboxylique, ces molécules contiennent sur leur chaîne initiale 5 ou 10 carbones.

Cette synthèse se déroule en plusieurs étapes réactionnelles, tout d'abord le cycle pyrrole est formé; dans l'étape 2, l'acide carboxylique est transformé en ester activé ; celui-ci réagit ensuite avec les fonctions hydrazine ou hydrazide dans l'étape 3, pour obtenir les « pyrrole - hydrazide » attendus (figure 40).

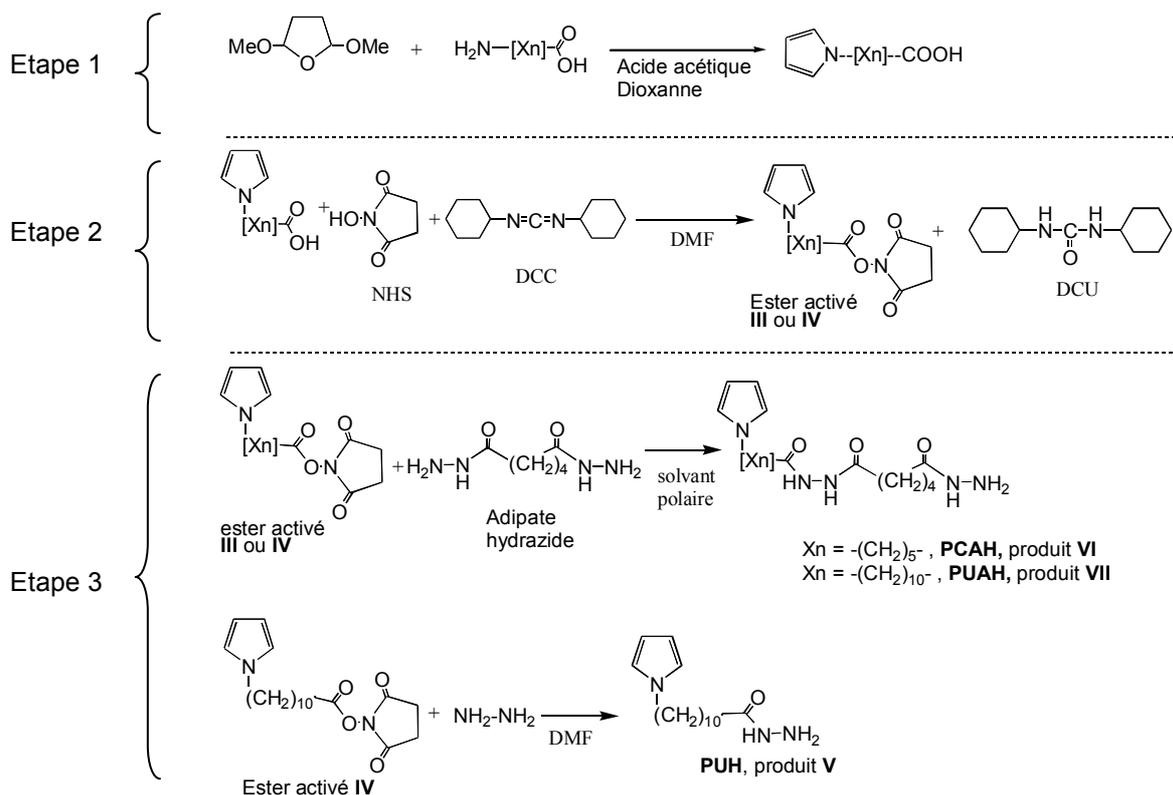
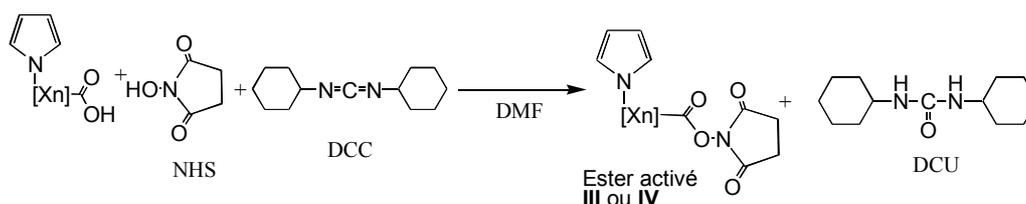


Figure 40 : Principe de la synthèse des monomères « pyrrole-hydrazide »

a.1. Synthèse des pyrroles acides

L'étape 1 (figure 40) est effectuée selon le mode opératoire décrit par I. Jirkovsky et coll.¹⁹³, à partir de deux produits commerciaux : le diméthoxytétrahydrofurane et l'acide 6-amino-caproïque ($X_n = -(CH_2)_5-$) ou l'acide 11-amino-undécanoïque ($X_n = -(CH_2)_{10}-$). La formation du produit se fait en plusieurs étapes, la première étant l'ouverture de l'époxyde par attaque nucléophile selon un mécanisme SN_2 du doublet non liant de l'atome d'azote sur le carbone en position 2 de l'oxygène. Cette ouverture acido-catalysée du diacétal se fait pendant le reflux. Suit une phase lente où se fait la refermeture du cycle, en passant par une imine instable pour obtenir au final un hétérocycle azoté à 5 atomes. Après purification, le produit **I** (PC-COOH) est obtenu avec un rendement de 86 % et le produit **II** (PU-COOH) avec un rendement de 65 %.

a.2. Synthèse des pyrrole - esters activés



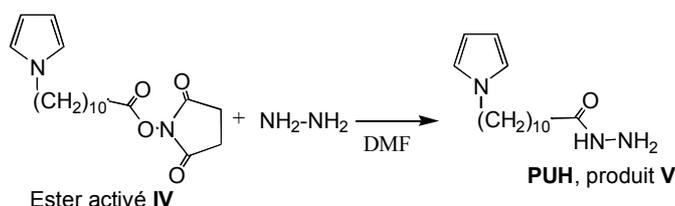
Pour obtenir les molécules « pyrrole - hydrazides » souhaitées, il nous faut d'abord transformer les acides carboxyliques en esters activés. Ces esters sont obtenus selon le mode opératoire décrit par E.A. Bayer et coll.¹⁹⁴ dans lequel la N-hydroxysuccimide (NHS) et le produit **I** (ou **II**) sont couplés par l'intermédiaire de la N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). C'est une réaction acido-catalysée avec formation d'un intermédiaire O-acylurée, conduisant à la formation de la dicyclohexylurée (DCU), insoluble dans les solvants organiques, éliminée facilement par simple filtration. Après avoir concentré le filtrat, aucune purification supplémentaire n'est requise, afin d'éviter d'hydrolyser l'ester formé. Les rendements de ces deux estérifications sont estimés à environ 75 % pour l'ester de pyrrole-[5]-N-hydroxysuccimide (PC-NHS, produit **III**) et pour l'ester de pyrrole-[10]-N-hydroxysuccimide (PU-NHS, produit **IV**).

a.3. Synthèse des pyrroles - hydrazides

Rappelons tout d'abord la nécessité d'avoir une fonction hydrazide terminale afin de pouvoir coupler le sucre au pyrrole, en bout de chaîne, grâce à l'interconversion du dernier cycle de la chaîne oligosaccharidique.

A partir des deux précurseurs I et II, nous souhaitons obtenir trois produits finaux « pyrrole - hydrazide », ayant trois longueurs de chaîne distinctes.

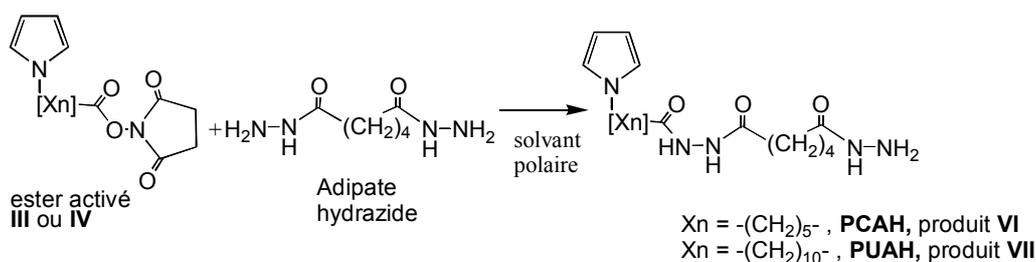
a.3.1. Formation du produit **V**, le pyrrole-[10]-hydrazide : **PUH**



C'est une réaction de type addition-élimination, avec régénération du NHS. L'ester activé et l'hydrazine sont additionnés en quantité stoechiométrique, afin d'éviter la formation de sous-produits tels que des « dimères » de pyrrole. Malgré cette précaution, en fin de

réaction, des « dimères » sont présents dans le milieu réactionnel. Lors de la purification, il nous a été impossible de séparer de manière quantitative le PUH des autres produits.

a.3.2. Formation des produits VI et VII : le pyrrole-[5]-adipate-hydrazide PCAH et le pyrrole-[10]-adipate-hydrazide PUAH



Les deux produits sont obtenus par une réaction de type addition-élimination, avec régénération de NHS, entre les esters activés III ou IV et l'adipate dihydrazide pour former le produit VI : PCAH (Xn = -(CH₂)₅-) dans le DMF, et PUAH (Xn = -(CH₂)₁₀-) dans le DMSO. Le NHS étant insoluble dans les solvants polaires que sont le DMF et le DMSO, précipite. Il est donc facile de connaître l'état d'avancement de la réaction en filtrant simplement et en séchant et pesant le NHS régénéré. La purification est effectuée sur une colonne de silice avec un gradient de DMSO dans CH₂Cl₂, c'est une séparation par différence de solubilité de différents produits, avec un rendement estimé à 44 % pour PCAH et 41 % pour PUAH. Après passage sur la colonne, il reste des traces de dimères, ce qui fausse l'estimation du rendement mais ne pose pas de problème pour la suite, puisque ces dimères seront inertes vis-à-vis du sucre (aucune fonction réactive accessible).

b) Synthèse du monomère « pyrrole - amine », produit IX

Après avoir préparé les monomères « pyrrole - hydrazide », un nouveau « pyrrole - bras espaceur » est synthétisé, contenant en fonction terminale une amine primaire et ne possédant pas la même chaîne intermédiaire que les trois molécules synthétisées précédemment.

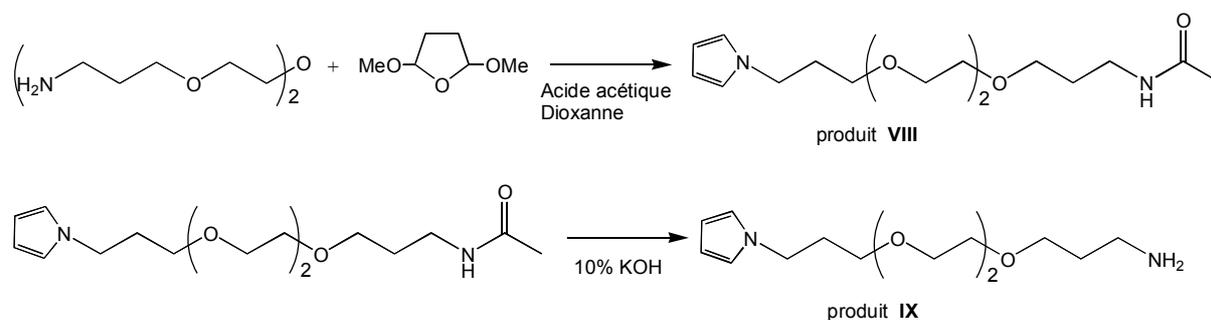


Figure 41 : Principe de la synthèse du monomère « pyrrole-amine »

Comme l'illustre la figure 41 ci-dessus, le composé **VIII** a été, préparé selon le mode opératoire de I. Jirkovsky et coll.¹⁹³ à partir de deux produits commerciaux qui sont la 4,7,10-trioxatridecane-1,13-diamine et le 2,5-diméthoxytétrahydrofurane. Il faut noter que nous avons utilisé un équivalent de diméthoxy-THF pour trois équivalents de diamine afin de limiter la formation du produit secondaire dipyrrole analogue au composé **VIII** comme précisé par les auteurs. Le rendement de cette synthèse s'est révélé être relativement faible (45%), en comparaison avec celui obtenu par les auteurs pour la synthèse du 1-(2-acétamidoéthyl) pyrrole (68 %). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce faible rendement associé à la synthèse de l'acétamide **VIII** : la formation de dipyrrole et d'oligomères de pyrrole, ce qui explique la coloration noire du milieu réactionnel (typique de la formation de ce composé).

La deuxième étape de cette réaction est une désacétylation en milieu basique de l'amine primaire terminale du pyrrole-[13]-acétamide **VIII** pour donner le pyrrole-[13]-amine, produit **IX**, avec un rendement de 83 %.

c) Synthèse du monomère « pyrrole - maléimide »

Il faut savoir que la fonction maléimide est généralement utilisée pour permettre le couplage entre les cystéines des protéines et les marqueurs (fluorescents ou non). Nous nous sommes basés alors sur ce principe ; un paramètre change : l'oligosaccharide doit subir une modification en bout de chaîne pour lui introduire une fonction thiol terminale.

La synthèse du monomère « pyrrole – maléimide » est réalisée selon le mode opératoire suivant composé de trois étapes réactionnelles.

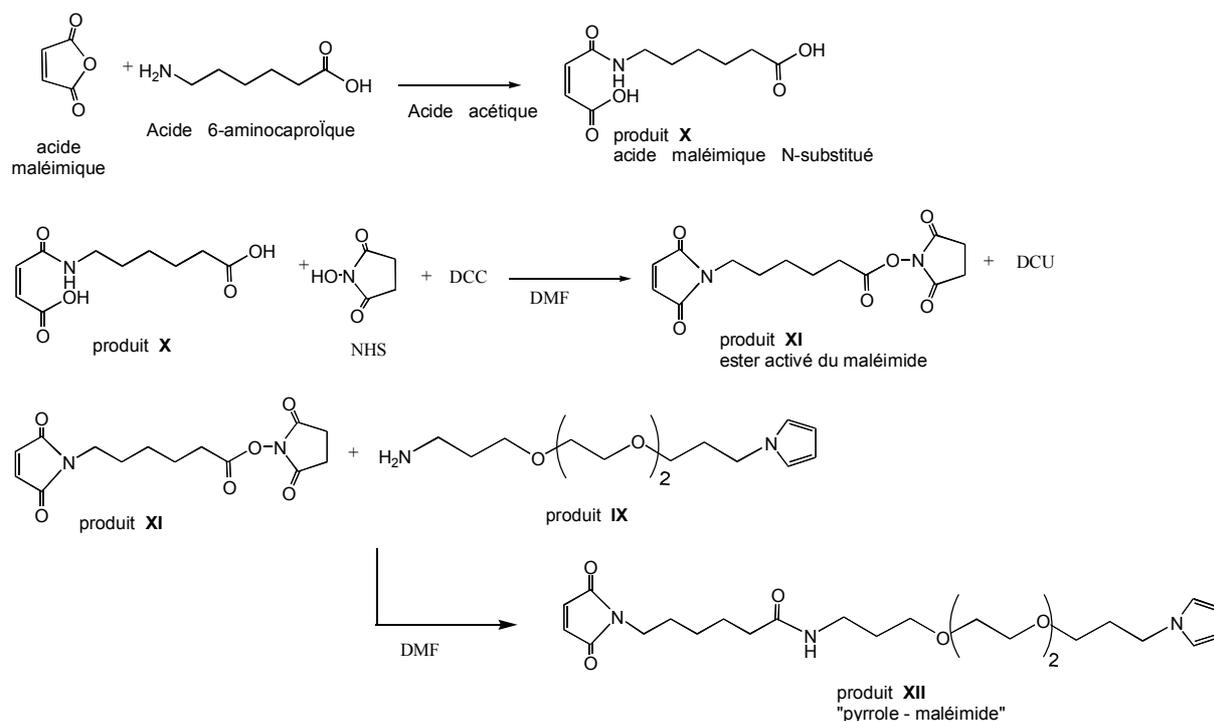


Figure 42 : Principe de synthèse du monomère « pyrrole – maléimide »

c.1. Synthèse du composé X : l'acide maléimique N-substitué

Cette synthèse (figure 42) a été réalisée selon le mode opératoire décrit par G.D. Prestwich¹⁹⁵, à partir de deux produits commerciaux que sont l'acide 6-aminocaproïque et l'acide maléique. Cette réaction est acido-catalysée par l'acide acétique, l'acide maléimique est insoluble dans l'acide acétique et donc précipite dans le mélange réactionnel. Contrairement à la purification effectuée par les auteurs, notre étape de purification a été effectuée par recristallisation dans l'éthanol. En effet, l'acide maléimique cristallise dans l'éthanol (à froid) et redevient soluble dans de l'alcool chaud¹⁹⁶.

c.2. Synthèse de l'ester activé du maléimide : produit XI

Cette étape de synthèse, développée au laboratoire par M. André Roget, est en fait une réaction « one-pot », dans laquelle le cycle du maléimide se forme en même temps que la transformation de l'acide en ester. Ces deux réactions simultanées sont acido-catalysées avec formation d'un intermédiaire O-acyluréé, suivie d'une réaction d'addition-élimination, conduisant à la formation de la DCU qui précipite dans le DMF et donc est facilement éliminée par simple filtration.

c.3. Fonctionnalisation du pyrrole-[13]-amine = produit XII

Le greffage de l'oligosaccharide thiolé sur le monomère de pyrrole est précédé de l'étape importante de la formation du composé « pyrrole - maléimide ».

Ainsi le composé IX « pyrrole-amine » déjà synthétisé (cf. II.2.1.2.b) est mis en présence du maléimide - ester activé (produit XI). L'ester activé réagit avec l'amine dans le DMF, c'est une réaction de type addition-élimination, avec régénération du NHS. Après purification, le produit XII est obtenu avec un rendement de 45 %.

2.1.3. Propriétés des bras espaceurs

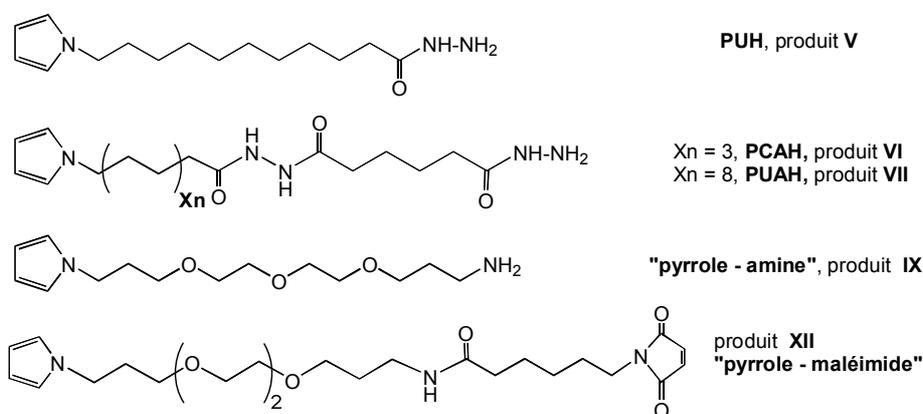


Figure 43 : Structures des différents « pyrrole – bras espaceurs » synthétisés.

Ces cinq molécules pyrrolylées (figure 43) synthétisées en vue d'un greffage à un sucre possèdent des propriétés physico-chimiques différentes. Notons tout d'abord qu'aucune ne possède la même longueur de chaîne :



Cela signifie que, dans l'absolu, si l'on admet qu'il n'y a pas de repliement de chaîne, ni d'interactions du bras avec la surface, le sucre fixé au bout du **Py~Maléimide** sera le plus éloigné du polypyrrole, donc de la surface, et de surcroît, aura un environnement plus favorable pour l'interaction avec les protéines. Le désavantage de travailler avec le **Py~Maléimide** est qu'il nécessite une fonctionnalisation au préalable de l'oligosaccharide. Ainsi, pour un oligosaccharide naturel, le **PUAH** possède la chaîne la plus longue.

Pour le sucre modèle utilisé HP6 qui mesure environ 100 Å, la longueur de chaîne du bras espaceur peut ne pas être un facteur critique, mais dès que nous nous intéresserons à la

fixation de fragments d'héparane sulfate beaucoup plus courts, ce critère pourrait devenir déterminant.

Une autre caractéristique physico-chimique entre en jeu : leur **hydrophilie** ; ainsi, on constate que le PUH est le composé le plus hydrophobe, cela étant dû à sa chaîne aliphatique faiblement compensée par un atome d'oxygène et deux d'azote ; nous pouvons donc soumettre un classement d'hydrophilie pour ces cinq composés :



Les composés $\text{Py}\sim\text{NH}_2$ et $\text{Py}\sim\text{Maléimide}$ contiennent sur leur chaîne trois oxygènes, permettant une bonne hydrophilie de cette partie de la chaîne (propriétés des PEG). Aussi, plus les chaînes sont longues sans hétéroatomes à l'intérieur, plus ces chaînes risquent de se replier, sur elles-mêmes, se compacter au contact d'une solution aqueuse.

De plus, le polypyrrole étant chargé positivement, il sera entouré de contre-ions négatifs pour obtenir son électroneutralité. Les héparanes sulfates et l'héparine étant fortement chargés négativement par leurs groupes carboxylates et sulfates, il peut se poser le problème que le sucre soit « collé » ou même partiellement voire totalement inclus dans le polymère. En effet, le sucre chargé négativement peut devenir un bon contre-ion pour le polypyrrole chargé positivement, ce qui risque d'empêcher le bon déroulement des interactions ; on comprend alors que l'environnement du sucre fonctionnalisé par un pyrrole reste donc un facteur essentiel.

2.2. Couplages entre l'oligosaccharide et les « bras espaceurs - pyrrole »

Maintenant que les différents composés « pyrrole – bras espaceurs » ont été synthétisés, l'étape suivante est le couplage de l'oligosaccharide naturel ou modifié (fonctions terminales différentes), afin d'obtenir la biomolécule voulue en vue de l'électrocopolymérisation.

Ainsi, il est apparu deux stratégies possibles (figure 44) pour synthétiser les molécules finales : la première (**I**) est de construire la molécule et de coupler directement le « pyrrole - bras espaceur » au sucre, la deuxième (**II**) étant de construire « séquentiellement » la molécule à partir du sucre en fixant étape par étape les réactifs formant le « sucre – bras espaceur – pyrrole ».

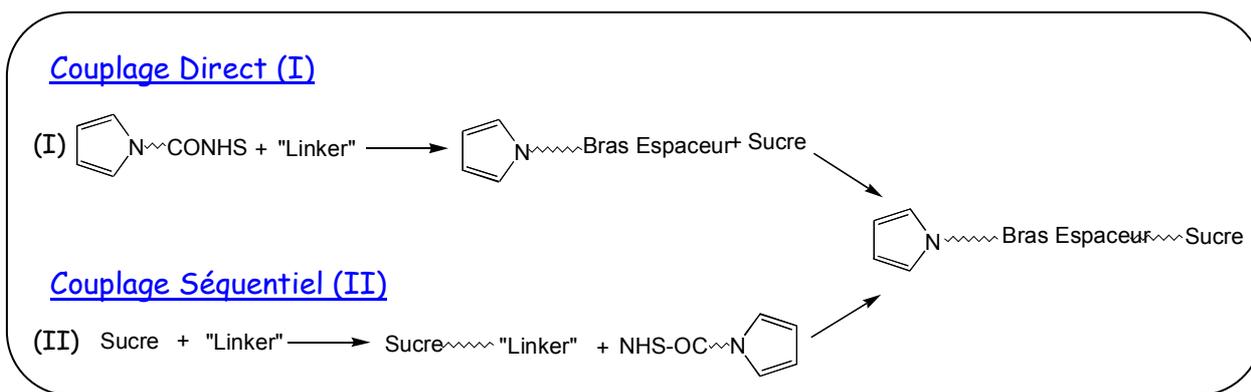


Figure 44 : représentation schématique des deux stratégies possibles afin de coupler le sucre et le monomère de pyrrole.

Dans ce paragraphe, seront décrits les différentes manières d'obtenir la biomolécule fonctionnalisée finale. Mais auparavant, il apparaît indispensable de décrire les différentes techniques analytiques permettant les caractérisations des produits et l'estimation des rendements de couplage

2.2.1. Estimations des rendements de couplage

Il est évident que, par nos techniques de couplage, nous allons obtenir les molécules « sucres sondes » souhaitées, mais une question se pose : peut-on déterminer un rendement pour cette réaction ? Nous avons pu déterminer grâce aux techniques classiques de RMN ou de spectroscopie de masse nos différentes molécules « pyrrole – bras espaceurs » ; mais une fois ces molécules reliées aux sucres, ces techniques sont très difficiles à mettre en œuvre, car les oligosaccharides sont de structure très complexe (ils ont, la plupart du temps une même longueur de chaîne mais les fonctions ne sont pas distribuées de la même façon) ; l'instrument de RMN à notre disposition ne nous permet pas de caractériser ces sucres précisément. D'autre part, un essai de caractérisation par la méthode de la HPLC-MS a été tenté sans succès: une fraction d'HPLC préparative issu de l'oligosaccharide HP6 à un temps précis a été injectée dans le système HPLC-MS, mais les résultats se sont révélés extrêmement complexes et impossibles à interpréter. De plus, ces oligosaccharides et la molécule de pyrrole ne possèdent aucune possibilité de caractérisation simple en UV-visible.

Ici nous allons décrire succinctement les techniques simples mises en œuvre pour évaluer l'efficacité de nos réactions de couplage.

a) Détermination de la quantité d'oligosaccharides

A l'issue des couplages, les échantillons, après purification, ne sont constitués que d'oligosaccharides, natifs ou modifiés par le « pyrrole – bras espaceur ». Il a d'abord été tenté de quantifier ces échantillons par absorbance UV, mais ces sucres tout comme les molécules « pyrrole – bras espaceurs » n'ont pas révélé de véritables propriétés d'absorption UV. Nous avons donc décidé de peser ces échantillons après séchage. Le problème majeur est le manque de précision de la pesée lors de la manipulation de quelques centaines de microgrammes. Ainsi un dosage, issu des travaux de Bitter et Muir, datant de 1962¹⁹⁷, est apparu comme essentiel dans la quantification des échantillons re-dissous dans H₂O. Par une réaction avec une molécule de carbazole et l'utilisation d'une gamme étalon, les acides uroniques du sucre sont dosés par colorimétrie. Notons que cette technique ne nécessite le prélèvement que de quelques microlitres d'échantillons, ce qui permet, dans l'absolu, de pouvoir doser toutes les solutions issues des couplages. Or il faut savoir que cette réaction au fur et à mesure des tentatives, s'est montrée capricieuse, obligeant l'utilisateur à recommencer au minimum trois fois la même manipulation afin d'obtenir des résultats cohérents ; malgré ses inconvénients, cette étape s'est révélée être indispensable dans l'estimation de la quantité de sucre.

La quantification finale des sucres dans les échantillons est une donnée importante, mais il manque un paramètre crucial à déterminer : l'estimation de la pyrrolylation des sucres.

b) Estimation qualitative de la pyrrolylation des oligosaccharides

Suite aux réactions de couplages et après avoir dosé la quantité totale en sucre, la quantité de pyrrole fixé aux oligosaccharides est le dernier paramètre à élucider. Il est apparu que le dosage avec la biotine-hydrazide était une bonne solution pour les couplages utilisant comme lien d'attache l'aldéhyde de la forme ouverte du cycle. Ce dosage, qui est basé sur la réaction mise au point par Ridley et coll.¹⁹⁸ est un dosage en retour sur membrane à différentes dilutions de l'échantillon (*cf.* partie expérimentale 2.3.1.). La biotine-hydrazide doit réagir avec les oligosaccharides n'ayant pas été modifiés lors du couplage. La figure 45 est un exemple de résultat obtenu après ce dosage : les deux premières lignes servent de témoin pour le dosage, celles-ci correspondent à l'oligosaccharide HP6 seul, donc, il est évident que les biotines se sont fixées et en nombre, quelle que soit la dilution. Par contre, si nous nous intéressons de plus près aux trois dernières lignes de la membrane qui sont des échantillons ayant réagi avec les « pyrrole - hydrazides », les résultats nous incitent à penser que seul l'échantillon PUH-HP6 a subi un couplage correct. Les intensités de l'échantillon

PCAH-HP6 sont très proches de celles des deux témoins HP6 et donnent à penser que le couplage a échoué.

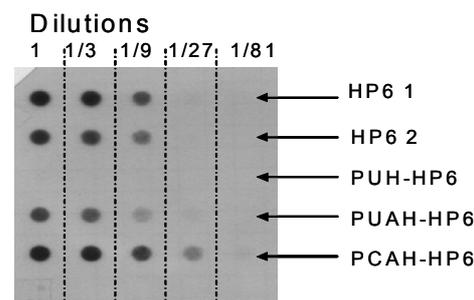


Figure 45: Exemple de résultat obtenu après un dosage sur membrane par la réaction avec la biotine-hydrazide. HP6 1 et 2 sont des témoins, ces sucres ne sont pas modifiés avant le dosage. Les 3 autres lignes : PUH-HP6, PUAH-HP6 et PCAH-HP6 sont les échantillons issus du couplage (cf. II.2.2.2.a).

Le désavantage majeur de ce dosage est qu'il ne nous offre qu'une estimation qualitative des rendements, ainsi nous nous sommes attachés à rechercher dans la littérature l'existence possible du test quantitatif des monomères de pyrrole.

c) Détermination de la quantité de pyrrole

Après quelques recherches dans la littérature, il nous est apparu qu'il existait un moyen de quantifier le pyrrole substitué, à des concentrations de l'ordre de la dizaine de nanomolaires. Les deux techniques trouvées sont dérivées de la méthode de Muhs et Weiss¹⁹⁹, initialement utilisée dans la quantification des dérivés pyrrolylés dans des distillats de pétrole.

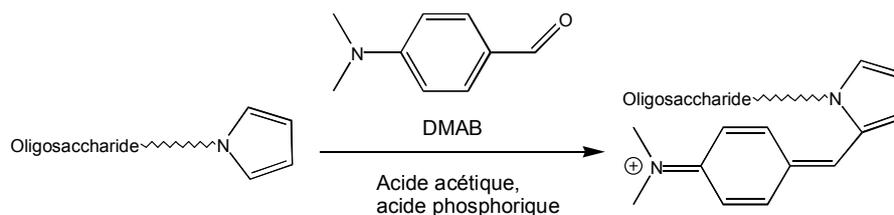


Figure 46 : principe du dosage des échantillons « oligosaccharide - pyrrole » avec le DMAB.

Contrairement aux conditions utilisées dans la méthode développée par Iyer *et al.*²⁰⁰, celles de Wolowacz *et al.*²⁰¹ sont plus aisées à mettre en œuvre ; de plus, dans ces travaux, le pyrrole à doser est lui aussi relié, *via* un bras espaceur, à une biomolécule par son atome d'azote.

C'est pour ces raisons que nous nous sommes inspirés de leurs protocoles afin de doser nos échantillons. La première étape a été de vérifier si l'oligosaccharide seul réagissait avec le réactif DMAB, ce qui n'était pas le cas et de tester une gamme de pyrrole-

biomolécules connue, afin de déterminer la précision du dosage aux très faibles concentrations.

La méthode consiste à faire réagir le p-(diméthylamino)-benzaldéhyde (DMAB) sur le groupement pyrrole, donnant un chromophore observable dans le visible (figure 46). Ce dosage a été réalisé sur tous les échantillons (que ce soit du couplage direct ou séquentiel), dès que le volume final des échantillons le permettait, l'étalonnage a pu être fait grâce à une gamme en ODN-pyrrole connue, dont le taux de pyrrolylation est de 100% (purification HPLC) et qui sont faciles à quantifier par spectrométrie UV.

2.2.2. Stratégie I: Couplage direct « pyrrole – bras espaceur » / Sucre

Maintenant que les différentes méthodes de détermination de la quantité de sucre et de pyrrole ont été expliquées, nous allons décrire, dans ce paragraphe, les différents couplages faits entre les molécules « pyrrole - bras espaceurs » synthétisés précédemment et les oligosaccharides naturels et / ou modifiés, afin d'obtenir les molécules sondes finales, prêtes pour la copolymérisation.

a) Couplage direct avec les « pyrrole-hydrazide »

Les hydrazides, qui sont des bases faibles, sont connues pour former des liaisons stables acyl-hydrazones avec une fonction aldéhyde, à un pH moyennement acide²⁰².

Cette réaction permettant de relier une molécule chimique à une molécule biologique par un lien covalent hydrazide a été initialement décrit par King et al.²⁰³ pour lier deux protéines *via* une molécule chimique. Notre réaction est basée sur les travaux plus récents de Ridley et al.¹⁹⁸, qui consiste en un couplage direct, car il permet de lier en une seule réaction l'oligosaccharide au monomère de pyrrole fonctionnalisé. Ce couplage a été réalisé principalement en solution, le couplage sur support a été seulement un moyen de comparaison de l'efficacité des deux méthodes.

a.1. Couplage en solution des « pyrrole-hydrazide » sur les oligosaccharides.

Signalons tout d'abord que ce type de couplage a été effectué sur plusieurs oligosaccharides : HP6 (notre sucre modèle), la Chondroïtine sulfate (CS), le Dermatan

Sulfate (DS) et différentes longueurs d'oligosaccharides de dp8 à dp16 (dp : degré de polymérisation) issues de HP6.

Cette réaction de couplage est réalisée en deux étapes (figure 47). La réaction est lente et se fait à chaud, dans un mélange DMSO 20 / tampon acétate de sodium (20mM, pH = 5) 1, car nos réactifs « pyrrole – hydrazides » ne sont pas solubles dans l'eau (figure 46). Les étapes du couplage sont les suivantes : d'abord le bras espaceur pyrrolylé (PUH, PUAH ou PCAH) est couplé au sucre HP6 (ou dp12 ou CS ou DS) par une fonction hydrazone, qui est connue pour s'hydrolyser facilement dans l'eau. C'est pourquoi, on réduit, dans une deuxième étape, cette fonction en hydrazide stable par le cyano-borohydrure de sodium (la réduction permet en fait de transformer le lien hydrazone instable en lien hydrazide stable)²⁰⁴.

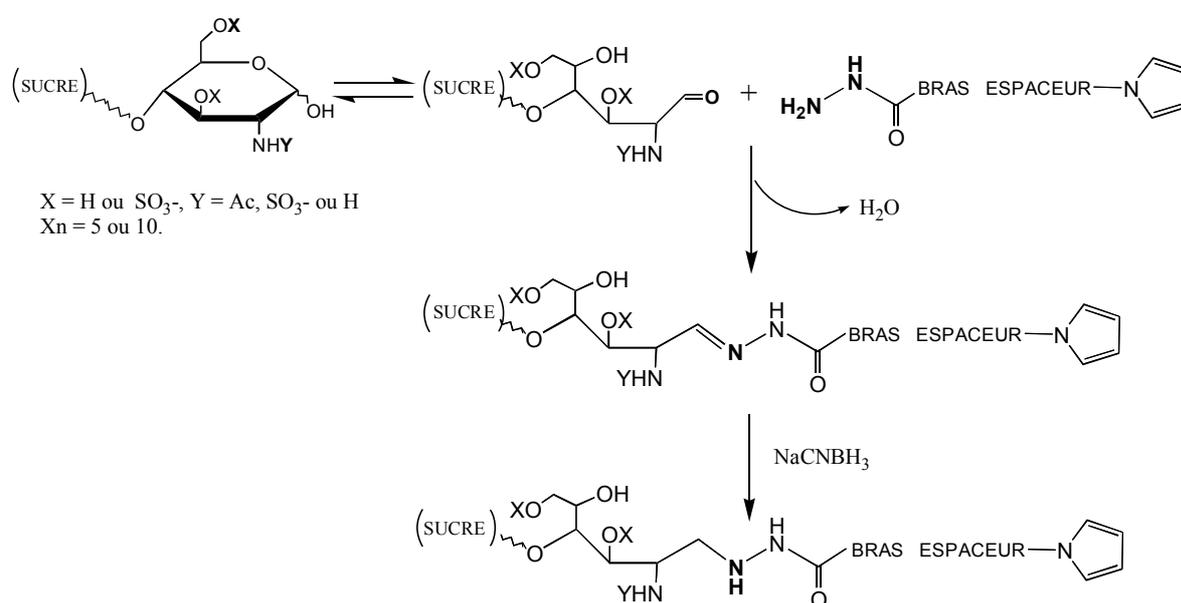


Figure 47 : Principe du couplage direct, réalisé en deux étapes, basé sur les travaux de Ridley¹⁹⁸, adapté ici à la fonctionnalisation des oligosaccharides. Première étape : formation d'une liaison hydrazone ; deuxième étape : réduction de l'hydrazone en hydrazide.

Un rapport molaire initial (RMI) de 50 molécules pyrrolylées (PUH, PUAH, PCAH) pour 1 sucre HP6 a été fixé avant le couplage. Cet excès est nécessaire afin de provoquer plus facilement la réaction entre l'hydrazide et la très faible quantité d'aldéhyde, issue de la forme ouverte du dernier cycle de l'oligosaccharide.

A l'issue du couplage, une purification est effectuée sur une mini colonne d'exclusion (PD10). La partie 'sucre couplé au pyrrole' est éluée dans la première fraction, suivant le volume mort, en même temps que le sucre non pyrrolylé ; l'excès de réactifs sort dans la deuxième fraction (non conservée). Ensuite la fraction récupérée est séchée, pesée ; tous les échantillons sont alors amenés à une concentration de 6 mg/mL, soit 1 mM dans H₂O.

Les conditions de couplage ont été optimisées en acidifiant légèrement le milieu. Afin de se placer au pH optimal de 5 (conditions de King²⁰³), la solution tampon acétate a été modifiée, le sucre est dissous dans du tampon acétate 1M à pH = 4,2 afin d'obtenir dans le mélange final, une solution tamponnée d'acétate au pH 5 désiré.

A la suite du couplage, les rendements de couplage ont pu être calculés, grâce aux deux dosages mis en place (oligosaccharides et pyrrole); nous avons obtenu après optimisation du pH, des valeurs de l'ordre de **20 % pour les échantillons PUH-HP6, 12 % pour PUAH-HP6 et 14 % pour PCAH-HP6**. Par contre, pour le couplage avec l'oligosaccharide dp12 (moitié de HP6), le dosage a révélé que le rendement de la réaction était très faible : rendement de **3% pour PUH-dp12**.

La première constatation est que ces rendements sont faibles, et ce, malgré différentes tentatives d'amélioration des conditions : concentration en réactifs, pH, temps de réaction et température. La faiblesse de rendement peut aussi s'expliquer par le fait suivant : avant le passage des échantillons sur la mini colonne d'exclusion, un volume de H₂O est rajouté en quantité, ce qui fait précipiter les « pyrrole – hydrazide » non solubles. En précipitant, ceux-ci peuvent peut-être piéger une certaine quantité de sucres naturels et sucres modifiés. Seules les expériences en fluorescence nous permettront de conclure sur l'efficacité de ces couplages.

a.2. Couplage sur support des « pyrrole - hydrazide » sur les oligosaccharides

Ce même couplage direct, après optimisation, a été tenté sur des billes de chromatographie DEAE-Sephacel, entre le sucre HP6 et la molécule PUH (donnant le meilleur rendement en couplage en solution). Ces billes servent habituellement à purifier des mélanges complexes d'oligosaccharides ; nous avons utilisé la propriété qu'ont ces billes pour immobiliser les oligosaccharides HP et HS de manière réversible. Ainsi, avant de démarrer le couplage, le sucre HP6 est immobilisé sur les billes, cette fixation temporaire est mesurée par la différence d'absorbance des solutions de sucres avant et après le contact avec les billes. Nous procédons ensuite à la même réaction entre les « pyrrole - hydrazide » et l'oligosaccharide. En fin de réaction, les billes sont lavées avec H₂O, afin d'éliminer toute trace de molécules organiques. Ensuite on procède à la phase de « décrochage » : une solution en NaCl 1M permet de dissocier les sucres de la surface des billes. Après centrifugation, la

solution est reprise et purifiée elle aussi sur petite colonne d'exclusion (PD10), séchée et pesée. Les échantillons sont au final repris à une concentration de 1 mM dans H₂O.

Leur concentration en sucres a été dosée, ainsi que celle en pyrrole. Il avait été avancé que le couplage sur billes serait une bonne alternative à celui en solution, or, les rendements de couplage faits sur les échantillons de PUH-HP6 et de PUH-dp12 sont quasi nuls : 2-3% de rendement. Ainsi, l'idée de réaliser la réaction sur support a été rapidement abandonnée, les résultats étant trop bas, nous avons peu de chances d'optimiser d'un facteur 5, pour avoisiner les rendements en solution. De plus, un problème se posait : les trois « pyrrole - hydrazides » ne supportaient qu'une faible proportion d'eau dans le milieu réactionnel, et au cours des diverses tentatives sur billes, les réactifs hydrazides ont précipité et il devait être rajouté un certain volume de DMSO pour resolubiliser les échantillons, modifiant ainsi nos paramètres initiaux. La proportion de H₂O dans ce système était difficilement gérable à cause de la capacité des billes à retenir H₂O. Ainsi, même si les rendements de couplages en solution nous semblaient faibles, cette technique s'avère être plus avantageuse que le couplage sur support.

a.3. Couplage direct des « pyrrole-amine » sur le sucre HP6

Souhaitant obtenir des molécules « sucres sondes » avec des bras espaceurs différents, nous avons opté pour une fonction amine terminale du bras espaceur, nous permettant ainsi d'insérer un bras espaceur plus hydrophile que ceux des molécules terminées par une hydrazide.

Notre réaction de couplage entre le sucre et ce bras espaceur est basée sur une amination réductrice. Ce type de réaction a été décrit pour la première fois, en 1982, entre l'héparine et une protéine, par Radoff *et al.*²⁰⁵. Depuis de nombreux articles sur cette réaction ont été publiés^{206,207}.

De plus, le « pyrrole - amine » possède un avantage par rapport aux « pyrrole - hydrazides », il est hydrosoluble ; ainsi le couplage est effectué en solution aqueuse, sans craindre les effets de non solubilité des molécules réactives.

Les réactifs sont mélangés dans du tampon Bicarbonate de sodium (20 mM, pH 7,4) : « pyrrole-amine » 15 / HP6 1, la réaction se fait sur 48H à 37°C, l'ajout rapide en début de réaction du cyanoborohydrure de sodium permet la réduction de la fonction imine; tout comme pour la réaction entre l'hydrazide et le sucre, l'amine réagit sur la fonction aldéhyde

du dernier cycle de la chaîne de l'oligosaccharide, sous sa forme ouverte. Récemment Dalpathdo *et al.* ont redémontré l'efficacité d'un tel réducteur, mais ont montré aussi la possible utilisation d'un autre réducteur le triacétoborohydrure de sodium ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$), obtenant les mêmes résultats mais en évitant la toxicité du cyanoborohydrure de sodium²⁰⁸.

Ensuite, les échantillons sont purifiés, séchés et pesés avant d'être repris à une concentration de 1mM dans H_2O .

Là encore, les échantillons ont pu être dosés. Les rendements obtenus sont de l'ordre de 45 %, ce qui est un très bon rendement vis-à-vis des précédents (plus du double), et contrairement au « pyrrole - hydrazides », le « pyrrole - amine » est soluble en solution aqueuse et donc ne précipite pas lors de la préparation de la purification (rajout d'un certain volume de H_2O). La vérification de ce rendement sera faite lors des études d'interaction en microscopie de fluorescence.

a.4. Couplage direct du « pyrrole - maléimide » sur l'oligosaccharide thiolé

Afin de coupler le « pyrrole – maléimide » à l'oligosaccharide, celui-ci doit être au préalable thiolé à partir de la fonction aldéhyde terminale par une réaction de couplage avec la cystamine suivie d'une réduction coupant le pont disulfure de la cystamine (cf. partie expérimentale). L'idée d'utiliser un sucre thiolé réagissant avec un groupe maléimide provient, entre autres, des résultats de l'équipe de Mrksich⁶⁴ (cf. I.2.2.6.b). La réaction de couplage est basée sur les travaux de Ni *et al.*²⁰⁹ ; sont donc mis en présence l'oligosaccharide thiolé et le maléimide dans des proportions 1 / 30, dans un mélange H_2O 4 / DMF 1, pendant deux heures à température ambiante. Une fois le couplage effectué, les échantillons suivent le même cycle de purification, de séchage et de pesée.

Ce couplage nécessite moins de temps et de chauffage que pour les précédents, mais d'autres contraintes apparaissent : la faible quantité du bras espaceur ne permet pas de travailler dans les mêmes conditions que les autres couplages. A cause de cette faible quantité finale et donc du faible volume repris, il n'a pas été possible de déterminer de façon quantitative la proportion d'oligosaccharides pyrrolylés. Les expériences en fluorescence, après construction de la matrice, seront notre seul juge de l'efficacité du couplage.

b) Couplage séquentiel avec les « pyrrole - hydrazide »

Ce procédé n'a été tenté qu'avec un « pyrrole - hydrazide » longue chaîne, PUAH. Cette stratégie nous permet de construire la molécule « sucre - bras espaceur - pyrrole » au fur et à mesure, à partir du sucre (figure 48).

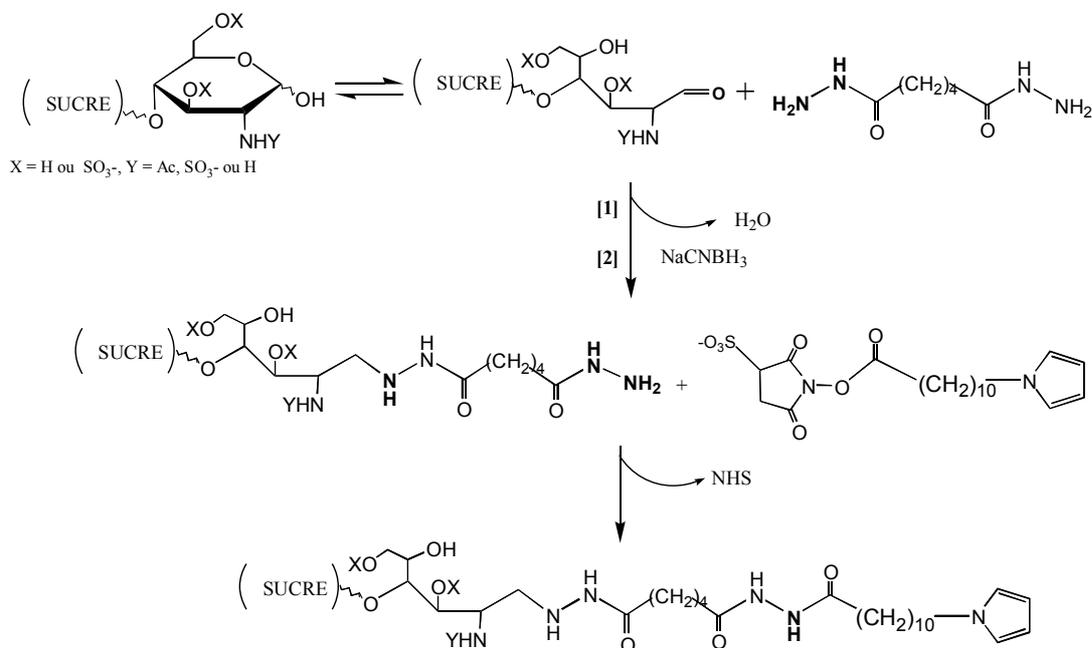


Figure 48 : Principe du couplage séquentiel pour construire la molécule sucre sonde

On cherche à construire la molécule « bras espaceur pyrrolylé – sucre » à partir de la biomolécule (HP6 ou dp12). Le fragment dp12 est issu de l'héparine par digestion enzymatique, sa longueur de chaîne correspond à la moitié de celle de HP6.

Pour construire cette molécule, le sucre est d'abord couplé à l'adipate dihydrazide par la même réaction que lors du couplage direct entre les « pyrrole - hydrazides » et l'oligosaccharide (figure 48). Après la réaction suivie de la purification par le passage du mélange réactionnel sur la colonne PD10, l'hydrazide libre de l'adipate réagit, dans une deuxième étape, avec une molécule pyrrole-sulfo-NHS (Xn = 10). Signalons que la molécule pyrrole-sulfo-NHS a été synthétisée par M. André Roget ; cette molécule ressemble aux molécules PU-NHS et PC-NHS, seulement le groupe sulfate du NHS permet une meilleure hydrosolubilité. Ainsi, cette deuxième étape du couplage, contrairement à la réaction effectuée dans le cadre de la synthèse des composés **III** et **IV** (cf. partie expérimentale 2.1.1.b), se fait dans l'eau, et non dans le DMF.

Le mélange est ensuite purifié sur une colonne PD10, séché et mis à la concentration de 1mM en sucre dans H₂O.

D'autre part, les travaux récents de Flinn *et coll.*²¹⁰ montrent que la fixation de l'adipate sur l'aldéhyde de l'oligosaccharide peut être réalisée sous d'autres conditions ; ils avancent dans leur article que leur méthode permet de fixer l'adipate par un mécanisme utilisant la forme ouverte du sucre, et que l'étape de réduction de l'imine en hydrazide permet de recycliser le dernier cycle du sucre. Ainsi, notre mécanisme de fixation de l'adipate sur l'oligosaccharide peut être discuté.

Après avoir réalisé le couplage permettant d'obtenir les molécules sucre sondes finales *via* une méthode directe ou séquentielle, les échantillons sont ensuite dosés. Les rendements obtenus sont **10% pour le PUAH-HP6 et 8% pour le PUAH-dp12**. Il semblerait donc, que ce couplage ne soit pas plus avantageux pour associer de manière covalente les PUAH aux oligosaccharides.

2.2.3. Bilan sur les différents couplages effectués

a) Problèmes rencontrés

D'après les résultats obtenus dans le paragraphe précédent, nous remarquons que les rendements de réaction sont assez faibles. Ajoutons à cela, qu'il est apparu au cours du développement de ces protocoles, un manque de reproductibilité ; nous avons eu beau chercher quelles en étaient les raisons : dégradation des réactifs (commerciaux ou non) ou des solutions, il a été impossible d'en déterminer la source. Ainsi, les tests nous permettant d'évaluer l'efficacité du couplage ont été réalisés en fluorescence. Chaque échantillon issu du couplage est copolymérisé sur la surface d'or et l'interaction biologique entre les oligosaccharides et une protéine est étudiée par fluorescence. Sans entrer dans les détails des résultats qui seront introduits dans un prochain paragraphe, il nous est apparu que certains rendements semblaient faux ; cela a été le cas pour les échantillons « pyrrole-amine-oligosaccharide ». D'après les multiples dosages de pyrrole et de sucre, le résultat obtenu en fluorescence était moindre que ceux obtenus avec les « pyrrole-hydrazide-sucres ». Nous avons supposé, après une quatrième vérification du dosage de pyrrole nous donnant le même résultat, que notre test était faussé par la présence supposée du « pyrrole-amine » dans l'échantillon final ; la colonne d'exclusion n'ayant pas servi à éliminer ces molécules. Cette hypothèse a été confirmée par une nouvelle purification de l'échantillon « pyrrole-amine » sur une colonne PD10 suivie d'un dosage du pyrrole et d'une étude en fluorescence. Le nouveau rendement obtenu sur l'échantillon purifié était de 26 % (< 45 %) mais la nouvelle étude en

fluorescence montrait encore des interactions moindres qu'avec les « pyrrole – hydrazides - sucre » ; il restait donc encore des traces de « pyrrole - amine ».

Parallèlement à ces comparaisons, nous avons cherché à développer un système de séparation des molécules de nos échantillons issus des couplages.

b) Séparation par Chromatographie en phase liquide

Le rendement dans les divers échantillons étant connu, nous souhaitons n'utiliser que les oligosaccharides modifiés par un pyrrole, pour le dépôt en films de polymère. Grâce aux études réalisées au laboratoire avec l'ADN, nous savons que l'ADN et l'ADN modifié par un pyrrole peuvent être séparés par chromatographie en phase liquide haute pression, sur des colonnes C18, phase inverse ; l'ADN modifié par le pyrrole possède un temps de rétention dans la colonne plus long que celui du brin d'ADN seul.

De plus, dans la littérature, il a été montré que les différentes longueurs de chaîne d'héparine pouvaient être séparées. Bien évidemment, la séparation des oligosaccharides utilisent des éluants différents de ceux utilisés pour l'ADN ; malgré cela, les oligosaccharides de HP6 ressemblant à l'ADN en étant des polymères linéaires et hautement négatifs, nous avons estimé possible une séparation des oligosaccharides modifiés par notre système.

La première étape a été de mettre au point le gradient d'éluant nous permettant d'observer l'oligosaccharide HP6, dans de bonnes conditions d'éluant.

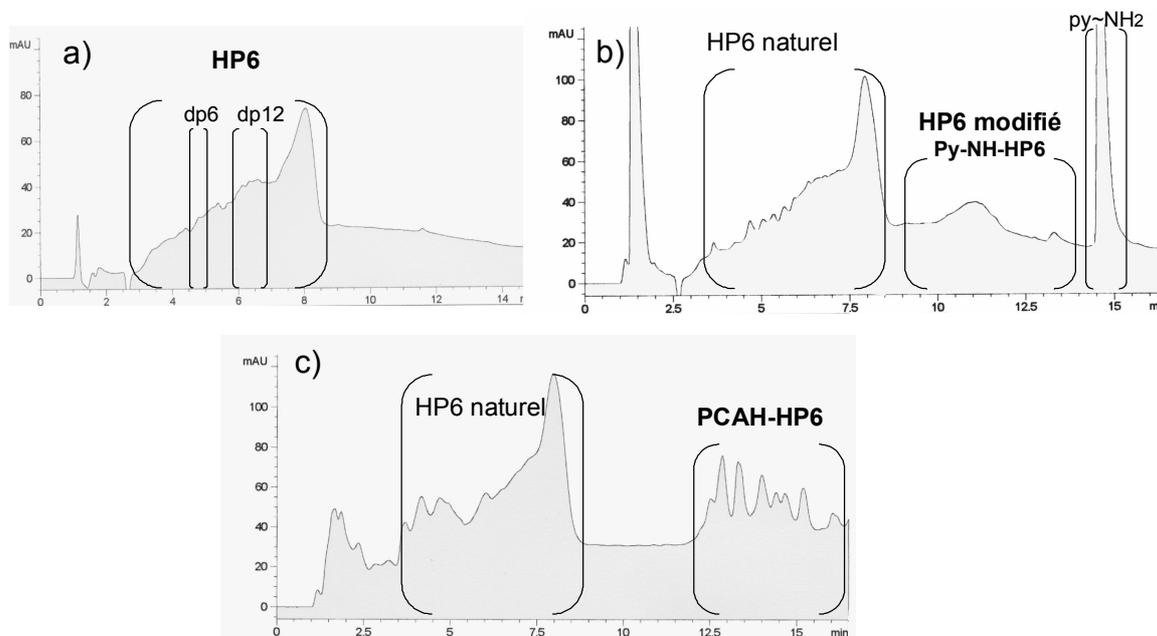


Figure 49 : Graphes HPLC de différents échantillons injectés : a) oligosaccharide HP6 (2mM, 75 μ L) ; b) échantillon issu du couplage entre HP6 et le pyrrole-amine (1mM en sucre total, 90 μ L) ; c) échantillon issu du couplage entre HP6 et PCAH (1mM en sucre total, 90 μ L)

Ainsi l'oligosaccharide modèle de notre étude, HP6, sort en HPLC avec une forme caractéristique multi-pics (figure 49a), ce qui est compréhensible puisque ce produit commercial est composé de différentes fractions d'oligosaccharides, de poids moléculaires inférieurs à 6 kDa. Pour confirmer notre résultat, l'injection de différentes fractions connues issues de la digestion enzymatique de HP6 a été effectuée et ainsi chaque pic a pu être attribué à chaque fraction (pics validés pour les fractions : dp6, dp8, dp10, dp12, dp14, dp16). Ainsi sur la figure 49a, ont été représentées les parts respectives des fractions de dp6 et dp12 en guise d'exemple.

Après cette étude préliminaire, différents échantillons ont été injectés : PUH-HP6, PUAH-HP6, PCAH-HP6 et Py~NH-HP6. Seul l'échantillon issu du couplage entre l'oligosaccharide thiolé et le « pyrrole - maléimide » n'a pu être testé faute de quantité suffisante. Comme nous pouvons le voir sur la figure 49b, l'allure HPLC de l'échantillon « pyrrole-amine » possède en plus de l'enveloppe correspondant à HP6, plusieurs petits pics ayant un temps de rétention plus grand que le sucre seul mais aussi un pic large en fin de gradient. Ces trois parties ont été collectées séparément, traitées, puis ont subi, après dépôt sur la surface, une nouvelle étude en fluorescence. D'après les images prises en fluorescence, il est déduit que la fraction correspondant aux petits pics sortant entre 9.5 et 14 min (figure 49b) comprend bien la proportion de sucres modifiés par le « pyrrole - amine ». Le grand pic ne donne aucun signal en fluorescence, on en conclut qu'aucun sucre modifié n'est présent dans cette partie. De plus, comme nous suspicions une présence résiduelle de pyrrole-amine, nous avons injecté une solution contenant seulement le « pyrrole - amine », l'allure de son analyse HPLC ne possède qu'un seul grand et large pic sortant vers 14.5 min, ainsi nous avons pu conclure définitivement, que la mesure du rendement de couplage était faussée par la présence importante après purification de la réaction, de pyrrole-amine. Cette molécule, lors la purification sur les petites colonnes d'exclusion PD10, n'était que peu retenue durant l'élution, et pollueait, en plus, à long terme celle-ci, puisqu'elle a été retrouvée à l'état de traces dans les échantillons de couplage suivants (confirmation par HPLC).

La figure 49c nous montre l'analyse HPLC du PCAH-HP6 qui est représentative des échantillons de couplages : PUH-HP6 et PUAH-HP6 ont les mêmes allures. Sur ce graphe, on retrouve l'enveloppe multi-pics de HP6 et la multitude de pics plus ou moins fins et petits à des temps de rétention plus longs. Tous ces pics correspondant aux molécules de PCAH-HP6, la présence de plusieurs pics s'explique par les multiples longueurs de chaînes présentes dans l'échantillon commercial de HP6, chacun pouvant réagir avec l'hydrazide de la même façon, il n'y a pas de longueur de chaîne particulière.

Ce développement de l'utilisation d'analyse HPLC pour identifier et séparer les diverses molécules de l'échantillon après purification est prometteur, puisque c'est un moyen de contourner les deux dosages (sucre / pyrrole) si les quantités d'échantillon sont trop faibles, mais rappelons que l'essai HPLC-MS a été peu concluant par faute de produits témoins purs.

Maintenant que nous avons en notre possession les différentes molécules « sucres sondes », nous pouvons passer à la fabrication des puces, soit électrocopolymériser ces échantillons en vue de réaliser des mesures d'interaction avec la protéine modèle, afin de valider notre système d'étude. Signalons que cette étape de dépôt n'a été que peu optimisée lors de nos études, certains paramètres ont été simplement affinés, mais aucune étude longue n'a été réalisée afin d'améliorer la conception de ces matrices de plots.

2.3. Immobilisation de la molécule « sonde » : Technique de l'Electrospotting

Afin de structurer notre surface d'or par une matrice de plots de polypyrrole, il a été développé au laboratoire une technique basée sur l'électrochimie, s'appelant « Electrospotting ». Ce procédé est basé sur l'électrocopolymérisation de solutions mixtes : monomères de pyrrole à 20 mM et pyrroles fonctionnalisés sur leur atome d'azote par l'oligosaccharide choisi, le tout dans une solution de tampon phosphate. Les concentrations en pyrrole modifié varient en général entre 200 nM et 20 μ M, en fonction de la nature de l'expérience à réaliser.

Le montage permettant cette fonctionnalisation de surface a été déjà décrit dans un paragraphe précédent (*cf.* II.1.1.4.). Rappelons tout de même qu'il utilise comme cellule électrochimique mobile un cône de pipette, le platine servant de contre électrode et la surface d'or d'électrode de travail. Ce cône est travaillé initialement afin d'introduire un fil de platine de 0,6 mm de diamètre à l'intérieur, ce fil étant placé de façon à ce qu'il soit en contact avec la solution prélevée. Le volume le plus communément prélevé lors de cette étape ne dépasse pas 12 μ L.

Cette cellule surmonte une plateforme motorisée pouvant se déplacer selon les trois axes spatiaux x,y,z. cette plateforme est pilotée par un logiciel développé au laboratoire, nous offrant la possibilité de déplacements en des lieux précis pour les dépôts de films de polymère.

La fabrication des plots se fait en plusieurs étapes ; il faut savoir tout d'abord que les supports en verre fraîchement recouverts de 1 nm de chrome et 48 nm d'or sont hydrophiles, ainsi il est nécessaire soit d'attendre un certain temps (de l'ordre de 2 à 5 jours) afin que la surface dorée se passive et devienne de ce fait hydrophobe, soit de réaliser un traitement chimique simple (dépôt d'undecane-thiols), pour rendre la surface hydrophobe rapidement.

Cette hydrophobie est nécessaire lors de la génération des plots de polymère sur la surface, car après chaque spot réalisé, lorsque le cône est retiré de la surface, une goutte provenant de la solution du cône se forme au niveau de celle-ci. Cette propriété de la surface permet aux gouttes de rester petites, bien rondes et non de s'étaler sur la surface, perdant une superficie non négligeable pour la fabrication des plots suivants, voire la contamination d'un autre plot déjà formé.

La surface d'or, avant de passer au dépôt de plots, doit subir un nettoyage préliminaire ; celui-ci consiste en un lavage par un détergent (si surface non traitée) et par des rinçages successifs par H₂O, éthanol et H₂O. La forme des gouttes d'eau, issues du dernier rinçage nous indique le degré d'hydrophobie de la surface (si la surface n'est pas hydrophobe, on procède au traitement chimique). Vient ensuite l'étape de spotting à proprement parler, la fabrication des différents plots se fait 1 à 1 dans un ordre linéaire, avec retour à la ligne en fonction de la forme de la matrice souhaitée (carrée ou rectangulaire).

Avant de lancer le programme réalisant la matrice, le cône est chargé en solution à spotter. La première solution pipetée est toujours une solution de pyrrole seul uniquement ; ce premier plot, servant de référence pour nos études, permet de vérifier notamment l'existence ou non d'adsorption non spécifique de protéines sur le polymère et ne doit être, en aucun cas, contaminé par d'autres solutions dites mixtes (composées de pyrroles et de pyrroles fonctionnalisés).

L'électrocopolymérisation de la solution est alors réalisée, une tension de 2V entre l'électrode de travail et le fil de platine est appliquée par le potentiostat, durant un temps variable. Les temps choisis pour notre étude ont été généralement de 250 et 500 ms. Les plots réalisés à 500ms sur des lames de verre servent aux études en microscopie de fluorescence, et ceux faits à 250 ms effectués sur la couche d'or recouvrant les prismes en verre servent aux études en imagerie SPR, car ils doivent être plus fins (d'où un temps de copolymérisation plus court).

La réaction d'électrocopolymérisation se fait dans un volume restreint à l'extrémité du cône (1 à 2 μ L, soit un dixième du volume total utilisé), proche de la surface d'or. C'est pour ces raisons que la concentration utile en pyrrole simple ne doit pas être inférieure à 20 mM, afin

d'avoir un apport suffisant de matière pour créer les oligomères formant au final le film de polymère sur la surface.

L'impulsion électrique étant faite, le cône est retiré de la surface, vidé, rincé puis rechargé avec la nouvelle solution à spotter. Cette phase de rinçage est obligatoire afin d'éviter toute contamination entre les différents échantillons. Les plots sont ainsi formés tour à tour, suivant le même protocole. Au final, le support soutenant la surface dorée, sur laquelle a été réalisée la matrice, est enlevé du montage ; la puce est lavée avec H₂O, lavage sans risques car les oligosaccharides ne craignent pas un environnement d'eau seule (contrairement aux protéines) ; puis la puce est séchée et stockée à 4°C.

Cette technique d'électrospeining offre la possibilité de réaliser des matrices de plots variant d'un seul plot à une matrice d'une centaine de plots, ce chiffre dépend seulement du diamètre des plots et de la surface sur laquelle on doit travailler. La limitation de surface en fluorescence n'existe pas, alors qu'en imagerie SPR, souhaitant intégrer cette matrice de plots à un système fluide, une cuve plus exactement, celle-ci aura une certaine surface (~80 mm²) et donc imposera nécessairement une matrice de plots de taille limitée. Afin de déterminer le nombre de plots pouvant être contenus sur cette surface restreinte, le diamètre de plots doit être pris en compte : les plots formés habituellement ont un diamètre compris entre 200 et 400 µm, cette variation est liée à la forme du ménisque du cône, à l'hydrophilie relative des solutions mixtes et / ou à celle de la surface d'or ; de plus, ces plots ne doivent pas se toucher afin d'éviter toute contamination, d'où une obligation de laisser un espace d'une centaine de micromètres entre les différents plots. Ainsi des matrices possédant jusqu'à 64 plots peuvent être réalisées actuellement.

En résumé de nombreuses matrices ont pu être réalisées par cette méthode, qui est à la fois simple de mise en œuvre, efficace et hautement reproductible.

Les matrices étant réalisées et pouvant se conserver à sec, il est donc possible de tenter de caractériser la structure de ces plots. Nous allons donc maintenant décrire la structure de nos plots formés grâce à deux techniques : la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et la Microscopie à Force Atomique.

2.4. Caractérisations structurales des films polymère formés

Afin d'obtenir de plus amples informations quant à l'homogénéité des plots, leur épaisseur, mais aussi la structure du polymère sur les bords des plots, nous allons nous intéresser à la morphologie des différents films de polymère. Elles ont été caractérisées par deux techniques : le Microscope Electronique à Balayage (MEB) et la Microscopie de Force Atomique (AFM). Toutes ces études ont été réalisées sur des matrices de plots, à sec, après électrospotting, rinçage à l'eau et séchage.

2.4.1. La Microscopie Electronique à Balayage (MEB)

Cette étude structurale des plots de polymères par un MEB JEOL 840A a été réalisée grâce à M. Jean-Jacques Allegraud, technicien au SPrAM – UMR5819, équipe des « Polymères Conducteurs Ioniques ». Dans un premier temps, nous rappellerons brièvement le principe du MEB, puis nous décrirons les images obtenues.

a) Description simple du principe

Le pouvoir séparateur d'un microscope optique (i.e. son grossissement) est limité par la longueur d'onde de la lumière visible ; aucun détail de dimension inférieure à $0,2 \mu\text{m}$ ne peut être observé. Aussi l'utilisation de particules accélérées de plus courte longueur d'onde associée permet-elle d'augmenter le grossissement. Le microscope est dit à balayage lorsque l'image est obtenue point par point (6 à 10 nm).

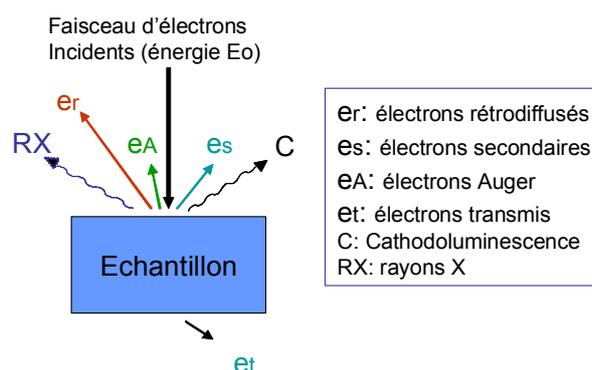


Figure 50 : Représentation schématique de l'interaction entre un faisceau d'électrons et la surface d'un échantillon.

Le principe du balayage consiste à explorer la surface de l'échantillon par lignes successives et à transmettre le signal du détecteur à un écran cathodique dont le balayage est exactement synchronisé avec celui du faisceau incident. Les microscopes à balayage utilisent un faisceau très fin qui balaie point par point la surface de l'échantillon. Par l'intermédiaire

d'un canon à électrons, un faisceau d'électrons de l'ordre de 10 à 40 eV est envoyé sur l'échantillon. En contact avec la matière, ces électrons interagissent de différentes façons. Sous l'impact du faisceau d'électrons accélérés, des électrons rétrodiffusés e_r et des électrons secondaires e_s émis par l'échantillon sont recueillis sélectivement par des détecteurs qui transmettent un signal à un écran cathodique dont le balayage est synchronisé avec le balayage de l'objet (figure 50).

Le MEB utilisé pour cette étude, va permettre d'exploiter notamment une information, qui va être traduite en images : une image en électrons secondaires (e_s), qui naissent d'une interaction entre les électrons du faisceau et les électrons des couches électroniques de l'atome et qui nous donnera une information topographique de l'échantillon. Avant de passer aux résultats, il faut savoir que l'émission d'électrons secondaires est un arrachement d'électrons par ionisation. Certains électrons incidents de faible énergie (< 50 eV) sont éjectés de l'échantillon sous l'effet du bombardement. Comme seuls les électrons secondaires produits près de la surface sont détectés, ils formeront des images avec une haute résolution (3-5 nm). Le contraste de l'image est surtout donné par le relief de l'échantillon mais on peut également observer un contraste chimique dans le cas de grandes différences de numéros atomiques.

Le microscope électronique à balayage comporte (figure 51), comme équipement, une colonne, dans laquelle sont présents une source de rayonnement, une optique (les lentilles), un système de balayage (bobines défectrices), une platine porte-objet et des détecteurs d'électrons, mais aussi un ensemble électronique et un système d'analyse. Le MEB est simple d'utilisation, il y a peu de contraintes pour la préparation de l'échantillon ; cependant, celui-ci doit être conducteur électrique (ou rendu conducteur par dépôt d'une couche mince d'or ou de graphite) afin d'éviter l'accumulation de charges. Pour notre étude, il n'a pas été nécessaire de déposer une couche mince car notre surface d'or est assez conductrice.

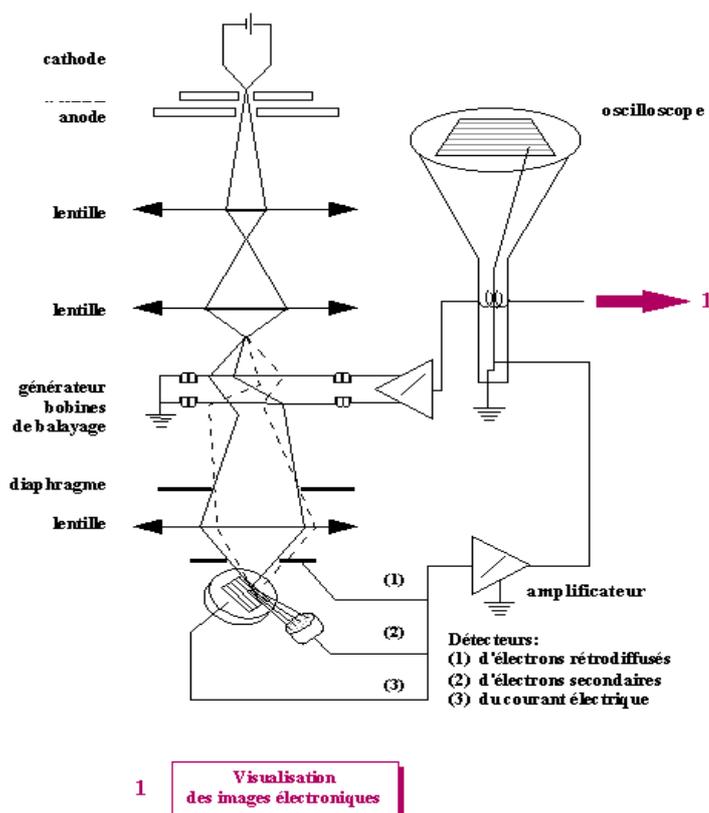


Figure 51: Représentation schématique d'un microscope électronique à balayage.

Après cette brève description du principe du MEB utilisé, nous allons nous intéresser aux résultats obtenus.

b) Résultats obtenus

Tout d'abord, il faut savoir que seulement des études structurales sur des films épais de polypyrrole ont été reportées dans la littérature, jusqu'à ce jour.

Par cette étude, nous souhaitons observer la forme des plots séchés, spottés sur la surface d'or, mais aussi déterminer l'homogénéité et/ou la présence de défauts.

Douze plots ont été caractérisés : 4 de polypyrrole 20mM seul spottés à des temps différents (125, 250, 500 et 1000 ms), 4 plots où est immobilisé py-ODN (pyrrole - oligonucléotide) à 10 μ M à des temps différents (125, 250, 500 et 1000 ms) et 4 plots où est immobilisé PUH-HP6 à des concentrations de 5 μ M (en sucre pyrrolylé) à des temps différents (125, 250, 500 et 1000 ms). Trois séries d'études ont été faites de manière à corroborer les divers résultats.

La première observation a été réalisée au grossissement x110, ainsi nous avons observé l'ensemble du plot (Figure 52). Les plots étudiés (figure 52) semblent avoir une

forme elliptique, or ils sont bien circulaires en réalité ; simplement l'acquisition des images nous offre une image allongée, donc un plot déformé.

On constate que quel que soit le temps de spotting subi, les plots possèdent le même diamètre (utilisation d'un même cône). De plus, il faut noter l'aspect du plot dans sa globalité : plus le temps de polymérisation est long, meilleure semble être la « texture » du plot (figure 52).

Le plot à 125 ms est un peu granuleux, cet aspect granuleux se répartit en forme de couronne autour du centre du plot ; l'effet de couronne commence à s'estomper à 250 ms, à 500 ms, il ne reste que quelques aspérités visibles, et au delà, le plot (à 1000 ms) ne présente plus ces défauts. L'estompement des défauts est dû à l'augmentation de l'épaisseur de film de polypyrrole proportionnellement à celle des temps de polymérisation. Sur ce même principe, le contour des plots s'améliore parallèlement à l'accroissement en temps de polymérisation. Mais cette couronne, après évaluation des distances, correspond en fait aux bords du cône de spotting, d'où la nécessité de ne pas écraser le cône sur la surface lors de l'électrocopolymérisation. Toutefois, il apparaît en bordure de plots, quel que soit son temps de polymérisation, une sorte de halo, ne correspondant pas à la taille des bords du cône de spotting.

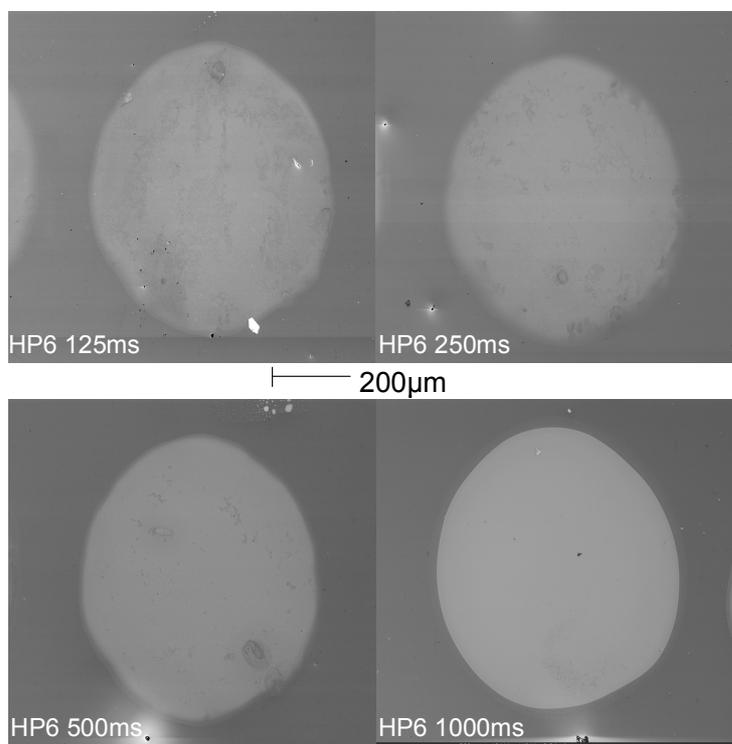


Figure 52 : Images des quatre plots où l'oligosaccharide HP6 est immobilisé à des temps différents ; le grossissement de l'image est x110 ; l'échelle est de 200µm.

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux défauts présents sur les plots. Comme nous le montre le plot ppy à 250ms de la figure 53, les bords de plots peuvent être mal dessinés

quand le ménisque du cône ne recouvre pas totalement les bords du cône lors du spotting, ce qui s'avère ne pas être déterminant lors de la suite des expériences, puisque une grande partie du cœur du plot reste homogène. Dans le pire des cas, des bulles d'air minuscules à l'échelle de l'œil, mais fortement destructrices à une échelle de $200\mu\text{m}$ peuvent être emprisonnées, comme nous l'indique le plot ppy à 125ms (figure 53). Nous pouvons alors supposer que le cône de spotting peut être usé, abîmé, voire même que l'embout ne soit plus plan, ce qui ne permet plus d'obtenir des matrices de plots réguliers et reproductibles.

Sur le plot de polypyrrole à 125ms (figure 53), en plus de l'air emprisonné, on remarque aussi l'existence très marquée de la couronne, ainsi, la surface s'avère totalement inhomogène, et ce plot ne conduit pas à une utilisation optimale lors des mesures d'interaction avec les protéines en imagerie SPR. L'étape de spotting se révèle donc être déterminante, chaque prélèvement de solution doit être minutieusement réalisé. Le contact établi entre le cône et la surface doit se faire sans « écraser le cône », en vérifiant au préalable l'existence du ménisque en bout de cône et la présence éventuelle de bulles, qui ne permettent pas une bonne électrocopolymérisation.

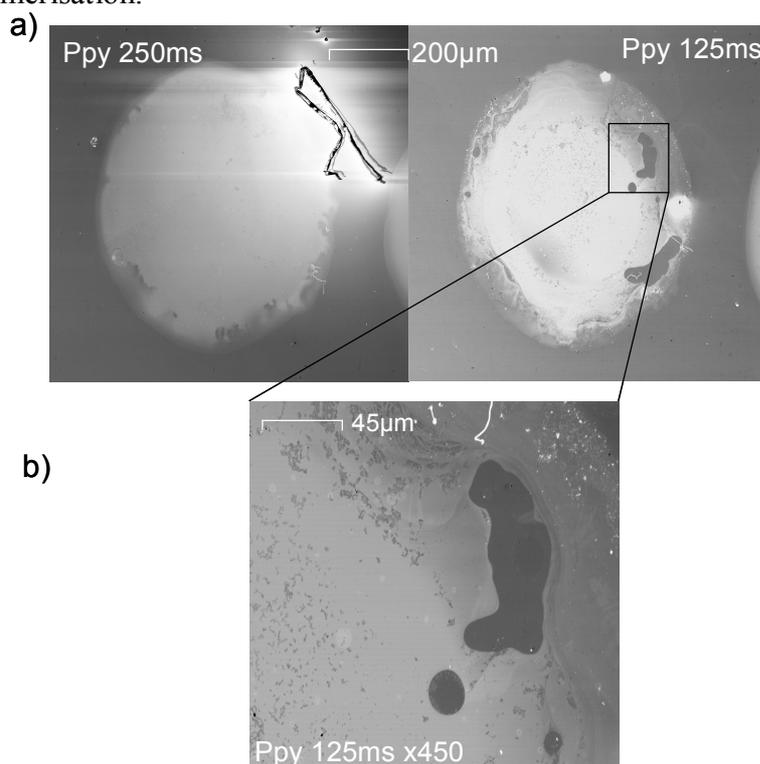


Figure 53 :a) Exemple de plots mal spottés ; deux plots ppy spottés à 125ms et 250ms ; b) zoom sur le plot ppy à 125ms, des bulles ont été emprisonnées lors de l'électrocopolymérisation.

Cette étude structurale nous montre qu'il est indispensable de limiter les inhomogénéités de polymères pour nos études futures ; il s'est donc avéré que si ces défauts

se présentaient régulièrement, il serait nécessaire d'imposer un temps de polymérisation minimum de 250 ms, qui nous permettrait d'éviter le maximum d'irrégularités.

Une dernière caractéristique a été relevée, une sorte de halo en bordure de plot avait été observée sur les plots pris au grossissement x 110. Nous avons donc zoomé sur ces zones, pour confirmer cette présence ou non (figure 54a). Ainsi sur le plot de ppy à 250 ms, cette marche semble très nette, quel que soit le grossissement auquel elle est regardée (x 1000 ou x 6000). Nous n'avons aucune hypothèse à avancer sur ce phénomène observé sauf peut-être qu'il se passe lors de l'électrocopolymérisation un effet de bord sur les lignes de courant...

D'autre part, nous souhaitons observer l'aspect du centre de plot ; d'après les images prises à des grossissements de x 27000 et x 50000, nous constatons que le polymère apparaît granuleux, ceci est peut-être dû à la faible épaisseur finale du plot, au vu des temps de polymérisation très courts, mais ceci est peut-être aussi dû à la structure de la surface d'or.

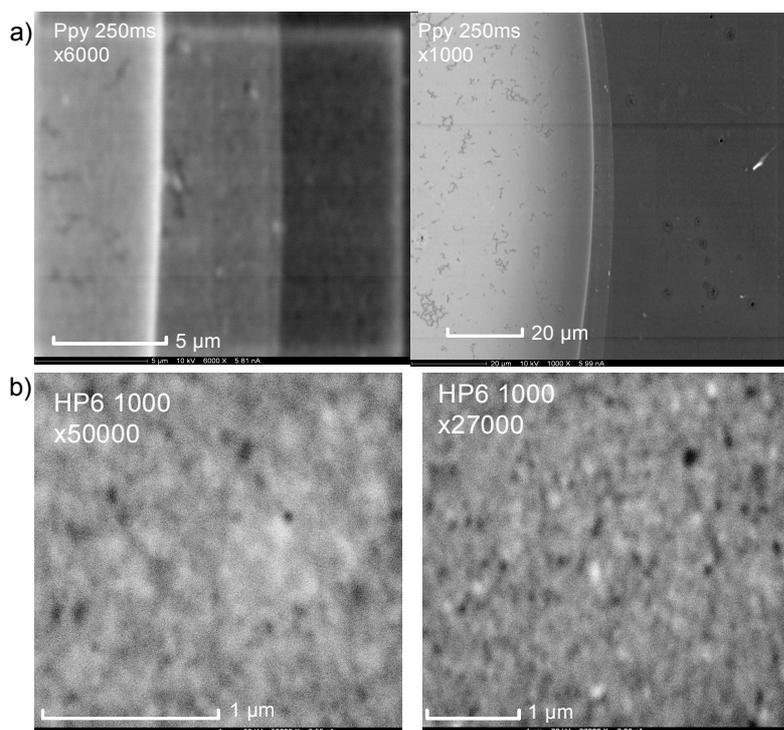


Figure 54 : a) Bordure de plot de ppy à 250ms à deux échelles différentes ; b) centre de plot ppy + HP6 à 1000ms, vu à deux grossissements différents.

Après avoir réalisé ces caractérisations structurales de nos plots à sec, nous avons souhaité les compléter par une étude en microscopie à force atomique, afin de décrire plus précisément les structures observées à l'aide du MEB : connaître la rugosité du film, mesurer l'épaisseur des plots formés, *etc.*

2.4.2. Caractérisation complémentaire au MEB : l'AFM

Cette étude par AFM a été menée en collaboration avec l'équipe PMS (Polymères et Matériaux Synthétiques) de notre UMR 5819. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Mathieu Monville, doctorant dans cette équipe. L'appareil d'AFM utilisé est un microscope AFM fonctionnant à température et atmosphère ambiantes (Nanotec Electronica, Madrid, www.nanotec.es/, figure 55 haut). Souhaitant faire des études en topographie, nous avons travaillé selon le mode contact intermittent (*tapping*TM). Les Cantilevers utilisés pour ces expériences sont des cantilevers Budget Sensors BS-Tap3000 (constante de raideur moyenne de 40N/m, fréquence de résonance environ 275kHz).

Nous allons décrire brièvement le principe de ce microscope et notamment les caractéristiques du mode « contact », avant de commenter les images topographiques obtenues.

a) Son principe

L'invention en 1982 du microscope à effet tunnel, qui permet de visualiser et de manipuler les atomes²¹¹, est à l'origine d'une nouvelle famille de microscopes, les microscopes à champ proche ou à sonde locale, dédiés essentiellement à l'étude des propriétés de surface des échantillons. Ils sont caractérisés par l'absence de tout système de lentille optique ou électromagnétique. Leur principe consiste à positionner une sonde (généralement une pointe effilée) à une distance de la surface à étudier de l'ordre du nanomètre et à déterminer localement, point par point, la valeur d'une grandeur physique choisie (transfert d'électrons, flux de photons ou d'ions, topographie ou température). Le microscope à force atomique (AFM)²¹² permet d'observer les atomes à la surface d'échantillons cristallins, sous vide ou dans l'air. Il peut aussi fonctionner en milieu liquide, propriété qui a très rapidement permis le transfert de cette technologie à la biologie²¹³.

Le principe consiste à amener, soit au contact de la surface à étudier, soit à une distance de quelques Å, une pointe dont l'extrémité a un rayon de quelques nm, et à lui faire balayer ligne par ligne la topographie de cette surface en évitant de la déformer. Cette pointe, généralement en nitrure de silicium (Si₃N₄), se situe à l'extrémité d'un levier flexible, appelé *cantilever*. La déflexion du *cantilever*, provoquée par la présence d'une aspérité, entraîne l'intervention d'une boucle de rétrocontrôle qui va maintenir constante la distance, et donc la force d'interaction, entre la pointe et l'échantillon (figure 55). Le « mode contact », mode de

fonctionnement dans lequel la pointe et la surface restent en contact ou quasi-contact, permet d'obtenir des images à haute résolution sur des objets peu rugueux²¹⁴. Durant un balayage, trois types d'images peuvent être collectés simultanément : les images topographiques (encore appelées images « iso-force » ou images hauteur), les images de déflexion correspondant à la dérivée des mouvements de réajustement de la position relative entre la pointe et l'échantillon qui font ressortir les détails de la surface, et les images de friction résultant de la torsion du *cantilever*. En effet, la microscopie à force atomique impose que l'échantillon soit adsorbé sur un support plan et y adhère suffisamment pour n'être pas déplacé sous l'effet du balayage par la pointe.

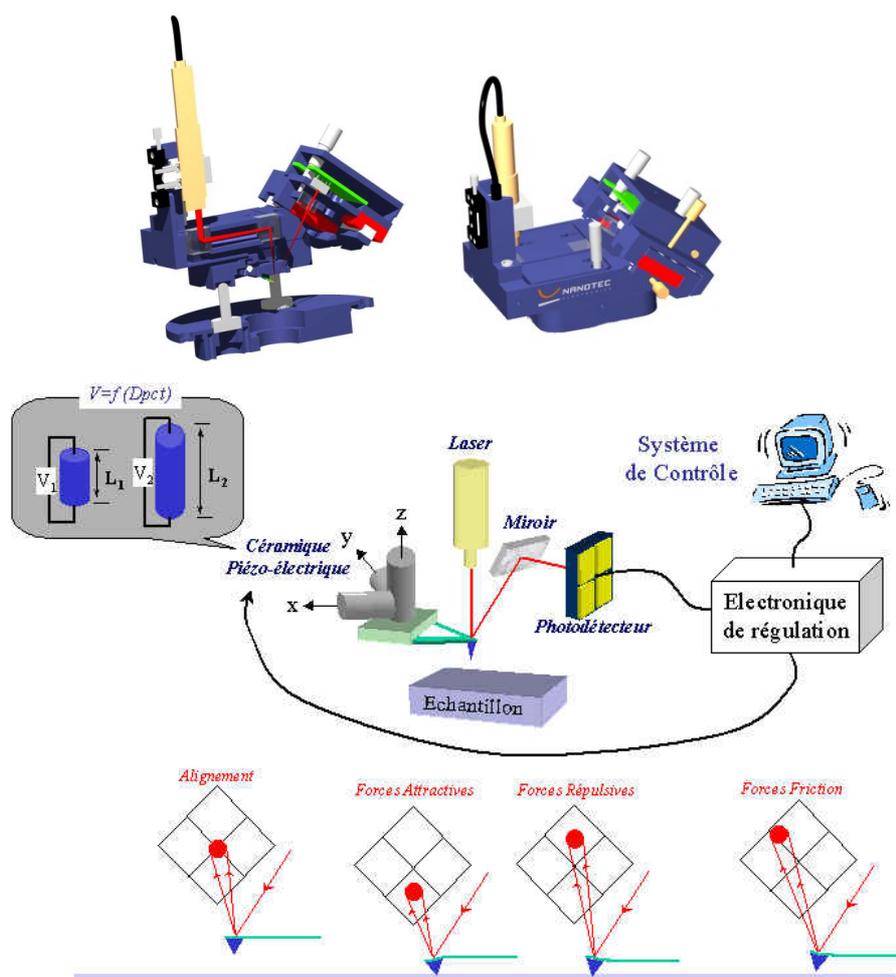


Figure 55 : Haut : appareil AFM Nanotec Electronica; Bas : Schéma du principe du microscope à force atomique.

b) résultats obtenus et comparaison avec la littérature

L'analyse par AFM des plots de polypyrrole purs et modifiés a été menée sur deux lames : ces deux échantillons comportaient les mêmes espèces ppy pur, ppy-ODN à $10\mu\text{M}$ et ppy-PUH-HP6 à $25\mu\text{M}$ (en sucre total). Seuls les temps d'électrocopolymérisation changent

en fonction des lames. Chacune possède 12 plots ; la première supporte des plots ayant des temps de polymérisation de 1s, 5s, 10s et 20s, alors que sur la deuxième, les plots sont faits par l'utilisation de temps plus courts : 125ms, 250ms, 500ms et 1s. Ainsi la deuxième lame se rapproche plus des conditions de spotting normal, utile pour les expériences en fluorescence ou en imagerie SPR. Cette deuxième lame est en fait identique à celles utilisées lors de l'analyse au MEB, dans le but d'obtenir confirmation ou non des observations déjà faites, voire de compléter les observations.

Tout d'abord, signalons qu'il a été assez difficile d'observer nos plots sur la lame d'or par la caméra de contrôle du microscope, l'échantillon étant difficile à positionner de manière parfaitement plane et donc observable à la caméra. Comme le montre la photo (figure 56 gauche), outre la position du cantilever, les plots de ppy observés (à gauche, 10s et à droite, 20s) sont assez pâles, alors que ce sont les plots les plus épais réalisés, au vu des temps de polymérisation.

Cette analyse en AFM a été réalisée en complément de celle faite en MEB. Nous cherchions à connaître plus précisément les structures des bords de plots déjà observés, leur épaisseur, leur rugosité et nous souhaitons comparer nos observations aux résultats de la littérature sur des études de films de polypyrrole en AFM.

Vision à la caméra des plots à étudier et du cantilever



Caractéristiques fournisseur du cantilever

	Valeur	Typiquement
Fréquence de résonance	300 kHz	+/- 100 kHz
Constante de force	40 N/m	20 N/m to 75 N/m
Longueur	125 µm	+/- 10 µm
Largeur moyenne	30 µm	+/- 5 µm
Épaisseur	4 µm	+/- 1 µm
Hauteur de la pointe	17 µm	+/- 2 µm
Set back	15 µm	+/- 5 µm
Rayon de la pointe	< 10 nm	
Traitement réfléchissant	épaisseur Aluminium 30 nm	
Angle 1/2 cône	20°-25° sur l'axe du levier 25°-30° sur le coté 10° à la 1/2 hauteur	

Figure 56 : A gauche, Photo où figurent le cantilever utilisé pour les mesures et un plot de polypyrrole pur (dépôt électrochimique 10s à gauche, 20s à droite) ; à droite, caractéristiques données par le fournisseur sur le cantilever.

Nous nous sommes d'abord intéressés à la structure des contours des plots, nous avons ainsi réalisé des images de plots à 1s, plots estimés assez épais, de polypyrrole seul et de ppy-

HP6, afin d'avoir le meilleur contraste or / film possible (figure 57). Il nous est apparu que, quelle que soit la lame étudiée, les plots de pyrrole pur (1s) présentent à la caméra des contours de plots mieux définis que les plots en présence de HP6 (1s).

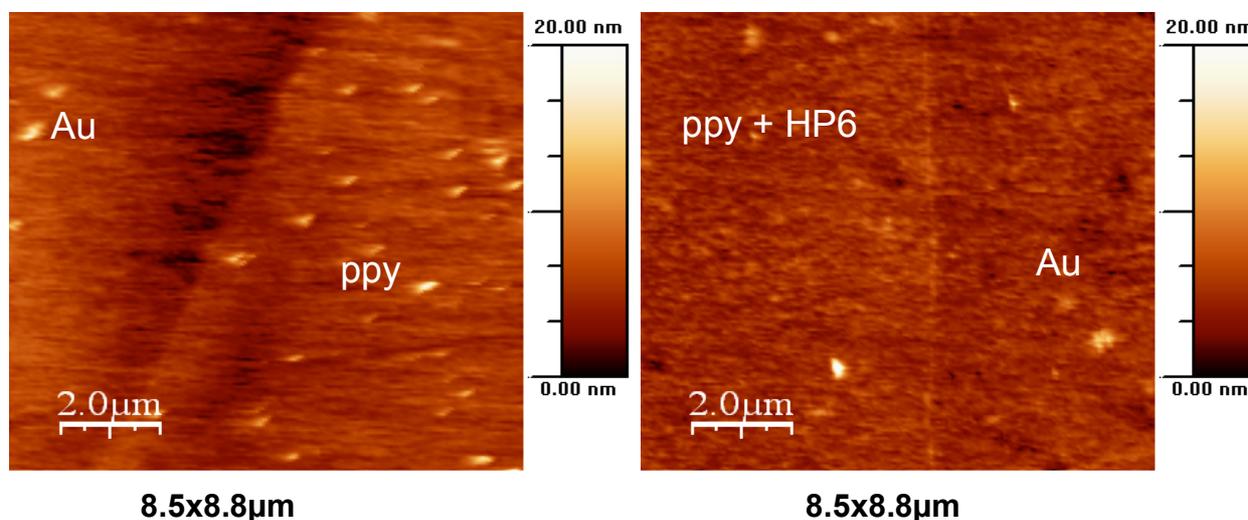


Figure 57 : Images de frontières de plots entre le film et la surface d'or ; à gauche entre le ppy seul et l'or et à droite entre le ppy-HP6 et l'or.

La caractéristique commune de ces deux plots est qu'ils semblent épouser la structure de la couche d'or. D'autres images ont été réalisées pour confirmer cette caractéristique, et il s'est avéré que seulement à partir de 10 secondes d'électrocopolymérisation, le polymère commençait à masquer la forme initiale de la couche d'or, grâce à sa croissance longue.

La deuxième observation faite, toujours à la frontière polymère/or, est celle de l'épaisseur. Pour notre exemple, nous avons choisi le plot de ppy à 20 s, car il nous est apparu être caractéristique de l'observation, vu son temps de polymérisation, il doit être le plot ayant la plus grande épaisseur (figure 58). L'étude de ce plot nous révèle l'épaisseur moyenne du plot d'une dizaine de nanomètres (au zoom 3 x 3 μm), la distribution des hauteurs nous permettant d'obtenir l'épaisseur du film de polymère par rapport à la surface d'or. En zoomant un peu plus (0.5 x 0.5 μm), un profil a pu être tracé sur l'interface or/ppy et on remarque l'apparition d'une marche entre la surface de travail et le polymère.

Après avoir étudié ce plot ppy à 20 s, l'étude a été étendue aux plots de ppy à 10 s et 1 s d'électrospotting, afin de déterminer les épaisseurs de films et la présence de marches. Notons que nous avons effectué ces mêmes mesures sur les plots possédant des temps de spotting inférieurs à une seconde, mais il s'est avéré que l'épaisseur du polymère étant

tellement faible, les valeurs relevées aux différents zooms variaient du simple au double, il nous est donc impossible de conclure quant à une épaisseur moyenne sur ces plots, la seule remarque possible sur ces plots est que leur épaisseur même non mesurée apparaît plus faible que la valeur de 4nm observée pour le plot à 1 s (tableau 4 ci-dessous).

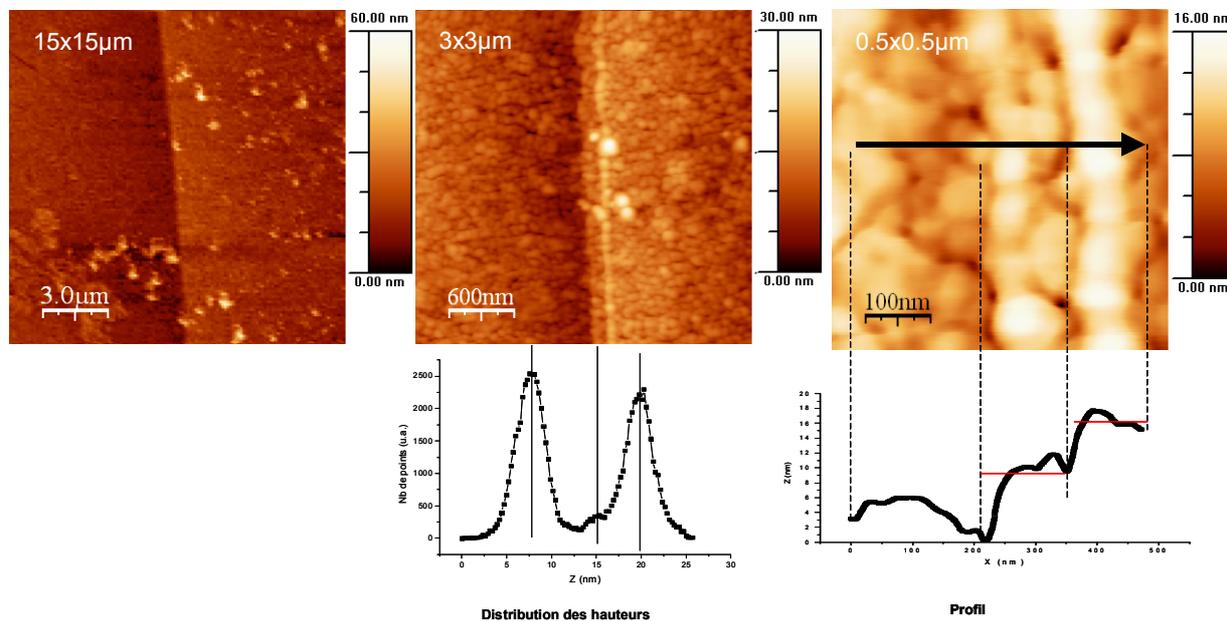


Figure 58 : Etude approfondie du plot de ppy seul spotté à 20 s, 2 zooms réalisés, image 3x3µm avec la distribution des hauteurs sur l'or et sur le polymère, image 0.5 x 0.5µm avec le profilomètre de l'épaisseur à la surface.

On constate tout de même sur le tableau ci-dessous que les épaisseurs de plots entre 10 et 20 s ne varient que peu, on semble parvenir à une valeur limite d'épaisseur de film de polymère. Ceci peut s'expliquer simplement par le fait que pour ces grands temps de polymérisation, la quantité de monomères de pyrrole libre 20mM se révèle être limitante. Cette hypothèse est basée sur les travaux de Song et al.²¹⁵ et de Fujikawa et al.²¹⁶, qui utilisent, afin de former des films de polypyrrole sur une surface d'or, une concentration en pyrrole seul d'au moins 100 mM, quel que soit le milieu de réaction (solvant aqueux ou organique et électrolytes différents).

Temps de dépôt (s)	Hauteur de marche (nm)			Moyenne(nm)
	Image (15x15µm)	Image (3x3µm)	Image (0.5x0.5µm)	
1	4	3.9	(5.7)	4.0 +/- 0.1
10	(9.3)	7.3	7.2	7.3 +/- 0.7
20	8.3	9.2	7.7	8.4 +/- 0.7

Tableau 4 : présentation des moyennes des épaisseurs mesurées pour les différents plots

Notre troisième observation s'est faite sur la croissance du film de polymère de polypyrrole en fonction du temps. Sur la figure 59, nous pouvons voir la structure du polymère évoluer avec le temps de polymérisation, notamment l'épaisseur des films augmentant proportionnellement aux temps de spotting.

Remarquons que les plots de ppy à 1s épousent la surface, sans véritablement en changer l'aspect. Passé un temps de 10 s d'électrospotting, on note une sorte de recouvrement de la surface d'or mais celle-ci devenant irrégulière. Ainsi par endroits, quelques « nuages » épais apparaissent ; ceux-ci se confirment, sur les vues du plot à 20 s, la surface d'or est alors totalement masquée, la surface du polymère ressemble à une structure de « chou-fleur », certains endroits du film sont comme boursoufflés. Notons la différence entre les plots de ppy à 10 s et à 20 s, même si leur épaisseur diffère d'1 à 2 nm, cette couche est suffisante pour changer l'aspect de la surface. De plus, si nous cherchons à comparer avec les études déjà réalisées sur des films de polypyrrole, il est difficile de trouver une similitude, car déjà au départ, nous n'utilisons pas le même mode ni le même temps de dépôt. Par exemple, l'équipe de Marx²¹⁷ a travaillé sur une immobilisation d'ADN dans un film de polypyrrole, mais ce film, à la différence des nôtres, mesure 120µm d'épaisseur après une électrosynthèse de 5 heures. L'équipe de Kawai²¹⁶ fabrique des films de ppy sur des temps minimum de 30 s, ayant des formes d'anneaux, leurs films sont très épais par rapport aux nôtres. L'équipe de Park²¹⁸ montre, quant à elle, qu'il est possible d'obtenir différents types de films en fonction du type d'électrolytes dans la solution ; de même, ils polymérisent sur des temps jamais inférieurs à 20 s. C'est pour ces raisons que nous avons poussé notre polymérisation si loin dans le temps, pour savoir si, malgré la différence des conditions de dépôt, nous pouvions observer les mêmes sortes de film. Mais, nos conditions de concentration, comme nous l'avons remarqué précédemment, limitent notre formation de film.

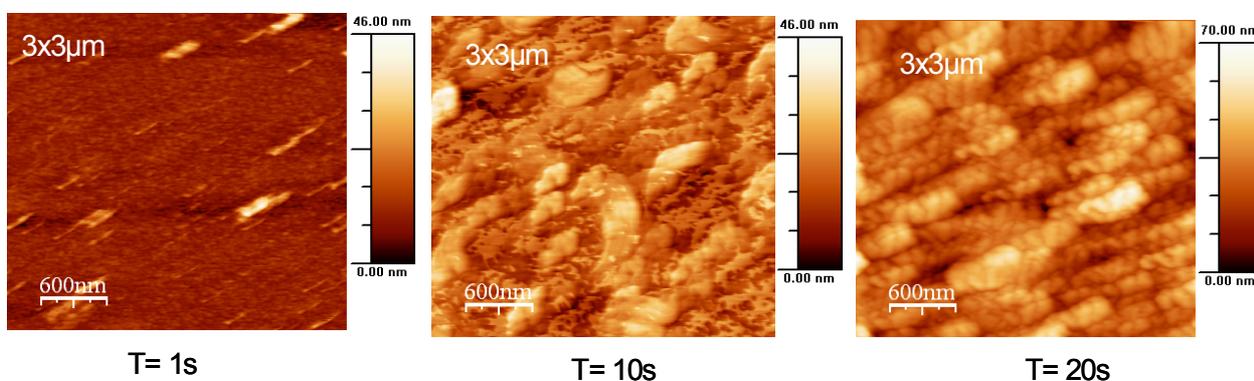


Figure 59 : 3 états de surfaces pris en AFM au grossissement 3x3µm, des plots de ppy 1, 10 et 20s.

Pour terminer notre étude en AFM, nous avons dressé un tableau (tableau 5) nous permettant de récapituler les différentes mesures.

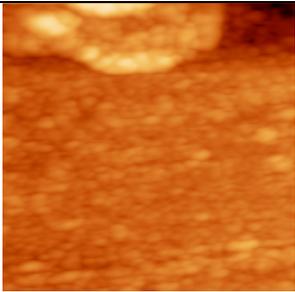
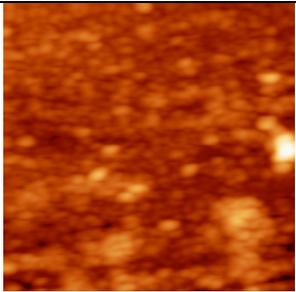
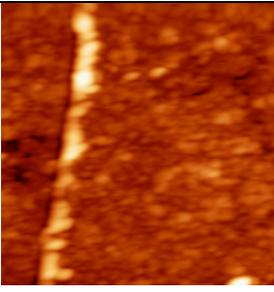
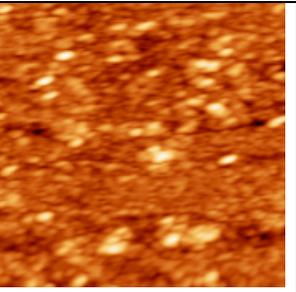
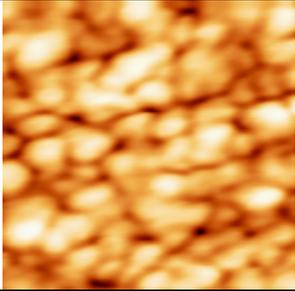
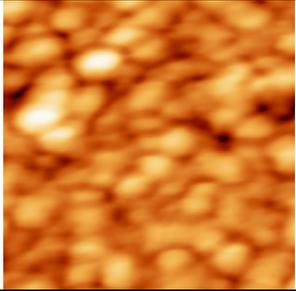
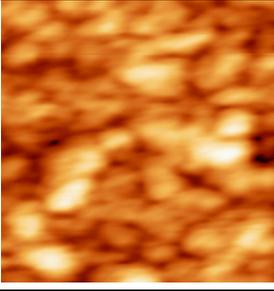
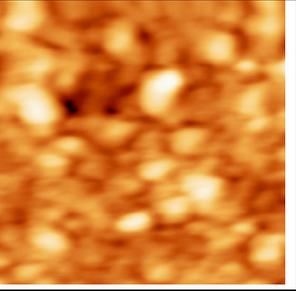
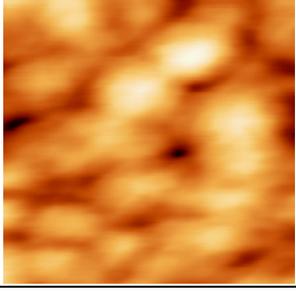
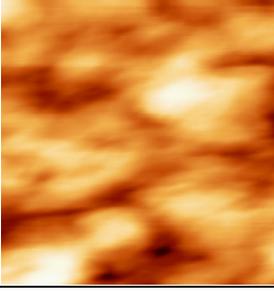
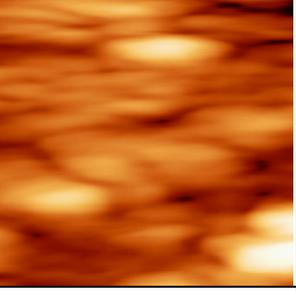
Taille image	Au	PPy pur	PPy+ODN	PPy+HP6
15x15 μm				
3x3 μm				
0.5x0.5 μm	Pas d'image			
Rugosité (nm)	1.9 +/- 0.2	1.9 +/- 0.2	1.6 +/- 0.1	1.7 +/- 0.1

Tableau 5 : récapitulatif des images prises en AFM sur les plots à 500ms : ppy, ppy+HP6 et ppy+ODN, à trois grossissements différents.

Dans ce tableau, sont représentés plusieurs plots spottés à 500 ms : polypyrrole pur, de polypyrrole + oligonucléotide et de polypyrrole + oligosaccharide. Ces images nous permettent de comparer leurs structures pour des temps de spotting utilisables en routine pour notre dépôt.

Au premier grossissement 15 x 15 μm , nous avons une vue d'ensemble des plots ; nous pouvons alors comparer l'aspect des plots de polymère par rapport à la surface d'or nu. Nous remarquons les mêmes irrégularités sur le spot de polymère que sur l'or, ce qui nous confirme que nos plots sont tellement fins qu'en se formant sur la surface ils épousent la surface et tous ses défauts. Nous pouvons faire la même constatation au grossissement 3 x 3 μm , seulement les « alvéoles » de la surface d'or semblent être moins prononcées pour le ppy seul. Si on s'intéresse au dernier grossissement réalisé, on voit que les plots possédant une

biomolécule (ODN ou HP6) ne présentent pas la même structure fine que le ppy seul. Il semble que la forme des « alvéoles » ne soient pas la même pour le plot de ppy et pour les deux autres catégories de plots, ce qui nous permet d'émettre l'hypothèse que les biomolécules sont bien immobilisées sur la surface. Tout ceci est confirmé par la mesure de la rugosité de la surface, cet effet est sûrement dû à l'immobilisation de biomolécules sur le film de polypyrrole, ces biomolécules étant de plus grande taille.

Jusqu'à présent, nous avons détaillé les différentes phases nous permettant de construire nos puces à sucres : la construction des molécules « pyrrole - bras espaceurs », leur couplage à un sucre naturel, leur mode de dépôt et la caractérisation des plots par deux méthodes : le MEB et l'AFM.

Par la suite, notre travail portera sur la détection et la mesure de l'interaction biologique modèle entre l'oligosaccharide HP6 et la chimiokine SDF-1 présentée en début de chapitre II (*cf.* II.1.2.2.).

3. Mise au point analytique

Toujours dans le but de réaliser l'analyse dynamique de l'assemblage des complexes protéines - Héparanes Sulfates, nous avons souhaité effectuer ces complexations sur support solide (puce = matrice de plots) et en utilisant, comme détection, une mesure multiparamétrique : l'imagerie SPR. Nous étudierons préalablement l'assemblage possible entre HP6 greffé et la protéine SDF-1, notre modèle d'étude, par microscopie à épifluorescence. Nos travaux de reconnaissance biologique se basent sur l'expérience et les résultats de l'équipe avec laquelle nous collaborons à l'IBS.

3.1. Interactions sucre HP6 - protéine SDF-1 révélée par microscopie de fluorescence

Dans un premier temps, le système de détection par fluorescence utilisé au laboratoire, sera décrit, puis les différents résultats seront ensuite exposés. Ces études préliminaires, vont nous servir à déterminer si, d'une part, l'interaction biologique est mesurable, et d'autre part,

quels sont les paramètres utiles pour cette détection, pouvant aussi servir de point de départ pour les études futures en imagerie SPR.

3.1.1. Principe du microscope à épifluorescence

Un microscope à fluorescence est un microscope photonique équipé d'une lampe à arc. Des filtres d'excitation permettent de choisir la longueur d'onde incidente et des filtres d'émission (ou d'arrêt) permettent de sélectionner les radiations émises par l'objet excité. Un microscope équipé en épifluorescence est pourvu de plusieurs jeux de filtres correspondant aux fluorophores les plus habituellement utilisés. Chaque jeu de filtres est constitué d'un filtre d'excitation, d'un miroir dichroïque et d'un filtre d'émission.

Pour nos études, nous utilisons la microscopie de fluorescence pour la visualisation d'une biopuce, c'est-à-dire un substrat fonctionnalisé avec de nombreuses sondes différentes. Comme pour les tests immunologiques ELISA, la procédure d'utilisation comprend deux étapes principales : l'interaction puis la lecture. L'interaction consiste en l'injection sur la biopuce de la solution test contenant les cibles marquées par un fluorophore, suivie de l'élimination des cibles non liées par une solution de rinçage. L'intensité de fluorescence est alors mesurée.

Ainsi, pour nos travaux, afin de nous affranchir des problèmes de quenching, liés au polymère, nous avons choisi un fluorophore : la R-Phycoérythrine liée à une molécule de Streptavidine. Le principe présenté précédemment reste inchangé, hormis le fait qu'il y a deux étapes d'interactions successives. Dans une première étape, l'interaction biologique a lieu entre le sucre immobilisé sur le support et la molécule cible en solution, marquée par une molécule de biotine et, dans une deuxième étape après rinçage de la puce (élimination du surplus de cibles n'ayant pas réagies), a lieu l'interaction Biotine – Streptavidine, la streptavidine étant reliée au fluorophore, la Phycoérythrine. Une fois ces deux étapes d'interactions réalisées, la lecture de la puce peut être effectuée (figure 61).

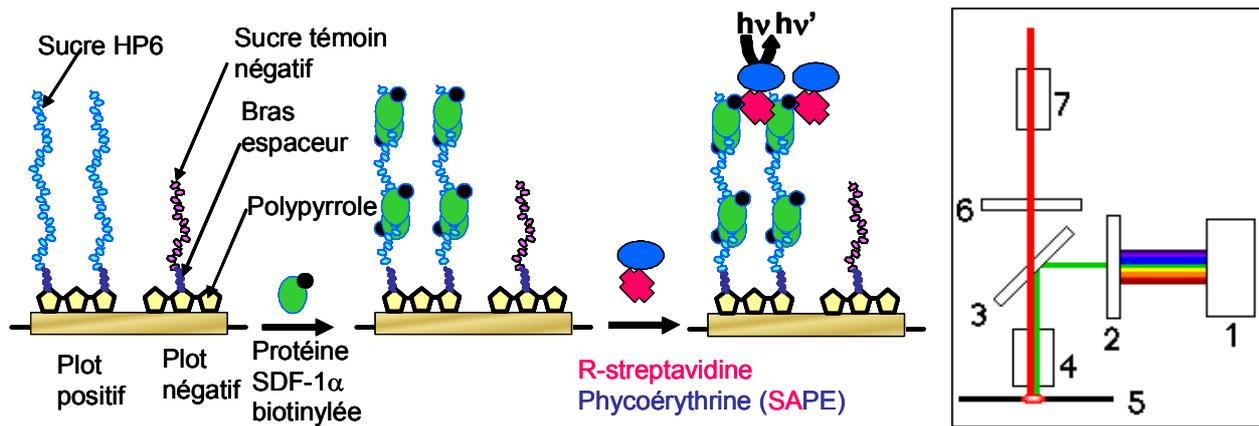


Figure 61: principe de l'utilisation de la biopuce pour une détection en fluorescence ; première étape : interaction biologique avec la protéine marquée par une biotine ; deuxième étape : interaction biotine/SA marquée par un fluorophore ; troisième étape : lecture sous le microscope : 1- lampe à arc, 2- filtre d'excitation, 3- miroir dichroïque, 4- objectif, 5- puce, 6- filtre d'émission, 7- oculaire / caméra.

Le principe de détection par fluorescence maintenant décrit, nous allons exposer, dans la suite de ce paragraphe, les différentes expériences réalisées, afin de, premièrement, valider la démarche de fabrication réalisée jusqu'ici, et dans un deuxième temps, d'optimiser les paramètres utiles lors de cette détection.

3.1.2. Première détection de l'interaction biologique modèle

Dans un premier temps, pour valider la technique de l'« électrospeint » transposée au greffage de sucres, a été déposé, sur une surface d'or, le sucre modèle HP6 qui est relié à une molécule de pyrrole par un bras espaceur : PUH, PUAH ou PCAH.

L'objectif de cette expérience est de vérifier la reconnaissance du sucre HP6 par la protéine SDF-1 biotinylée, et de déterminer à partir de quelle concentration en sucre déposé, la reconnaissance, si elle a lieu, peut être détectée.

Le principe de révélation en fluorescence de la complexation HP6/SDF-1 biotinylée est le suivant : la puce est plongée dans une solution tampon de rinçage ; ce tampon contient de la BSA (sérum albumine bovine), servant à « bloquer » l'or nu de la puce et aussi les plots de ppy, afin d'éviter toute fluorescence non spécifique. Une fois le blocage fait, sont incubées successivement la protéine SDF-1 α biotinylée (interaction protéine SDF-1 α / héparine HP6) puis la streptavidine R-phycoérythrine (SAPE) (interaction streptavidine / biotine). L'intensité de fluorescence (IF ou niveaux de gris) est ensuite évaluée à l'aide d'un microscope à épifluorescence.

Pour cette étude préliminaire, les dépôts ont été faits sur une lame de verre recouverte de chrome (1 nm) et d'or (48 nm). 25 plots de polypyrrole ont été déposés sur la lame. La durée d'électrocopolymérisation (impulsion électrique) est de 500 ms. Ce temps nous permet d'obtenir une couche de polymère assez épaisse. Ces plots sont constitués d'un mélange initial (pour le dépôt) de pyrrole 20 mM, tampon phosphate (50mM pH=7) et de pyrrole greffé au composé biologique à différentes concentrations et se détaillent de la façon suivante :

- **Espèce 1** : sucre HP6 + bras espaceur PCAH (**PCAH-HP6**)
- **Espèce 2** : sucre HP6 + bras espaceur PUAH (**PUAH-HP6**)
- **Espèce 3** : sucre HP6 + bras espaceur PUH (**PUH-HP6**)
- **Espèce 4** : sucre HP6 sans bras espaceur et non greffé au pyrrole (**HP6 seul**)
- **Espèce 5** : Chondroïtine Sulfate (CS) ne reconnaissant pas la protéine + PCAH (**PCAH-CS**)
- **Espèce 6** : pyrrole (pas de composé biologique greffé, appelé Milieu Réactionnel (**MR**))

Ces plots ont été déposés à 6 concentrations différentes : **A** = 100μM, **B** = 50μM, **C** = 25μM, **D** = 10μM, **E** = 1μM, **F** = 500nM. Le plot grisé du schéma est un plot de MR polymérisé. Ces concentrations représentent la concentration en sucre total (sucre – pyrrole et sucre seul) présent en solution. Le sucre Chondroïtine Sulfate (CS) a été utilisé comme témoin négatif, parce qu'il possède une structure similaire à celle de l'héparine HP6 mais ne possède pas de propriétés de reconnaissance de la protéine SDF-1α. Tout comme HP6, ce sucre négatif est relié au PCAH, afin d'être fixé dans les mêmes conditions.

Pour la première étape, qui correspond à l'interaction biologique, nous nous sommes inspirés de la concentration en ODN complémentaires cibles déjà utilisés pour la détection de l'hybridation d'ADN par fluorescence au laboratoire¹⁵⁸ ; ainsi, la concentration de 1μM a été choisie. C'est une valeur qui peut paraître élevée mais qui permet d'être sûr de ne pas avoir la protéine cible en quantité limitante. Le volume utile de dépôt de la solution de SDF-1 est d'environ 45μL ; plusieurs essais d'incubation de la protéine cible en fonction du temps ont été réalisés, et il nous est apparu qu'à partir d'un temps de 30 minutes, notre signal final en fluorescence était maximum et il en est de même pour l'interaction Biotine – Streptavidine. Ces quelques paramètres ayant été déterminés, la première expérience a pu être effectuée.

La photo 62 montre les résultats obtenus après incubation de SDF-1 biotinylée à 1μM (45μL) pendant une demi-heure suivie d'un rinçage puis de l'incubation de SAPE durant une

demi-heure. Les mesures d'intensité de fluorescence prises sur la photo sont récapitulées dans le tableau suivant (tableau 6) :

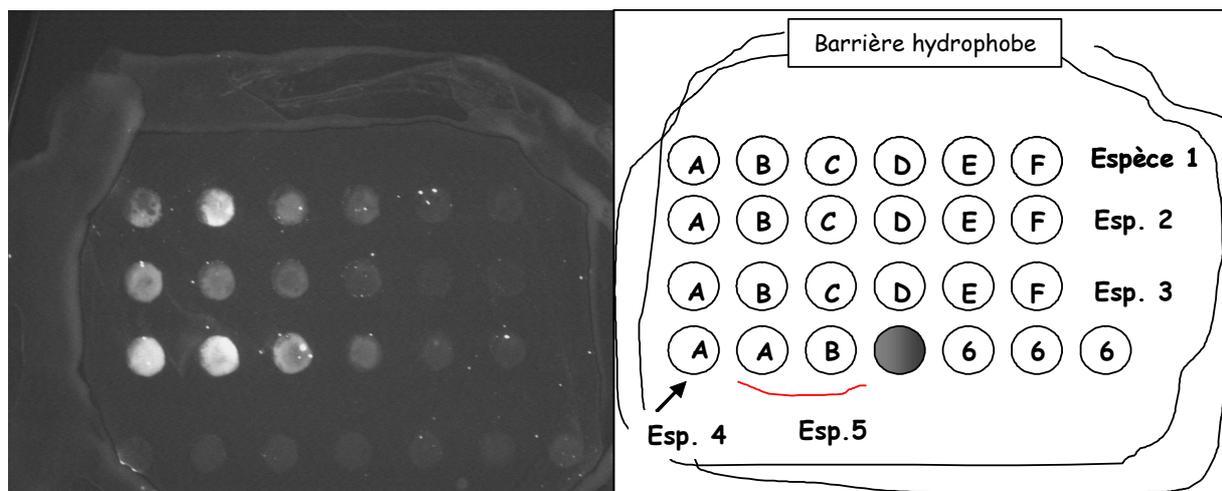


Figure 62: gauche : photo de la lame au microscope exposée 0,52s (temps d'exposition faible, afin d'éviter la saturation lumineuse) après passage de SDF-1 à 1 μ M; droite : schéma de composition de la lame.

Concentration en sucre (μ M)	PUH-HP6	PUAH-HP6	PCAH-HP6	PCAH-CS(A)	HP6 seul	MR
0,5	18	4	10	–	–	–
1	24	12	22	–	–	–
10	80	24	68	–	–	–
25	218	66	130	–	–	0
50	326	114	312	8	–	0
100	346	172	–	8	12	0

Tableau 6 : récapitulatif des intensités normalisées de fluorescence obtenues lors de la lecture de la lame (présentée ci-dessus, fig. 62) au microscope, intensités exprimées en niveaux de gris.

Par l'image obtenue en fluorescence et la mesure semi quantitative de l'intensité des plots (exprimée en niveaux de gris dans le tableau 6, ci-dessus), nous pouvons observer que : **(1)** les 3 plots MR, conformément à nos attentes, ne présentent pas de fluorescence, montrant l'absence d'adsorption non spécifique à la surface du film de polypyrrole. De plus, l'étape de blocage est utile, car la protéine SDF-1 α biotinylée ne s'adsorbe ni sur l'or, ni sur le polypyrrole seul (MR), après traitement ; **(2)** le témoin négatif PCAH-CS greffé au polypyrrole, ne présente qu'une très faible fluorescence, la protéine ne s'adsorbe pas sur ce plot et n'interagit pas avec ce sucre (négatif) et **(3)** le témoin HP6 (**Espèce 4**) immobilisé dans le polypyrrole, montre une fluorescence très inférieure aux plots HP6 greffés au pyrrole. Cela démontre que la détection de la reconnaissance protéine / sucre nécessite que le sucre soit

pyrrolylé et copolymérisé avec le pyrrole, contrairement aux protéines ou à l'ADN, qui sont des biomolécules pouvant s'adsorber de manière passive (sans covalence) sur les films de polypyrrole et permettant tout de même une bonne reconnaissance biologique.

Les intensités de fluorescence nous indiquent que plus la solution de spotting est concentrée en sucres modifiés (liée à la densité du plot en sucres), plus la reconnaissance biologique (et donc les intensités de fluorescence) augmente. Mais en comparant les intensités de fluorescence des trois molécules « pyrrole - bras espaceurs - HP6 », la meilleure fluorescence est observée pour le bras PUH, suivi du bras PCAH et enfin du bras PUAH.

En l'état actuel de nos travaux, nous pouvons affirmer que la fluorescence obtenue est spécifique de la reconnaissance entre le sucre HP6 greffé de manière covalente sur les plots de polypyrrole et la protéine biotinylée, grâce à la présence des quatre témoins négatifs : l'or, le ppy seul, HP6 immobilisé dans le film et le plot PCAH-CS. Nous comprenons donc que les oligosaccharides utilisés supportent l'étape d'électrospotting et que le pyrrole est nécessaire à la fixation de sucres. En revanche, nous ne sommes pas en mesure de savoir avec certitude pourquoi l'oligosaccharide HP6 supporté par un bras espaceur présente un meilleur signal qu'un autre. D'après le dosage de la quantité de pyrrole lié au sucre, on sait qu'il y a plus de sucre HP6 lié au bras espaceur PUH qu'au PCAH et qu'au PUAH, ce qui pourrait expliquer en partie, pourquoi il y a une meilleure fluorescence pour le PUH > PCAH > PUAH. Mais pour répondre à cette question plus précisément, d'autres études sont nécessaires pour déterminer le caractère hydrophile plus ou moins important des bras, afin de comprendre leur rôle dans la reconnaissance (résultats discutés dans un prochain paragraphe).

Nous pouvons déjà conclure que la technique d'immobilisation du sucre HP6 est favorable à la reconnaissance de la protéine et que même si les rendements de couplage sont faibles et la proportion finale de sucre greffés de façon covalente est aussi faible, elles sont tout de même suffisantes et efficaces pour nos études de reconnaissance.

Il reste maintenant à déterminer la gamme de concentrations en protéine SDF-1 biotinylée favorable à la détection en fluorescence mais aussi celle des sucres, utile pour le spotting. D'après cette première expérience, les plots ayant une concentration en sucre total comprise entre 10 μ M et 50 μ M, offrent une bonne réponse en fluorescence pour la concentration en protéine utilisée ; en revanche, il n'y a quasiment aucune fluorescence pour les plots de 0,5 μ M et 1 μ M et les plots à 100 μ M semblent être saturés en fluorescence, ils

possèdent donc une densité de sucres à la surface du polymère trop grande. Il faut penser à l'encombrement stérique exercé par l'empilement « sandwich » sucre immobilisé + Protéine Biotinylée + SAPE. Un compromis, entre la quantité de sucre à déposer et la concentration en protéine à incuber sur la puce, doit être trouvé.

3.1.3. Optimisation des paramètres pour la détection en fluorescence

L'étude précédente a montré que, pour une solution de protéines SDF-1 biotinylée à la concentration de 1 μM , une densité en sucre HP6 de 1 μM n'aboutissait qu'à une faible intensité de fluorescence et qu'une concentration supérieure à 50 μM en HP6 spotté, quelle que soit la molécule « pyrrole - bras espaceur » utilisée, donnait des plots saturés en fluorescence. Nous nous sommes donc intéressés à une gamme de concentration en sucre total à spotter allant de 1,5 μM à 25 μM . De plus, lors de cette étude, une gamme de concentrations de protéines cibles a été testée afin de déterminer la sensibilité de la reconnaissance biologique étudiée.

Les différentes espèces « pyrrole - bras espaceur – sucre » ont été déposées suivant la matrice représentée sur la figure 63. Les concentrations indiquées pour les différents plots correspondent aux concentrations en sucre total utilisées dans la solution de pyrrole libre, en vue du dépôt électrochimique. Trois contrôles négatifs sont utilisés :

- **MR** : (milieu réactionnel) il correspond à un plot composé uniquement de polypyrrole.
- **HP6** : HP6 libre, non greffé au pyrrole.
- **PCAH-CS** : le sucre chondroïtine sulfate (CS) relié à un pyrrole par le bras espaceur PCAH.

Ici, la même matrice de plots (quatre expériences indépendantes réalisées avec la même composition de plots afin de valider l'étude) a été incubée avec différentes concentrations en SDF-1 biotinylée: 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM et 1 μM (figure 63). Nous savions d'après les premières expériences que la solution en protéines cibles à 1 μM nous permet d'avoir de très bonnes intensités en fluorescence. Par la présente étude, nous avons cherché à connaître le seuil de reconnaissance en fonction de la quantité de sucres spottés et de celle en protéines incubées, sachant qu'il est préférable de limiter toute consommation de produits biologiques (protéines ou sucres), d'où la recherche d'un compromis dans l'utilisation des biomolécules.

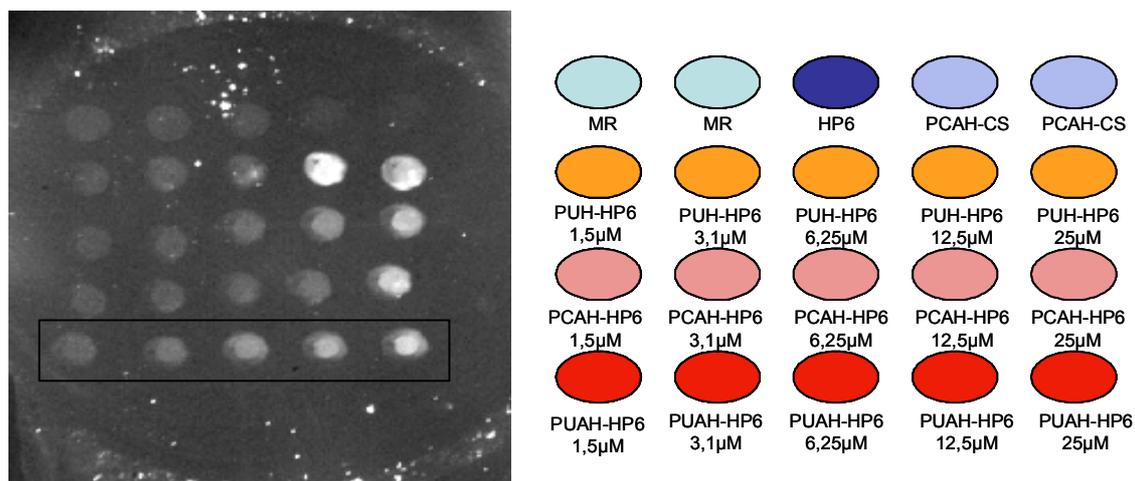


Figure 63 : Gauche : photo de la puce vue au microscope à épifluorescence exposée à 1.6s, après interaction avec la protéine ciblée à 500nM, suivie de la révélation avec la SAPE ; la dernière ligne composée d'un gradient en concentrations de molécules PUAH-dp12 ne servant pas à l'étude a été masquée; droite : légende de la matrice réalisée.

Les premières conclusions sont que, quelle que soit la concentration en protéines cibles, les trois témoins négatifs ne montrent qu'une faible intensité de fluorescence. Le niveau d'interaction non spécifique est donc peu élevé. Ces valeurs confirment l'étude précédente (*cf.* II.3.1.2.). D'autre part, l'étape de saturation réalisée en incubant 1% de BSA en début d'expérience semble satisfaisante puisque la protéine ne se fixe pas sur l'or (figure 63) et qu'elle ne se fixe que dans de très faibles proportions sur les plots de polypyrrole seul (MR). Notons tout de même la présence de points très lumineux sur les images prises, nous avançons l'hypothèse que ce sont des agglomérats de protéines biotinylées mal dissoutes dans le tampon utilisé, mais cette fluorescence est totalement non spécifique, et ne compromet en rien ces expériences.

De plus, la protéine ne s'adsorbe que très faiblement sur le sucre négatif PCAH-CS, ce qui confirme la spécificité du complexe SDF-1/ HP6. Enfin, le plot témoin HP6 immobilisé dans le polymère de polypyrrole présente une fluorescence très inférieure aux plots HP6 greffés de façon covalente au polypyrrole, ce qui confirme l'immobilisation de celui-ci dans le polymère, mais cette immobilisation non covalente ne permet pas une bonne accessibilité du sucre pour la reconnaissance de la protéine.

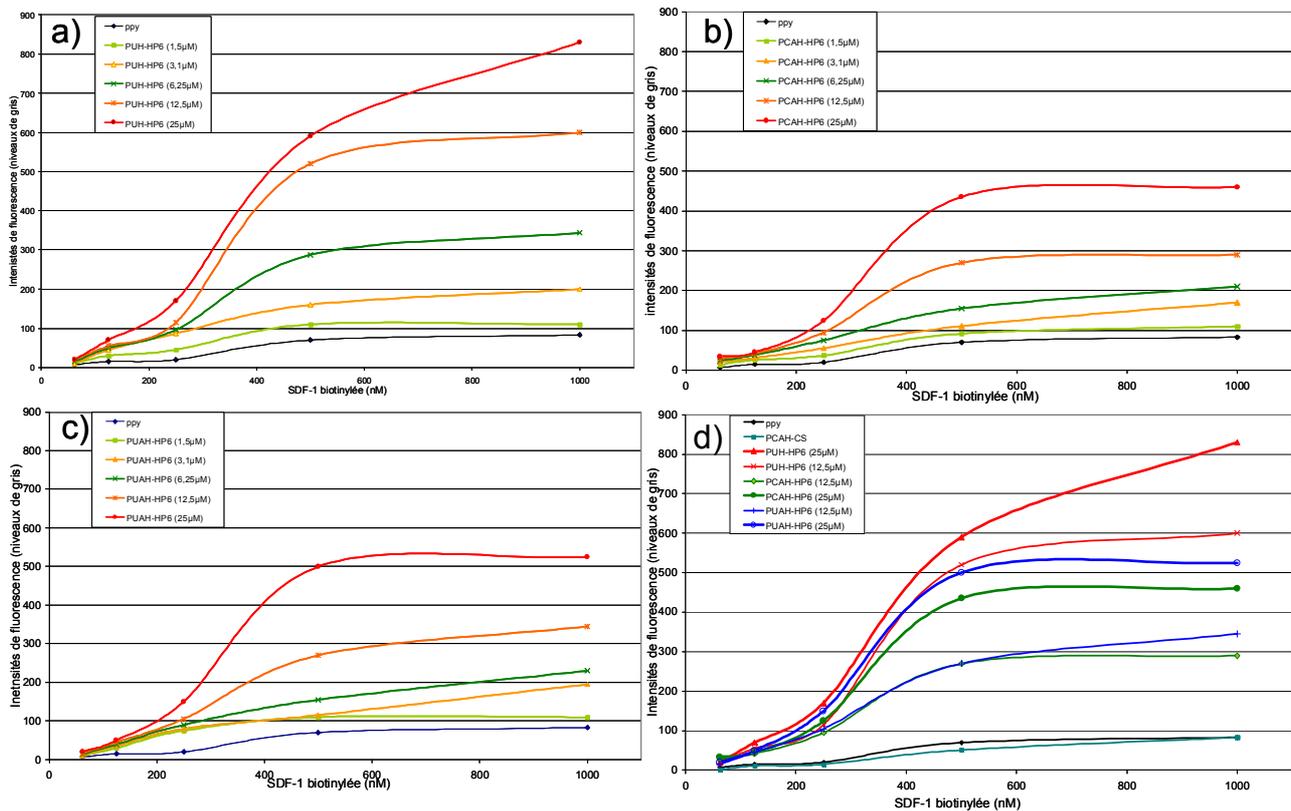


Figure 64 : Niveau d'intensité de fluorescence, correspondant à l'interaction entre la protéine SDF-1 α biotinylée à différentes concentrations et les différentes espèces sucre/bras espaceur, après ajout de SAPE : a) pour les plots PUH-HP6; b) pour les plots PCAH-HP6 ; c) pour les plots PUAH-HP6 ; d) récapitulatif des intensités de fluorescence pour les spots les plus concentrés en HP6, quel que soit le bras espaceur ; tous ces graphes sont comparés aux intensités de deux témoins négatifs : le ppy seul et le plot PCAH-CS.

En nous intéressant plus précisément à la réponse en fluorescence en fonction de la concentration de protéines cibles, nous pouvons observer sur la figure 64 que plus un plot possède de sucres HP6 greffés, plus l'intensité de fluorescence croît, donc plus la reconnaissance biologique est importante.

D'après les courbes d'intensité (figure 64), les réponses en fluorescence sont considérées comme spécifiques (supérieures aux contrôles négatifs) à partir d'une concentration supérieure à 125 nM en SDF-1, pour les plots en HP6 à 12,5 μ M et 25 μ M. Sur la figure 64, les plots ayant comme concentrations de greffage 1,5 μ M et 3,1 μ M (quel que soit le bras espaceur utilisé) ne présentent que de faibles intensités de fluorescence, mais tout de même supérieures à la fluorescence non spécifique observée sur les plots témoins. Cependant nous avons estimé que ce n'est qu'à partir des plots de HP6 à 6,25 μ M que l'ensemble des concentrations en protéines cibles était détectable spécifiquement. Nous avons constaté que l'augmentation en protéines aboutit à une augmentation de l'intensité de fluorescence du plot, jusqu'à l'obtention d'un plateau, illustrant la saturation du plot en protéines, ici visible sur la figure 64 à partir de 500 nM en SDF-1.

Grâce à cette étude, nous avons pu affiner nos paramètres de détection en fluorescence ; nous pouvons travailler avec des concentrations en protéines bien inférieures à 1 μM , et parallèlement, nous pouvons choisir d'utiliser des concentrations en sucre HP6 à greffer de l'ordre d'une dizaine voire d'une vingtaine de micromolaires en sucre total et non plus à 100 μM . Nous pouvons aussi discuter des intensités de fluorescence différentes en fonction du bras espaceur utilisé ; il suffit de faire entrer en jeu des différents rendements de couplage des « bras espaceurs – HP6 », pour comprendre qu'une fois les intensités normalisées en fonction de ces valeurs, les intensités présentent nettement moins de dispersion en fonction des différents bras espaceurs. Les seules conclusions que nous pouvons tirer pour l'instant de ces mesures, vis-à-vis du bras espaceur, sont que sa présence est nécessaire pour une bonne accessibilité de la chaîne oligosaccharidique et que les trois bras espaceurs testés (PUH, PUAH et PCAH) semblent équivalents. Il est donc prématuré, pour l'instant, d'opter pour un bras espaceur plutôt qu'un autre.

3.1.4. La fluorescence : un moyen de valider la purification des oligosaccharides par HPLC

Après les étapes de validation et d'optimisation des paramètres, la détection par fluorescence sert de phase de contrôle de couplage, avant toute construction de matrice de plots sur un prisme recouvert d'or suivie d'une analyse cinétique par imagerie SPR.

Ce paragraphe va nous permettre de décrire plus précisément ce contrôle ; généralement, les échantillons issus du couplage, après avoir été dosés, sont spottés sur lame de verre recouverte d'or, puis révélés en fluorescence. Leurs résultats obtenus, après lecture de la puce, nous permettent le plus de souvent de valider le couplage et donc passer à l'étude des interactions par imagerie SPR. Mais, il arrive que l'étape de fluorescence donne des résultats non attendus. Dans ce cas de figure, les causes doivent être trouvées. C'est pour cela qu'il a été mis au point, après un contrôle en fluorescence non conforme, un principe de vérification et de purification des oligosaccharides modifiés par le couplage, au moyen de l'analyse HPLC (cf. II.2.2.3.b). Dans ce paragraphe, nous allons expliquer cette démarche de vérification des couplages, avec lecture en fluorescence, avant et après purification par HPLC.

Ici, nous travaillons sur l'exemple suivant : à l'issue des couplages entre les bras espaceurs PCAH et Py~NH₂ et le sucre modèle HP6, un contrôle en fluorescence est réalisé, après avoir effectué les différents dosages du sucre et du pyrrole.

Afin de valider les couplages, les échantillons (les différentes espèces « pyrrole - bras espaceur – sucre » décrites figure 66 et dans la partie expérimentale) sont spottés dans une gamme de concentration assez large. Comme attendu, les témoins négatifs ne répondent pas en fluorescence et les deux plots témoins positifs (PCAH-HP6 à 12,5 et 25μM) répondent correctement lors de l'expérience. Or les 4 échantillons issus du nouveau couplage donnent une réponse très faible, vis-à-vis des deux plots témoins positifs (PCAH-HP6). Précédemment, les rendements de couplage de chaque échantillon avaient été mesurés au préalable et sont les suivants : Py~NH-HP6 (1) = 16% ; Py~NH-HP6 (2) = 22% ; Py~NH-HP6 (3) = 55% ; PCAH-HP6 (4) = 95%.

A l'obtention de ces valeurs et après comparaison avec les intensités de fluorescence, un doute sur l'efficacité du dosage et/ou du couplage est apparu. Habituellement, le couplage entre le bras espaceur PCAH et le sucre modèle HP6 atteint généralement les 14-15% et là, sa valeur dépasse 90%, et vu la très faible fluorescence des plots même à forte concentration (plots à 50 ou 100μM), un problème est survenu. Pensant d'abord à l'erreur humaine, les dosages sont refaits, mais aucune valeur pour les couplages avec les Py~NH-HP6 ne change, celle du couplage PCAH-HP6 diminue pour donner 60%. Cette étape permet de vérifier l'exactitude des dosages, la question se pose donc sur les étapes précédentes : le couplage en lui-même et/ou sa purification sur colonnes d'exclusion.

Voulant déterminer au plus vite la cause, aucun couplage n'est refait, en revanche, les échantillons (1), (2), (3) et (4) (décrits plus loin) sont passés en HPLC. Les quatre échantillons possèdent tous l'enveloppe correspondant au sucre HP6 (cf. II.2.2.3.b), mais au lieu de n'avoir qu'une série de petits pics entre 9 et 16 min, comme il avait déjà été observé pour les bras espaceurs PUAH, PCAH et PCAH, ces 4 échantillons possèdent en plus un grand pic sortant aux alentours de 14,5 min : phénomène assez surprenant pour PCAH (figure 65). Ces différents pics sont tout de même collectés en vue du nouveau contrôle.

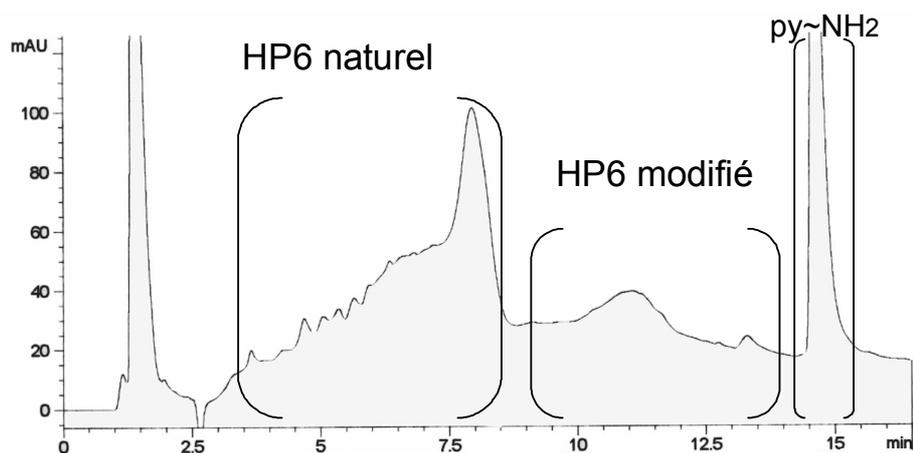


Figure 65 : Graphe HPLC d'un des échantillons testés, **Py-NH-HP6 (1)** : Enveloppe correspondant au sucre naturel HP6, puis série de pics plus ou moins grands, plus ou moins fins correspondant aux molécules de sucre modifié et au temps $t = 14,5$ min, pic se révélant être Py-NH_2 .

Après réflexion, l'idée qu'il reste du réactif possédant un groupement amine n'ayant pas réagi dans l'échantillon final devient évidente, ces réactifs faussant les dosages d'échantillons. La diamine, réactif de départ pour Py-NH_2 (cf. II.2.1.2.b), n'est peut-être pas totalement éliminée ; or d'après les caractérisations en spectroscopie de masse et en RMN, aucune trace de diamine n'a été détectée. Le seul réactif pouvant fausser les dosages, autre que la diamine, est en fait le « pyrrole - bras espaceur » n'ayant pas réagi : Py-NH_2 . Pour confirmer cette hypothèse, ce « pyrrole - bras espaceur » seul dissous dans du tampon de HPLC a été injecté et le graphe obtenu ne comporte qu'un pic, celui à 14,5min. Ainsi, nous comprenons que ce réactif, malgré le désalage sur colonne après couplage, n'est pas totalement éliminé ; encore un problème se pose, pourquoi y a-t-il donc du Py-NH_2 dans l'échantillon désalé de PCAH-HP6 ? L'explication est simple : cette molécule lors du premier désalage sur la colonne reste piégée dans celle-ci, et malgré le rinçage de celle-ci entre chaque échantillon, au fur et à mesure des différentes purifications, il se décroche et vient donc contaminer les échantillons successifs. Au final, il a été établi que le rinçage de cette mini colonne d'exclusion entre chaque échantillon devait être triplé en volume, voire utiliser une seule colonne par échantillon distinct.

Fort de ces connaissances, les fractions des différents pics collectées sur HPLC sont séchées, et seules celles correspondant aux séries de sucres modifiés sont reprises dans du MR (40 μL), afin de réaliser un nouveau contrôle par fluorescence.

Les différentes espèces « pyrrole - bras espaceur – sucre » ont été déposées suivant la matrice représentée sur la figure 66. Tous les plots ne concernent pas notre étude, donc ces autres couplages, ayant subi le même protocole de purification par HPLC, ont été masqués.

Les concentrations indiquées pour les différents plots correspondent à des dilutions au 10° et au 100°, en vue du dépôt électrochimique. Trois contrôles négatifs sont utilisés : **MR**, **PCAH-CS** et **HP6**.

- **PCAH-HP6** : (dernière ligne) Echantillon connu, servant de témoin positif, à deux concentrations 12.5 et 25µM.
- **Py~NH-HP6 (1)** : conditions normales de couplage dans du tampon Bicarbonate de sodium pH = 7.8 (cf. partie expérimentale).
- **Py~NH-HP6 (2)** : conditions normales de couplage, seulement le bras espaceur Py-NH2 est deux fois plus concentré.
- **Py~NH-HP6 (3)** : les mêmes conditions de couplage que les conditions (1), seulement le tampon de couplage change : tampon acétate de sodium à pH = 5.
- **PCAH-HP6 (4)** : conditions normales de couplage dans du tampon acétate de sodium.

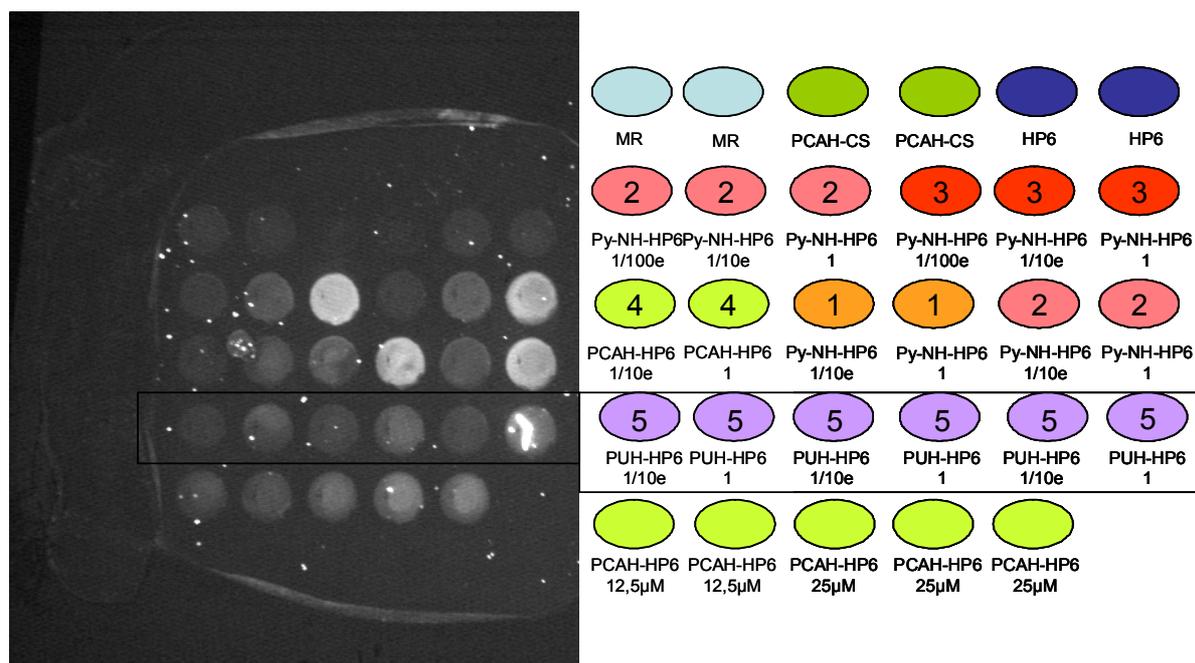


Figure 66 : *Gauche* : photo de la puce vue au microscope à épifluorescence exposée à 1s, après interaction avec la protéine ciblée à 800nM, suivie de la révélation avec la SAPE ; *droite* : Schéma de la matrice réalisée ; **Py-NH-HP6 (1)** : conditions normales de couplage, **Py-NH-HP6 (2)** : conditions normales de couplage, quantité de bras espaceur augmentée, **Py-NH-HP6 (3)** : les mêmes conditions de couplage que les conditions (1), seulement le tampon de couplage change : tampon acétate à pH = 5, **PCAH-HP6 (4)** : conditions normales de couplage.

Au vu de l'image de fluorescence, on constate que les fractions collectées répondent très bien en fluorescence, les échantillons Py~NH-HP6 donnent des intensités bien

supérieures à celles des plots témoins positifs. Ce dernier contrôle nous permet donc de valider cette technique de purification des oligosaccharides. A l'heure actuelle, il est encore difficile d'en déduire la quantité de sucres modifiés mais nous pouvons au moins valider la faisabilité du couplage entre le bras espaceur Py~NH₂ et HP6.

3.1.5. Bilan

La détection par fluorescence nous a permis de valider et d'optimiser notre technique de dépôt associée à la chimie de couplage « pyrrole / oligosaccharide ». Cette technique de détection s'est révélée être utile et un moyen de contrôle efficace pour la préparation des échantillons.

Maintenant que le modèle d'étude des interactions sucre – protéine est validé sur puce, la suite de notre travail va consister en l'étude de cette reconnaissance, par imagerie SPR, afin d'obtenir de nouveaux paramètres : les cinétiques d'association et de dissociation du complexe sucre – protéine, en temps réel et sans marquage de protéines au préalable.

3.2. Interactions sucre HP6 - protéine SDF-1 suivies par imagerie SPR

Le modèle d'étude des interactions oligosaccharide – protéine étant validé par la détection en fluorescence (cf. II.3.1.), ces mêmes interactions vont pouvoir maintenant être détectées par l'imagerie SPR. Avant de s'intéresser aux résultats obtenus, le système optique va être décrit, ainsi que le système fluidique.

3.2.1. Présentation du système d'imagerie SPR

a) Montage optique

Comme nous l'avons déjà expliqué plusieurs fois au cours de cette thèse, les différents plots sont placés sur la couche d'or au contact du prisme. Pour étudier simultanément et en temps réel les interactions se produisant sur ces différents spots, ceux-ci sont imagés sur une caméra CCD par un système optique adéquat (figure 67). Ce système a été largement décrit

par Emmanuel Maillart dans sa thèse¹⁸⁰ ; notre système optique est basé sur toutes les considérations énoncées dans sa thèse.

Rappelons cependant que la résonance de plasmons de surface est une technique qui permet de détecter à la surface d'une couche métallique, (l'or est généralement utilisé pour son excellente stabilité et ses propriétés optiques), la fixation de molécules de toute nature. Cette méthode est une mesure indirecte des changements de masse qui pourraient survenir à la surface. En effet, l'apparition d'un excès de molécules en une zone particulière de la surface se traduit par une variation locale de l'indice de réfraction, difficile à mesurer par une technique classique. Associée à un système d'imagerie de la surface, la SPR constitue une méthode particulièrement simple et reconnue pour sa haute capacité à mesurer localement de faibles variations d'indice sur une épaisseur de l'ordre de quelques nanomètres.

Notre système (figure 67) est composé d'une diode LED ($\lambda = 650$ nm), dont le faisceau est collimaté par deux objectifs de microscope. Ce faisceau de 10 mm de diamètre est dirigé vers la base du prisme ; celui-ci est recouvert d'un film mince d'or d'une cinquantaine de nanomètres d'épaisseur (1nm Cr + 48nm Au). Le faisceau traverse donc le prisme et se réfléchit sur la couche d'or, puis ce rayon lumineux est renvoyé vers une caméra CCD, permettant de visualiser l'image des plots. L'excitation des plasmons de surface est obtenue pour un angle d'incidence bien déterminé (angle de résonance) et se manifeste par l'extinction du faisceau réfléchi. La réflectivité du système autour de l'angle de résonance est représentée sur la figure 67 (courbe de réflectivité en fonction de l'angle θ)^{59,160,175}.

La réflectivité du système présente un minimum proche de zéro. La largeur du pic de réflectivité à mi-hauteur est d'environ 5° dans le cas d'un film mince d'or. Si une couche moléculaire se fixe progressivement sur la surface métallique, les conditions de couplage de résonance sont modifiées et la courbe de réflectivité se décale angulairement (passage de la courbe I à la courbe II, figure 67). En se plaçant à une incidence fixe θ_0 correspondant au maximum de la pente de la courbe, on observe une variation de la réflectivité provoquée par la fixation de matière sur la surface d'or, en fonction du temps (figure 67).

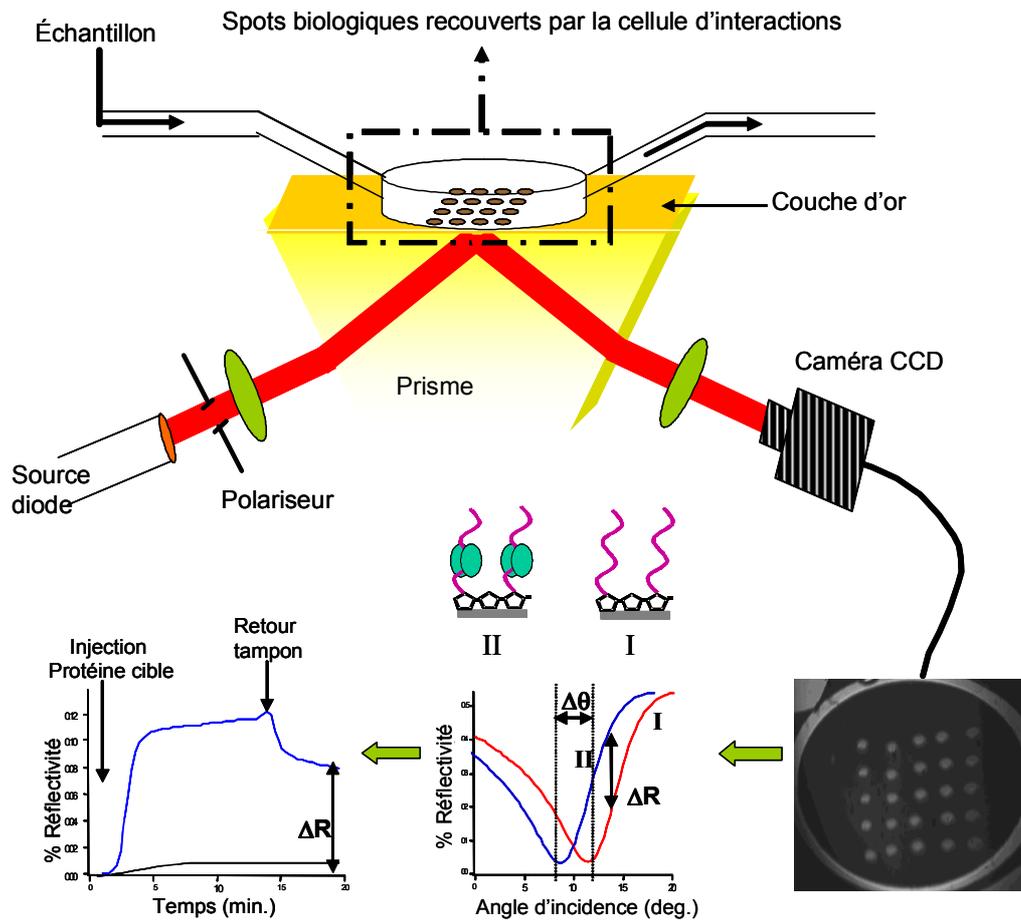


Figure 67 : schéma du système de transduction optique mettant en jeu le phénomène physique de résonance des plasmons de surface ; gauche et milieu bas : courbes typiques de la réflectivité en fonction du temps. La courbe de réflectivité se déplace vers la gauche lorsqu'une couche moléculaire se fixe sur l'interface ; droite bas : image obtenue à la caméra CCD correspondant à la variation de la réflectivité pour un angle θ_0 à l'instant t en fonction de l'épaisseur moyenne de produit biologique déposé à l'interface.

b) Fluidique

Le système fluidique est le dispositif permettant d'amener les cibles au contact des sondes fixées sur la surface d'or. Ce dispositif est constitué d'une pompe, d'une vanne, d'une boucle d'injection, de tubulures, de raccords et d'une cellule où vont se dérouler les interactions. Ce système doit être biocompatible pour ne pas polluer les réactifs et le volume du circuit d'injection doit être le plus faible possible afin d'économiser les réactifs dont le prix de revient est assez élevé ou dont la disponibilité est limitée.

b.1. La pompe

Deux systèmes d'injection sont couramment utilisés : ceux basés sur une pompe péristaltique et ceux basés sur une pompe pousse-seringue. Ces deux types de pompe, très différents, imposent le choix de la tubulure et des raccords.

Notre choix s'est porté sur une pompe pousse-seringue car nous possédions déjà ce type de matériel dans le laboratoire. Il faut savoir qu'une pompe pousse-seringue, comme son nom l'indique, est constituée d'une seringue et d'une translation motorisée contrôlant le mouvement du piston de cette seringue. Le liquide est alors « poussé » dans des tuyaux rigides. Les avantages de ce type de pompe sont les suivants : **(1)** la circulation du liquide est sans à-coups, contrairement à une pompe péristaltique, grâce à la translation continue du piston, **(2)** la précision du débit (contrôlé grâce à la vitesse de translation du piston), ce qui permet une plus grande reproductibilité. En revanche, les pompes pousse-seringue ont aussi quelques inconvénients : les différentes solutions doivent remplir la seringue donc, pour éviter toute contamination, il est nécessaire d'utiliser autant de seringues que de produits. Cet inconvénient est corrigé par le montage d'un système de boucle d'injection entre la pompe et la cellule d'interactions. Notre pompe, de marque Bioblock Scientific, pour des tuyaux de diamètre interne 250 μm , permet de faire varier le débit entre 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ et plusieurs centaines de $\mu\text{L}/\text{min}$. Nous verrons, dans la partie suivante, en quoi le choix du débit est très important lors de l'étude de cinétiques d'interactions (*cf.* II.3.2.5.a).

b.2. Injection des échantillons

Nous allons maintenant expliquer comment les échantillons sont injectés grâce à la pompe pousse-seringue. L'injection des analytes se fait au moyen d'une vanne à boucle centrale d'injection²¹⁹. Cette vanne, de marque Rheodyne modèle 5020 à 2 positions, permet de ne faire passer que du tampon par la pompe pendant toute l'expérience. En position 1, le tampon sort directement de la vanne en laissant la boucle de volume fixe, libre pour y insérer les réactifs à l'aide d'une seringue. Ensuite, en position 2, ce volume prédéfini est introduit dans le circuit d'injection en faisant passer le tampon dans cette boucle. Suivant la taille de la boucle, nous pouvons faire passer différentes quantités d'analytes (50 μL , 100 μL , 250 μL , ...). Le principe de fonctionnement d'une vanne d'injection est illustré dans la figure 69. Ce système, comprenant une pompe et une vanne, est couramment utilisé dans les systèmes FIA (Flow Injection Analysis : analyse de petites quantités de réactifs insérés dans un flux continu de tampon, comme en HPLC)²²⁰.

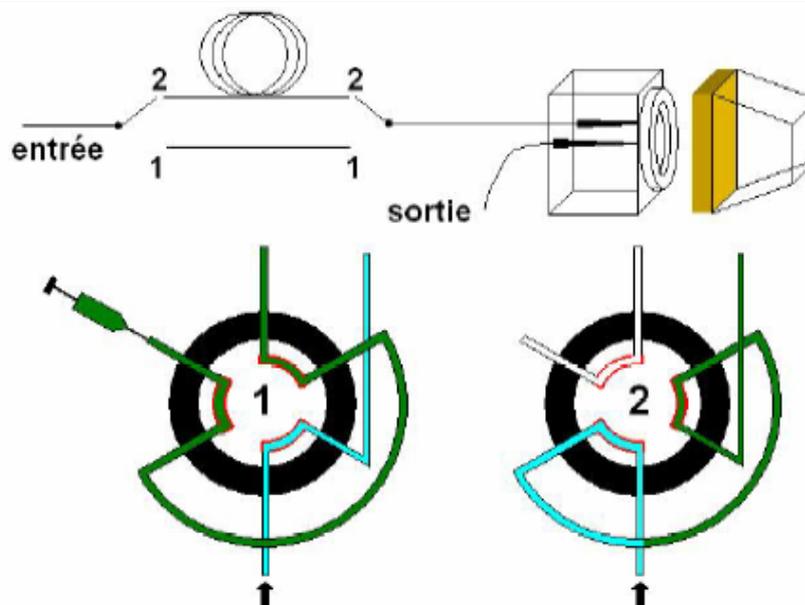


Figure 69 : Principe de fonctionnement d'une vanne à boucle d'injection centrale. En position 1, le tampon (bleu clair) est injecté dans la cellule. Pendant ce temps, la boucle peut être chargée avec un réactif (vert foncé) grâce à une seringue. En position 2, le tampon passe par la boucle préalablement chargée avant d'atteindre la cellule.

b.3. Cellules d'interactions

Pour finir la description du système fluide, nous allons maintenant décrire la cellule d'interactions. Elle est caractérisée par plusieurs propriétés : sa taille, sa forme ainsi que sa composition. Sa taille va définir le nombre maximal de plots pouvant être analysés en parallèle, sa forme va définir l'écoulement des réactifs au niveau de l'interface tandis que le choix du matériau composant la cuve doit permettre une bonne biocompatibilité avec les réactifs et une bonne étanchéité de la cellule.

La cellule d'interactions doit être la plus grande possible afin de pouvoir intégrer un maximum de plots dans la cellule, mais, dans le même temps, sa taille va définir le volume de la cellule et, par conséquent, la quantité de réactifs nécessaires pour l'analyse des interactions ; le choix de cette taille résulte donc d'un compromis. Nous avons choisi d'analyser des matrices de plots sur une superficie de 6 x 6 mm. Cette surface utile va nous permettre d'analyser simultanément un certain nombre de plots, dans le cadre de nos études.

Une première cellule d'interactions cylindrique de diamètre 9,5 mm a été conçue, ce qui nous laisse une tolérance suffisante pour placer la matrice de plots au centre de la cellule. Cette cellule a une hauteur $h = 100 \mu\text{m}$, ce qui fait un volume raisonnable de $7,1 \mu\text{L}$. L'injection se fait alors par une ouverture de diamètre 400 μm à une extrémité de la cellule et

la sortie par une autre ouverture de même diamètre à l'opposé de l'entrée. Ces deux trous dans la bloc tenant la cellule s'ouvrent sur un pas de vis permettant de fixer le raccord d'une tubulure. Cette cellule a été choisie en adéquation avec les travaux de thèse d'Emmanuel Maillart, qui a montré qu'une cellule cylindrique de volume 15 μL permettait une circulation homogène des réactifs.

Une deuxième cellule d'interactions a été réalisée, elle est cette fois-ci de forme hexagonale, de largeur 7,5 mm et de longueur entre les deux sommets centraux 11,5 mm, l'épaisseur de cette cellule est de 100 μm , soit un volume de 7,2 μL .

Ces deux cellules sont taillées dans un bloc de 14.5 mm x 15 mm x 25 mm de PVDF. Ce matériau a plusieurs avantages : il est biocompatible et assez souple, ce qui facilite son usinage et ce qui permet aux parois de la cuve d'épouser la forme du prisme afin d'assurer une bonne étanchéité. Les plans de ces cuves sont représentés sur la figure 70. Les joints sont usinés dans la masse. Ces cellules sont fermées en appliquant le bloc de la figure 70 sur un prisme recouvert d'une couche mince d'or.

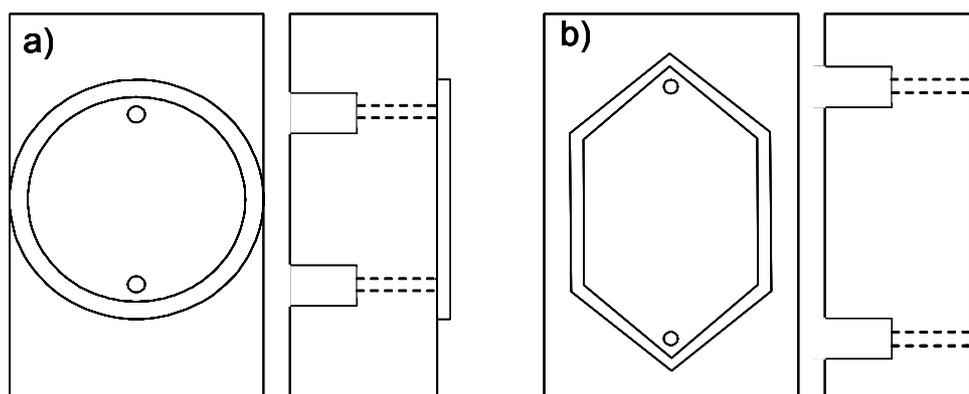


Figure 70 : Plans des cuves en PVDF servant de cellules d'interactions pour l'imagerie SPR. La cellule a) se résume à un anneau de téflon de diamètre intérieur de 9,5 mm, de diamètre extérieur 10 mm et d'épaisseur interne 100 μm et la cellule b) a une forme hexagonale de dimension 71.25 mm^2 et d'épaisseur 100 μm . Ces deux cuves sont sur un bloc de 14.5 x 15 x 25 mm^3 percés de trous de diamètre 400 μm au niveau de la cellule pour l'entrée et la sortie des réactifs.

Le système fluide d'injection des différents liquides est maintenant complet. Il va permettre de faire circuler de manière homogène de faibles quantités de réactifs. Ce système va ensuite être adjoint au prisme, afin de réaliser les expériences d'interactions biologiques entre les oligosaccharides et des protéines.

3.2.2. Spécificité / comparaison avec la détection par fluorescence

Maintenant que la fluorescence nous a permis de valider notre modèle de reconnaissance et que nous avons déterminé quelle gamme de concentrations en sucres « à spotter », nous allons étudier les interactions entre le sucre HP6 et la protéine SDF-1 par l'imagerie SPR (*cf.* II.3.2.1.) en temps réel.

L'objectif premier des expériences en imagerie est de vérifier la reconnaissance, en temps réel, du sucre HP6 par la protéine SDF-1 α . Pour cette étude cinétique, les dépôts ont été faits sur un prisme recouvert de chrome (1 nm) et d'or (48 nm). L'expérience a été renouvelée sur deux prismes différents, sur le banc SPRi développé par Emmanuel Maillart à l'IOTA (Orsay) et sur notre système développé au laboratoire.

Tout d'abord rappelons le principe des expériences réalisées en imagerie SPR. Après avoir positionné le prisme au contact de la cellule d'interactions, le tampon de rinçage est injecté en continu à débit constant. Pendant ce temps, la boucle d'injection est chargée en protéines cibles ; puis la boucle est ouverte, la protéine arrive donc dans la cellule, et si cela est possible, la protéine reconnaît les oligosaccharides sondes (figure 71).

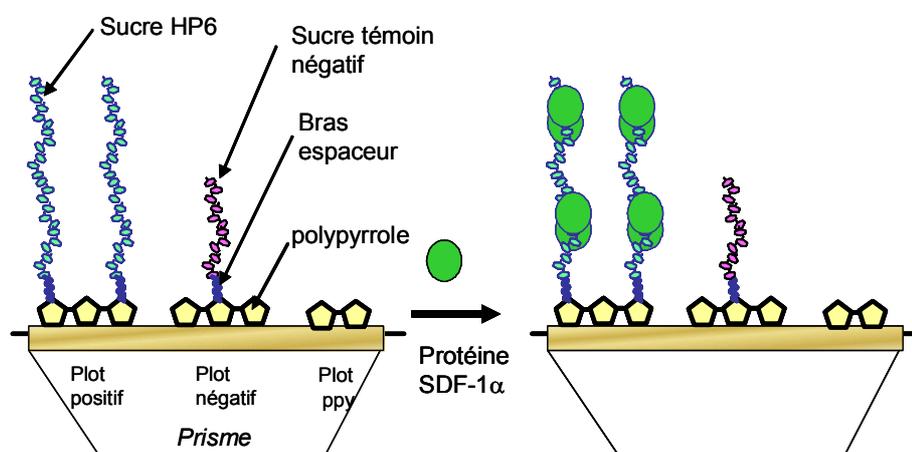


Figure 71 : Schéma de principe de la reconnaissance biologique, ayant lieu dans la cellule d'interactions de l'imager SPR ; ici, la protéine SDF-1 injectée est native.

24 plots de polypyrrole ont été déposés sur le prisme. La durée d'électrocopolymérisation était de 250 ms. Ces plots sont constitués d'un mélange de pyrrole (20 mM, tampon phosphate 50mM pH = 7) et de pyrrole greffé au composé biologique et se détaillent de la façon suivante (figure 72): les mêmes espèces « pyrrole – bras espaceur –

HP6 » ont été utilisés : PUH-HP6 (plots rouges), PUAH-HP6 (plots oranges) et PCAH-HP6 (plots verts clairs). Ces plots ont été déposés à 5 concentrations différentes : **100 μ M**, **50 μ M**, **25 μ M**, **12,5 μ M** et **6,25 μ M**. Ces concentrations représentent la concentration en sucre total (sucre pyrrolé et sucre seul). Nous avons utilisé le sucre Chondroïtine Sulfate (CS) comme témoin négatif : PCAH-CS à 50 μ M et HP6 non modifié à 100 μ M.

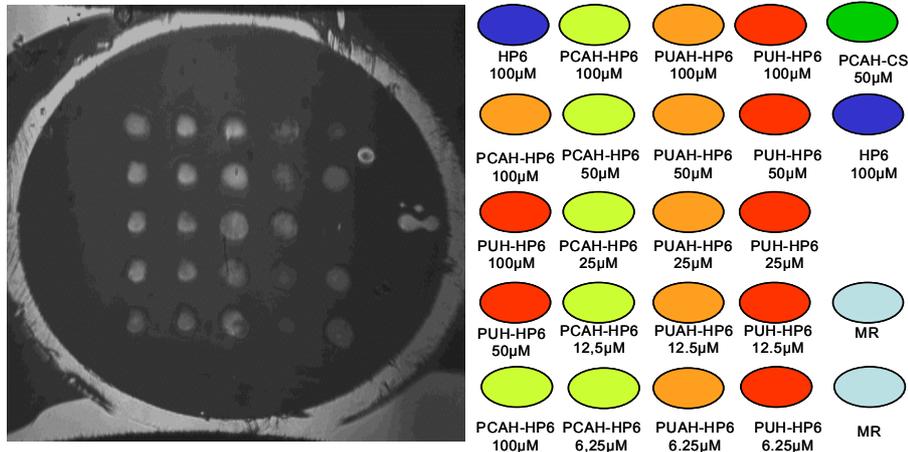


Figure 72 : gauche : image du prisme vue en imagerie SPR, lorsqu'il est en solution tampon de rinçage ; droite : schéma de disposition des plots sur la surface dorée du prisme.

Une fois le prisme placé dans l'appareil, les courbes de plasmons des différents plots sont tracées. Ces courbes de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence permettent dans un premier temps de déterminer l'angle pour l'expérience de reconnaissance biologique « sucre-SDF-1 α » (figure 73). Plus le plot est épais, plus la courbe sera décalée vers les incidences faibles. Sur cette figure, l'or est représenté en jaune.

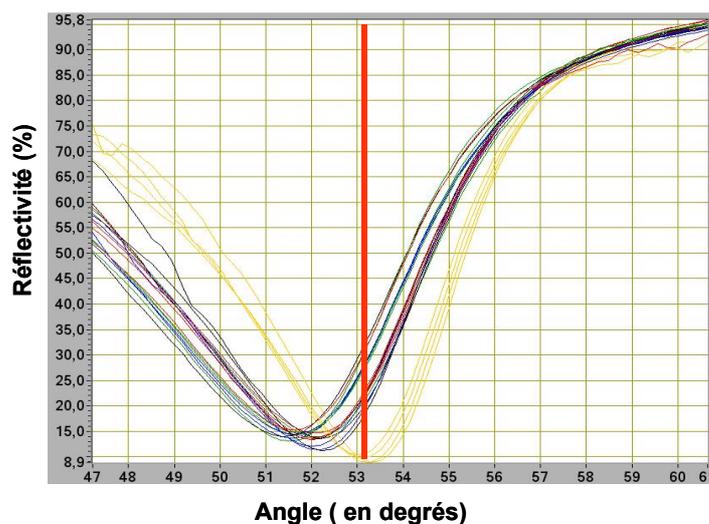


Figure 73 : plasmon en tampon de rinçage réalisé avant de lancer l'injection de protéine, afin de déterminer l'angle optimal pour la résonance plasmonique de surface.

D'après l'image de la matrice de la figure 72, on constate que les plots de polypyrrole seuls et les plots ppy + HP6 non modifiés sont homogènes, contrairement à ceux contenant des sucres greffés à un pyrrole. Afin de pouvoir analyser la fonctionnalité des sucres ainsi déposés, nous nous plaçons ensuite à incidence fixe pour mesurer les cinétiques de variation de la réflectivité en fonction du temps. Nous nous sommes placés vers 53° (droite rouge sur figure 73), pour être dans le flanc droit du pic d'absorption de la courbe de réflectivité.

Toutes les mesures ont été faites ici avec un débit de $50 \mu\text{L} / \text{min}$. Sur ce prisme, le protocole a été le suivant :

- Passage du tampon de rinçage, solution contenant 1% de BSA, servant de bloquant pour l'expérience.
- Mesure de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence (figure 73).
- Passage d'une solution contenant la protéine SDF-1 α diluée dans le tampon de rinçage, pendant 7 minutes.
- Retour en tampon de rinçage seul afin de mesurer la différence de niveau dans le même milieu avant et après l'interaction (rinçage pendant plus de 15 minutes).
- Passage d'une solution NaCl 1M dans le tampon de rinçage pour dissocier totalement les complexes protéine / oligosaccharide.
- Retour en tampon afin de mesurer la différence de niveau de réflectivité dans le même milieu avant et après le passage de sels.

La figure 74 nous confirme la validité de notre modèle d'étude, nous obtenons les mêmes résultats qu'avec la fluorescence. Les cinétiques obtenues nous donnent quelques indications sur la spécificité de l'interaction HP6 – SDF-1. Pour cette concentration d'injection de la protéine (200 nM), la différenciation entre les plots greffés HP6 et les plots témoins négatifs (PCAH-CS ou ppy seul) se fait sans problème : avant le rinçage, la variation de réflectivité due à la fixation de la protéine est beaucoup plus importante sur les plots HP6 greffés que sur les témoins négatifs (comme le plot CS). Par contre, durant le rinçage, la majorité des protéines fixées se dissocie, ce qui rend la différenciation entre les HP6 greffés et le CS plus difficile. Les plots réagissent de la même façon qu'en détection par fluorescence. La prise après rinçage est tout de même différenciable pour les plots HP6 greffés les plus denses ($100 \mu\text{M}$).

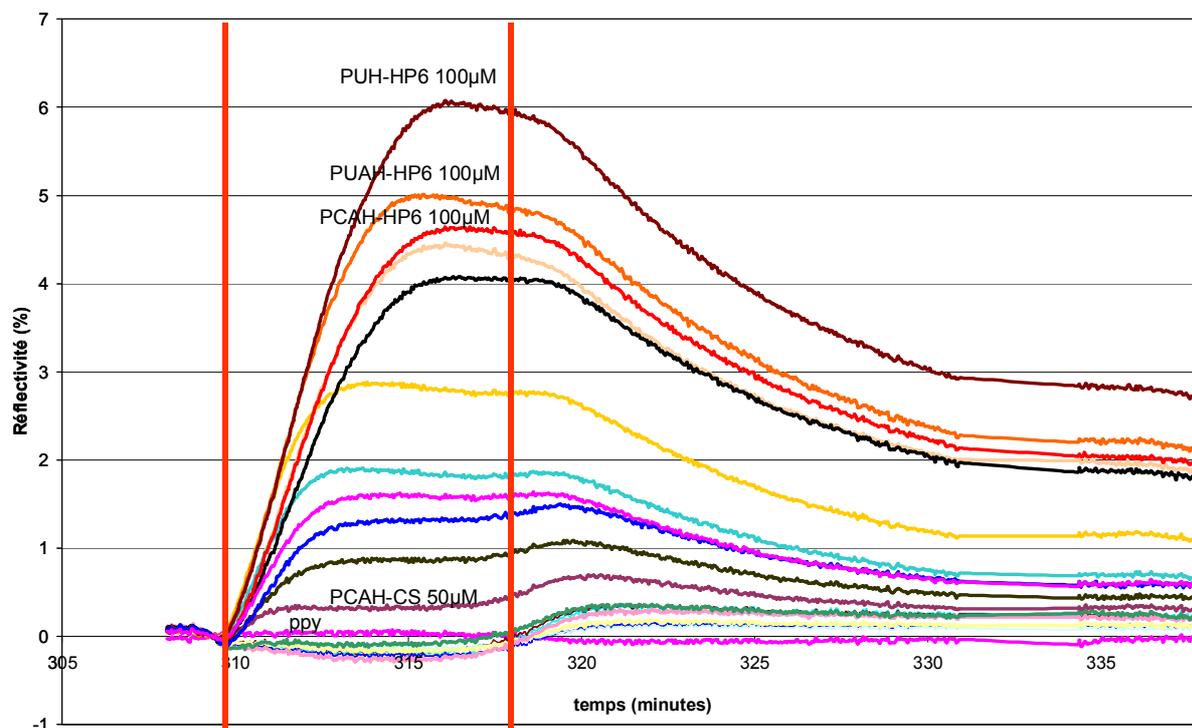


Figure 74 : courbes cinétiques brutes pour la concentration 200nM en protéine SDF (7 minutes), pourcentage de réflectivité en fonction du temps (secondes). Pour indication, les différentes injections sont matérialisées par deux barres verticales rouges : tampon / Protéine / tampon.

La fixation de protéines cibles est spécifique de l'interaction (au vu des plots témoins négatifs). Lors de cette injection, nous pouvons remarquer, tout comme en fluorescence, que plus les plots contiennent des oligosaccharides greffés, plus le signal dû à la reconnaissance biologique est fort. Mais cette technique nous permet d'aller plus loin ; grâce à l'acquisition en temps réel des interactions, les cinétiques d'association de complexe oligosaccharide – protéine peuvent être observées, ainsi que les cinétiques de dissociation ; de plus, il faut remarquer que la concentration en protéine SDF-1 est de 200 nM pour cette cinétique, concentration moindre qu'en fluorescence, cette diminution de consommation de protéine est un facteur non négligeable ; cette diminution de consommation de protéine pour obtenir un résultat équivalent à la détection en fluorescence s'explique par la présence du rinçage nécessaire pour la détection par fluorescence avant lecture sous microscope, ce rinçage engendrant sûrement un début de dissociation du complexe.

Parallèlement, une gamme de concentrations en sucre greffé a été étudiée pour déterminer la sensibilité de la reconnaissance en fonction de la densité du plot en sucre. Comme nous le montre l'histogramme des plots PUH-HP6 (figure 75), nous retrouvons l'augmentation de réflectivité en fonction de la concentration en sucre, comme nous pouvions

le suspecter. A titre indicatif, les plots PUAH-HP6 et PCAH-HP6 répondent de manière équivalente, il a donc été jugé inutile de les représenter.

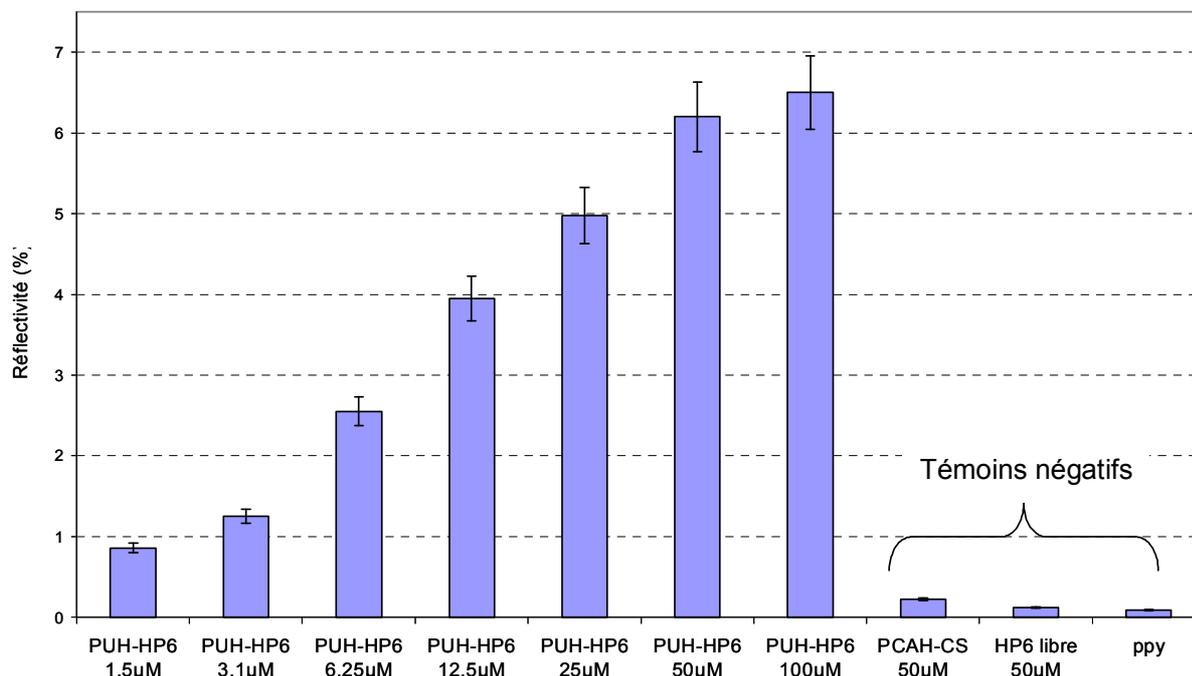


Figure 75 : Histogramme représentant les variations en réflectivité des plots PUAH-HP6 à différentes concentrations de greffage ainsi que trois témoins négatifs (PCAH-CS, HP6 libre et ppy) pour une injection de protéine SDF-1 à 200nM. Les valeurs ont été relevées sur les courbes en fin d'injection, juste avant le retour en tampon amorçant la dissociation du complexe.

Cette variation de réflectivité ne croît pas linéairement entre les plots 1.5 µM et 100µM ; une saturation apparaît à partir des plots 50 µM, ce qui suggère que les sites de reconnaissance des HP6 sur les plots deviennent de plus en plus inaccessibles. L'explication est simple : malgré le grand nombre de sites sur les plots concentrés, ils sont de plus en plus proches les uns des autres, et donc les protéines qui possèdent un certain volume spatial ne peuvent plus accéder à tous. Il faudra donc choisir de spotter des concentrations inférieures à 50 µM en sucre total pour que tous les sites disponibles restent accessibles.

La technique de l'imagerie SPR étant validée à son tour pour l'étude des interactions oligosaccharides – protéines par cette expérience préliminaire, nous allons maintenant nous intéresser à améliorer nos signaux en réflectivité.

3.2.3. Optimisation des tampons utilisés

La solution permettant de dissocier totalement le complexe sucre / protéine, composée de 1M de NaCl dans du tampon de rinçage, telle qu'elle a été utilisée durant les expériences, a un inconvénient : lors du retour en tampon suivant l'injection de la solution saline, la stabilisation de la ligne de base prend plus de trente minutes, ce qui représente une durée plus importante que celle de l'interaction en elle-même. Dans la figure suivante (figure 76), nous avons repris les cinétiques de la figure 74 suivies d'une injection de NaCl 1M et retour en tampon, afin d'illustrer ce phénomène.

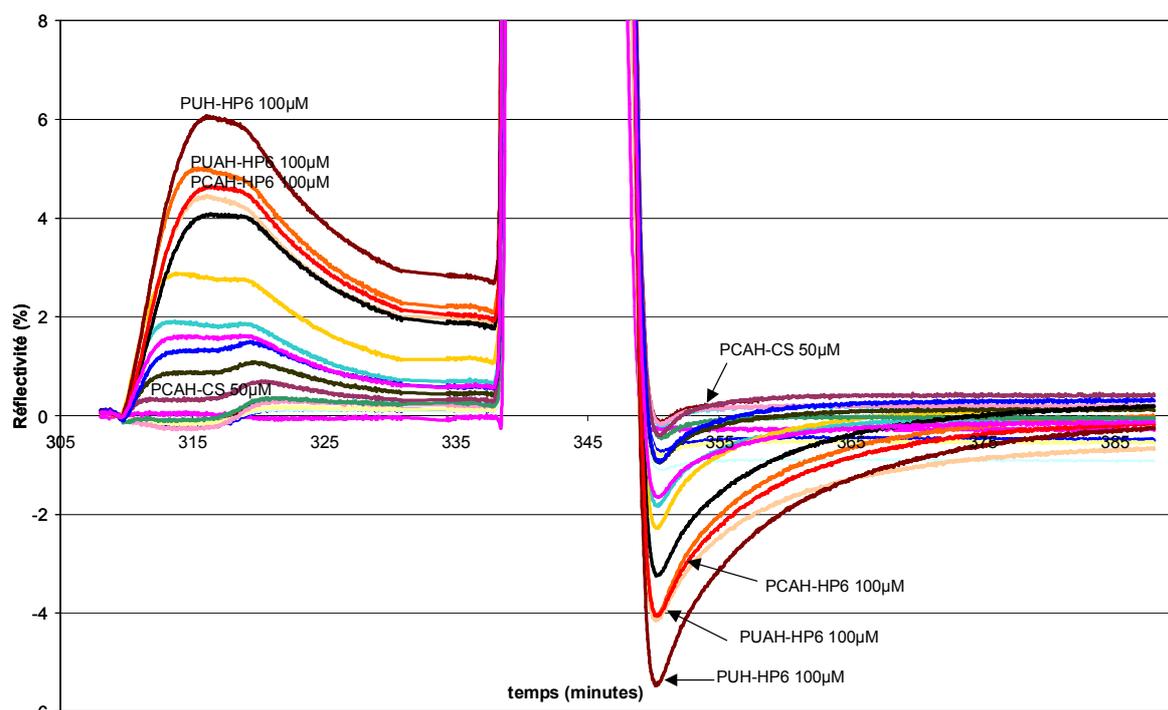


Figure 76 : Courbes de variation de réflectivité en fonction du temps correspondant à la fixation de la chimiokine SDF-1 (200nM) sur les plots HP6 suivie d'une injection de solution de régénération et d'un retour en tampon . Cette figure reprend et prolonge les cinétiques de la figure 74.

Alors que les plots de HP6 greffés ont leurs courbes qui chutent lors du retour en tampon après l'injection de sels, le plot témoin négatif PCAH-CS retrouve quasiment instantanément une ligne de base stable, il en est de même pour les plots ppy seuls (présents sur la figure 76 mais non désignés). De plus, nous pouvons constater que plus les plots sont denses en HP6 greffés, plus le signal diminue fortement avant de revenir vers une ligne de base stable.

Pour remédier à ce problème, des essais ont été réalisés sur un nouveau prisme fonctionnalisé. Nous avons directement réalisé une injection de sels, après avoir fait circuler simplement du tampon de rinçage dans la cellule ; ce prisme n'a jamais été en contact avec la

protéine SDF-1 et pourtant nous observons le même phénomène que celui observé sur la figure 76 (données non représentées). Nos soupçons se sont alors portés sur un constituant présent dans la solution de tampon de rinçage, qui pourrait interagir avec HP6 : la BSA (*bovine serum albumin*). Dans cette hypothèse, la solution de NaCl évacuerait la BSA des plots de HP6 et la « dérive » qui s'en suit serait due à nouveau au blocage de ces plots par la BSA présente dans le tampon tout le long de l'expérience. Pour vérifier cette supposition, plusieurs cycles d'injection de protéine SDF-1 suivis d'injections de sels ont été faits, mais cette fois-ci, avec un tampon de rinçage **sans BSA**.

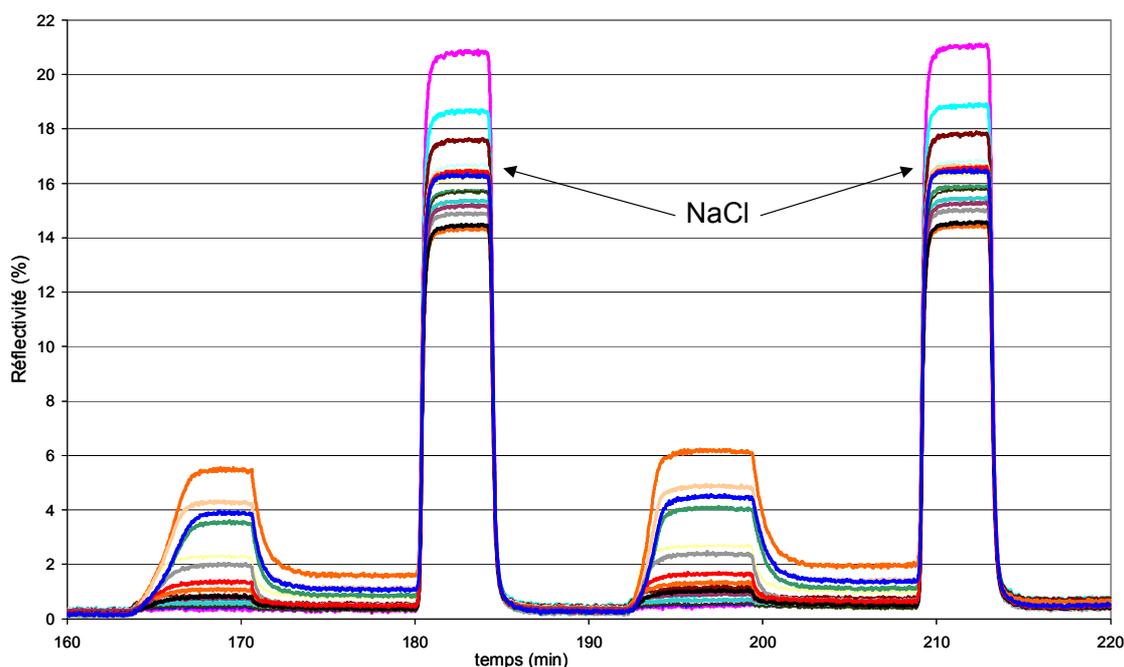


Figure 77 : Courbes de variation de réflectivité en fonction du temps correspondant à la fixation de la protéine SDF-1 sur des plots de HP6 (association puis dissociation) suivie d'une injection de NaCl 1M pour régénérer la surface et d'un retour en tampon. Ce même protocole est répété entre t = 160 et t = 185 min et entre t = 185 et t = 220 min. Le tampon utilisé tout au long de cette cinétique ne contient pas de BSA.

L'hypothèse d'une interaction entre le bloquant (la BSA) et l'héparine s'est donc révélée être la bonne. En effet, sur la figure 77, pour tous les plots, le retour en solution tampon de rinçage, après injection de la solution salée durant 5 minutes, conduit immédiatement à un niveau de réflectivité stable et équivalent au niveau de réflectivité initial avant l'interaction d'intérêt. Ce nouveau protocole d'interaction va maintenant nous permettre d'utiliser nos puces à sucre de manière plus efficace.

Il est tout de même indispensable de bloquer notre surface fonctionnalisée avant interaction avec des protéines d'intérêt, car si celle-ci n'est pas bloquée, les protéines s'adsorbent de manière non spécifique sur l'or et aussi sur les plots de ppy modifiés ou non. Il a donc été décidé de bloquer la surface en début d'expérience, en injectant à deux reprises 1% de BSA suivie d'une injection de solution saline, comme l'illustre la figure 78.

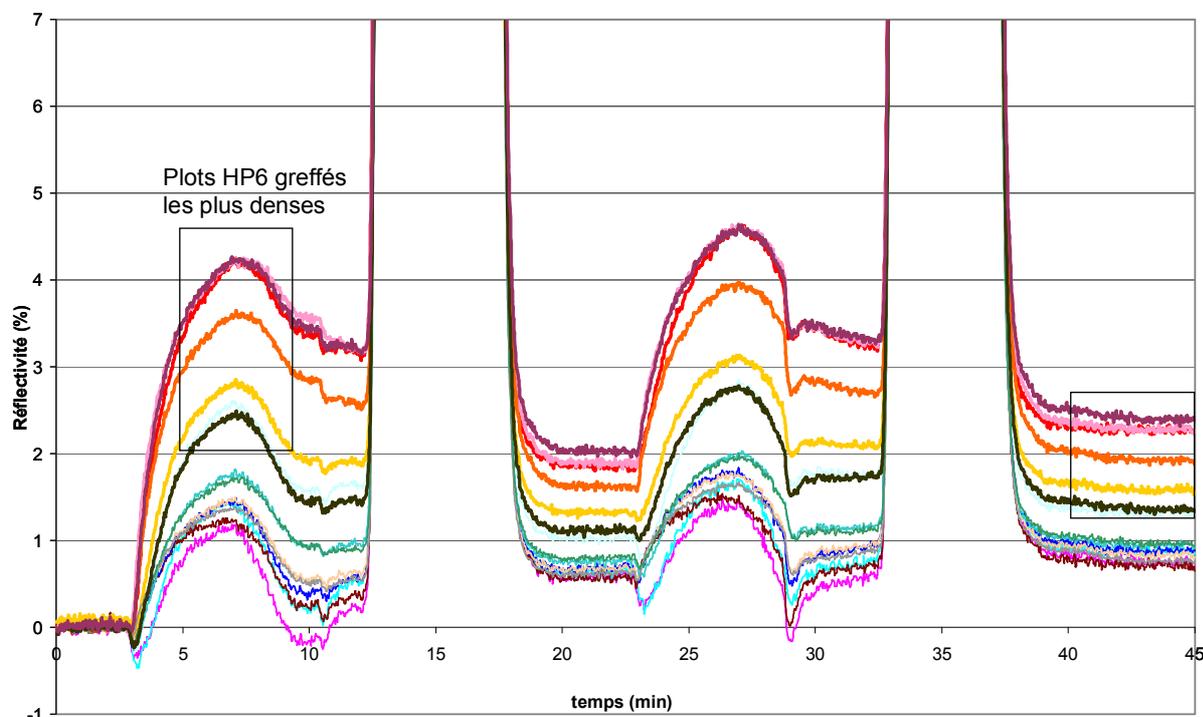


Figure 78 : Courbes de variation de réflectivité en fonction du temps correspondant à l'injection de 1% BSA sur les plots : HP6 greffés à différentes concentrations, témoins négatifs suivie d'une injection de NaCl 1M pour régénérer la surface et d'un retour en tampon. Ce même protocole est répété entre $t = 0$ et $t = 20$ min et entre $t = 20$ et $t = 45$ min. Le tampon utilisé tout au long de cette cinétique ne contient pas de BSA.

Les deux injections de BSA permettent de bloquer la surface de manière irréversible pour tout le reste de l'expérience. En moyenne, après cette phase de blocage, la variation de réflectivité est de + 1%, sauf pour les plots (encadrés sur la figure 78) de HP6 greffés aux plus hautes concentrations, dont la variation augmente entre 1,5 et 2,5 %. Ceci est sûrement dû à cette "affinité" déjà révélée entre cet oligosaccharide et la BSA. Après ce blocage, il n'apparaît plus au cours de l'expérience de nouvelle hausse de réflectivité due à une adsorption non spécifique. Après injection de sels, tous les plots retrouvent leur ligne de base.

Le fait d'avoir optimisé les solutions tampon nous permet d'obtenir de meilleurs signaux en SPRi et un gain de temps. Mais d'autres paramètres entrent en jeu dans

l'observation des cinétiques d'interactions oligosaccharide – protéine ; avant de nous y atteler, nous allons discuter du phénomène de régénération.

3.2.4. Régénération et Stabilité

Plusieurs injections successives de protéines peuvent être réalisées sur un même prisme grâce à un protocole de régénération de la surface ; celui-ci, basé sur le protocole utilisé en Biacore (*cf.* partie expérimentale), dissocie le complexe oligosaccharide – protéine. Ce protocole de régénération, consistant à injecter dans la cellule du NaCl 1M dilué dans le tampon de rinçage, nous permet d'utiliser les prismes fonctionnalisés, plusieurs fois de suite pour la mesure d'interactions. Signalons que cette régénération ne modifie pas les oligosaccharides immobilisés sur la surface. Les plots peuvent subir jusqu'à une quinzaine de régénérations par expérience ; seulement, après la première régénération suivant la première injection de protéines, les plots de HP6 greffés présentent une perte en reconnaissance, évaluée à 8% du signal total (pour la même quantité de protéine injectée). Ces deux cycles d'injection passés, plus aucune diminution d'activité liée à la régénération n'est observée. Les signaux de cinétique enregistrés en SPRi sont donc reproductibles et comparables.

En plus de cette **reproductibilité intra-expérience**, ces puces ont la capacité d'être stables dans le temps : elles peuvent être lavées en fin de manipulation par H₂O, d'être **séchées et stockées à sec jusqu'à 6 mois à 4°C**, sans grande perte d'activité, celle-ci est évaluée à 4%.

Ce procédé de régénération douce associée à notre chimie de couplage covalent nous permettent d'obtenir des puces reproductibles intra-expériences mais aussi inter-expériences. Néanmoins, d'autres paramètres se révèlent aussi importants lors de nos études de cinétiques d'interactions oligosaccharide / protéine ; pour cela, nous allons nous intéresser au rôle joué par le système fluide.

3.2.5. Optimisation de la fluidique

Le modèle est à présent validé, les cinétiques d'association et de dissociation sont observables et des paramètres importants que sont la régénération de nos plots et la reproductibilité intra-expérience et inter-expériences ont été démontrées. Malgré ces paramètres, il nous reste encore à éclaircir certains phénomènes observés lors des premières expériences. Dans ce paragraphe, nous allons donc discuter de l'influence du débit

sur l'observation des cinétiques, mais aussi celle de la forme de la cuve sans oublier l'optimisation de l'utilisation de la boucle d'injection.

a) Influence du débit et de la forme de la cuve

Après quelques expériences de cinétique utilisant le tampon sans BSA et la régénération de la surface (à débit constant de 60 $\mu\text{L}/\text{min}$), nous nous sommes rendu compte que certains défauts apparaissaient. Jusqu'à présent, nos conditions expérimentales étaient basées sur les protocoles utilisés par l'équipe de l'IBS pour une manipulation Biacore. Notre système étant différent, par le fait de l'utilisation d'une cellule unique d'interactions et non de 4 canaux différents, nous avons rencontré certains problèmes d'écoulements inhomogènes.

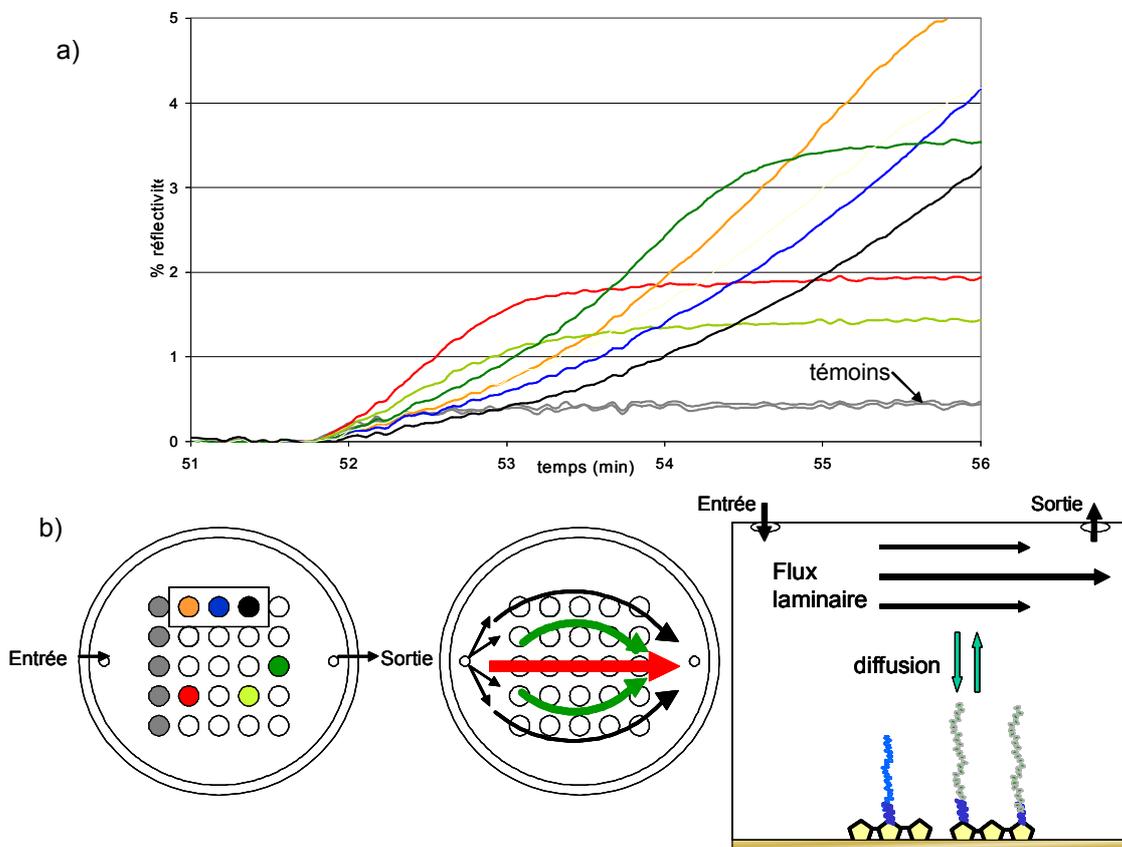


Figure 79 : a) Exemples de problèmes rencontrés lors d'une injection de protéine SDF-1 à 200 nM ; b) configuration de la matrice de plots dans la cellule d'interactions avec la ligne de plots gris correspondant aux témoins négatifs, avec direction de la circulation du flux et existence de phénomène de diffusion.

Comme le montre la figure 79a, l'injection de SDF-1 à 200 nM ne donne pas des allures de cinétiques d'association comparables entre elles : il semble y avoir un défaut dans l'écoulement du flux dans la cellule, tous les plots ne commencent pas à reconnaître la protéine en même temps. Le plot orange (figure 79b) est le premier plot à « voir » la protéine

par rapport au plot bleu et au noir, ce qui est confirmé par l'allure des courbes cinétiques. La circulation du flux n'est donc pas parfaite, il existe un temps de retard de prise en variation de réflectivité pour les plots les plus denses en HP6 greffés (plots orange, bleu et noir de la figure 79a) ; d'autre part, le plot rouge qui est moins dense en sucre, au vu de sa prise finale démarre en premier sa cinétique d'association, de même pour les deux plots verts (situés plus loin de l'entrée de la cellule). Ce défaut observé nous confirme la circulation en arc de cercle dans la cuve entre l'entrée et la sortie (flèches figure 78b), avec un effet de gradient de concentration ayant des difficultés à s'homogénéiser rapidement. Ainsi, le plot rouge a presque saturé tous ses sites avec la SDF-1 en circulation alors que les plots orange, bleu et noir n'en sont qu'au commencement de la phase d'association.

Il est impératif de trouver une solution afin d'obtenir des allures comparables entre les plots ; ceux-ci formant les mêmes complexes, devraient donner les mêmes allures de cinétique, seule la hauteur en réflectivité doit varier en fonction de la densité du plot.

Pour trouver une solution à ce problème, nous effectuons une expérience contrôle : une matrice comportant des plots tous identiques, sauf une ligne de témoins négatifs. L'expérience consiste à faire varier le débit de circulation dans la cellule pour observer les éventuels défauts de l'écoulement. La figure 80 illustre les cinétiques obtenues à différents débits en fonction des lignes de plots étudiées.

Le phénomène d'écoulement inhomogène est le plus visible lors de la première injection de protéine à un débit de 35 $\mu\text{L}/\text{min}$ (débit assez faible). On constate que plus les plots sont éloignés de la direction linéaire centrale (entre l'entrée et la sortie), moins leur variation de réflectivité est importante, tous ces plots étant par ailleurs tous identiques. La 3^e ligne, (au milieu de la cellule, figure 80) affiche une prise en réflectivité de l'ordre de 6 %, les 2^e et 4^e lignes avoisinent aussi le 6 % alors que les lignes extérieures (1^e et 5^e lignes) ne dépassent pas 4 %. Le débit de 35 $\mu\text{L}/\text{min}$ ne permet pas de renouveler assez rapidement le liquide dans la cellule, les plots d'une même ligne n'ont pas la même variation en réflectivité, un phénomène d'épuisement progressif de la solution de protéine au passage des plots HP6 greffés est également visible. Ainsi quand les plots rouges arrivent presque à saturation (plateau de réflectivité), les plots suivants sont encore loin de cet effet. Il apparaît donc des cinétiques d'association différentes, alors que nous sommes censés observer le même phénomène sur tous les plots.

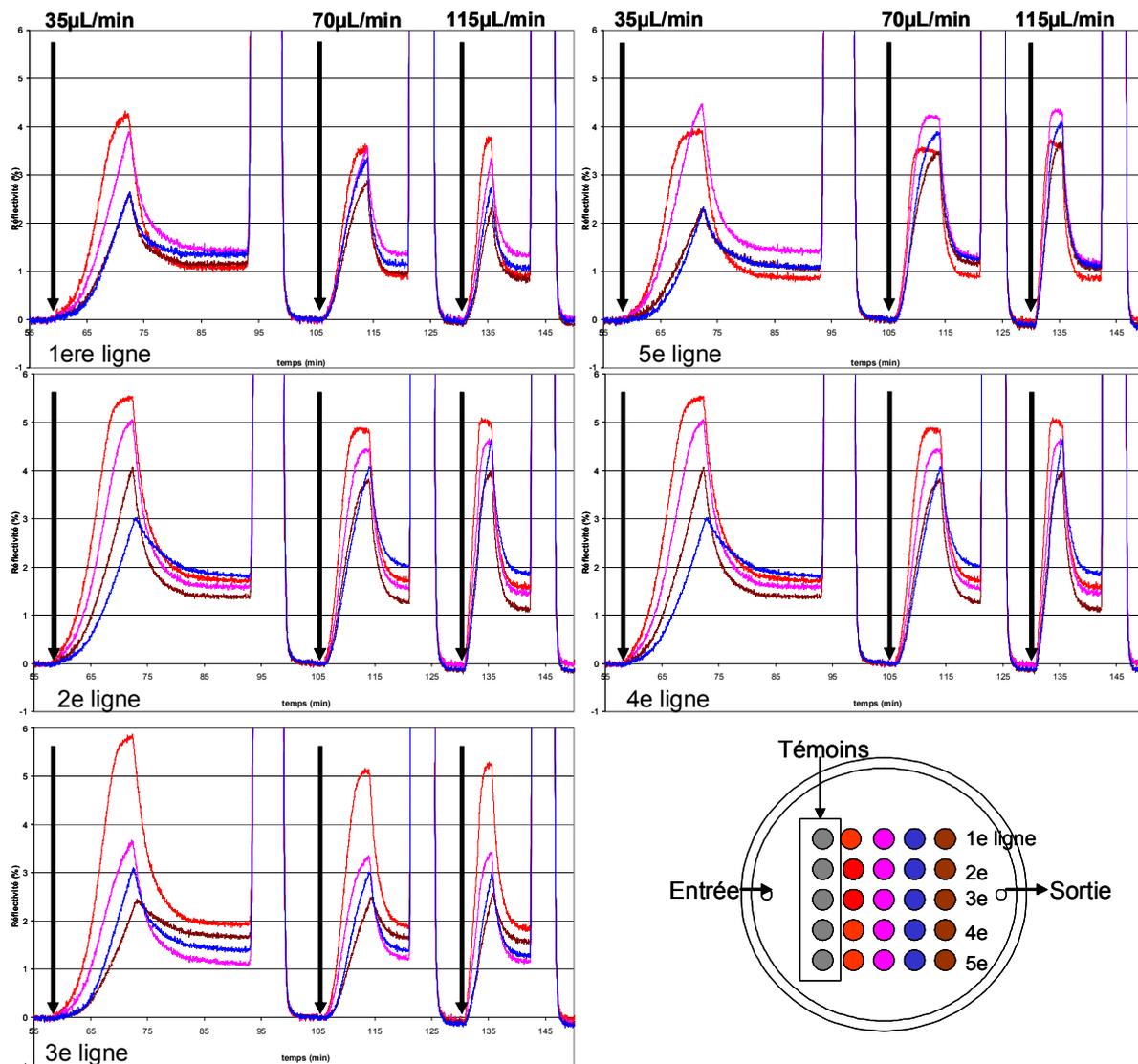


Figure 80 : Courbes de variation de réflectivité en fonction du temps correspondant à la fixation de la protéine SDF-1 200nM sur des plots de HP6 25µM (association puis dissociation) suivie d'une injection de NaCl 1M pour régénérer la surface et d'un retour en tampon à différents débits : 35, 70 et 115µL/min. Les lignes de plots étudiés ainsi que leurs couleurs sont répertoriées dans la légende en bas à droite. Les témoins négatifs sont en première colonne.

En augmentant le débit (70 et 115 µL/min), le départ des cinétiques est plus homogène et l'effet d'épuisement s'estompe. Ainsi, d'après cette expérience, nous décidons de définir un débit de 70 µL/min, qui est le meilleur compromis, il permet une bonne reconnaissance biologique dynamique entre les oligosaccharides et la protéine, tout en évitant un mauvais écoulement dans cette cellule ronde.

Une autre étude a été faite, afin de confirmer ces résultats ; pour cela, une matrice avec des plots décalés les uns par rapport aux autres a été réalisée. Elle montre que l'écoulement est toujours inhomogène aux faibles débits, mais les cinétiques sont améliorées de par cette disposition.

N'étant pas entièrement satisfait de cette cellule d'interactions, il a été décidé d'en construire une deuxième possédant une autre géométrie : une cuve hexagonale (cf. II. 3.2.1.b.3. figure 70). Une nouvelle étude a été réalisée afin de comparer l'écoulement du fluide dans ces cuves. L'expérience a été effectuée en injectant, sur la même puce que celle présentée figure 80, successivement H₂O / tampon de rinçage / H₂O. Le débit choisi est de 70 μ L/min. D'après la figure 81, on constate que l'homogénéisation de la surface est plus lente dans la cuve ronde que dans la cuve hexagonale. De plus, les courbes de réflectivité de la cuve ronde sont moins homogènes. Cette comparaison nous confirme qu'il paraît préférable d'utiliser la cuve hexagonale que la cuve ronde, car il y a un meilleur écoulement du flux, une meilleure homogénéisation dans la cuve.

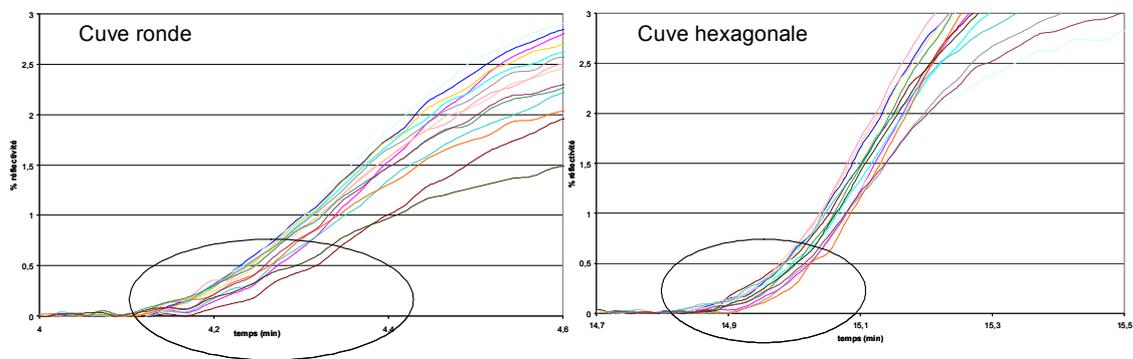


Figure 81 : Courbes en variation de réflectivité en fonction du temps correspondant à l'injection de tampon de rinçage dans une cuve où circule H₂O; les zooms sont faits sur les débuts d'injection à gauche pour la cuve ronde et à droite pour la cuve hexagonale.

Cette étude nous a permis de déterminer des paramètres de fluidique essentiels afin de travailler dans les meilleures conditions possibles : choix d'une cuve hexagonale et celui d'un débit assez rapide de 70 μ L/min. il nous reste maintenant un dernier paramètre à optimiser : la boucle d'injection.

b) Rôle de la boucle d'injection

Après les premières expériences de cinétiques avec HP6 et la protéine SDF-1, nous avons constaté que nos courbes SPR obtenues n'avaient pas de ruptures de pente franches entre les différentes solutions injectées ; notamment, à la fin des injections de protéines dans le tampon, le retour total en tampon est très lent, il semblerait que la partie du tampon qui pousse le contenu de la boucle vers la cuve se mélange avec la fin de la solution en protéines.

Afin d'optimiser cette phase de la cinétique d'interactions, nous avons travaillé sur les effets de la boucle. Pour cela, l'étude a été faite sur un prisme doré sans matrice de plots, les solutions utilisées sont H₂O / tampon Phosphate (PBS) / H₂O (réalisation d'injection de tampon dans l'eau), le tout à un débit de 70 µL/min. Comme nous le montre la figure 82a, il apparaît un phénomène de mélange des solutions tampon injecté / retour en tampon, observé sur la partie (a) du graphe. Une solution a été testée (cas b) de la figure 82): ne pas attendre que la boucle ne se vide totalement, mais la fermer manuellement avant la partie où apparaît le mélange dû à la pression de poussée. Ainsi, on constate que le retour en tampon [partie (b)] du graphe est nettement plus rapide 0,81 minutes au lieu de 3,25 minutes en retour en tampon sans fermeture. Il est donc préférable d'opter pour la fermeture manuelle de la boucle d'injection afin de limiter l'effet de mélange.

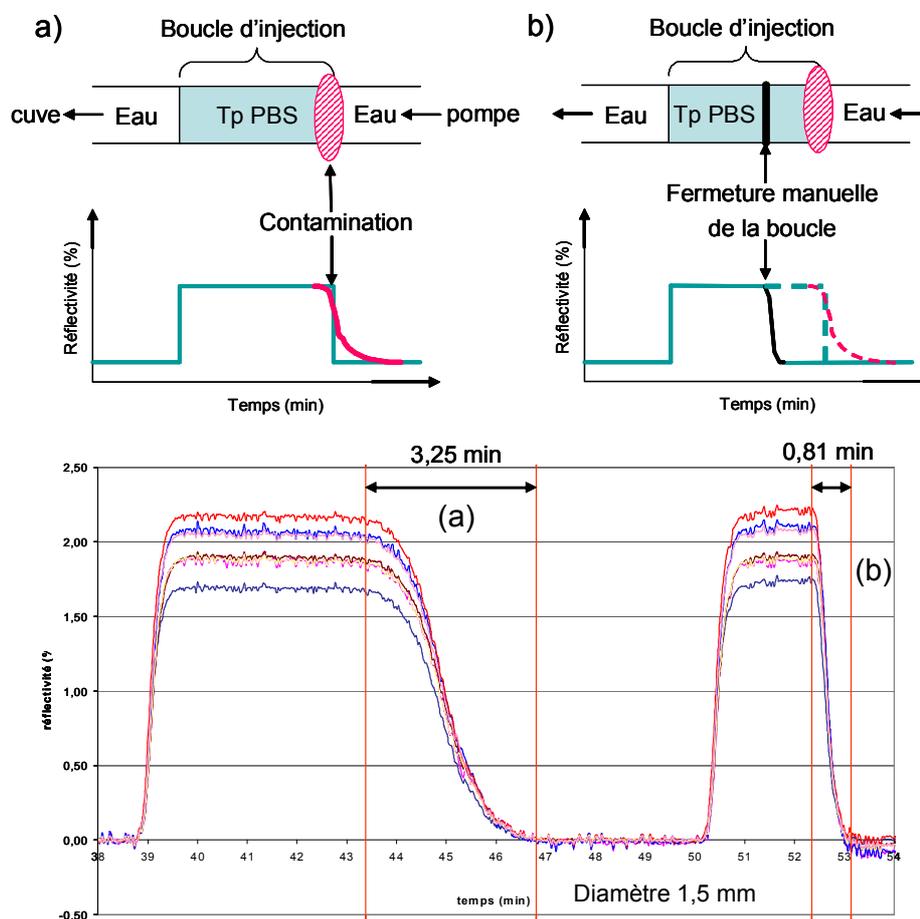


Figure 82 : Cas rencontrés lors de l'étude de la boucle d'injection : a), lorsque la pompe pousse en continu le contenu de la boucle vers la cuve, les courbes obtenues en variation de réflectivité en fonction du temps sont la partie (a) ; b) quand la boucle d'injection est fermée manuellement avant la fin de l'injection, la contamination disparaît, ce qui est représenté par la partie (b) du graphe.

D'autre part, deux diamètres de boucle d'injection ont été testés : la boucle contient toujours 500 µL mais les diamètres sont de 1,5 mm (figure 82) et de 0,8 mm (graphe non

représenté). Il apparaît qu'en réduisant le diamètre de la boucle, la pente du retour en tampon est plus raide, le temps est plus court 1,65 minutes au lieu de 3,25 min, il y a donc moins de contamination en fin de boucle.

Grâce à cette étude, nous décidons de choisir une boucle d'injection de diamètre 0,8 mm et d'un volume total de 500 μ L et la fermeture manuelle de la boucle juste avant la fin de l'injection est décidée afin de limiter le phénomène de contamination inter-solutions.

4. Caractéristiques analytiques

Nous avons vu jusqu'à présent les différentes étapes de la conception de la puce à sucres : la construction de molécules « sucres sondes », les dépôts de manière covalente sur une surface de verre recouverte d'or, les caractérisations structurales et la validation du modèle en fluorescence. Les premières études en SPRi ont été présentées, elles nécessitaient des améliorations qui lui ont été apportées. Nous avons donc optimisé les différents paramètres clés afin d'obtenir des cinétiques exploitables. Dans ce paragraphe, nous allons donc nous intéresser aux réponses dynamiques obtenues par SPRi et nous verrons l'influence des paramètres biologiques sur les cinétiques.

4.1. Sensibilité de l'interaction oligosaccharide HP6 - protéine SDF-1

Grâce à la détection en fluorescence, nous avons précédemment optimisé les concentrations en sucre total à spotter (*cf.* II.3.1.3). Nous cherchons à présent à connaître la sensibilité de la reconnaissance biologique. Pour cela, nous avons souhaité réaliser des expériences de cinétique au travers d'une gamme assez large de concentrations en SDF-1.

Nous avons donc travaillé avec des puces possédant HP6 relié aux trois bras espaceurs PUH, PCAH et PUAH. Ces « familles » ont été spottées dans une gamme de concentration allant de 1.5 μ M à 100 μ M en sucre total. Lors de ces expériences, les puces contenaient toutes les témoins négatifs, indispensables à la validation de la spécificité de l'interaction étudiée.

La figure 83 nous permet de visualiser plusieurs cinétiques ayant lieu lors d'une même expérience de sensibilité de la reconnaissance biologique. Sur cette figure, sont représentés 12 plots : 3 plots témoins négatifs et 9 plots ayant HP6 greffés par PUH, PCAH ou PUAH, à trois concentrations différentes (6.25, 12.5 et 25 μM). Les injections successives de SDF-1 (62.5 nM, 125 nM, 250 nM et 500 nM) nous indiquent que plus la concentration en protéine augmente, meilleure est la reconnaissance biologique. D'ailleurs, à partir de 250 nM de protéine SDF-1 injectée, les plots arrivent à saturation de reconnaissance. Parallèlement, plus la densité en HP6 greffé est élevée, plus leurs variations en réflectivité sont élevées. Nous remarquons aussi que le phénomène de régénération est quasi parfait, après chaque injection.

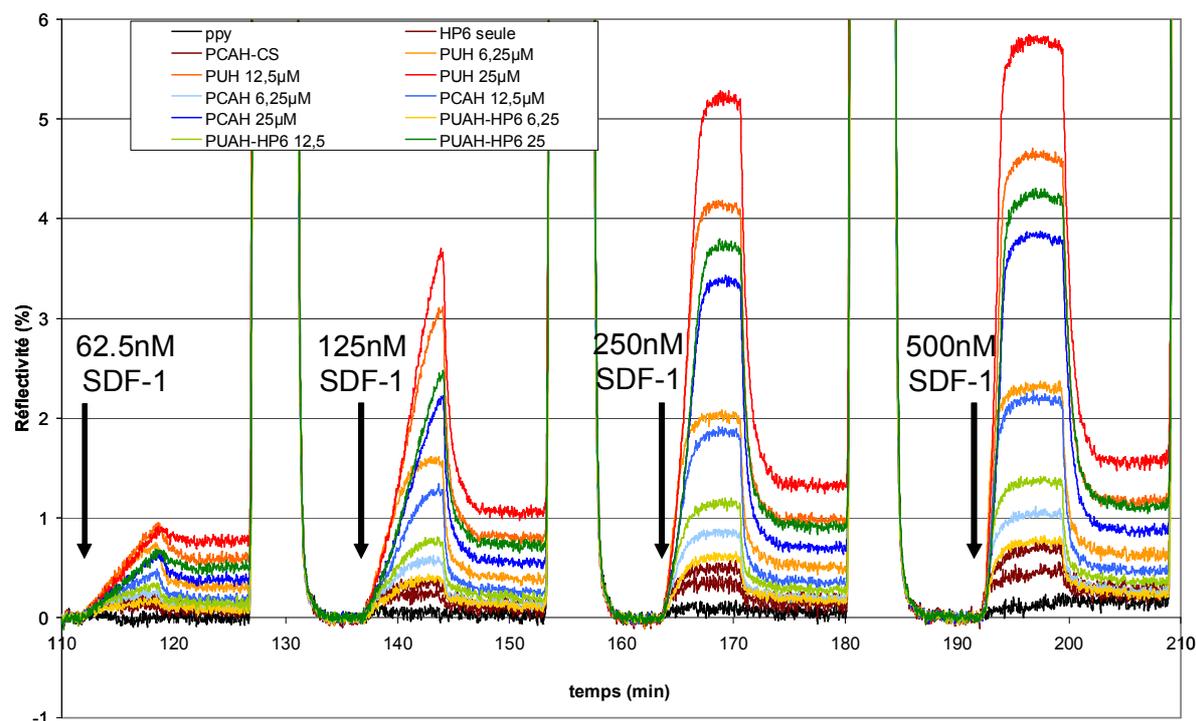


Figure 83 : courbes de variations de réflectivité en fonction du temps, représentant quatre injections successives de SDF-1 : 62.5 nM, 125 nM ; 250 nM et 500 nM ; toutes ces injections sont suivies du retour en tampon permettant la dissociation et d'une régénération. Les plots étudiés sont PUH-HP6, PUAH-HP6 et PCAH-HP6 aux concentrations de greffage 6.25, 12.5 et 25 μM en sucre total et trois témoins négatifs sont présentés : ppy, PCAH-CS 50 μM et HP6 libre 50 μM .

Par ces différentes études en fonction de la concentration en protéine injectée, nous avons pu construire des courbes de sensibilité en fonction de la concentration en sucre total. La figure 84 illustre ces travaux effectués pour les plots PUH - HP6 (les allures sont identiques pour PCAH-HP6 et PUAH-HP6). Ainsi, nous pouvons voir qu'à partir d'une concentration en SDF-1 d'environ 50 nM, nous obtenons des signaux de réflectivité totalement spécifiques et proportionnels à la densité de sucres sur le plot. D'autre part, à partir de 150 nM, nous voyons apparaître un plateau sur les différentes courbes, ce qui s'explique

par une saturation en protéines des plots, tous les sites disponibles des sucres sont occupés par la protéine. De plus, il faut noter que les variations de réflectivité croissent de manière proportionnelle entre 6.25 μM et 12.5 μM en sucre, alors qu'à partir de 25 μM , cet effet s'estompe : les plots de 50 et 100 μM sont trop concentrés, ils possèdent huit fois plus de sites de reconnaissance, mais ce n'est pas pour autant que la réflectivité est multipliée par huit. Nous comprenons que passée la concentration de 25 μM en sucre, le nombre de sites augmente, mais leur disponibilité spatiale se réduit fortement. Ces résultats confirment ceux obtenus par détection en fluorescence (cf. II.3.1.3.). Ainsi un compromis doit être choisi pour avoir un nombre suffisant de sites afin d'obtenir un signal en réflectivité correct, tout en laissant accessibles les sites pour que la protéine puisse venir se complexer. Il apparaît donc inutile de spotter HP6 à des concentrations supérieures à 25 μM , ni d'injecter des concentrations en protéine supérieures à 200nM.

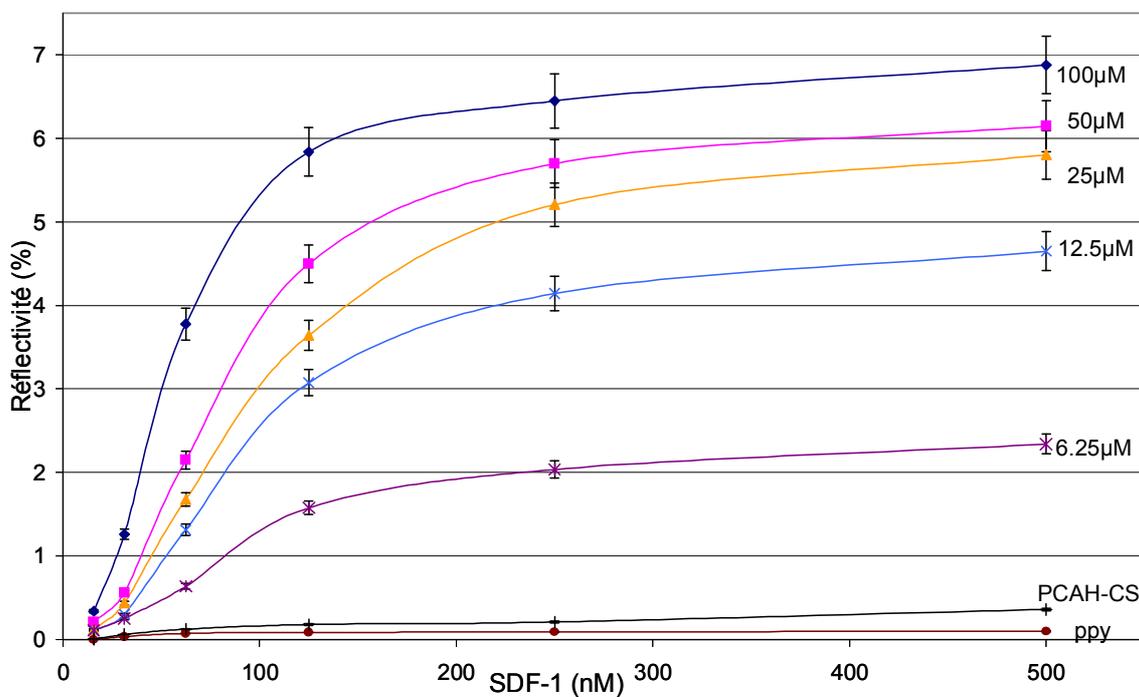


Figure 84 : Courbes de variations de réflectivité des plots PUH-HP6 à différentes concentrations, en fonction de la concentration de protéine SDF-1 injectée. Deux témoins sont répertoriés afin de valider la spécificité de la reconnaissance.

Ces travaux sur la gamme de concentrations en protéine nous ont permis de connaître le seuil de reconnaissance entre HP6 et SDF-1 : ~ 50 nM quel que soit le plot considéré. Ils nous ont permis aussi de connaître le rôle déterminant du nombre de sites de reconnaissance lié à la concentration en sucre.

4.2. Etude de la dissociation du complexe HP6 / SDF-1

Après avoir compris l'effet que pouvait avoir un plot trop concentré en sucre, nous nous sommes intéressés à la dissociation du complexe, lors du retour en tampon après injection. Rappelons que le rinçage de la cuve par du tampon après injection de protéines permet premièrement de « décrocher » le surplus de protéines, s'étant fixées par adsorption non spécifique sur le polymère comme sur le sucre et deuxièmement d'observer la dissociation du complexe sucre – protéine.

Lors des expériences réalisées, des cinétiques de dissociation assez différentes ont pu être observées; il s'est avéré que pour un plot concentré en sucres ($> 25 \mu\text{M}$), sa courbe en variation de réflectivité ne décroissait pas forcément lors du retour en tampon, après injections d'au moins 200 nM de SDF-1, comme le montre la figure 85a.

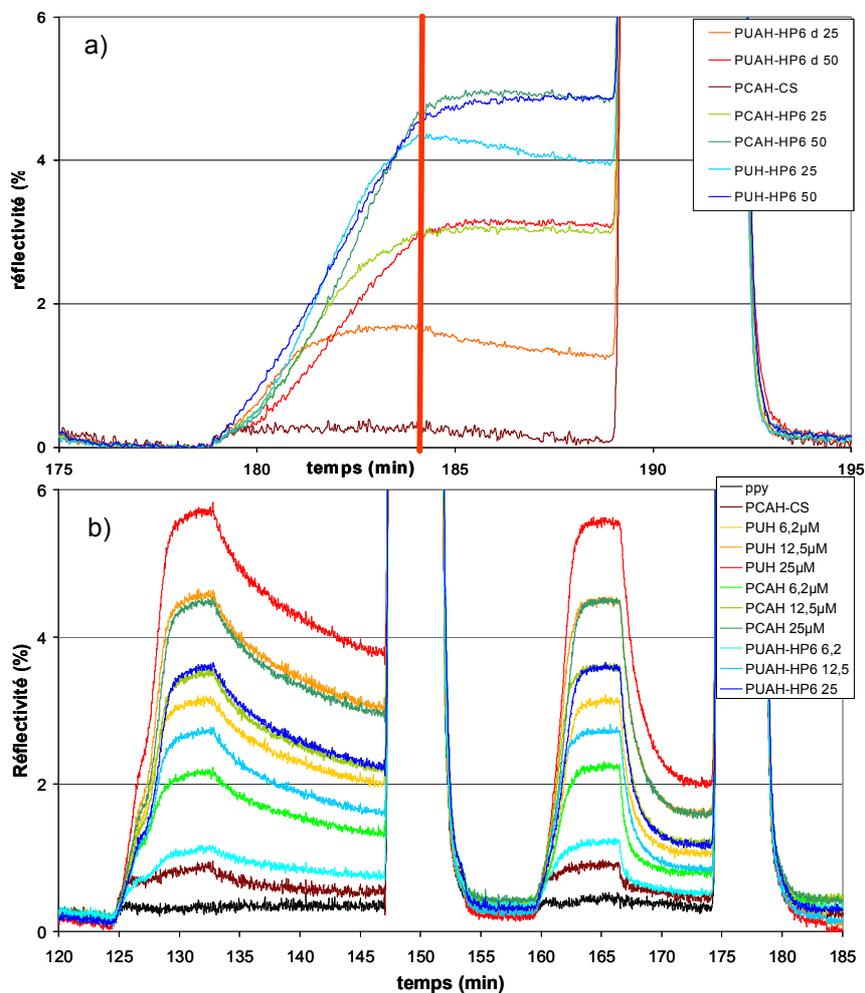


Figure 85 : Courbes de variation de réflectivité en fonction du temps, les trois injections représentées sont 250 nM de protéine SDF-1 ; a) les plots sont fortement en sucres 25 et 50 μM , après injection de protéines, il y a un retour en tampon suivi d'une régénération ; b) sur ces courbes, les plots possèdent entre 6.1 et 25 μM , la première injection est suivie d'un retour en tampon, la deuxième est suivie par une injection de 1 μM HP6 libre pour créer une compétition.

Toutes les courbes des plots à 50 μM , lors du retour en tampon, stagnent ou même continuent à croître. Si l'on observe les courbes des plots moins concentrés (figure 85a ou 85b-1ere injection), le retour en tampon permet une dissociation peu accentuée et assez lente. Après réflexion, une hypothèse a été proposée afin d'expliquer la stagnation des courbes : lors du retour en tampon, les protéines se dissocient normalement, mais étant donné la forte densité des sites proches les uns des autres, ces protéines dissociées viennent se re-complexer instantanément sur le site voisin. Si la concentration en sites de reconnaissance diminue sur le plot, ces recomplexations deviennent moins probables, d'où l'observation de la dissociation véritable du complexe.

Souhaitant s'affranchir définitivement de ce problème de recomplexations sur le plot lors du retour en tampon, il a été proposé se réaliser une dissociation en compétition : elle consiste à injecter du sucre libre dilué (1 μM) dans le tampon de rinçage, ainsi lorsque la protéine se dissocie du site du sucre greffé, elle est directement re-complexée mais avec un sucre en solution. Par cette méthode, la dissociation est plus franche (2° injection figure 85b), rapide et reproductible quelle que soit la concentration du plot ou de la protéine injectée.

Nous avons donc analysé et amélioré tous les paramètres physiques et biologiques, nous allons pouvoir maintenant nous intéresser à la comparaison des bras espaceurs.

4.3. Comparaison des bras espaceurs utilisés grâce à deux oligosaccharides HP6 et dp12

L'objectif de ce paragraphe est de comparer le rôle des bras espaceurs utilisés jusqu'à présent. En l'état actuel de nos travaux, nous n'avons pas pu conclure sur le choix définitif de l'utilisation d'un seul « pyrrole - bras espaceur ».

Afin de déterminer plus exactement le rôle de ces molécules dans la reconnaissance biologique étudiée, nous avons réalisé de nombreuses puces sur lesquelles ont été spottés deux oligosaccharides « positifs » (possédant la même propriété de reconnaissance), *via* les différents bras espaceurs. Ces sucres sont donc HP6 (déjà utilisé dans les expériences précédentes) et l'oligosaccharide dp12, celui-ci, issu de la digestion enzymatique de HP6, a une longueur moitié moindre que celle de HP6. Ainsi, HP6 comporte sur toute sa longueur deux sites de reconnaissance de la protéine SDF-1 et dp12 n'en possède qu'un seul. Ces expériences ont été réalisées grâce à de multiples injections de SDF-1 à 200 nM, suivies de dissociation (retour en tampon) et de régénération. La figure 86 nous révèle les prises

mesurées en variation de réflectivité relevées en fin d'injection de SDF-1 ; les sondes PUH-HP6, PUAH-HP6 et PCAH-HP6 sont issues du couplage direct, alors que PUAH-dp12 provient du couplage séquentiel (*cf.* II.2.2.2.b.).

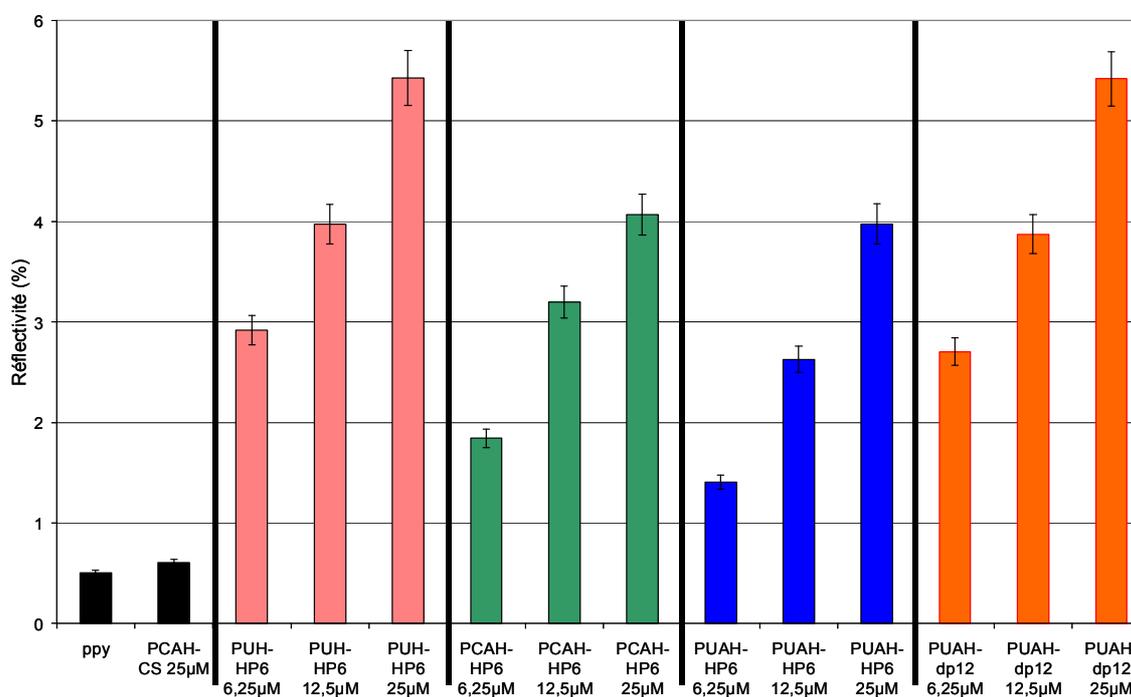


Figure 86 : Histogramme représentant les différents « pyrrole – bras espaceurs » reliés à HP6 et dp12. Les réflectivités mesurées ont été relevées en fin d'injection de protéine SDF-1 à 200nM, ces valeurs sont issues de moyennes faites sur 16 injections similaires.

Ces nombreuses injections nous montrent que, quel que soit l'oligosaccharide, plus la concentration en sucre est élevée, plus la réflectivité croît. Mais il faut tout de même remarquer, que les prises en réflectivité de PUAH-dp12 sont similaires à celles de PUH-HP6 ; or, nous nous attendions à obtenir un signal en cinétique divisé de moitié pour dp12 par rapport à HP6. Ce résultat assez inattendu nous laisse supposer que les deux sites de reconnaissance de HP6 ne sont pas atteints par la protéine SDF-1 lors de l'injection. Seul un site est atteint pour HP6, et nous pouvons supposer que ce site est celui le plus accessible, donc le plus éloigné de la surface de polypyrrole. Néanmoins, ces résultats nous montrent une fois de plus que les molécules sondes PUH-HP6 ont une meilleure prise en réflectivité que PCAH-HP6 et que PUAH-HP6. Nous avons déjà émis l'hypothèse afin d'expliquer ce phénomène, que ces différences étaient dues aux rendements de couplage différents : pour rappel, ces rendements sont PUH-HP6 20%, PCAH-HP6 14% et PUAH 12%. Mais un problème apparaît, le rendement de couplage séquentiel pour PUAH-dp12 n'est que de 8 % ; malgré cela, les plots PUAH-dp12 répondent aussi bien que PUH-HP6.

Pour aller plus loin dans la discussion de ces résultats, il a été décidé de normaliser ces prises en réflectivité (figure 87).

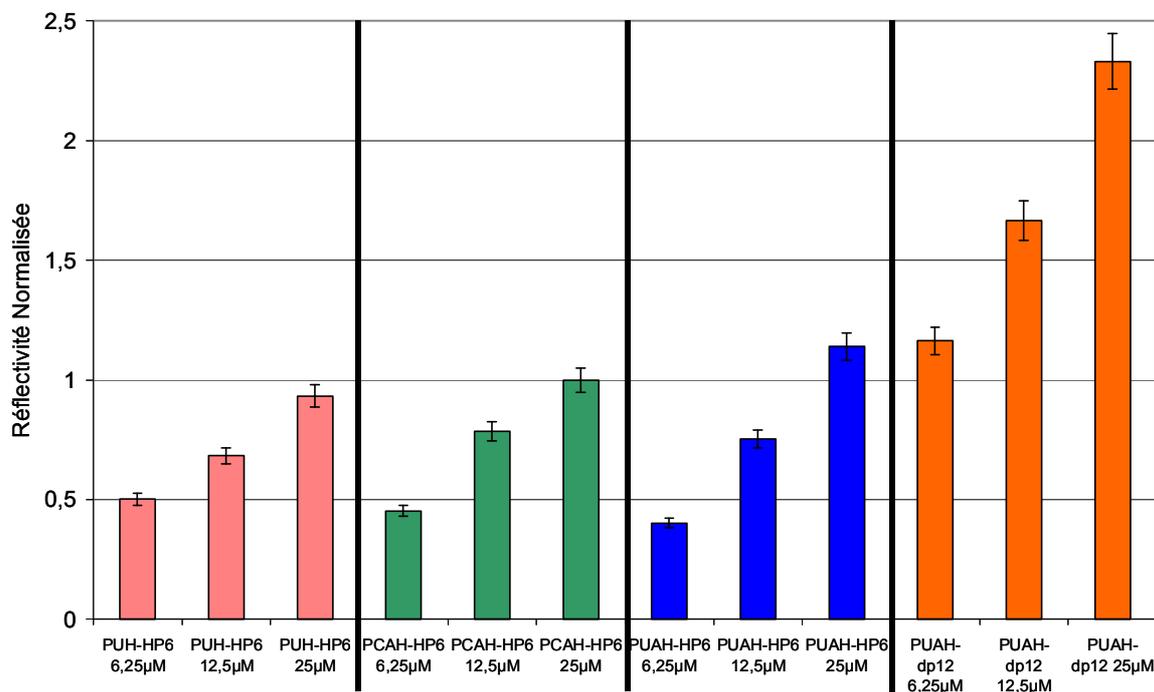


Figure 87 : Histogramme en réflectivité normalisée par l'application des valeurs de rendements de couplage. Ces valeurs normées proviennent des valeurs données en figure 86.

Après cette normalisation par les rendements de couplage, il nous apparaît que les prises en réflectivité de PUH-HP6, PCAH-HP6 et PUAH-HP6 présentent nettement moins de dispersion, moins de 10 % d'écart. Ces trois bras espaceurs semblent finalement être équivalents pour l'utilisation de HP6. Par contre, Les résultats normalisés concernant PUAH-dp12 sont surprenants, ils sont deux fois plus élevés que ceux obtenus avec HP6. Une des hypothèses expliquant ce phénomène serait que le rendement de couplage de 8% soit erroné, mais ceci paraît peu probable, vu la reproductibilité avec laquelle il a été mesuré. Une deuxième hypothèse pourrait concerner l'accessibilité des sites, la longueur de HP6 (~100 Å) peut changer son accessibilité vis-à-vis de la protéine par des repliements sur lui-même, alors que dp12 de longueur bien plus réduite gênerait moins l'accès à son site de reconnaissance.

Cette étude réalisée avec deux longueurs différentes de sucres ne nous permet pas de conclure définitivement sur le choix d'un seul « pyrrole – bras espaceur » à utiliser. Elle nous apprend tout de même que HP6 se révèle ne pas être le meilleur moyen d'étude pour cette comparaison ; il faut diminuer la taille de l'oligosaccharide utilisé et préférer ainsi des sucres de longueur plus courte comme dp12. Mais ce sucre est beaucoup plus difficile à obtenir. Enfin, ces résultats nous indiquent que les bras espaceurs étudiés sont équivalents lors de

l'étude de HP6, ceci étant probablement dû au fait qu'une partie de HP6 sert de bras espaceur complémentaire.

5. Bilan

Ce chapitre nous a permis de valider, étape après étape, notre puce à oligosaccharides. A partir des compétences du laboratoire sur la technologie des puces à ADN et dans la chimie du pyrrole, il nous a été possible de proposer une chimie basée sur le pyrrole, afin de fonctionnaliser de manière covalente un oligosaccharide modèle. Cette chimie s'est révélée être efficace, associée à la technique de dépôt par électrospotting. Les plots formés ont pu être étudiés par MEB et AFM afin d'obtenir des caractéristiques quant à leur forme, leur épaisseur et leur reproductibilité. Cette puce à oligosaccharides a été validée par l'étude de l'interaction modèle entre le sucre HP6 et la protéine SDF-1, tout d'abord au moyen de la fluorescence, qui s'est révélée être une technique de détection efficace afin de valider les échantillons « pyrrole –bras espaceurs- sucre » puis l'étude a été affinée grâce à l'utilisation de l'imagerie SPR. Cette technique, en plus de confirmer les résultats de spécificité et d'optimisation faits en fluorescence, nous a permis de suivre en temps réel les interactions biologiques. Pour que ce système de puce couplé à l'imagerie SPR soit complètement opératoire, des améliorations au niveau de la fluidique et du matériel ont été apportées. Après ces optimisations techniques, les paramètres chimiques tels que la concentration en sucres spottés, le phénomène de dissociation ou l'influence des bras espaceurs ont pu être étudiés, ainsi que des paramètres biologiques comme la concentration de protéines à injecter. Toutes ces études ont apporté la confirmation de la faisabilité et de l'efficacité d'un tel procédé afin d'étudier les interactions oligosaccharides - protéines.

Dans le dernier chapitre, nous allons nous intéresser aux applications biologiques réalisées avec ce système.

Chapitre III :

Applications biologiques

Dans ce chapitre final, nous allons aborder différentes applications biologiques réalisées avec nos puces à oligosaccharides, couplées à l'imagerie SPR.

Nous allons plus particulièrement décrire deux études : la première concernera l'influence de la longueur de l'oligosaccharide dans la reconnaissance de protéines et la deuxième traitera de l'étude de différents oligosaccharides de la famille des GAGs. Enfin, nous expliquerons brièvement les autres développements effectués au moyen de ces puces : le développement d'une chimie alternative et l'extension de l'utilisation de ces puces à l'étude de l'adhésion de vésicules synthétiques.

1. Influence de la longueur de la chaîne oligosaccharidique dans la reconnaissance biologique

Avant de présenter les expériences effectuées et leur interprétation, nous allons tout d'abord introduire les résultats de la littérature. Ceux-ci sont simplement rédigés afin d'améliorer la compréhension des expériences réalisées et ne visent en aucun cas une description détaillée des phénomènes abordés.

1.1. Etat de l'art

Comme il a été énoncé dans le chapitre I (*cf.* I.4.), les glycosaminoglycanes sont des sucres pouvant reconnaître une multitude de protéines différentes (un peu plus de 200 à l'heure actuelle). Les interactions entre un oligosaccharide GAG et une protéine ont lieu en des endroits bien définis de ces molécules ; seulement certains acides aminés de la protéine sont impliqués dans l'interaction avec un nombre précis de monosaccharides du sucre. De nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer spécifiquement les lieux d'interactions, comme dans le cas de l'interaction entre l'héparine et la chimiokine SDF-1. Ces études^{186,191} ont permis de déterminer notamment la longueur de chaîne oligosaccharidique à partir de laquelle il y avait apparition de reconnaissance avec SDF-1 ; leurs résultats indiquent qu'à partir d'une chaîne de 8 monosaccharides (dp8) il y a reconnaissance, qui est augmentée lorsque sont mises en présence des chaînes dp10 et dp12 et augmentée une deuxième fois quand les chaînes ont une longueur minimale de 14 monosaccharides. De ces travaux en découle la représentation spatiale de l'interaction, comme le montre la figure 88.

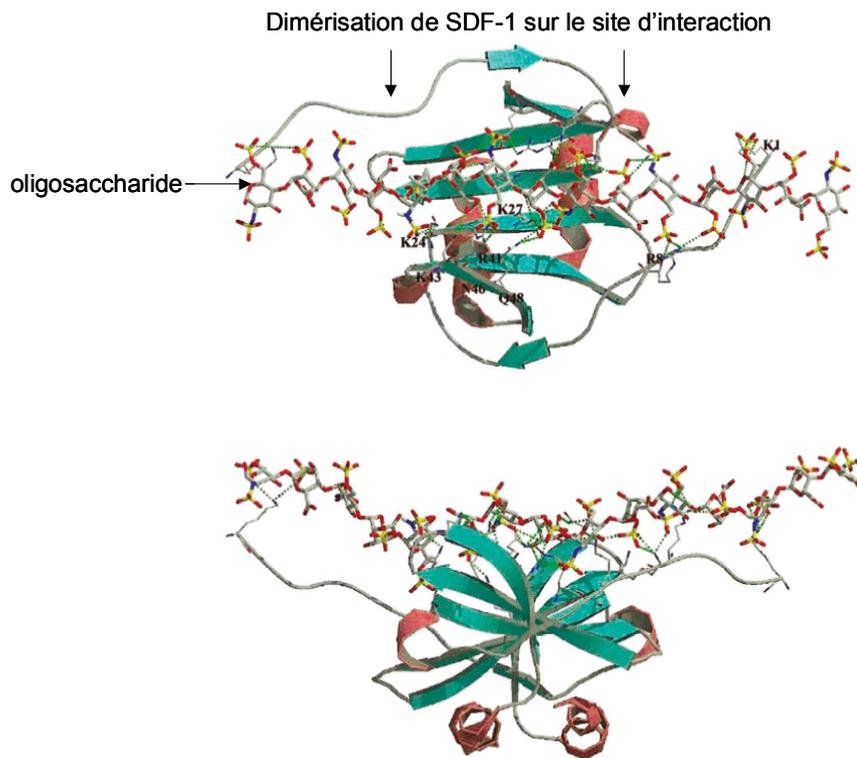


Figure 88 : représentations orthogonales du modèle pour l'interaction de l'héparine avec un dimère SDF-1. (Figure extraite de la publication 186)

L'équipe de l'IBS avec laquelle nous collaborons pour mon projet de thèse, travaille également sur l'interaction entre ces mêmes oligosaccharides GAGs et la protéine Interféron γ . Cette protéine joue un rôle dans la modulation des phénomènes d'inflammation et dans la réponse immunitaire. Cette cytokine est connue pour être naturellement sous forme d'un homodimère (2 x 17 kDa). Leurs travaux réalisés depuis une dizaine d'années^{121, 145, 147, 221} ont montré que la protéine interagissait fortement avec l'oligosaccharide HP/HS. La figure 89 modélise l'interaction entre le sucre et l'IFN γ ; celle-ci nécessite la présence de deux courts domaines sulfatés (dp6-dp8), séparés l'un de l'autre par un grand domaine acétylé (dp30-dp32). Ainsi il s'avère que l'interaction ne peut se produire qu'en présence d'une grande chaîne oligosaccharidique de GAGs.

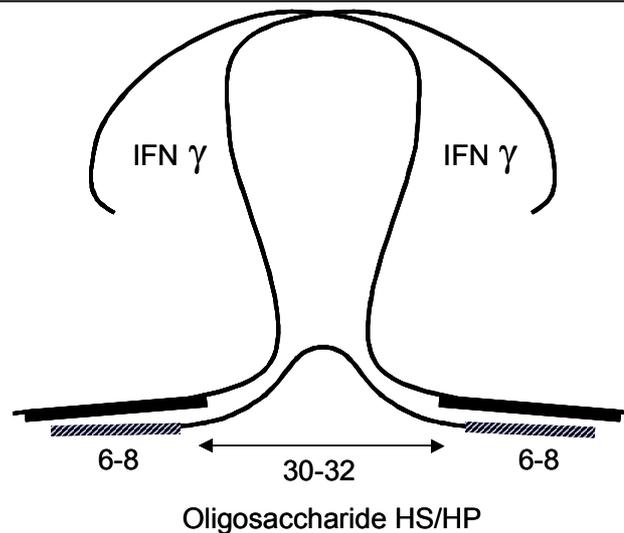


Figure 89 : Représentation du domaine de haute affinité de HS/HP qui est composé de deux petits domaines sulfatés (dp6 dp8) ; ceux-ci sont séparés par un domaine très acétylé d'environ 30-32 monosaccharides). IFN γ naturellement homodimérique sur le site de reconnaissance de l'oligosaccharide.

Nous venons de présenter succinctement deux interactions protéines / Héparine, qui ne nécessitent pas les mêmes besoins en terme de longueur de chaîne oligosaccharidique. Par ces deux exemples, nous comprenons l'enjeu de déterminer les longueurs de chaîne spécifique des interactions avec les protéines. Ainsi nous avons souhaité reproduire ces résultats par une étude sur puce de l'influence de différentes longueurs de chaîne d'héparine lors de l'interaction avec la protéine.

1.2. Etude de l'influence de la longueur de chaîne de sucre

Après avoir décrit brièvement deux exemples importants de reconnaissance en fonction de la longueur de chaîne, nous avons voulu savoir si notre système de puces nous permettait de retrouver ces mêmes résultats sur ces longueurs utiles.

Notre sucre de départ étant toujours HP6 (correspondant à l'enchaînement de 24 monosaccharides), a tout d'abord subi une digestion enzymatique afin d'obtenir différentes longueurs de chaîne à étudier. A l'issue de ce traitement, nous avons obtenu six longueurs de chaîne différentes : dp6, dp8, dp10, dp12, dp14 et dp16. Ces oligosaccharides non modifiés ont été obtenus dans une proportion assez faible (de l'ordre d'une centaine de microgrammes).

1.2.1. Couplage « pyrrole –oligosaccharide »

Avant de se lancer dans le couplage du pyrrole sur ces oligosaccharides, il nous a d'abord fallu choisir la molécule « pyrrole - bras espaceur » à utiliser de façon générique. Pour ce faire, des couplages entre HP6 et les « pyrrole – bras espaceurs » PUH, PCAH et PUAH ont été réalisés en réduisant au maximum les volumes et les quantités utilisés. A l'issue de ces couplages, les échantillons ont été normalement purifiés sur les mini-colonnes PD10, séchés et pesés. De par la très faible quantité obtenue, les contrôles classiques finaux (dosages du sucre et du pyrrole) n'ont pas pu être réalisés.

Cependant afin de trouver quel est le meilleur rendement de couplage, et ce de manière qualitative, les nouveaux échantillons « pyrrole - bras espaceurs - HP6 » sont spottés sur une lame de verre recouverte d'or, puis subissent l'interaction avec SDF-1 biotinylée suivie de la révélation et de la lecture sous microscope à épifluorescence. Comme précédemment, il s'avère que la molécule PUH est celle qui obtient le meilleur rendement. Il est donc décidé d'utiliser exclusivement pour cette expérience ce « pyrrole –bras espaceur » PUH.

Les oligosaccharides (de dp6 à dp16) subissent donc le couplage avec PUH, et donc les mêmes étapes que celles faites précédemment avec HP6. Seulement, la pesée se révèle extrêmement imprécise. Les échantillons sont spottés à l'aveugle dans une large gamme de concentrations et révélés en fluorescence. La lecture des intensités de fluorescence indiquent que la protéine biotinylée reconnaît les témoins positifs mais ne nous permet pas de savoir si nos couplages ont réellement réussi ou échoué, car il est possible que la quantité d'oligosaccharides modifiés spottés sur la surface soit insuffisante pour l'obtention d'une interaction correcte.

Afin de ne pas gaspiller nos échantillons, les solutions de spotting sont purifiées sur mini colonne et réintégrées à la solution mère des échantillons. Ceux-ci sont à nouveau spottés mais cette fois-ci à la plus forte concentration possible, mais cette fois-ci directement sur un prisme, afin de les vérifier par imagerie SPR.

1.2.2. résultats obtenus par imagerie SPR

Afin de lever le doute sur le possible échec du couplage, la matrice de plots est construite sur la surface d'un prisme. Comme le montre la figure 90, cette puce est constituée, comme à chaque nouvelle expérience de témoins : les positifs composés ici de plots PUH-HP6 et d'un plot PUAH-dp12 (échantillons déjà testés) et les négatifs étant deux plots de ppy

seul, un de HP6 libre et un PCAH-CS. Les plots dp « x » (x : 6, 8, 10, 12, 14 et 16) ont été spottés à une concentration inconnue mais estimée comme étant la plus grande utilisable. Ils ont été déposés à deux ou trois concentrations différentes afin de créer une gamme de mesure. L'expérience est réalisée au débit constant de 70 μL / min et débute par un blocage de la surface par deux injections de BSA 1%.

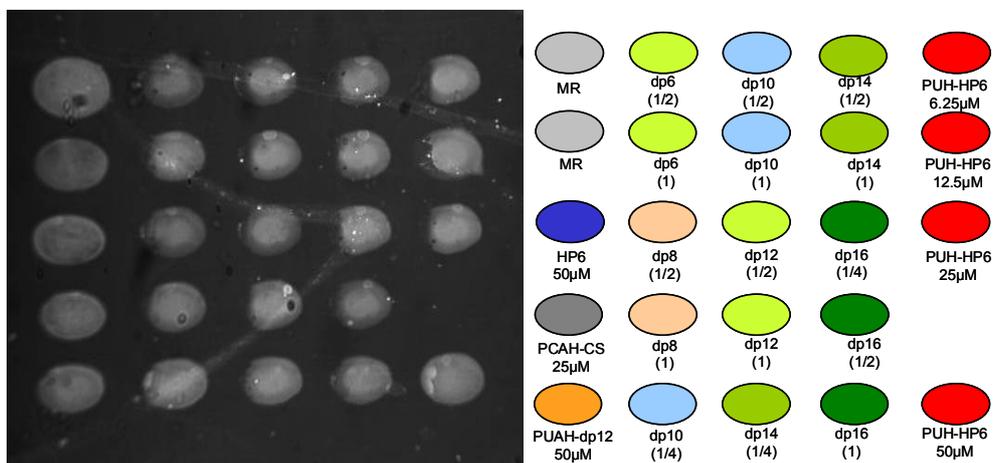


Figure 90 : Image des plots en début d'expérience, avec la légende détaillée sur la droite. Les différents dp « x » ont été spottés à deux ou trois concentrations : 1, $\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{4}$. Les témoins sont : PUH-HP6 et PUAH-dp12 pour les positifs et PCAH-CS, HP6 libre et ppy comme négatifs.

Pour révéler la sensibilité des interactions avec les protéines SDF-1 et IFN γ , nous avons choisi d'injecter des concentrations assez élevées, pour ne pas être en quantité limitante de protéines.

Lors de l'injection de SDF-1 à 200 nM, nous avons pu observer, que nos témoins positifs reconnaissent la protéine, nous permettant de ce fait de valider l'activité de celle-ci. En revanche, contrairement à la détection en fluorescence, les plots dp « x » reconnaissent la protéine. Ainsi, le couplage direct effectué avec le « pyrrole - bras espaceur » PUH se révèle être efficace. Sur la figure 91a, les courbes de variation de réflectivité, obtenues par l'injection de SDF-1, nous indiquent que les plots dp « x », ayant une réponse comprise entre les plots PUH-HP6 12.5 μM et 25 μM , ne sont pas très denses en sucre, mais assez pour obtenir une réponse spécifique ; nous ne nous sommes intéressés qu'aux plots les plus concentrés (les $\frac{1}{2}$ et les $\frac{1}{4}$ ne sont pas représentés sur le graphe).

En s'intéressant de plus près à ces réponses en réflectivité, nous constatons qu'un ordre de réponse en fonction du dp apparaît : dp16 > dp14 > dp12 > dp10 > dp8 \approx dp6. Seuls les plots dp6 et dp8 se situent en dessous de la courbe noire du témoin négatif PCAH-CS. Ces données peuvent être comparées à celles énoncées dans le paragraphe précédent ; à partir de dp10, nous observons une reconnaissance spécifique entre les oligosaccharides et la protéine

SDF-1 et comme ce qui est attendu dans la littérature, il y a une augmentation du signal d'interaction pour les plots dp14 et dp16.

Conjointement à cette cinétique, nous avons voulu tester la reconnaissance de ces oligosaccharides avec la protéine IFN γ , celle-ci a été injectée à une concentration de 100nM.

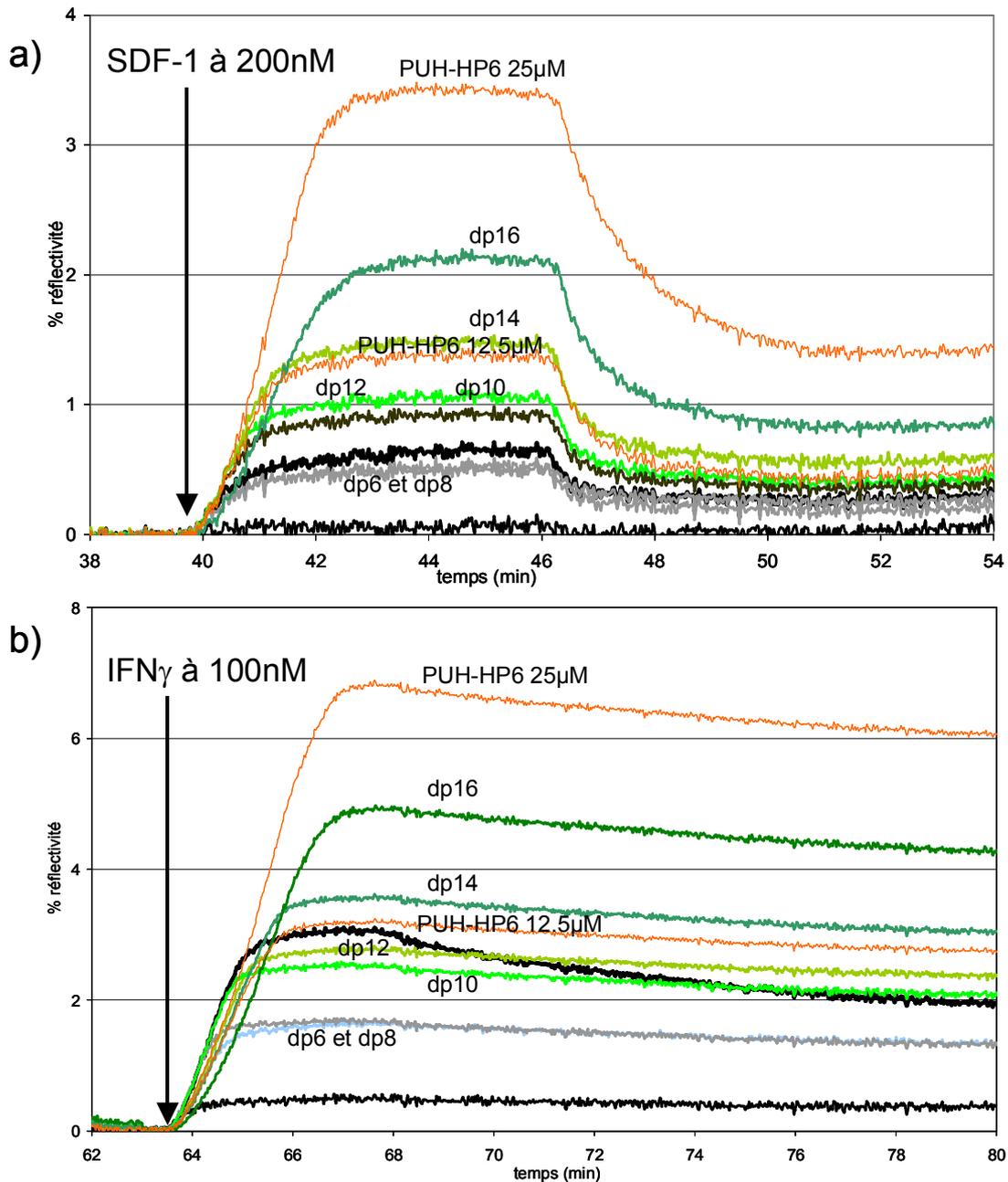


Figure 91 : Courbes de variation en réflectivité en fonction du temps correspondant aux plots dp « x » à la concentration (1), aux témoins positifs PUH-HP6 12.5 et 25 μ M et aux témoins négatifs ppy et PCAH-CS 25 μ M. a) : injection de la protéine SDF-1 à 200 nM suivie d'une dissociation en compétition avec HP6 libre ; b) : injection de la protéine IFN γ à 100 nM suivie d'une dissociation simple en tampon de rinçage.

Sur la figure 91b, correspondant à l'injection de IFN γ , nous remarquons tout d'abord la spécificité de la reconnaissance grâce aux plots positifs PUH-HP6 ; un autre fait important est à noter : le plot PCAH-CS reconnaît cette protéine. Cette interaction entre CS et IFN γ a été rapportée dans la littérature²²², elle est connue pour interagir plus faiblement que l'héparine, ce qui est vérifié lors de cette expérience par la comparaison entre ce plot et le plot PUH-HP6 25 μ M. Cette réponse en cinétique nous permet surtout de valider le vrai caractère « témoin négatif » porté par les plots de PCAH-CS durant toutes les précédentes expériences ; nous pouvons donc prétendre à l'existence véritable de sucres greffés et accessibles sur ces plots.

D'autre part, les cinétiques des plots dp « x » semblent donner des réponses positives d'interactions avec IFN γ ; or, d'après la littérature, le site de reconnaissance doit être de longueur « dp8 + dp8 » afin d'avoir un début d'interaction. Notons que même les plots dp6 et dp8, supposés bien trop courts, ont une réponse cinétique proche de 2 % (nettement supérieur au plot ppy à 0.5 %). Pour expliquer ce phénomène, nous avançons l'hypothèse, que ces plots, même si leur concentration est inconnue, ont des couplages équivalents et qu'ils sont assez denses pour que la protéine reconnaisse deux oligosaccharides proches sur le même plot.

1.3. Bilan

Cette expérience nous a permis de valider l'extension de notre couplage à des oligosaccharides issus de la digestion enzymatique de HP6. L'expérience en imagerie SPR nous permet d'observer les cinétiques d'interactions en fonction de la longueur de l'oligosaccharide greffé. Il est vrai qu'il est difficile à l'heure actuelle de conclure sur les phénomènes observés, car seulement un couplage avec ces dp « x » et deux expériences (indépendantes) en SPRi ont pu être réalisés. Afin de pouvoir conclure sur l'exactitude de nos résultats obtenus, il est souhaitable de réitérer l'étude avec de nouveaux oligosaccharides en plus grande quantité, afin de pouvoir réaliser au moins le dosage du sucre ou du pyrrole, nous permettant de travailler sur une valeur concrète. Tout de même, cette expérience est un premier pas vers l'étude plus systématique sur puces des interactions entre des fragments d'oligosaccharides GAGs et diverses protéines.

2. Extension de l'usage de la puce développée à l'étude de différents oligosaccharides de la famille des GAGs

Dans ce paragraphe, nous allons exposer une application faite à partir de notre système afin d'étudier simultanément trois sucres différents. Pour illustrer cet exemple, nous nous sommes inspirés des sucres utilisés par l'équipe de l'IBS. Ainsi, il a été choisi de travailler sur trois sucres issus de la famille des GAGs (cf. I.4.1.) : l'Héparine HP6 (6 kDa), la Chondroïtine Sulfate CS (32 - 45 kDa) et le Dermatan Sulfate DS (37 kDa). Ces hétéropolysaccharides sont les sucres les plus abondants dans le corps humain. Comme le montre le tableau 7 ci-dessous, ces quatre sucres qui possèdent une structure similaire sont distribués en des localisations très différentes, d'où il résulte des propriétés de reconnaissance distincte.

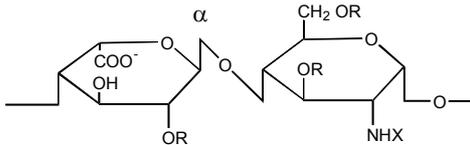
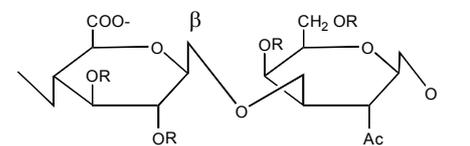
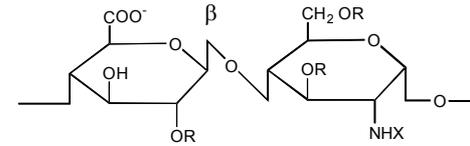
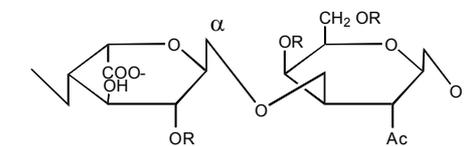
GAG Localisation	STRUCTURES
CHONDROÏTIN SULFATE cartilage, os, valves cardiaques	 <p style="text-align: center;">GlcA GalNAc</p>
HEPARANE SULFATE constituants des surfaces cellulaires	 <p style="text-align: center;">GlcA GlcNH₂</p>
HEPARINE Composés des granules intracellulaires des mastocytes recouvrant les artères pulmonaires, foie et peau	 <p style="text-align: center;">IdoA GlcNH₂</p>
DERMATANE SULFATE peau, vaisseaux sanguins, valves cardiaques	 <p style="text-align: center;">IdoA GalNAc</p>

Tableau 7 : Récapitulatif des différents oligosaccharides étudiés, leur localisation dans le corps et leurs structures. Chaque unité est composée d'acide uronique (GlcA ou IdoA) et d'un amino sucre (GalNAc ou GlcNH₂). R = H, SO₃⁻ ; X = H, SO₃⁻, COCH₃. DS contient quelques unités disaccharides CS, HS contient aussi quelques unités disaccharides HP et *vice versa*.

Ces trois sucres sont disponibles commercialement, ce qui nous permet de travailler avec des quantités suffisantes pour effectuer les différents dosages suivant le couplage, contrairement aux dp « x ». Pour valider notre démarche, nous avons recherché pour chacun des oligosaccharides, une protéine spécifique pour l'étude de la reconnaissance biologique. Comme nous avons vu dans le paragraphe précédent (*cf.* III.1), seul HP6 interagit avec le SDF-1 alors que l'IFN γ est reconnue par CS et HP6. Après quelques recherches dans la littérature, il nous est apparu que DS possédait lui aussi une activité de reconnaissance avec la protéine IFN γ^{223} et d'après un catalogue de produits biochimiques, qu'un anticorps reconnaissant spécifiquement la CS était disponible (Sigma). Le but de cette étude est simple : nous souhaitons montrer que trois sucres spottés sur une même puce peuvent interagir avec leurs protéines de manière spécifique et ce sans reconnaissance croisée.

2.1. Couplage des oligosaccharides aux « pyrrole - bras espaceurs »

Les sucres doivent tout d'abord subir un couplage avec un « pyrrole – bras espaceur » en vue de les spotter ultérieurement. Nous préférons utiliser le PUH pour les mêmes raisons que celles énoncées dans le paragraphe précédent (*cf.* III.1.2.1.), simplement parce qu'il se fixe au sucre avec un meilleur rendement de couplage. Contrairement aux dp « x », nous ne sommes pas limités dans la quantité et le volume à utiliser. Pour être dans les mêmes conditions pour les trois sucres, nous décidons de refaire un échantillon de couplage PUH-HP6.

Une fois les monomères de pyrrole fixés aux oligosaccharides (HP6, CS et DS), les échantillons subissent les deux dosages (sucre et pyrrole). Au final, nous obtenons ces valeurs : pour PUH-HP6 (témoin positif du dosage), le rendement est de 19 % (valeur correcte), pour le nouveau couplage PUH-HP6 il n'est que de 4.5 %, cette valeur nous indique que ce couplage a échoué. En revanche, les couplages PUH-CS et PUH-DS obtiennent des rendements respectivement de 17 et 10.5 %, valeurs au demeurant faibles mais suffisantes pour obtenir une reconnaissance correcte après spotting.

Comme seulement la protéine SDF-1 est disponible sous une forme biotinylée, nous ne pouvons pas réaliser une vérification en fluorescence, et nous devons directement tester nos couplages sur un prisme par imagerie SPR. Souhaitant mettre toutes les chances de notre côté afin d'observer la moindre interaction biologique existante, les oligosaccharides modifiés sont spottés sur la surface dans une gamme de concentrations assez large. Sur la figure 92 est

représentée une image de la matrice spottée vue par imagerie SPR. Sur cette puce, en plus des trois sucres à étudier, une gamme de témoins positifs PUH-HP6 a été spottée au cas où le nouveau couplage avec HP6 ait véritablement échoué. Ici, seuls les plots ppy et HP6 libre sont considérés au départ comme des témoins négatifs.

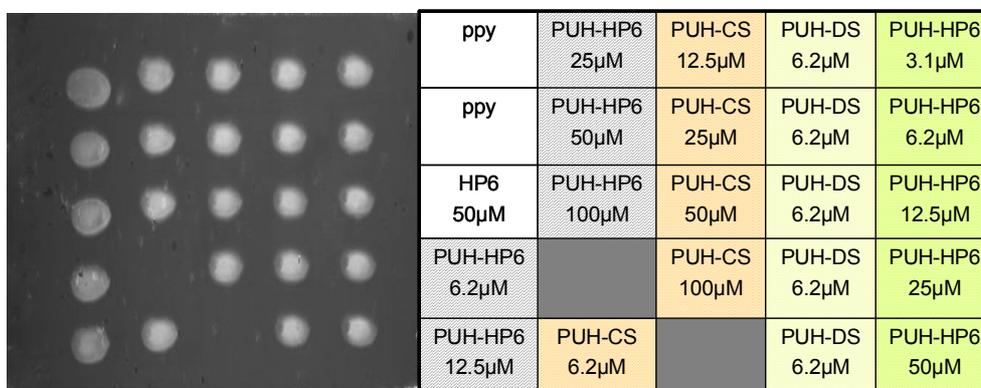


Figure 92 : à gauche image de la matrice comportant les trois nouveaux couplages (HP6, CS et DS) et à droite la légende correspondante à cette image, où ont été déposés les témoins négatifs ppy et HP6 libre. En hachuré ce sont les plots PUH-HP6 issus du nouveau couplage, en vert sur la droite ce sont les plots PUH-HP6 témoin positif.

Maintenant que notre puce est construite, il reste à savoir si nos plots possèdent bien les différents sucres à la surface et si ceux-ci sont toujours actifs vis-à-vis des protéines qui vont être injectées.

2.2. Premiers résultats

Avant de débiter nos injections, la surface est d'abord bloquée par deux injections de BSA 1%. Cette première étude en imagerie SPR va nous permettre de valider ou non le couplage des trois sucres choisis pour cette illustration.

La première injection est faite avec la protéine SDF-1 à 200 nM afin de vérifier l'activité de reconnaissance stricte de HP6. Comme nous pouvons l'observer sur la figure 93, les plots témoins négatifs, que sont les ppy et HP6 libre ne répondent pas à l'injection ; d'autre part, nous obtenons les mêmes allures de courbes d'interaction que dans toutes les expériences précédentes. Les plots PUH-HP6 (encadrés en bleu sur l'image de la figure 93) interagissent de manière spécifique avec cette protéine, les plots CS et DS ne reconnaissent que très peu la protéine, par une interaction totalement non spécifique. Cette injection nous permet de conclure sur l'échec du nouveau couplage entre PUH et HP6, car même aux concentrations les plus élevées en sucre (50 et 100 µM), les plots ne reconnaissent que faiblement SDF-1. Il nous reste à savoir si les oligosaccharides DS et CS ont gardé eux aussi

leur activité de reconnaissance. Pour cela, la protéine IFN γ est injectée ensuite à la concentration de 100 nM.

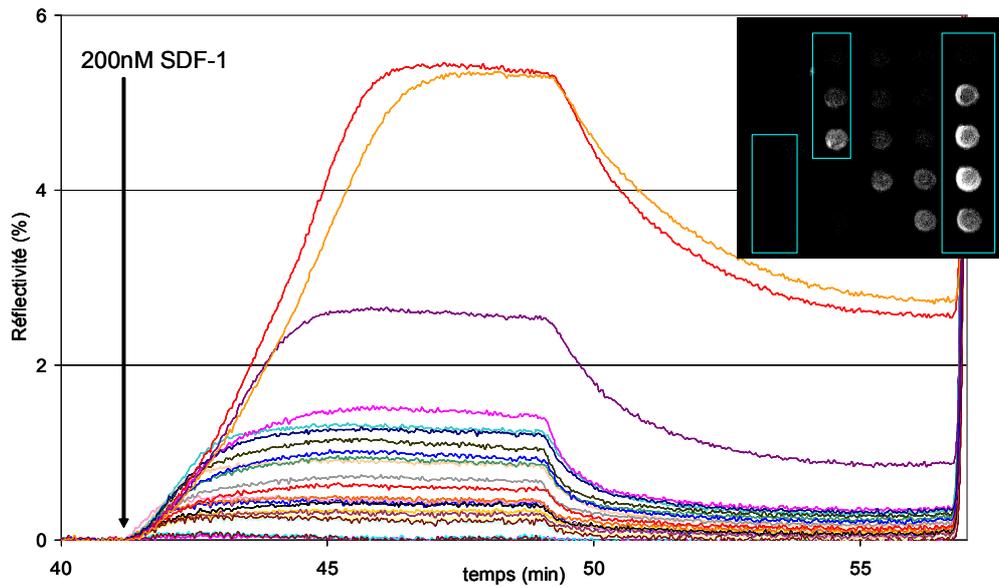


Figure 93 : Courbes en variation de réflectivité en fonction du temps correspondant à l'injection de la protéine SDF-1 à 200 nM. L'image en haut à droite représente la matrice en images différentielles observées en fin d'injection de protéine, les plots PUH-HP6 sont encadrés en bleu.

D'après la littérature, nous savons que l'interféron est reconnu par les trois sucres. Ainsi, la figure 94 nous permet de confirmer ces résultats ; les témoins négatifs nous permettent de valider l'interaction biologique spécifique. Remarquons que, comme attendu, plus le plot est dense en sucre, que ce soit HP6, CS ou DS, meilleure est sa réponse en réflectivité.

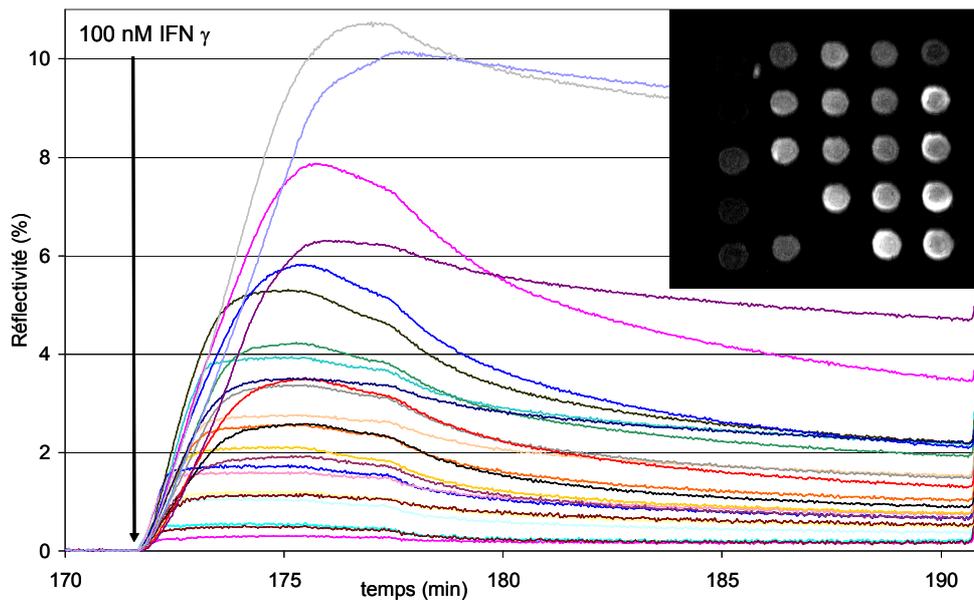


Figure 94 : Courbes en variation de réflectivité en fonction du temps correspondant à l'injection de la protéine IFN γ à 100 nM. L'image en haut à droite représente la matrice en images différentielles observées en fin d'injection de protéine.

De plus, les allures de cinétique avec IFN γ et avec SDF-1 diffèrent; la variation de réflectivité est plus élevée pour la reconnaissance d'IFN γ , alors que la concentration est inférieure (100 nM au lieu de 200 nM), ceci est sûrement dû à la différence de poids moléculaire des deux protéines IFN γ 34 kDa et SDF-1 8 kDa mais aussi à la différence d'affinité.

Signalons tout de même que les cinétiques ne sont pas vraiment « lisses », il y a certaines ruptures de pente en fin d'injection de IFN γ et en début de dissociation ; ces cassures sont dues à un problème de surpression lié au pousse-seringue, et non à un phénomène biologique. Sans entrer dans les détails de cinétique, cette injection valide l'activité biologique des trois sucres.

La dernière injection à réaliser est celle de l'anticorps commercial anti-CS, celui-ci est supposé ne reconnaître que le sucre CS, malgré ses similitudes avec DS et HP6. Cet anticorps est donc injecté à 10 nM, concentration nettement plus basse que les deux précédentes protéines. Afin d'éviter les éventuels problèmes de surpression momentanée de la pompe, nous avons décidé de diminuer le débit à $\sim 15 \mu\text{L}/\text{min}$. La figure 95, représentant les cinétiques d'interactions de la puce, parle d'elle-même. Ici, seuls les plots CS interagissent exclusivement avec cet anticorps, et ce quelle que soit leur concentration. Cette spécificité nous permet de valider l'activité anti-CS de l'anticorps commercial, mais aussi celle du sucre.

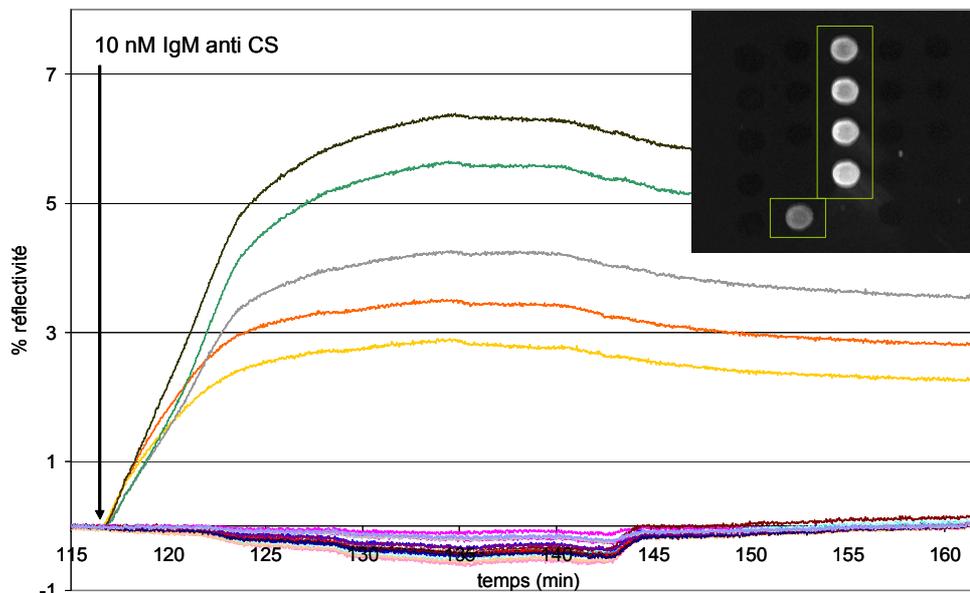


Figure 95 : Courbes en variation de réflectivité en fonction du temps correspondant à l'injection de la protéine IgM anti-CS à 10 nM. L'image en haut à droite représente la matrice en images différentielles observées en fin d'injection d'anticorps, les plots CS aux différentes concentrations sont encadrés en vert.

Par ces trois injections simples, nous pouvons valider notre couplage sur ces deux nouveaux sucres naturels, ainsi que leurs spécificités de reconnaissance biologique. Nous pouvons constater aussi que chaque interaction possède sa propre allure de cinétique d'association et de dissociation ; alors que les complexes avec SDF-1 ou IFN γ se dissocient rapidement, le complexe avec l'anticorps ne se dissocie que très peu (résultat déjà obtenu lors de l'étude sur puces d'interactions antigène - anticorps²²⁴).

2.3. Etudes de sensibilité

Forts de ces résultats, nous avons voulu aller plus loin dans l'étude simultanée de ces trois sucres. Après discussion avec l'équipe de l'IBS, nous avons souhaité affiner nos réponses obtenues lors d'injections d'IFN γ et de l'anticorps ; mais contrairement aux interactions entre les trois sucres et l'interféron, il n'existe nulle part dans la littérature une étude de sensibilité de cet anticorps pour CS permettant de déterminer une constante d'affinité, il nous a donc paru intéressant de l'estimer qualitativement.

2.3.1. Interactions avec IFN γ

L'étude entre la protéine IFN γ et les trois sucres de la famille des GAGs a été approfondie en réalisant une gamme en protéine injectée afin de discuter de leurs différentes affinités. Lors d'une deuxième expérience sur la même puce que précédemment, 7 injections à différentes concentrations ont été réalisées et il en résulte les courbes en variation de réflectivité en fonction de la concentration en protéine injectée sur la figure 96.

Sur cette figure, seules 5 concentrations différentes sont représentées, chaque graphe possède exactement la même échelle en réflectivité ; ainsi, il est remarquable de voir que même si les plots CS et DS sont plus denses que ceux en HP6, la variation en réflectivité correspondant au complexe HP6 – IFN γ est nettement supérieure, par exemple, la réponse est quasiment multipliée par deux entre PUH-CS et PUH-HP6. D'après la littérature, nous connaissons les valeurs des constantes d'affinité entre HP6 ou CS et IFN γ : K_d (IFN γ / HP) = 1,5 nM²²⁵ et K_d (IFN γ / CS) = 33 – 93 nM²²³, et d'après nos résultats nous pouvons voir une similitude entre ces valeurs d'affinité et les réponses en réflectivité. En revanche, comme aucune valeur n'a été rapportée dans la littérature pour l'interaction DS / IFN γ , vous pouvez simplement imaginer que cette interaction, compte tenu des rendements de couplage, semble proche de celle entre HP6 et la protéine.

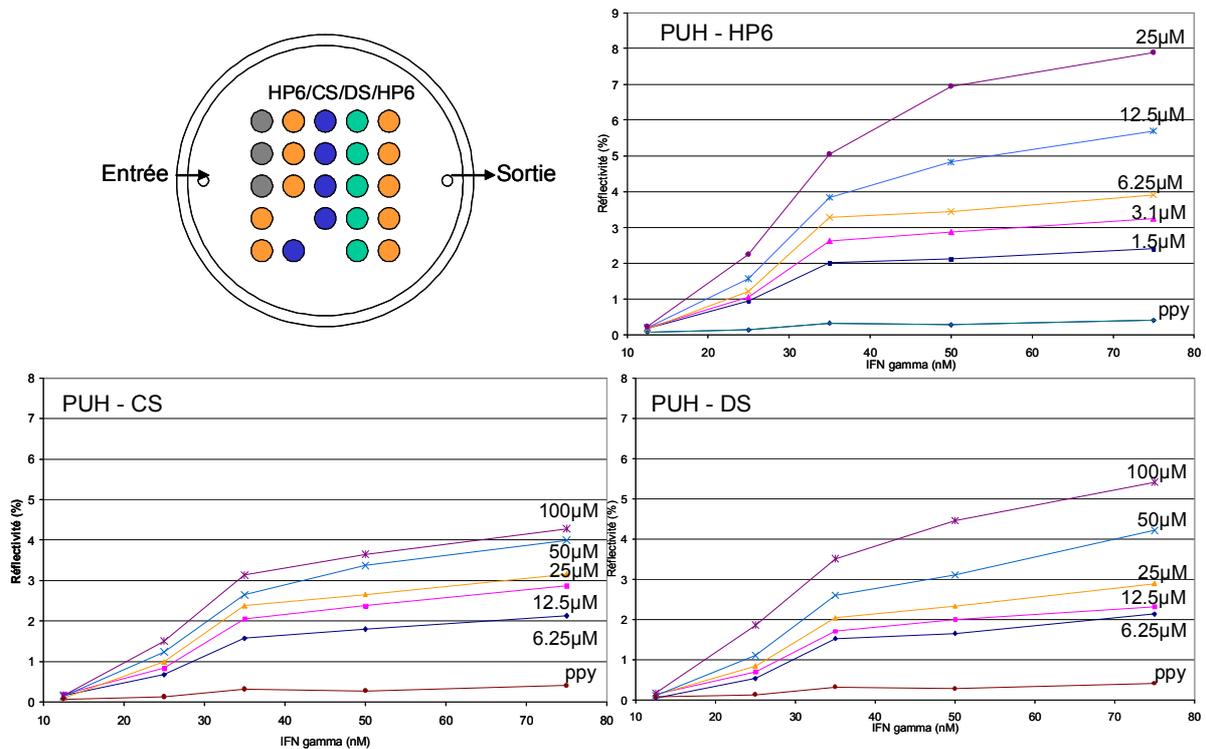


Figure 96 : Courbes en variation de réflectivité en fonction de la concentration en IFN γ pour les différents HP6, CS et DS avec légende de la matrice; les concentrations des plots sont indiquées sur les courbes.

Cette étude assez simple permet de mettre en lumière le potentiel réel de ce genre de puces à oligosaccharides. Mais il faudrait encore approfondir cette étude pour pouvoir comparer véritablement les trois complexes formés, notamment en améliorant le traitement des courbes.

2.3.2. Etude de l'interaction entre IgM anti-CS et CS

Lors de la première utilisation de l'anticorps anti-CS, nous ne connaissions pas la constante d'affinité liée au complexe IgM anti-CS /CS ; après quelques recherches, il a été confirmé qu'aucune valeur n'existait pour ce complexe ; ainsi, en collaboration avec l'équipe de l'IBS, nous avons réalisé une étude d'interactions sur la même puce que précédemment, par imagerie SPR, en injectant successivement différentes concentrations variant de 250 pM à 10 nM. La première remarque est que l'interaction IgM / CS est détectable même lors de l'injection de 250 pM d'anticorps, son seuil de sensibilité est donc très bas par rapport aux autres protéines, ce qui est compréhensible puisque premièrement un IgM possède un poids moléculaire d'environ 900 kDa (bien supérieur à ceux de SDF-1 8 kDa et d'IFN γ 2 x 17kDa) et que deuxièmement, l'affinité ne peut être identique.

D'autre part, grâce à l'analyse graphique du Scatchard plot, la technique la plus communément utilisée, l'estimation de la constante de dissociation et la mesure du Bmax de la relation analyte / sonde peuvent être réalisées. Cette technique s'appuie sur l'utilisation de différentes concentrations de l'analyte, ici l'anticorps anti-CS. L'équation pour la droite de Scatchard est :

$$B / F = (B_{\max} - B) / K_d$$

Où B est la densité d'anticorps lié spécifiquement au sucre immobilisé (nM), F est la concentration d'anticorps injecté libre (nM), Bmax est la densité maximale d'anticorps liés et Kd la constante de dissociation (figure 97 b).

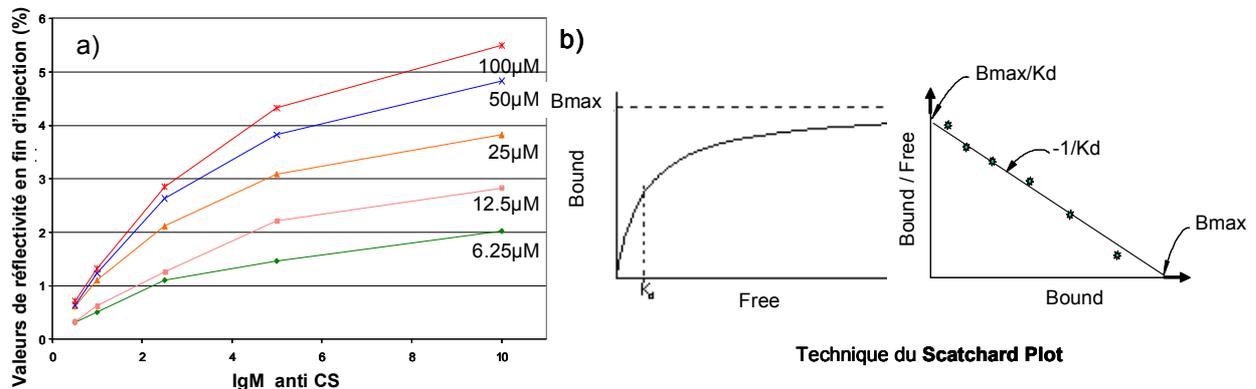


Figure 97 : a) Courbes en variation de réflectivité des cinq plots PUH-CS en fonction de la concentration en IgM anti-CS injectée (valeurs relevées en fin d'injection) ; b) technique graphique du Scatchard Plot pour déterminer la constante de dissociation Kd, Bound pour anticorps lié (valeur de réflectivité à l'équilibre, lue sur le graphe a), Free pour la concentration en anticorps libre.

Des cinq injections d'anticorps, nous obtenons les valeurs en réflectivité à l'équilibre, utiles pour l'analyse, comme nous le montre la figure 97a ; les courbes nous indiquent que nous nous sommes placés dans la bonne gamme de concentrations pour l'étude. Le rapport B / F obtenu est exprimé en fonction de B selon la représentation de Scatchard, et une droite est tracée entre les points. La densité des analytes fixés Bmax est représentée par l'intersection avec l'axe des abscisses, et la constante de dissociation est l'inverse de la pente de la droite. L'analyse a été réalisée sur les cinq plots et nous obtenons pour chacun les valeurs de constante de dissociation suivantes :

$$K_d (\text{CS } 100 \mu\text{M}) = 5,7 \text{ nM}$$

$$K_d (\text{CS } 50 \mu\text{M}) = 5,3 \text{ nM}$$

$$K_d (\text{CS } 25 \mu\text{M}) = 3,9 \text{ nM}$$

$$K_d (\text{CS } 12.5 \mu\text{M}) = 7,2 \text{ nM}$$

$$K_d (\text{CS } 6.25 \mu\text{M}) = 4,2 \text{ nM}$$

A partir de ces valeurs, nous pouvons en déduire une estimation du K_d inférieur à la dizaine de nanomolaires, qui correspond à un complexe de forte affinité comme pour toute interaction entre un antigène et un anticorps.

2.4. Bilan

Cet exemple d'application biologique nous permet de penser que notre concept de puces à oligosaccharides a un grand potentiel dans des études de screening, où de nombreux sucres différents peuvent être immobilisés, car il paraît possible de fixer n'importe quel sucre naturel à nos « pyrrole - bras espaceurs ». De plus, par cette étude, nous avons pu aussi discuter qualitativement des différences possibles des K_d entre les complexes GAG – IFN γ ; il nous a aussi été possible d'estimer la constante de dissociation entre l'anticorps anti-CS commercial et la Chondroïtine Sulfate, jusqu'alors inconnue.

3. Autres développements

Après avoir réalisé ces deux études, utilisant notre système de puces à oligosaccharides couplé à l'imagerie SPR, nous nous sommes aperçu que les oligosaccharides disponibles dans les laboratoires de biologie pouvaient être déjà fonctionnalisés par une molécule de biotine ou par une fonction thiol. Ainsi une chimie alternative a été proposée permettant d'utiliser ces sucres modifiés tout en conservant notre électrocopolymérisation du pyrrole. Connaissant la haute affinité de la biotine pour la streptavidine et les études déjà réalisées sur l'utilisation de cette interaction pour construire une puce à sucres (*cf.* I.2.2.1.), nous avons fonctionnalisé la streptavidine par une molécule de pyrrole afin de la spotter sur une surface dorée. Grâce aux travaux de Ludivine Grosjean sur les puces à protéines²²⁶, nous savons qu'il est possible de fonctionnaliser et de déposer par électrochimie cette protéine, de surcroît, très résistante. Elle a donc été pyrrolylée *via* le couplage entre sa fonction amine terminale (cas minoritaire) ou les amines libres des lysines (cas majoritaire) et la molécule « pyrrole - bras espaceur » PC-NHS (produit III, *cf.* II.2.1.2.a.2.) puis électropolymérisée sur la surface. Après avoir optimisé toutes les conditions de couplage et de spotting, des oligosaccharides biotinylés, donnés par l'IBS, ont été déposés ; cette technique de dépôt est inspirée de celle utilisée par Nathalie Bassil à Orsay²²⁷. La phase de dépôt des oligosaccharides biotinylés améliorée, la matrice a enfin pu être testée par SPRi. Les résultats

de ces expériences ont été très concluants et cette technique alternative avec la streptavidine a été validée.

Parallèlement à ce développement, nous avons construit un nouveau bras espaceur (produit XII *cf.* II.2.1.2.c.3.) pouvant être couplé à un oligosaccharide modifié par une fonction thiol. Ce bras espaceur possède un maléimide comme fonction finale. Tout comme pour les oligosaccharides biotinylés, le couplage a été optimisé et validé par fluorescence et imagerie SPR. Ainsi, quel que soit l'oligosaccharide : naturel, biotinylé ou thiolé, il nous est donc possible de réaliser des puces basées sur notre système développé au cours de ma thèse.

La dernière application réalisée au moyen de nos puces à oligosaccharides a été faite en collaboration avec Emmanuel Suraniti, un doctorant de notre équipe, qui étudie l'adhésion de vésicules synthétiques sur surfaces d'or modifiées. Nos expériences ont permis d'observer la capacité qu'ont les vésicules à interagir avec d'abord le polypyrrole mais aussi avec les sucres HP6, CS, DS et dp12. Il a pu être montré qu'elles interagissaient différemment en fonction de leur charge (positive, neutre ou négative) et que les réponses obtenues en imagerie SPR entre les sucres et les vésicules variaient en fonction de la propriété de reconnaissance du sucre (CS \neq DS \neq HP6 ou dp12). De plus ces réponses sont proportionnelles à la concentration en sucres déposés.

Finalement, le système de puces à oligosaccharides développé au cours de cette thèse possède la capacité d'être transposable à de multiples applications : celles découlant étroitement de notre système d'étude (différentes longueurs de chaîne, différents sucres, mesure d'affinité) et celles plus ouvertes (chimie alternative afin de répondre le plus facilement possible au problème rencontré, étude d'adhésion de vésicules). Ce système possède donc la capacité d'être utilisé dans des études plus systématiques d'interactions sucres – protéines.

Conclusion

Le but de ce travail de thèse résidait en la conception d'une puce à oligosaccharides, compatible avec un système optique d'imagerie en résonance des plasmons de surface, afin d'obtenir une analyse simultanée de multiples interactions entre des protéines et des oligosaccharides en temps réel.

Après avoir fait l'état de l'art de la fonctionnalisation de surface par des oligosaccharides ainsi que leurs modes de détection, nous avons proposé la réalisation d'un système modèle, ayant comme sucre sonde, l'héparine commerciale. Le recours à la chimie a permis de transformer un sucre en molécule « sucre sonde » par l'adjonction de pyrrole, afin de le déposer sur une surface d'or par électrocopolymérisation. Cette chimie a nécessité la construction de molécules « pyrrole - bras espaceurs » compatibles avec les propriétés de reconnaissance des sucres utilisés. Pour ce faire, cinq molécules « pyrrole – bras espaceurs » ont été synthétisées, possédant chacune des propriétés physico-chimiques différentes. L'oligosaccharide modèle a été fixé aux bras de deux manières différentes, soit par couplage direct soit par couplage séquentiel. Malgré des difficultés de caractérisation liées à la fois à la structure de l'oligosaccharide et du pyrrole, il a été développé deux techniques de dosage des échantillons après couplage afin de quantifier la proportion de sucres modifiés.

Une fois les monomères « pyrrole – sucre » réalisés, ils ont été déposés sur une surface d'or compatible avec l'imagerie SPR, par la technique de l'électrospotting. Avant de tester la possible reconnaissance biologique entre le sucre greffé et la protéine SDF-1 servant de modèle d'étude, les plots formés ont été caractérisés par MEB et par AFM.

Le premier essai de reconnaissance biologique a été effectué grâce à la détection par fluorescence. Ces expériences nous ont permis de valider notre système ainsi que la chimie proposée initialement ; nous avons pu démontrer que la fluorescence observée était spécifique de l'interaction biologique grâce à la présence de témoins négatifs. La fluorescence est donc un moyen de contrôle efficace pour la préparation des échantillons.

Une fois cette validation faite, les études d'interactions biologiques suivies par SPRi ont été réalisées ; les résultats obtenus ont confirmé la spécificité de l'interaction, précédemment détectée par fluorescence. Ces travaux nous ont permis d'aller plus loin : grâce à l'acquisition en temps réel des interactions, les cinétiques d'association et de dissociation du complexe « oligosaccharide – protéine » ont pu être observées. L'étape suivante consistait en l'optimisation de certains paramètres essentiels, concernant la fluidique (la cellule d'interactions et les tubulures) ainsi que la composition des réactifs utilisés. Grâce à ces

améliorations, des cinétiques d'interactions de meilleure qualité ont pu être observées. De plus, nous avons démontré que les puces fabriquées sont régénérables sans grande perte d'activité mais aussi réutilisables sur une large période de temps (plusieurs mois).

Après ces optimisations techniques, des paramètres chimiques (influence des bras espaceurs, la concentration en sucres spottés,...) ainsi que des paramètres biologiques (concentration de protéines à injecter,...) ont pu être étudiés.

Cette approche a pu être appliquée finalement à certaines problématiques biologiques : la première concerne l'influence de la longueur des oligosaccharides sur la cinétique de reconnaissance, la seconde porte sur la comparaison de l'activité biologique de différents composés de structure proche. Par ailleurs, bien que ne figurant pas en détail dans ce manuscrit, des chimies de greffage alternatives ont été étudiées ainsi que de nouvelles applications de puces à oligosaccharides dans le domaine de l'étude de l'adhésion de vésicules synthétiques.

Tout ce travail de thèse a donc permis de proposer un procédé de fabrication et de lecture de puces à sucres performant, qui a fait l'objet d'une demande de brevet. Par la suite, des applications plus systématiques et incluant un traitement des données plus approfondi sont envisagées. Ce système de puces à sucres peut être utilisé pour des études de screening de protéines issues de milieux complexes ou par étude par compétition ; il peut être également étendu à l'utilisation d'autres sucres de nature différente. Enfin, grâce à des développements parallèles au sein du laboratoire, il est envisageable à moyen terme de mesurer plus d'un millier d'interactions simultanément, ce qui peut ouvrir des perspectives dans le domaine de l'analyse de sucres issus de la chimie combinatoire.

Partie Expérimentale

1. Matériels

1.1. Produits

1.1.1. Synthèses chimiques

- 2,5-Diméthoxy-Tétrahydrofurane : DiméthoxyTHF mixture of cis- and trans- isomers 99% (*Acros Organics*)
- Acide 6-amino-caproïque 99+% (*Acros*)
- Acide 11-amino-undécanoïque 99% (*Acros*)
- Acide acétique glacial, purex for analysis (*SDS*)
- Adipate dihydrazide 98% (*Acros*)
- Chloroforme anhydre pour analyses (*SDS*)
- Chloroforme-d, 99.9% D, stabilize avec 0.5 wt silver foil (*Aldrich*).
- Dichlorométhane, purex for analysis (*Prolabo*)
- Diméthylformamide : DMF ACS for analysis (*Carlo Erba*)
- Diméthylsulfoxyde : DMSO min. 99.5% pour analyses (*Prolabo*)
- 1-4-Dioxanne pure pour synthèses (*SDS*)
- Ethanol EtOH anhydre pour analyses (*SDS*)
- Hydrazine (NH₂-NH₂) 1M dans THF (*Aldrich*)
- Méthanol : MeOH anhydre pour analyses (*prolabo*)
- N-hydroxysuccinimide : NHS 97% (*Fluka*)
- N,N'-dicyclohexylcarbodiimide : DCC 99% (*Aldrich*)
- Révélateur de CCM sur silice : vapeur d'iode.

1.1.2. Modifications biochimiques

- Héparine HP6 : Heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa mol wt. 4,000-6,000 (*Sigma*)
- Chondroitin sulfate A sodium salt from bovine trachea approx. 70% (*Sigma*)
- Chondroitin sulfate B sodium salt, b-heparin; dermatan sulfate sodium salt, from porcine intestinal mucosa, mun. 90%, lyophilized powder (*Sigma*)
- Tétraborohydrure de sodium min. 99% (*Merck*)
- Cyanoborohydrure de sodium min. 99% (*Merck*)
- Tampon Bicarbonate de sodium (*Sigma*)
- Tampon PBS : phosphate buffered saline tablets (*Sigma*)

1.1.3. Détections

- Acide (N-[2-hydroxyéthyl]-piperazine-N'-[2-éthane]-sulfonique : HEPES min. 99.5% (*Sigma*)
- Bovine Serum Albumin : BSA, initial fractionation by heat shock, fraction V, min. 98% (*Sigma*)

- Carbazole ~95% (*Sigma*)
- Chlorure de sodium : NaCl (*SDS*)
- Acide o-phosphorique 85% (*Carlo Erba*)
- (Diméthylamino)-benzaldéhyde : DMAB 99%, A.C.S. reagent (*Aldrich*)
- Stromal cell-derived factor-1 α biotinylée ou non biotinylée : SDF-1 α Biot / SDF-1 α , donnée par le laboratoire d'enzymologie moléculaire de l'Institut de Biologie Structurale (IBS, Grenoble).
- SDS : sodium dodécyl sulfate Biochemica ultra >99% (GC) (*Fluka*)
- Monoclonal anti-Chondroitin sulfate clone CS-56, mouse ascites fluid (*Sigma*)
- Tween 20 in vitro test (*CisBio International*)
- Triton X-100: t-octylphenoxy poly(ethoxyethanol) (*Sigma*)
- Révélateur de CCM sur silice : vapeur d'iode.

1.2. Matériels

1.2.1. Chimie – "construction de la molécule sucre-sonde"

- Spectromètre UV-Visible UVIKON (*Biotech instruments*)
- Plaques de silice sur aluminium, couche 0.20mm gel de silice 60 avec indicateur de fluorescence UV₂₅₄ (*Macherey-Nagel*)
- Spectromètre RMN Brüker AM-200. Les spectres RMN ont été enregistrés à 200MHz, en utilisant les solvants comme référence interne. Les déplacements chimiques sont rapportés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Pour les spectres protons : 7.26 ppm pour CHCl₃ et 2.49 ppm pour le DMSO. Les multiplicités des signaux sont présentées de la façon suivante : s = singulet, d = doublet, t = triplet, dd = doublet de doublet, td = triplet de doublet, sl = singulet large, m = multiplet.
- Spectromètre de masse : Les spectres de masse (MS) ont été réalisés par Colette LEBRUN, en ionisation par bombardements d'électrons, au SCIB/RI du CEA, et par David LEMAIRE au LSMP/IBS par Electrospray.
- Chromatographie haute pression en phase liquide (HPLC) Hewlett Packard Series 1050.

1.2.2. Fabrication de la puce et caractérisations

- Colonne PD10 : 5 mL Econo-Pac Q cartridge (*BioRad*)
- Potentiostat EGG *Princeton Applied Research*, modèle 263.
- Table traçante *Schlumberger* 8300 Enregistreur X-Y.
- Microscope à épifluorescence BX 60 (*Olympus*), équipé d'une caméra CCD refroidie (*Hamamatsu*) et logiciel de traitement de l'image Image Pro Plus (*Media Cybernetics*)

- Microscope à balayage électronique MEB JEOL 840A.
- Microscope AFM fonctionnant à température ambiante et atmosphère ambiante, Nanotec Electronita, Madrid.
- Cantilevers Budget Sensors BS-Tp300 (constante de raideur moyenne 40N/m, fréquence de résonance environ 275kHz).
- Appareil d'imagerie SPR développé à *IOTA* (Orsay).

1.3. Fabrication des différents tampons

Chaque tampon, après la préparation, est filtré sur 0.8µm et 0.22 µm puis aliquoté en tubes de 15 ou 50 mL.

Tampon de Rinçage : 10mM HEPES pH 7,4 ; 150mM NaCl ; 0.005% Tween 20

Tampon de Blocage : tampon de rinçage + 1% BSA (p/v)

Tampon de Régénération : tampon de rinçage + 1M NaCl

Tampon de Couplage : PBS 0.01M ; pH 7,4 ; tampon préparé par dissolution de pastilles pré dosées.

Tampon d'électrocopolymérisation : Tampon phosphate 50mM, pH 6.8.

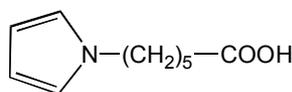
2. Méthodes

2.1. Synthèses organiques

2.1.1. Synthèses des monomères « pyrrole- hydrazides »

a) Synthèses des pyrrole-acides

a.1. Acide 5-pyrrolyl-caproïque PC-COOH (produit I) :



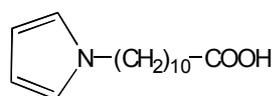
Dans un ballon muni d'un réfrigérant, on additionne le 2,5-diméthoxy-Tétrahydrofurane (490mmol, 64.85 mL), l'acide 5-amino-caproïque (430mmol, 56.33 g), l'acide acétique glacial (430 mL) et du dioxanne (570 mL). Le mélange est porté à reflux au chauffe-ballon pendant 4h. On laisse la réaction se poursuivre sous agitation magnétique toute la nuit à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite concentré à l'évaporateur rotatif sous vide. Le résidu est repris dans l'éthanol (2 fois) et concentré. Le produit pur est obtenu après une chromatographie sur colonne de silice. L'éluion de la colonne est commencée avec du dichlorométhane pur, puis poursuivie avec un mélange de dichlorométhane/éthanol (éluion croissante en éthanol : 2.5 % EtOH puis 5 % EtOH). La purification est suivie par chromatographie sur couche mince

(CCM) sur plaque de silice avec comme éluant un mélange chloroforme 90 / méthanol 10. On obtient 67.41 g d'acide 5-pyrrolyl-caproïque, soit un rendement de 86 %. Le produit sec est conservé à 4°C, à l'abri de la lumière.

Caractérisation par RMN :

¹H-RMN (200MHz ; CDCl₃ / TMS) : pics caractéristiques de la chaîne alkyle [δ (ppm) = 1,72 (m, 6H, -CH₂-(CH₂)₃-CH₂-) ; 2,34 (t, 2H, -CH₂-CO₂H) ; 3,87 (t, 2H, -CH₂-N)] ; du pyrrole [δ (ppm) = 6,13 (dd, 2H, 3-H et 4-H) ; 6,64 (dd, 2H, 2-H et 5-H)].

a.2. Acide 10-pyrrolyl-undécanoïque PU-COOH (produit II):



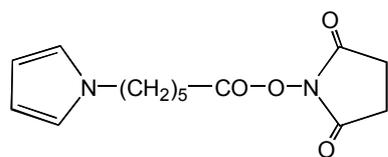
Dans un ballon muni d'un réfrigérant, sont additionnés le 2,5-diméthoxy-THF (490mmol, 64.85 mL), l'acide 10-amino-undécanoïque (430mmol, 86.56 g), l'acide acétique glacial (430 mL) et du dioxane (570 mL). Le mélange est porté à reflux au chauffe-ballon pendant 4h. On laisse la réaction se poursuivre sous agitation magnétique toute la nuit à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite concentré à l'évaporateur rotatif sous vide. Le produit pur est obtenu après une chromatographie sur colonne de silice. L'élution de la colonne est commencée avec du dichlorométhane pur, le produit II étant encore plus apolaire que le produit I, il n'y a pas besoin de faire un véritable gradient en méthanol. La purification est suivie par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de silice avec chloroforme 90 / méthanol 10 comme éluant. On obtient 70.0 g d'acide 10-pyrrolyl-undécanoïque, soit un rendement de 65 %. Le produit sec est conservé à 4°C, à l'abri de la lumière.

Caractérisation par RMN :

¹H-RMN (200MHz ; CDCl₃ / TMS) : pics caractéristiques de la chaîne alkyle [δ (ppm) = 1,64 (m, 14H, -CH₂-(CH₂)₈-CH₂-) ; 2,34 (t, 2H, -CH₂-CO₂H) ; 3,86 (t, 2H, -CH₂-N)] ; du pyrrole [δ (ppm) = 6,13 (dd, 2H, 3-H et 4-H) ; 6,64 (dd, 2H, 2-H et 5-H)].

b) Synthèse des pyrrole-esters activés

b.1. Pyrrole-[6]- N-hydroxysuccinimide : PC-NHS (produit III) :



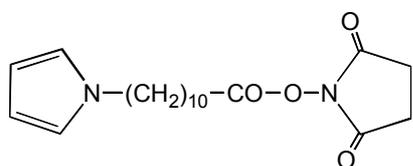
Dans un ballon, sont mélangés le produit I (144mmol, 26.055g), le NHS (144mmol, 16.56 g), la DCC (159mmol, 32.75 g) et le DMF (500 mL). La réaction est mise sous agitation durant toute la nuit, à température ambiante. La réaction est suivie par CCM, éluant :

chloroforme 95 / méthanol 5. Le mélange est ensuite filtré pour éliminer la DCU formée. Le filtrat est ensuite séché sous vide. Le produit est par la suite utilisé tel quel, sans purification supplémentaire, pour ne pas risquer d'hydrolyser l'ester, d'où une absence de calcul du rendement de la réaction.

Caractérisation par RMN :

¹H-RMN (200MHz ; CDCl₃ / TMS) pics caractéristiques de la chaîne [δ (ppm) = 1,72 (m, 6H, -CH₂-(CH₂)₃-CH₂-) ; 2,53 (t, 2H, -CH₂-CO)] ; du NHS [δ (ppm) = 2,88 (tt, 4H, CH₂-CH₂)] ; du pyrrole [δ (ppm) = 3,87 (t, 2H, -CH₂-N) ; 6,13 (dd, 2H, 3-H et 4-H) ; 6,64 (dd, 2H, 2-H et 5-H)].

b.2. Pyrrole-[11]- N-hydroxysuccinimide : PU-NHS (produit IV):



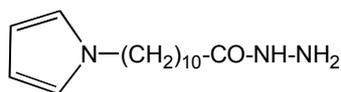
Suivant le même protocole que précédemment, on mélange le produit **II** (95mmol, 23.9 g), le NHS (95mmol, 10.925 g) et la DCC (104.5mmol, 21.52 g) dans 500 mL de DMF. La réaction est mise sous agitation durant toute la nuit, à température ambiante. Elle est suivie par CCM dans un mélange chloroforme 95 / méthanol 5. Le mélange réactionnel est ensuite filtré pour éliminer la DCU formée. Le filtrat est ensuite séché sous vide. Le produit est utilisé par la suite tel quel, sans purification supplémentaire, pour ne pas risquer d'hydrolyser l'ester formé (absence de rendement).

Caractérisation par RMN :

¹H-RMN (200MHz ; CDCl₃ / TMS) pics caractéristiques de la chaîne [δ (ppm) = 1,64 (m, 6H, -CH₂-(CH₂)₈-CH₂-) ; 2,6 (t, 2H, -CH₂-CO) ; 3,86 (t, 2H, -CH₂-N)] ; du NHS [δ (ppm) = 2,89 (tt, 4H, CH₂-CH₂)] ; du pyrrole [δ (ppm) = 3,86 (t, 2H, -CH₂-N) ; 6,13 (dd, 2H, 3-H et 4-H) ; 6,65 (dd, 2H, 2-H et 5-H)].

c) Synthèse des pyrrole-Hydrazides

c.1. Pyrrole Undecanoyl Hydrazide : PUH (produit V)



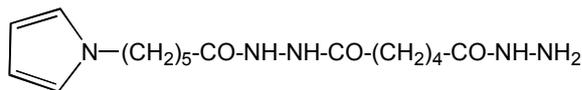
Dans un ballon, on met l'ester activé PU-NHS **IV** (20mmol, 6.96g), l'hydrazine 1 M dans THF (20mmol, 20 mL), en mélange stœchiométrique, dans le DMF (180 mL), afin d'éviter au maximum la formation de sous-produits (« dimères de pyrrole »). Le mélange est mis sous agitation toute la nuit, à température ambiante, en suivant la réaction par CCM (CHCl₃ 90 / MeOH 10). Ensuite, le DMF est évaporé à l'aide de l'évaporateur rotatif sous vide. Plusieurs produits sont observés : PUH, PUHUP (dimères), des traces d'ester activé PUNHS **IV**. On a tenté de séparer ces produits sur colonne de silice, en faisant passer d'abord 1% DMSO dans CH₂Cl₂, puis en

effectuant un gradient (2%, 5% et 10%). Or, le produit PUH sort en même temps que les autres produits, quelque soit le pourcentage de DMSO. Le rendement n'a donc pas été calculé.

Caractérisation par Spectrométrie de masse :

T = 200°C, solvants : CH₂Cl₂ / DMSO, m/z = 266.3 (M+H)⁺ PUH ; 348.1 (composé IV) ; 251 (composé II), 225.3 (DCU).

c.2. Pyrrole Caproyl Adipate Hydrazide : PCAH (produit VI)



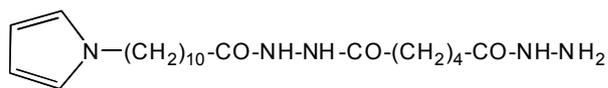
Sont mis en présence, dans un ballon, le PCNHS **III** (5mmol, 1.4 g) et l'adipate dihydrazide (5mmol, 0.87 g), dans 50 mL de DMF. Etant donné que l'adipate se dissout mal dans le DMF, 15 mL H₂O ont été rajoutés. Le tout est mis sous agitation toute la nuit, à température ambiante ; il se forme un dépôt blanc. La CCM réalisée dans CHCl₃ 95 / MeOH 5, en fin de réaction, nous indique que tout l'ester activé PC-NHS a été consommé ou hydrolysé. Le mélange réactionnel est filtré sur fritté, 30 mg de solide correspondant au NHS sont récupérés, insolubles dans un mélange DMF/ H₂O. Le mélange DMF/ H₂O est évaporé du filtrat, on obtient 2.1 g de produit brut. On purifie la réaction sur colonne de silice, on élue dans un gradient de DMSO (0-50 %) dans CH₂Cl₂. On arrive à éliminer l'adipate ainsi qu'une majorité du dimère PCAHACP. La Spectrométrie de Masse (SM) montre encore des traces de dimère. La masse obtenue de produit est 750 mg, soit un rendement d'environ 44 %.

Caractérisation du produit brut en spectrométrie de masse:

3 pics caractéristiques : 173.1 (M-H)⁺ soit 174.1 pour l'adipate ; 336.2 (M-H)⁺ soit 337.2 pour le PCAH ; 399.2 (M-H)⁺ soit 400.2 pour le dimère PCACP.

Caractérisation par RMN :

¹H-RMN (200MHz ; CDCl₃ / TMS) pics caractéristiques de la chaîne adipate [δ (ppm) = 1.42 (tt, 4H, -CH₂-(CH₂)₂-CH₂-) ; 1.95 (t, 2H, -CH₂-CO-NH-NH₂) ; 2.04 (t, 2H, -CH₂-CO-NH-NH-) ; 4.12 (sl, 2H, -NH-NH₂) ; 8.9 (s, 3H, -NH-NH- et NH-NH₂).]; de la chaîne alkyle [δ (ppm) = 2.46 (t, 2H, -CH₂-CO-NH-NH-) ; 3.78 (t, 2H, -CH₂-N)]; du pyrrole 5.91 [δ (ppm) = (dd, 2H, 3-H 4-H) ; 6,67 (dd, 2H, 2-H 5-H)].

c.3. Pyrrole Undecanoyl Adipate Hydrazide : PUAH (produit VII)

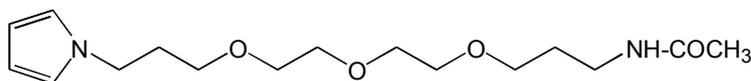
Dans un ballon, sont mis à réagir l'ester activé PU-NHS **IV** (5mmol, 1.74 g) avec l'adipate dihydrazide (5mmol, 0.87 g) dans 50 mL de DMSO, durant toute la nuit, à température ambiante. La réaction est suivie par CCM dans CHCl₃ 90 / MeOH 10. Le DMSO est ensuite évaporé, à la pompe à vide sous agitation et chauffage. On obtient 6.2 g de produit brut, le produit étant fragile, le chauffage sous vide n'a pas été plus poussé, pour ne pas risquer de détruire le produit, en finissant d'évaporer le solvant. On purifie la réaction sur colonne de silice, on élue dans un gradient de DMSO (de 0 à 20 %) dans CH₂Cl₂. On arrive à éliminer l'adipate ainsi qu'une majorité du dimère PUAHAUP. La SM montre encore des traces de dimère. La masse obtenue de produit est 840 mg, soit un rendement estimé d'environ 41 %.

Caractérisation du produit brut en spectrométrie de masse:

3 pics caractéristiques : 175.1 (M+H)⁺ soit 174.1 pour l'adipate ; 408.2 (M+H)⁺ soit 407.2 pour le PUAH ; 641.2 (M+H)⁺ soit 640.2 pour le dimère PUAUP.

Caractérisation par RMN :

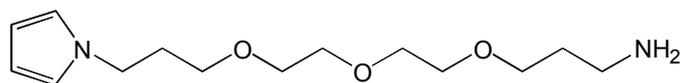
¹H-RMN (200MHz ; CDCl₃ / TMS) pics caractéristiques de la chaîne adipate [δ (ppm) = 1.43 (tt, 4H, -CH₂-(CH₂)₂-CH₂-) ; 1.94 (t, 2H, -CH₂-CO-NH-NH₂) ; 2.03 (t, 2H, -CH₂-CO-NH-NH-) ; 4.12 (sl, 2H, -NH-NH₂) ; 8.9 (s, 3H, -NH-NH- et NH-NH₂)]; de la chaîne alkyle [δ (ppm) =; 2.49 (t, 2H, -CH₂-CO-NH-NH) ; 3.79 (t, 2H, -CH₂-N)]; du pyrrole [δ (ppm) = 5.9 (dd, 2H, 3-H 4-H) ; 6,66 (dd, 2H, 2-H 5-H)] .

2.1.2. Synthèse du pyrrole-aminea) pyrrole-trioxatridecane-acétamide (produit VIII):

Dans un ballon muni d'un réfrigérant on additionne : du 2,5-diméthoxyTHF (13.216 g ; 0,1mole), du 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine (66 mL ; 0,3mole), de l'acide acétique glacial (130 mL), du dioxanne (220mLl). Le mélange est porté à reflux au chauffe-ballon pendant 6h. On laisse la réaction se poursuivre sous agitation magnétique toute la nuit à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite concentré à l'évaporateur rotatif sous vide. Le résidu est repris par deux fois dans 100 mL d'éthanol et concentré afin d'éliminer le maximum d'acide acétique. Le résidu est ensuite repris dans 200mL de dichlorométhane et lavé avec 2 fois 100 mL d'hydrogénocarbonate de sodium

(NaHCO₃) à 10 % puis par deux fois 100 mL d'eau distillée. La phase organique est récupérée et séchée. La phase aqueuse étant, elle aussi, très colorée, subit un traitement au carbonate de potassium (K₂CO₃) pour la neutraliser, puis une nouvelle extraction au dichlorométhane est réalisée. La nouvelle phase organique est récupérée et concentrée. Le produit pur est obtenu après une chromatographie sur colonne de silice. L'élution de la colonne est commencée par du dichlorométhane pur et poursuivie par un mélange dichlorométhane/méthanol : 98% - 2%. En augmentant la proportion de méthanol dans l'éluant, la dernière fraction sortie correspond au pyrrole-amine non protégé. On obtient 14.1 g du produit **VIII** d'où un rendement de 45 %. Le produit obtenu est toujours un liquide brun.

b) pyrrole-trioxatridecane-amine, produit IX: Déprotection de l'acétylamino-pyrrole



Dans un ballon muni d'un réfrigérant, on additionne du produit **VIII** (14.1 g ; 45mmoles) dans 300 mL de potasse aqueuse à 10 %. Le mélange est chauffé à reflux pendant 2h. Le milieu réactionnel, une fois refroidi, est extrait par 3 x 150 mL de dichlorométhane. La phase organique est récupérée et concentrée. La purification se fait sur colonne de silice : l'élution est commencée avec du CH₂Cl₂ pur, puis poursuivie avec un gradient croissant en méthanol (élution du produit : 95% - 5%). La masse obtenue du produit **VI** est de 10.13 g. Le rendement de la synthèse est donc de 83 %.

Caractérisation du produit brut en spectrométrie de masse, Electrospray:

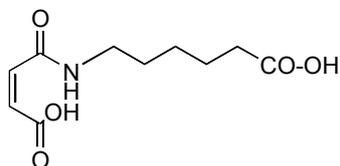
3 pics caractéristiques : 343.05 (M+Na)⁺ et 321.09 (M+H)⁺ soit 320 pour le dipyrrole-trioxatridecane ; 335.07 (M+Na)⁺ et 313.08 (M+H)⁺ soit 312 pour le produit **VIII**; 271.3 (M+H)⁺ soit 270.3 pour le produit **IX**.

Caractérisation par RMN :

¹H-RMN (200MHz ; CDCl₃ / TMS) pics caractéristiques de la chaîne [δ (ppm) = 1,70 (q, 2H) ; 1,90 (q, 2H) ; 2,83 (t, 2H) ; 3,34 (t, 2H) ; 3,34 (m, 4H) ; 3,53-3,72 (m, 10H) ; 3,96 (t, 2H)] ; du pyrrole [δ (ppm) = 6,08 (dd, 2H, 3-H 4-H) ; 6,62 (dd, 2H, 2-H 5-H)].

2.1.3. Synthèse du pyrrole-maléimide

a) Acide maléamique N-substitué produit X:



On introduit dans un ballon : l'acide 6-amino-caproïque (29,66 g ; 0,226 mole), l'anhydride maléique (22,18 g ; 0,226 mole) puis

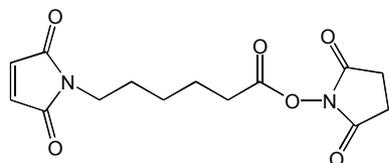
l'acide acétique glacial (450 mL). La réaction se fait sous agitation magnétique pendant 20 heures. Le produit (poudre blanche) est obtenu après filtration et séchage sur fritté, puis purifié par recristallisation dans de l'éthanol. On obtient 40g de produit soit un rendement final de 81 %.

Caractérisation par spectrométrie de masse et par RMN :

¹H-RMN (200MHz ; DMSO / TMS) pics caractéristiques de la chaîne [δ (ppm) = 1,23-1,50 (m, 6H, 7-CH₂, 8-CH₂, 9-CH₂) ; 2,16 (t, 2H, J = 7,26Hz, 2-CH₂) ; 3,1 (m, 2H, 6-CH₂)] ; de l'acide maléimique [δ (ppm) = 6,18 (d, 1H, J = 12,6 Hz, =CH) ; 6,35 (d, 1H, J = 12,6 Hz)].

(M + H⁺) = 230. Masse exacte calculée = 229,1

b) Ester activé du Maléimide Produit XI:



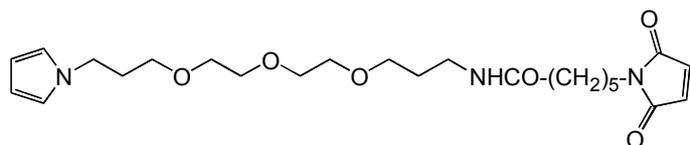
Le mélange d'acide maléimique (4 g ; 17.5mmole), de DCC (7.4 g ; 36mmole), de NHS (4.2 g ; 36mmole) dans le DMF (150 mL) est mis sous agitation magnétique à température

ambiante pendant 96 heures, puis filtré sous pression réduite. Le filtrat (liquide brun) est évaporé à sec et le résidu est purifié sur colonne de silice. L'éluion du produit se fait à l'acétate d'éthyle pur. On obtient environ 1.62 g du produit **XI**. Le rendement de la réaction est de 30 %.

Caractérisation par RMN :

¹H-RMN (200MHz ; CDCl₃ / TMS) pics caractéristiques de la chaîne [δ (ppm) = 1,20-1,41 (m, 6H, 3-H, 4-H et 5-H) ; 2,14 (t, 2H, CH₂ -CONHS) ; 3,1 (t, 2H, CH₂-N)] ; du NHS [δ (ppm) = 2,69 (tt, 4H, CH₂-CH₂)]; du maléimide [δ (ppm) = 6,35 (s, 2H, 3-H 4-H)].

c) Pyrrole-trioxatridecane-maléimide produit XII:



Le mélange d'ester activé du maléimide (**XI**) (1.62 g ; 5.25mmole) et de (**IX**) (1.42 g ; 5.25mmole) dans

25 mL DMF est mis sous agitation pendant une nuit à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivie par CCM (CHCl₃ 90 % / MeOH 10 %).Après évaporation du DMF, le produit est purifié par chromatographie sur colonne de silice. L'éluion commencée par du

dichlorométhane pur est poursuivie par un gradient en méthanol (élution du produit : 98% / 2%). La masse du produit **XII** obtenu est de 1.1 g, soit un rendement de 45 %.

Caractérisation par spectrométrie de masse :

3 pics caractéristiques : 486.3 (M+Na)⁺ et 464.1 (M-H)⁺ soit 465 pour le produit **XII** ; 225.1 (M+H)⁺ correspondant à la DCU.

Caractérisation par RMN:

¹H-RMN (200MHz ; CDCl₃ / TMS) pics caractéristiques de la chaîne [δ (ppm) = 1,70 (q, 2H) ; 1,90 (q, 2H) ; 2,83 (t, 2H) ; 3,53-3,72 (m, 10H)]; du pyrrole [δ (ppm) = 6,1 (dd, 2H, 3-H 4-H) ; 6,6 (dd, 2H, 2-H 5-H)] ; du maléimide [δ (ppm) = 6,6 (s, 2H, 3-H 4-H)].

2.2. Obtention d'oligosaccharides à partir de l'Héparine HP6

2.2.1. Préparation d'oligosaccharides d'héparine

Ce protocole de préparation a été mis en place par l'équipe de l'IBS et publié¹⁸⁶. Une digestion de l'héparine HP6 (1 g) est réalisée par une enzyme Héparinase I (8 milliunités/mL) dans 15 mL d'une solution de BSA à 0.1 mg/mL (2 mM CaCl₂, NaCl 50 mM et tampon Tris 5 mM, pH 7.5), durant 54h à 25°C. La réaction enzymatique est stoppée en chauffant la solution à 100°C pendant 5 min. Les produits de digestion sont ensuite séparés en fonction de leur taille, sur une colonne Bio-Gel P-10 (4.4 x 150 cm), qui est équilibrée avec une solution de NaCl à 0.25 M et éluée à 1 mL/min. Les produits élués sont détectés par absorbance à λ = 232 nm, ils sont constitués de séries d'oligosaccharides de taille uniforme, allant de dp2 (2 unités disaccharidiques) à dp18. Afin d'assurer l'homogénéité des échantillons, seulement le milieu de chaque pic est collecté et chaque fraction isolée est re-chromatographiée sur une colonne de gel de filtration pour éliminer toute contamination possible. Les échantillons sont dialysés contre H₂O (distillée) et quantifiés par test colorimétrique, en utilisant la méthode de Bitter et Muir¹⁹⁷.

2.2.2. Préparation d'oligosaccharides dp12 thiolés : couplage de la cystamine

L'oligosaccharide dp12 (5μL à 100 mg/mL) est mélangé à 100 μL de cystamine (75.6 mg/mL), auquel sont rajoutés 350 μL de tampon bicarbonate de sodium (0.1 M, EDTA 2 mM, pH 8.3) et 50μL de cyanoborohydrure de sodium (100 mg/mL). La réaction se fait à 37°C pendant 48 heures. Une fois le couplage réalisé, on effectue un dessalage sur une colonne PD10, puis les échantillons sont collectés et lyophilisés.

Après avoir couplé la cystamine, il faut rompre le pont disulfure. Pour ceci, une réduction est effectuée en utilisant un réducteur le tétraborohydrure de sodium. Le protocole est le suivant : l'échantillon sec est mélangé à 50 μL de tampon PBS pH 8,5 et à 5 μL de NaBH_4 (1 M dans H_2O). Ce mélange est laissé à température ambiante pendant 45 min. Puis est rajouté de l'acide chlorhydrique (4.2 μL 1M dans H_2O), à nouveau, le mélange est laissé 10 min à température ambiante. Enfin, l'échantillon est traité par la soude NaOH (0.8 μL à 1M) et du tampon PBS (40 μL à pH 8,5).

Le couplage est alors dosé par la réaction utilisant le réactif de Ellman, cette technique permet de doser les groupements thiol. Le rendement du couplage oligosaccharide-SH est de 85 %. Afin de vérifier la valeur du rendement, un contrôle avec la biotine-maléimide (réagissant sur la groupe thiol) est fait puis révélé sur dot blot.

2.3. Couplage entre les « Bras espaceur - pyrrole » synthétisés et l'oligosaccharide

2.3.1. Stratégie I : Couplages directs

Les « bras espaceurs » utilisés lors de ce couplage sont le PUAH, le PCAH, le PUAH, le $\text{Py}\sim\text{NH}_2$ et le $\text{Py}\sim\text{Maléimide}$ synthétisés précédemment. Les sucres mis en jeu sont l'héparine commerciale dite HP6 (~ 6kDa), le dp12, fragment de cette héparine HP6 (~3kDa), le dp12-SH (thiolé), la chondroïtine sulfate CS (32-45kDa), le dermatan sulfate DS (37kDa) et les différents fragments d'HP6 de longueur variable dp6 (~1500Da), dp8 (~1500Da), dp10(~2kDa), dp14(~3.5kDa), dp16(~4kDa).

a) Réaction de couplage 1 : Couplage par réaction entre l'hydrazide et l'aldéhyde

Par cette réaction, le bras espaceur est fixé par sa fonction hydrazide à la fonction aldéhyde du sucre, le sucre étant en équilibre entre une forme pyranose et une forme ouverte comportant une fonction aldéhyde.

Dans un tube eppendorf, le réactif « Pyrrole-Hydrazide » (50 mM dans DMSO, 250 μL) est mélangé au sucre HP6 (20 mM dans du tampon acétate 2 M pH 4.2, 12.5 μL) et le réducteur cyanoborohydrure de sodium (4M dans EtOH, 2.5 μL) est ajouté. Les échantillons sont placés à l'étuve à 56°C durant 48h, après 6-8h de réaction, un nouvel ajout du réducteur est fait (2.5 μL).

A l'issue de la réaction, on fait un dessalage des échantillons, sur une PD10 (mini colonne d'exclusion). Le protocole est le suivant : le volume de l'échantillon est complété à 500 μL avec H_2O , les « pyrrole – hydrazide » n'ayant pas réagi précipitent, alors l'échantillon est centrifugé et seul le surnageant est récupéré (fraction contenant les oligosaccharides modifiés et naturels). Puis on passe successivement sur la colonne les 500 μL de l'échantillon (surnageant), puis 5 x 500 μL H_2O (qu'on élimine), puis à nouveau 4 x 500 μL H_2O , fractions que l'on collecte, puis la colonne est lavée avec 20 mL H_2O , pour nettoyer la colonne de toutes les petites molécules. Ensuite une lecture est effectuée au spectromètre UV-visible, à $\lambda = 232$ nm, pour vérifier la présence du sucre. Les fractions collectées sont alors regroupées et séchées en les passant au « speed'vac » et finalement pesées.

b) Réaction de couplage 2 : Couplage par réaction entre l'amine et l'aldéhyde = Amination réductrice

Par cette réaction, le bras espaceur est fixé par sa fonction amine primaire à l'aldéhyde du sucre (réaction d'amination réductrice). Ici, une différence est notable par rapport au couplage 1 : étant donné que le composé « pyrrole-amine » est soluble dans l'eau, il n'y plus besoin d'utiliser le DMSO.

Dans un tube eppendorf, le réactif « pyrrole ~ amine » (100mM dans Tp Bicarbonate, pH = 7.8, 50 μL) est mélangé au sucre HP6 (20 mM dans H_2O , 16.5 μL séché préalablement), du Tp bicarbonate (175 μL) et le réducteur cyanoborohydrure de sodium (300 mg/mL dans Tp Bicarbonate, 50 μL) est ajouté. Les échantillons sont placés à l'étuve à 37°C durant 48h, après 6-8h de réaction, un nouvel ajout du réducteur est fait (25 μL).

A l'issue de la réaction, on fait un dessalage des échantillons, sur une PD10 (*cf.* protocole 2.3.1.a). Ensuite une lecture est effectuée au spectromètre UV-visible, à $\lambda = 232$ nm, pour vérifier la présence du sucre. Puis les fractions collectées sont regroupées et séchées en les passant au « speed'vac » et finalement pesées.

c) Réaction de couplage 3 : Couplage par réaction entre le maléimide et le thiol greffé sur l'oligosaccharide

Par cette réaction, le « pyrrole - maléimide » (**XII**) est fixé au sucre, par le couplage entre la fonction thiol ajoutée préalablement à l'extrémité de l'oligosaccharide et le maléimide du bras espaceur.

Dans un tube eppendorf, le « pyrrole - maléimide » (50 mM dans DMF, 12.5 μ L) est mélangé au sucre dp12-cystamine « dp12-SH » (8.5 μ M dans H₂O, 25 μ L) dans 25 μ L H₂O. On laisse évoluer le mélange durant 2h à température ambiante.

A l'issue de la réaction, on fait un dessalage des échantillons, sur une PD10 (*cf.* protocole 2.3.1.a). Ensuite une lecture est effectuée au spectromètre UV-visible, à $\lambda = 232$ nm, pour vérifier la présence du sucre. Puis les fractions collectées sont regroupées et séchées en les passant au « speed'vac » et finalement pesées.

2.3.2. Stratégie II : couplage séquentiel du bras espaceur-sucre

a) Première réaction de couplage

Dans un tube eppendorf, sont mélangés l'adipate hydrazide (0.5 M, 50 μ L) au sucre lyophilisé (soit HP6 3 mg, soit dp12 1.8 mg), le réducteur NaCNBH₃ (4 M dans EtOH, 20 μ L) est rajouté ; les échantillons et leurs témoins négatifs sont placés à l'étuve à 56°C durant 96h, après 12-18h de réaction, on rajoute 20 μ L de réducteur NaCNBH₃.

A l'issue de la réaction, un dessalage des échantillons est réalisé sur une PD10 (*cf.* protocole 2.3.1.a). Ensuite une lecture est effectuée au spectromètre UV-visible, à $\lambda = 232$ nm, pour vérifier la présence du sucre. Puis les fractions collectées sont regroupées et séchées en les passant au « speed'vac » et finalement pesées et dissoutes à une concentration proche du millimolaire.

b) Deuxième réaction de couplage

Après avoir fixé l'adipate, on fixe le groupe pyrrolé. Dans un tube eppendorf, 10 μ L du sucre : dp12 (12 mg/mL) ou HP6 (24 mg/mL) sont additionnés à 10 μ L de PUNHS-SO₃⁻ [molécule synthétisée au laboratoire par André Roget] (50 mM dans H₂O) et 30 μ L de DMSO. On laisse 1h à température ambiante, puis pour stopper la réaction, le volume est complété à 500 μ L avec H₂O, puis les échantillons sont passés sur PD10 (*cf.* protocole 2.3.1.a). Ensuite, on regroupe les fractions collectées et on les lyophilise en les passant au « speed'vac ».

2.3.3. Couplage sur billes (couplage direct)

Par l'utilisation de billes, nous souhaitons tester un couplage sur support, afin de comparer l'efficacité du couplage direct en solution.

Le protocole est le suivant :

Tout d'abord les billes (400 μL), billes de chromatographie DEAE-Sephacel¹⁸⁶, sont préparées par centrifugation, le surnageant est enlevé, puis les billes sont lavées deux fois avec 200 μL de H_2O . Une fois le surnageant de lavage retiré, l'oligosaccharide (HP6 ou dp12, 100 μL à 20 mM dans H_2O) est ajouté aux billes et incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Le tout est ensuite centrifugé et le surnageant enlevé. Pour vérifier la fixation de l'oligosaccharide sur les billes, la densité optique (D.O. à $\lambda = 232 \text{ nm}$) de la solution contenant le sucre est mesurée avant l'incubation, de même une mesure est réalisée après incubation, sur le surnageant.

Une fois la préparation des billes achevées, 5 μL de Tp Acétate de sodium à $\text{pH} = 4,2$ est ajouté, suivi par l'ajout de la solution de « bras espaceurs – pyrrole » (PUH, 200 μL à 50 mM dans le DMSO) et du réducteur NaCNBH_3 (4 M dans EtOH, 15 μL).

Les échantillons sont ensuite placés à 56°C pendant 48h. En fin de réaction, les tubes sont rincés plusieurs fois à l'eau (problème de solubilité des molécules « pyrrole - bras espaceur »), le surnageant étant à chaque fois retiré. Les billes sont alors mélangées à une solution de NaCl 1M, afin de décrocher HP6 du support. Le surnageant est repris et passé sur colonne PD-10 pour être désaler. Les échantillons alors collectés sont séchés.

2.3. Quantification du pyrrole et dosage de l'acide uronique du sucre

2.3.1. Dosage du couplage par la biotine-LC-Hydrazine.

La Biotine-[Longue chaîne]-Hydrazine sert à doser *qualitativement* le rendement de la réaction de couplage précédente.

Dans un eppendorf, on additionne 10 μL de l'échantillon 6 mg/mL (HP6 témoin, PUH, PUAH ou PCAH) 2.5 μL de Biotine-LC-Hz (18.6 mg/mL de DMSO), auxquels on ajoute 12.5 μL H_2O , on laisse les échantillons 24h à température ambiante.

A l'issue de la réaction, on fait un dessalage des échantillons, sur une PD10 (*cf.* protocole 2.3.1.a), puis on fait 5 dilutions en cascade (rapport 1/3). Ces échantillons dilués sont déposés sur une membrane Zeta Probe GT. Ensuite, on bloque la membrane par 5 % de caséine dans du TBS 1X, à 4°C toute la nuit.

Au matin, on remplace la solution par de l'extravidine diluée au 1/4000^e dans du TBS Tween 0.05 %, on laisse incuber 1H. On effectue 4 lavages successifs (15 min) dans du TBS Tween 0.05 %. On fait ensuite une détection ECL Western Blotting, en laissant incuber la membrane avec les réactifs de détection durant 4 min, puis on bloque la membrane dans du film transparent. Celle-ci est mise en contact avec un « Hyperfilm » par pression durant 30s et révélées par un développeur compact X2.

2.3.2. Dosage de l'acide uronique du sucre

Les échantillons testés sont ceux issus du couplage « pyrrole - bras espaceur – sucre », étant dilués à trois concentrations différentes : 5-10-20 µg/mL.

La gamme en sucre HP6 comporte six points : 0-5-10-20-30-50 µg/mL.

Référence : Bitter and Muir, 1962, *Anal. Biochem.*, 4 : 330-334.

Le protocole est le suivant :

Préparer du tétraborate de sodium hydraté à 0.025M dans l'acide sulfurique (peser 9.5mg/mL d'acide sulfurique)

Placer 250µL de ce réactif dans un tube en verre, refroidir à 4°C.

Ajouter lentement l'échantillon sur la surface : 50µL.

Fermer les tubes (bouchon vis + joint téflon).

Agiter lentement puis rapidement, en restant à basse température.

Incuber 10 min dans l'eau bouillante.

Refroidir à température ambiante.

Ajouter 10µL de carbazole (0.125% dans EtOH ou MeOH).

Agiter les tubes et incuber 15 min dans l'eau bouillante.

Refroidir à température ambiante.

Lire l'Absorbance à $\lambda = 530\text{nm}$.

La valeur du blanc (contre l'acide sulfurique) ne doit pas dépasser 0.025 en DO.

2.3.3. Détermination de la quantité de pyrroles couplés aux sucres

Les échantillons testés sont ceux issus du couplage pyrrole étant dilués à trois concentrations différentes dans H₂O: 2.5 µM, 5 µM et 10 µM.

La gamme étalon en « ODN – pyrrole » (dilués dans H₂O) comporte sept points : 2 μM, 1 μM, 500 nM, 250 nM, 125 nM, 62.5 nM et 0 nM.

La méthode de dosage est dérivée de celle faite par Wolowacz et al.²⁰¹

Le protocole est le suivant : le mélange réactionnel est composé de 50 μL de 1 % de 4-(diméthylamino)-benzaldéhyde dans l'acide phosphorique, 400 μL de l'échantillon à doser et 550 μL d'acide acétique. La réaction est placée à 40°C pendant 2h. A la sortie de l'étuve, la lecture de l'absorbance est faite à $\lambda = 559$ nm.

2.3.4. Purification par HPLC

Les échantillons issus du couplage (qu'il soit direct ou séquentiel) sont tout d'abord lyophilisés, puis repris dans le tampon A de l'HPLC.

Les tampons utilisés pour l'élution sont le Tampon A (Tp A: acétate de triéthylammonium 25 mM, 5 % Acétonitrile) et le Tp B (acétate de triéthylammonium 25 mM, 50 % Acétonitrile).

Le gradient d'élution est le suivant : départ du gradient 100 % Tp A, à 5 min 10 % Tp B, à 15 min 50 % Tp B, à 17 min 100 % Tp B, à 19 min 100 % Tp B et à 20 min 0 % Tp B. Les deux minutes à 100 % Tp B servent à purger la colonne afin d'éliminer toute trace d'échantillons. Au début de chaque utilisation de l'appareil, il est nécessaire de réaliser des blancs : le premier est l'injection de H₂O, le deuxième Tp A seul (pour vérifier l'homogénéité du tampon utilisé) et le dernier est un témoin : injection de 20 μL de HP6 1 mM.

Ensuite, chaque échantillon, une fois repris dans le tampon A, est injecté à la concentration et au volume voulus.

2.4. Synthèse électrochimique du polypyrrole fonctionnalisé : *Electrospotting*

La réaction d'électrospotting se fait en utilisant le montage de « spotting » (présenté au chapitre II.1.1.4.) et le logiciel Polypotter (développé au laboratoire). Les surfaces de verre des prismes ou des lames de microscope sont recouvertes d'une surface de Cr de 1 nm sur laquelle est déposé 48 nm d'or. La surface d'or sur laquelle est réalisé le dépôt des plots de polymère sert d'électrode de travail, un fil de platine de diamètre 0.6 mm situé dans le cône sert de contre-électrode (dans ce montage, il n'y a pas d'électrode de référence). Tout ce système électrochimique est alors connecté au potentiostat, lui-même relié à une table traçante.

La copolymérisation s'effectue avec 10 μL d'une solution contenant 20 mM Pyrrole dans du tampon phosphate 50 mM pH 6.8 + l'échantillon à spotter dans sa concentration désirée (de l'ordre du nanomolaire) ; ce volume est contenu dans un pipetman Gilson de 200 L rattaché à une plateforme dirigée par 3 moteurs reliés un ordinateur permettant de les piloter.

Le film est synthétisé sur la couche d'or suite à une impulsion électrique, « pulse » (durant 250 ms pour les prismes et 500 ms pour les lames), montant à 2V.

Une fois la solution prélevée par la pipette, l'utilisateur doit vérifier la forme du ménisque à l'extrémité inférieure du cône. Le ménisque de solution à l'extrémité du cône va permettre d'établir le contact électrique ; si celui-ci est trop gros, il risque de baver sur la surface créant, au final, un plot de trop grand diamètre, de même s'il est trop petit, les bords en plastique du cône devront venir s'appuyer sur la surface d'or, risquant de provoquer une déformation du bout du cône, voire sa planéité, ce qui entraînerait la construction de plots de mauvais qualité pour tout le reste de la matrice.

Une fois ces vérifications faites, le cône est alors déplacé vers la position initiale : en haut à gauche de la matrice à réaliser. Le premier dépôt sert aussi d'étape d'optimisation des paramètres : ainsi quand le cône a atteint sa première position de dépôt, le cône est approché d'abord par les moteurs vers la surface, puis un réglage fin (de l'ordre de quelques micromètres sur l'axe z) est fait manuellement afin de mettre en contact le ménisque formé et la surface d'or et non d'écraser l'extrémité du cône sur la surface. Il y a donc une vérification visuelle du contact, puis une deuxième vérification est faite en constatant le contact électrique sur l'affichage du potentiostat (d'où la vérification initiale de la forme du ménisque).

Une fois l'impulsion faite, le cône est retiré de la surface grâce aux trois moteurs de la plateforme (x, y, z), revenant à sa position initiale, nous permettant de le rincer et de le recharger avec une nouvelle solution de pyrrole + pyrrole fonctionnalisé. Les différents spots (ou plots) sont tous réalisés de la même façon, représentant une matrice définie au préalable, *via* le logiciel de contrôle. Une fois l'électrospotting réalisé, on rince la surface dorée à l'eau, on la sèche puis on la conserve à 4°C.

2.5. Phase de détection en fluorescence.

Après avoir effectué la synthèse électrochimique, la zone des plots sur la lame d'or est délimitée par une barrière hydrophobe faite à l'aide d'un feutre colle.

Les plots sont ensuite lavés par deux passages de 1 mL de tampon de rinçage. Puis on les « bloque » en mettant 100 µL de tampon de blocage durant 30 min, à température ambiante, ce tampon possède en plus une protéine, la BSA, qui va s'adsorber sur l'or et sur le polypyrrole (ppy) et ainsi limiter le risque de fixations non spécifiques des protéines sur l'or et le ppy, lors de la révélation des interactions en fluorescence.

On rince à nouveau avec 1 mL de tampon de rinçage, avant de déposer 100 µL de la protéine SDF-1 α biotinylée (1 µM) dans le tampon de rinçage, durant 30 min, à température ambiante.

Après un nouveau rinçage, on dépose 100 µL de Streptavidine R-phycoerythrine (SAPE) à 7% dans le tampon de rinçage durant 15 min, à température ambiante, à l'abri de la lumière, puis un dernier rinçage (identique aux précédents) est réalisé avant la phase de détection au microscope.

Pour la révélation de fluorescence, les échantillons déposés sur la lame d'or sont placés entre lame et lamelle, puis observés au microscope à épifluorescence équipé d'une caméra CCD, sous lumière verte et un grossissement x 1,2. Les images des plots sur la matrice sont prises et leurs intensités de fluorescence sont mesurées par le logiciel Image Pro Plus.

Après la lecture sur le microscope, les plots sont lavés par 2 x 1 mL de tampon de rinçage puis par 2 x 1 mL de tampon de régénération. Puis la lame est lavée à l'eau, avant d'être séchée puis stockée à 4°C.

2.6. Phase de détection, en SPR (résonance de plasmons de surface)

Le protocole d'une manipulation avec l'imageur SPR est la suivante :

- Dégazer tous les tampons : rinçage, blocage et régénération.
- Mettre le prisme, comportant une matrice de plots dans l'appareil SPR.
- Démarrer le système fluide, c'est-à-dire, qu'après avoir rempli la seringue de tampon de rinçage, la placer dans le pousse-seringue et allumer l'appareil. Ainsi, arrive en débit constant un flux de tampon dans la cuve SPR. « Passage de tampon de rinçage ».
- Lancer le logiciel Genovision (Genoptics) et faire les réglages de la caméra CCD.
- Tracer les courbes de plasmon qui correspondent aux Niveaux de gris de la caméra en fonction de l'angle d'incidence, que l'on balaie manuellement. Ces courbes représentent la

variation de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence à la surface du prisme, elles permettent de comparer l'épaisseur des différents plots déposés sur la surface d'or du prisme. Plus le plot est épais, plus la courbe de plasmon de surface sera décalée vers les incidences faibles, donc vers la gauche du graphe.

Afin d'analyser la fonctionnalité des plots ainsi déposés, nous nous plaçons ensuite à une incidence fixe, durant toute l'expérience, pour mesurer les cinétiques de variation de réflectivité en fonction du temps. Ici, nous nous sommes placés à un angle de 54° , pour être sur le flanc droit du pic d'absorption de courbe de réflectivité.

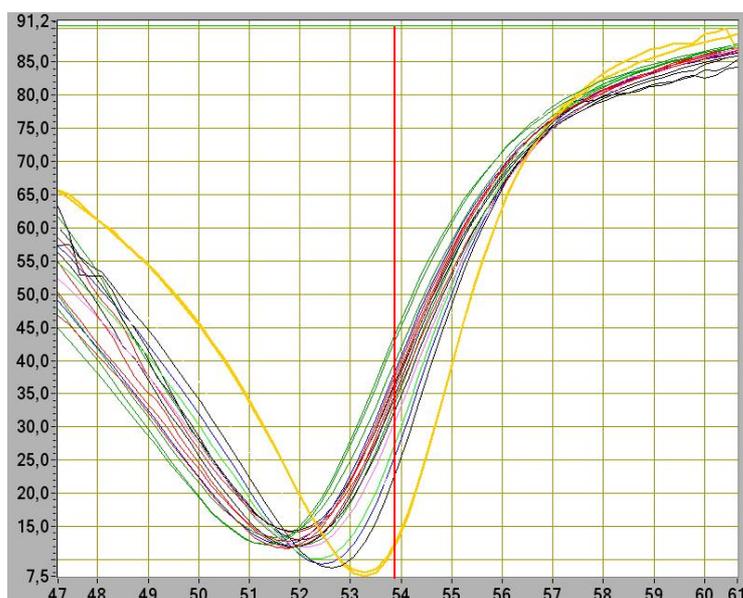


Figure 98 : Courbes de plasmons de surface des différents plots dans la tampon de rinçage en fonction de l'angle d'incidence. En jaune, la courbe représente la couche d'or non modifiée.

Après avoir fait tous les réglages sur le prisme dans l'appareil SPR, le protocole de suivi en cinétique des interactions est le suivant :

- Circulation du tampon de rinçage dans le système fluide, après avoir choisi le débit du pousse-seringue pour la suite de l'expérience.
- *Etape indispensable* : blocage de la surface en réalisant deux injections de tampon de blocage (1% BSA) (pendant 7 min30s à débit $60\mu\text{L}/\text{min}$) suivies d'une étape de régénération de la surface (1M NaCl dans le tampon de rinçage), pour éliminer le surcroît de BSA « collée ».
- Retour en tampon de rinçage, pour observer la stabilisation de la ligne de base.
- Passage de la protéine SDF-1 α à la concentration désirée dans un tampon de rinçage.
- Retour en tampon de rinçage, afin de mesurer la différence de niveau dans le même milieu avant et après la prise de protéines sur les sucres.

- Passage du tampon de régénération.
- Retour en tampon de rinçage.

Ce protocole peut être répété avec d'autres concentrations de protéine SDF-1 α .

Après chaque expérience, le système fluide est nettoyé par un passage de 20mL de H₂O, suivi d'un séchage à l'air comprimé. Une fois ce nettoyage réalisé, le prisme peut être enlevé, rincé à l'eau une nouvelle fois, puis séché et stocké à 4°C.

- ¹ Zhu H., Snyder M. ; Protein chip technology ; *Current Op. In Chem. Biol.*; **2003** ; 7 : 55-63.
- ² Feizi T.; Mulloy B.; Carbohydrate and glycoconjugates glycomics: the new area of carbohydrate biology; *Curr. Opin. Struct. Biol.*; **2003**; 13: 602-604.
- ³ Bertozzi C.R., Kiessling L.L.; Chemical glycobiology ; *Science* ; **2001** ; 291 : 2357-2364.
- ⁴ Love K.R.; Seeberger P.H.; Carbohydrate arrays as tools for glycomics; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2002**; 41(19): 3583-3586.
- ⁵ Mellet C.O.; Garcia Fernandez J.M.; Carbohydrate Microarrays; *Chem. Bio. Chem.*; **2002** ; 3: 819-822.
- ⁶ Feizi T.; Fazio F.; Chai W.; Wong C.-H.; Carbohydrate microarrays – a new set of technologies at the frontiers of glycomics; *Curr. Opin. Struct. Biol.*; **2003**; 13: 637-645.
- ⁷ Stryer L.; Chapter 18 : Carbohydrates ; *Biochemistry*, Fourth Edition, **1995** ; L. Stryer ; W. H. Freeman and Company New York.
- ⁸ Cheng J. and Kricka L.J., Gordon; *Biochip Technologies ed.* ; Breach/Harwood Academic publishers; **2001**.
- ⁹ Williams S.J.; Davies G.J.; Protein-carbohydrate interactions: learning lessons from nature; *Trends in Biotechnol.*; **2001**; 19(9): 356-362.
- ¹⁰ Hirabayashi J.; Oligosaccharide microarrays for glycomics; *Trends in Biotechnol.*; **2003**; 21(4): 141-143.
- ¹¹ Maeder T.; De nouveaux médicaments: les sucres; *Pour la Science*; **2002**; 299: 70-77.
- ¹² Schena M.; Shalon D.; Davis R.W.; Brown P.O.; Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray ; *Science* ; **1995** ; 270 : 467-470.
- ¹³ Mitchell P.; A perspective on protein microarrays ; *Nat. Biotechnol.* ; **2002** ; 20 : 225-229.
- ¹⁴ Bertozzi C.R.; Kiessling L.L.; Chemical Glycobiology; *Science*; **2001**; 291: 2357-2364.
- ¹⁵ Nicolaou K.C.; Mitchell H.J.; Adventures in carbohydrate chemistry: new synthetic technologies, chemical synthesis, molecular design and chemical biology ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001** ; 40 : 1576-1624.
- ¹⁶ Pease A.C.; Solas D.; Sullivan E.J.; Cronin M.T.; Holmes C.P.; Fodor SPA; Light-Generated Oligonucleotide Arrays for Rapid DNA Sequence Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **1994**; 91: 5022-5026.
- ¹⁷ Fodor S.P.; Read J.L.; Pirrung M.C.; Stryer L.; Lu A.T.; Solas D.; Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, **1991**; 251: 767-776.
- ¹⁸ Marcaurelle L.A.; Seeberger P.H.; combinatorial carbohydrate chemistry ; *Curr. Op. Chem. Biol.* **2002** ; 6 : 289-296.
- ¹⁹ Sears P.; Wong C.-H.; Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins ; *Science* **2001** ; 291 : 2344-2350.

- ²⁰ Hölemann A.; Seeberger P.H.; Carbohydrate diversity : synthesis of glycoconjugates and complex carbohydrates ; *Curr. Op. Biotechnol.*; **2004** ; 15 : 615-622.
- ²¹ Seeberger P.H.; Haase W.C.; Solide-Phase oligosaccharide synthesis and combinatorial carbohydrate libraries ; *Chem. Rev.* ; **2000** ; 100 : 4349-4393.
- ²² Plante O.J.; Palmacci E.R.; Seeberger P.H.; Automated solid-phase synthesis of oligosaccharides ; *Science*; **2001** ; 291 : 1523-1527.
- ²³ Zhang Z.Y.; Ollmann I.R. ; Ye X.-S. ; Wischnat R.; Baasov T.; Wong C.-H.; Programmable one-pot oligosaccharide synthesis ; *J. Am. Chem. Soc.*; **1999** ; 121 : 734-753.
- ²⁴ Koeller K.M.; Wong C.H.; Enzymes for chemical synthesis ; *Nature* ; **2001** ; 409 : 232-240.
- ²⁵ Chai W.; Luo J.; Lim C.K.; Lawson A.M.; Characterization of heparin oligosaccharide mixtures as ammonium salts using electrospray mass spectroscopy ; *Anal. Chem.*; **1998**; 70: 2060-2066.
- ²⁶ Shively J.E.; Conrad H.E.; Formation of anhydrosugars in the chemical depolymerization of heparin ; *Biochemistry* ; **1976** ; 15 : 3932-3942.
- ²⁷ Chai W.; Yuen C.-T.; Feizi T.; Lawson A.M.; Core-branching pattern and sequence analysis of mannitol-terminating oligosaccharides by neoglycolipid technology; *Anal. Biochem.*; **1999**; 270: 314-322.
- ²⁸ Wilcheck M.; Bayer E.A.; *Methods in Ezymology*; Academic Press: New York; **1990**; vol. 184.
- ²⁹ Shao M.C.; the use of streptavidin-biotinyglycans as a tool for characterization of oligosaccharide-binding specificity of lectin ; *Anal. Biochem.* ; **1992**; 205 :77-82.
- ³⁰ Shinohara Y.; Sota H.; Gotoh M.; Hasebe M.; Tosu M.; Nakao J.; Hasegawa Y.; *Anal. Chem.*; **1996**; 68: 2573-2579.
- ³¹ Leteux C.; Childs R.A.; Chai W.; Stoll M.; Kogelberg H.; Feizi T.; Biotinyl-L-3-(2-naphthyl)-alanine hydrazide derivatives of N-glycans: versatile solid-phase probes for carbohydrate-recognition studies; *Glycobiology*; **1998**; 8(3): 227-236.
- ³² Löfas S.; Dextran modified self-assembled monolayer surfaces for use in biointeraction analysis with surface plasmon resonance ; *Pure & Appl. Chem.* ; **1995** ; 67(5) :829-834.
- ³³ O'Shannessy D.J.; Brigham-Burke M.; Peck K.; Immobilization chemistries suitable for use in the Biacore surface plasmon resonance detector; *Anal. Biochem.*; **1992**; 205: 132-136.
- ³⁴ Gestwicki J.E.; Cairo C.W.; Mann D.A.; Owen R.M.; Kiessling L.L.; Selective immobilization of multivalent ligands for surface plasmon resonance and fluorescence microscopy ; *Anal. Biochem.* ; **2002** ; 305 :149-155.
- ³⁵ Wang D.; Liu S.; Trummer B.J.; Deng C.; Wang A.; Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells; *Nat. Biotechnol.*; **2002**; 20: 275-281.
- ³⁶ Willats W.G.T.; Rasmussen S.E.; Kristensen T.; Mikkelsen J.D.; Knox J.P.; Sugar-coated microarrays : a novel slide surface for the high-throughput analysis of glycans ; *Proteomics*; **2002**; 2: 1666-1671.

- ³⁷ Fukui S.; Feizi T.; Galustian C.; Lawson A.M.; Chai W.; Oligosaccharide microarrays for throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions ; *Nat. Biotechnol.*; **2002**; 20: 1011-1017.
- ³⁸ Bryan M.C.; Plettenburg O.; Sears P.; Rabuka D.; Wacowich-Sgarbi S.; Wong C.H.; Saccharide display on microtiter plates; *Chem. Biol.*; **2002**; 9: 713-720.
- ³⁹ Fazio F.; Bryan M.C.; Blixt O.; Paulson J.C.; Wong C.H.; Synthesis of sugars arrays in microtiter plate ; *J. Am. Chem. Soc.* ; **2002** ; 124 : 14397-14402.
- ⁴⁰ Bryan M.C.; Wong C.H.; Aminoglycoside array for the high throughput analysis of small molecule-RNA interactions; *Tetrahedron Lett.* ; **2004**; 45: 3639-3642.
- ⁴¹ Bryan M.C.; Fazio F.; Lee H.K.; Huang C.Y.; Chang A.; Best M.D.; Calarese D.A.; Blixt O.; Paulson J.C.; Burton D.; Wilson I.A.; Wong C.H.; Covalent display of oligosaccharide arrays in microtiter plates ; *J. Am. Chem. Soc.* ; **2004** ; 126 :8640-8641.
- ⁴² Köhn M.; Wacker R.; Peters C.; Schröder H.; Soulère L.; Breinbauer R.; Niemeyer C.M.; Waldmann H.; Staudinger ligation: a new immobilisation strategy for the preparation of small-molecule arrays; *Ang. Chem. Int. Ed.*; **2003**; 42: 5830-5834.
- ⁴³ Benters R.; Niemeyer C.M.; Wöhrle D.; Dendrimer-activated solid supports for nucleic acid and protein microarrays; *ChemBioChem.*; **2001**; 2: 686-694.
- ⁴⁴ Park S.; Shin I.; Fabrication of carbohydrate chips for studying protein-carbohydrate interactions ; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2002** ; 41(17) : 3180-3182.
- ⁴⁵ Shin I.; Jung H.J.; Lee M.R.; Chemoselective ligation of maleimidosugars to peptides / protein for the preparation of neoglycopeptides / neoglycoproteins ; *Tetrahedron Lett.* ; **2001** ; 42 :1325-1328.
- ⁴⁶ Park S.; Lee M.R.; Pyo S.J.; Shin I.; Carbohydrate chips for studying high-throughput carbohydrate-protein interactions ; *J. Am. Chem. Soc.* ; **2004** ; 126 : 4812-4819.
- ⁴⁷ Houseman B.T.; Mrksich M.; Carbohydrate arrays for the evaluation of protein binding and enzymatic modification ; *Chem. Biol.*; **2002**; 9: 443-454.
- ⁴⁸ Pale-Grosdemange C.; Simon E.S.; Prime K.L.; Whitesides G.M.; Formation of self-assembled monolayers by chemisorption of derivatives of oligo(ethylene glycol) of structure HS(CH₂)₂(OCH₂CH₂)_mOH ; *J. Am. Chem. Soc.* ; **1991** ; 113: 12-20.
- ⁴⁹ Chan E.W.L.; Yousaf M.N.; Mrksich M.; Understanding the role of adsorption in the reaction of cyclopentadiene with an immobilized dienophile ; *J. Phys. Chem. A*; **2000**; 104: 9315-9320.
- ⁵⁰ Yousaf M.N.; Chan E.W.L.; Mrksich M.; The kinetics of an interfacial Diels-Alder Reaction depends on the environment of the immobilized dienophile ; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2000** ; 39(11) : 1943-1945.
- ⁵¹ Yousaf M.N.; Mrksich M.; Diels-Alder Reaction of the selective Immobilization of Protein to Electroactive Self-Assembled Monolayers; *J. Am. Chem. Soc.*; **1999**; 121: 4286-4287.
- ⁵² Houseman B.T.; Huh J.H.; Kron S.J.; Mrksich M.; Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity; *Nat. Biotechnol.*; **2002**; 20: 270-274.

- ⁵³ Mrksich M.; A surface chemistry approach to studying cell adhesion ; *Chem. Soc. Rev.* ; **2000** ; 29 : 267-273.
- ⁵⁴ Mann D.A.; Kanai M.; Maly D.J.; Kiessling L.L.; Probing low affinity and multivalent interactions with surface plasmon resonance : ligands for Concanavalin A; *J. Am. Chem. Soc.* ; **1998** ; 120(41) : 10575-10582.
- ⁵⁵ Revell D.J.; Knight J.R.; Blyth D.J.; Haines A.H.; Russell D.A.; Self-assembled carbohydrate monolayers : formation and surface selective molecular recognition ; *Langmuir* ; **1998** ; 14 :4517-4524.
- ⁵⁶ Horan N.; Yan L.; Isobe H.; Whitesides G.M.; Kahne D.; Nonstatistical binding of a protein to clustered carbohydrates ; *Proc. Natl. Acad. Sci.* ; **1999** ; 96 : 11782-11786.
- ⁵⁷ Smith E.A.; Wanat M.J.; Cheng Y.; Barreira S.V.P.; Frutos A.G.; Corn R.M.; Formation, Spectroscopic Characterization, and Application of Sulfhydryl-Terminated Alkanethiol Monolayers for the Chemical Attachment of DNA onto Gold Surfaces ; *Langmuir* ; **2001** ; 17 : 2502-2507.
- ⁵⁸ Wegner G.J.; Lee H.J.; Corn R.M.; Characterization and Optimization of Peptide Arrays for the Study of Epitope-Antibody Interactions Using Surface Plasmon Resonance Imaging; *Anal. Chem.*; **2002**; 74: 5161-5168.
- ⁵⁹ Smith E.A.; Thomas W.D.; Kiessling L.L.; Corn R.M. ; Surface plasmon imaging studies of protein-carbohydrate interactions ; *J. Am. Chem. Soc.* ; **2003** ; 125 : 6140-6148.
- ⁶⁰ Adams E.W.; Ueberfeld J.; Ratner D.M.; O'Keefe B.R.; Walt D.R.; Seeberger P.H.; Encoded fiber-optic microsphere arrays for probing protein-carbohydrate interactions ; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2003**; 42: 5317-5320.
- ⁶¹ Steemers F.J.; Ferguson J.A.; Walt D.R.; Screening unlabeled DNA targets with randomly ordered fiber-optic gene arrays; *Nat. Biotechnol.* ; **2000** ; 18(1): 91-94.
- ⁶² Ferguson J.A.; Steemers F.J.; Walt D.R.; High-density fiber-optic DNA random microsphere array; *Anal. Chem.*; **2000**; 72(22): 5618-5624.
- ⁶³ <http://www.illumina.com>
- ⁶⁴ Houseman B.T.; Gawalt E.S.; Mrksich M.; Maleimide-functionalized self-assembled monolayers for the preparation of peptide and carbohydrate biochips ; *Langmuir* ; **2003** ; 19 : 1522-1531.
- ⁶⁵ Ratner D.M.; Adams E.W.; Su J.; O'Keefe B.R.; Mrksich M.; Seeberger P.H.; Probing protein-carbohydrate interactions with microarrays of synthetic oligosaccharides ; *ChemBioChem.* ; **2004**; 5: 379-383.
- ⁶⁶ Adams E.W.; Ratner D.M.; Bokesh H.R.; McMahon J.B.; O'Keefe B.R.; Seeberger P.H.; Oligosaccharides and glycoprotein microarrays as tools in HIV glycobiology: glycan-dependent gp120/protein interactions; *Chem. Biol.*, **2004**; 11: 875-881.
- ⁶⁷ Société Glycominds: <http://www.glycominds.com>
- ⁶⁸ Nimrichter L.; Gargir A.; Gortler M.; Altstock R.T.; Shtevi A.; Weisshaus O.; Fire E.; Dotan N.; Schnaar R.L.; Intact cell adhesion to glycan microarrays ; *Glycobiology* ; **2004** ; 14(2) : 197-203.

- ⁶⁹ Schwarz M.; Spector L.; Gargir A.; Shtevi A.; Gortler M.; Altstock R.T.; Dukler A.A.; Dotan N.; A new kind of carbohydrate array, its use for profiling antiglycan antibodies, and the discovery of a novel human cellulose-binding antibody; *Glycobiology*; **2003**; 13(11): 749-754.
- ⁷⁰ Shin I.; Cho J.W.; Boo D.W.; Carbohydrate arrays for functional studies of carbohydrates; *Comb. Chem. High Throughput Screen.*; **2004**; 7: 565-574.
- ⁷¹ Perraut F.; Barritault P.; Chaton P.; Marchand G.; Campagnolo R.; Bidan G.; Détection : L'instrumentation pour la biologie, *Observatoire des Micro- et Nanotechnologies*; **2002**: 5-10.
- ⁷² Société Affymetrix : <http://www.affymetrix.com>
- ⁷³ Société Agilent : <http://www.chem.agilent.com>
- ⁷⁴ Société Nanogen : <http://www.nanogen.com>
- ⁷⁵ Cush R.; Cronin J.M.; Stewart W.J.; Maule C.H.; Molloy J.; Goddard N.J.; The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part I: Principle of operation and associated instrumentation; *Biosens. Bioelectron.*; **1993**; 8: 347-354.
- ⁷⁶ Kamei K.; Wu X.; Xu X.; Minami K.; Huy N.T.; Takano R.; Kato H.; Hara S.; The analysis of heparin-protein interactions using evanescent wave biosensor with regioselectively desulfated heparins as the ligands; *Anal. Biochem.*; **2001**; 295: 203-213.
- ⁷⁷ Xu X.; Takano R.; Nagai Y.; Yanagida T.; Kamei K.; Kato H.; Kamikubo Y.; Nakahara Y.; Kumeda K.; Hara S.; Effect of heparin chain length on the interaction with tissue factor pathway inhibitor; *Int. J Biol. Macromol.*; **2002**; 30: 151-160.
- ⁷⁸ Wood R.W.; On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction gratings spectrum; *Phil. Magm.*; **1992**; 4: 396-402.
- ⁷⁹ Fano U.; The theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces (Sommerfeld's waves); *J. Opt. Soc. Am.*; **1941**; 31: 213-222.
- ⁸⁰ Otto A.; Excitation of surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection; *Z. Physik*; **1968**; 216: 398-410.
- ⁸¹ Kretschmann E.; Raether H.; Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light; *Z. Naturforsch.*; **1968**; 23A: 2135-2136.
- ⁸² Liedberg B.; Nylander C.; Lundström I.; Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing; *Sens. Actuators*; **1983**; 4: 299-304.
- ⁸³ <http://www.biocore.com/home.lasso>
- ⁸⁴ McDonnell J.M.; Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition; *Curr. Opin. Chem. Biol.*; **2001**; 5: 572-577.
- ⁸⁵ Rich R.L.; Mysska D.G.; Survey of the 1999 surface plasmon resonance biosensor literature; *J. Mol. Recogn.*; **2000**; 13: 388-407.
- ⁸⁶ Green R.J.; Frazier R.A.; Shakesheff K.M.; Davies M.C.; Roberts C.J.; Tendler S.J.B.; Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials; *Biomaterials*; **2000**; 21: 1823-1835.

- ⁸⁷ De Bruijn H.E.; Kooyman R.P.H.; Greve J.; Choice of metal and wavelength for SPR sensors: some considerations; *Appl. Opt.*; **1992**; 31: 440-442.
- ⁸⁸ De Feijter J.A.; Benjamins J.; Veer F.A.; Ellipsometry as a tool to study the adsorption behaviour of synthetic and biopolymers at the air-water interface; *Biopolymers*; **1978**; 17: 1759-1772.
- ⁸⁹ Malmqvist M.; Biospecific interaction analysis using biosensor technology; *Nature*; **1993**; 361: 186-187.
- ⁹⁰ Baird C.L.; Courtenay E.S.; Myska D.G.; Surface plasmon resonance characterization of drug/liposome interactions; *Anal. Biochem.*; **2002**; 310: 93-99.
- ⁹¹ Khalifa M.B.; Choulier L.; Lortat-Jacob H.; Altschuh D.; Vernet T.; BIACORE data processing : an evaluation of the global fitting procedure ; *Anal. Biochem.*; **2001**; 293: 194-203.
- ⁹² Rothenhausler B.; Knoll W.; Surface plasmon microscopy; *Nature*; **1988**; 332: 615-617.
- ⁹³ Jordan C.E.; Frey B.L.; Kornguth S.; Corn R.M.; Characterization of Poly-L-lysine adsorption onto alkanethiol-modified gold surfaces with polarization-modulation Fourier transform infrared spectroscopy and surface plasmon resonance measurements; *Langmuir*; **1994**; 10: 3642-3648.
- ⁹⁴ Jordan C.E.; Frutos A.G.; Thiel A.J.; Corn R.M.; Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA adsorption and streptavidin/DNA multilayer formation at chemically modified gold surfaces; *Anal. Chem.*; **1997**; 69: 4939-4947.
- ⁹⁵ Morrill P.R.; Millington R.B.; Lowe C.R.; Imaging surface plasmon resonance system for screening affinity ligands; *J. Chromatogr.*; **2003**; 793: 229-251.
- ⁹⁶ Zizlsperger M.; Knoll W.; Multispot parallel on-line monitoring of interfacial binding reactions by surface plasmon microscopy; *Progr. Colloid. Polym. Sci.*; **1998**; 109: 244-253.
- ⁹⁷ Nelson B.P.; Grimsrud T.E.; Liles M.R.; Goodman R.M.; Corn R.M.; Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays; *Anal. Chem.*; **2001**; 73: 1-7.
- ⁹⁸ Nishida N.; Hara M.; Sasabe H.; Knoll W.; Dimerization process in alkanethiol self-assembled monolayer on Au (111); *Jpn. J. Appl. Phys. Vol.*; **1996**; 35: 799-802.
- ⁹⁹ Liebermann T.; Knoll W.; Sluka P.; Herrmann R.; Complement hybridization from solution to surface-attached probe-oligonucleotides observed by surface-plasmon-field-enhanced fluorescence spectroscopy; *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*; **2000**; 169: 337-350.
- ¹⁰⁰ Cooper M.A.; Biosensor profiling of molecular interactions in pharmacology ; *Curr. Opin. Pharmacol.*; **2003**; 3: 557-562.
- ¹⁰¹ Carbohydrates and glycobiology, *Science*, dossier spécial ; **2001** ; 291 : 2337-2378.
- ¹⁰² Lindahl U.; Hook M.; Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules; *Annu. Rev. Biochem.*; **1978**; 47: 385-417.
- ¹⁰³ Gallagher J.T.; The extended family of proteoglycans: social residents of the pericellular zone; *Curr. Opin. Cell. Biol.*; **1989**; 1: 1201-1218.

- ¹⁰⁴ Gallagher J.T.; Lyon M.; Steward W.P.; Structure and function of heparan sulphate proteoglycans; *Biochem. J.*; **1986**; 236: 313-325.
- ¹⁰⁵ Salmivirta M.; Lidholt K.; Lindahl U.; Heparan sulfate: a piece of information; *FASEB. J.*; **1996**; 10:1270-1279.
- ¹⁰⁶ Bourin M.C.; Lindahl U.; Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation; *Biochem. J.*; **1993**; 289: 313-33.
- ¹⁰⁷ Jorpes J.E.; Gardell N.; On heparin monosulfuric acid; *J. Biol. Chem.*; **1948**; 176: 267-276.
- ¹⁰⁸ Gallagher J.T.; Walker A.; Molecular distinctions between heparan sulphate and heparin. Analysis of sulphation patterns indicates that heparan sulphate and heparin are separate families of N-sulphated polysaccharides; *Biochem. J.*; **1985**; 230: 665-674.
- ¹⁰⁹ Perrimon N.; Bernfield M.; Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes; *Nature*; **2000**; 404: 725-728.
- ¹¹⁰ Lindahl U.; Kusche-Gullberg M.; Kjellen L.; regulated diversity of heparan sulfate; *J. Biol. Chem.*; **1998**; 148: 227-232.
- ¹¹¹ Iozzo R.V.; Cohen I.; Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma; *Experientia*; **1993**; 49: 447-455.
- ¹¹² Shriver Z.; Liu D.; Sasisekharan R.; Emerging views of heparan sulfate glycosaminoglycan structure/activity relationships modulating dynamic biological functions; *Trends Cell Biology*; **2002**; 12 (2): 71-77.
- ¹¹³ San Antonio J.D.; Iozzo R.V.; Glycosaminoglycans: structure and biological functions; *Encyclopedia of Life Sciences*; **2001**.
- ¹¹⁴ Esko J.D.; Zhang L.; Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly; *Curr. Opin. Struct. Biol.*; **1996**; 6: 663-670.
- ¹¹⁵ Zhang D.; David G.; Esko J.D.; Repetitive Ser-Gly sequences enhance heparan sulfate assembly in proteoglycans; *J. Biol. Chem.*; **1995**; 270: 27127-27135.
- ¹¹⁶ Capila I.; Linhardt R.J.; Heparin-protein interactions; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2002**; 41: 390-412.
- ¹¹⁷ Esko J.D.; Lindahl U.; Molecular diversity of heparan sulfate; *The Journal of Clinical Investigation*; **2001**; 108 (2): 169-173.
- ¹¹⁸ Kolset S.O.; Salmivirta M.; Cell surface heparan sulfate proteoglycans and lipoprotein metabolism; *Cellular and Molecular Life Sciences*; **1999**; 56: 857-870.
- ¹¹⁹ Feyzi E.; Trybala F.; Fager G.; Spillmann D.; Lindahl U.; Salmivirta M.; characterization of heparin and heparan sulfate domains binding to the long splice variant of platelet-derived growth factor A chain; *J. Biol. Chem.*; **1997**; 272: 5518-5524.
- ¹²⁰ Langford J.K.; Stanley M.J.; Cao D.; Sanderson R.D.; Multiple heparan sulfate chains are required for optimal syndecan-1 function; *J. Biol. Chem.*; **1998**; 273: 29965-29971.
- ¹²¹ Lortat-Jacob H.; Turnbull J.E.; Grimaud J.A.; Molecular organization of the interferon- γ -binding domain in heparan sulfate; *Biochem. J.*; **1995**; 310: 497-505.

- ¹²² Nugent M.A.; Heparin sequencing brings structure to the function of complex oligosaccharides ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; **2000** ; 97 (19) : 10301-10303.
- ¹²³ Nishimura T.; Nakatake Y.; Konishi M.; Itoh N.; Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver ; *Biochim. Biophys. Acta* ; **2000**; 1492(1): 203-206.
- ¹²⁴ Thompson L.D.; Pantoliano M.W.; Springer B.A.; Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification of the heparin binding domain; *Biochemistry*; **1994**; 33(13): 3831-3840.
- ¹²⁵ Guerrini M.; Agulles T.; Bisio A.; Hricovini M.; Lay L.; Naggi A.; Poletti L.; Sturiale L.; Torri G.; Casu B.; Minimal Heparin/Heparan sulfate sequences for binding to fibroblast growth factor -1 ; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; **2002** ; 292 : 222-230.
- ¹²⁶ Luo J.; Luo Z.; Zhou N.; Hall J.W.; Huang Z.; Attachment of C-terminus of SDF-1 enhances the biological activity of its N-terminal peptide ; *Biochemical and Biophysical research Communications* ; **1999** ; 264 : 42-47.
- ¹²⁷ Rossi D.; Zlotnik A.; The biology of chemokines and their receptors; *Annu. Rev. Immunol.*; **2000** ; 18: 217-242.
- ¹²⁸ Stringer S.E.; Gallagher J.T.; Specific binding of the chemokine platelet factor 4 to heparan sulfate; *J. Biol. Chem.* ; **1997** ; 272 : 20508-20514.
- ¹²⁹ Spillmann D.; Witt D. ; Lindahl U.; Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate ; *J. Biol. Chem.* ; **1998** ; 273 : 15487-15493.
- ¹³⁰ Proudfoot A.E.I.; Fritchley S.; Borlat F.; Shaw J.P.; Vilbois F.; Zwahlen C.; Trkola A.; Marchant D.; Clapham P.R.; Wells T.N.C.; The BBXB Motif of RANTES Is the Principal Site for Heparin Binding and Controls Receptor Selectivity; *J. Biol. Chem.*; **2001**; 276: 10620-10626.
- ¹³¹ Vivès R.R.; Sadir R.; Imberty A.; Rencurosi A.; Lortat-Jacob H.; A kinetics and modelling study of RANTES(9-68) binding to heparin reveals a mechanism of cooperative oligomerisation; *Biochemistry*; **2002**; 41: 14779-14789.
- ¹³² Capila I.; VanderNoot V.A.; Mealy T.R.; Seaton B.A.; Linhardt R.J. ; Interaction of heparin with annexin V ; *FEBS Lett.*; **1999** ; 446(2-3): 327-330.
- ¹³³ Tyler K.L.; Fields B.N.; *Fields Virology* (Eds: Fields BN; Knipe DM; Howley PM); Lippincott-Raven, Philadelphia; **1996**; pp. 173-217.
- ¹³⁴ Rider C.C.; The potential for heparin and its derivatives in the therapy and prevention of HIV-1 infection; *Glycoconjugate J.*; **1997**; 14: 639-642.
- ¹³⁵ Herold B.C.; Gerber S.I.; Polonsky T.; Belval B.J.; Shaklee P.N.; Holme K. ; Identification of structural features of heparin required for inhibition of herpes simplex virus type 1 binding ; *Virology*; **1995**; 206(2): 1108-1116.
- ¹³⁶ McEver R.P.; Selectins ; *Curr. Opin. Immunol.*; **1994**; 6(1): 75-84.

- ¹³⁷ Aruffo A.; Dietsch M.T.; Wan H.; Hellstrom K.E.; Hellstrom I.; Granule membrane protein 140 (GMP140) binds to carcinomas and carcinoma-derived cell lines ; *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1992** ; 89(6): 2292-2296.
- ¹³⁸ Koenig A.; Norgard-Sumnicht K.; Linhardt R.; Varki A.; Differential interactions of heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans with the selectins. Implications for the use of unfractionated and low molecular weight heparins as therapeutic agents; *J. Clin. Invest.*; **1998**; 101(4): 877-889.
- ¹³⁹ Nelson R.M.; Cecconi O.; Roberts W.G.; Aruffo A.; Linhardt R.J.; Bevilacqua M.P.; Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation; *Blood.*; **1993**; 82(11): 3253-3258.
- ¹⁴⁰ Desai U.R.; Wang H.M.; Linhardt R.J.; Specificity studies on the heparin lyases from *Flavobacterium heparinum* ; *Biochemistry* ; **1993** ; 32(32): 8140-8145.
- ¹⁴¹ Hileman R.E.; Smith A.E.; Toida T.; Linhardt R.J.; Preparation and structure of heparin lyase-derived heparan sulfate oligosaccharides; *Glycobiology*; **1997**; 7(2): 231-239.
- ¹⁴² Smorenburg S.M.; Van Noorden C.J.; The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies; *Pharmacol. Rev.*; **2001**; 53(1): 93-105.
- ¹⁴³ Pervin A.; Gallo C.; Jandik K.A.; Han X.J.; Linhardt R.J.; Preparation and structural characterization of large heparin derived oligosaccharides; *Glycobiology*; **1995**; 5(1): 83-95.
- ¹⁴⁴ Jemth P.; Kreuger J.; Kusche-Gullberg M.; Sturiale L.; Gimenez-Gallego G.; Lindahl U.; Biosynthetic oligosaccharide libraries for identification of protein-binding heparan sulfate motifs; *J. Biol. Chem.*; **2002**; 277: 30567-30573.
- ¹⁴⁵ Lubineau A.; Lortat-Jacob H.; Gavard O.; Sarrazin S.; Bonnaffé D.; Synthesis of Tailor-made glycoconjugate mimetics of heparan sulfate that bind IFN- γ in the nanomolar range ; *Chem. Eur. J.*; **2004**; 10: 4265-4282.
- ¹⁴⁶ Thompson L.D.; Pantoliano M.W.; Springer B.A.; Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification of the heparin binding domain ; *Biochemistry*; **1994**; 33: 3831-3840.
- ¹⁴⁷ Vanhaverbeke C.; Simorre J.P.; Sadir R.; Gans P.; Lortat-Jacob H.; NMR characterization of the interaction between the C-terminal domain of interferon- γ and heparin-derived oligosaccharides; *Biochem. J.*; **2004**; 384: 93-99.
- ¹⁴⁸ Bae J.; Desai U.R.; Pervin A.; Caldwell E.E.; Weiler J.M.; Linhardt R.J.; Interaction of heparin with synthetic antithrombin III peptide analogues ; *Biochem. J.*; **1994**; 301: 121-129.
- ¹⁴⁹ Lee M.; Lander A.D.; Analysis of affinity and structural selectivity in the binding of proteins to glycosaminoglycans: development of a sensitive electrophoretic approach; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **1991**; 88: 2768-2772.

- ¹⁵⁰ Edens R.E.; Fromm J.R.; Fromm S.J.; Linhardt R.J.; Weiler J.M.; Two-dimensional affinity resolution electrophoresis demonstrates that three distinct heparin populations interact with antithrombin III ; *Biochemistry* ; **1995** ; 34 : 2400-2407.
- ¹⁵¹ Fromm J.R.; Hilemann R.E.; Weiler J.M.; Linhardt R.J.; Interaction of fibroblast growth factor-1 and related peptides with heparan sulfate and its oligosaccharides ; *Arch. Biochem. Biophys.*; **1995**; 323: 279-287.
- ¹⁵² Dawes J.; Measurement of the affinities of heparins, naturally occurring glycosaminoglycans, and other sulfated polymers for antithrombin III and thrombin ; *Anal. Biochem.* ; **1988** ; 174 : 177-186.
- ¹⁵³ Mach H.; Volkin D.B.; Burke C.J.; Middaugh C.R.; Linhardt R.J.; Fromm J.R.; Loganathan D.; Mattsson L.; Nature of the interaction of heparin with acidic fibroblast growth factor ; *Biochemistry* ; **1993** ; 32 : 5480-5489.
- ¹⁵⁴ Evans D.L.; Marshall C.J.; Christey P.B.; Carrell R.W.; Heparin binding site, conformational change, and activation of antithrombin; *Biochemistry* ; **1992** ; 31 : 12629-12642.
- ¹⁵⁵ Faham S. ; Hileman R.E. ; Fromm J.R. ; Linhardt R.J.; Rees D.C.; Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor ; *Science* ; **1996** ; 271 : 1116-1120.
- ¹⁵⁶ Livache T.; Bazin H.; Caillat P.; Roget A.; Electroconducting polymers for the construction of DNA or peptides arrays on silicon chips; *Biosens. Bioelectron.*; **1998**; 13: 629-634.
- ¹⁵⁷ Livache T.; Bazin H.; Mathis G.; Conducting polymers on microelectronics devices as tools for biological analyses; *Clin. Chim. Acta*; **1998**; 278: 171-176.
- ¹⁵⁸ Livache T.; Fouque B.; Roget A.; Marchand J.; Bidan G.; Teoule R.; Mathis G; Polypyrrole DNA chips on a silicon devices: example of hepatitis C virus genotyping; *Anal. Biochem.*; **1998**; 255: 188-194.
- ¹⁵⁹ Livache T.; Roget A.; Dejean E. ; Barthet C. ; Bidan G.; Teoule R.; Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucléotides bearing a pyrrole group; *Nucleic Acids Res.*; **1994**; 22: 2915-2921.
- ¹⁶⁰ Guedon P., Livache T., Martin F., Lesbre F., Roget A., Bidan G., Levy Y. ; Characterization and optimization of a real-time, parallel, label-free, polypyrrole-based DNA sensor by surface plasmon resonance imaging ; *Anal. Chem.*; **2000**; 72: 6003-6009.
- ¹⁶¹ Shirakawa S.; Louis E.J.; MacDiarmid A.G.; Chiang C.K.; Heeger A.J.; Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacétylène (CH)_x; *J. Chem. Soc.; Chem. Comm.*; **1977**; 578-580.
- ¹⁶² Heinze J.; Electrochemistry of conducting polymers; *Synth. Met.*; **1991**; 43(1-2): 2805-2823.
- ¹⁶³ Cosnier S.; Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review; *Biosens. Bioelect.*; **1999**; 14: 443-456.
- ¹⁶⁴ Kondo K.; Suwa M.; Ozaki A.; Takemoto K.; Synthesis and electrochemical analysis of N-substituted pyrrole compounds; *J. Electroanal. Chem.*; **1992**; 333: 143-151.

- ¹⁶⁵ Higgins S.; Conjugated polymers incorporating pendant functional groups – synthesis and characterization ; *Chem. Soc. Reviews*; 1997 ; **26** (4) : 247-258.
- ¹⁶⁶Rühe J.; Ezquerra T.; Wegner G.; Conductiong polymers from 3-alkylpyrroles ; *Makromol. Chem Rapid Commun.*; **1989**; 10: 103-108.
- ¹⁶⁷ Vork F.T.A.; Schuermans B.C.A.M.; Barendrecht E.; Influence of inserted anions on the properties of polypyrrole; *Electrochim. Acta*; **1990**; 35: 567-575.
- ¹⁶⁸ Diaz A.F.; Kanazawa K.K. ; Gardini G.P. ; Electrochemical polymerization of pyrrole; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*; **1979**; 14: 635-636.
- ¹⁶⁹ Sadki S.; Schottland P.; Brodie N.; Sabouraud G.; The mechanisms of pyrrole electropolymerization ; *Chem. Soc. Rev.*; **2000**; 29: 283-293.
- ¹⁷⁰ Suarez M.F.; Compton R.G.; In situ atomic force microscopy study of polypyrrole synthesis and the volume changes induced by oxidation and reduction of the polymer; *J. Electroanal. Chem.*; **1999**; 462: 211-221.
- ¹⁷¹ Vernitskaya T.V.; Efimov O.N.; Polypyrrole: a conducting polymer; its synthesis, properties and applications; *Russian Chem. Rev.*; **1997**; 66(5) : 443-457.
- ¹⁷² Dupont-Filliard A.; Billon M.; Guillerez S.; Bidan G.; Comparison by QCM and photometric enzymatic test of the biotin-avidin recognition on a biotinylated polypyrrole; *Talanta*; **2001**; 55: 981-992.
- ¹⁷³ Dupont-Filliard A.; Roget A.; Livache T.; Billon M.; Reversible oligonucleotide immobilization based on biotinylated polypyrrole film; *Anal. Chim. Acta*; **2001**; 449: 45-50.
- ¹⁷⁴ Lassalle N.; Roget A.; Livache T.; Mailley P.; Vieil E.; Electropolymerisable pyrrole-oligonucleotide : synthesis and analysis of ODN hybridization by fluorescence and QCM ; *Talanta* ; **2001** ; 55 : 993-1004.
- ¹⁷⁵ Livache T.; Maillart E.; Lassalle N.; Mailley P.; Corso B.; Guedon P.; Roget A.; Levy Y.; Polypyrrole based DNA hybridization assays : study of label free detection processes versus fluorescence on microchips ; *J. Pharm. Biomed. Anal.*; **2003**; 32: 687-696.
- ¹⁷⁶ Livache T.; Guedon P.; Brakha C.; Roget A.; Levy Y.; Bidan G.; Polypyrrole electrospotting for the construction of oligonucleotide arrays compatible with a surface plasmon surface resonance hybridization detection; *Synth. Metals*; **2001**; 121: 1443-1444.
- ¹⁷⁷ Schuhmann W.; Kranz C.; Wohlschläger H.; Strohmeier J.; Pulse technique for the electrochemical deposition of polymer films on electrode surfaces; *Biosens. Bioelectron.*; **1997**; 12: 1157-1167.
- ¹⁷⁸ Xinglong Y.; Dongsheng W.; Dingxin W.; Jain-Hua O.Y.; Zibo Y.; Yonggui D.; Wei L.; Micro-array detection system for gene expression products based on surface plasmon resonance imaging; *Sens. Actuators B*; **2003**; 91: 133-137.
- ¹⁷⁹ Nikitin P.I.; Beloglazov A.A.; Grigorenko A.N.; Savchuk A.I.; Anokhin P.M.; Wright J.D.; detection of nitrogen dioxide by means of a gold film in a surface plasmon resonance scheme; *Tech. Phys. Lett.*; **1997**; 23: 920-922.

¹⁸⁰ Maillart Emmanuel ; Thèse de doctorat en Optique, Université Paris XI ; soutenue le 30 juin **2004** ; « Développement d'un système optique d'imagerie en résonance de plasmons de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel ».

¹⁸¹ Osmond R.I.W.; Kett W.C.; Skett S.E.; Coombe D.R.; Protein-heparin interactions measured by BIAcore 2000 are affected by the method of heparin immobilization; *Anal. Biochem.*; **2002**; 310: 199-207.

¹⁸² Adeloju S.B.; Wallace G.G.; Conducting polymers and the bioanalytical sciences: new tools for biomolecular communication; *Analyst*; **1996**; 121: 699-703.

¹⁸³ Ugolini S., Mondor I., Sattenteau Q.J.; HIV-1 attachment: another look; *Trends in Microbiology*; **1999**; 7 (4): 144-149.

¹⁸⁴ Dimitrov D.S.; Cell biology of virus entry; *Cell.*; **2000**; 10(7): 697-702.

¹⁸⁵ Amara A.; Gall S.L.; Schwartz O.; Salamero J.; Montes M.; Loetscher P.; Baggiolini M.; Virelizier J.L.; Arenzana-Seisdedos F.; *J. Exp. Med.*; **1997**; 186(1): 139-146.

¹⁸⁶ Lortat-Jacob H.; Grosdidier A.; Imberty A.; Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines ; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; **2002** ; 9 (3) : 1229-1234.

¹⁸⁷ Sadir R.; Baleux F.; Grosdidier A.; Imberty A.; Lortat-Jacob H.; Characterization of the Stromal Cell-derived Factor-1 α -heparin complex ; *J. Biol. Chem.* ; **2001** ; 276 (11) : 8288-8296.

¹⁸⁸ Valenzuela-Fernandez A.; Palanche T.; Amara A.; Magerus A.; Altmeyer R.; Delaunay T.; Virelizier J.-L.; Baleux F.; Galzi J.-L.; Arenzana-Seisdedos F.; Optimal inhibition of X4 HIV isolates by the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1 α requires interaction with cell surface heparan sulfate proteoglycans ; *J. Biol. Chem.* ; **2001** ; 276 (28) : 26550-26558.

¹⁸⁹ Mbemba E.; Gluckman J.C.; Gattegno L.; Glycan and glycosaminoglycan binding properties of stromal cell-derived factor (SDF)-1 α ; *Glycobiology*; **2000** ;10(1): 21-29.

¹⁹⁰ Sweeney E.A.; Lortat-Jacob H.; Priestley G.V.; Nakamoto B.; Papayannopoulou T.; Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells; *Blood*; **2002**; 99 (1): 44-51.

¹⁹¹ Amara A.; Lorthioir O.; Valenzuela A.; Magerus A.; Thelen M.; Montes M.; Virelizier J.L.; Delepierre M.; Baleux F.; Lortat-Jacob H.; Arenzana-Seisdedos F.; Stromal cell-derived factor-1 α associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine.; *J. Biol. Chem.*; **1999**; 274(34): 23916-23925.

¹⁹² Lemieux G.A.; Bertozzi C.R.; Chemoselective ligation reactions with proteins, oligosaccharides and cells; *Tibtech.*; **1998**; 16: 506-513.

¹⁹³ Jirkovsky I.; Baudy R.; A facile large scale preparation of 1H-pyrrole-1-ethanamine and syntheses of substituted pyrrolo[1,2-a]pyrazines and hydro derivatives thereof; *Synthesis*; **1981**;481-483.

¹⁹⁴ Bayer E.A.; Wilneck M.; The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology; *Methods Biochem Anal.* ; **1980**; 261: 1-45.

- ¹⁹⁵ Liu X.-H.; Wang, H.-K.; Herron J.N.; Prestwich G.D.; Photopatterning of Antibodies on Biosensors; *Bioconjugate Chem.*, **2000**, 11 (6) : 755-761.
- ¹⁹⁶ *The Merck Index*; 10ème édition; **1983** : 813-815.
- ¹⁹⁷ Bitter T.; Muir H.M.; A modified uronic acid carbazole reaction; *Anal. Biochem.*; **1962**; 4: 330-334.
- ¹⁹⁸ Ridley B.L.; Spiro M.D.; Glushka J.; Albersheim P.; Darvill A.; Mohnen D.; A method for biotin labelling of biologically using a chemically stable hydrazide linkage; *Anal. Biochem.*; **1997**; 249 : 10-19.
- ¹⁹⁹ Muhs M.A.; Weiss F.T.; Determination of pyrrolic nitrogen in petroleum distillates; *Anal. Chem.*; **1958**; 30: 259-266.
- ²⁰⁰ Iyer R.S.; Kobierski M.E.; Salomon R.G.; Generation of pyrroles in the reaction of Levugladin E₂ with proteins; *J. Org. Chem.*; **1994**; 59: 6038-6043.
- ²⁰¹ Wolowacz S.E.; Yon Hin B.F.Y.; Lowe C.R.; Covalent electropolymerization of glucose oxidase in polypyrrole; *Anal. Chem.*; **1992**; 64: 1541-1545.
- ²⁰² Reeves R.L.; in *The Chemistry of the carbonyl group* (Patai S; Ed.); **1960**; pp 600-614; Interscience, London.
- ²⁰³ King T.P.; Zhao S.W.; Lam T.; Preparation of protein conjugates via intermolecular hydrazone linkage; *Biochemistry*; **1986**; 25: 5774-5779.
- ²⁰⁴ Mester L.; El Khadem H.S.; in *The carbohydrates, Vol. IB, Chemistry and Biochemistry* (Pigman W, Horton D, Wandler JD, Eds); pp 929-988; Academic Press, New York.
- ²⁰⁵ Radoff S.; Danishefsky I.; Solid-phase synthesis of fluorescent heparin; *Anal. Biochem.*; **1982**; 120: 373-378.
- ²⁰⁶ Irazoqui F.J.; Lopez P.H.H.; Vides M.A.; Nores G.A.; Novel immunogenicity of Thomsen-Friedenreich disaccharide obtained by a molecular rotation on its carrier linkage ; *Glycobiology* ; **2000** ; 10(8) : 781-787.
- ²⁰⁷ Kurtz A.J.; Lloyd R.S.; 1,N²-Deoxyguanosine adducts of acrolein, crotonaldehyde, and trans-4-hydroxynonenal cross-link to peptides via Schiff base linkage; *J. Biol. Chem.*; **2003**; 278(8): 5970-5976.
- ²⁰⁸ Dalpathado D.S.; Jiang H.; Kater M.A.; Desaire H.; reductive amination of carbohydrates using NaBH(OAc)(3) ; *Anal. Bioanal. Chem.*; **2005**; 381(6): 1130-1137.
- ²⁰⁹ Ni J.; Singh S.; Wang L.-X.; Synthesis of maleimide-activated carbohydrates as chemoselective tags for site-specific glycosylation of peptides and proteins ; *Bioconjugate Chem.* ; **2003**; 14: 232-238.
- ²¹⁰ Flinn N.S.; Quibell M.; Monk T.P.; Ramjee M.K.; Urch C.J.; A single-step method for the production of sugar hydrazides : intermediates for the chemoselective preparation of glycoconjugates ; *Bioconjugate Chem.* ; **2005**; 16: 722-728.
- ²¹¹ Binig G.; Rohrer H.; Gerber C.; Weibel E.; Surface studies by scanning tunneling microscopy; *Phys Rev Lett.*; **1982** ; 49 : 57-61.
- ²¹² Binnig G.; Quate C.F.; Gerber C.; Atomic force microscope; *Phys Rev Lett.*; **1986** ; 56 : 930-933.

- ²¹³ Kasas S.; La microscopie à force atomique dans la recherche en biologie ; *Med Sci* ; **1992** ; 8 : 140-148.
- ²¹⁴ Engel A.; Gaub H.E.; Müller D.J.; Atomic force microscopy: a forceful way with single molecules. *Curr. Biol.*; **1999** ; 9 : R133-136.
- ²¹⁵ Song S.-H.; Park K.-M.; Kim W.-S.; Chang S.-M.; Analysis of the characteristics of electrochemically polymerized polypyrrole films by using QCA et AFM ; *Mater. Sci. Eng.*; **2004**; 24: 225-227.
- ²¹⁶ Fujokawa K.; Jung H.S.; Park J.W.; Kim J.M.; Lee H.Y.; Kawai T.; AFM imaging of nanostructure polypyrrole doughnuts shapes fabricated by direct electrochemical oxidation; *Electrochem. Comm.*; **2004**; 6: 461-466.
- ²¹⁷ Pande R.; Ruben G.C.; Lim J.O.; Tripathy S.; Marx K.A.; DNA bound to polypyrrole films: high-resolution imaging, DNA binding kinetics and internal migration; *Biomaterials*; **1998**; 19: 1657-1667.
- ²¹⁸ Han D.-H.; Lee H.J.; Park S.-M.; Electrochemistry of conductive polymers XXXV : electrical and morphological characteristics of polypyrrole films prepared in aqueous media studied by current sensing atomic force microscopy ; *Electrochem. Acta*; **2005**; 50: 3085-3092.
- ²¹⁹ Stemmler I.; Brecht A.; Gauglitz G.; Compact surface plasmon resonance-transducers with spectral readout for biosensing applications; *Sens. Actuators B*; **1999**; 54: 98-105.
- ²²⁰ Schügerl K.; Progress in monitoring, modelling and control of bioprocesses during the last 20 years ; *J. Biotechnol.*; **2001**; 85: 149-173.
- ²²¹ Lortat-Jacob H.; Baltzer F.; Grimaud J.-A.; Heparin decreases the blood clearance of Interferon- γ and increases its activity by limiting the processing of its carboxyl-terminal sequence; *J. Biol. Chem.*; **1996**; 271 (27): 16139-16143.
- ²²² Hurt-Camejo E.; Rosengren B.; Sartipy P.; Elfsberg K.; Camejo G.; Svensson L.; CD44, a cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, mediates binding of interferon-gamma and some of its biological effects on human vascular smooth muscle cells; *J. Biol. Chem.*; **1999**; 274(27): 18957-18964.
- ²²³ Brooks B.; Briggs D.M.; Eastmond N.C.; Fernig D.G.; Coleman J.W.; Presentation of IFN-g to nitric oxide-producing cells : a novel function for mast cells ; *J. Immunol.*; **2000**; 164: 573-579.
- ²²⁴ Grosjean L.; Cherif B.; Mercey E.; Roget A.; Levy Y.; Marche P.; Villiers M.-B.; Livache T.; « Polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interactions studies using label free detection process »; 2005 soumis à Analytical Biochemistry.
- ²²⁵ Lortat-Jacob H.; Grimaud J.-A.; Binding of interferon-gamma to heparan sulfate is restricted to the heparin-like domains and involves carboxylic--but not N-sulfated—groups; *Biochim. Biophys. Acta*; **1992**; 1117(2): 126-130.
- ²²⁶ Grosjean L.; *Diplôme de Recherche Technologique* « Bioreconnaissance protéine – ligand sur des substrats de polymères conducteurs : vers les puces à protéines» **soutenu le 21 Octobre 2003.**

²²⁷ Bassil N.; Maillart E.; Canva M.; Lévy Y.; Millot M.-C.; Pissard S.; Narwa R.; Goossens M.; One hundred spots parallel monitoring of DNA interactions by SPR imaging of polymer-functionalized applied to the detection of cystic fibrosis mutations ; *Sens. Actuators B*; **2003**; 94: 313-323.