



**HAL**  
open science

## Des puces à protéines/peptides pour des applications en recherche fondamentale et clinique

Boutheina Cherif

► **To cite this version:**

Boutheina Cherif. Des puces à protéines/peptides pour des applications en recherche fondamentale et clinique. Ingénierie biomédicale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00068738

**HAL Id: tel-00068738**

**<https://theses.hal.science/tel-00068738>**

Submitted on 18 May 2006

**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.

Université Joseph Fourier-Grenoble I  
Ecole doctorale Ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement

## **Thèse**

Pour obtenir le titre de

**Docteur de l'Université Joseph Fourier**

Présentée par

**Boutheina Cherif**

---

### **Des puces à protéines/peptides pour des applications en recherche fondamentale et clinique**

---

Soutenue le 27 Avril 2006 devant le jury d'examen composé de :

**Rapporteurs :**

**Pr. Alain BRISSON  
Dr. Malcolm BUCKLE**

**Examineurs :**

**Dr. Geneviève INCHAUSPE  
Pr. Hammadi AYADI  
Pr. Jacques DEMONGEOT  
Dr. Marie-Bernadette VILLIERS  
Dr. Thierry LIVACHE**

INSERM U548  
Département de Réponse et Dynamique Cellulaire  
CEA-Grenoble  
Université Joseph Fourier



## Remerciements...

Aux membres de jury de cette thèse : Hammadi Ayadi, Jacques Demongeot et Geneviève Inchauspé, qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce travail, Alain Brisson et Malcolm Buckle pour l'intérêt qu'ils ont porté et d'accepter être rapporteur de ce travail.

À l'unité INSERM U548 : Patrice Marche pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, Villiers Christian pour les conseils et les discussions que nous avons eu, aux autres scientifiques, personnels techniques ou administratifs et aux autres doctorants ou « ex-doctorants » que j'ai côtoyés durant cette période.

À Marie-Bernadette pour l'encadrement et le suivi pendant le DEA et la thèse que nous avons découvert ensemble un nouveau monde des nanotechnologies enrichissant par ses aspects pluridisciplinarité et haute technologie, pour ses conseils et son soutien pendant les moments difficiles. Ces dernières années étaient un combat pour toutes les deux, pour se familiariser avec de nouveaux langages scientifiques en même temps il faut avancer malgré tout problème ou obstacle. Merci pour tous ces moments de solidarité.

À Thierry pour l'encadrement et l'intérêt qu'il a porté à ce mon travail et à ma présence dans son laboratoire, je n'oublierai jamais les moments qu'il m'a accordés pour discuter chaque fois devant l'imageur SPR pendant mes expériences, à travers ses remarques et ses conseils constructives j'ai appris énormément. Ce travail n'aurait pu aboutir sans toi, je te remercie du fond du cœur, à travers ta personnalité j'ai découvert comment ça se présente la science en toute simplicité.

À toute l'équipe du CREAB : Roberto Calmczuk pour les conseils, discussion et intérêt qu'il a porté à mon travail, André Roget, Arnau Buhot et tous les thésards que j'ai rencontrés.

À Génoptics : Philippe Kérourédan pour le soutien financier pendant ces derniers mois de la thèse et tout le personnels de cette jeune société.

## Abréviations

Ac : Anticorps  
ADN : Acide désoxyribonucléotide  
AFM : Atomic force microscopy  
Ag : Antigène  
ARN : Acide ribonucléotide  
BSA : Sérum albumine bovine  
CD : Cellule dendritique  
FACS : Flow analysis cell sorting  
hCG : Hormone gonadotrophine chorionique  
HEL : Hen egg lysozyme  
HPLC : High performance liquide chromatographie  
HVR : Région hypervariable  
LB : Lymphocyte B  
LT : Lymphocyte T  
MALDI-TOF : Matrix assisted laser desorption/ionization-Time of light  
MEMS : Microelecromecanical system  
NP : Nucléoprotéine  
NTC : Nanotube de carbone  
PDMS : Polydimethylsiloxane  
PCR : Polymerase chain reaction  
QCM : Quartz Cristal Microbalance  
RCA: Rolling cercle amplification  
RMI : Rapport molaire initial  
SELDI : Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization  
SPR: Résonance plasmonique de surface  
VHB : Virus de l'hépatite B  
VHC : Virus le l'hépatite C  
VIH : Virus de l'immunodéficience humain  
WHO : Word health organization

# Sommaire

**Introduction générale.....page 9**

**Chapitre 1 : Introduction.....page 11**

**Partie 1 : Nanotechnologies et intérêts en biologie.....page 12**

- I- Introduction
- II- Quelques domaines d'application des nanotechnologies
  - 1- Les nanomatériaux
    - 1-1- Les nanotubes de carbone
    - 1-2- Les nanoparticules
  - 2- Laboratoires sur puce (*Lab on chip*)
    - 2-1- Analyse des acides nucléiques
    - 2-2- Analyse des protéines
    - 2-3- Analyse des cellules
  - 3- Les implants et les prothèses
  - 4- Les biopuces
    - 4-1- Les puces à ADN
    - 4-2- Les puces à protéines
    - 4-3- Les puces à peptides
    - 4-4- Les puces à oligosaccharides

**Partie 2 : Stratégies d'immobilisation des protéines et des peptides sur support miniaturisé.....page 31**

- I- Introduction
- II- Les supports
- III- Immobilisation des protéines
  - 1- L'adsorption
  - 2- L'inclusion ou le piégeage

- 3- Le couplage covalent
- IV- Immobilisation des peptides
  - 1- Immobilisation des peptides pré-synthétisés
  - 2- Synthèse des peptides *in situ*
    - 2-1- Synthèse en SPOT
    - 2-2- Synthèse par photolithographie
- V- Dépôt des protéines et des peptides sur support miniaturisé

**Partie 3 : Les techniques de détection et d'analyse d'interactions protéines-protéines/peptides sur des puces.....page 43**

- I- Méthodes de détection avec marquage
  - 1- La fluorescence
  - 2- La radioactivité
  - 3- L'activité enzymatique
  - 4- Détection magnétique
- II- Méthodes de détection sans marquage
  - 1- La spectrométrie de masse (SELDI)
  - 2- La microbalance à quartz (QCM)
  - 3- La microscopie à force atomique (AFM)
  - 4- Les micro et nano systèmes électromécaniques (Cantilevers)
  - 5- Les biocapteurs optiques
    - 5-1- Définition de l'onde évanescente
    - 5-2- La résonance plasmonique de surface

**Partie 4 : Caractéristiques des infections au virus de l'hépatite C ....page 62**

- I- Epidémiologie et histoire naturelle du VHC
- II- Structure et virologie moléculaire
- III- Variabilité génétique
- IV- Réplication du VHC
- V- Transmission du VHC

- VI- Immunologie des infections au VHC
  - 1- Le système immunitaire
    - 1-1- L'immunité innée
    - 1-2- L'immunité adaptative
  - 2- Evolution de la réponse immune au cours des infections au VHC
    - 2-1- Réponse immune innée
    - 2-2- Réponse immune adaptative
    - 2-3- Echappement du virus et l'hépatite chronique
- VII- Pathogénie du VHC
- VIII- Diagnostic
- IX- Traitement de la maladie et vaccination

## **Chapitre 2 : Résultats.....page 77**

**Article 1** : A polypyrrole protein microarray for antibody–antigen interaction studies using a label-free detection process.....page 79

**Article 2:** Immunomodulatory properties of Morbillivirus nucleoproteins.....page 88

**Article 3:** Design and application of microarray for fluorescence and SPR imaging analysis of peptide-antibody interactions .....page 117

**Article 4:** Clinically related protein-peptide interactions monitored in real time on novel peptide chips by surface plasmon resonance imaging.....page 142

## **Chapitre 3 : Discussion et perspectives.....page 145**

**Références bibliographiques.....page 161**

**Table des illustrations.....page 173**

**Résumé.....page 174**



## **Introduction générale**

La convergence de différentes disciplines telles que la chimie, la physique et la biologie, a mis en valeur un nouvel espace scientifique en plein essor ces dernières années, c'est le domaine des nanosciences et des nanotechnologies. C'est un champ de connaissances et d'applications très vaste ouvrant de nouvelles voies dans la recherche fondamentale et appliquée. C'est dans ce cadre d'étude que mes travaux de thèse s'inscrivent, et plus précisément dans le développement et la conception des biopuces.

Les biopuces, ou « microarrays » en anglais, sont des microsystèmes permettant une analyse biologique à haut débit. Le concept des puces a été émergé à partir des procédures de miniaturisation qui ont commencées avec la microélectronique. Les premières applications des puces au séquençage du génome de certaines espèces, ont permis de réaliser de grands progrès dans la génomique. Ceci a conduit les technologues à appliquer ces systèmes à la protéomique, un domaine qui occupe une grande place aussi bien dans la recherche, fondamentale ou clinique, que dans l'industrie pharmaceutique. Si les puces à ADN sont apparues au début des années 90, ce n'est qu'après une dizaine d'années que les premières puces à protéines ont été validées. Cette différence de phase entre puce à ADN et puce à protéines est liée d'une part à un retard dans la prise de conscience de l'importance technologique d'un tel système appliqué aux protéines et d'autre part aux difficultés rencontrées dans sa réalisation à cause de la complexité des protéines par rapport à l'ADN. La conception et la validation d'une biopuce comporte plusieurs étapes : la première est une étape d'immobilisation des biomolécules sur un support bien défini et qui doit répondre aux exigences de la chimie de fixation et de la méthode utilisée pour l'analyse des interactions biomoléculaires, la deuxième est une étape de validation de la puce avec des modèles connus. La dernière étape consiste à de détermination de la performance de la puce vis-à-vis de la nature des échantillons à analyser et la possibilité de réutilisation d'une même puce.

Mon travail de thèse se rattache à deux domaines de recherche. Le premier concerne la technologie des puces, plus précisément le développement des puces à protéines/peptides en prenant appui sur l'expertise technologique de l'équipe de T. Livache (DRFMC/ CEA) dans les domaines de la chimie de surface et des biocapteurs optiques, comme l'imagerie de résonance plasmonique de surface. Le deuxième est un domaine biologique et correspond à la

partie présentant les différentes applications menées au cours de ma thèse et plus particulièrement dans le cadre d'une étude clinique concernant les infections par le virus de l'hépatite C. Ce manuscrit comprend un premier chapitre introductif contenant une présentation des nanotechnologies avec les principales applications en biologie, puis il reprend l'état de l'art sur les différentes stratégies d'immobilisation des biomolécules (protéine/peptide) sur une surface et les différentes méthodes utilisées pour étudier des interactions biomoléculaires sur des puces. Ensuite, quelques données liées aux infections par le virus de l'hépatite C sont développées et plus particulièrement la réponse immunitaire induite par ce virus, cette dernière faisant l'objet de la principale application exposée dans ce travail. Les principaux résultats obtenus sont exposés dans le deuxième chapitre et discutés dans le troisième.

# **Chapitre 1 : Introduction**

# Partie 1 : Nanotechnologies et intérêts en biologie

## I- Introduction

Les nanotechnologies constituent un champ de recherche et de développement technologiques impliquant la fabrication de structures, de dispositifs et de systèmes à partir de procédés permettant de structurer la matière au niveau atomique, moléculaire ou supra moléculaire, à des échelles comprises approximativement entre 1 et 100 nanomètres. Les nanotechnologies peuvent donc être définies comme étant l'ensemble des techniques permettant la création et l'utilisation de nouveaux matériaux ou systèmes. Elles résultent du contrôle de la matière à l'échelle atomique et de l'exploitation de phénomènes ayant lieu à l'échelle nanométrique. En effet, il est maintenant clairement établi qu'à cette échelle, les propriétés fondamentales de la matière (mécaniques, thermiques, électriques, magnétiques, optiques) dépendent de la taille des structures et peuvent différer énormément du matériau en masse. Cela est dû à plusieurs raisons incluant le comportement quantique, l'importance des phénomènes interfaciaux, le rapport surface/volume élevé, etc. Les nanotechnologies résultent aussi souvent d'une hiérarchie d'architectures, à l'image de beaucoup de processus rencontrés chez le vivant.

Les nanosciences requièrent la manipulation et le contrôle de la matière éventuellement jusqu'au niveau atomique, et élaborent des systèmes pour mettre en évidence et étudier des phénomènes aux échelles atomiques, moléculaire et supramoléculaire. Les nanotechnologies visent à concrétiser des concepts en utilisant des savoir-faire permettant d'élaborer des matériaux ou des systèmes dont la fonctionnalité répond à un besoin particulier, en vue d'une application identifiée. Schématiquement, les nanotechnologies utilisent deux approches : l'approche ascendante "*bottom-up*", c'est-à-dire à partir du plus petit pour aller vers le plus grand. Dans ce contexte, les atomes sont manipulés individuellement, et l'utilisation des procédés d'assemblage permet la formation de groupe d'atomes. L'organisation spatiale de ces atomes donne naissance à des structures plus au moins complexes tels que les nanomatériaux ou les nanomachines. La deuxième est une approche descendante "*top-down*", c'est-à-dire du plus grand pour aller vers le plus petit, privilégiant la miniaturisation des procédés de micro fabrication déjà développés. Quel que soit le cas de figure, les nanotechnologies impliquent l'incorporation de ces structures à

l'échelle nanométrique au sein de matériaux, de composants, de systèmes ou d'architectures plus ou moins complexes pour les amener à l'échelle des objets usuels dont les fonctions ou les propriétés découlent directement de la structuration ou de l'agencement réalisés à l'échelle nanométrique.

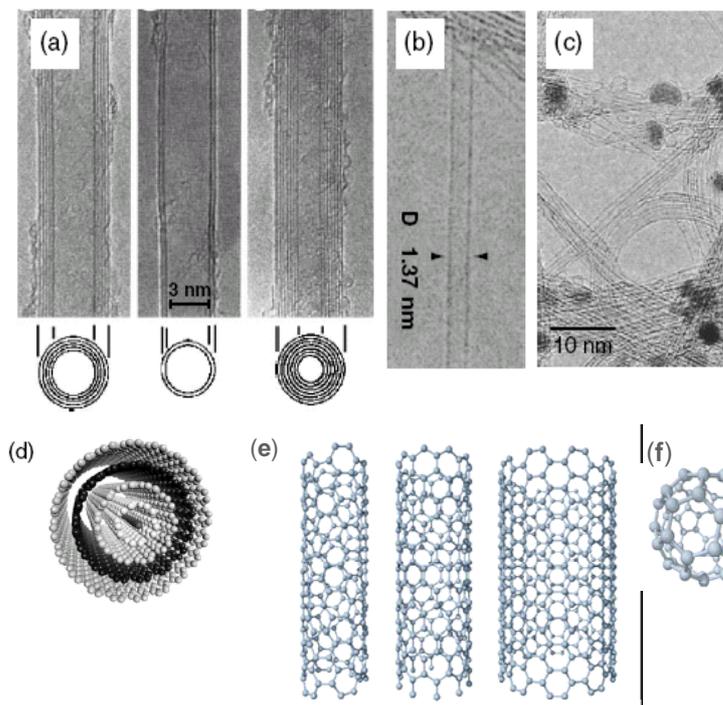
## **II- Quelques domaines d'application des nanotechnologies**

L'objectif de ce paragraphe est de décrire les nanotechnologies à travers quelques applications développées et de montrer l'intérêt qu'elles peuvent apporter par rapport à l'ancien état de l'art. Ces applications sont nombreuses et variables, elles ont touché plusieurs domaines, allant des transistors jusqu'aux prothèses médicales. Nous développons plus particulièrement celles décrites pour la biologie.

### **1- Les nanomatériaux :**

#### **1-1- Les nanotubes de carbone**

Le carbone, sous ses formes cristallines (graphite et diamant) ou amorphes (noir de carbone, pyrocarbone...), occupe une place de choix dans les matériaux technologiques. Ainsi, les nanotubes de carbones (NTC) découverts en 1991 par Iijima (Iijima, 1991) présentent une structure et des propriétés si particulières qu'ils ouvrent de larges perspectives dans de nombreux domaines telles que la mécanique, la nanochimie ou la nanoélectronique. Un NTC est une structure cristalline (graphite) de forme tubulaire, composée d'atomes disposés régulièrement en hexagone et pouvant être fermés aux deux extrémités par un chapeau de type fullerène (figure 1.1). Ces cylindres peuvent être longs de plusieurs microns pour un diamètre de l'ordre du nanomètre. Un nanotube constitué d'un seul cylindre graphitique est couramment appelé nanotube monofeuillet. Il est possible aussi de synthétiser des nanotubes constitués de plusieurs cylindres graphitiques coaxiaux. Ce sont les nanotubes multi-feuillets.



**Figure 1.1:** Microscopie électronique à transmission (MET) des NTC multifeuillet (a) (Iijima, 1991) et monofeuillet (b) (Iijima and Ichihashi, 1993). (c) Image par MET de « bandes » de NTC. Représentation schématique d'un NTC multifeuillet (d) et monofeuillet (e); Gauche : nanotube chiral, centre: nanotube zig-zag et droite:chaise. (f) Fullerène C60.

La diversité de la chimie des NTC ont permis d'ouvrir un champ d'application en tant que transporteurs pour des cibles pharmaceutiques, d'ADN, de protéines ou autres molécules d'intérêt. En effet, Les NTC peuvent être modifiés chimiquement soit pour augmenter leur solubilité dans certains solvants, soit pour moduler leurs propriétés électroniques, ou encore pour les activer avec des groupements permettant la fixation de biomolécules. Ces propriétés se révèlent intéressantes dans l'application des NTC dans le domaine des biocapteurs grâce à leur petite dimension, leur grande surface d'interaction avec la cible, leur capacité de fixation et leur propriété électrique modulable. Les NTC peuvent être modifiés par la fixation, covalente ou non de diverses molécules, permettant ainsi la détection de nombreux éléments biologiques tels que la Streptavidine (NTC-biotine, (Woolley, 2004)), des anticorps (NTC-antigène, (Takeda et al., 2005)) ou le glucose (NTC-glucose oxydase, (Azamian et al., 2002; Perez et al., 2005)). De plus, la sensibilité de tels biosenseurs est très supérieure à celle des capteurs classiques (10x dans le cas de la détection du glucose par exemple, (Wang et al., 2004)). D'autres applications ont prouvé l'efficacité des NTC comme modèle de base des biocapteurs électriques. Des NTC ont été utilisés dans l'étude des propriétés électrochimiques

de certaines molécules telles que la dopamine (Wu et al., 2003a), la NADH (Wang and Musameh, 2003) et le peroxyde d'hydrogène (Wang and Musameh, 2003).

Les NTC ont été utilisés aussi en tant que transporteurs de molécules soit par adhérence sur leur surface par exemple dans le cas d'auto-assemblage de l'ADN (Katz and Willner, 2004), ou dans leur cavité intérieure tels que le cytochrome c et la  $\beta$ -Lactase I (Davis et al., 1998). Cette dernière approche ouvre des perspectives d'utilisation des NTC comme nanocapsule pour acheminer des drogues à des cellules cibles.

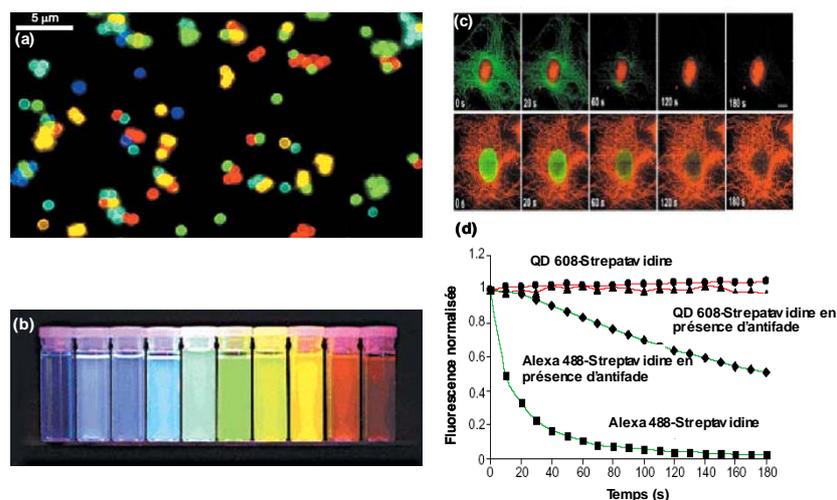
Les propriétés des NTC en font également des outils prometteurs dans le domaine de la vaccination. Ainsi, Pantarotto et ses collaborateurs ont montré que l'injection de peptides couplés à des NTC induit une réponse humorale supérieure à celle observée après injection du peptide libre (Pantarotto et al., 2003). Ce résultat, obtenu chez la souris, peut être en partie expliqué par les travaux de Salvador Morales (Salvador-Morales et al., 2006) qui montrent que les NTC ont la capacité d'activer le système complémentaire, élément indispensable à la mise en place de la réponse immunitaire.

Les NTC semblent être un outil important dans la culture des neurones (Mattson et al., 2000). Ils ont été utilisés comme substrat pour la culture qui favorise la progression des dendrites en adhérant sur les NTC. Cette approche a permis de maintenir des neurones vivants plus longtemps. Récemment, des scientifiques ont montré qu'on peut contrôler la culture des neurones en utilisant des NTC fonctionnalisés chimiquement (Lovat et al., 2005).

## **1-2- Les nanoparticules**

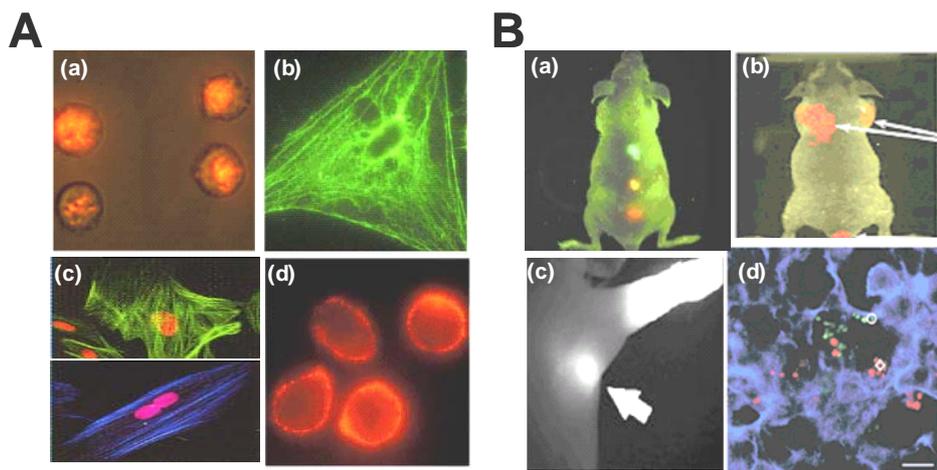
### **a- Les nanocristaux semi-conducteurs fluorescents (Quantum dots = QD)**

Ce sont des cristaux de taille nanométrique de matériaux semi-conducteurs purs ou composés qui, sous éclairage ultraviolet, réémettent une lumière fluorescente dont la longueur d'onde dépend de la taille du nanocristal (figure 1.2), une conséquence d'un phénomène appelé « confinement quantique » lié à leur petite taille (Alivisatos, 1996). De plus, les nanocristaux présentent un fort coefficient d'extinction ( $10^5$ - $10^6$   $M^{-1}cm^{-1}$ ), 10 à 100 fois supérieur aux molécules fluorescentes classiques ; cette caractéristique permet de les détecter avec une grande efficacité (Dabbousi et al., 1997; Murray et al., 1993; Wu et al., 2003b).



**Figure 1.2 :** Les nanocristaux semi-conducteurs (Quantum-dot). **(a)** Image par fluorescence d'un mélange de billes de CdSe/ZnS avec différentes émissions à 484, 508, 547, 575, et 611 nm. Les billes ont été immobilisées sur une lame traitée avec la poly-lysine. **(b)** Illustration des 10 différentes couleurs observées avec des nanocristaux de CdSe/ZnS sous une lampe ultraviolet. L'émission varie du bleu (gauche) vers le rouge (droite) avec des maximums d'émission localisés à 443, 473, 481, 500, 518, 543, 565, 587, 610, et 655 nm (Han et al., 2001). **(c)** et **(d)** Comparaison de la photostabilité des QD-608 et Alexa-488. **(c)** Marquage simultané des microtubules et le noyau des cellules 3T3, en rouge QD-608 et en vert Alexa-488. **(d)** Cinétique des intensités de fluorescence du QD-608 et de l'Alexa-488 en présence ou pas de l'agent antifadique (Wu et al., 2003b).

Les premières expériences sur l'emploi des nanocristaux en biologie ont suscité un intérêt considérable dans la mesure où ils apportent une solution nouvelle à des limitations connues depuis longtemps pour la fluorescence des colorants organiques. En plus de leur photostabilité déjà mentionnée, les nanocristaux ont des propriétés spectrales particulièrement favorables pour une détection multi-couleur. En effet, les nanocristaux ayant une large bande d'absorption et un spectre d'émission étroit, plusieurs types de particules, de taille différente et donc de longueur d'onde d'émission distinctes, peuvent être excitées simultanément à l'aide d'une seule source lumineuse. De multiples espèces moléculaires peuvent ainsi être facilement identifiées au sein d'un même échantillon à travers la couleur des sondes auxquelles elles se lient. Grâce à leurs propriétés optiques, les nanocristaux sont donc des outils très intéressants comme traceurs fluorescents illustrés par plusieurs applications biologiques notamment dans l'imagerie sur des préparations cellulaires, *ex-vivo* et *in vivo* (figure 1.3).

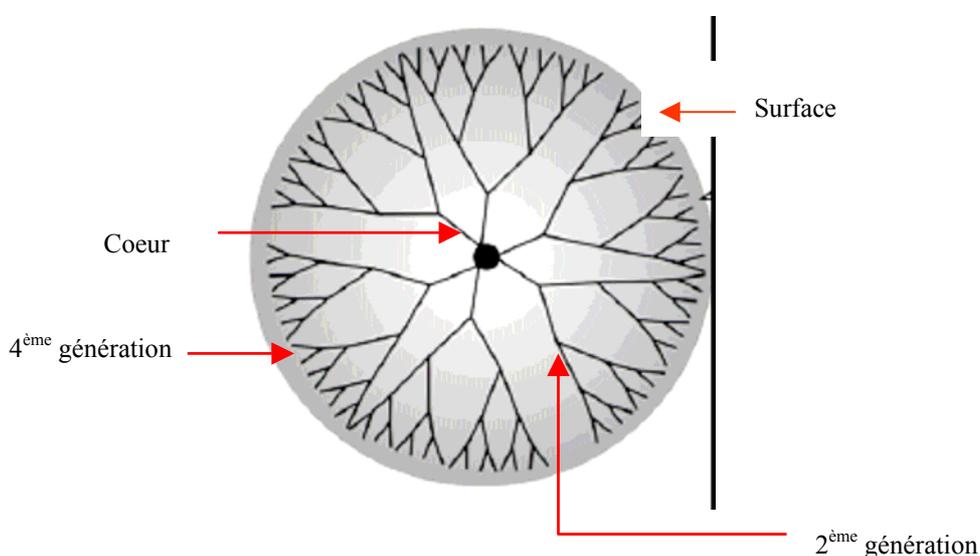


**Figure 1.3.** Marquage cellulaire avec des nanocristaux semi-conducteurs. **(A)** Microscopie sur des préparations cellulaires : **(a)** localisation intracellulaire d'un peptide conjugué à des QD au niveau des cellules vivantes, **(b)** observation de l'actine des fibroblastes fixés, **(c)** visualisation simultanée du noyau et du cytosquelette des fibroblastes, **(d)** marquage fluorescent du récepteur de l'urokinase avec un anticorps marqué par des QD-rouges dans des cellules tumorales vivantes (Gao et al., 2004). **(B)** Imagerie du vivant avec les nanocristaux fluorescents : **(a)** révélation simultanée des microbilles marquées avec différents QD injectées à une souris vivantes (Gao et al., 2004), **(b)** observation d'une tumeur développée après injection au niveau de la queue de la souris (Gao et al., 2004), **(c)** observation en IR- fluorescence des QD localisés au niveau d'un ganglion lymphatique (Kim et al., 2004), **(d)** Marquage ex-vivo des cellules tumorales avec des QD au niveau d'un tissu prélevé des poumons (Voura et al., 2004).

## b- Les dendrimères

Un dendrimère est une macromolécule constituée de monomères associés selon une architecture arborescente autour d'un cœur central plurifonctionnel. La synthèse d'un tel composé s'effectue par la répétition d'une même séquence de réactions qui assure la croissance progressive des branches autour du cœur. A partir d'une certaine taille, le dendrimère prend généralement une forme sphérique, hautement ramifiée et plurifonctionnalisée grâce aux nombreuses fonctions terminales présentes en périphérie (figure 1.4). Les dendrimères peuvent être modifiés par des groupements pour acquérir un caractère de biocompatibilité avec un faible degré de cytotoxicité et une grande bioperméabilité. Ce sont des structures synthétisées avec une grande pureté et faciles à analyser avec les méthodes standards telles que la spectrométrie de masse, la spectroscopie infrarouge et la spectroscopie à RMN.

Les dendrimères offrent une large palette d'applications allant de la chimie moléculaire et supramoléculaire à la biologie, la science des matériaux, la catalyse, etc. Plus particulièrement, les dendrimères ont été employés en médecine dans un but thérapeutique. En effet, ils sont utilisés comme agents antibactériens et antiviraux, dans certaines thérapies anti-cancéreuses, dans la vectorisation de molécules ou gènes médicaments et surtout comme glyco- transporteurs pour cibler des cellules cancéreuses (Boas and Heegaard, 2004; Khan et al., 2005). La biocompatibilité est un critère important pour l'utilisation de ce genre de nanoparticules. Les premières structures avec des groupements cationiques à la surface entraînent une déstabilisation de la membrane cellulaire et ensuite la lyse (Rittner et al., 2002). Plus récemment, des dendrimères avec des groupements hydroxyles ou méthyles sont sans effet toxique soit *in vitro* ou *in vivo* (Ihre et al., 2002; Padilla De Jesus et al., 2002). De plus, des dendrimères fluorescents ont été développés en amenant des molécules fluorescentes à l'intérieur ou à la surface du dendrimère par fixation covalente, piégeage ou une adsorption passive (Loiseau et al., 2005).



**Figure 1.4** : Structure des dendrimères (Dufes et al., 2005).

### c- Les colloïdes

Les nanoparticules métalliques ont été utilisées comme marqueurs en analyse biologique. C'est en 1996 qu'une nouvelle propriété sur les nanoparticules d'or a été rapportée. En effet, Mirkin et ses collaborateurs (Mirkin et al., 1996) ont observé des caractéristiques optiques différentes avec des nanoparticules sous forme de réseau mis en place suite à une interaction biologique. L'exemple décrit est basé sur l'utilisation de deux colloïdes différents sensibilisés chacun par un simple brin d'ADN, la présence d'une cible dont la séquence est complémentaire à ces deux brins permet la formation de ce réseau de nanoparticules qui entraîne le changement de la lumière émise. Par ailleurs, cette stratégie peut être appliquée pour détecter d'autres molécules avec des nanoparticules fonctionnalisées différemment.

Un autre type de colloïdes d'or enveloppés par une coquille (appelés couramment nanoshells) ont des caractéristiques intéressantes pour des applications biologiques. Ces nanoparticules sont sphériques formées d'un cœur minuscule en silice recouvert d'une coquille d'atome d'or. Ces particules ont des caractéristiques optiques résonantes qui peuvent être contrôlées par la taille relative du cœur et de la couche d'or néoformée à la surface. Par ailleurs, ces nanoparticules ont la grande particularité de s'échauffer quand ils sont exposés à la lumière infrarouge. Halas et son équipe ont montré l'efficacité de ce genre de nanoparticules pour la détection des immunoglobulines dans le sang total (Hirsch et al., 2003a) et dans une approche anticancéreuse *in vitro* et *in vivo* (Hirsch et al., 2003b). Dans cette dernière étude, les auteurs ont montré la destruction irréversible du tissu cellulaire après exposition en infrarouge uniquement de la zone colonisée par les nanoparticules. L'association de l'effet photothermique induit localement et de la fonctionnalisation de ces particules offre une nouvelle stratégie dans la thérapie du cancer qui permet une destruction optimale des cellules malignes sans affecter les cellules saines.

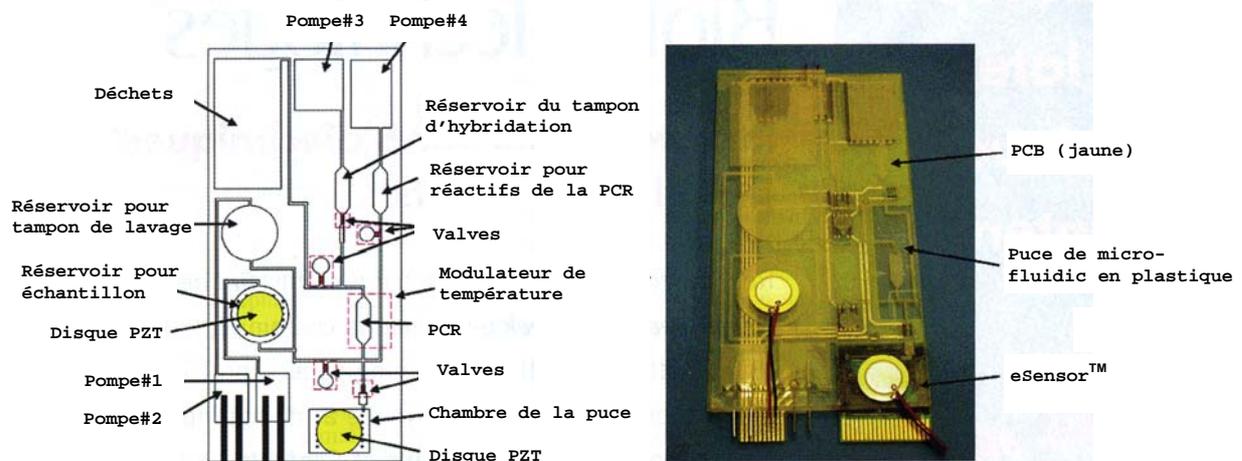
## **2- Laboratoires sur puce**

Avec les micro et nanotechnologies s'ouvre un nouvel univers de pièces miniaturisées pouvant servir dans des systèmes de diagnostics et d'analyses biologiques. Certains de ces systèmes, désignés par le terme « lab on chip » peuvent analyser en parallèle plus de 500000 molécules simultanément ; d'autres sont capables de synthétiser des structures complexes, de séparer des mélanges comportant des concentrations très faibles de biomolécules, ou de procéder à la catalyse de phénomènes variés. Ce sont des micro-usines fondées sur le principe des MEMS (*microelectromechanical systems*). Les micro-laboratoires bénéficient du développement de l'art du micro-usinage et de la micro-fluidique. Ces systèmes renferment des pompes miniatures, des microréacteurs, des systèmes de séparation et de minuscules canaux dans lesquelles circulent des molécules. Ainsi, les dispositifs micro-fluidiques ont été utilisés dans diverses applications.

### **2-1 Analyse des acides nucléiques**

Une des premières applications des laboratoires sur puce est l'électrophorèse micro-capillaire permettant la séparation d'oligonucléotides, ou de fragments d'ADN (Woolley and Mathies, 1994). Plus récemment, des micro-dispositifs ont été utilisés pour le génotypage dans des expériences de criblage de maladies héréditaires (Landers, 2003) ou dans des analyses en médecine légale (Verpoorte, 2002). Les principaux avantages des systèmes micro-fluidiques résident dans l'aspect multiparamétrique et la rapidité de l'analyse par rapport aux techniques habituelles. En effet, pour déterminer la taille d'un fragment d'ADN, le temps d'analyse est réduit d'un facteur 10 par rapport à l'électrophorèse capillaire classique et d'un facteur 100 par rapport à une analyse sur gel traditionnel (Hofgartner et al., 1999). Les systèmes de séparation de l'ADN sur puce utilisent généralement des dispositifs en verre, comprenant des gels de séparation tels que le polyacrylamide introduit dans des micro-canaux et un système de détection basé sur la fluorescence "laser- induite". Le système possède une grande résolution, ce qui a permis d'étendre le champ d'application au séquençage de l'ADN (Woolley and Mathies, 1995). L'analyse à haut débit est l'un des grands avantages de ce concept qui peut mettre en jeu un grand nombre de micro-canaux (jusqu'à 384) et plusieurs couleurs pour la détection (Emrich et al., 2002; Kheterpal et al., 1996).

Outre la séparation de l'ADN par électrophorèse sur puce, la PCR est une autre application des systèmes micro-fluidiques. Ces derniers présentent l'avantage d'un temps de réaction plus court grâce à des cinétiques de transfert thermique plus rapides. Les approches employées varient d'une simple micro-réaction dans une chambre en silicium (Wilding et al., 1994) jusqu'à la PCR en flux continu (Kopp et al., 1998). Plus récemment, des systèmes intégrés ont été développés et qui permettent la préparation de l'échantillon, la PCR, la séparation et le séquençage des produits d'ADN (Liu et al., 2004) (figure 1.5).



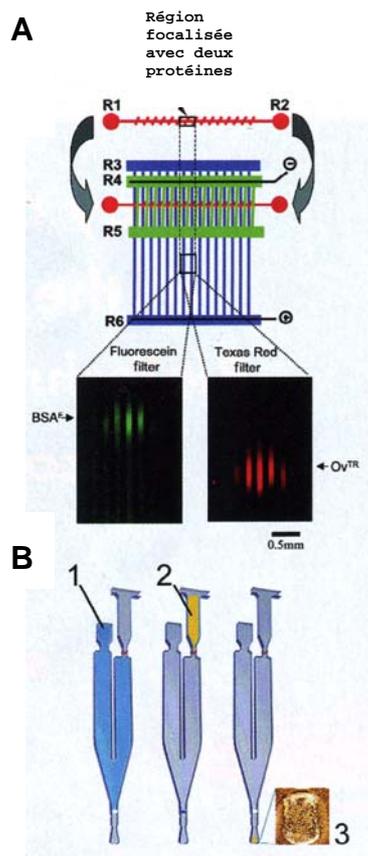
**Figure 1.5.** Schéma et image d'un dispositif intégré "Lab on chip" permettant une analyse en parallèle allant de la préparation de l'échantillon et la PCR jusqu'à la détection sur une puce d'ADN (D'après (Liu et al., 2004)).

## 2-2 Analyse des protéines

L'analyse de protéines sur puces est un champ d'application important, incluant les tests immunologiques, enzymatiques et tout type d'interaction protéine-ligand. Beaucoup de travaux ont montré la possibilité d'intégrer dans un même système les étapes de préparation, de séparation et d'analyse par spectrométrie de masse. Les premières analyses de protéines sur puce concernent la séparation des protéines sur gel en une seule dimension selon leur poids moléculaire (Bousse et al., 2001; Yao et al., 1999), l'isoélectro-focalisation (IEF) (Hofmann et al., 1999; Mao and Pawliszyn, 1999), l'électro-chromatographie capillaire (Ericson et al., 2000; Slentz et al., 2002; Throckmorton et al., 2002). Plus récemment, des travaux ont montré de nouvelles conceptions avec une intégration d'une séparation

orthogonale, ce qui permet d'avoir une séparation en deux dimensions avec plus d'efficacité (Gottschlich et al., 2001; Herr et al., 2003; Ramsey et al., 2003). D'autres approches ont privilégié l'utilisation de plusieurs micro-canaux orthogonaux par rapport à une même séparation dans une dimension (Chen et al., 2002; Griebel et al., 2004; Li et al., 2004). A titre d'exemple, l'approche décrite par Chen et ses collaborateurs consiste à faire une séparation des protéines en deux dimensions avec un système comportant une première séparation horizontale par IEF ensuite une séparation verticale en parallèle sur 100 micro-canaux par électrophorèse sur gel (figure 1.6-A).

L'analyse des protéines par spectrométrie de masse est une autre application très intéressante des dispositifs micro-fluidiques. De nombreux groupes de recherche ont développé des systèmes incluant les étapes de séparation et de caractérisation des protéines. Citons l'exemple du système développé par Gustafsson et ses collaborateurs qui ont pu intégrer l'étape de préparation d'échantillon et l'analyse de la masse par MALDI (figure 1.6-B). Ce dispositif comporte une conception de 96 micro-canaux, avec les étapes de concentration, séparation sur colonne en phase inverse, élimination des sels, et enfin une cristallisation de l'éluat avec une matrice destinée à des analyses en MALDI (Gustafsson et al., 2004).

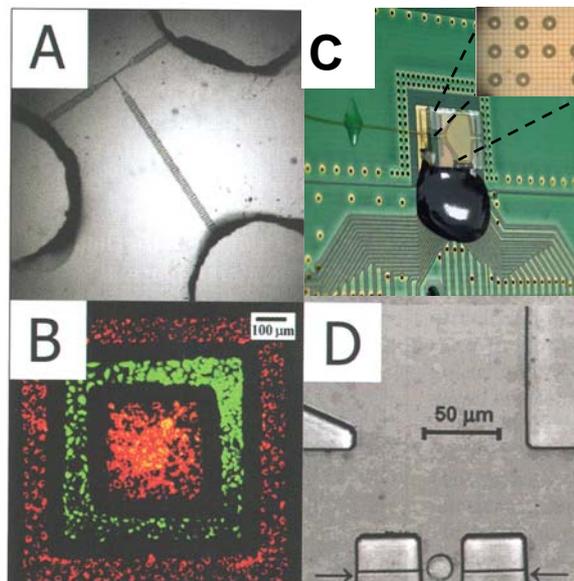


**Figure 1.6.** Exemples de dispositif de micro-fluidique pour l'analyse des protéines. **(A)** Schéma d'une électrophorèse capillaire en deux dimensions sur un microdispositif, dans lequel un micro-canal d'IEF est appliqué perpendiculairement sur une centaine de micro-canaux pour une deuxième séparation (Chen et al., 2002). **(B)** Schéma d'un dispositif de micro-fluidique allant de la préparation de l'échantillon jusqu'à l'analyse par MALDI ; (1) lieu d'introduction de l'échantillon, (2) colonne pour la séparation et (3) pointe de cristallisation (Gustafsson et al., 2004).

### 2-3 Analyse des cellules

De nombreux travaux ont décrit des dispositifs miniaturisés pour l'analyse des cellules "cell on chip". Une première application des systèmes micro-fluidiques dans ce domaine est le développement d'un  $\mu$ FACS (FACS = Flow Analysis Cell Sorting), microsystèmes dédiés au tri cellulaire. Un exemple de conception comporte trois chambres séparées par des micro-canaux de jonction ( $3 \mu\text{m}$ ) en forme de T et la dynamique cellulaire est basée sur un flux électro-osmotique (Fu et al., 1999) (figure 1.7-A). Plus récemment, un système microélectronique a été développé pour la séparation des cellules selon leurs propriétés de lévitation (Fuchs et al., 2006) (figure 1.7-C). Un autre groupe de recherche a mis au point un système de culture pour différents types cellulaires et d'une manière contrôlée, grâce à un dispositif micro-fluidique en 3-dimensions (Chiu et al., 2000). Les cellules sont mises dans

des micro-canaux qui permettent l'adhésion cellulaire à la surface dans une zone limitée selon le dessin effectué. Après 24 h de culture, les canaux sont retirés pour permettre une croissance et une répartition cellulaire sur la surface selon les besoins d'interaction des cellules les unes avec les autres (figure 1.7-B). Ce système est très intéressant dans des études de chimiotactisme et de coopération cellulaire. Contrairement au système  $\mu$ FACS décrit auparavant, Weeler et ses collaborateurs ont développé un système permettant une capture passive d'une seule cellule à partir d'une suspension cellulaire (Wheeler et al., 2003). La figure 1.7-D montre le concept développé où une seule cellule peut être sélectionnée et capturée dans une micro-chambre par une maîtrise de la mécanique du fluide employée.



**Figure 1.7.** Quelques applications des dispositifs microfluidiques pour les manipulations cellulaires. (A) Image d'un dispositif miniaturisé dédié au tri cellulaire " $\mu$ FACS" (Fu et al., 1999). (B) Image par fluorescence de deux types de cellules cultivées dans des empreintes du PDMS avec une micro-structuration (Chiu et al., 2000). (C) Dispositif microélectronique pour le tri cellulaire (Fuchs et al., 2006). (D) Image d'une seule cellule capturée dans un micro-bassin (Wheeler et al., 2003).

### 3- Les implants et les prothèses

Une application spectaculaire des MEMS, est la "pilule intelligente" capable de délivrer lentement leur contenu au cours de temps. Le professeur Langer et son équipe ont développé un implant sous-cutané comportant des réservoirs miniatures remplis de médicaments et recouvert d'une membrane d'or jouant le rôle d'anode (Santini et al., 1999).

Sous l'effet d'un faible courant électrique provenant, par exemple, d'un biocapteur, les réservoirs s'ouvrent libérant *in situ* le produit actif. Ces capsules programmées sont contrôlables à distance par de très faibles courants électriques. Elles sont en effet fabriquées à partir de polymères formant un gel qui se dissout dans l'eau dès qu'il reçoit un très faible courant électrique. L'innovation technologique consiste dans la conception de minuscules capsules en couches successives (comme une pelure d'oignon). Les doses contrôlées du médicament sont renfermées entre chaque couche de la capsule. Au passage du courant électrique une couche est éliminée ce qui libère le médicament. Ce processus peut être répété autant de fois que nécessaire. L'avantage de cette approche est la possibilité d'avoir des doses régulières contrôlables et une grande rapidité de diffusion du produit. La capsule est implantée sous la peau et le courant électrique programmé par un microprocesseur. Les applications sont nombreuses: administration d'insuline, de produits anti-douleur ou d'hormones.

L'apport des nanotechnologies dans la conception des prothèses permet d'améliorer leur biocompatibilité et d'allonger leur durée de vie. Grâce à un revêtement par des nanoparticules, les prothèses d'articulation se fixent plus solidement au tissu osseux donnant une meilleure adaptation pour les patients (Sato and Webster, 2004). En outre, les endoprothèses coronaires peuvent être recouverte d'une couche nanoporeuse afin d'empêcher la formation des caillots sanguins pour éviter de nouvelles obstructions des artères (Palmaz, 2004).

#### **4- Les Biopuces**

Un engouement pour les méthodes d'analyse globale du fonctionnement cellulaire s'est développé ces 20 dernières années. La technologie des biopuces ("*microarray*") permet une analyse simultanée de plusieurs paramètres en une seule étape. Des *microspots* de molécules de capture (sondes) sont réalisés sur un support solide et mis en contact d'échantillons contenant des molécules de ligands (cibles). Le concept des biopuces découle de la théorie de l'analyte ambiant décrite par Ekins (Ekins and Chu, 1992; Ekins et al., 1990; Ekins, 1989) énonçant que la réduction de la quantité de sonde ou de ligand permet d'avoir un système plus sensible. La sonde et la cible peuvent être de nature différente: acides nucléiques, protéines, peptides, oligosaccharides ou composants chimiques voir même cellules.

#### **4-1- Les puces à ADN**

Les puces à ADN constituent un outil essentiel dans l'ère du génomique et post-génomique. Elles offrent la possibilité de réaliser rapidement des milliers d'analyses en parallèle. Ces puces sont généralement constituées d'un support solide sur lequel sont immobilisés des oligonucléotides (fragment d'ADN simple brin) qui constituent des sondes susceptibles de s'apparier à des brins d'ADN complémentaires présents dans l'échantillon à analyser. Cette analyse à haut débit a permis une avancée dans le domaine de l'identification des gènes, de leur fonction, leur organisation et leur localisation chromosomique. Les domaines d'application des puces à ADN sont très larges et intéressent plusieurs secteurs tels que la recherche fondamentale et pharmaceutique, le diagnostic, le contrôle agro-alimentaire et industriel ...

#### **4-2- Les puces à protéines**

L'avènement des puces à ADN a incité les chercheurs à développer des puces à protéines. Ce type de biopuce, en permettant la détection et/ou l'analyse rapide et multiparamétrique des protéines, sont d'un grand intérêt dans de nombreux domaines, mais leur développement a été freiné par la complexité et l'hétérogénéité des protéines : le défi consiste à immobiliser ce type de molécules sur un support tout en conservant leur intégrité et leur fonctionnalité. Les méthodes d'immobilisation, nombreuses, seront détaillées ultérieurement (Cf chapitre 1, partie 2). Dans cette partie, nous développerons les principaux domaines d'applications des puces à protéines.

##### **➤ Interactions protéines- protéines**

Des analyses fonctionnelles ont été menées en parallèle sur des puces à protéines. Des travaux ont illustré l'application des puces dans la caractérisation des sites phosphorylés avec des anticorps (Ac) spécifiques. L'équipe de Snyder a démontré l'efficacité des puces à protéines pour déterminer le profil des kinases chez *S.cerevisiae*, les auteurs ont construit une puce avec 5800 protéines candidates (Zhu et al., 2001; Zhu et al., 2000). D'autres applications relèvent l'intérêt des puces pour l'identification de nouveaux partenaires à des protéines cibles tels que des facteurs de transcription (Snappyan et al., 2003) ou des histones (Coleman et al., 2003).

Les Ac sont des protéines relativement stables, qui reconnaissent spécifiquement des molécules cibles (les antigènes (Ag)) avec une grande affinité. Ce sont de bons outils pour détecter la présence d'une protéine dans un milieu complexe, et ont été souvent utilisés soit comme molécules sondes, soit comme molécules cibles (Belov et al., 2001; Haab et al., 2001; MacBeath and Schreiber, 2000; Schweitzer et al., 2002). L'utilisation des puces à protéines dans des applications médicales a été largement décrite dans la littérature. En effet, des études d'identification, de spécificité et de réactivité croisée des anticorps ont été menées en utilisant des puces à protéines à haute densité (Lueking et al., 1999; Lueking et al., 2003; Michaud et al., 2003). Dans des études immunologiques fonctionnelles, les interactions antigène (Ag)-Ac sont exploitées principalement dans des contextes médicaux, par exemple dans les maladies auto-immunes. Le criblage des antigènes sur une puce avec un sérum ou un plasma d'un malade atteint d'une maladie auto-immune permet d'identifier de potentiels antigènes, en même temps le diagnostic ou le typage de l'auto-anticorps (Lueking et al., 2003; Robinson et al., 2002). Une autre application des puces à protéines a été décrite dans le criblage des IgE sériques sur des échantillons de patients avec une matrice construite avec des allergènes, cette application a été étendue à des analyses à haut débit sur des puces présentant la majorité des allergènes de nature protéique ou autres (Hiller et al., 2002; Wiltshire et al., 2000).

Des profils de cytokines ou de chimiokines ont été établis en utilisant des puces avec des Ac pour analyser des plasmas ou des lysats cellulaires (Huang et al., 2001; Lin et al., 2003; Schweitzer et al., 2002). D'autres molécules d'intérêt clinique ont été aussi analysées sur des puces, à titre d'exemple, la lamine, la fibronectine, la protéine C-réactive, l'alpha-fœtoprotéine (Arenkov et al., 2000), et plus particulièrement des marqueurs tumoraux (Negm et al., 2002; Woodbury et al., 2002).

### ➤ **Interaction protéines-peptides**

La majorité des études d'interactions protéines-peptides utilise des puces à peptides, les protéines étant les molécules cibles (Cf paragraphe 4-3) mais le schéma inverse de l'interaction a été réalisé dans quelques cas. A titre d'exemple, un peptide de la protéine  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (protéine intervient dans la régulation de l'activation des plaquettes) a été utilisé pour cribler une puce à protéines à très haute densité (37 000 protéines recombinantes) (Larkin et al., 2004).

### ➤ **Interaction protéines- phospholipides**

L'utilisation des puces à protéines pour analyser des lipides reste rare. Néanmoins, la puce protéomique de la levure a été criblée contre certains phospholipides sous forme de liposomes (Zhu et al., 2001). Les auteurs ont identifié avec leur système 150 partenaires (sur 5800 testées) pouvant fixer les phospholipides sous forme de liposomes.

### ➤ **Interaction protéines- cellules**

La technique la plus utilisée pour la caractérisation des cellules est la cytométrie en flux (FACS). Avec les nouveaux appareils, il est possible d'analyser au maximum 10 paramètres dans un même test. Pour en étudier un nombre plus important, des puces avec des anticorps spécifiques de différentes molécules exprimées à la surface de la cellule (antigènes et/ou récepteurs) constituent une stratégie plus appropriée pour une analyse à haut débit. En effet, Belov et ses collaborateurs ont développé une puce avec 60 anticorps pour le phénotypage des leucocytes de différents individus (Belov et al., 2001). Plus récemment, des tests d'identification et de caractérisation des lymphocytes sur une puce avec des tétramères (complexe formé d'une molécule d'histocompatibilité et un peptide antigénique) ont été réalisés (Soen et al., 2003).

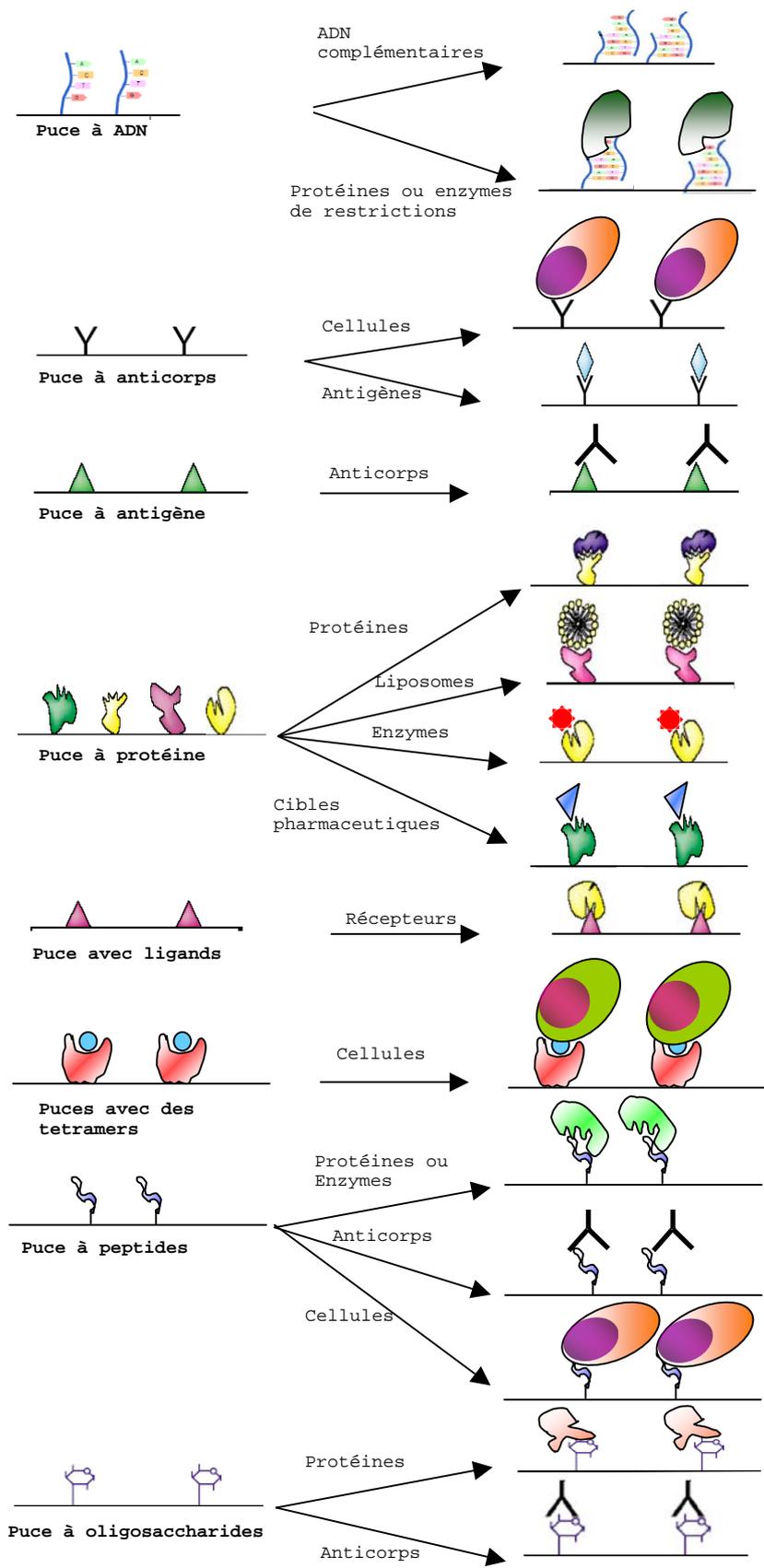
### **4-3- Les puces à peptides**

Contrairement aux protéines, les puces à peptides sont faciles à réaliser du fait de leur meilleure stabilité. Les interactions protéines-protéines ou anticorps-antigènes impliquent des zones limitées des deux partenaires. Les puces à peptides permettent d'identifier ces zones d'interaction. Ainsi, l'utilisation d'une puce portant 484 peptides recouvrant le récepteur de l'angiotensine II de type 1 a permis l'identification, d'un peptide fixant l'angiotensine II avec une forte affinité (Kato et al., 2004). Ce peptide peut être utilisé sous sa forme libre comme inhibiteur de l'interaction de l'angiotensine II à son récepteur dans le traitement des maladies cardiovasculaires. De même, les puces à peptides peuvent être utilisées pour déterminer la spécificité des anticorps, ce qui permet, par exemple, d'étudier le profil de la réponse humorale dans le cas d'une maladie. Par ailleurs, les puces à peptides ont montré un grand intérêt dans l'analyse des activités enzymatiques, telles que des kinases (Falsey et al., 2001; Houseman et al., 2002; MacBeath and Schreiber, 2000), des protéases (Nazif and Bogoy,

2001), et autres enzymes. Enfin, des essais de fixation de cellules sur puce à peptides ont été réalisés afin de déterminer la spécificité de liaison d'un peptide sur différentes lignées cellulaires et d'analyser les caractéristiques de la liaison de ce peptide sur la signalisation intracellulaire (Falsey et al., 2001).

#### **4-5- Les puces à oligosaccharides**

Des puces à sucres ont été utilisées pour rechercher des protéines ayant la capacité d'interagir avec certains oligosaccharides (Fukui et al., 2002; Houseman and Mrksich, 2002). Ainsi, Fukui et ses collaborateurs ont démontré le potentiel de telles puces dans la détection et la caractérisation des spécificités d'interaction entre protéines et sucres en prenant pour exemple des molécules d'intérêt médical (cytokines, chimiokines).



**Figure 1.8.** Schéma récapitulatif des différents types d'interactions biologiques sur puce

## **Partie 2 : Stratégies d'immobilisation des protéines et des peptides sur support miniaturisé**

### **I- Introduction**

Les premières tentatives d'immobilisation des protéines pour générer des puces cherchaient le plus souvent à extrapoler la méthode employée dans la conception des puces à ADN en utilisant la même technologie et la même démarche expérimentale. Or il s'est avéré qu'une adaptation ne permet pas, dans la majorité des cas, de réaliser des puces à protéines fiables. En effet, l'adaptation de la technique utilisée pour fabriquer les puces à ADN pour la conception des puces à protéines se heurte à des difficultés inhérentes à la complexité structurale des protéines. Ainsi, l'ADN est une molécule stable, très uniforme, formée uniquement de la combinaison de quatre nucléotides avec une structure bien définie, hydrophile, chargée négativement. D'où la manipulation d'oligonucléotides lors de la réalisation de la puce est relativement simple et les interactions établies entre ces sondes fixées et les ADN complémentaires cibles sont stables et uniformes. Par contre les protéines sont beaucoup plus fragiles et hétérogènes. Leur structure tridimensionnelle est très variée : 20 acides aminés de base peuvent générer des milliers d'enchaînements différents ; les protéines peuvent être hydrophiles ou hydrophobes, acides ou basiques et par conséquent interagir avec leur environnement par force électrostatique, liaison hydrogène, liaison hydrophobe ou force de Van der Waals. De plus, une seule protéine peut interagir avec différents partenaires en raison de multiples sites actifs, ce qui n'est pas le cas pour l'ADN. Cependant, l'immobilisation de peptides sur des supports miniaturisés semble être moins compliquée que celle des protéines, ils sont beaucoup plus stables et ne possèdent pas de structure tridimensionnelle bien définie.

Ainsi, la conception d'une puce à protéines ou à peptides requiert un support et une chimie de surface dont le choix dépend de la méthode de détection. Ce choix doit être compatible avec la conservation de l'activité de la protéine. Pour cela, différentes approches ont été décrites pour fixer des protéines ou des peptides sur des supports miniaturisés.

## II- Les supports

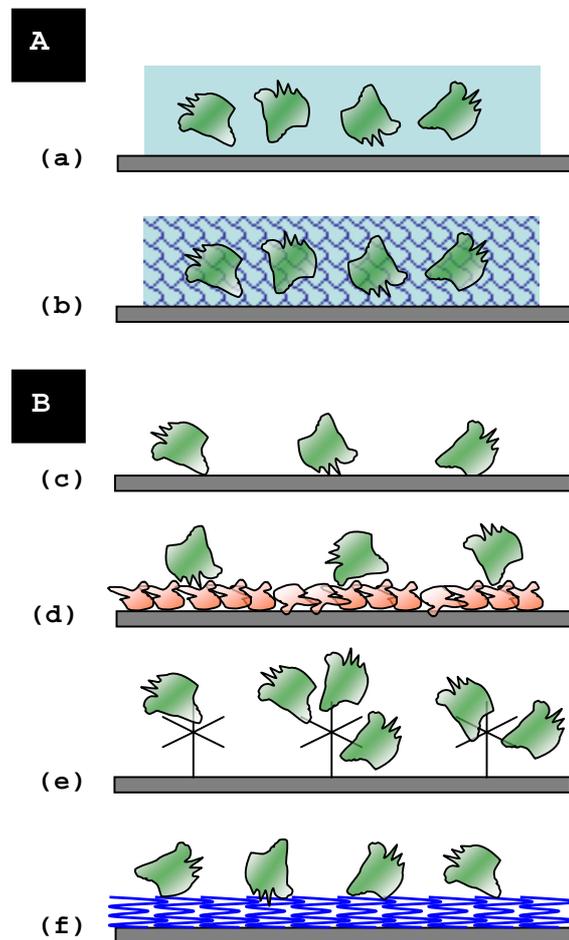
Les supports ou surfaces d'attachement conçus pour fixer des protéines peuvent être classés en deux groupes : ceux en deux-dimensions et en trois-dimensions (figure 1.9). Le concept de support en deux-dimensions est le plus développé : généralement, ce sont des supports en verre activés avec divers groupements permettant une chimie de couplage par des aldéhydes, époxy, esters carboxyliques (MacBeath and Schreiber, 2000; Zhu et al., 2000). Ce groupe de supports inclut aussi les surfaces sensibilisées avec des molécules d'interface comme la Streptavidine (Peluso et al., 2003; Wacker et al., 2004), des dendrimères (Angenendt et al., 2003; Benters et al., 2001; Pathak et al., 2004), une protéine activée (MacBeath and Schreiber, 2000) et le PEG (polyéthylène glycol) activé (Cha et al., 2004; Kannan et al., 2006).

Un autre matériau a été conçu pour l'immobilisation des protéines à haute densité, ce procédé développé par Zhu et ses collaborateurs, est basé sur la fabrication de nanopuits en PDMS (Polydimethylsiloxane) déposés sur une lame de verre (Zhu et al., 2000). Ces nanopuits ont une structure ouverte permettant d'une part une meilleure distribution des différents composants (tampons et réactifs) nécessaires pour le test et d'autre part une diminution significative des phénomènes d'évaporation.

Ces supports en deux-dimensions avec différentes chimies de surface fixent les protéines par attachement covalent ou non. Ils sont bien adaptés à la fabrication de puces à haute densité et permettent une bonne reproductibilité des tests réalisés ainsi qu'une bonne sensibilité et un faible bruit de fond. De plus, ces supports sont compatibles avec la plupart des méthodes de détection : fluorescence, radioactivité, spectrométrie de masse et SPR (résonance plasmonique de surface). Pour ces deux dernières méthodes, les supports sont recouverts avec une couche d'or. L'inconvénient majeur des concepts d'immobilisation en deux-dimensions est l'inactivation des protéines par défaut d'adressage sur la surface ou du fait de la chimie de couplage qui affecte la structure tridimensionnelle.

Une alternative à ce problème est l'utilisation de surfaces recouvertes de gel d'agarose (Afanassiev et al., 2000), de polyacrylamide (Arenkov et al., 2000; Rubina et al., 2003) ou de membrane en nitrocellulose (Ge, 2000; Joos et al., 2000). C'est un concept d'immobilisation sur un support en trois-dimensions où des matrices poreuses permettent un piégeage des

protéines dans un environnement hydraté. Les protéines piégées conservent leur conformation fonctionnelle avec une bonne accessibilité des sites actifs. Ces méthodes offrent une plus grande capacité de fixation que les supports en deux- dimensions car il est possible d'activer les gels avec des agents bi-fonctionnels permettant une amélioration de l'immobilisation des protéines (Charles et al., 2004; Kiyonaka et al., 2004; Rubina et al., 2004). Ces supports semblent être une approche très efficace pour immobiliser les protéines. En revanche, ils se heurtent à des problèmes d'instabilité de l'intensité du signal mesuré et de diffusion aux sites actifs des ligands ou des réactifs de détection. De plus ces méthodes génèrent un bruit de fond important qui limite la sensibilité du signal détecté pour de très faibles concentrations de protéines.



**Figure 1.9 :** Schéma des différents supports utilisés dans la conception des puces à protéines. (A) Exemple de supports avec matrice tridimensionnelle : matrice en gel passif (a) et activé (b). (B) Exemple de supports d'immobilisation en deux-dimensions : (c) support non activé, (d) support modifié par une protéine (Streptavidine, BSA-NHS...), (e) support modifié par des dendrimères et (f) support modifié par le polyéthylène glycol activé par des groupement époxy.

### **III- Immobilisation des protéines**

Les réactions chimiques mises en jeu lors de l'étape de greffage dépendent du type de matériau utilisé et du mode de greffage considéré.

#### **1- L'adsorption**

L'adsorption met en jeu des interactions de type ionique, hydrophobe ou encore des liaisons hydrogènes entre la protéine et la surface par l'intermédiaire d'un matériau actif tels que les surfaces en verre recouvertes d'une fine couche de nitrocellulose (Ge, 2000; Joos et al., 2000) ou de poly-L-lysine (Haab et al., 2001). Cette méthode simple, rapide et non dénaturante permet une fixation non covalente des protéines avec une orientation aléatoire, mais celles-ci peuvent facilement se désorber sous l'action des variations de pH, de la température, ou de la force ionique, ce qui limite la stabilité et la durée d'utilisation des puces à protéines conçues avec ce mode d'immobilisation. De plus, un bruit de fond est assez important à cause des adsorptions non spécifiques.

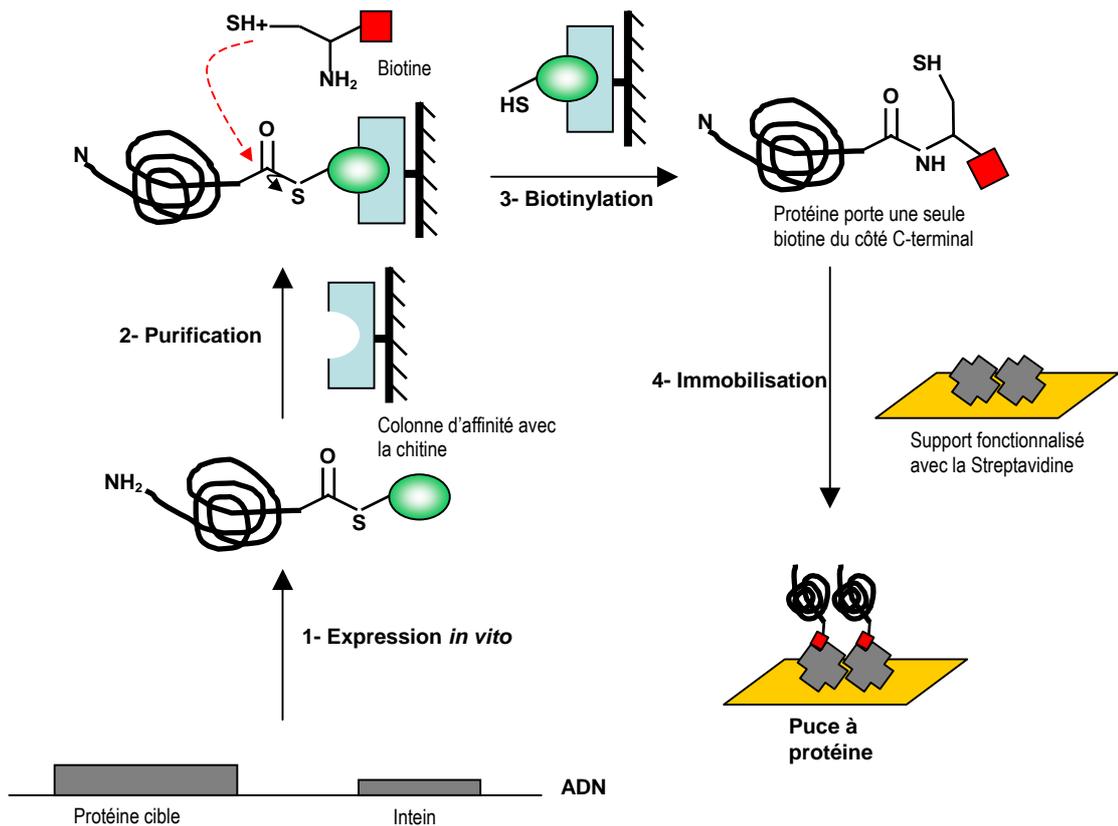
#### **2- L'inclusion ou le piégeage**

La méthode d'inclusion consiste à incorporer la protéine dans un gel insoluble tel que le polyacrylamide, l'agarose ou la gélatine. Dans ce cas, la protéine est mélangée au matériau, puis déposée à la surface sous certaines conditions ; elle se trouve donc piégée mécaniquement à l'intérieur des matrices polymériques. Les mailles de la matrice assurent la rétention de la protéine tout en permettant la diffusion des ligands et des réactifs nécessaires pour le test. Cette méthode permet une bonne conservation de la conformation et de l'activité de la protéine, du fait qu'elle ne soit pas réellement fixée. Toutefois, cette technique est limitée par la taille des pores du gel qui entraîne le relargage des protéines de faible poids moléculaire. Plus récemment, des polymères actifs ont été développés : ce sont des matrices tridimensionnelles de polyacrylamide ou autre gel fonctionnalisés avec des groupements qui fixent la protéine d'une manière covalente (Charles et al., 2004; Kiyonaka et al., 2004).

### 3- Le couplage covalent

L'utilisation d'une liaison forte assure une meilleure fixation de la protéine sur le support. Ainsi, l'immobilisation peut être réalisée d'une manière directe sur des supports en verre fonctionnalisés par des entités chimiques qui interagissent avec les groupements carboxyles ou amines des protéines, tels que des aldéhydes ou des époxy (MacBeath and Schreiber, 2000; Vijayendran and Leckband, 2001; Zhu et al., 2001). Sur les supports recouverts d'une couche d'or, les alcanes thiols sont les plus fréquemment utilisés pour sensibiliser la surface (Hu et al., 2005; Lee et al., 2005). Ces stratégies permettent une fixation des protéines sur la surface d'une manière aléatoire, ce qui peut entraîner une altération de leur conformation native et par conséquent une perte de leur activité, ou encore l'inaccessibilité du site actif faute d'engagement dans l'immobilisation. Pour améliorer l'efficacité d'attachement des protéines, il est judicieux d'éloigner celle-ci du support afin d'augmenter son accessibilité et de lui donner plus de flexibilité. Ainsi, l'insertion d'une chaîne de radicaux de carbone  $(CH_2)_n$  qui interagit avec les groupements amines ou thiols des protéines (Kusnezow et al., 2003) est une des alternatives les plus performantes.

D'autres stratégies utilisent des interactions d'affinité spécifiques entre des molécules préalablement fixées au support et les molécules sondes à immobiliser. Ainsi, une protéine peut être modifiée par fixation de biotine. Elle peut alors être immobilisée sur un support fonctionnalisé avec une couche de Streptavidine (Peluso et al., 2003), mais, cette approche se heurte aussi aux problèmes d'orientation de la protéine sur la surface. L'utilisation de protéines de fusion recombinantes portant à une de ses extrémités un domaine « intein » (domaine utilisé pour cibler la protéine) a permis de résoudre ce problème (Lesaichere et al., 2002a; Lue et al., 2004). Le domaine intein, en se liant à la chitine, permet de retenir la protéine sur une colonne d'affinité. Puis, l'addition de cystéine biotinylée induit l'excision du domaine intein qui reste sur la colonne et son remplacement par la biotine (figure 1.10). On obtient de cette façon une protéine portant une seule biotine à une de ses extrémités, ce qui permettra une immobilisation orientée et uniforme sur une couche de Streptavidine. Une autre stratégie développée par Zhu et ses collaborateurs (Zhu et al., 2001) consiste à synthétiser des protéines de fusion contenant à leur extrémité une poly-histidine (His-tag) qui sera l'élément d'ancrage des protéines sur une surface recouverte par une couche de Nickel.



**Figure 1.10.** Stratégie de biotinylation des protéines (site spécifique) et immobilisation sur un support fonctionnalisé.

#### IV- Immobilisation des peptides

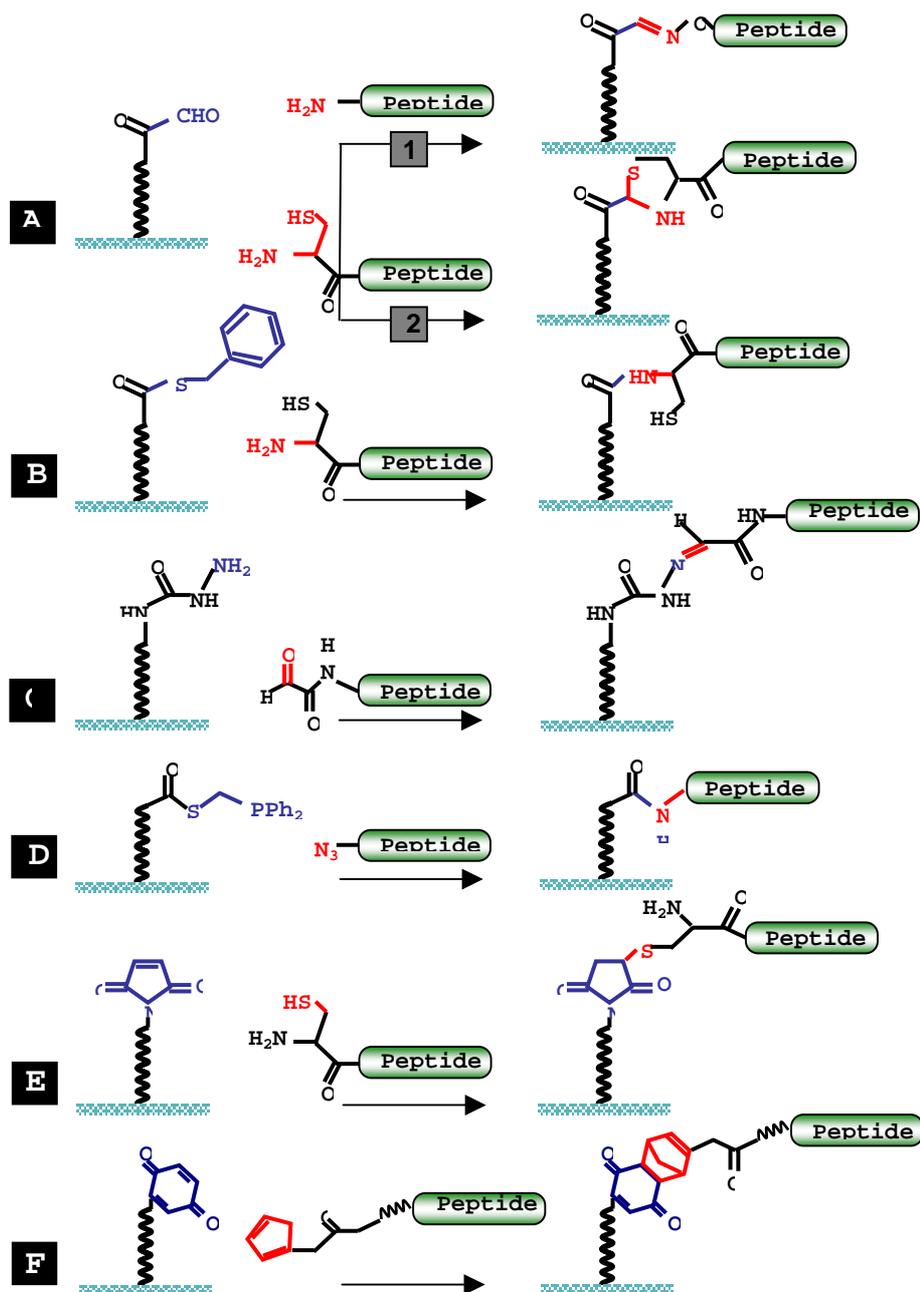
Le concept des puces à peptides a été initialement proposé par Southern en 1988 (Southern, 1988). Le développement de nouvelles technologies de fabrication des puces, telles que la photolithographie de synthèse sur support en verre (Fodor et al., 1991) et la synthèse de spot sur membrane « SPOT-synthesis » (Dostmann et al., 2000; Min et al., 2004), a permis de produire des puces avec des peptides synthétiques à haute densité. Deux grands groupes de méthodes sont utilisés dans la conception des puces à peptides : l'immobilisation de séquences peptidiques pré-synthétisées et la synthèse *in situ* directement sur le support.

## 1- Immobilisation de peptides pré- synthétisés

L'immobilisation de peptides pré-synthétisés consiste à faire la synthèse des séquences peptidiques éventuellement modifiées par un groupement réactif puis à les fixer sur un support fonctionnalisé par une chimie compatible. Cette approche dite d'immobilisation "chimie sélective" est particulièrement adaptée à la fixation de peptides ayant un grand nombre d'acides aminés et offre de nombreuses possibilités d'immobilisation par la variété des réactions pouvant être mises en jeu (figure 1.11). Même si les peptides pré-synthétisés sont contaminés avec des sous produits au cours de la synthèse : seuls les peptides portant le groupement chimique fonctionnel peuvent se fixer sur le support de la puce modifié. De plus, cette approche permet de contrôler l'orientation et la densité des peptides immobilisés. En revanche, la chimie sélective nécessite des étapes de purification, étapes fastidieuses parfois même impossibles pour certaines chimies.

Généralement, l'immobilisation chimie-sélective utilise des aldéhydes et des glyoxylyl comme groupements fonctionnels de la surface qui interagissent avec des groupements amino-oxy-acétyl des séquences peptidiques modifiées (Reimer et al., 2002; Rychlewski et al., 2004). Il est possible aussi de fixer directement les peptides par l'intermédiaire d'un résidu cystéine (Falsey et al., 2001; Lesaichere et al., 2002b; Uttamchandani et al., 2003; Uttamchandani et al., 2004). Des liaisons type Diels-Alder entre des groupements de benzoquinone présents sur le support et des peptides modifiés avec une cyclopentadiène (Houseman et al., 2002) permettent une fixation covalente.

Un point critique dans la conception des puces à peptides est leur accessibilité de la cible. En effet, les séquences peptidiques sont généralement utilisées pour déterminer des sites spécifiques, et les séquences sont généralement courtes. Dans ce cas, il peut être nécessaire d'incorporer un bras espaceur entre le peptide et le support, ce qui permet de bien présenter le substrat à son enzyme ou l'épitope à son anticorps. Différents types d'espacesurs ont été employées : l'acide 11-mercaptoundécanoïque (Wegner et al., 2002), une chaîne hydrophilique de polyéthylène glycol (Falsey et al., 2001), le dextran (Luo et al., 1995), la sérum albumine bovine (MacBeath and Schreiber, 2000), la leptine humaine (Lee and Lee, 2004) et l'hydrogel supramoléculaire (Kiyonaka et al., 2004).



**Figure 1.11 :** Immobilisation par chimie sélective de peptides pré-synthétisés. Les groupements hydroxylamine (A-1) ou des résidus de cystéine (A-2) sur un support activé avec des glyoxylyl, (B) des résidus de cystéine sur un support avec des acyloate de S-phénylméthyl pour former une liaison amide, (C) des glyoxylyl-peptide sur un support activé avec des carbazides, (D) des peptidyarides sur un support portant des thioacylate de méthylidiphénylphosphine, (E) des résidus de cystéine sur un support activé par des groupements maléimides pour former des thioetere et (F) des résidus de cyclopentadiène sur un support activé par des benzoquinones selon la réaction de Diels-Alder.

## **2- Synthèse des peptides *in situ***

L'immobilisation *in situ* consiste à faire la synthèse des peptides directement sur le support. Les méthodes employées permettent un adressage des peptides sur une surface miniaturisée, d'où la taille infiniment petite des spots. Ces procédés de production rapide permettent une synthèse en parallèle et sont bien adaptés à l'industrialisation. Il existe deux stratégies de synthèse *in situ* des peptides : la stratégie de synthèse en SPOT « SPOT synthesis » et la synthèse par photolithographie.

### **2-1- Synthèse en SPOT**

Dans cette stratégie, la synthèse est réalisée par étape sur un support solide fonctionnalisé tels que les membranes de cellulose, le polypropylène ou le verre, selon la méthode standard Fmoc de synthèse des peptides (Frank and Overwin, 1996; Min et al., 2004). Dans un premier temps, les acides aminés activés vont être fixés sur la surface. Chaque spot est considéré comme un microréacteur indépendant formé d'une goutte. Un point très important dans cette approche, les solvants nécessaires pour la synthèse doivent être non volatiles, pour maintenir un environnement hydraté au niveau du spot. La taille des spots est définie selon la dispersion de la goutte sur le support et les caractéristiques physiques de la surface.

Les différentes étapes de cette synthèse sont :

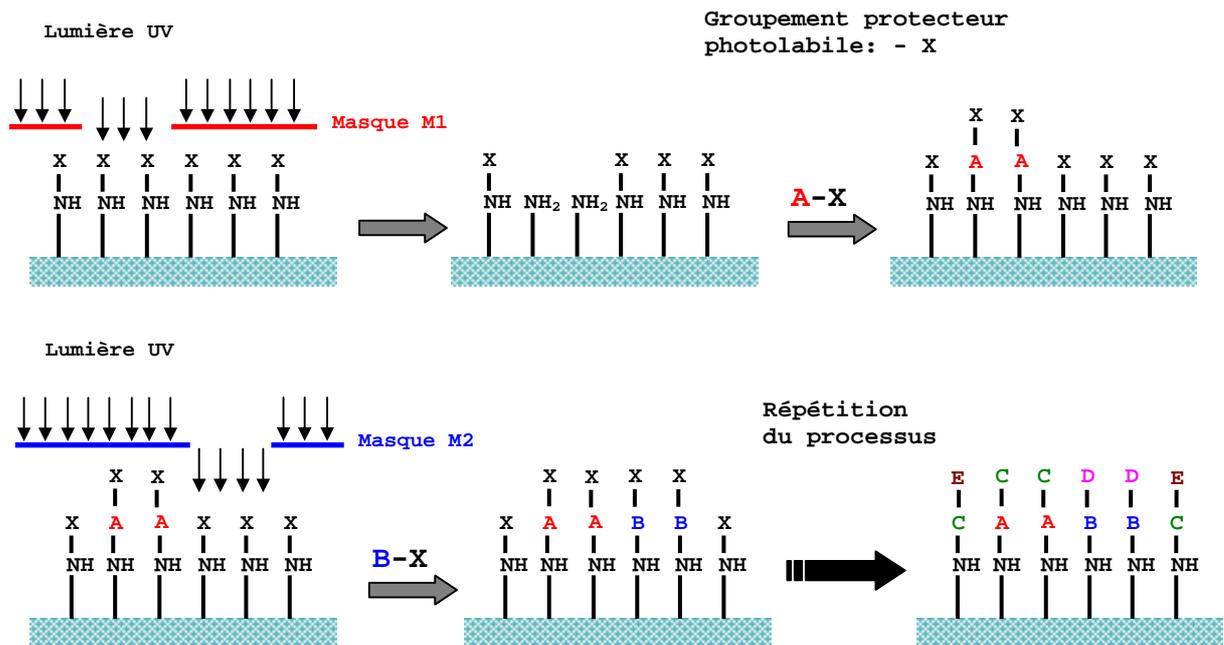
- le choix du support selon la chimie appropriée et l'évènement biologique à analyser en final.
- la fixation du bras espaceur,
- la fonctionnalisation du support avec des groupements chimiques pour fixer le premier acide aminé modifié,
- l'immobilisation des premiers acides aminés modifiés au bras espaceur,
- la synthèse des séquences par cycles successifs de déprotection et couplage.

Le procédé Fmoc pour la synthèse de peptides *in situ* peut être appliqué à plusieurs types de supports (Wenschuh et al., 2000) : des surfaces fonctionnalisées avec des esters (Frank and Overwin, 1996), des membranes en APEC (amino-hydroxypropyl éther cellulose) (Ast et al., 1999; Licha et al., 2000), des membranes en polypropylène fonctionnalisées avec

des groupements amines (Wenschuh et al., 2000) et des supports en verre activés par des groupements amines (Lesaicherre et al., 2002b).

## **2-2 Synthèse par photolithographie**

La synthèse *in situ* des peptides par photolithographie est la méthode la plus adaptée pour construire des puces à haute densité. La synthèse est réalisée avec des monomères d'acide aminé protégé du côté N-terminal par un groupement photolabile (NOVC = nitroveratryloxycabonyl). Le principe de synthèse des peptides sur puce par photolithographie (figure 1.12) est le suivant : des acides aminés dont le N-terminal est protégé par un groupement photolabile, sont fixés sur un support en verre par l'intermédiaire d'une chimie appropriée. Puis, les groupements photolabiles sont libérés par effet de la lumière ultraviolette dirigée spécifiquement sur des sites sélectionnés grâce à des photo-masques appliqués à la surface. Une réaction de couplage avec un nouvel acide aminé portant lui aussi le groupement photolabile a lieu sur les N-terminaux déprotégés. Des cycles successifs comprenant une étape de photo-déprotection et une étape de couplage permettent la synthèse en parallèle des peptides sur la surface. Cette méthode reste relativement chère puisqu'elle nécessite un nombre important de photomasques : ainsi, pour synthétiser une puce avec des oligonucléotides de 25-mers, 100 masques différents sont requis. De plus ces masques perdent leur efficacité avec l'utilisation. Pour palier à ces inconvénients, de nouveaux dispositifs avec des micro-miroirs digitaux ont été développés (Singh-Gasson et al., 1999) pour remplacer les masques.



**Figure 1.12.** Principe de synthèse des peptides *in situ* sur un support en verre par photolithographie.

## V- Dépôt des protéines et peptides sur support miniaturisé

Pour réaliser des puces, des dépôts en micro-gouttes avec le matériel à immobiliser sur le support sont effectués. Les méthodes les plus employées utilisent l'appareillage robotique exploité pour le dépôt de sondes oligonucléotidiques sur puces (MacBeath and Schreiber, 2000; Zhu et al., 2001). Les dépôts effectués sont de très petits volumes (< 100 nL) pour pouvoir obtenir sur une seule lame de nombreux spots. Ils sont souvent multiples pour chaque protéine/peptide (duplicat ou triplicat) ce qui permet un meilleur contrôle des résultats. Durant cette phase, l'objectif principal est de maintenir les protéines dans un état d'hydratation suffisant afin de minimiser leur dénaturation. Les milieux utilisés sont de différentes natures : il peut s'agir de tampons phosphate seuls ou associés à la sérulalbumine bovine. La plupart des auteurs y associent du glycérol à 40% pour éviter une déshydratation des échantillons. Le dépôt peut s'effectuer par contact direct avec le support à l'aide de fines aiguilles creuses ou pleines. Des dépôts de 0,5 à 1 nL (spot de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre) sont effectués tous les 300  $\mu\text{m}$  avec les pointes creuses alors que l'utilisation de pointes pleines permet des dépôts de 500  $\mu\text{m}$  tous les 600  $\mu\text{m}$ . D'autres robots n'établissent pas de contact direct avec le support et déposent de fines gouttelettes par microcapillarité ou par injection (Lopez and Pluskal, 2003),

procédure ressemblant au système d'impression à jet d'encre. Dans ce cas, les volumes des dépôts varient du nanolitre au picolitre. Cependant, ce système peut altérer les protéines à cause de la force du jet employé (Haab et al., 2001), mais en contre partie il convient à tous types de support et de tests biochimiques/biologiques. Afin d'améliorer la miniaturisation plus les dépôts des protéines/peptides sur des supports, Avseenko et ses collaborateurs ont développé une méthode de dépôt par « electrospary » sur substrat en dextran (Avseenko et al., 2002) ; cette technologie produit des spots de très petite taille compris entre 30 et 150  $\mu\text{m}$  de diamètre.

## **Partie 3 : Les techniques de détection et d'analyse d'interaction protéines-protéines/peptides sur des puces**

Le développement des biocapteurs est un champ d'étude très vaste et qui préoccupe des scientifiques depuis des années. Les biopuces s'inscrivent dans ce champ d'étude, et exigent une adaptation de certaines anciennes techniques de détection. Le biocapteur permettant d'avoir accès à toutes les informations possibles à partir d'un échantillon n'existe pas, pour cela, le choix de la méthode de détection dépendra de la question posée initialement.

Les techniques de détection des biomolécules sur puces les plus couramment utilisées peuvent être classées en deux grands groupes selon qu'elles utilisent ou non un traceur. L'objectif de ce paragraphe est de décrire les principales techniques utilisées dans le domaine des puces avec un développement particulier pour la détection par résonance plasmonique de surface (SPR), méthode utilisée au cours de ce travail.

### **I- Méthodes de détection avec marquage**

#### **1- La fluorescence**

La détection par fluorescence est le mode le plus utilisé dans les systèmes miniaturisés (Haab et al., 2001; Houseman et al., 2002; MacBeath and Schreiber, 2000). Son principe est basé sur le marquage des molécules cibles par des traceurs fluorescents ou par l'intermédiaire d'une molécule révélatrice (méthode sandwich). Les traceurs sont des molécules qui absorbent de l'énergie lumineuse dans une gamme de longueur d'onde donnée (excitation) et la restituent en partie sous forme de lumière fluorescente (émission). Ces molécules sont donc caractérisées par la longueur d'onde de la lumière d'excitation et d'émission. Actuellement, plusieurs marqueurs sont disponibles sur le marché avec une gamme assez large de longueur d'onde.

La fluorescence reste la méthode de détection la plus simple pour une mesure sur puces, réalisée par un scanner. Cet appareil permet de balayer la surface de la puce avec une source lumineuse accordée à la fréquence d'excitation du fluorophore utilisé. Des capteurs (photomultiplicateur ou caméra CCD) permettent de collecter la lumière émise par

fluorescence et de reconstituer une image de la surface avec une résolution latérale de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$ .

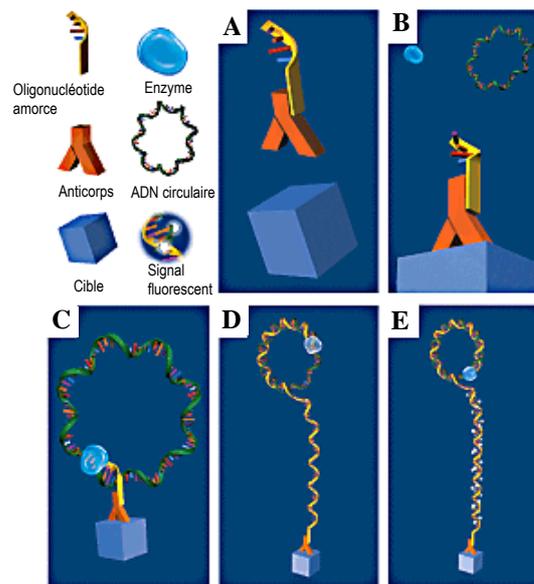
L'inconvénient majeur de la technique de détection directe est lié à la nécessité de marquer les molécules cibles, ce qui peut influencer leur interaction avec les molécules sondes. De même, une mesure indirecte par sandwich, favorisent les interactions non spécifiques et induit un rapport signal sur bruit de fond élevé. De plus, le marquage des molécules cibles nécessite des étapes supplémentaires sur les protocoles de préparation, ce qui veut dire un temps de réalisation relativement long et des pertes inévitables. De plus, les marqueurs fluorescents les plus courants aujourd'hui ont certaines limites : le phénomène de « quenching » qui résulte de l'adsorption d'une partie de l'énergie par les autres molécules présentes dans le milieu, et le phénomène de photoblanchiment qui caractérise la perte des propriétés fluorescentes des molécules sous l'effet d'une excitation prolongée ou par une forte intensité lumineuse.

## **2- La radioactivité**

Traditionnellement, le marquage des cibles par des isotopes radioactifs ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ ) permet d'avoir la meilleure sensibilité de détection. La radioactivité a été utilisée par plusieurs groupes de recherche, essentiellement dans des analyses d'activités enzymatiques, plus particulièrement des kinases (MacBeath and Schreiber, 2000; Zhu et al., 2001). Ce mode de détection se révèle peu intéressant dans les systèmes de puces. En effet, si des écrans photostimulables et des systèmes de lecture adaptés (phosphorImager) ont été longtemps utilisés pour des lectures semi-quantitatives sur membranes, la diminution de la taille de ces membranes ainsi que l'augmentation de la densité des biomolécules fixées a montré les limites de ces systèmes, à cause de leur faible résolution (de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$ ). A cela s'ajoute les problèmes de la radioactivité : les limites d'utilisation de certains isotopes (demi-vie), les risques de contamination et surtout les processus d'élimination des déchets et leur coût.

### 3- L'activité enzymatique

La détection enzymatique d'interactions entre biomolécules sur puces est issue des systèmes de révélation utilisés dans certaines techniques de dot-blot ou d'ELISA. L'une des méthodes les plus couramment employées consiste à utiliser la Streptavidine ou des anticorps secondaires conjugués à la peroxydase ou à la phosphatase alcaline pour catalyser une réaction dont le produit final est détectée par chimiluminescence (Moody et al., 2001; Wiese et al., 2001) ou fluorescence. La lumière générée au niveau des spots est enregistrée par une caméra CCD. Afin d'augmenter la sensibilité de détection sur la puce, Schweitzer et ses collaborateurs (Schweitzer et al., 2002) ont utilisé une activité enzymatique pour une réaction d'amplification appelée RCA (Rolling Circle Amplification). Cette amplification, faite en présence d'un ADN circulaire simple brin, est initiée par une amorce fixée sur un Ac spécifique de la protéine à détecter (figure 1.13). Une telle technique permet d'atteindre un seuil de détection de 0,5 pg/ml.



**Figure 1.13.** Principe de la réaction "RCA" : fixation sur la cible d'un anticorps spécifique activé par une amorce (A), addition du complexe d'amplification (ADN circulaire simple brin et l'enzyme) (B), initiation de la synthèse (C), synthèse amplifiée du brin complémentaire de l'ADN circulaire (D), fixation de la sonde fluorescente sur l'ADN double (E). (D'après (Schweitzer et al., 2002)).

Malgré sa grande sensibilité, la détection basée sur l'activité enzymatique n'est pas idéale dans le cas des puces : le point limitant l'utilisation de ce type de procédé est la nécessité de compartimenter les spots de façon à empêcher la diffusion du produit issu de la révélation enzymatique.

#### **4- Détection magnétique**

Le principe de la détection magnétique est basé sur l'emploi de particules magnétiques pour le marquage des molécules cibles. De nombreuses études ont permis le développement de cette technologie pour la mesure des interactions biologiques. Récemment, des capteurs à vanne de spin (Graham et al., 2003) permettent d'obtenir une grande sensibilité (jusqu'à la molécule unique). La technique développée par Graham et ses collaborateurs est basée sur la révélation des molécules cibles par des particules magnétiques de 2 $\mu$ m de diamètre, composées d'oxyde de fer dans une matrice de polymère. Ces particules sont fonctionnalisées par des molécules cibles (dans ce cas la Streptavidine) qui reconnaissent les molécules sondes immobilisées sur le capteur (dans ce cas la biotine). Ce système pourrait être étendu à la détection de n'importe quelle molécule cible en utilisant une méthode en 3 étapes :

- fixation de la cible sur la molécule sonde
- fixation molécule biotinylée spécifique de la molécule cible
- fixation des particules magnétiques fonctionnalisées par la Streptavidine.

## **II- Méthodes de détection sans marquage**

### **1- La spectrométrie de masse**

La puce utilisée dans cette technologie est constituée de barrettes présentant des spots ayant des sites actifs avec des propriétés chimiques différentes (ioniques, hydrophobes, hydrophiles...) ou fonctionnalisés avec des sondes biologiques (ADN, Ac, récepteur...) permettant la capture spécifique de la cible. Après application d'un échantillon sur la puce, la barrette est insérée dans un lecteur SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization) pour analyser les molécules capturées. Cette technologie commercialisée par la société CIPHERGEN (<http://www.ciphergen.com>) permet d'identifier de nouvelles cibles inconnues, en plus elle peut être couplée à d'autres techniques de purification telle que la chromatographie

ou d'analyse telles que la résonance plasmonique de surface et la spectrométrie de masse en tandem (Borch and Roepstorff, 2004).

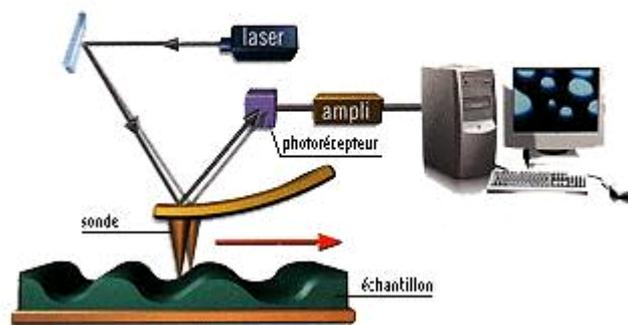
## **2- La microbalance à quartz**

Les systèmes les plus classiques utilisant une transduction mécanique sont les microbalances à quartz (QCM : Quartz Cristal Microbalance). Le dispositif est généralement constitué d'un solide piézoélectrique de géométrie simple dont la résonance est excitée par l'application d'une tension alternative. Celle-ci est transmise par l'intermédiaire d'électrodes métalliques déposées en couche mince sur le matériau. Cette couche mince peut être fonctionnalisée avec des molécules sondes. La fixation des molécules cibles entraîne une variation de la fréquence de résonance en modifiant la masse présente en surface. Ces systèmes permettent de mesurer les interactions en temps réel, ce qui donne la possibilité d'étudier des paramètres cinétiques. Cette méthode a été utilisée le plus souvent pour analyser des interactions ADN-ADN (Borch and Roepstorff, 2004). Malgré sa grande sensibilité (de l'ordre du  $\text{ng}/\text{cm}^2$ ), cette technique nécessite plus de développement pour l'adapter à des puces à haute densité.

## **3- La microscopie à force atomique**

Le microscope à force atomique (AFM, Atomic Force Microscope) permet d'observer les atomes à la surface d'échantillons 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 biologie. Le principe de l'AFM 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 se situe à l'extrémité d'un levier flexible, le *cantilever*. Un faisceau laser dirigé sur l'extrémité du *cantilever* est réfléchi vers une photodiode à deux ou quatre cadrans. Les déplacements du faisceau sur la photodiode permettent de détecter les mouvements du *cantilever* dans les trois plans de l'espace (x, y, z) avec une précision voisine de la taille de l'atome (figure 1.14). Initialement, la technique a été utilisée pour caractériser les surfaces solides, puis son champ d'application s'est étendu à la biologie. En effet, la mesure de la force d'interaction entre la pointe et l'échantillon, sur laquelle repose l'imagerie par microscopie à force atomique, a servi également à déterminer les forces de liaison entre deux molécules. Les premières

expériences ont été réalisées sur l'interaction avidine-biotine (Florin et al., 1994). Par la suite, de nombreux travaux ont porté sur la mesure des forces d'interaction inter- et intramoléculaires, incluant les interactions ADN-ADN (Rief et al., 1999), Ag-Ac ou ligand-récepteur (Willemsen et al., 2000), ainsi que sur la mesure des forces d'adhérence entre cellules vivantes (Benoit et al., 2000; Grandbois et al., 2000) ou sur des études de caractérisations structurales des membranes (Richter and Brisson, 2004).



**Figure 1.14.** Principe de la microscopie à force atomique

#### **4- Les micro et nano systèmes électromécanique (Microcantilever)**

Les dispositifs de type micro-levier révèlent un grand potentiel d'application notamment dans le développement des capteurs physiques, chimiques et biologiques (Hansen and Thundat, 2005). Ces dispositifs permettent la traduction des interactions biomoléculaires par une donnée mécanique suite à une déflexion des micro-leviers. Ces capteurs sont intéressants grâce à leur grande sensibilité (Hansen et al., 2001) et la possibilité de mesure en temps réel.

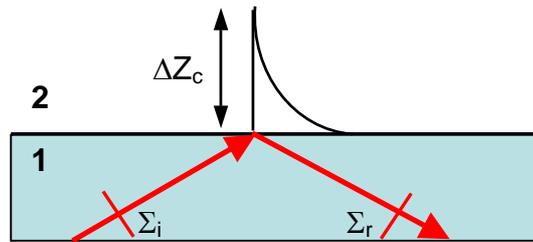
#### **5- Les biocapteurs optiques à ondes évanescentes**

Parmi les méthodes de détection sans marquage, les biocapteurs optiques sont les plus développés grâce aux avantages qu'ils présentent par rapport à d'autres techniques n'utilisant pas de marquage. Ces biocapteurs permettent une analyse en temps réel des interactions entre biomolécules type protéine-protéine (Yuk et al., 2004), ADN-ADN (Wark et al., 2005) et ADN-protéine (Buckle, 2001), en évitant l'étape de marquage qui peut affecter l'interaction par la modification apportée à la cible. La détection des interactions est basée sur le changement induit sur la surface par la formation du complexe sonde-cible qui va perturber

un signal initial optique. La variation de ce signal est mesurée en fonction du temps : c'est la notion de mesure en temps réel, qui va permettre d'obtenir une cinétique de l'interaction donnant accès aux paramètres dynamiques (constante d'association, constante de dissociation, l'affinité). Le signal optique dépend aussi d'une caractéristique intrinsèque aux biocapteurs optiques : l'onde évanescente qui se propage à l'interface de la surface solide du biocapteur et le milieu recouvrant cette surface (l'air ou une solution aqueuse).

### **5-1 Définition de l'onde évanescente**

L'onde évanescente est issue du phénomène de propagation de la lumière entre deux milieux ayant des indices de réfraction différents. En effet, lorsqu'une onde incidente, issue du milieu le plus réfringent (exemple le verre par rapport à l'air ou l'eau), est dirigée vers l'interface selon un angle d'incidence supérieur à l'angle de réfraction limite, une composante électromagnétique de la lumière, appelée onde évanescente est produite au voisinage de l'interface dans le milieu d'indice le plus faible (figure 1.15). Cette onde décroît exponentiellement en fonction de sa distance à l'interface ( $\Delta Z_c$ ), ce qui fait son intérêt puisque elle ne sera sensible qu'aux perturbations au voisinage de l'interface (à une distance de quelques nanomètres), siège des interactions biomoléculaires, et donc insensible à toutes perturbations en dehors de cette zone limites. L'adsorption ou la fixation de biomolécules sur l'interface va perturber la propagation de l'onde évanescente, entraînant des variations de phase et d'amplitude du faisceau réfléchi. Il est ainsi possible de détecter en temps réel les changements d'indice de réfraction, d'épaisseur de la couche, d'adsorption suite à des réactions qui se produisent à une distance de quelques centaines de nanomètre de la surface (McDonnell, 2001). Plusieurs techniques optiques sont basées sur le principe de l'onde évanescente tels que les miroirs résonants, les guides d'ondes et la SPR que nous développons dans le paragraphe suivant.



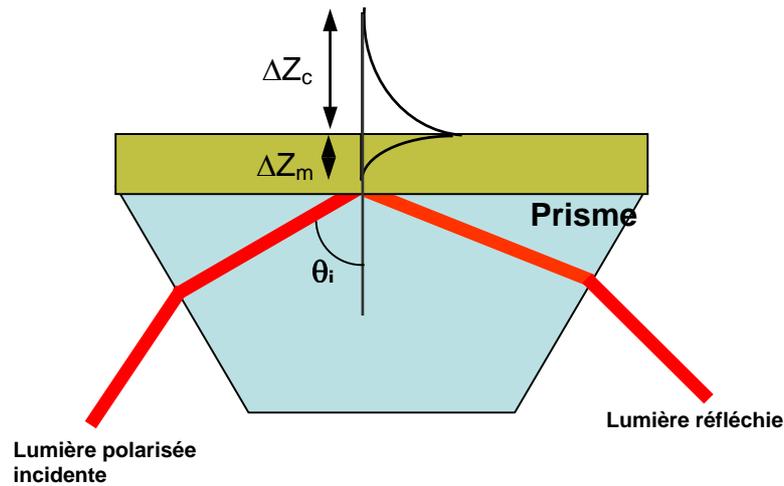
**Figure 1.15.** L'onde évanescente. Le faisceau lumineux incident (plan d'onde  $\Sigma_i$ ) est totalement réfléchi (plan d'onde  $\Sigma_r$ ) et entraîne la formation d'une onde évanescente à l'interface entre deux milieux d'indices de réfractions différents. Cette onde est confinée sur une profondeur  $\Delta Z_c$  dans le milieu 2.

## 5-2 La résonance plasmonique de surface

C'est en 1902 que Wood remarque de fines bandes sombres dans le spectre diffracté qui apparaissent dans le spectre d'une lumière blanche observée en utilisant un réseau de diffraction en réflexion. En 1941, Fano démontre que ce phénomène d'absorption ou diminution de l'énergie lumineuse (Fano, 1941) est lié, aux ondes de surface (plasmons de surface). Ce n'est qu'en 1968 que différentes équipes déterminent les conditions d'excitation de ces ondes de surface (Kretschmann and Raether, 1968; Otto, 1968), suscitant un grand intérêt pour les plasmons de surface notamment dans la caractérisation des films minces et l'analyse des processus se produisant sur des interfaces métalliques. Plus tard, les scientifiques ont élargi le champ d'application montrant que ce phénomène de surface peut être exploités dans les biocapteurs pour la détection et l'analyse des interactions entre biomolécules (Liedberg et al., 1983). Ce procédé technologique a pu être commercialisé depuis le début des années 90 par la société Biacore International première entreprise spécialisée dans ce domaine.

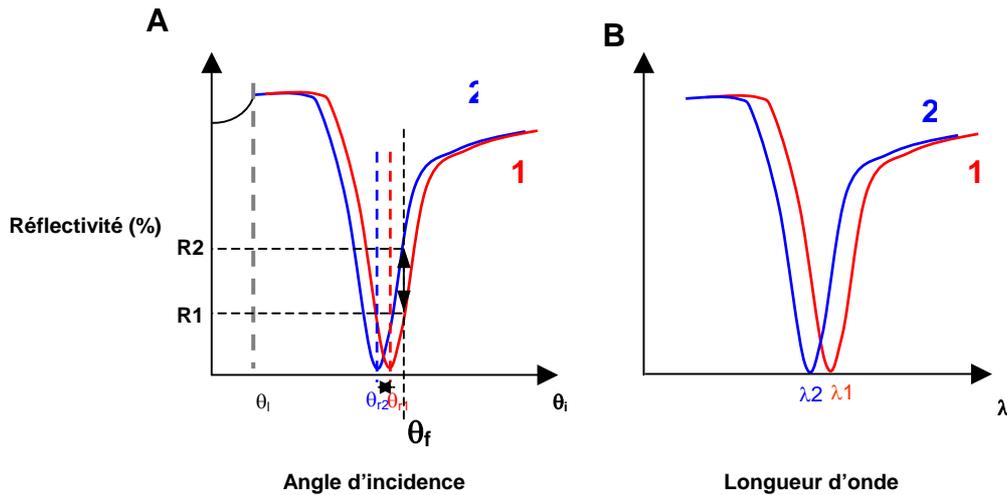
### a- Théorie de la résonance plasmonique de surface

La SPR se définit comme un phénomène de résonance entre les électrons libres d'un métal et l'onde évanescente provoquant une chute de la réflectivité due à un transfert d'énergie entre le faisceau incident et l'onde de surface qui se propage à l'interface. Par conséquent, le capteur doit comporter une surface métallique recouvrant un support solide en verre. Le plasmon de surface est une onde à décroissance exponentielle des deux côtés de l'interface (figure 1.16) qui se propage parallèlement à l'interface métal/solution. Elle joue le rôle de détecteur dans le milieu où se situe l'interaction biomoléculaire.



**Figure 1.16.** Schéma d'une configuration d'un capteur optique basé sur la résonance plasmonique de surface établie par Kretschmann.  $\Delta Z_c$  et  $\Delta Z_m$  sont les grandeurs caractéristiques de la profondeur de pénétration de l'onde plasmon de surface dans le milieu diélectrique (espace des interactions biologiques) et le métal respectivement.

Le principe de mesure par SPR est basé sur la courbe de plasmon qui représente la variation de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence (figure 1.17). L'optimum de la résonance des plasmons est au voisinage d'un angle d'incidence donnant le minimum de réflectivité. Les variations des propriétés de ce pic d'adsorption vont permettre de quantifier les perturbations se produisant près de l'interface métal/solution dues aux variations de l'indice de réfraction du milieu couvrant, de l'épaisseur de la couche formée et de la concentration d'une molécule cible. Ainsi, pour un état (1) la courbe de plasmon présentera un angle de résonance ( $\theta_{r1}$ ) ; la fixation d'une entité sur la surface (état 2), la courbe se déplace présentant alors un angle de résonance ( $\theta_{r2}$ ) (figure 1.17-A). Le même principe est observé dans le cas d'une variation de la réflectivité en fonction de la longueur d'onde de la lumière (figure 1.17- B). Il existe une relation linéaire entre l'énergie de résonance et la concentration en masse des molécules d'intérêt biologique comme l'ADN ou les protéines (De Feijter et al., 1978). Le signal SPR exprimé en réflectivité (ou en unité de résonance : UR) est une mesure indirecte mais corrélée à la quantité en masse présente à la surface. Trois moyens permettent le suivi des interactions qui se produisent à la surface : la variation de l'angle de résonance pour une longueur d'onde fixe ( $\lambda_f$ ), la variation de la réflectivité pour un angle d'incidence fixe ( $\theta_f$ ) et la variation spectrale pour  $\theta_f$ .



**Figure 1.17.** Principe de mesure des biocapteurs à SPR. Courbe de plasmon : variation de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence (A) et la longueur d'onde (B).

Ce procédé physique présente un grand intérêt dans la conception des biocapteurs optiques car il permet une analyse en temps réel et sans marquage des interactions biomoléculaires. Deux types de capteurs sont utilisés pour l'analyse par SPR des interactions biologiques : les monocapteurs permettant d'analyser une seule interaction et les multicapteurs offrent la possibilité d'étudier plusieurs interactions en même temps.

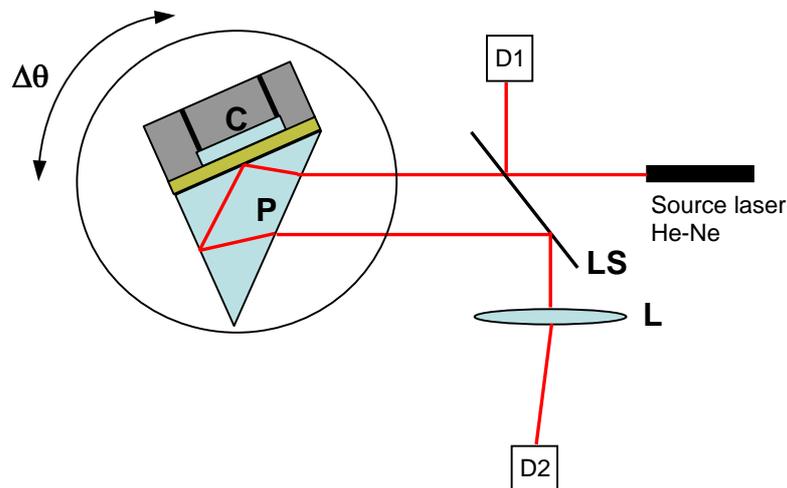
### **b- Les monocapteurs**

Les monocapteurs forment le groupe le plus développé et le plus ancien des biocapteurs optiques basés sur la SPR. Les systèmes les plus connus sont les instruments commercialisés par Biacore International ; malgré l'évolution de ces instruments, ils ne permettent actuellement d'analyser que 4 paramètres en même temps avec la dernière génération.

Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, il est possible de suivre ces changements par deux différentes méthodes ; l'interrogation angulaire (Karlsson and Stahlberg, 1995; Salamon et al., 1997) qui consiste à suivre la position angulaire du minimum de réflectivité SPR à une longueur d'onde fixe, et l'interrogation spectrale (Pfeifer et al., 1999) qui consiste à suivre la position spectrale du minimum de réflectivité SPR à un angle d'incidence fixe. Généralement, les monocapteurs utilisent l'interrogation angulaire ou spectrale.

### ➤ Monocapteur à interrogation angulaire

Une première configuration consiste en un faisceau incident collimaté balayant les différentes incidences autour de l'angle de résonance et le signal réfléchi est capturé par une photodiode (figure 1.18). Une lecture simultanée du signal de la photodiode et de l'angle d'incidence permet la détermination de l'angle de résonance lorsque le signal est à son minimum. Le temps de mesure est lié à la durée d'un balayage (avec les mouvements de rotation), ce qui induit un délai dans l'acquisition du signal. De plus, la mesure ne concerne que la surface éclairée par le faisceau laser. Cette configuration a été améliorée en remplaçant la platine de rotation par un cristal piézoélectrique permettant des petits mouvements d'oscillation du prisme.

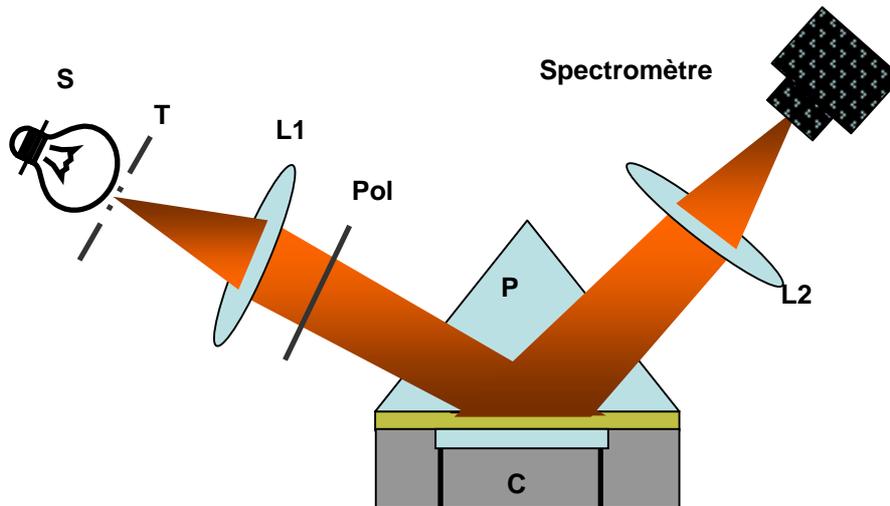


**Figure 1.18.** Montage d'un monocapteur SPR à interrogation angulaire avec balayage. C : cuve, P : prisme, L : lentille, D1 : photodétecteur de référence, D2 : photodétecteur du signal SPR, LS : lame semi-réfléchissante.

Une deuxième configuration utilise avec un faisceau incident non-collimaté, qui éclaire la surface simultanément selon différentes incidences (Melendez et al., 1996). Dans ce cas, le signal réfléchi est envoyé sur une barrette de photodiodes, chaque photodiode reçoit un signal correspondant à une incidence donnée dont une aura le signal de résonance. Le temps de mesure est lié au temps d'acquisition de la barrette CCD (photodiodes). Cette configuration permet une acquisition du signal plus rapide, puisque sans balayage et donc, un meilleur suivi des interactions que les monocapteurs à interrogation angulaire avec balayage. Ce type d'appareils est commercialisé par la société Texas Instrument (<http://www.ti.com/spreeta>) sous le nom de TISPR-Spreeta.

### ➤ Monocapteur à interrogation spectrale

Ce type de capteurs analyse le spectre de la lumière réfléchiée à l'aide d'un spectromètre et détermine la longueur d'onde pour laquelle le signal de réflectivité est le minimum (figure 1.19). Ces dispositifs sont moins développés et leur utilisation est limitée (Homola et al., 2002).



**Figure 1.19.** Montage d'un biocapteur SPR à interrogation spectrale. C : cuve, P : prisme, S : source de lumière blanche, L1 et L2 : lentilles, T : trou de source, Pol : polarisateur.

### c- Les multicapteurs

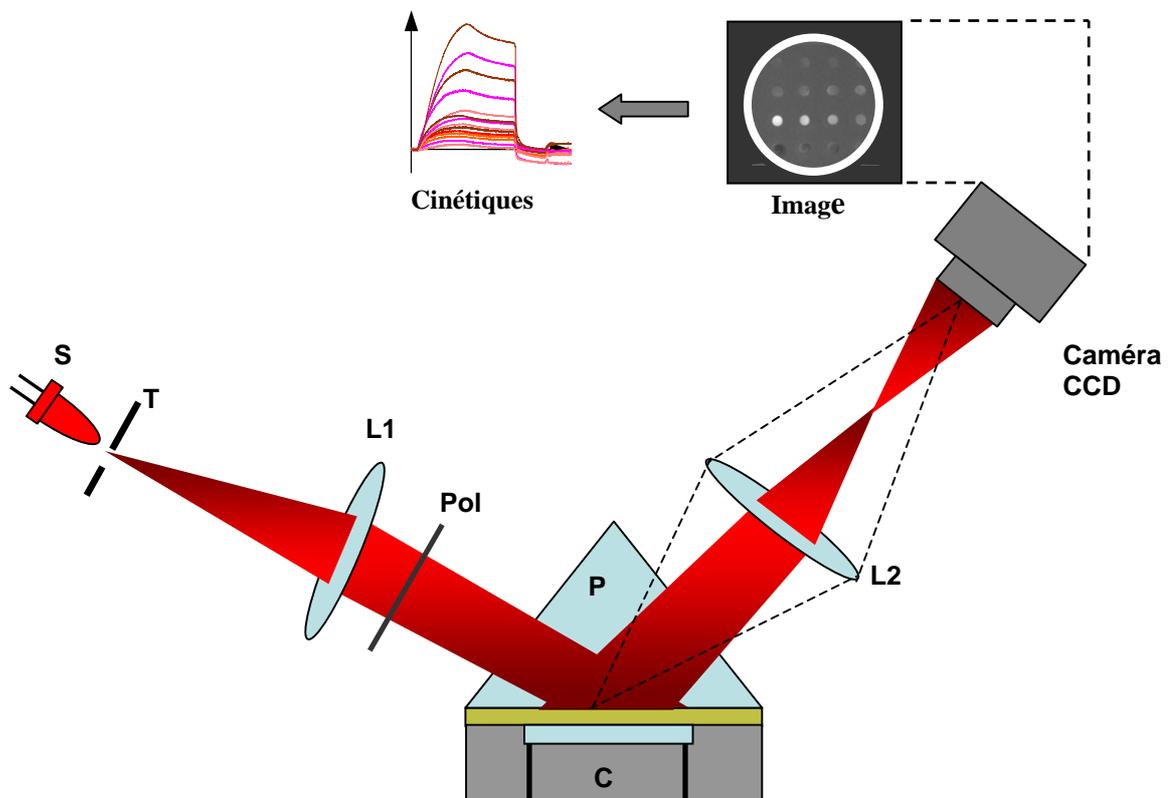
Le développement des multicapteurs SPR est une nécessité afin de franchir les limites des monocapteurs pour répondre aux besoins des analyses à haut débit sur des biopuces. De nouveaux dispositifs ont été conçus pour réaliser de nombreuses analyses simultanées. Ces analyses sont basées sur deux types d'imagerie, de la réflectivité et spectrale.

### ➤ Imagerie SPR

Ce type de biocapteur est celui que nous avons utilisé dans l'étude menée au cours de ma thèse. C'est un procédé développé aussi par l'équipe de Corn pour analyser des interactions type de ADN-ADN (Jordan et al., 1997) et protéine-protéine/peptides (Wegner et al., 2002;

Wegner et al., 2004). Le principe de mesure par imagerie SPR est basé sur le suivi de la variation de la réflectivité à un angle d'incidence fixe (interrogation en réflectivité).

La configuration d'un capteur par imagerie SPR comporte une composante essentielle qui est la caméra CCD. Toute la surface du biocapteur est analysée par la caméra à l'aide d'un système optique symbolisé par une lentille ( $L_2$ , figure 1.20). La caméra enregistre l'évolution de la réflectivité à travers une succession d'images témoignant les interactions se produisant à la surface (figure 1.20).



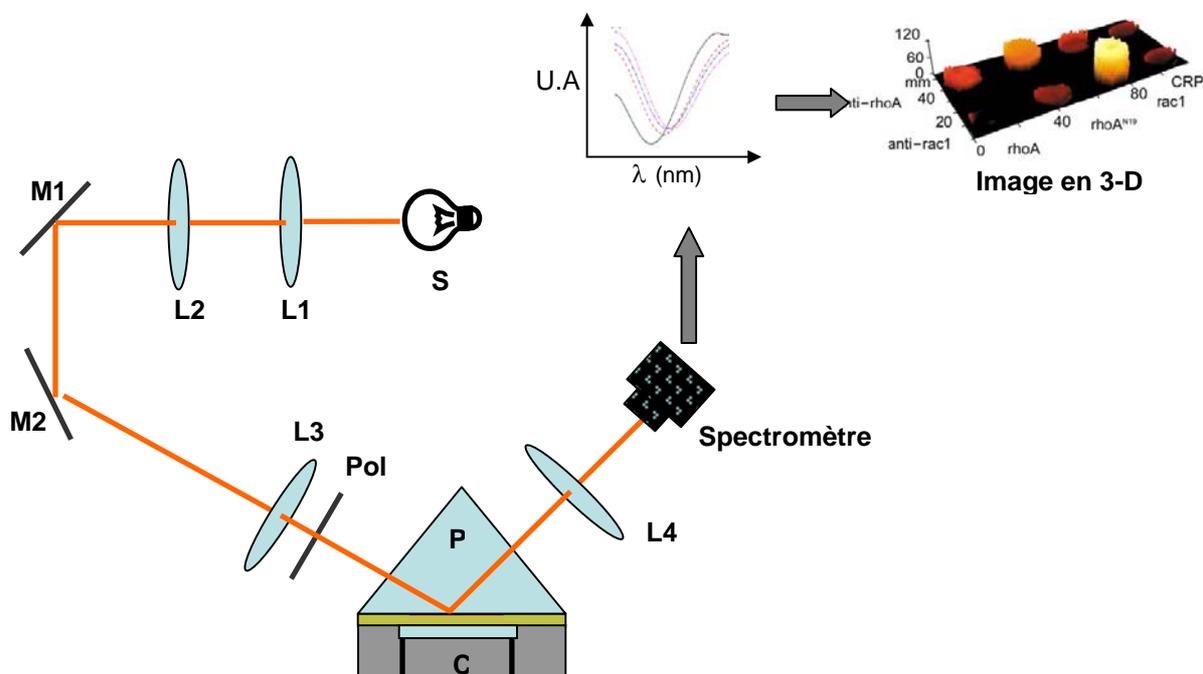
**Figure 1.20.** Multicapteur par imagerie de la réflectivité. C : cuve, P : prisme, Pol : polarisateur, L1 et L2 : lentilles, T : trou de source, S : source lumineuse.

Les conditions optimales d'utilisation d'un tel système doivent être définies au cas par cas : car elles dépendent des molécules présentes en surface. En effet, la position de l'angle d'incidence, paramètre critique, doit permettre d'obtenir une variation de réflectivité maximale lors des interactions en surface. Pour cela, il faut que cet angle soit positionné à une valeur où la pente de la courbe de réflectivité est maximale (paramètre déterminé à partir de la dérivée de la courbe de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence). La réponse du

Le système est donné en pourcentage de réflectivité qui correspond à un niveau de gris enregistré en temps réel par la caméra par rapport à deux images de référence, à savoir : une image noire (totale) correspondant à 0 % de réflectivité et une image blanche totale correspondant à 100 % de réflectivité (saturation du système).

### ➤ Imagerie spectrale

Les capteurs SPR par imagerie spectrale sont basés sur la mesure de la différence de la longueur d'onde (interrogation spectrale) à un angle d'incidence fixe. Le dispositif développé par le groupe de Ha (Zhavnerko and Ha, 2004) permet d'obtenir une image en 2-D et 3-D à partir des données SPR enregistrées par le spectromètre (figure 1.21). Les images sont construites à partir d'un balayage total (whole-scanning mode) de la surface. Cette approche nécessite un temps relativement long pour acquérir une image d'une puce à haute densité. Une approche alternative développée par Yuk et ses collaborateurs (Yuk et al., 2005; Yuk et al., 2004b) consiste à balayer de la surface en ligne (line-scanning mode) et dans deux directions planaires. La variation spectrale est traduite par une couleur selon un code qui dépend de l'épaisseur formée à la surface du capteur suite à une interaction biologique.



**Figure 1.21.** Multicapteur par imagerie spectrale. C : cuve, P : prisme, Pol : polarisateur, L1, L2, L3 et L4 : lentilles, M1 et M2 : miroirs, S : source lumineuse. (D'après (Yuk and Ha, 2005)).

#### **d- Amplification du signal SPR et couplage avec autre technique**

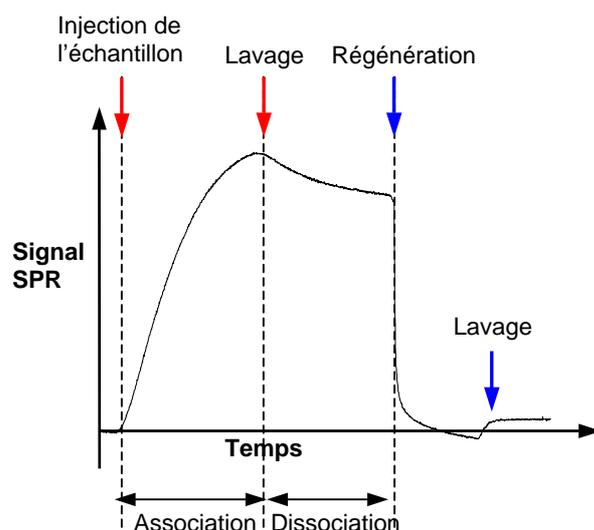
Il est possible d'amplifier le signal SPR en appliquant une molécule secondaire (méthode sandwich). Cette stratégie est intéressante surtout pour des analyses qualitatives donnant des signaux SPR trop faibles, que ce soit à cause de la fixation d'une faible quantité de matière ou à cause de la faible taille des cibles. Cette méthode permet de passer d'un signal correspondant à la fixation de la cible à un signal correspondant à la fixation de la cible et de la molécule secondaire. Ce gain sera d'autant plus important que la masse de la molécule secondaire sera importante. A titre d'exemple, l'amplification du signal SPR peut être utilisée dans le cas des interactions anticorps/antigènes (Homola et al., 2002) en utilisant un anticorps secondaire, et dans le cas de la détection de mutations d'ADN en utilisant la protéine MutS qui se lie spécifiquement aux paires de bases non complémentaires (Gotoh et al., 1997). Néanmoins, il faut noter que l'amplification d'un signal SPR n'est pas liée à la sensibilité de la technique. De plus, elle fait perdre l'aspect d'analyse en temps réel et de ce fait ne permet pas la détermination des caractéristiques de l'interaction (constantes d'association et de dissociation).

L'application de la SPR aux biocapteurs présente un grand intérêt, surtout en recherche, du fait que cette méthode est non-destructive et qu'elle offre la possibilité de l'utiliser en tandem avec d'autres techniques permettant une caractérisation de la cible telles que la spectrométrie de masse et l'AFM. L'association de la SPR avec la spectrométrie de masse a été décrite par Williams et Addona (Williams and Addona, 2000): des protéines et des peptides ont été capturés spécifiquement sur une surface par un biocapteur SPR puis identifiés par spectrométrie de masse. La combinaison de la SPR à la spectrométrie de masse est une approche rapide et prometteuse pour la caractérisation et l'identification de molécules capturées à partir d'un mélange complexe et constitue un outil intéressant dans des analyses protéomiques à haut débit. De plus, les biocapteurs SPR peuvent être couplés à des analyses de surface par AFM, permettant d'avoir des informations sur la topologie des molécules capturées sur la surface (Green et al., 2000).

### e- Analyse des données SPR

Quelque soit la configuration adoptée dans la conception du biocapteur SPR, les résultats sont donnés sous forme de sensorgrammes : cinétiques exprimant la variation du signal SPR (réflectivité ou unité de résonance) en fonction du temps. Une cinétique type comporte deux phases : la première est la phase d'association durant laquelle il y a formation des complexes sondes-cibles jusqu'à atteindre une saturation, et la deuxième phase est la phase de dissociation. Ces deux phases dépendent de deux vitesses caractéristiques du complexe lui-même et des conditions expérimentales. D'un point de vue pratique, la première phase où il y a une augmentation puis stabilisation du signal SPR, est réalisée pendant le temps d'injection de l'échantillon à la surface, par contre la phase dissociation est une étape de lavage avec le tampon de la réaction (figure 1.22). En utilisant des solutions adaptées à la nature des interactions mises en jeu, la surface peut être régénérée pour permettre l'analyse d'autres échantillons. Une régénération se traduit par une désorption rapide de la cible qui fait chuter le signal SPR.

Les données des cinétiques d'interaction permettent de quantifier les molécules capturées sur la surface et de déterminer les constantes d'association et de dissociation.



**Figure 1.22.** Sensorgramme obtenu avec des interactions biomoléculaires mesurées par un biocapteur SPR. La phase d'association commence par une injection de l'échantillon à la surface suivie d'une phase de dissociation déclenchée par une étape de lavage. La surface peut être régénérée avec un tampon approprié, ce fait se traduisant par la chute du signal SPR.

### ➤ Quantification des molécules capturées à la surface par SPR

La SPR offre la possibilité de quantifier les interactions biomoléculaires en temps réel. Pour cela, il faut convertir une grandeur optique mesurée à une grandeur biologique caractéristique de cette interaction. Les variations de réflectivité mesurées sont liées aux variations d'indice de réfraction et donc de manière indirecte, aux changements de concentration des molécules au voisinage de l'interface. Ainsi, ces variations peuvent être converties en quantité de matière présente par unité de surface, grandeur appelée  $\Gamma$  (unité de masse/unité de surface) qui représente le taux de recouvrement surfacique.

D'après les travaux de Stenberg et ses collaborateurs (Stenberg et al., 1991), le signal SPR varie d'une manière linéaire avec le taux de recouvrement de l'entité biologique adsorbée sur la surface. Cette linéarité est valable lorsque l'épaisseur de la couche formée est très petite par rapport à la longueur de pénétration de l'onde évanescente dans le milieu couvrant, cette donnée est compatible avec les couches formées lors des interactions biologiques. Le taux de recouvrement peut s'écrire selon la relation suivante :

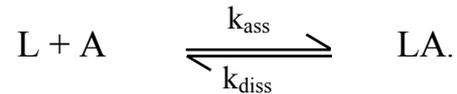
$$\Gamma = \frac{\Delta R \cdot Lz_c}{S_{P,R} \partial n / \partial C}$$

avec  $\Delta R$  est la variation de la réflectivité,  $Lz_c$  est la grandeur de pénétration de l'onde,  $S_{P,R}$  est la sensibilité SPR mesurée après calibration du système et  $\partial n / \partial C$  est l'incrément d'indice de molécule biologique et qui vaut  $0,19 \text{ cm}^3/\text{g}$  pour les protéines et les oligonucléotides (Karlsson et al., 1991; Liedberg et al., 1993).

### ➤ Etude de la dynamique des interactions biomoléculaires à travers des cinétiques mesurées par la SPR

Les cinétiques d'interactions moléculaires suivent des modèles mettant en jeu les notions de phénomène d'association et de dissociation qui vont déterminer l'affinité d'un ligand (L) pour un analyte (A). Le système de détection par imagerie de la SPR est basé sur le

suivi en temps réel la réflectivité, dont la variation en fonction du temps dépend d'une part de l'association de l'analyte avec son ligand qui est pondéré par la concentration appliquée, et d'autre part de la dissociation du complexe qui est indépendante de la concentration de l'analyte. Pour un modèle d'interaction monovalent (1 :1) simple entre un ligand et un analyte (modèle de Langmuir), la réaction peut s'écrire :



Avec  $k_{\text{ass}}$  la constante d'association de la réaction en  $M^{-1}\text{min}^{-1}$  et  $k_{\text{diss}}$  la constante de dissociation de la réaction en  $\text{min}^{-1}$ . La constante d'affinité  $K_A$  (en  $M^{-1}$ ) est définie par le rapport  $k_{\text{ass}}/k_{\text{diss}}$ .

Dans des conditions expérimentales où l'interaction n'est pas limitée par le transport de masse, on peut écrire l'équation exprimant la variation de la réflectivité en fonction du temps comme suit :

$$d[AL]/dt = k_{\text{ass}} [A] [L] - k_{\text{diss}} [AL] \quad (1)$$

Dans le cas des puces, où une des deux espèces impliquées dans l'interaction est fixée sur une surface, le ligand (L) correspond à la sonde et l'analyte à la cible (A). Cette équation peut être simplifiée en admettant que la concentration (C) de l'analyte est constante durant l'injection justifiée par son apport en quantité suffisante durant l'expérience et que la concentration du ligand effective est la différence entre la concentration totale et celle du ligand lié à l'analyte.

L'équation (1) peut s'écrire comme suit :

$$dR/dt = k_{\text{ass}} C (R_{\text{max}} - R) - k_{\text{diss}} \cdot R \quad (2)$$

où R est la réponse du biocapteur (la réflectivité dans notre cas).

A partir de cette relation la constante  $K_A$  peut être déterminée de deux manières, soit à l'équilibre soit à partir de l'analyse de la cinétique.

→ *Analyse à l'équilibre*

A l'équilibre,  $dR/dt (t \rightarrow \infty) = 0$  et  $R = R_{eq}$  ( $R$  à l'équilibre), l'équation (2) devient :

$$R_{eq}/C = K_A (R_{max} - R_{eq})$$

$K_A$  est donc la pente de la droite  $R_{eq}/C$  en fonction de  $R_{eq}$ .

→ *Analyse à partir de la cinétique*

C'est une analyse en temps réel, en dehors de l'équilibre, l'équation (2) devient :

$$dR/dt = k_{ass} C R_{max} - (k_{ass} C + k_{diss.}) R \quad (3)$$

Cette relation permet de déterminer la nature de l'évolution temporelle de la réponse du système durant la phase d'injection de l'analyte (association) puis durant la phase de rinçage (dissociation) :

$$\begin{cases} R_a(t) = R_a(t_0) + (R_a(\infty) - R_a(t_0)) \cdot [1 - \exp(-k_{on}(t - t_0))] & (4) \quad \text{(Association)} \\ R_d(t) = R_d(\infty) + (R_d(t_1) - R_d(\infty)) \cdot [\exp(-k_{off}(t - t_1))] & (5) \quad \text{(Dissociation)} \end{cases}$$

avec  $k_{on} = k_{ass} C + k_{diss}$  : constante caractéristique de la phase d'association

$k_{off} = k_{diss}$  : constante caractéristique de la phase de dissociation.

Les deux équations (4 et 5) peuvent être simplifiées en supposant que  $R_a(t_0) = 0$  et  $R_a(\infty) = R_{eq}$  et  $R_d(\infty) = 0$ , d'où ces deux équations deviennent :

$$\begin{cases} R_a(t) = R_{eq} [1 - \exp(-k_{on}(t - t_0))] & \text{(Association)} \\ R_d(t) = R_d(t_1) [\exp(-k_{off}(t - t_1))] & \text{(Dissociation)} \end{cases}$$

## **Partie 4 : Caractéristiques des infections par le virus de l'hépatite C (VHC)**

### **I- Epidémiologie et histoire naturelle du VHC**

Le VHC infecte plus de 170 millions de personnes, soit près de 3% de la population mondiale (WHO, 1999). Actuellement, 3 à 4 millions de personnes nouvellement infectées sont détectées chaque année, ce qui montre l'importance de cette infection en santé publique. Moins de 2,5 % de la population est touchée en Europe du Nord, Australie et Amérique du Nord. Les zones endémiques sont localisées au niveau de l'Afrique noire, l'Amérique du Sud, la Roumanie et la Chine avec une prévalence qui varie entre 5 et 10 %. Des foyers de très forte endémie se trouvent en Egypte, Bolivie, Congo, Sierra Leone, et la Mongolie avec une prévalence supérieure à 10 %.

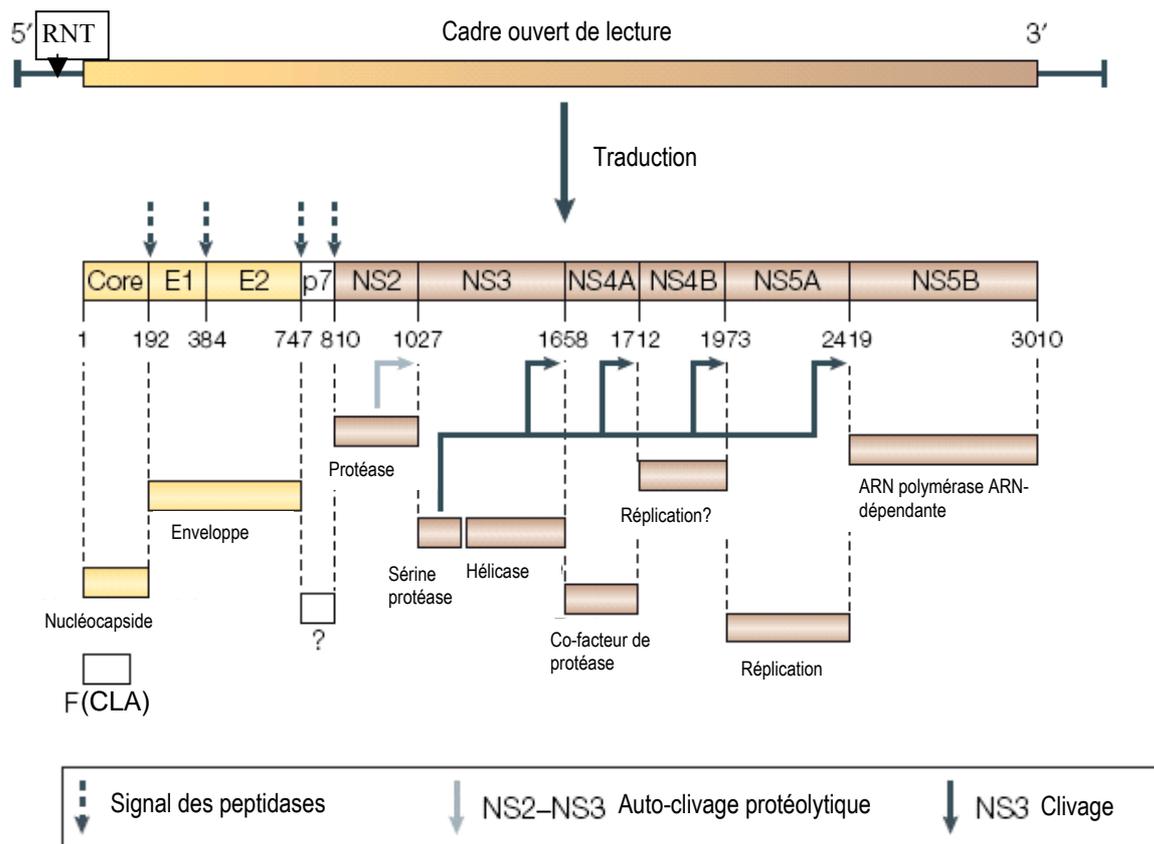
Au cours des années 70, le terme d'hépatite « non A - non B » est utilisé pour désigner les hépatites transmissibles à l'homme et au chimpanzé, et non liées au virus de l'hépatite A ou de l'hépatite B. Plus tard, des études ont montré que des chimpanzés infectés avec du plasma de sujet atteint d'hépatite non A - non B développent une maladie identique à celle de l'homme et que cette maladie est d'origine virale. Ce n'est qu'en 1989 que le VHC est découvert par isolement partiel et séquençage de son génome (Choo et al., 1989). Le VHC est classé dans la famille des *Flaviviridae* (Plagemann, 1991) qui comprend les genres *flavivirus*, *pestivirus* et *hepacivirus* dont le VHC est membre.

### **II- Structure et virologie moléculaire**

Le VHC est un virus enveloppé de 55 à 70 nm de diamètre possédant un ARN de polarité positive de 9600 nucléotides qui codent pour une polyprotéine de 3010 acides aminés (Choo et al., 1991) contenue dans un seul cadre de lecture. Une séquence non codante appelée IRES, région 5' non traduite (RNT), est composée de 342 nucléotides qui forment une structure secondaire et tertiaire complexe impliquée dans la réplication virale. A côté de cette région, s'étend la séquence du gène codant de la protéine core, c'est la région la plus conservée entre les différents types du VHC. La partie 3' du génome est une région non traduite aussi d'environ 240 nucléotides. Elle est composée d'une région riche en pyrimidine (poly U/C)

peu conservée entre les différents génotypes et d'une région extrêmement conservée de 98 nucléotides nommée 3'X.

La polyprotéine est clivée sous l'action de protéases cellulaires et virales pour générer les protéines structurales : core (C), les deux protéines d'enveloppe (E1 et E2), la protéine p7 ; et les protéines non structurales : NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B (figure 1.23) qui seront impliquées dans le clivage, la réplication et la résistance du virus. Une protéine supplémentaire, nommée F, a été récemment découverte : elle résulte d'un changement du cadre de lecture au niveau du 11<sup>e</sup> codon de la protéine C (Xu et al., 2001). C'est une protéine de 17 kDa qui a une durée de vie relativement courte (< 10 minutes *in vitro*) et qui peut s'associer au réticulum endoplasmique (Xu et al., 2003). Son implication dans l'infection ou la pathogénèse du virus n'est pas encore montrée. Les protéines structurales possèdent des domaines particuliers qui leur permettent de s'ancrer dans la membrane du réticulum endoplasmique. La protéine core (21 kDa) pourrait moduler le métabolisme lipidique cellulaire en s'associant à des gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme, effet susceptible d'induire la stéatose hépatocellulaire. Les protéines d'enveloppe ont des poids moléculaires variables selon le degré de glycosylation : E1 (32 à 35 kDa) et (68 à 72 kDa) (Goffard and Dubuisson, 2003). Elles peuvent former des hétérodimères et se lient à la membrane cellulaire par l'intermédiaire de leurs domaines hydrophobiques. La partie N-terminale de la protéine E2 est une région contenant des épitopes neutralisants (Eren et al., 2006; Habersetzer et al., 1998; Schofield et al., 2005). Les protéines non structurales sont clivées en *cis* ou *trans* par les protéases du virus. La métalloprotéase NS2 clive en *cis* la jonction qui la lie à NS3. La protéine multifonctionnelle NS3 (contenant un domaine sérine protéase, une NTPase et un domaine hélicase) clive en *trans* les jonctions NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B. NS3 joue un rôle critique dans le développement du carcinome hépatocellulaire. La protéine NS4A est un cofacteur pour l'activité de NS3 et constitue de ce fait une cible de choix dans le développement des stratégies thérapeutiques anti-VHC. Le rôle de la protéine NS4B est encore inconnu. La protéine NS5A est impliquée dans la résistance du virus à l'interféron (Taylor et al., 1999) *via* sa partie C-terminale. NS5B est une ARN polymérase ARN dépendante assurant la réplication virale, et constitue elle aussi une cible potentielle pour des stratégies thérapeutiques.



**Figure 1.23.** Organisation génomique du virus de l'hépatite C. Un cadre de lecture ouvert code une polyprotéine de ~3010 acides aminés. Les nombres mentionnés dans la figure sont des indications des sites de clivage par des protéases virales et cellulaires. Une protéine F (Frameshift) est traduite avec un cadre de lecture alternatif (CLA). E, protéine d'enveloppe ; NS, protéine non-structurale ; RNT, région non-traduite. (D'après (Rehermann and Nascimbeni, 2005)).

### III- Variabilité génétique

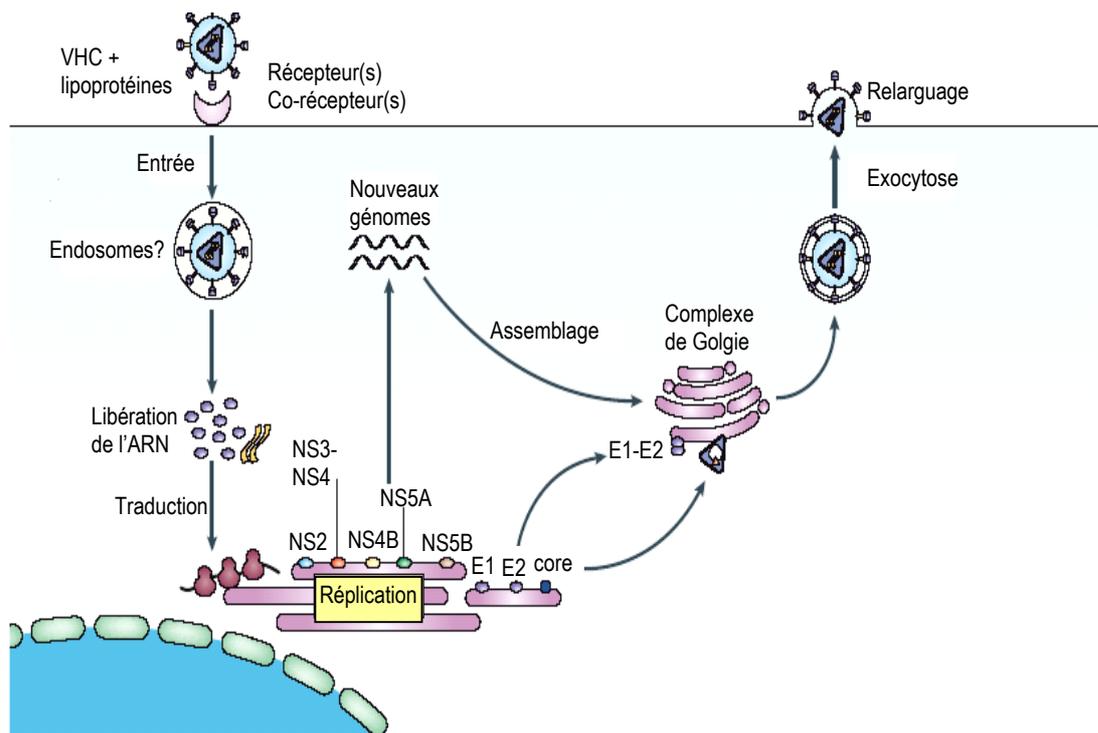
La variabilité génétique est une des caractéristiques principales du VHC. Elle est très importante puisqu'elle touche plus de 30 à 35 % des séquences nucléotidiques. L'hétérogénéité du virus est attribuée à l'ARN polymérase, peu fiable, qui provoque l'apparition des mutations. Cette variabilité, très hétérogène, est particulièrement importante dans la séquence codante pour la protéine d'enveloppe E2 ; notamment dans sa partie 5' (région hypervariable HVR1). En revanche, la région 5' non-codante est hautement conservée d'un isolat à un autre. Les séquences codant pour la protéine core et NS5 semblent avoir le niveau de variabilité le plus faible. Cette variabilité génétique a conduit à la classification des différentes souches en types et sous-types avec un taux de divergence de 30 et 20

respectivement. La variabilité génétique est très fréquente au cours de l'évolution de la maladie chez un même patient, on parle alors de quasi-espèces. Elles sont à l'origine de la persistance de l'infection virale par échappement au système immunitaire de l'hôte ou par résistance au traitement par l'INF- $\alpha$  (Pawlotsky, 1999). Actuellement, il existe six génotypes majeurs (1 à 6) (Simmonds et al., 1994) et 14 à 54 sous-types (1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 3a, ...). La répartition géographique des différents génotypes et sous-types est très hétérogène. En effet, les génotypes 1, 2 et 3 sont mondialement distribués avec une prévalence importante du 1b en Europe et au Japon, 1a au USA, 4 en Afrique centrale et au Moyen-Orient, 5 en Afrique du sud et 6 en Asie. De plus, les génotypes sont différents selon l'âge des personnes infectées et le mode de contamination : 1a et 3a sont plus fréquents chez les sujets jeunes et les toxicomanes tandis que 1b est prédominant chez les sujets âgés et contaminés par transfusion sanguine

#### **IV- Réplication du VHC**

Jusqu'à maintenant, il y a aucune technique efficace pour la production du VHC *in vitro*. Néanmoins, des systèmes de culture impliquant des pseudo-particules du virus ont été élaborés pour mieux comprendre la modalité de l'infection (Bartosch et al., 2003). Plus récemment, Heller et ses collaborateurs (Heller et al., 2005) ont développé une stratégie permettant la production de virions du VHC *in vitro*. Le VHC infecte principalement les hépatocytes, mais il s'est avéré que ce virus peut infecter plusieurs type de cellules : hématopoïétiques (Lerat et al., 1998), mononuclées périphériques (PBMCs) (Radkowski et al., 1999) et cellules dendritiques (Goutagny et al., 2003).

La première étape de l'infection est le stade le moins connu du cycle de l'infection ; en effet, le mécanisme d'attachement et les récepteurs mis en jeu ne sont pas encore bien définis. Après l'entrée dans une cellule hôte, la nucléocapside du VHC libère l'ARN viral qui est directement traduit en une polyprotéine, laquelle est ensuite clivée en protéines structurales et non-structurales. Après maturation, les protéines non-structurales et l'ARN viral forment des complexes de réplication « web » sous forme de vésicules compactes (Egger et al., 2002) qui catalysent la transcription de plusieurs copies d'ARN intermédiaires de polarité négative qui seront des matrices pour la synthèse d'ARN génomiques (polarité positive). Les nouveaux brins d'ARN s'associent à la nucléocapside puis aux protéines d'enveloppe pour former de nouvelles particules virales infectieuses qui seront relarguées par exocytose (figure 1.24).



**Figure 1.24.** Cycle de réplication du VHC. (D'après (Rehermann and Nascimbeni, 2005)).

## V- Transmission du VHC

La transmission du VHC se fait essentiellement par la voie parentérale. Parmi les personnes infectées, on retrouve principalement les consommateurs de drogues par injections intraveineuses. La transmission verticale mère/enfant est faible (< 6 %) (Batallan et al., 2003) mais augmente sensiblement dans le cas où la mère est également infectée par le VIH. La transmission par des rapports sexuels est peu documentée mais n'est pas exclue (Leruez-Ville et al., 2000). Par contre, le virus ne peut pas coloniser les muqueuses (Belec et al., 2003). Par ailleurs, l'affichage d'un pourcentage élevé (jusqu'à 30 %) de personnes infectées dans une population donnée suggère l'existence d'un autre mode de contamination et de propagation du virus, telles que les contaminations nosocomiales.

## **VI- Immunologie des infections au VHC**

### **1- Le système immunitaire**

Le système immunitaire est un ensemble d'acteurs (cellules et facteurs solubles) qui permettent à l'organisme de se défendre contre les agents pathogènes vivants (bactéries, virus, parasites) ou non vivants (toxines et prion) et les anomalies d'un dysfonctionnement endogène (cancer). Dans le cas d'une infection virale, les particules infectieuses se propagent dans l'organisme librement ou transportées par les cellules mononuclées, jusqu'à leur rencontre avec une cellule cible (cellule hôte). Une fois à l'intérieur de sa cible, le virus va pouvoir s'exprimer (réplication et multiplication virale) en utilisant les moyens et l'énergie de la cellule infectée. Pour se défendre, l'organisme va mettre en action deux systèmes différents mais pas indépendants : l'immunité innée et l'immunité acquise.

#### **1-1- L'immunité innée**

L'immunité innée regroupe les fonctions immunitaires non spécifiques : l'activité cytolytique des cellules NK et NK-T, la phagocytose par les macrophages et les polynucléaires, l'apprêtement des antigènes par les cellules dendritiques et la production de cytokines par toutes ces cellules.

Les cellules NK (Natural Killer) sont des cellules n'exprimant pas le récepteur à l'antigène des lymphocytes T (TCR= T cell receptor/CD3), mais elles expriment les récepteurs KIRs (Killer Inhibitory Receptor) et NCRs (Natural Cytotoxicity Receptors). Les cellules NK entrent en communication avec tout type de cellule par l'intermédiaire de ces récepteurs. Si le récepteur NCR est engagé tout seul, la cellule NK s'active pour produire des substances lytiques (perforine et granzymes) qui vont lyser la cellule infectée et des cytokines/chimiokines (INF- $\gamma$ , IL-1, TNF- $\alpha$ ...) qui vont attirer d'autres cellules immunitaires sur le site infectieux. Dans le cas où les deux récepteurs, KIR et NCR, sont engagés simultanément, il n'y aura pas d'activité lytique.

Les cellules NK-T sont des lymphocytes caractérisées par l'expression à la fois du récepteur à l'antigène des cellules T (TCR/CD3) et les récepteurs des NK. Ce type de cellule reconnaît des antigènes associés aux molécules d'histocompatibilité de type I (CMH I) et peut

exercer une activité cytotoxique sur des cellules infectées, induite par l'IL-2 et l'IL-12. Après stimulation, les NK-T produisent également l'INF $\gamma$ - et l'INF- $\alpha$ , cytokines qui jouent un rôle dans la régulation de la réponse immune antivirale.

Les macrophages et les polynucléaires sont des cellules phagocytaires qui peuvent capturer l'antigène après opsonisation de celui-ci.

Les cellules dendritiques (CD) font aussi partie du système immunitaire inné. Ces cellules jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse immune acquise. Lors d'une primo-infection par un virus, les cellules infectées sont incapables d'activer directement les lymphocytes B et T (acteurs de la réponse immune acquise) naïfs présents dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions et rate), et donc de déclencher une réponse immune spécifique anti-virale. Celle-ci sera mise en jeu après intervention des CD : ces cellules capturent l'antigène par endocytose ou pinocytose et, après protéolyse de celui-ci, le réexprime à leur surface sous forme de peptides associés aux molécules du CMH. Ces CD présentant les complexes peptides-CMH vont migrer vers les ganglions lymphatiques pour rencontrer les cellules T afin d'initier la réponse immune acquise.

Comme moyen de lutte anti-virale, la cellule infectée produit l'interféron de type I (INF- $\alpha$  et INF- $\beta$ ) qui va inhiber la réplication virale par induction de synthèse d'une enzyme (endoribonucléase) lysant l'ARN. La sécrétion de l'interféron est aussi un signal de danger lancé par la cellule infectée pour activer le système immunitaire.

### **1-2- L'immunité acquise**

La reconnaissance par les cellules T, via le TCR, des peptides antigéniques associés aux CMH exprimés à la surface des cellules dendritiques constitue le premier signal d'activation des lymphocytes T (LT) CD4<sup>+</sup> naïfs. Après stimulation, ces cellules se différencient en deux populations effectrices ayant deux fonctions distinctes, et sont appelées Th1 ou Th2 suivant leur profil de sécrétion cytokinique. Les cellules Th1 secrètent de l'INF- $\gamma$  et de l'IL-2, elles sont impliquées dans la réponse immune à médiation cellulaire ; efficace contre les pathogènes intracellulaires et elles favorisent l'activité cytotoxique et l'expansion des LT CD8<sup>+</sup> (CTL). Par contre, les Th2 produisent de l'IL-4, 5, 10 et 13 et favorisent la réponse immune à médiation humorale en activant la production des Ac par les lymphocytes B (acteur de la réponse immune spécifique humorale).

### ➤ Réponse humorale

Les lymphocytes B (LB) produisent des Ac qui reconnaissent un épitope spécifique de l'Ag. Le signal d'activation est induit par la fixation de l'Ag sur le BCR, récepteur spécifique présent sur la surface des LB, et est régulé par diverses molécules notamment les cytokines produites par les Th2 (CD45, CD40...). Les Ac produits permettent la neutralisation des particules virales en bloquant leur entrée dans les cellules cibles et en facilitant leur élimination par les cellules phagocytaires et le système complémentaire.

### ➤ Réponse cellulaire

Les CTL exercent une activité lytique sur les cellules cibles en sécrétant des perforines et des granzymes. Il y a deux populations distinctes de CTL ; les Tc1 qui produisent de l'INF- $\gamma$  et de l' INF- $\alpha$  en présence d'IL-12, et les Tc2 qui sécrètent de l'IL-4. L'activation des LB, NK ou macrophages dépend du profil cytokinique produit par les CTL.

## 2- Evolution de la réponse immune au cours des infections par leVHC

Il est évident que les paramètres du patient, tels que les facteurs génétiques, l'alimentation, le stress, l'alcool, ainsi que des caractéristiques liées au pathogène comme le génotype viral sont des éléments affectant l'évolution de la pathologie. Beaucoup de travaux ont évalué la réponse immune humorale et cellulaire au cours des infections par le VHC (figure 1.25).

### 2-1- Réponse immune innée

En utilisant des puces à ADN, des travaux ont montré que l'expression différentielle de certains gènes intra-hépatiques est modifiée au cours de l'infection par le VHC (Bigger et al., 2001; Su et al., 2002). Ces études faites chez des chimpanzés infectés expérimentalement ont montré une activation rapide de gènes dépendant de l'INF- $\alpha$  et l'INF- $\gamma$ , cytokines impliquées dans la lutte antivirale. Cependant, il n'y a pas de corrélation entre l'expression de l'interféron et la régression de la maladie, bien que des réplicons du VHC aient été montrés comme étant sensible à l'action de l'interféron de type I *in vitro* (Frese et al., 2001).

De même, les protéines virales peuvent interférer avec certaines fonctions des cellules effectrices du système immunitaire inné, tel que les NK. De récentes études *in vitro* ont montré qu'à forte dose, la protéine recombinante E2 du VHC se fixe sur le CD81 exprimés par les NK et inhibe leur effet cytotoxique (Crotta et al., 2002; Tseng and Klimpel, 2002).

## **2-2- Réponse immune acquise**

### **➤ Réponse cellulaire**

La mise en place d'une réponse cellulaire intense et multi-spécifique des LT (CD4+ et CD8+) permet l'élimination du virus (Lechner et al., 2000; Thimme et al., 2001). Ainsi, des études chez le chimpanzé ont montré qu'une réponse cellulaire T CD4<sup>+</sup> est corrélée avec l'expression de INF- $\gamma$  et une diminution de la charge virale (Major et al., 2004). Une activité cytotoxique des lymphocytes CD8<sup>+</sup> périphériques et intra-hépatiques dirigée contre plusieurs épitopes du VHC s'établit au cours de la phase aiguë de l'infection (Wong et al., 2001). Cette réponse des LT cytotoxiques est plus intense durant la phase aiguë que chronique, et associée à l'éradication du virus.

Au cours de la phase chronique, une réponse des LT CD4<sup>+</sup> spécifiques est également observée, mais dans la majorité des cas, cette réponse est polarisée vers une sécrétion des cytokines de type Th2 (Chang et al., 2001). De même, des LT CD8<sup>+</sup> ayant une activité cytotoxique ont été localisées au niveau du foie. Ces lymphocytes, qui sont incapables de contrôler la réplication virale, semblent être les principales cellules impliquées dans la destruction du tissu hépatique par apoptose ou nécrose (Leroy et al., 2003). Cette inaptitude des CD8<sup>+</sup> à établir une réponse cytotoxique efficace contre les cellules infectées par le VHC est due en grande partie aux phénomènes d'échappement viraux (Cf page suivante).

### **➤ Réponse humorale**

Contrairement à une infection par le VHB, la réponse humorale chez des patients infectés par le VHC est très variable. En effet, cette réponse est tardive par rapport à l'infection, voire même absente dans certains cas. Les anticorps spécifiques développés au cours des infections par le VHC ont un profil isotypique réduit avec un titre sérique faible et inférieur de 2 log par rapport aux anticorps anti-VHB (Chen et al., 1999). De plus, les

anticorps anti-VHC ne sont pas présents à vie, ils disparaissent 10-20 ans après de la guérison (Takaki et al., 2000). Par ailleurs, une persistance virale évoluant vers la chronicité de l'infection peut avoir lieu malgré un taux d'anticorps élevé contre le virus et, réciproquement, des éradications peuvent être observées en absence d'Ac. Cependant, le profil des Ac développés a une influence sur l'évolution de la maladie. Des études de vaccinations faites chez le chimpanzé ont montré l'efficacité des Ac dirigés contre les protéines E1/E2 et core (Forns et al., 2000; Youn et al., 2005).

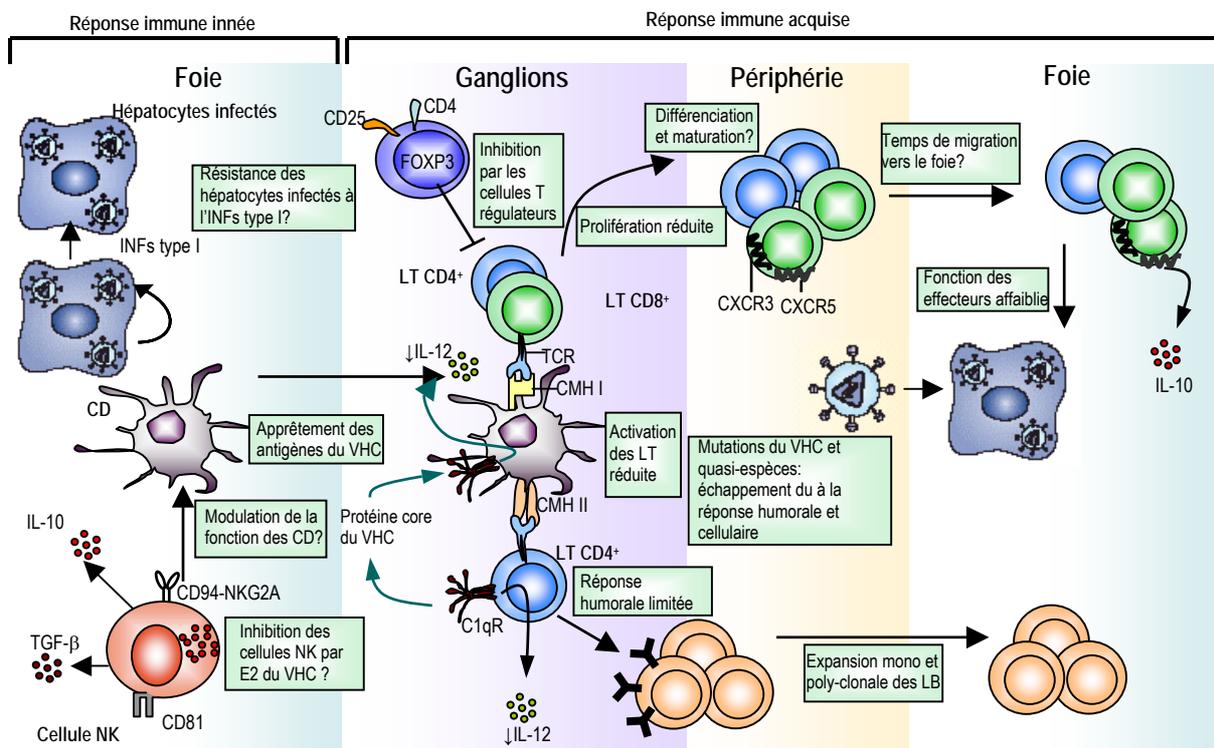
Il est bien établi que l'inefficacité de la réponse humorale est due au délai nécessaire à l'établissement de cette réponse, et du délai pour l'apparition de quasi-espèces suite aux mutations qui touchent en particulier la région E2 (HVR1). Durant la phase chronique de la maladie, le taux des anticorps anti-VHC est très important au début du traitement par l'INF- $\alpha$  chez les patients répondeurs contrairement aux non répondeurs ou échappeurs. Ce taux d'anticorps diminue progressivement au cours du traitement chez les patients répondeurs au traitement. Ces études suggèrent que la détermination du taux et de la spécificité des anticorps contre certains épitopes des protéines structurales et non structurales pourrait être un facteur prédictif pour la réponse au traitement.

### **2-3- Echappement du VHC et hépatite chronique**

Pour assurer sa persistance, le VHC échappe au système immunitaire de son hôte en utilisant plusieurs stratégies. Le mécanisme le plus important est la variabilité génétique entraînant l'apparition de quasi-espèces, au cours de la maladie. Ainsi, le fort taux de mutation provoque une perte des épitopes viraux reconnus par les lymphocytes B et T. Ces mutations touchent surtout la région HVR1 de E2 qui représente la principale cible des Ac neutralisants. Comme évoqué précédemment, le délai d'apparition d'une réponse immune cellulaire et humorale facilite le processus d'échappement par mutation. D'autres mécanismes ont été proposés pour expliquer la défaillance de la fonction des cellules T effectrices. En effet, il a été démontré qu'une séquence de la protéine core du virus peut se fixer sur le domaine globulaire du récepteur de C1q (protéine du complément) qui est exprimé à la surface des macrophages et des cellules T. Cette fixation entraîne l'inhibition de production de l'IL-12 par les macrophages (Eisen-Vandervelde et al., 2004) et la prolifération des cellules T accompagnée d'une diminution de production de l'IL-2 et INF- $\gamma$  (Kittlesen et al., 2000). Ces mécanismes ont été démontré *in vitro* et prouvés avec des études *in vivo* chez des

souris infectées par le virus de la vaccine exprimant la protéine core recombinante du VHC (Large et al., 1999).

De plus, la perte de l'efficacité des fonctions des cellules dendritiques est une éventuelle possibilité pour expliquer l'échappement du virus (Dolganiuc et al., 2003). Plus récemment, des scientifiques ont émis l'hypothèse de l'influence du polymorphisme des gènes de certaines cytokines ou des récepteurs de chimiokines (Hellier et al., 2003). Ce polymorphisme pourrait moduler la réponse immune spécifique anti-VHC.



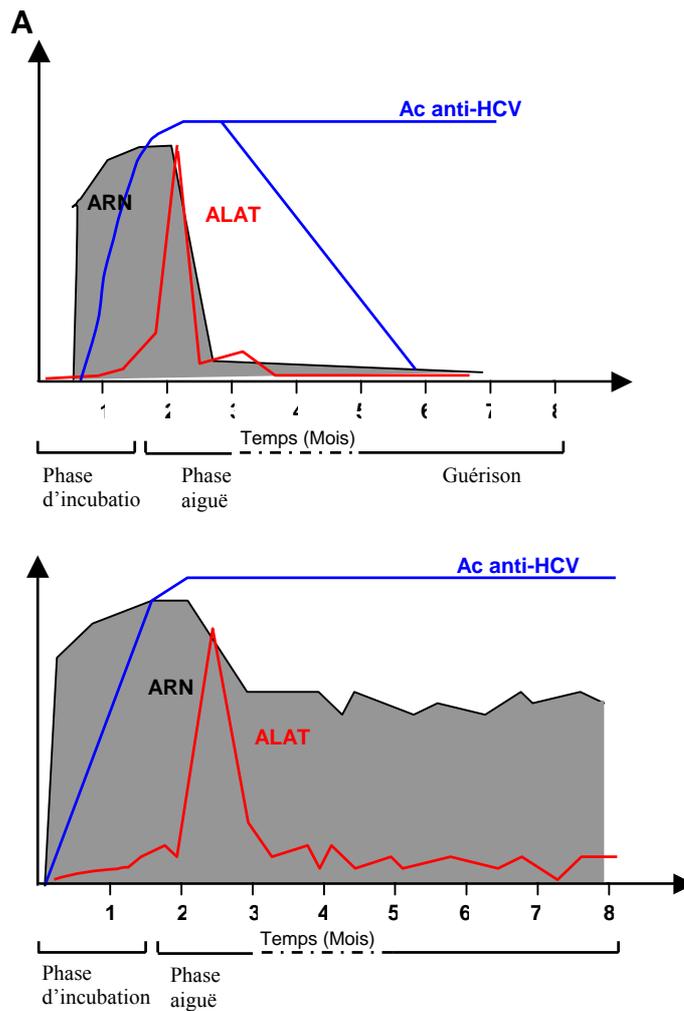
**Figure 1.25.** Schéma global de la réponse immune anti-VHC. (D'après (Rehermann and Nascimbeni, 2005)).

## VII- Pathogénie du VHC

L'homme est le seul hôte naturel connu du VHC, mais le chimpanzé peut être infecté expérimentalement. Une période d'incubation qui dure entre 4 à 12 semaines et durant laquelle l'ARN viral peut être détectée puis une hépatite aiguë se développe. Cette phase est anictérique et asymptomatique dans 80 % des cas. Les symptômes d'une hépatite aiguë sont : troubles digestifs, asthénies, prurit, ictère. L'hépatite aiguë sévère/ fulminante est très rare.

Les anticorps sont détectables au cours de cette phase, mais parfois il faut attendre 26 semaines pour observer une séroconversion. La phase aiguë est également caractérisée par une augmentation du taux des transaminases (ALAT) qui témoignent du début des lésions hépatiques.

Après la phase aiguë, la maladie évolue soit vers la guérison (20 % cas) soit vers la chronicité (80 % des cas) (figure 1.26), à l'exception des patients infectés par le génotype 2 parmi lesquels 53 % développe l'hépatite chronique. Les patients qui évoluent vers la guérison éliminent le virus (chute de l'ARN viral, diminution des ALAT), mais les anticorps restent détectables pendant de nombreuses années. Par contre, durant une hépatite chronique, l'ARN viral reste présent, est élevé bien que plus faible que durant la phase aiguë et la quantité d'anticorps est très variable : ils peuvent être détectables pendant longtemps ou disparaître rapidement. Le diagnostic histologique est un outil important pour définir le degré de l'inflammation et des lésions hépatiques (score Métavir ou Knodell). L'hépatite chronique évolue vers la cirrhose dans 5-10 % après 10 ans d'infection, mais plusieurs facteurs peuvent favoriser et aggraver le stade cirrhose tels que l'âge du patient, le génotype, une infection virale associée (VHB) et la consommation d'alcool. Le risque de dégénérescence vers un carcinome hépatocellulaire est de 4-5 % des patients cirrhotiques par an.



**Figure 1.26.** Evolution des paramètres cliniques au cours des infections par le VHC. (A) Hépatite ayant évolué vers la guérison. (B) Hépatite ayant évolué vers la chronicité. (D'après (Rehermann and Nascimbeni, 2005)).

### VIII- Diagnostic

Le diagnostic d'une infection par le VHC et le pronostic de son évolution reposent sur 4 types d'analyses : biologique ou biochimique, sérologique, histologique et moléculaire. La détection des anticorps (Ac) dirigés contre des antigènes du VHC est réalisée couramment par des tests immuno-enzymatiques (ELISA) ou par immunoblot (RIBA). La plupart des patients qui répliquent le VHC présentent des Ac anti-VHC. Lors de la phase aiguë, les Ac ne sont détectables qu'après 7 à 8 semaines de l'infection. Les tests sérologiques sont réalisés par des kits ELSA qui ont subi une évolution surtout avec la dernière génération permettant un diagnostic plus précoce. Malgré cela, ces tests présentent encore plusieurs inconvénients : difficulté de corrélation avec le test RIBA, incompatibilité avec un diagnostic précoce et

difficulté de différencier une hépatite active ou ancienne. Par ailleurs, récents travaux ont mis au point des systèmes miniaturisés tels que des puces avec des antigènes viraux. Ces systèmes présentent un avantage majeur : une meilleure détermination avec multiples informations détaillées (Yuk et al., 2004a; Zhang et al., 2005).

Des méthodes sérologiques ont été proposées pour distinguer les différents géotypes ou types, ces tests sont désignés par le terme de « sérotypage ». Ces méthodes utilisent des antigènes sous forme de séquences peptidiques spécifiques de type ou de sous-type du virus. Actuellement, les antigènes mis en place pour le sérotypage correspondent à des séquences de la protéine non-structurale NS4 (Bhattacharjee et al., 1995). Les inconvénients de ce test actuel sont, outre les possibilités de réactions croisées, l'absence de distinction de certains sous-types, en particulier 1a et 1b, et la mauvaise reconnaissance des infections mixtes. Les avantages du sérotypage sont un moindre coût par rapport aux techniques de géotypage, sa plus grande facilité de réalisation technique et la possibilité d'identifier les types et sous-types du VHC chez des sujets non virémiques ou ayant une virémie faible.

A côté de la sérologie, la détection de l'ARN viral par PCR reste un élément primordial pour le diagnostic précoce du VHC (ARN positif 1 à 2 semaines après contamination). Un paramètre important dans le diagnostic du VHC est la détermination de la virémie ou charge virale plasmatique, celle-ci est réalisée par PCR quantitative. Ainsi, ce test reflète directement le degré de répllication virale et permet de différencier une hépatite active d'une hépatite ancienne ou en voie de guérison. Il constitue un test de choix pour le suivi des patients traités.

Comme l'hépatite virale provoque des lésions au niveau du foie, le degré de l'activité virale peut être évalué après examen histologique de biopsies hépatiques. L'histologie est nécessaire dans le diagnostic des hépatites chroniques car elle permet une classification des hépatites chroniques selon un score. Les cliniciens utilisent deux scores pour évaluer la gravité de l'hépatite : le score de Knodell qui prend en compte la nécrose parcellaire, la nécrose lobulaire et la fibrose, et le score Métavir actuellement le plus utilisé car il permet de faire un bilan lésionnel en tenant compte séparément de l'activité de l'hépatite et de la fibrose. L'évaluation de la sévérité des lésions hépatiques basée sur des tests biochimiques est nécessaire pour compléter le tableau clinique (dosage des transaminases et de certains marqueurs de fibrose tels que l'alpha2-macroglobuline, haptoglobine, bilirubine T ...).

## **IX- Traitement de la maladie et vaccination**

Le traitement de base de l'hépatite chronique repose sur l'association de ribavirine, un analogue antiviral de la guanosine et l'INF- $\alpha$ , une cytokine naturellement produite par les leucocytes et qui est connue pour son action répressive de la réplication virale au niveau cellulaire (Hui et al., 2003). Depuis peu, une nouvelle forme de l'interféron « interféron pégylé » a été conçue en associant du polyéthylène glycol (PEG) à l' INF- $\alpha$  (Jessner et al., 2003). Cette forme permet une meilleure adsorption de l'interféron sur les cellules et une augmentation de sa demi-vie par relâchement progressif. L'efficacité du traitement est liée au diagnostic précoce de l'hépatite chronique et du génotype.

Il n'existe actuellement aucun vaccin disponible afin de prévenir une hépatite par le VHC et le seul modèle animal est le chimpanzé. Cet animal est un modèle attrayant pour l'étude des mécanismes de lutte contre le VHC puisque environ 60 % des singes infectés éliminent naturellement le virus (Bigger et al., 2001). De nouvelles stratégies vaccinales/thérapeutiques sont en cours de développement. Elles visent à inhiber soit la réplication virale par siRNA (Sen et al., 2003; Wilson et al., 2003) soit l'activité des protéines virales.

## **Chapitre 2 : Résultats**

## Objectif

Ce chapitre regroupe les principaux résultats obtenus au cours de ma thèse et qui ont fait l'objet de 4 publications présentées dans ce manuscrit. Mon projet principal a porté sur le développement de puces à peptides allant de la conception jusqu'aux applications. J'ai également eu l'opportunité de travailler sur le développement des puces à protéines, projet initié par les travaux de Ludivine Grosjean au sein de l'équipe de T. Livache (DRFMC-CEA-Grenoble).

Le projet consiste à appliquer la technologie développée pour les puces MICAM (puce à ADN = approche génomique) à la conception des puces à protéines/peptides (approche protéomique). La technologie utilisée est basée sur l'immobilisation des biomolécules en présence de polymères conducteurs (polypyrrole). Les puces réalisées seront analysées par microscopie de fluorescence et imagerie SPR, méthode en cours de développement au sein de l'équipe de T. Livache.

Trois phases sont nécessaires au le déroulement du projet :

- la première est une phase d'élaboration des puces : cette partie englobe les essais de modification des biomolécules (protéines et peptides) et d'immobilisation sur des supports adaptée à la méthode de détection utilisée, le but final de cette phase étant de déterminer les conditions optimales pour la chimie du couplage et la fixation sur le support.
- la deuxième est une phase de caractérisation du système (sensibilité, spécificité, performance) en se basant sur des modèles d'interactions simples et connus : cette partie concerne les expériences de mise au point sur la puce par des analyses avec la méthode de référence (la fluorescence) et la méthode utilisée au cours de cette thèse (imagerie SPR) pour déterminer les conditions optimales d'utilisation de la puce selon le modèle utilisé (possibilité de régénération et fréquence d'utilisation).
- la troisième est une phase de validation du système en l'appliquant à plusieurs études touchant différents domaines : les puces à protéines ont été utilisées dans le cadre d'une recherche fondamentale et les puces à peptides dans une application clinique.

## **Article 1**

### **A polypyrrole protein microarray for antibody–antigen interaction studies using a label-free detection process**

Ludivine Grosjean, Boutheina Cherif, Emilie Mercey, André Roget, Yves Levy,  
Patrice Noel Marche, Marie-Bernadette Villiers, Thierry Livache

*Analytical Biochemistry*, **2005**, (347) 193-200.

## Commentaire sur l'article 1

Le concept des biopuces repose sur la construction d'une matrice de plusieurs molécules biologiques sur un système miniaturisé comprenant une surface, structurée ou non, en plastique, en verre ou en métal. La construction nécessite l'immobilisation de molécules biologiques (appelées couramment sondes) selon une chimie de surface adaptée, de manière à conserver leurs fonctions une fois fixées. La surface ainsi fonctionnalisée doit réagir efficacement et spécifiquement avec la cible, ce qui implique une limitation des interactions non spécifiques. De plus, la réutilisation de la puce pour analyser plusieurs échantillons est un avantage qui dépend de la possibilité de régénérer sa surface sans affecter la reconnaissance biologique. Il faut donc maîtriser l'immobilisation de la sonde qui est fonction essentiellement de la chimie de fixation et sa densité sur le spot pour limiter les encombrements stériques et favoriser l'accessibilité des sites d'interaction. Généralement, il y a un élément intermédiaire entre la surface de la puce et la sonde (bras espaceur ou protéine inerte) ; celui-ci doit être neutre vis-à-vis de la nature des interactions à étudier et n'entraîner perturber les sites de reconnaissance biologique.

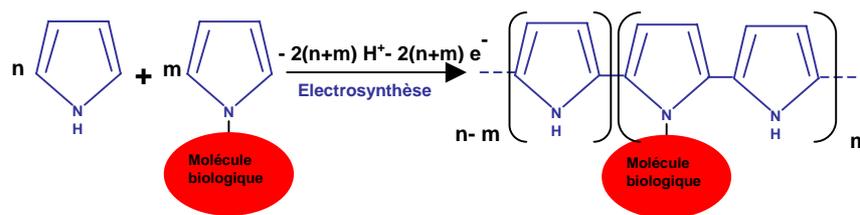
L'objectif de l'étude présentée dans cet article est de développer une puce à protéines pour étudier des interactions protéines-protéines par imagerie SPR. La réalisation de la puce est basée sur la chimie des polymères conducteurs. La technique consiste à déposer par électrocopolymérisation (électrospotting) différentes protéines à immobiliser sur une surface d'or (prisme ou lame dorés). L'immobilisation des protéines met en jeu les propriétés électrochimiques du pyrrole par un procédé développé initialement par l'équipe de T. Livache (Livache et al., 1994) pour les puces MICAM (puce à ADN) (Livache et al., 1998a). Cette publication décrit les différentes étapes d'obtention et de caractérisation de la puce en utilisant différents modèles biologiques.

### **1- L'électrosynthèse du polymère de pyrrole**

Les polymères conducteurs présentent des propriétés électriques intéressantes. Ils sont formés par oxydation chimique ou électrique de monomères aromatiques tels que l'aniline, le thiophène ou le pyrrole. Le procédé d'immobilisation développé par l'équipe de T. Livache

est basé sur l'électropolymérisation de monomères de pyrrole modifiés ou non avec la molécule sonde à immobiliser. Pour réaliser la synthèse du film de polypyrrole, les positions (2) et (5) du cycle aromatique doivent être libres puisque ces deux positions seront engagées dans l'oxydation pour former le polymère ; ainsi, les molécules de pyrrole doivent être modifiées en position (1) ou (3) (figure 2.1).

La synthèse du polypyrrole par électropolymérisation est effectuée par application d'un potentiel dans la solution contenant les monomères de pyrrole. Ce potentiel est appliqué entre deux électrodes : la contre électrode (fil de platine), polarisée négativement, permet la réduction de l'eau, donc le dégagement d'hydrogène, et l'électrode de travail (surface en or), polarisée positivement, permet l'oxydation et la polymérisation du pyrrole. Celle-ci est obtenue en présence d'un anion qui assure la conduction et le dopage du pyrrole. La réaction de polymérisation est la suivante :



**Figure 2.1.** Principe de polymérisation du pyrrole.

## 2- Fabrication de la puce

L'équipe de T. Livache a développé un système qui permet de réaliser une matrice portant un grand nombre de spots à sa surface. Ce système consiste en une cellule électrochimique mobile dans les trois axes de l'espace, constituée d'un cône de micropipette contenant un fil en platine (contre électrode) mis en contact avec la solution de greffage. L'espace correspondant au spot sur la surface est déterminé par la microgoutte du ménisque de liquide formé au bout du cône. 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 court (entre 100 et 500 ms) est générée par le potentiostat et permet la copolymérisation. Une fois l'impulsion achevée, le cône est déplacé pour le rinçage et le remplissage avec la deuxième solution à copolymériser. La pipette qui porte le cône (cellule électrochimique) est montée sur un support dirigé par trois moteurs permettant un positionnement micrométrique dans les trois

directions et pilotés par le logiciel Polypotter (équipe de T. Livache). Ainsi, la puce est construite après (n) copolymérisations successives (Cf figure 1 de l'article 1).

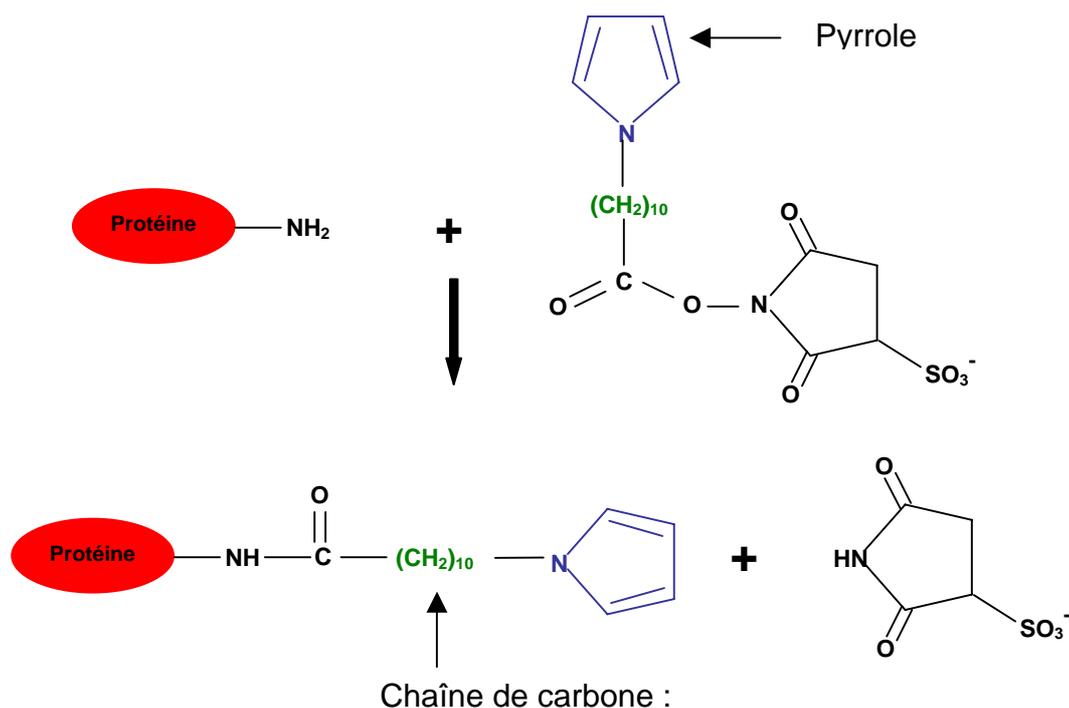
Avec ce système, les spots ont une taille comprise entre 400-600  $\mu\text{m}$  et l'épaisseur du film peut être estimée selon la relation suivante (Livache et al., 1998b):

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

avec  $l$  : l'épaisseur du polymère (mètres),  $M$  : la masse molaire du pyrrole (0,067 kg/mol),  $Q$  : la charge de synthèse du polymère (Coulombs),  $A$  : l'aire de l'électrode (mètre carré),  $F$  : la constante de Faraday ( $9,64 \times 10^4 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) et  $\rho$  : la masse volumique du polypyrrole (1580 kg/m<sup>3</sup>). Par exemple, pour un spot ayant une taille de 500 $\mu\text{m}$  et une charge d'électropolymérisation de 20 $\mu\text{C}$ , l'épaisseur du film de polypyrrole est de 5nm.

### 3- Couplage des protéines au pyrrole

Pour immobiliser les protéines sur le support, celles-ci doivent être fonctionnalisées avec le pyrrole. Le couplage protéine-pyrrole nécessite la modification de l'un de ces partenaires ou des deux par des fonctions chimiques assurant une liaison covalente entre le pyrrole et la protéine. Dans notre étude, le couplage est réalisé avec des esters activés du pyrrole: le pyrrolyl undécanoate de sulfo N-hydroxysuccinimide ou le pyrrolyl caproate de N-hydroxysuccinimide, qui sont synthétisés par l'équipe de T. Livache. Ainsi, le couplage protéine-pyrrole se fait par établissement d'une liaison amide entre les  $\text{NH}_2$  primaires de la protéine et l'ester-NHS (figure 2.2).



**Figure 2.2.** Principe de couplage des protéines au pyrrole réactif (undécanoate de sulfo N-hydroxysuccinimide).

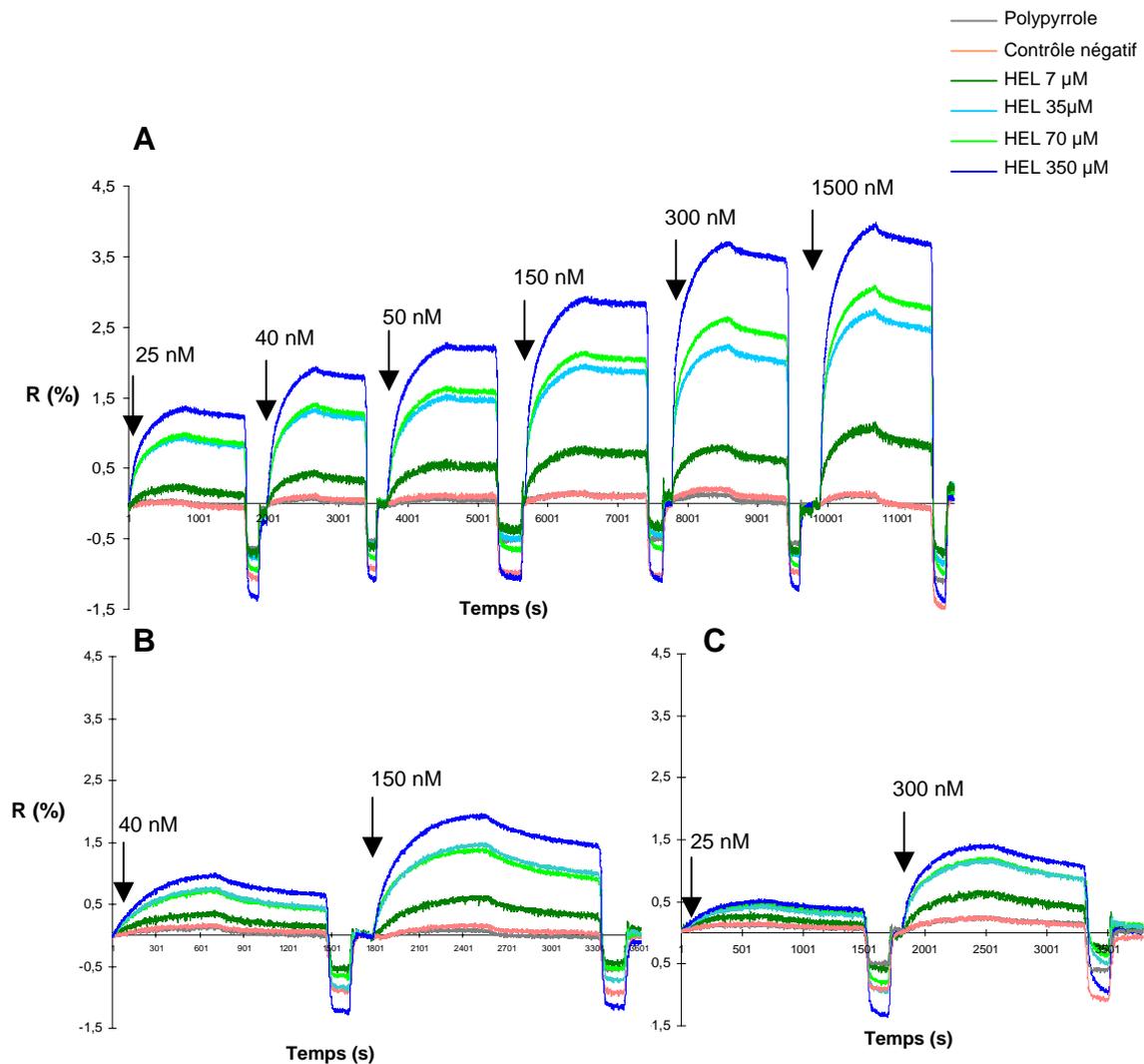
#### 4- Mise au point de la puce et caractérisation des interactions protéines-protéines sur la puce

Dans cette étude nous avons choisi de mettre au point le système en prenant comme modèle l'interaction antigène/ anticorps : le lysozyme de blanc d'œuf de poule (HEL = Hen Egg Lysozyme) est utilisé comme Ag (molécule cible) et un Ac monoclonal anti-HEL (F10) comme molécule sonde, greffée sur la puce. Dans un premier temps, nous avons optimisé les conditions de greffage de l'anticorps F10 en étudiant l'influence de la concentration de la protéine dans la solution de greffage et du rapport NHS-pyrrole/ protéine (RMI = rapport molaire initial de couplage) lors de l'obtention des conjugués pyrrole-protéines. L'interaction F10-HEL a été analysée par fluorescence et par imagerie SPR : ces deux méthodes de détection donnent les mêmes résultats quant aux conditions optimales de greffage (RMI = 20 et concentration = 10  $\mu$ M). Nous avons démontré la spécificité du système et la corrélation entre le signal SPR et la concentration en protéine cible. De plus, nous avons montré l'efficacité de la puce après régénération ce qui permet sa réutilisation. Ces résultats ont été confirmés en utilisant un deuxième modèle avec l'hormone gonadotrophine chorionique

(hCG) comme Ag et une IgG monoclonale anti-hCG comme molécule cible. Dans ce cas, nous avons montré que nous pouvons amplifier le signal SPR par un deuxième Ac secondaire.

### **5- Analyse des paramètres cinétiques des interactions par imagerie SPR**

L'imagerie SPR est une méthode d'analyse en temps réel permettant la détermination des paramètres cinétiques. Nous avons étudié la possibilité de calculer ces paramètres à partir des courbes d'interactions enregistrées par imagerie SPR sur la puce. Pour cela, nous avons choisi le premier modèle décrit dans cette publication mais dans le sens inverse : HEL immobilisé sur la puce et différents Ac monoclonaux anti-HEL injectés. HEL a été couplé au pyrrole selon le protocole décrit dans l'article avec un RMI = 20 et greffée à différentes concentrations (7, 35, 70 et 350  $\mu$ M). Nous avons utilisé trois Ac monoclonaux anti-HEL (F10, D44-1 et D11-15) ayant des constantes d'affinité différentes connues et établies par un autre système (Tello et al., 1993). Les différentes cinétiques obtenues avec les Ac monoclonaux sont données dans la figure 2.3.



**Figure 2.3.** Analyse des anticorps monoclonaux anti-HEL F10 (A), D44-1 (B) et D11-15 (C) sur une puce greffée avec HEL à 7, 35, 70 et 350  $\mu\text{M}$ .

A partir de ces courbes cinétiques nous avons calculé le  $k_{\text{on}}$ ,  $k_{\text{off}}$  et  $R_{\text{eq}}$  (Cf chapitre 1, partie 3) avec le logiciel SPRi1000 (Génoptics).

### ➤ Analyse en cinétique

Pour appliquer les équations mentionnées dans le chapitre 1 (partie 3), nous avons supposé que le modèle de l'interaction HEL-anti-HEL suit le modèle de Langmuir. Nous avons calculé les paramètres des cinétiques sur les différents spots de HEL à l'exception du spot de concentration 7  $\mu\text{M}$  qui donne des signaux relativement faibles. Pour le calcul du  $k_{\text{on}}$  et du  $k_{\text{off}}$  nous avons choisi certaines conditions : le  $k_{\text{on}}$  est calculé pour des concentrations d'Ac non saturantes : ainsi pour F10 et D11-15 les concentrations supérieures à 100 nM ne

sont pas prises en compte. Tandis que le calcul du  $k_{off}$  est calculé sur des spots HEL à 35  $\mu\text{M}$  avec des concentrations d'Ac saturantes. Cette dernière condition est justifiée par le fait que  $k_{off}$  ne dépend pas de la concentration de l'Ac injecté et qu'il est plus correct de le déterminer à partir des cinétiques où les sites d'interactions sont tous occupés. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

	<b>F10</b>	<b>D44-1</b>	<b>D11-15</b>
$k_{ass} \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1} \times 10^{-9}$	0,0047 $\pm$ 0,0017	0,0012 $\pm$ 0,00036	0,0015 $\pm$ 0,0012
$k_{diss} \text{ min}^{-1}$	0,011 $\pm$ 0,004	0,088 $\pm$ 0,011	0,088 $\pm$ 0,004
$K_A \text{ (SPR)} \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$	42,72 $\pm$ 3,81	1,36 $\pm$ 0,32	1,7 $\pm$ 1,81
$K_A \text{ (littérature)} \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$	> 10	1,4	53

**Tableau 2.1.** Analyse des constantes d'affinité des Ac monoclonaux par imagerie SPR.

Par comparaison avec les valeurs publiées (Tello et al. 1993), les résultats montrent que :

- pour D44-1 :  $K_A \text{ (SPR)} = K_A \text{ (littérature)}$
- pour F10 :  $K_A \text{ (SPR)}$  est du même ordre que  $K_A \text{ (littérature)}$
- pour D11-15 :  $K_A \text{ (SPR)} \ll K_A \text{ (littérature)}$ .

#### ➤ Analyse à l'équilibre

Nous avons calculé  $R_{max}$  pour chaque Ac sur les 3 spots de HEL (35, 70 et 350  $\mu\text{M}$ ) selon les équations mentionnées dans le chapitre 1, partie 3. Les résultats montrent que  $R_{max}$  augmente avec la concentration de HEL et que le  $R_{max}$  de D11-15 est plus faible que celui de D44-1 et F10 (figure 2.4).

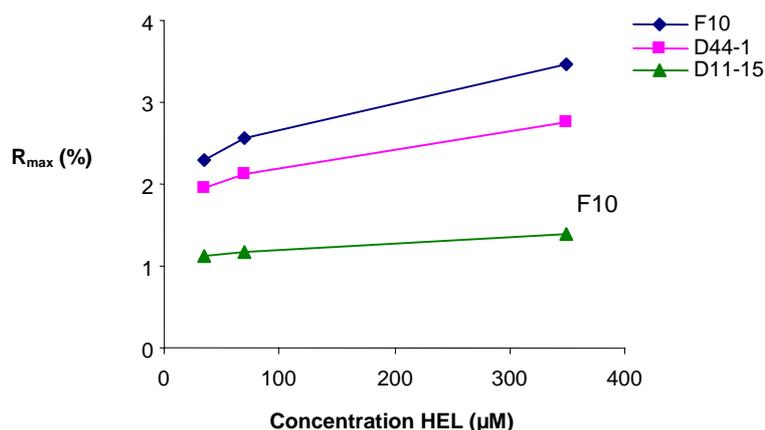


Figure 2.4. Variation du  $R_{\text{max}}$  en fonction de la concentration de HEL greffée.

Cette étude quantitative est préliminaire nécessitant d'être approfondie, néanmoins l'analyse de la dynamique de l'interaction des Ac monoclonaux en cinétique ou à l'équilibre montre que le système permet une bonne détermination du  $K_A$  des Ac D44-1 et F10, mais il présente une limite pour l'Ac D11-15 ; nous discuterons ces résultats dans le chapitre 3.

En conclusion, nous avons pu réaliser une puce à protéines basée sur l'immobilisation des molécules par électrocopolymérisation. Nous avons démontré, à travers les différents modèles biologiques utilisés, la spécificité de la mesure d'interaction par fluorescence et imagerie SPR, et la validité de la puce après sa régénération. En fin, le système nous a permis de déterminer les constantes d'équilibre.

### Article 1 :

[http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6W9V-4HB5NFJ-1&\\_coverDate=12%2F15%2F2005&\\_alid=403549801&\\_rdoc=1&\\_fmt=&\\_orig=search&\\_qd=1&\\_cdi=6692&\\_sort=d&view=c&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=447dd26720552712a19397a90ad5225d](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6W9V-4HB5NFJ-1&_coverDate=12%2F15%2F2005&_alid=403549801&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_qd=1&_cdi=6692&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=447dd26720552712a19397a90ad5225d)

## **Article 2**

### **Immunomodulatory properties of Morbillivirus nucleoproteins**

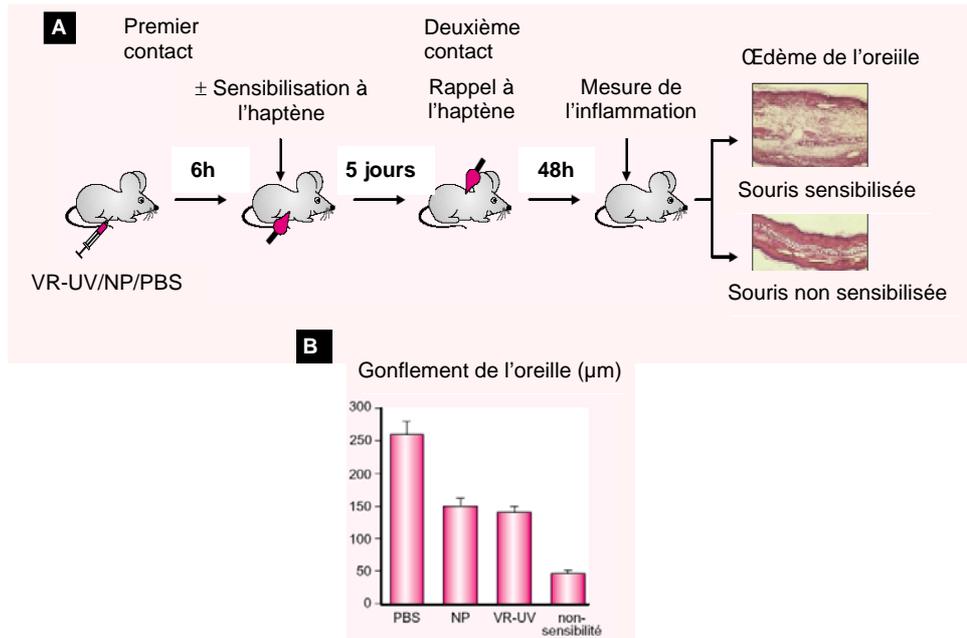
Yann M. Kerdiles, Boutheina Cherif, Julien C. Marie, Nicolas Tremillon, Bariza Blanquier, Geneviève Libeau, Adama Diallo, Fabian T. Wild, Marie-Bernadette Villiers and Branka Horvat

*Viral Immunology* : **article sous presse.**

## Commentaire sur l'article 2

L'agent étiologique de la rougeole est un virus enveloppé, du genre *Morbillivirus*, dont le génome est un ARN monocaténaire négatif. La nucléocapside est formée du génome viral protégé par la nucléoprotéine (NP) et des protéines P et L impliquées dans la transcription du virus. Il est connu depuis longtemps que les virus du genre *Morbillivirus*, notamment ceux de la rougeole (Measles virus = MV) et de la maladie de Carré induisent un état d'immunosuppression transitoire chez l'hôte naturel, l'homme et les canidés (chien, furet) respectivement. Cette immunosuppression a été observée même après vaccination contre la rougeole. Certains travaux, notamment avec le virus de la rougeole, ont permis de comprendre quelques mécanismes régissant les effets immunosuppresseurs des *Morbillivirus*. En effet, il a été démontré par des études *in vitro*, que les *Morbillivirus* inhibent la prolifération des leucocytes (Heaney et al., 2002) par l'intermédiaire de la nucléoprotéine virale qui interagit avec la surface des cellules (Schlender et al., 1996).

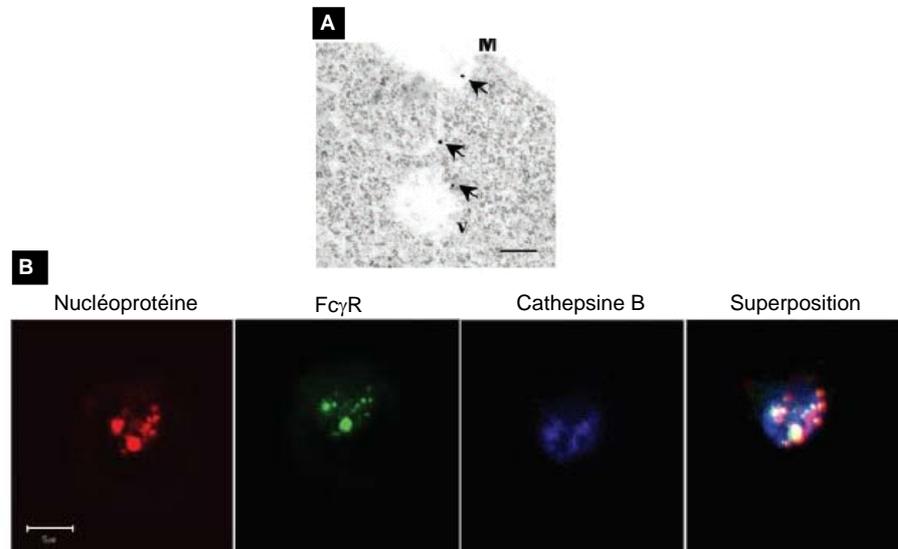
L'équipe de B. Horvat a développé un modèle animal afin d'étudier *in vivo* l'effet immunosuppresseur des *Morbillivirus* (figure 2.5). Ce modèle repose sur deux types de réactions inflammatoires : l'hypersensibilité retardée à l'hémocyanine de patelle (KLH = Keyhole Limpet Hemocyanin) et l'hypersensibilité de contact induite par exposition cutanée à un haptène (dinitrofluorobenzène = DNFB). Il a permis de montrer que la réplication virale n'est pas nécessaire à l'induction de l'immunosuppression et que celle-ci dépend de l'interaction des protéines de l'enveloppe et de la nucléoprotéine avec leurs récepteurs cellulaires respectifs (Marie et al., 2001).



**Figure 2.5.** (A) Protocole expérimentale de l'étude *in vivo* de l'effet immunosuppresseur des protéines du virus de la rougeole sur l'hypersensibilité de contact aux haptènes ; VR-UV : virus de la rougeole inactivé par les UV, NP : nucléoprotéine. (B) Diminution de la réponse inflammatoire par le virus de la rougeole et la NP.

Il reste à définir la voie et les mécanismes mis en jeu pour comprendre cet effet d'inhibition de la réponse immune. Pour cela, des études *in vitro* et *in vivo* ont été menées avec des NP recombinantes. Ainsi, Ravel et ses collaborateurs ont montré par des expériences en cytométrie en flux que la NP du virus de la rougeole se fixe sur les LB humains et murins (Ravel et al., 1997). Cette interaction met en jeu un récepteur cellulaire exprimé par les LB : le récepteur Fcγ (FcγR) de type II (appelé aussi CD32) qui reconnaît spécifiquement certaines immunoglobulines G. Cette observation est confirmée par l'absence de fixation de la NP par des lignées cellulaires déficientes en ce récepteur et par des études *in vivo* utilisant des souris transgéniques déficientes en CD32 (FcRγ<sup>-/-</sup>) : l'injection de la NP à ces animaux n'induit pas de diminution de la réaction inflammatoire lors des tests d'hypersensibilité.

L'interaction entre NP et CD32 a été également observée à l'intérieur de cellules infectées par le MV ; cette interaction, qui a lieu dans des endosomes, permet le transport et/ou la sécrétion de la NP à la surface des cellules infectées (figure 2.6).



**Figure 2.6.** (A) Localisation de la NP dans le cytoplasme et au niveau membranaire des cellules infectées, image par microscopie électronique. (B) Colocalisation de la NP et du CD32 en intracellulaire au niveau des endosomes et à la surface des cellules infectées, image par microscopie confocale. (D'après (Marie et al., 2004)).

Ainsi, ces observations suggèrent fortement que l'effet immunosuppresseur observé lors des infections par le virus de la rougeole est du, au moins en partie, à la NP *via* son interaction avec le CD32 (Marie et al., 2004). La question posée dans cet article est la suivante : est-ce que l'interaction NP-CD32 est partagée par différents virus du genre *Morbillivirus*, constituant un mécanisme commun de modulation de la réponse immune ? Outre le virus de la rougeole, trois autres virus ont été analysés : PPRV (Peste-des Petits-Ruminants Virus), CDV (Canine Distemper Virus) et RPV (Rinderpest Virus). Un cinquième virus, le NiV (Nippha Virus), du genre *Henipavirus* a été également étudié : malgré une homologie de 44% de sa NP avec celle du MV, ce virus n'induit pas d'immunospression *in vivo*.

Notre contribution à ce travail a été l'étude de l'interaction entre les nucléoprotéines des différents virus (MV, VDV, PPRV, RPV et NiV) et le CD32. Les NP utilisées comme molécules sondes, ont été immobilisées sur un prisme doré selon la procédure

d'électrospotting que nous avons déjà développée et mise au point (Article 1). Le CD32 recombinant soluble a été injecté sur la puce et les interactions CD32-NP ont été analysées par imagerie SPR. Nos expériences ont montré qu'il y a une reconnaissance spécifique du CD32 par les NP des virus du genre *Morbillivirus* (MV, CDV RPV et PPRV) mais pas du genre *Henipavirus* (NiV) par rapport à une nucléoprotéine contrôle (la protéine core du virus de l'hépatite C) qui ne fixe pas le CD32. Les résultats montrent que la NP-MV présente la meilleure interaction avec le CD32, résultat attendu car nous avons utilisé dans nos expériences du CD32 humain et le MV est le seul, parmi les virus testés, à infecter l'homme. C'est la NP-RPV qui présente l'interaction la plus faible avec CD32 ( $\Delta R < 0,5\%$ ).

En conclusion, nous avons pu étudier par imagerie SPR l'interaction NP-CD32. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus par l'équipe de B. Horvat par des expériences en cytométrie en flux et qui mettent en évidence une fixation des NP sur les LB, dépendante de CD32. Cette étude permet d'obtenir des courbes de cinétiques à partir desquelles nous pourrions déterminer les caractéristiques de la dynamique de cette interaction (analyse actuellement en cours).

# IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF MORBILLIVIRUS NUCLEOPROTEINS

Yann M. Kerdiles<sup>1</sup>, Boutheina Cherif<sup>2</sup>, Julien C. Marie<sup>1</sup>, Nicolas Tremillon<sup>1</sup>, Bariza Blanquier<sup>1</sup>, Geneviève Libeau<sup>3</sup>, Adama Diallo<sup>3,4</sup>, T. Fabian Wild<sup>1</sup>, Marie-Bernadette Villiers<sup>2</sup> and Branka Horvat<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U404, Université Claude Bernard Lyon, IFR128 BioScience Lyon-Gerland, Lyon, 69365, France

<sup>2</sup>INSERM U548, Laboratoire d'Immunochimie, Université J. Fourier,CEA-G/DRDC, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

<sup>3</sup>CIRAD/EMVT, Programme Santé Animale, TA 30/G, Montpellier 34398, France

<sup>4</sup>Present address: Animal Production Unit, FAO/EA Agriculture and Biotechnology Laboratory, IAEA Laboratories, Vienna, Austria

Corresponding author: Branka Horvat, INSERM U404, 21 Avenue Tony Garnier, 69007, Lyon, France. Phone: 33 4 37 28 24 56. Fax: 33 4 37 28 23 91. e-mail: horvat@cervi-lyon.inserm.fr

## **Abstract**

Morbillivirus infections have been known for a long time to be associated with an acute immunosuppression in their natural hosts. Here, we show that recombinant Morbillivirus nucleoproteins from Canine Distemper virus, Peste-des-petits-ruminants virus and Rinderpest virus bind B-lymphocytes from dogs, goats and cattle, respectively, similarly to measles virus nucleoprotein in humans. The use of surface plasmon resonance imaging allowed the real time detection of differential interactions between Morbillivirus nucleoproteins and Fc $\gamma$ RIIb (CD32). Moreover, those nucleoproteins which bind murine Fc $\gamma$  receptor inhibited the inflammatory immune responses in mice in a Fc receptor-dependent manner. In contrast, nucleoprotein from closely related Henipavirus genus, belonging to the *Paramyxoviridae* family as Morbillivirus, was devoid of capacity either to bind Fc $\gamma$ RIIb or to inhibit inflammatory response. Altogether, these results suggest that nucleoprotein-FcR interaction is a common mechanism used by different Morbilliviruses to modulate the immune response.

## Introduction

The *Morbillivirus* genus includes highly contagious pathogens that cause severe diseases in humans and animals. The best-characterized members of these enveloped, non-segmented, negative-strand RNA viruses are Measles virus (MV), Canine Distemper virus (CDV), Pestedes- petits-ruminants virus (PPRV) and Rinderpest virus (RPV). MV is responsible for an acute childhood disease, which is widespread in developing countries, with sporadic outbreaks in industrialized countries despite vaccination. CDV causes fatal disease in many species of carnivores, while RPV can cause disease to all animals species of the *Artiodactyls* order. PPRV is mainly a pathogen of domestic and wild small ruminants and it constitutes the main constraints to sheep and goat productions in countries where it is endemic (2).

The common characteristic of the Morbillivirus infection is the development of an acute immunosuppression (18). In the case of the most analyzed Morbillivirus MV, the profound immunosuppression lasts for weeks after the primary infection leading to increased susceptibility to opportunistic infections and causing around 1 million infant deaths a year (38). The immune abnormalities associated with measles are mainly related to the cellular arm of the immune response (6) and include the ablation of the delayed-type hypersensitivity responses (43, 45), impaired proliferation of peripheral blood lymphocytes (21) and allospecific cytotoxicity (15). Moreover, many of the immunological alterations observed during natural measles also occur after vaccination with the attenuated MV (14, 23). CDV infection is also associated with shortand long-term immunosuppression, leading to secondary infections (27). CDV infection suppressed the inflammatory delayed-type skin reaction and antigen-induced proliferation of lymphocytes in dogs (47). PPRV infection induces a lung infection often followed by secondary bacterial infections, diarrhea and death in 50 to 80% of acute cases (30). RPV infection is followed by lymphodepletion in different lymphoid tissues (46) and vaccination of cattle with attenuated RPV reduced mitogen-induced responses of leukocytes (35) suggesting the immunosuppressive nature of RPV infection. Finally, infection with the lapinized RPV strain suppressed both antibody production and delayed-type hypersensitivity to tuberculin in rabbits (48).

Although only a small proportion of peripheral blood cells is infected with MV (13) the immunosuppression can last for weeks, suggesting that it could be induced, similarly to HIV infection, by an indirect immunopathogenic mechanism. Several recent studies are in agreement with this hypothesis, suggesting that *Morbillivirus* proteins could inhibit the

immune response in the absence of viral replication *in vitro* (20, 39, 41) as well as *in vivo* {(36) and reviewed in (26)}. It has been demonstrated that MV nucleoprotein (N) binds to Fc gamma receptor for IgG type II (FcγRII/CD32) and that recombinant N inhibits antibody production by human B cells *in vitro* (39). In addition, MV-N reduces hypersensitivity responses in mice, causing an impairing of the function of dendritic cells and the loss of antigen-specific T-cell proliferation (36). As N produced during the viral infection is a cytosolic protein, it needs to leave an infected cell to produce the immunosuppressive effect. Recently, we have demonstrated that cell surface delivery of MV-N by FcγR-expressing infected cells presents a new viral strategy to induce an immunosuppression (37). Comparison of nucleic acid and protein sequences of different Morbillivirus nucleoproteins has shown a high homology between them (11). In this paper we have analyzed whether N-FcγR interaction is shared within different Morbilliviruses as a common mechanism to modulate immune response.

## **Materials and methods**

**Cloning, production and purification of recombinant Morbillivirus N and Nipah virus N.** Recombinant nucleoproteins from MV, CDV, PPRV, RPV and Nipah virus (NiV) were produced using the baculovirus expression system. MV-N cDNA of the Hallé strain was obtained from pHMG-NP vector (3) and CDV-N cDNA of Onderstepoort strain was obtained from pEMC-N vector (16). NiV-N cDNA was cloned in pDrive cloning vector. All three constructions were then inserted into pAcHLT baculovirus transfer vectors (Pharmingen), containing his-tag, and recombinants baculoviruses were generated in Sf9 insect cell line, according to manufacture's instructions. The N cDNA from the vaccine strain of PPRV Nigeria 75/1 (11) and from the RGK1 strain of RPV, were amplified by RT-PCR from infected Vero cells and cloned into pAcYM1 and pBacPAK9 transfer vectors, respectively. Recombinant baculoviruses were generated in Sf9 insect cell line, by homologous recombination as described (32). Recombinant proteins, MV-N, CDV-N, PPRV-N, RPV-N and NiV-N were further generated in either Sf9 or H5 insect cell lines after infection with the corresponding baculovirus. Nucleocapsid formation in infected insect cells allowed the purification of recombinant N on CsCl gradients, as described (39). Recombinant NiV-N was alternatively purified using 10-60% sucrose gradient centrifugation at 250 000g for 6h, as described previously (44).

**SDS page and Western blot analysis.** Recombinant nucleoproteins were analyzed by 10% SDS-PAGE. Gels were either stained with Coomassie brilliant blue R-250 or transferred to Immobilon-P™ membranes (Millipore). Membranes were then blocked using 5% dried milk in TBS-T (20 mM Tris, pH 7.6, 130 mM NaCl, 0.1% Tween-20) and then incubated over-night at 4°C with Morbillivirus N-specific mAb 33-4 (31) or anti His-tag mAb (BD Bioscience Clontech). Immunoreactive bands were visualized by using secondary rabbit-anti mouse Cy5 Ab (Amersham) and fluorescence was analyzed on Typhoon 8600 (Molecular Dynamics).

**Cell purification and culture.** Peripheral blood lymphocytes (PBLs) were purified from blood of either human healthy donors, dogs, cattle or goats by Ficoll gradient centrifugation. Murine B lymphoma cell line IIA1.6, a FcγRII-negative variant of mouse A20/2J B lymphoma (24) and its murine FcγRIIb1 transfectant (1), P815-N, murine mastocytoma transfected with MV-N, or P815-CDV, persistently infected P815 cells with CDV Onderstepoort strain (42), were cultured in RPMI or DMEM medium (Invitrogen Inc.) supplemented with 10% FCS, 10mM HEPES, 2mM glutamine,  $5 \times 10^{-5}$  M 2β-ME, and 50μg/ml of gentamicin at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

**Flow cytometry.** For the detection of N binding  $5 \times 10^5$  cells were incubated for 1h at 4°C with Morbillivirus N (10μg) in 100μl of PBS, 1%BSA, 0.1%NaN<sub>3</sub>. Cells were then washed and N binding was detected with either biotinylated mAb anti-MV-N (Cl.25) (8), anti-CDV-N (C-5), anti-RPV-N (IV.B2), or anti-PPRV-N (38.4) (31), followed by staining with either FITC or PE conjugated streptavidin (SA). Human, dog, goat and cattle B and T lymphocytes were gated using specific antibodies: anti-human-CD3-FITC (Dako), anti-human-CD19-FITC (Dako), anti-goat CD2 and anti-goat-Ig (provided by Dr. Y. Chebloune, France), anti-CD21-FITC, anticanine- CD4-FITC, anti-canine-CD8 and anti-canine-CD5, (provided by Dr. D. Rigal, France) followed by anti-rat-Ig-FITC. Membrane expression of Morbillivirus N was analyzed after saturation of Fcγ receptors by incubation of nonpermeabilized cells with supernatant containing anti-FcR mAb 2.4G2 for 15 min, followed by staining with either biotinylated mAb anti-MV-N (Cl.120) or anti-CDV-N (C-5), and PE-SA. Anti-mouse Bcl-2-PE mAb and hamster IgG-PE isotype control (BD Pharmingen) were used to control plasma membrane integrity. Flow cytometric analysis was carried out on FACScan (Becton-Dickinson).

**Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi).** Chip slides were provided by Genoptics (Orsay, France) in the form of prisms coated with a 50 nm thick gold layer on the surface and NHS-pyrrole was obtained according to the described protocol (34). Briefly, proteins (25 μM) were conjugated to NHS-activated pyrrole at 1:20 molar ratio in phosphate-buffered saline (PBS = NaCl 137mM, KCl 3mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM, pH 7.2) for 30 min at room temperature then for 4 hours at 4°C and were stored at -20°C. Hepatitis C virus core protein (kindly provided by Dr. Paranhos-Baccalà UMR 2714 CNRS-Biomérieux, France) was used as a control protein. Immobilization of proteins was carried out by an

electrochemical polymerization process (electro-spotting) as described previously (19). Briefly, electro-spotting was achieved in phosphate buffer (50 mM) pH 6.8 containing 20mM free pyrrole, 20  $\mu$ M pyrroled proteins and 10% glycerol. The protein chips were constructed by successive electro-directed copolymerisation of the different mixtures of pyrrole and pyrroled proteins using electrical pulse (2.4V for 250 ms). The slides were rinsed with PBS after the proteins spots synthesis, and stored at 4°C. CD32 (R&D Systems) binding assays were carried out in PBS at room temperature with a flow rate of 37.5  $\mu$ L min<sup>-1</sup>. The chip was initially saturated with PBS containing 1% BSA, then CD32 (1  $\mu$ M in PBS) was injected to the sensor surface for 15 min, the surface was rinsed with running buffer (PBS) for 15 min. After these association and dissociation phases, the chip was regenerated with a 0.1M Glycine solution, pH 2, for 5 min and washed again. SPRi signals were monitored using Surface Plasmon Resonance Imager (SPRi-PLEX, Genoptics, Orsay, France) and a dedicated software from Genoptics (Orsay, France).

**Mice.** C57BL/6 mice were purchased from IFFA CREDO (L'Arbresle, France). Gene targeted mice lacking FcR (Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup> x FcR $\gamma$ <sup>-/-</sup>, model 585-MM) were obtained from Taconic (USA). Experiments were done in the animal facility of ENS-Lyon, France, certified by French Agriculture and Research Government Department (authorization number A69035) and all *in vivo* protocols were certified by the Animal Care and Use Committee of ENS-Lyon.

**Contact hypersensitivity assay.** Contact hypersensitivity to dinitrofluorobenzene (DNFB) was determined as described (25). Briefly, DNFB was diluted in acetone: olive oil (4:1) before use and 25  $\mu$ l of 0.5% DNFB solution was applied to a shaved ventral skin (sensitization phase). After 5 days, mice received 10  $\mu$ l of a non-irritant concentration of DNFB applied on both sides of the right ear, and the solvent alone on the left ear (effector phase). Ear thickness was monitored before challenge and two days after challenge by a third experimenter 'blinded' to sample identity. The ear swelling was calculated as {(T-To) right ear} - {(T-To) left ear}, where T and To are ear thickness after and before challenge, respectively.

**Delayed type hypersensitivity (DTH) assay.** DTH response to keyhole limpet hemocyanin (KLH) was measured by a conventional footpad-swelling assay. Mice were sensitized by the subcutaneous injection of 300  $\mu$ g of KLH in 200  $\mu$ l PBS emulsified with complete Freund's adjuvant (CFA) (1:1, v/v). After 7 days mice were challenged by the

subcutaneous injection in the right hind footpad of 150  $\mu$ g of KLH in PBS. The left footpad was injected with PBS alone. Footpad thickness was measured before challenge and 24 after challenge by a second experimenter 'blinded' to sample identity. KLH-specific DTH was calculated using the same formula as for CHS.

**Statistical analysis.** Data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Statistic analyses were performed using Student's T tests.

## Results

**Recombinant Morbillivirus nucleoproteins bind B lymphocytes from their natural hosts.** Morbillivirus nucleocapsids are difficult to purify and are often degraded in mammalian cells (5). Our previous study demonstrated that recombinant and viral MV nucleocapsids have similar biochemical and antigenic characteristics (39). We therefore produced recombinant nucleoproteins from MV, CDV, PPRV and RPV using the baculovirus expression system. In addition, we produced a recombinant nucleoprotein from closely related Nipah virus, belonging to recently described Henipavirus genus of the Paramyxoviridae family and sharing 44% homology with MV-N (10). SDS-PAGE analysis of Morbilliviruses N (Fig. 1A) showed two molecular species around 60 KDa, similarly to what has been described with MV N (39), and both were recognized by Morbillivirus N-specific mAb 33.4 in a Western blot (Fig. 1B). The minor band most probably represents the cleavage product of the major one, being more abundant in cells harvested later. RPV-N migrated slightly slower than the other N, similar to what has been previously observed with N derived from RPV-infected cells (12). Finally, recombinant NiV-N showed a migration pattern very similar to Morbillivirus N (Fig. 1C) and was revealed in Western blot using anti-his tag Ab (Fig. 1D).

We next tested whether the recombinant Morbillivirus nucleoproteins could bind peripheral blood lymphocytes from their natural hosts. We therefore purified human, dog, goat and bovine lymphocytes and incubated them with the corresponding purified N, followed by the matching biotinylated anti-N mAbs (Fig. 2). All analyzed nucleoproteins bound B cells, but not T cells from their natural hosts. As B-lymphocytes, in contrast to T lymphocytes, express Fc $\gamma$ R, these data indicate that N from CDV, PPRV and RPV may bind Fc $\gamma$ R on their natural hosts, similarly to the MV-N.

**Binding of Morbillivirus nucleoproteins to Fc $\gamma$  receptor.** As mammalian Fc $\gamma$ Rs were suggested to be conserved among species (22), we next tested whether CDV, PPRV and RPV-N could bind human Fc $\gamma$ RIIb (CD32) (Fig. 3). We used surface plasmon resonance imaging (SPRi) (9, 19) to analyze the interaction of Morbillivirus nucleoproteins with soluble human CD32. Recombinant nucleoproteins were immobilized to a chip and protein-protein interaction was analyzed after injection of a solution containing soluble CD32. These interactions induced a modification of the refractivity index near the chip surface, resulting in a change of reflectivity. All Morbillivirus N proteins tested showed the modification of SPRi

signal but at different level, depending on the origin of N, while NiV-N did not show interaction with CD32. These results demonstrated the capacity of Morbillivirus N, but not NiV-N, to interact with human FcγRIIb, although the affinity of interaction was different, being highest for MV-N and lowest for RPV-N.

These results suggested that Morbillivirus N could interact with FcγRII of animal species different from the natural virus host, probably due to the high homology among mammalian Fcγ receptors. We thus extended our studies by analyzing binding capacity of these proteins to murine FcγRIIb, in order to further test their immunomodulatory properties in a murine model. The murine FcγR negative B lymphoma cell line IIA1.6 and its murine FcγRIIb1 transfectant were incubated with different Morbillivirus N (Fig. 4). None of the different N bound to IIA1.6 cells. However, CDV, PPRV and MV-N bound to FcγRIIb1 transfectant, demonstrating the ability of these three different Morbillivirus nucleoproteins to interact with murine FcγRII. The affinity of interaction between RPV-N and murine FcγRIIb1 may be rather weak, similarly to human FcγRIIb1 (Fig. 3) and therefore insufficient to detect the binding in this system.

We have recently demonstrated that MV-N has a remarkable capacity to be exported to the surface of infected cells in association with FcγRII and contribute to the immunosuppressive effect seen during measles infection (37). We therefore analyzed whether this egress to cell membrane is shared with some of the other Morbillivirus N, notably CDV-N. Similarly to what we have observed in MV-infected cells (37) and N-transfected P815 cells, N is also detected on the surface of CDV-infected P815 cells (Fig. 5). Membrane integrity of CDV infected and transfected P815 cells was preserved, not allowing the entry of antibodies into cells, as demonstrated by the absence of staining for the intracellular Bcl-2 protein in non-permeabilized cells (Fig. 5), and therefore confirming that observed N-staining is at the surface level. These results suggest that intracellular traffic of Morbillivirus nucleoproteins may share some common features, allowing their export to the surface of infected cells.

**Morbillivirus nucleoproteins inhibit cellular immune responses.** We next tested whether morbillivirus nucleoproteins could modulate the immune responses in mice. As morbillivirus infection was reported to inhibit delayed type hypersensitivity (DTH) in their natural hosts (43, 48), we therefore used two types of T-cell dependent inflammatory reactions: DTH to KLH and contact hypersensitivity (CHS) induced by epicutaneous

exposure to the hapten DNFB, to analyze immune response in mice. While DTH is mediated by CD4<sup>+</sup> T cells (17), CHS is mediated by CD8<sup>+</sup> T cells (7, 25). Mice were injected with different Morbillivirus recombinant N and the generation of hypersensitivity responses were analyzed after a second contact with the sensibilizing agent (Fig. 6). Injection of 100µg of N was chosen, based on the previous dose-response experiments in mice, using MV-N (36). CDV, PPR- as well as MV-N, reduced the development of both DTH and CHS responses in C57BL/6 mice (Fig 6A, C). Moreover, the N-induced inhibition of DTH was as strong as the effect obtained with injection of 1mg of anti-inflammatory corticosteroid, dexamethasone (Fig. 6C). Despite the high homology among Morbillivirus N, RPV-N did not affect inflammatory response in mice. As this nucleoprotein did not show visible binding to murine FcγRII either, it represented a good internal control in these experiments, excluding a nonspecific binding of recombinant nucleoproteins and potential immunosuppressive role of a possible contaminant in the nucleoprotein preparation. Furthermore, NiV-N did not exert any immunomodulatory effect in mice either (data not shown). The lack of the immunosuppressive effect of RPV-N and NiV-N suggested the importance of FcγRII binding in the modulation cellular immune response. Finally, none of the N tested affected the generation of the inflammatory responses in FcR-deficient mice (Fig. 6B, D), demonstrating that the observed immunosuppressive effect in wild type mice is FcγR-dependant.

## Discussion

The mechanism of induction of immunosuppression during Morbillivirus infection has not been elucidated. Different viral proteins may play an important role in the MV infection in humans, following the interaction with their respective cellular receptors [reviewed in (26)]. Here, we analyzed whether Morbillivirus nucleoproteins may share a common characteristic with MV-N to bind FcγRII and induce the immunosuppressive effect. Our data demonstrate the interaction of Morbillivirus N with FcγRII. The extracellular region of human, murine and bovine FcγRII are highly homologous (22) and human anti-FcγRII mAbs recognize canine neutrophils (33), indicating that there is a high conservation of Fcγ receptors during evolution, which may allow N-FcγR interaction across the species. Although RPV-N bound to its host B lymphocytes (Fig. 2), it had very low affinity for human FcγRIIb1 (Fig. 3) and its binding to murine FcγRIIb1 was not detectable by flow cytometry (Fig. 4). These results suggest that the difference in the amino-acid sequence between this RPV-N and the other N tested could be responsible for the lack of binding to other FcγRs, whereas binding to cattle FcR may still be conserved. However, no interaction was observed between FcγRIIb1 and NiV-N, obtained from a distinct but closely related Paramyxovirus belonging to the recently described Henipavirus genus (10). Although NiV-N shares 44% of homology with MV-N and 46% of homology with CDV-N (10), significant differences in nucleocapsid morphology within *Paramyxoviridae*, have recently been described (4) and may account for the lack of interaction with FcγRII.

Recently, the existence of a second receptor for MV-N, different from the FcγR has been suggested (29). MV-N seems to bind to this putative receptor via its c-terminal part and modulate cell proliferation *in vitro* (28). Several short regions are conserved within c-terminal part of N and it is therefore possible that the different Morbillivirus N may use this second receptor as well. Moreover, this could explain some low level background staining of RPV-N to bovine T cells observed in the figure 2. However, the identity and the *in vivo* role of this second receptor for N remains to be elucidated.

During cytopathic viral infection Morbillivirus N or its fragments may be released in the extracellular environment and interact with FcγR on hematopoietic cells. We have recently demonstrated that intracellular newly synthesized MV-N enters into the late endocytic compartment, where it recruits its cellular ligand, the Fcγ receptor (37). N can then

reach the cell membrane and be expressed at the surface of infected leukocytes and/or be secreted in the extracellular compartment, allowing its interaction with the Fc $\gamma$  receptor on uninfected cells. Here, we show that N from CDV could also be exported on the surface of infected cells (Fig. 5). As FcR has an important immunoregulatory role (40), its engagement by N during Morbillivirus infection may be responsible for at least part of the immunosuppressive effects associated to this infection and cumulative to the effects of the other viral proteins (20). Results from our previous studies suggested that MV-N interaction with dendritic cells, expressing FcR, causes the inhibition of IL-12 production and induces the inhibition of inflammatory responses (36), (37). Data presented in this study strongly suggest that a similar mechanism may be implicated in the other Morbillivirus infections, leading to the suppression of immune responses. Altogether, these data suggest that the interaction of Morbillivirus nucleoproteins with host FcR may be conserved within a genus, playing a role in viral pathogenesis.

Future studies are needed to identify the sequences within N, responsible for binding Fc $\gamma$ R and allow the development of specific inhibitors of this interaction, opening new possibilities for the intervention during Morbillivirus pathogenesis. Finally, as Morbillivirus nucleoproteins could bind human Fc $\gamma$ RIIb, additional analysis of the immunomodulatory role of these proteins and their fragments may open new avenues in the development of novel anti-inflammatory reagents.

### **Acknowledgments**

We are grateful to Drs. J.F. Nicolas, J. Kehren and C. Rabourdin-Combe for their help during the initiation of this work, to Drs. B. Rima, for the pEMC-N plasmid, C. Kai for anti-CDV-N mAb C-5, S. Amigorena, for IIA1.6-Fc $\gamma$ B1 cell line, Y. Chebloune and C. Bonfone for providing us with goat, cattle and dog lymphocytes and T and B specific mAbs and S. Souchon and L. Chihi for technical assistance. The helpful technical suggestions from M.C. Biéumont, H. Valentin and D. Laine are greatly appreciated. This work was supported in part by institutional grants from INSERM, FITT and MRT-Region Rhône Alpes, and grant N° 4450 from ARC (to BH). Y. Kerdiles is supported by the “Ligue National Contre le Cancer” and J.C. Marie is supported by HFSP.

## References

1. Amigorena, S., J. Salamero, J. Davoust, W. H. Fridman, and C. Bonnerot. 1992. Tyrosine-containing motif that transduces cell activation signals also determines internalization and antigen presentation via type III receptors for IgG. *Nature* 358:337-41.
2. Barrett, T. 1999. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Vet. Microbiol.* 69:3-13.
3. Beauverger, P., R. Buckland, and F. Wild. 1993. Establishment and characterisation of murine cells constitutively expressing the fusion, nucleoprotein and matrix proteins of measles virus. *J. Virol. Methods.* 44:199-210.
4. Bhella, D., A. Ralph, L. B. Murphy, and R. P. Yeo. 2002. Significant differences in nucleocapsid morphology within the Paramyxoviridae. *J Gen Virol* 83:1831-9.
5. Birrer, M. J., B. R. Bloom, and S. Udem. 1981. Characterization of measles polypeptides by monoclonal antibodies. *Virology* 108:381-90.
6. Borrow, P., and M. B. Oldstone. 1995. Measles virus-mono-nuclear cell interactions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 191:85-100.
7. Bour, H., E. Peyron, M. Gaucherand, J. L. Garrigue, C. Desvignes, D. Kaiserlian, J. P. Revillard, and J. F. Nicolas. 1995. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8<sup>+</sup> T cells and class II-restricted CD4<sup>+</sup> T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur. J. Immunol.* 25:3006-3010.
8. Buckland, R., P. Giraudon, and F. Wild. 1989. Expression of measles virus nucleoprotein in *Escherichia coli*: use of deletion mutants to locate the antigenic sites. *J Gen Virol* 70:435-41.
9. Cherif, B., A. Roget, C. L. Villiers, R. Calemczuk, V. Leroy, P. N. Marche, T. Livache, and M. B. Villiers. 2005. Clinically Related Protein-Peptide Interactions Monitored in Real Time on Novel Peptide Chips by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Clin Chem.* in press.
10. Chua, K. B., W. J. Bellini, P. A. Rota, B. H. Harcourt, A. Tamin, S. K. Lam, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, S. R. Zaki, W. Shieh, C. S. Goldsmith, D. J. Gubler, J. T. Roehrig, B. Eaton, A. R. Gould, J. Olson, H. Field, P. Daniels, A. E. Ling, C. J. Peters, L. J. Anderson, and B. W. Mahy. 2000. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288:1432-5.
11. Diallo, A., T. Barrett, M. Barbron, G. Meyer, and P. C. Lefevre. 1994. Cloning of the nucleocapsid protein gene of peste-des-petits-ruminants virus: relationship to other morbilliviruses. *J. Gen. Virol.* 75:233-7.
12. Diallo, A., T. Barrett, P. C. Lefevre, and W. P. Taylor. 1987. Comparison of proteins induced in cells infected with rinderpest and peste des petits ruminants viruses. *J. Gen. Virol.* 68 (Pt 7):2033-8.
13. Esolen, L. M., B. J. Ward, T. R. Moench, and D. E. Griffin. 1993. Infection of monocytes during measles. *J. Infect. Dis.* 168:47-52.
14. Fireman, P., G. Friday, and J. Kumate. 1969. Effect of measles vaccine on immunologic responsiveness. *Pediatrics* 43:264-72.
15. Galama, J. M. D., J. Ubels-Postma, A. Vos, and C. J. Lucas. 1980. Measles virus inhibits acquisition of lymphocyte functions but not established effector functions. *Cellular Immunology* 50:401.
16. Gassen, U., F. M. Collins, W. P. Duprex, and B. K. Rima. 2000. Establishment of a rescue system for canine distemper virus. *J. Virol.* 74:10737-44.
17. Grabbe, S., and T. Schwarz. 1998. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol. Today* 19:37-44.

18. Griffin, D. E., and W. J. Bellini. 1996. Measles Virus, p. 1267-1308. *In* F. B. N. e. al. (ed.), *Fields Virology*, 3rd edition. Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia.
19. Grosjean, L., B. Cherif, E. Mercey, A. Roget, Y. Levy, P. N. Marche, M. B. Villiers, and T. Livache. 2005. A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process. *Anal Biochem* 347:193-200.
20. Heaney, J., T. Barrett, and S. L. Cosby. 2002. Inhibition of in vitro leukocyte proliferation by morbilliviruses. *J. Virol.* 76:3579-84.
21. Hirsch, R. L., D. E. Griffin, R. T. Johnson, S. J. Cooper, I. Lindo de Soriano, S. Roedenbeck, and A. Vaisberg. 1984. Cellular immune responses during complicated and uncomplicated measles virus infections of man. *Clin. Immunol. Immunopath.* 31:1-12.
22. Hughes, A. L. 1996. Gene duplication and recombination in the evolution of mammalian Fc receptors. *J Mol Evol* 43:4-10.
23. Hussey, G. D., E. A. Goddard, J. Hughes, J. J. Ryon, M. Kerran, E. Carelse, P. M. Strebler, L. E. Markowitz, J. Moodie, P. Barron, Z. Latief, R. Sayed, D. Beatty, and D. E. Griffin. 1996. The effect of Edmonston-Zagreb and Schwarz measles vaccines on immune response in infants. *J. Infect. Dis.* 173:1320-6.
24. Jones, B., J. P. Tite, and C. A. Janeway, Jr. 1986. Different phenotypic variants of the mouse B cell tumor A20/2J are selected by antigen- and mitogen-triggered cytotoxicity of L3T4 positive, I-A-restricted T cell clones. *J. Immunol.* 136:348-56.
25. Kehren, J., C. Desvignes, M. Krasteva, M. T. Ducluzeau, O. Assossou, F. Horand, M. Hahne, D. Kagi, D. Kaiserlian, and J. F. Nicolas. 1999. Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 189:779-786.
26. Kerdiles, Y. M., C. I. Sellin, J. Druelle, and B. Horvat. 2005. Immunosuppression caused by measles virus: role of viral proteins. *Rev Med Virol.*
27. Krakowka, S., R. J. Higgins, and A. Koestner. 1980. Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am. J. Vet. Res.* 41:284-92.
28. Laine, D., J. M. Bourhis, S. Longhi, M. Flacher, L. Cassard, B. Canard, C. Sautes-Fridman, C. Rabourdin-Combe, and H. Valentin. 2005. Measles virus nucleoprotein induces cell proliferation arrest and apoptosis through NTAIL-NR and NCOREFcgammaRIIB1 interactions, respectively. *J Gen Virol* 86:1771-84.
29. Laine, D., M. C. Trescol-Biemont, S. Longhi, G. Libeau, J. C. Marie, P. O. Vidalain, O. Azocar, A. Diallo, B. Canard, C. Rabourdin-Combe, and H. Valentin. 2003. Measles virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from FcgammaRII via its C-terminal domain: role in MV-induced immunosuppression. *J. Virol.* 77:11332-46.
30. Lefevre, P. C., and A. Diallo. 1990. Peste des petits ruminants. *Rev. Sci. Tech.* 9:935-81.
31. Libeau, G., A. Diallo, F. Colas, and L. Guerre. 1994. Rapid differential diagnosis of rinderpest and peste des petits ruminants using an immunocapture ELISA. *Vet. Rec.* 134:300-4.
32. Libeau, G., C. Prehaud, R. Lancelot, F. Colas, L. Guerre, D. H. Bishop, and A. Diallo. 1995. Development of a competitive ELISA for detecting antibodies to the peste des petits ruminants virus using a recombinant nucleoprotein. *Res. Vet. Sci.* 58:50-5.
33. Lilliehook, I., A. Johannisson, and L. Hakansson. 1998. Expression of adhesion and Fcgamma-receptors on canine blood eosinophils and neutrophils studied by antihuman monoclonal antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 61:181-93.

34. Livache, T., A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan, and R. Teoule. 1994. Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Res* 22:2915-21.
35. Lund, B. T., A. Tiwari, S. Galbraith, M. D. Baron, W. I. Morrison, and T. Barrett. 2000. Vaccination of cattle with attenuated rinderpest virus stimulates CD4(+) T cell responses with broad viral antigen specificity. *J. Gen. Virol.* 81:2137-46.
36. Marie, J. C., J. Kehren, M. C. Trescol-Biemont, A. Evlashev, H. Valentin, T. Walzer, R. Tedone, B. Loveland, J. F. Nicolas, C. Roubardin-Combe, and B. Horvat. 2001. Mechanism of measles virus-induced suppression of inflammatory immune. *Immunity* 14:69-79.
37. Marie, J. C., F. Saltel, J. M. Escola, P. Jurdic, T. F. Wild, and B. Horvat. 2004. Cell surface delivery of the measles virus nucleoprotein: a viral strategy to induce immunosuppression. *J Virol* 78:11952-61.
38. Murray, C. J., and A. D. Lopez. 1997. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study [see comments]. *Lancet* 349:1269-76.
39. Ravanel, K., C. Castelle, T. Defrance, T. F. Wild, D. Charron, V. Lotteau, and C. Roubardin Combe. 1997. Measles virus nucleocapsid protein binds to FcγRII and inhibits human B cell antibody production. *J. Exp. Med.* 186:269-78.
40. Ravetch, J. V., and S. Bolland. 2001. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19:275-90.
41. Schlender, J., J. J. Schnorr, P. Spielhoffer, T. Cathomen, R. Cattaneo, M. A. Billeter, V. ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies. 1996. Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13194-13199.
42. Sixt, N., A. Cardoso, A. Vallier, J. Fayolle, R. Buckland, and T. F. Wild. 1998. Canine distemper virus DNA vaccination induces humoral and cellular immunity and protects against a lethal intracerebral challenge. *J Virol* 72:8472-6.
43. Tamashiro, V. G., H. H. Perez, and D. E. Griffin. 1987. Prospective study of the magnitude and duration of changes in tuberculin reactivity during uncomplicated and complicated measles. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6:451-454.
44. Tan, W. S., S. T. Ong, M. Eshaghi, S. S. Foo, and K. Yusoff. 2004. Solubility, immunogenicity and physical properties of the nucleocapsid protein of Nipah virus produced in *Escherichia coli*. *J Med Virol* 73:105-12.
45. Von Pirquet, C. 1908. Das verhalten der kutanen tuberculinreaktion während der mäsern. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 30:1297-1300.
46. Wohlsein, P., H. M. Wamwayi, G. Trautwein, J. Pohlenz, B. Liess, and T. Barrett. 1995. Pathomorphological and immunohistological findings in cattle experimentally infected with rinderpest virus isolates of different pathogenicity. *Vet. Microbiol.* 44:141-9.
47. Yamanouchi, K. 1980. Comparative aspects of pathogenicity of measles, canine distemper, and rinderpest viruses. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 33:41-66.
48. Yamanouchi, K., F. Chino, F. Kobune, A. Fukuda, and Y. Yoshikawa. 1974. Pathogenesis of rinderpest virus infection in rabbits. I. Clinical signs, immune response, histological changes, and virus growth patterns. *Infect. Immun.* 9:199-205.

## Figure legend

**FIG. 1.** Biochemical analysis of recombinant Morbillivirus and NiV nucleoproteins. H5 insect cells were infected with recombinant baculovirus encoding the corresponding Morbillivirus N, and harvested 3 to 4 days later. Recombinant nucleoproteins were then purified and analysed by SDS-PAGE (A, C) or Western blot using anti-morbillivirus-N mAb 33.4 (B) or anti-His-tag mAb (D).

**FIG. 2.** *Morbillivirus* nucleoproteins bind to B-lymphocytes from their natural hosts. Purified human, dog, goat and cattle lymphocytes were incubated for 1h with 10 µg of the corresponding purified recombinant N (shaded histograms), or left untreated (thick line). N binding was detected with either biotinylated mAb anti-MV-N (Cl.25), anti-CDV-N (C-5), anti-RPV-N (IV.B2), or anti-PPRV-N (38.4), followed by staining with PE-conjugated streptavidin (SA). B and T lymphocytes were gated using specific antibodies and flow cytometric analysis was carried out on FACScan. Results are representative from 2 independent experiments.

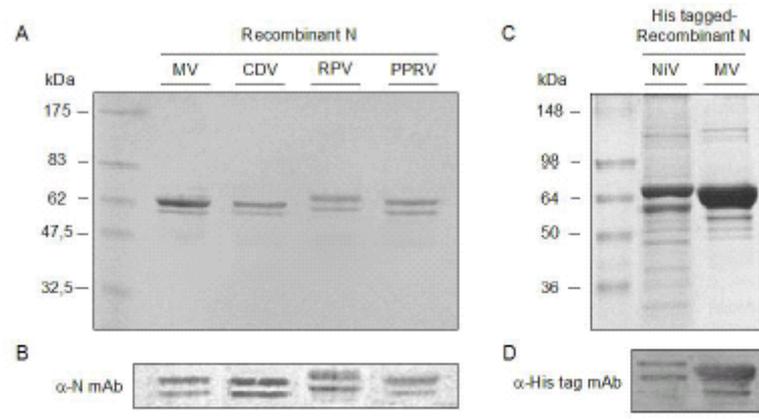
**FIG. 3.** Surface plasmon resonance imaging analysis of human FcγRIIb (CD32) interaction with nucleocapsid proteins on microarray. Sensorgrams obtained when CD32 (1 µM) was injected to protein chip bearing immobilized MV-N (*fuchsia line*), CDV-N (*green line*), PPRV-N (*red line*), RPV-N (*blue line*), NiV-N (*orange line*), control protein (hepatitis C core protein, *grey line*) and polypyrrole (*black line*). After 15 min of CD32 injection, the surface was washed with PBS for 15 min and followed by a regeneration step. Results are representative from 3 independent experiments.

**FIG. 4.** MV, PPRV and CDV-N, but not RPV-N, binds to murine FcγRIIb1. Murine B cell line IIA1.6 or its transfectant IIA1.6-FcγRIIb1 were incubated with 10 µg of indicated purified recombinant *Morbillivirus* N for 1h (shaded histograms), or left untreated (thick line). N binding was then detected with either biotinylated mAb anti-MV-N (Cl.25), anti-CDV-N (C-5), anti- RPV-N (IV.B2), or anti-PPRV-N (38.4), followed by staining with FITC-conjugated streptavidin (SA). Flow cytometric analysis was carried out on FACScan and results are representative from 5 different experiments.

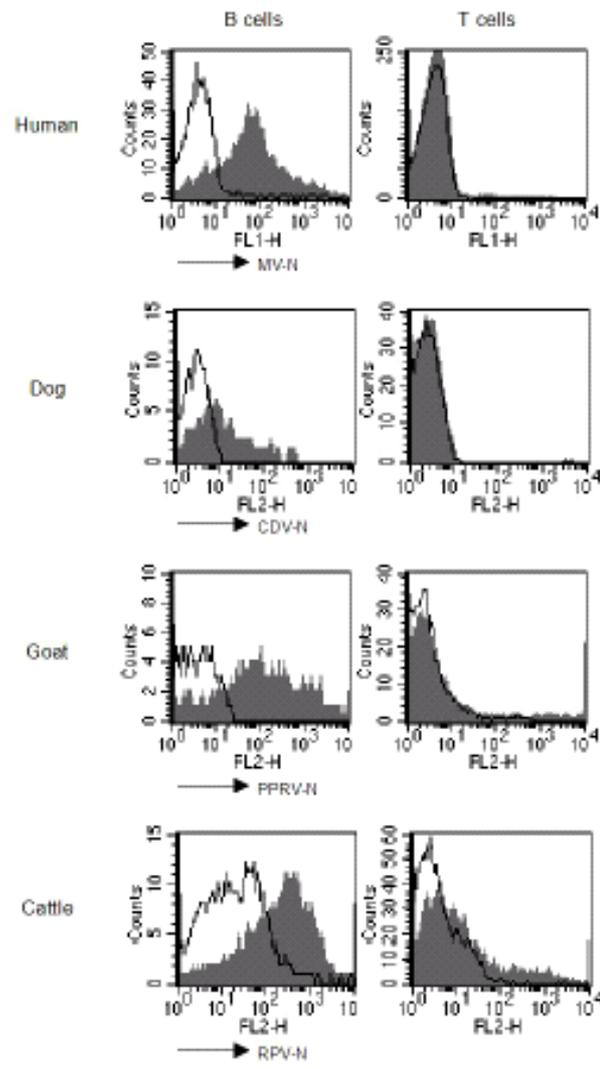
**FIG 5.** Expression of Morbillivirus N at the cell membrane. P815 cell line transfected with MVN (P815-N) or infected with CDV (P815-CDV) were incubated with saturating amounts of anti- FcγR 2.4G2 mAb, stained with either biotinylated mAb anti-MV-N (Cl.120) or anti-

CDV-N (C- 5) followed by PE-SA, and then analyzed by flow cytometry. Bcl-2 staining on non-permeabilized or permeabilized cells was used as control of plasma membrane integrity. Dashed lines correspond to PE-SA staining in the absence of primary antibody or hamster IgG-PE isotype control for anti-Bcl-2 mAb.

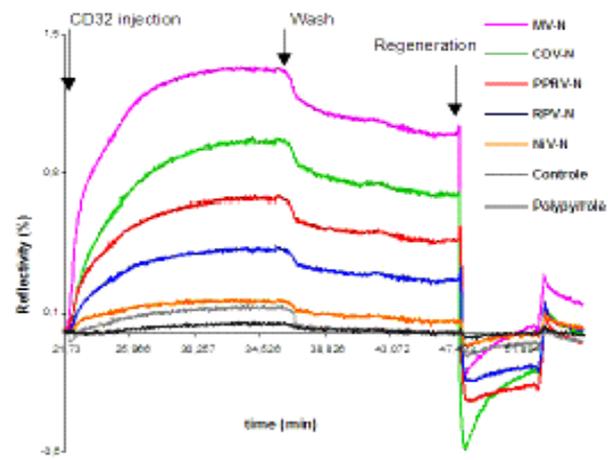
**FIG. 6.** MV, CDV and PPRV-N, but not RPV-N, inhibits inflammatory immune response in mice, dependent on Fc receptor expression. Groups of 5 C57BL/6 mice (A, C) or FcR<sup>-/-</sup> mice (B, D) were injected i.p. with 100 µg of indicated purified recombinant Morbillivirus N or with 1 mg of water-soluble dexamethasone (dexamethasone). (A, B) Mice were sensitized 6h later with DNFB, or left unsensitized (Unsensitized). CHS to DNFB was assessed after 5 days by ear challenge with a nonirritant dose of DNFB and ear swelling, shown as mean ± SD, was measured 48 hours later. (C, D). Mice were immunized 6h later with KLH in CFA or left unsensitized (Unsensitized). DTH to KLH was assessed after 7 days by footpad challenge with KLH in PBS. Footpad swelling was measured 24h later and presented as mean ± SD, (\*P<0.05, \*\*P<0.01, Student's T test).



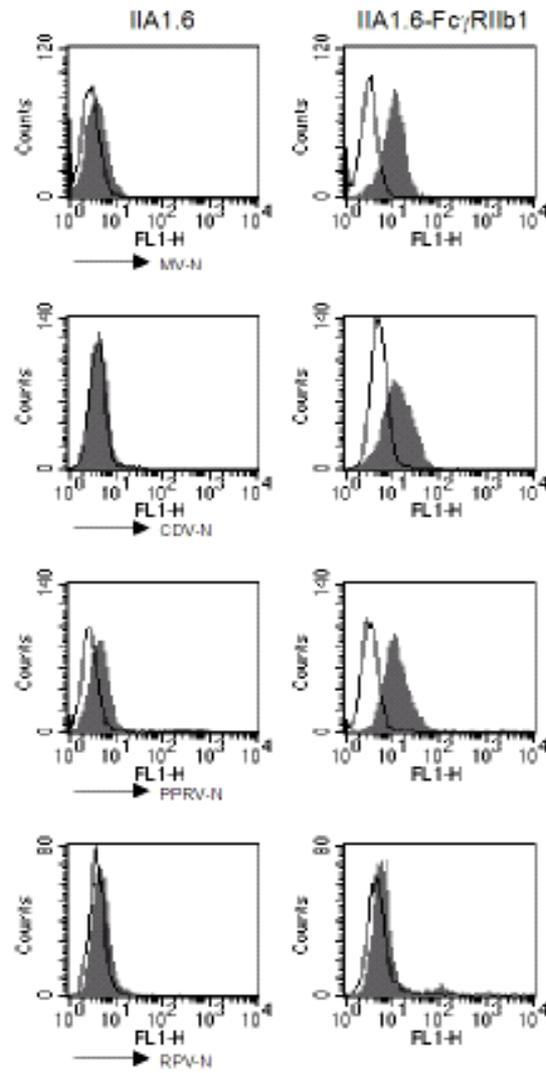
**Figure 1**



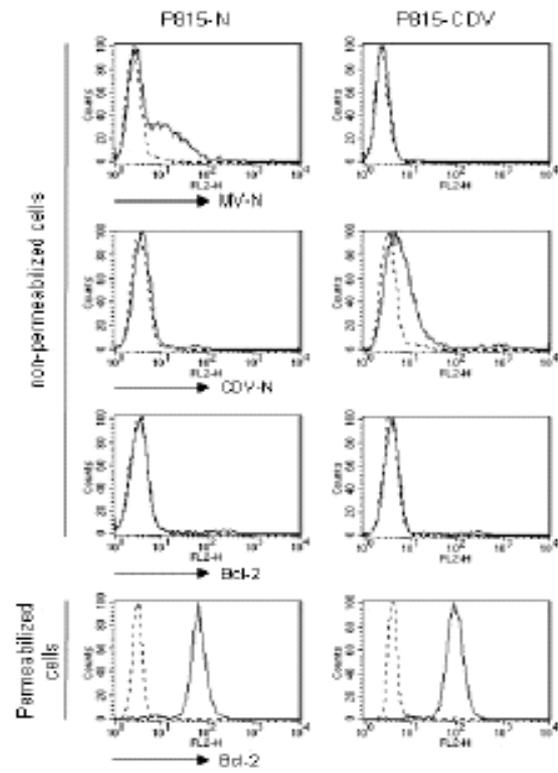
**Figure 2**



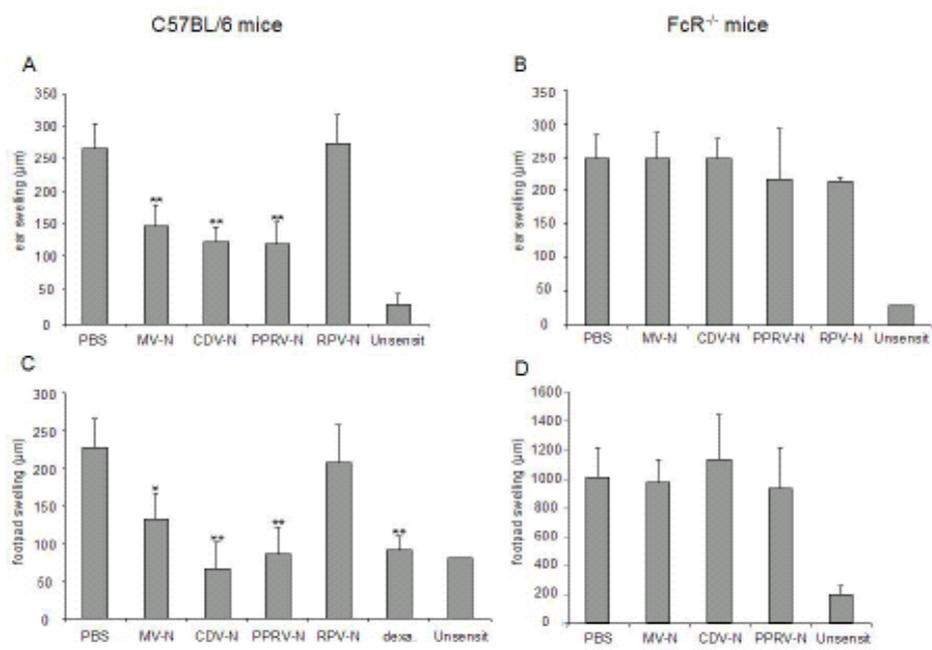
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

## **Article 3**

### **Design and application of a microarray for fluorescence and SPR imaging analysis of peptide-antibody interactions**

Boutheina Cherif, Christian L. Villiers, Glaucia Paranhos-Baccalà, Roberto Calemczuk, Patrice N. Marche, Thierry Livache, Marie-Bernadette Villiers

*Journal of Biomedical Nanotechnology*, **2006**, (2) 1-7.

### **Commentaire sur l'article 3**

La possibilité de faire des études multiparamétriques et la petite taille des sondes confèrent aux puces à peptides un intérêt majeur pour identifier des sites spécifiques d'interaction (cartographier une protéine, caractériser les épitopes reconnus par des Ac ou déterminer des substrats spécifiques de certaines enzymes). Au cours de ces dernières années, plusieurs équipes ont développé des puces à peptides mettant en jeu différentes chimies de surface permettant leur immobilisation sous forme de plusieurs spots sur un support qui sera utilisé pour analyser la fixation des molécules cibles. La majorité de ces travaux utilise le mode de détection par fluorescence (Falsey et al., 2001; Houseman et al., 2002). Néanmoins, l'équipe de Corn a développé un dispositif miniaturisé avec des peptides destiné à faire des analyses par imagerie SPR (Wegner et al., 2002; Wegner et al., 2004) en se basant sur des modèles biologiques simples et bien connus.

Notre objectif est de mettre au point une puce à peptides en se basant sur nos travaux réalisés avec les protéines : les peptides sont immobilisés selon la procédure d'électropolymérisation après couplage au pyrrole et nous analysons la fixation d'Ac spécifiques de ces peptides par microscopie à fluorescence et imagerie SPR afin de comparer les deux méthodes de détection.

### **1- Choix des peptides**

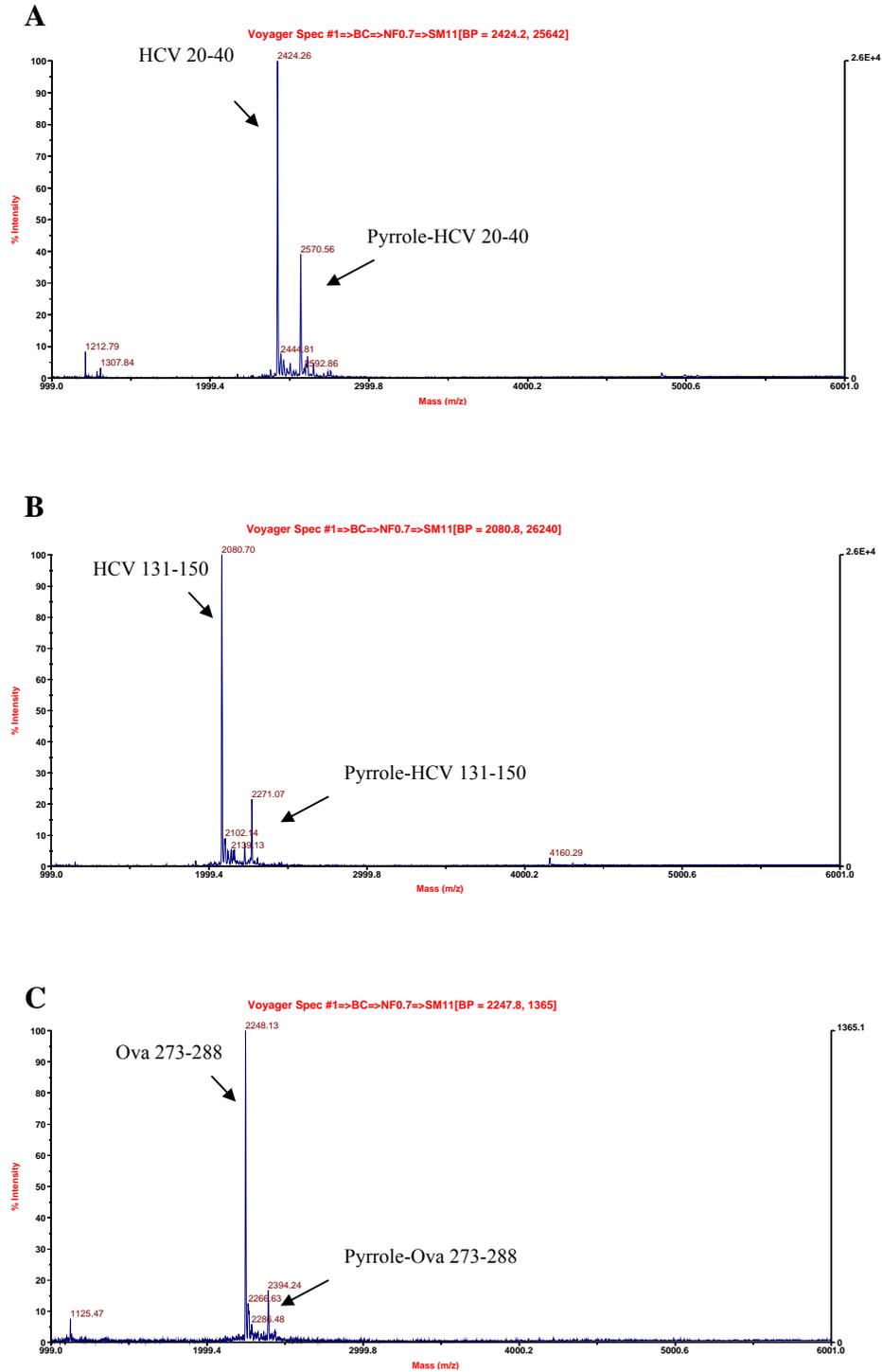
L'objectif final du travail effectué au cours de ma thèse est de concevoir une puce à peptides destinée à une étude clinique consistant à analyser le profil de la réponse immunitaire humorale de différents groupes de patients infectés par le VHC (Cf article 4). Pour la mise au point de la puce, nous avons travaillé avec deux peptides de la protéine core du VHC (core : 20-40 et 131-150) et un peptide contrôle de l'ovalbumine (Ova 273-288). Les deux peptides du VHC ont été choisis après une analyse bibliographique selon les critères suivants :

- séquence de la protéine core, car cette protéine est impliquée dans l'interaction du virus avec les cellules hôtes. C'est également la première protéine virale détectable dans le sérum de personnes infectées par le VHC
- séquence conservée par rapport à la variabilité du VHC
- épitope B (épitope reconnu par des Ac)

- épitope immunodominant (forte probabilité d'avoir des Ac contre ces peptides dans les sérums des patients).

## **2- Couplage des peptides au pyrrole et immobilisation su puce**

Les peptides sont modifiés à l'extrémité N-ter par addition d'un groupement maléimide qui réagit avec le -SH du pyrrole (Cf figure 1 de l'article 3) modifié, différent de celui utilisé pour l'immobilisation des protéines (NHS-pyrrole : Cf article 1). Dans un premier temps nous avons essayé de purifier les complexes peptide-pyrrole, sachant que la purification doit tenir compte de certaines conditions expérimentales, essentielles pour éviter le pyrrole de l'oxydation (critère important pour l'électropolymérisation). Plusieurs tentatives ont été menées pour purifier les complexes, mais sans succès. Afin d'estimer le pourcentage de peptides couplés au pyrrole après réaction, nous avons effectué des analyses de masse par spectrométrie MALDI-TOF (figure 2.7) : les analyses montrent que le rendement de couplage est de 20% à 40%. Les conjugués peptides-pyrrole ont été greffés sur la puce sans purification à différentes concentrations selon la procédure d'électrospeckting déjà décrite précédemment, par analogie avec le travail effectué sur les protéines.



**Figure 2.7.** Analyse de la masse des complexes peptide-pyrrole par spectrométrie MALDI-TOF: (A) pyrrole-HCV 20-40, (B) pyrrole- HCV 131-150 et (C) pyrrole-Ova 273-288.

### **3- Analyse des sérums immuns sur la puce par fluorescence et imagerie SPR**

Les peptides ont été immobilisés soit sur lame (analyse par fluorescence) soit sur prisme (analyse par imagerie SPR). Dans un premier temps, pour valider le greffage et la fonctionnalité de notre système, nous avons analysé, par microscopie de fluorescence et imagerie SPR, des sérums de lapins immunisés avec les deux peptides de la protéine core du VHC. Dans les deux cas, nous avons pu montrer la spécificité de reconnaissance des sérums sur les spots de peptide correspondants ; le signal de fluorescence comme celui obtenu par SPR est fonction de la concentration du peptide greffé et il est possible de régénérer la puce sans aucune dénaturation touchant les peptides ou déstabilisant le film de polypyrrole et sans aucune perte de signal. Les résultats obtenus par analyse en fluorescence ou imagerie SPR sont en parfaite corrélation. Notons que la quantité de ligand appliquée sur la puce est 10 x plus importante dans le cas des analyses par SPR ; cependant, les cinétiques d'interaction en temps réel ont été obtenues pour une fixation directe de la cible (dans le sérum) sans une étape d'amplification du signal permettant ainsi une détermination des caractéristiques de la dynamique de l'interaction, contrairement à la détection en fluorescence où nous avons deux étapes d'amplification (anti-IgG de lapin biotinylé + Streptavidine marquée à la phycoérythrine) donnant une valeur finale de l'interaction.

Dans un second temps, pour valider cette puce, nous l'avons utilisée pour identifier l'épitope reconnu par un Ac monoclonal (19D9D6) dirigé contre la protéine core du VHC (Jolivet-Reynaud et al., 1998). Les deux méthodes de détection révèlent une interaction spécifique avec le peptide HCV 20-40. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus par cristallographie du complexe core-19D9D6 indiquant que cet Ac reconnaît un épitope incluant les acides aminés 29-33 (Menez et al., 2003).

En conclusion, ces résultats nous ont permis d'établir que l'approche utilisée pour immobiliser des peptides permet la reconnaissance de cibles protéiques et est compatible avec une détection par fluorescence et par imagerie SPR. De plus, même si les rendements de couplage sont faibles et les complexes peptides-pyrrole immobilisés sans purification, le greffage est suffisant et la puce est efficace pour analyser des interactions peptides-protéines.

# **DESIGN AND APPLICATION OF A MICROARRAY FOR FLUORESCENCE AND SPR IMAGING ANALYSIS OF PEPTIDE- ANTIBODY INTERACTIONS**

Boutheina Cherif<sup>1</sup>, Christian L. Villiers<sup>1</sup>, Glaucia Paranhos-Bacalà<sup>2</sup>, Roberto Calemczuk<sup>3</sup>,  
Patrice N. Marche<sup>1</sup>, Thierry Livache<sup>3</sup> and Marie-Bernadette Villiers<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'Immunochimie; INSERM U548; Université J. Fourier, CEA-G/DRDC 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

<sup>2</sup> UMR 2714 CNRS-BioMérieux, IFR 128 BioScience Lyon-Gerland, CERVI-21, Av. Tony Garnier, 69007 Lyon, France

<sup>3</sup> CREAB, UMR 5819 (CEA, CNRS, UJF), CEA-G/DRFMC, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

## **Corresponding author**

Marie-Bernadette VILLIERS

INSERM U548; DRDC/ICH, CEA-G - 17 rue des Martyrs - F-38054 GRENOBLE-France

Phone number: + 33 4 38 78 96 65

Fax number: + 33 4 38 78 98 03

E-Mail: immuno@dsvsud.cea.fr

## **Abstract**

In the past few years, protein and peptide microarrays have shown a great potential in fundamental research, medical diagnostics and drug discovery. We have developed a new method based on covalent immobilization of peptides on a microarray gold surface for detecting antibodies by either fluorescence or surface plasmon resonance imaging (SPRi). The fluorescence-based revelation approach allows for an indirect analysis of protein-antibody binding via labeled molecules, whereas the SPRi-based assay is a real-time and label-free detection system suitable for the direct analysis of biological interactions. We illustrate our peptide chip's efficiency in specifically binding serum antibodies and compare the fluorescence and SPRi approaches to detect peptide-antibody interactions. Moreover, we used a monoclonal antibody against the hepatitis C virus nucleocapsid protein to provide evidence that our system is a powerful tool to identify which epitope is recognized by a given antibody. This novel technology therefore provides a promising tool for both antibody screening and epitope mapping.

**Key words:** peptide chip, SPR imaging, antibody, pyrrole, hepatitis C virus

## Introduction

The advent of microarray technology has favored the high-throughput analysis of biological events, and has great potentiality not only in fundamental but also in applied research, as shown by the outstanding success of DNA microarrays<sup>1</sup>. Despite the important contribution to gene expression profiling<sup>2,3</sup> or mutation mapping studies<sup>4</sup>, DNA microarray analyses by themselves do not account for biological processes such as protein expression. Proteins are the final and direct effectors of cellular functions and their expression or activity does not always correlate to RNA levels<sup>5</sup>. One would therefore expect protein microarrays to be an advantageous tool. Yet because they are complex molecules and because their functionality is highly dependent on their conformational folding, proteins are notoriously more challenging to immobilize on a microarray than DNA<sup>6</sup>.

Because peptides are much shorter and considered as more stable than proteins, peptide microarrays are a promising tool intended to allow for miniaturized and high-throughput screening of enzymatic activities as well as of antigen-antibody or ligand-receptor interactions<sup>7-10</sup>. In contrast to proteins, peptides do not possess well-defined three-dimensional structures. Nevertheless, their immobilization on surfaces must be controlled in order to make them accessible to ligands and thereby to allow optimal interaction between the peptide and its ligands.

Most currently used methods to study molecular interactions are indirect, provide an end-point measurement and require the use of labeled compounds. Fluorescence is the most widely used detection method in biochips<sup>11-13</sup>. Surface plasmon resonance (SPR) is an alternative approach that allows for label free and real-time monitoring of molecular interactions, and can provide kinetic measurements. The latter are of importance to characterize protein-protein binding, such as receptor-ligand interaction topology<sup>14,15</sup>. SPR is used in the Biacore technology that become the standard method for detecting protein-protein interactions<sup>16,17</sup>, but only few proteins, currently a maximum of four, can be immobilized on the biosensor chip. In order to make SPR compatible with a microarray format, the chip surface was imaged on a camera through SPR imaging. This technology, first developed for DNA chip applications, integrates data from multiple simultaneous measurements<sup>18-20</sup>. Here we describe a peptide-based microarray designed for antibody detection: 20 amino-acid peptides were covalently and orientedly immobilized on a gold surface through polypyrrole electro copolymerization. Antibody binding to the grafted peptides was assessed either by fluorescence or by SPR imaging in order to compare the two methods.

## Materials and methods

**Materials and reagents:** Prisms coated with a gold film (50nm thick) were provided by GenOptics (Orsay, France) and prepared as described previously<sup>18</sup>. SH-activated pyrrole was obtained according to Livache et al<sup>21</sup>. N-terminal maleimide-modified peptides derived from Ovalbumin (Ova 273-288 (MQQRKVYLPRMKMQ) and from Hepatitis C virus (HCV) core protein (HCV 20-40 (QNVKFPGGGNIVGGVYLLPRR) and HCV 131-150 (ANLMGYIPLVGAPLGGAARA)) were synthesized by NeoMPS (Strasbourg, France). Rabbit anti-sera against HCV 20-40 and 131-150 were also prepared by NeoMPS (Strasbourg, France). The anti-HCV core monoclonal antibody 19D9D6 was provided by Dr. Paranhos-Baccalà (Département des Immunoessais, bioMérieux, France).

**Preparation of pyrrole-peptide conjugates.** Peptides (2 mM) were incubated with SH-activated pyrrole (molecular ratio 1:10) in phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 for 2 hours at room temperature. About 20% of the peptides were conjugated to pyrrole, as estimated by MALDI-TOF mass spectrometry. Positive-ion mass spectra were acquired with a Perseptive Biosystems (Framingham, MA) Voyager Elite XL time of flight mass spectrometer with delayed extraction, operating with a pulsed nitrogen laser at 337 nm. This mixture was used for electro copolymerization without further purification.

**Copolymerization of pyrrole-peptide conjugates on the gold surface.** Briefly, the electrochemical copolymerization process (electrospotting) was carried out in sodium phosphate buffer (50 mM) pH 6.8, containing 20 mM free pyrrole, 10-500  $\mu$ M pyrrole-peptide conjugates and 10% glycerol, using an electrical pulse (0.2 s) as described previously<sup>18, 22, 23</sup>. The resulting chip could host 40 different spots on a 0.5cm<sup>2</sup> area. The diameter of a spot was 400  $\mu$ m and the typical thickness was in the range of 4nm. After spotting of all the peptides, the slide was rinsed with PBS and stored at 4°C in the same buffer.

**Detection of peptide-antibody interactions using fluorescence staining.** The sensor surface was first saturated with PBS containing 1% BSA (w/v) and 0.5% Tween 20 (w/v). Next, diluted rabbit immune sera (1/1000) or murine monoclonal antibody (mAb) (6 nM) were deposited on the peptide chip surface. Antibody binding was revealed with a biotinylated anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody (6.7 nM), followed by washing and a

streptavidin-phycoerythrin (16.6  $\mu\text{M}$ ) conjugation step. All steps were carried out at room temperature for 30 min. Fluorescence was visualized and recorded using an epifluorescence microscope (BX, Olympus) equipped with a Peltier cooled CCD camera, and quantified using the dedicated software (Quantity one, Bio-Rad). The chip can be used several times (up to 30) after regeneration with a 0.1 M, pH 2.3 Glycine buffer.

**SPRi-based monitoring of peptide-antibody interactions.** The optical set-up was described elsewhere <sup>18</sup>. Briefly, the light beam illuminates the reverse side of the chip made of a high optical index glass prism coated with a thin layer of chromium and gold (5 and 45 nm respectively). A 12-bit CCD camera was used to monitor changes in light reflectivity induced by antibodies interacting with the immobilized peptides. These changes in light reflectivity translate into contrasts in the level of gray. During the interaction process, images were recorded at fixed intervals of time (1.5 s) and analyzed with the dedicated software (GenOptics, Orsay, France). After saturating the chips with BSA (1%) in PBS, antibody binding was assessed by injecting either diluted rabbit immune sera (1/100) or monoclonal antibody 19D9D6 (60 nM) on the chip surface. PBS (pH 7.2) was used as running buffer at a flow rate of 36  $\mu\text{l min}^{-1}$ . The chip surface was regenerated with Glycine 0.1M, pH 2.3 and washed with PBS before further injection.

## Results and discussion

### Peptide chip preparation and SPR imaging device for kinetic measurements.

Peptides were immobilized on a gold surface by electro copolymerization of a mixture of pyrrole-peptide conjugates and free pyrrole using the previously described electrosporting method<sup>18</sup>. Pyrrole-peptide conjugates were obtained by coupling maleimide-modified peptides to a thiol-activated pyrrole, as shown in Fig.1. Using this chemistry, only one pyrrole residue can be grafted to the peptide. A spacer was inserted between the pyrrole and the peptide in order to limit steric hindrance effects and to increase epitope accessibility to antibodies. These pyrrole-peptide conjugates were then mixed with free pyrrole and submitted to successive electrical pulse-induced copolymerization reactions. Therefore, different peptides were covalently bound to a thin polypyrrole film (10 nm thick) in a spatially defined area. The generated spots are 300-500  $\mu\text{m}$  in diameter. This functionalized surface can be used to study peptide-antibody interactions using either fluorescence or SPR imaging. Fig.2 summarizes the experimental set-up. In the former approach (fluorescence, Fig.2A), antibody binding is revealed by successive incubations with a biotinylated secondary antibody and phycoerythrin-labeled streptavidin (SA-PE). Spot signal is end-point fluorescence intensity due to antibody binding to the peptide probe. The latter approach (SPR imaging, Fig.2B) on the other hand provides label-free and real-time measurements, which account for the kinetics of antibody binding. The signals on each spot are displayed in gray level scale and compared to a reference image. Reflectivity variation, which corresponds to ligand binding, is plotted against time to estimate ligand binding kinetics. Typical kinetic profiles feature an association phase during injection followed by a dissociation phase upon washing (removal of unspecific and/or low affinity binding) and a final regeneration phase (injection of Glycine 0.1 M, pH 2.3). The difference in reflectivity between the control and the relevant spots ( $\Delta R$ ) is proportional to the amount of bound molecules<sup>24</sup>.

### Antibody binding analysis using a peptide microarray and immune sera

#### 1. Suitability of the chip for both fluorescence and SPRi detection

To validate our chip for antibody detection, 500  $\mu\text{M}$  of two HCV core protein-derived peptides (HCV 20-40 and HCV 131-150) and of one Ovalbumin peptide (Ova 273-288) were spotted on the chip. Spots with Ova 273-288 or with polypyrrole alone were used as negative

controls. The chip was saturated with a BSA-Tween buffer as described in Materials and Methods. Rabbit anti-HCV 20-40 immune serum (1/1000) was injected, and the binding reaction was analyzed by both fluorescence and SPRi. As shown in Fig.3A and 3B, a significant and highly specific signal was generated by the spot harboring the HCV 20-40 peptide using both revelation approaches, whereas no signal change could be detected on the spots loaded with either irrelevant peptides (Ova 273-288 and HCV 131-150) or polypyrrole alone (control spots). Similar results were obtained on the intended target spot after chip regeneration and upon injection of anti-HCV 131-150 immune serum (Fig. 3C and 3D). It should be noted that saturation of the chip with BSA, which strongly decreased background signals due to non-specific interactions, is consistent with a good accessibility of the immobilized peptides for antibody binding, despite the two molecules' size difference (68 kDa for BSA and 2 kDa for the peptides). As the technique used to obtain peptide chips is probably suitable for most peptides, whatever their aminoacid composition (quality and quantity)<sup>23</sup>, the only limitation of the method is the accessibility of the epitope to the antibody. This could be improved by insertion of a spacer between pyrrole and peptide.

## ***2. Correlation between the amount of immobilized peptides and the signal***

The influence of the amount of immobilized peptide on the issued signal was assessed by analyzing spots grafted with HCV 20-40 or 131-150 peptide concentrations ranging from 10 to 500  $\mu$ M. As reported in Fig.4, both peptides challenged with the relevant antibodies and both detection methods (fluorescence, Fig.4A and SPRi, Fig.4B) generated a concentration-dependent signal. Very low background was observed with irrelevant antibodies, whichever the amount of grafted peptides. The background observed with fluorescence seems to be higher than those observed with SPRi, probably due to the number of steps involved in the fluorescence detection process. As both approaches allow quantifying of bound molecules through either fluorescence intensity or reflectivity changes ( $\Delta R$ ), we analyzed the correlation between the amount of bound antibodies and the initial peptide concentration in the grafting solution. As shown in Fig.5, fluorescence and SPRi signals were both a function of the amount of immobilized peptides, with a rapid initial increase followed by a plateau. This plateau may be attributable to system saturation and perhaps to decreased antibody accessibility of the peptide imposed by steric hindrance.

### ***3. Correlation between fluorescence and SPRi signals***

As we have shown that the peptide chip described in this paper is suitable for both fluorescence and SPRi detection, we compared the signals generated by these two approaches: as illustrated in Fig 6, the fluorescence and SPRi signals for the two peptides and their relevant anti-sera were highly correlated. Because the first method is an indirect measurement requiring binding of a biotinylated anti-rabbit IgG antibody followed by a SA-PE conjugate, the signal is amplified, which allows the use of highly diluted antiserum (1/1000). In contrast, SPRi requires lower serum dilutions (1/100). So, fluorescence detection process is roughly ten times more sensitive than the SPRi assay. However, as previously mentioned, fluorescence is less informative about peptide-antibody binding parameters.

#### **Monoclonal antibody characterization using peptide microarray**

To validate our peptide chip, we challenged it to identify the epitope recognized by a monoclonal antibody (19D9D6) directed against the core protein of HCV. This protein is an important target for HCV infection diagnosis as it is present in the serum of infected patients. Monoclonal antibody 19D9D6 has been raised against the viral core protein<sup>25</sup> and recognizes a conformational epitope including amino acid residues 29-33<sup>26</sup>. Monoclonal antibody 19D9D6 was injected (6 and 60 nM for fluorescence and SPRi detection respectively) onto a peptide chip grafted with HCV peptides 20-40 and 131-150 and control peptide Ova 273-288. Monoclonal Ab binding was revealed either by fluorescence measurements using a secondary anti-mouse IgG biotinylated antibody and PE-SA, or by SPRi. The spot grafted with HCV 20-40 specifically lit up with fluorescence and SPRi (Fig. 7), whereas the HCV 131-150 spot, the irrelevant peptide (Ova 273-288) or polypyrrole alone all generated a low background noise. These results confirm that the 19D9D6 mAb target lies within the 20-40 region, and are consistent with previous studies identifying the N-Ter end of the core protein as an immunodominant region<sup>27</sup> and determining the specificity of 19D9D6<sup>26</sup>.

#### **Conclusions**

We have developed a peptide microarray suitable for peptide-protein interaction analysis using either fluorescence or SPRi detection. In both systems, the high specificity of the signal together with the very low background noise constitute the great advantage of these peptide chips. Blocking the surface with BSA did not affect epitope recognition by relevant

antibodies and grafted peptides remained available for both polyclonal and monoclonal antibody binding. Fluorescence and SPRi were both efficient in detecting peptide-protein interactions. Fluorescence proved to be a more sensitive approach than SPRi, but requires multiple steps and labeled molecules, and leads to an end-point measurement. Moreover, some fluorochromes such as FITC are not compatible with polypyrrole because of quenching (data not shown). SPRi, although less sensitive, has the advantage of being a direct method allowing real-time analysis of peptide-protein interactions with access to kinetic parameters. Whichever the detection approach, the peptide chips described in this paper are readily manufactured, can be re-used (> 30 times) after regeneration and are compatible with high throughput screening, as a prism (0.5 cm<sup>2</sup>) can host 100 spots. Such a microarray is a promising tool for antibody screening and epitope mapping in fundamental as well as medical research.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank Bernard Dublet at the Institut de Biologie Structurale for mass spectrometry analysis.

This work was supported by institutional funds and by specific great funds from Agence National de la Recherche sur le Sida (ANRS).

Boutheina Cherif was supported by “Ministère de l’Enseignement Supérieur de Tunisie” and “CEA, Direction des Relations Internationales”.

## References

1. P. O. Brown and D. Botstein, Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat. Genet.* 21, 33 (1999).
2. R. Wadlow and S. Ramaswamy, DNA microarrays in clinical cancer research. *Curr. Mol. Med.* 5, 111 (2005).
3. K. K. Mantripragada, P. G. Buckley, T. D. de Stahl and J. P. Dumanski, Genomic microarrays in the spotlight. *Trends. Genet.* 20, 87 (2004).
4. M. M. Shi, Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin. Chem.* 47, 164 (2001).
5. S. P. Gygi, Y. Rochon, B. R. Franza and R. Aebersold, Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell Biol.* 19, 1720 (1999).
6. C. M. Halliwell, Nanoanalytical measurement of protein orientation on conductive sensor surfaces. *Analyst* 129, 1166 (2004).
7. M. J. Gomara, G. Ercilla, M. A. Alsina and I. Haro, Assessment of synthetic peptides for hepatitis A diagnosis using biosensor technology. *J Immunol Methods* 246, 13 (2000).
8. X. Duburcq, C. Olivier, F. Malingue, R. Desmet, A. Bouzidi, F. Zhou, C. Auriault, H. Gras-Masse and O. Melnyk, Peptide-protein microarrays for the simultaneous detection of pathogen infections. *Bioconjug Chem* 15, 307 (2004).
9. K. Y. Horiuchi, Y. Wang, S. L. Diamond and H. Ma, Microarrays for the Functional Analysis of the Chemical-Kinase Interactome. *J Biomol Screen* (2005).
10. R. C. Panicker, X. Huang and S. Q. Yao, Recent advances in peptide-based microarray technologies. *Comb Chem High Throughput Screen* 7, 547 (2004).
11. M. Takahashi, K. Nokihara and H. Mihara, Construction of a protein-detection system using a loop peptide library with a fluorescence label. *Chem. Biol.* 10, 53 (2003).
12. G. MacBeath and S. L. Schreiber, Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 289, 1760 (2000).
13. J. R. Falsey, M. Renil, S. Park, S. Li and K. S. Lam, Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjug. Chem.* 12, 346 (2001).
14. P. R. Morrill, R. B. Millington and C. R. Lowe, Imaging surface plasmon resonance system for screening affinity ligands. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 793, 229 (2003).
15. T. Ishino, G. Pasut, J. Scibek and I. Chaiken, Kinetic interaction analysis of human interleukin 5 receptor alpha mutants reveals a unique binding topology and charge distribution for cytokine recognition. *J. Biol. Chem.* 279, 9547 (2004).
16. M. Fivash, E. M. Towler and R. J. Fisher, BIAcore for macromolecular interaction. *Curr Opin Biotechnol* 9, 97 (1998).
17. R. Karlsson, SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas. *J Mol Recognit* 17, 151 (2004).
18. P. Guedon, T. Livache, F. Martin, F. Lesbre, A. Roget, G. Bidan and Y. Levy, Characterization and optimization of a real-time, parallel, label-free, polypyrrole-based DNA sensor by surface plasmon resonance imaging. *Anal. Chem.* 72, 6003 (2000).
19. N. Bassil, E. Maillart, M. Canva, Y. Levy, M.-C. Millot, S. Pissard, R. Narwa and M. Goossens, One hundred spots parallel monitoring of DNA interactions by SPR imaging of polymer-functionalized surfaces applied to the detection of cystic fibrosis mutations. *Sensors and Actuators B* 94, 313 (2003).

20. A. W. Wark, H. J. Lee and R. M. Corn, Long-range surface plasmon resonance imaging for bioaffinity sensors. *Anal. Chem.* 77, 3904 (2005).
21. T. Livache, A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan and R. Teoule, Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic. Acids Res.* 22, 2915 (1994).
22. L. Grosjean, B. Cherif, E. Mercey, A. Roget, Y. Levy, P. N. Marche, M. B. Villiers and T. Livache, A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process. *Anal Biochem* 347, 193 (2005).
23. B. Cherif, A. Roget, C. L. Villiers, R. Calemczuk, V. Leroy, P. N. Marche, T. Livache and M. B. Villiers, Clinically Related Protein-Peptide Interactions Monitored in Real Time on Novel Peptide Chips by Surface Plasmon Resonance Imaging. *Clin Chem* (2005).
24. B. P. Nelson, T. E. Grimsrud, M. R. Liles, R. M. Goodman and R. M. Corn, Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays. *Anal. Chem.* 73, 1 (2001).
25. R. Menez, M. Bossus, B. H. Muller, G. Sibai, P. Dalbon, F. Ducancel, C. Jolivet-Reynaud and E. A. Stura, Crystal structure of a hydrophobic immunodominant antigenic site on hepatitis C virus core protein complexed to monoclonal antibody 19D9D6. *J. Immunol.* 170, 1917 (2003).
26. C. Jolivet-Reynaud, P. Dalbon, F. Viola, S. Yvon, G. Paranhos-Baccala, N. Piga, L. Bridon, M. A. Trabaud, N. Battail, G. Sibai and M. Jolivet, HCV core immunodominant region analysis using mouse monoclonal antibodies and human sera: characterization of major epitopes useful for antigen detection. *J. Med. Virol.* 56, 300 (1998).
27. T. V. Firsova, T. I. Alekseenkova, V. A. Shibnev, G. Froesner and A. Semiletov Iu, Detection of antibodies to the nucleocapsid protein of Hepatitis C virus by immunoenzyme analysis using synthetic peptides of nucleocapsid N-terminal part. *Vopr. Virusol.* 46, 21 (2001).

## Figure legends

**Figure 1.** Pyrrole-peptide conjugates. Peptides containing an N-ter maleimide group were coupled to thiol-activated pyrrole via a thioether link.

**Figure 2.** Detection of antibody binding. (a) Fluorescence detection: general scheme of the experimental set-up (left) and an example of fluorescence staining (right). (b) SPRi detection: general scheme of the experimental set-up (left) and an example of sensorgrams (right).

**Figure 3.** Specificity of antibody binding: a peptide chip grafted with polypyrrole, Ova 273-288, HCV 20-40 and HCV 131-150 (500  $\mu$ M) was allowed to interact with rabbit anti-HCV 20-40 (a) (b) and anti-HCV 131-150 (c) (d) immune sera. Fluorescence staining (a) (c) and SPRi sensorgrams (b) (d) are shown.

**Figure 4.** Influence of the amount of immobilized peptides: a peptide chip grafted with different concentrations of HCV 20-40 and HCV 131-150 was allowed to interact with rabbit anti-HCV 20-40 (top) and anti-HCV 131-150 (bottom) immune sera. Fluorescence staining (a) and SPRi sensorgrams (b) are shown.

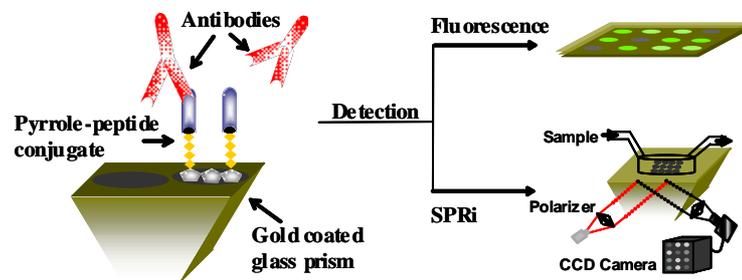
**Figure 5.** Correlation graphs between fluorescence or SPRi signals and the amount of immobilized peptides: a peptide chip grafted with HCV 20-40 and HCV 131-150 (10-500  $\mu$ M) was allowed to interact with rabbit anti-HCV 20-40 and anti-HCV 131-150 immune sera. The binding signals generated using fluorescence (a) or SPRi (b) detection were plotted against peptide concentration in the grafting solution.

**Figure 6.** Correlation between fluorescence and SPRi results: a peptide chip grafted with HCV 20-40 and HCV 131-150 (500  $\mu$ M) was allowed to interact with rabbit anti-HCV 20-40 and anti-HCV 131-150 immune sera. The fluorescent signals were plotted against the SPRi signals.

**Figure 7.** Characterization of a monoclonal antibody using the peptide chip. (a) Fluorescence detection and (b) SPRi analysis of monoclonal antibody 19D9D6 binding to a chip grafted with polypyrrole, Ova 273-288, HCV 20-40 and HCV 131-150 (500  $\mu$ M). Monoclonal antibody was used at 6 (a) and 60nM (b).

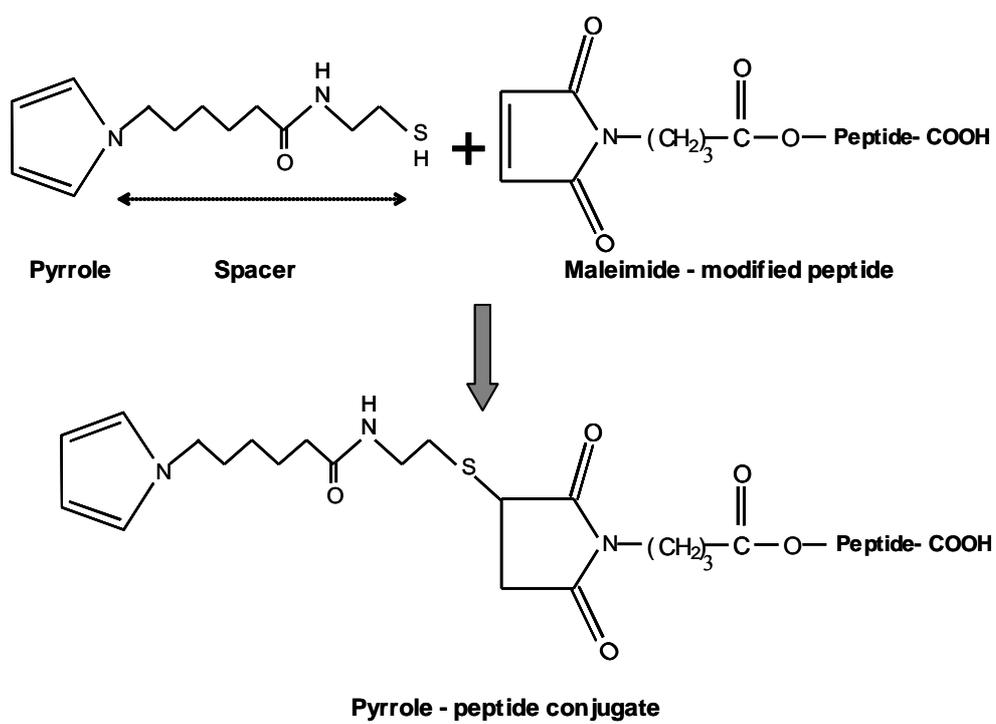
**A Novel Approach for Peptide Microarray Design for Antibody Detection  
Using Fluorescence and SPR imaging**

*Boutheina Chérif, Christian L. Villiers, Glauca Paranhos-Baccalà, Roberto Calenczuk, Patrice N. Marche, Thierry Livache, and Marie-Bernadette Villiers*



Peptides were immobilized on a gold surface in a microarray format and exposed to a solution of antibodies. Ligand binding was assessed using either fluorescence (an indirect method requiring labeled molecules) or surface plasmon resonance imaging (a direct, label-free method).

## Graphical abstract



**Figure 1**

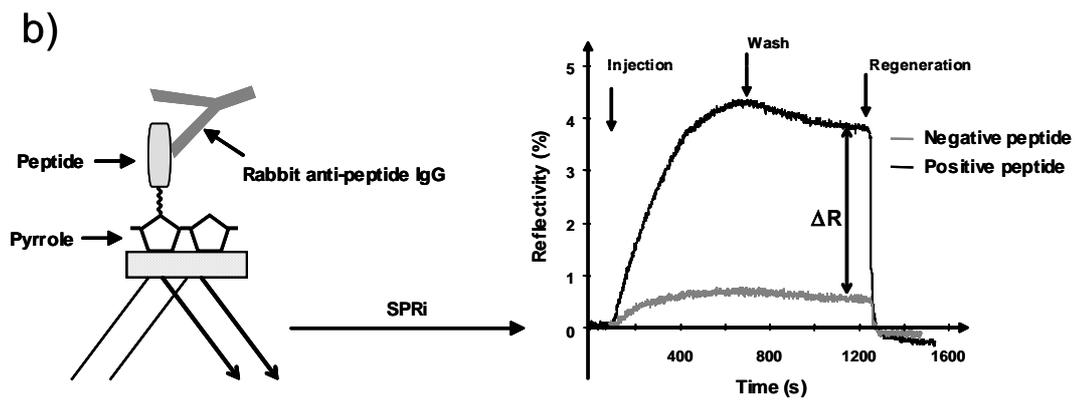
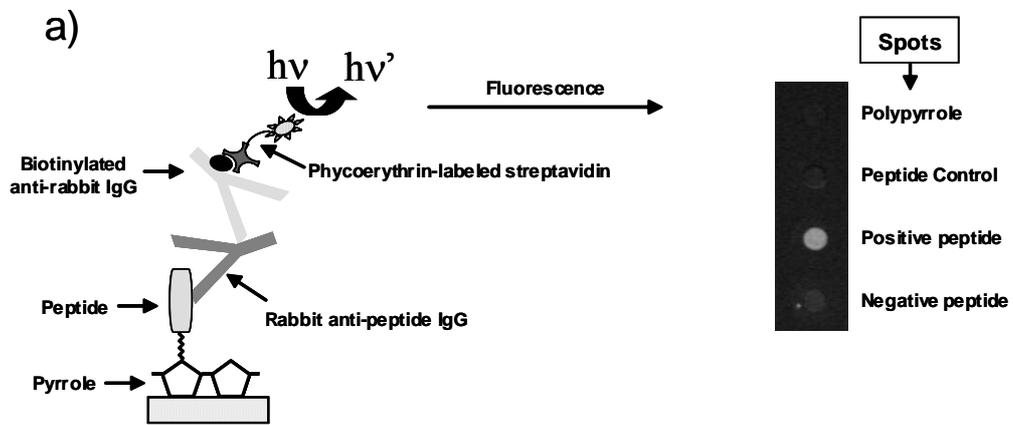
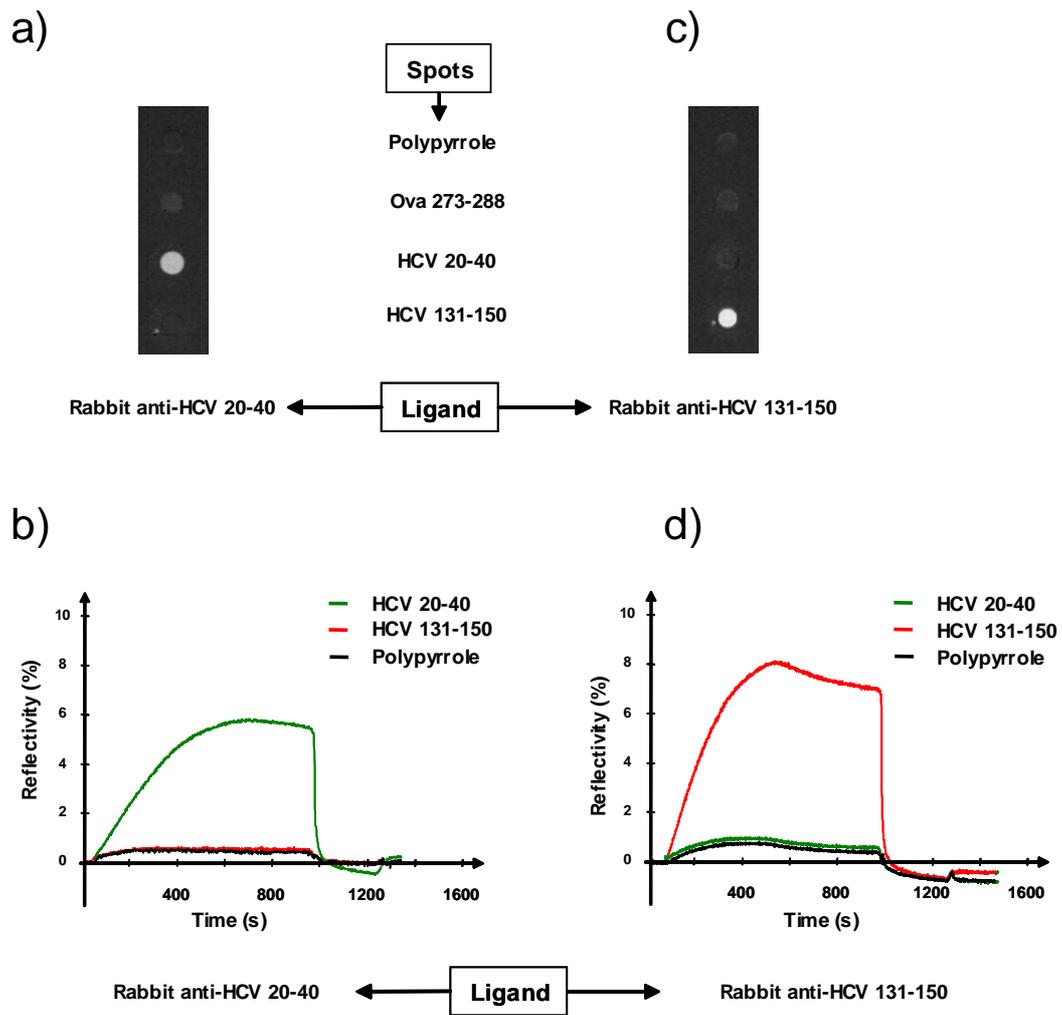
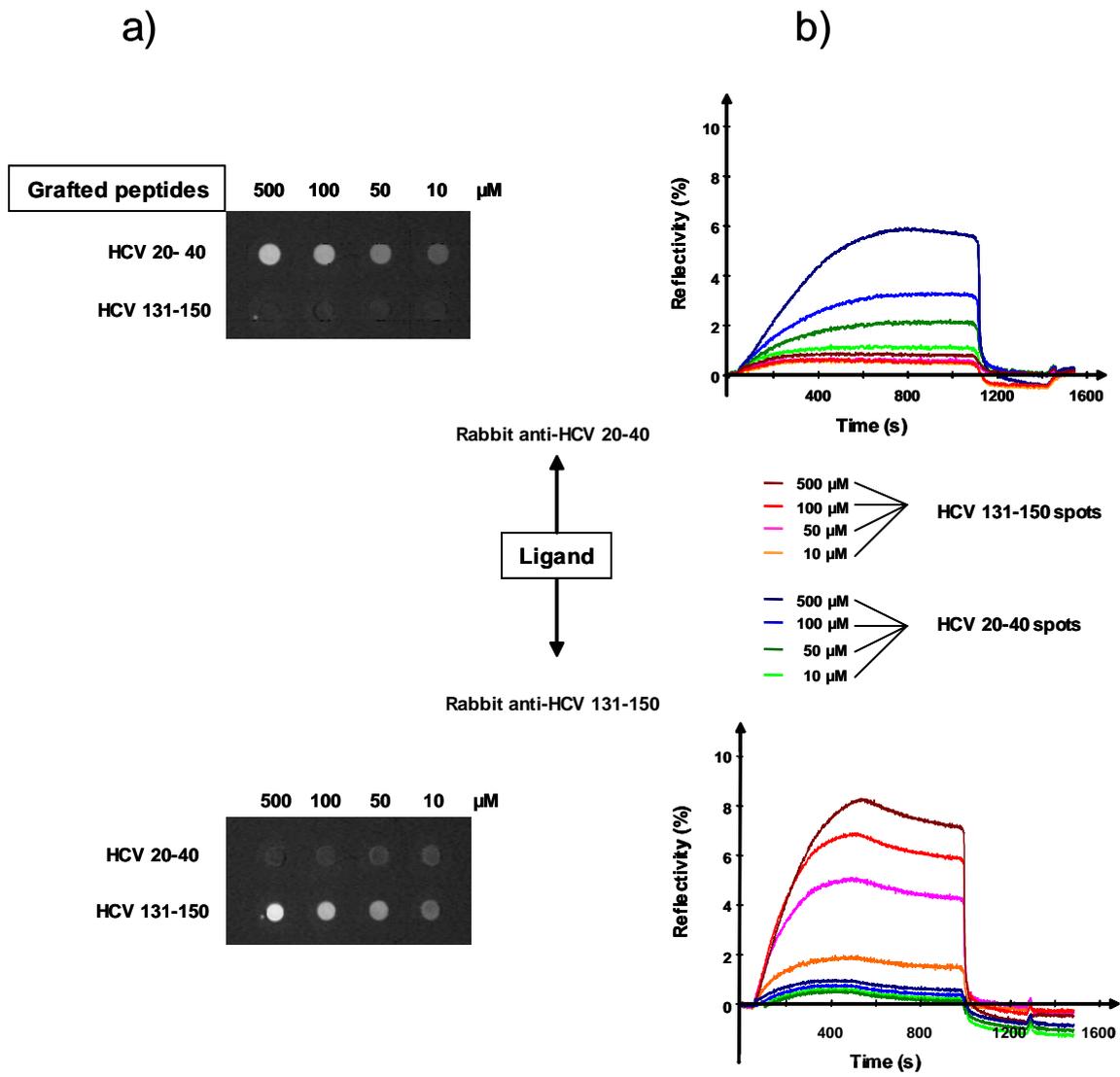


Figure 2



**Figure 3**



**Figure 4**

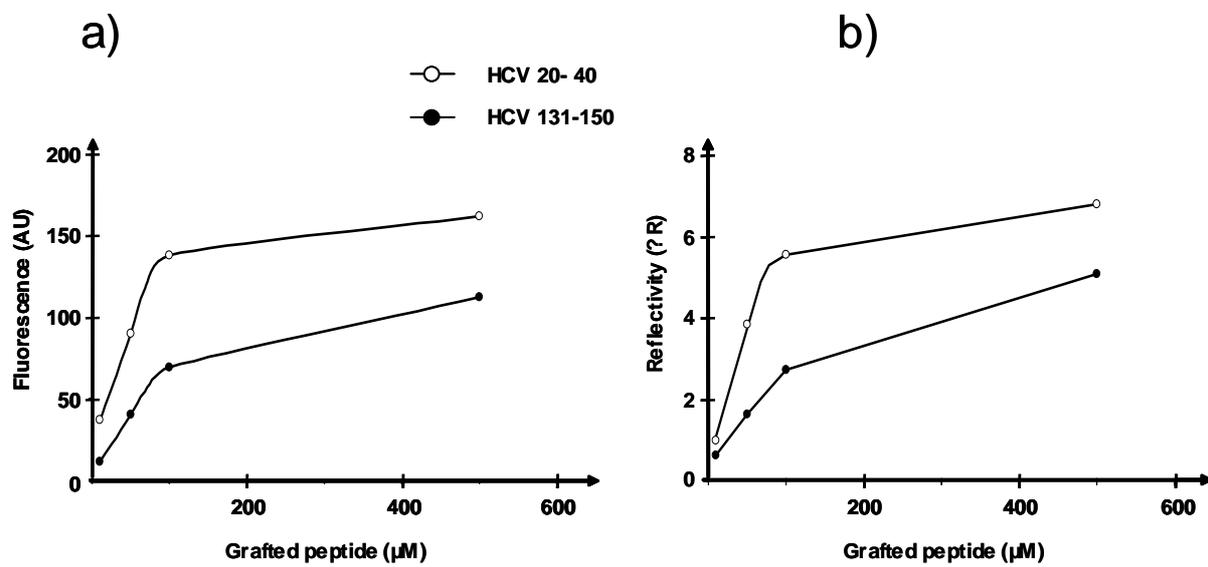
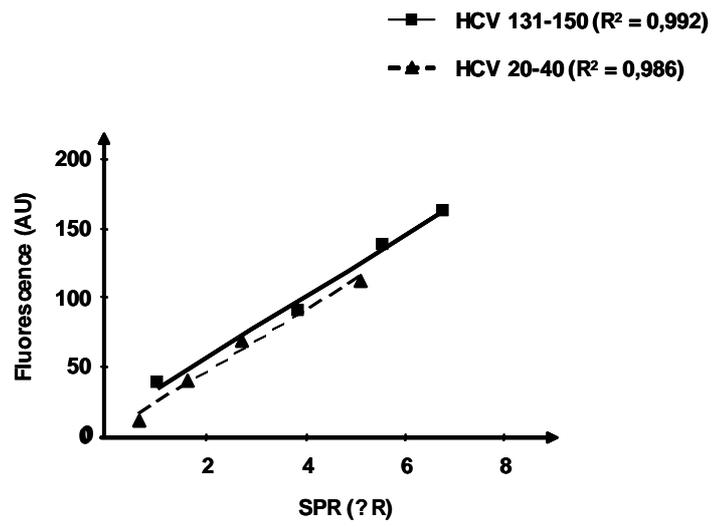
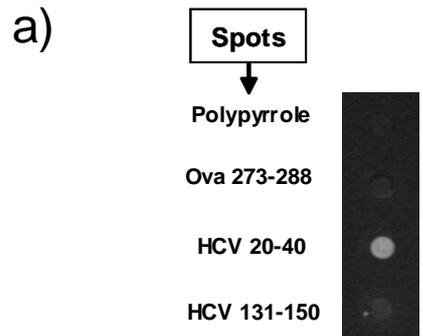


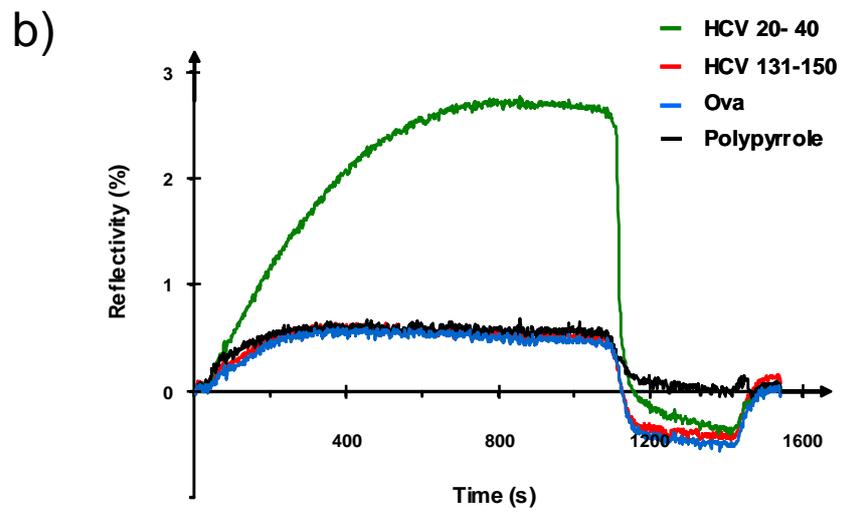
Figure 5



**Figure 6**



**Ligand** Monoclonal antibody against HCV core protein



**Figure 7**

## **Article 4**

### **Clinically related protein-peptide interactions monitored in real time on novel peptide chips using surface plasmon resonance imaging**

Boutheina Cherif, André Roget, Christian L. Villiers, Roberto Calemczuk, Vincent Leroy, Patrice N. Marche, Thierry Livache, Marie-Bernadette Villiers

*Clinical Chemistry*, **2006**, (52) 255-262.

## Commentaire sur l'article 4

Le travail publié dans l'article précédent a permis de mettre au point la chimie de couplage des peptides au pyrrole, leur immobilisation sur lame ou prisme dorés selon le procédé d'électrocopolymérisation et de valider leur utilisation pour analyser des interactions peptides-protéines (par microscopie de fluorescence et l'imagerie SPR). Jusqu'à présent, nous avons utilisé dans nos expériences des systèmes relativement simples : deux peptides, cibles purifiées ou présents dans des sérums dilués. Le but final de cette étude est de concevoir une puce à peptides pour une utilisation en diagnostic ou en recherche clinique qui implique un travail avec beaucoup plus de peptides greffés sur la puce et des échantillons complexes analysés à faible dilution. Notre objectif est donc de mettre au point le système dans ces conditions plus complexes.

Ainsi, nous avons comparé la variation du signal SPR en fonction de la dilution du sérum dans le tampon de l'expérience ou dans un sérum non immun. Cette dernière condition est importante car elle nous permet de mimer des conditions expérimentales réelles où nous serons amenés à analyser des sérums pour détecter des cibles présentes à faibles concentrations incompatibles avec une dilution de l'échantillon biologique. Hors celui-ci contient beaucoup d'éléments qui peuvent interférer avec la détection de la cible. Nous avons démontré que quelque soit le milieu de dilution, le système détecte l'anticorps avec une bonne efficacité (spécificité, sensibilité et régénération). Les résultats montrent que la réflectivité varie linéairement avec la dilution appliquée à l'échantillon jusqu'à une saturation et que la dilution dans du sérum non immun n'entraîne aucun affaiblissement dans la détection de l'interaction. Il est à noter que l'injection de sérum entier induit un grand saut d'indice qui apparaît au début de l'injection (figure supplémentaire 2 de l'article), dû à la présence d'éléments concentrés tels que les protéines sériques, ce qui entraîne un grand écart entre l'indice de réfraction du tampon de lavage et de l'échantillon injecté. Ceci n'a pas d'incidence sur la différence de  $\Delta R$  final mesuré après lavage de la puce.

La deuxième partie de cette publication concerne la validation du système sur des échantillons humains avec une puce comportant un nombre plus important de peptides. Nous

avons pris le modèle clinique des infections par le VHC et nous avons choisi une dizaine de peptides correspondant à des séquences d'une vingtaine d'acides aminés des différentes protéines du virus : 3 peptides de la protéine core dont 2 ont été l'objet de notre étude de mise au point de départ, un peptide de l'enveloppe E1 et E2, un peptide de chacune des protéines non-structurales NS2 et NS3 et deux peptides de NS4 et NS5. Nous avons analysé des sérums provenant d'une dizaine de patients infectés par le VHC, mais qui ont développé une réponse immunitaire efficace contre le virus attestée par l'absence d'ARN viral détectable. Cinq sérums contrôles provenant de donneurs sains ont été également étudiés. Ces échantillons ont été analysés par la technique ELISA, qui est une méthode utilisée couramment dans le diagnostic sérologique, et par imagerie SPR sur une puce fonctionnalisée avec les différents peptides. Les résultats montrent une bonne corrélation entre les deux méthodes. La méthode ELISA apparaît plus sensible que la SPR, car, contrairement à l'ELISA, la détection par imagerie SPR est directe sans aucune étape secondaire qui engendre une amplification du signal. De plus, nous avons une différence de présentation des peptides : dans le cas des puces, les peptides sont greffés directement par leur N-terminal pyrrolé sur le support tandis qu'ils ont été fixés sur une protéine porteuse dans le test ELISA selon des conditions différentes ; c'est un paramètre important qui peut influencer directement la reconnaissance par les anticorps. Par ailleurs, l'avantage majeur de la puce est de pouvoir analyser plusieurs paramètres à la fois, permettant d'avoir un profil des Ac présents dans chaque sérum. De plus, l'analyse directe et en temps réel donne accès à des informations sur la qualité des Ac (avidité).

Ainsi, les puces à peptides telles que nous les avons réalisées permettent d'analyser rapidement un milieu biologique. La possibilité de faire des études multiparamétriques et de régénérer les puces, leur grande spécificité et le faible bruit de fond en font un outil très prometteur pour des investigations cliniques, des études pharmacologiques ou en recherche fondamentale.

**Accès article 4 : <http://www.clinchem.org/cgi/reprint/52/2/255>**

## **Chapitre 3 : Discussion et perspectives**

Les biopuces sont des dispositifs miniaturisés permettant des analyses en parallèle de plusieurs paramètres. La majorité des puces ont été développées pour étudier des interactions entre biomolécules en utilisant des méthodes de détection avec traceur tel que la fluorescence (MacBeath and Schreiber, 2000; Zhu et al., 2001). En revanche, les méthodes de détection en temps réel sont moins développées notamment dans le cas de mesures en parallèle. Mon travail de thèse s'inscrit dans le développement des puces, particulièrement les puces à protéines et peptides pour étudier des interactions par imagerie SPR permettant des analyses multiples, simultanées, en temps réel et sans traceur. Le développement d'une puce comporte différentes étapes : la première consiste à réaliser une puce selon une stratégie donnée permettant d'immobiliser les biomolécules sur la surface. La deuxième étape consiste à vérifier la fonctionnalité de la puce et à optimiser les conditions expérimentales pour détecter des interactions biologiques en prenant des modèles d'étude simples et connus. La troisième étape concerne la caractérisation et la validation du système par des applications. Ainsi, les travaux exposés dans ce manuscrit portent sur le développement et l'application de puces à protéines (article 1 et 2) et de puces à peptides (article 3 et 4). Dans ce chapitre, nous discuterons les stratégies que nous avons utilisées et les résultats obtenus. Nous donnerons également les perspectives résultant de ces travaux.

## **1- Stratégie d'immobilisation des biomolécules**

### **1-1 Choix du polypyrrole**

Le pyrrole appartient au groupe des monomères cycliques qui se polymérisent en réponse à une réaction d'oxydation chimique ou électrique. Cette dernière est plus intéressante car elle permet le contrôle de l'épaisseur et de la morphologie du film du polymère (Heinze, 1991). Le pyrrole présente des propriétés chimiques et physiques avantageuses par rapport aux autres monomères : en effet celui-ci est hydrosoluble, facilement oxydable et peut se polymériser à pH neutre, caractéristiques compatibles avec les molécules biologiques. De plus, le potentiel de polymérisation du pyrrole est relativement faible (0,6 V/ECS dans une solution aqueuse), ce qui est favorable au maintien de l'intégrité des molécules biologiques.

Un deuxième avantage du pyrrole est la possibilité de le modifier par substitution de l'azote en position 1 ou en position 3 de l'hétérocycle. Dans le premier cas, la modification est plus facile à réaliser mais entraîne une diminution de la conductivité du pyrrole (Higgins, 1997; Kondo et al., 1992), contrairement à la deuxième possibilité qui est plus difficile à mettre en œuvre mais perturbe peu les propriétés électroniques du polymère (Rühe et al., 1989).

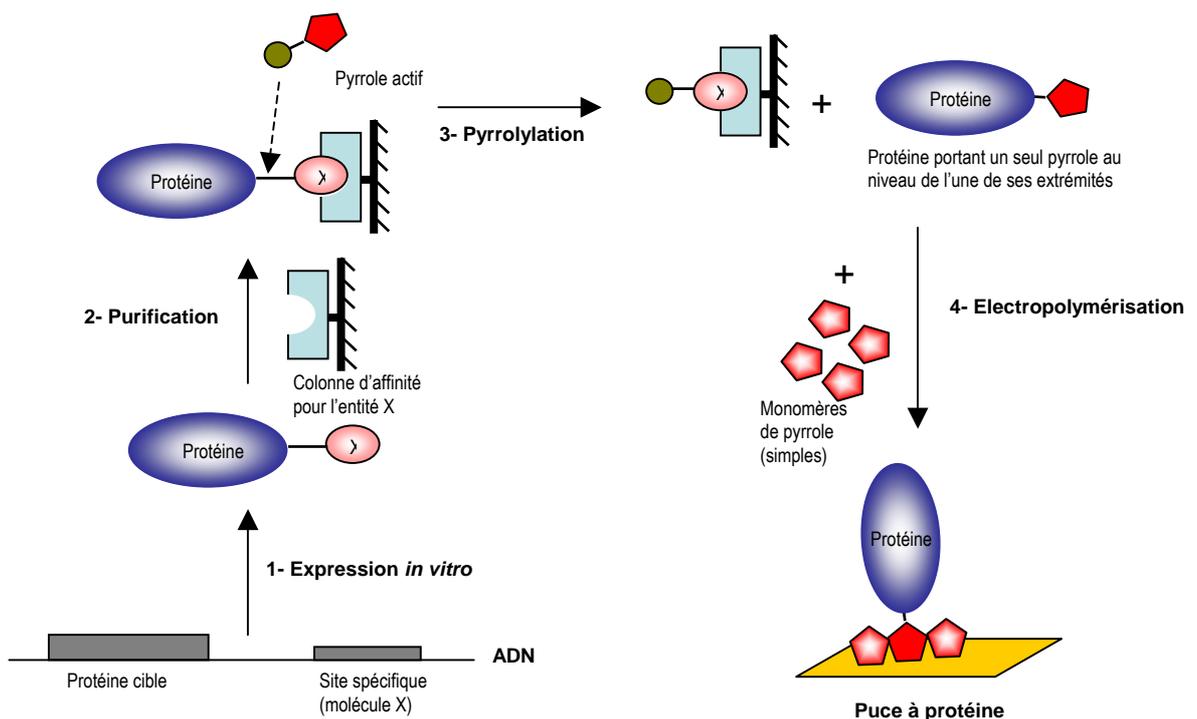
Le pyrrole doit être dopé pour qu'il y ait conduction lors de la polymérisation : le dopage est assuré par un anion qui s'insère dans le polymère, la nature de cet anion pouvant influencer les propriétés du film de polypyrrole (Vork et al., 1990). Initialement, lors du développement des puces à ADN, c'est l'anion perchlorate ( $\text{ClO}_4^-$ ) provenant du perchlorate de lithium ( $\text{Li ClO}_4$ ) qui a été utilisé dans le tampon d'électropolymérisation (Livache et al. 1998 ; Bidan et al. 2000). Dans le cas de polymérisation du pyrrole/ pyrrole-oligonucléotides, ce composé ne pose aucun problème du fait que la reconnaissance biologique de molécules d'ADN ne dépend que de l'enchaînement primaire en oligonucléotides. En revanche, le perchlorate de lithium n'est pas adapté aux protéines car les ions perchlorate interagissent avec des zones hydrophobes impliquées dans la structure tridimensionnelle de la protéine dont dépend l'activité de celle-ci. De plus, la solution de perchlorate de lithium est non tamponnée et la polymérisation du pyrrole génère des protons qui vont acidifier le milieu, ce qui est préjudicieux à la majorité des protéines.

Pour palier à ces problèmes, un nouveau tampon a été mis au point par l'équipe de T. Livache : c'est un tampon phosphate ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ ) pH 6,8 contenant du chlorure de sodium. Le choix de ce couple acide/base est justifié par le domaine de son pouvoir tampon qui est situé dans une zone de pH comprise entre 6 et 8,4, sachant que l'activité de la majorité des protéines est optimale pour  $6 < \text{pH} < 7,8$  et que le pyrrole se polymérise préférentiellement dans un milieu acide. Avec ce tampon, le dopage du pyrrole est assuré principalement par les ions  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ .

## **1-2 Couplage du pyrrole**

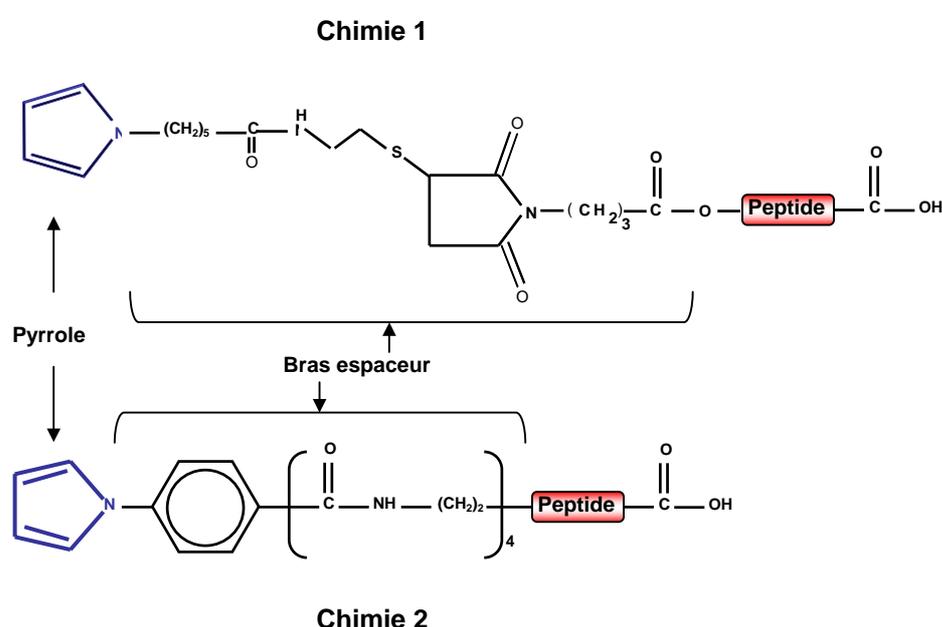
Pour coupler les protéines au pyrrole, nous avons utilisé des esters de pyrrole qui se lient aux amines primaires des protéines. Nous avons montré, à travers les différents modèles

étudiés, que cette approche est efficace pour fixer des protéines sondes sur le support. Néanmoins, elle manque de précision puisque la fixation du pyrrole activé sur la protéine se fait d'une manière semi- aléatoire, mettant en jeu n'importe quelle amine primaire, pourvu qu'elle soit accessible. Il y a, de ce fait, une hétérogénéité dans la position de la protéine fixée sur le support et donc potentiellement dans son interaction avec les ligands. Il serait donc intéressant d'orienter la fixation de la protéine sur le support selon des stratégies de modifications dites « site-spécifique ». Par analogie à ce qui a été réalisé pour la biotinylation des protéines sur un seul site, nous pourrions fixer une seule molécule de pyrrole sur un site bien définie de la protéine (figure 3.1), mais cette approche reste limitée aux protéines recombinantes. D'autres stratégies peuvent être employées selon le type de protéine à immobiliser : ainsi, si la protéine possède un seul site de glycosylation qui n'intervient pas dans la reconnaissance de la cible nous pouvons engager ces sucres dans l'immobilisation sur le support ; il est également possible d'utiliser une protéine intermédiaire telle que la protéine A pour l'immobilisation des Ig par exemple.



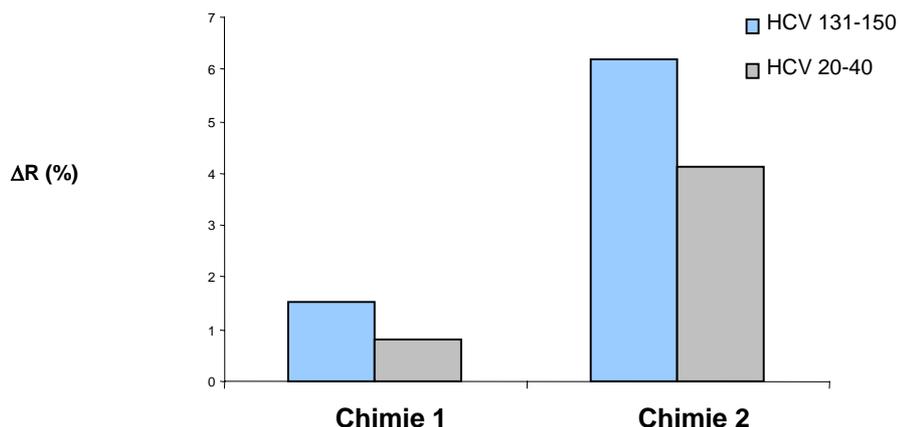
**Figure 3.1.** Stratégie d'immobilisation orientée des protéines après pyrrolylation sur un site spécifique.

Dans le cas du couplage du pyrrole aux peptides, la chimie que nous avons utilisée est basée sur l'établissement d'une liaison covalente entre le groupement maléimide fixé du côté N-terminal du peptide et le groupement thiol actif du pyrrole. Le problème rencontré dans cette stratégie est la purification des complexes peptide-pyrrole. Les analyses de masse des complexes peptide-pyrrole montrent que le rendement de couplage est faible (~40% pyrrole-HCV 20-40 et ~20% pyrrole-HCV 131-150 ou pyrrole-Ova 273-288). Afin d'améliorer ce point, nous nous sommes adressés à une société ayant une expertise dans le domaine de la chimie pour synthétiser des peptides pyrrolés. Ces peptides ont une chimie différente de ceux que nous avons utilisés précédemment (figure 3.2).



**Figure 3.2.** Complexe peptide-pyrrole selon la chimie 1 et 2.

Les mêmes peptides utilisés initialement pour la mise au point du système (HCV 20-40 et HCV 131-150) ont été synthétisés selon cette nouvelle chimie avec un degré de pureté > 90 %. Ils ont été testés sur la puce avec les sérums de lapins immunisés. Les résultats montrent que, pour une même dilution du sérum, le signal SPR est 4 fois plus important sur les spots de peptides pyrrolés selon cette nouvelle chimie (figure 3.3). Ceci s'explique essentiellement par la différence en concentration des conjugués peptides-pyrrole au moment du greffage, mais aussi à la chimie du bras espaceur qui peut influencer la présentation du peptide au niveau du film de polypyrrole.



**Figure 3.3.** Différence du signal SPR selon la chimie de couplage du pyrrole aux peptides. Les peptides HCV 131-150 et HCV 20-40 modifiés selon la chimie 1 et la chimie 2 ont été greffés sur la puce, ensuite des sérums de lapin anti-HCV 131-150 et anti-HCV 20-40 (dilution au 1/1000) ont été analysés par imagerie SPR.

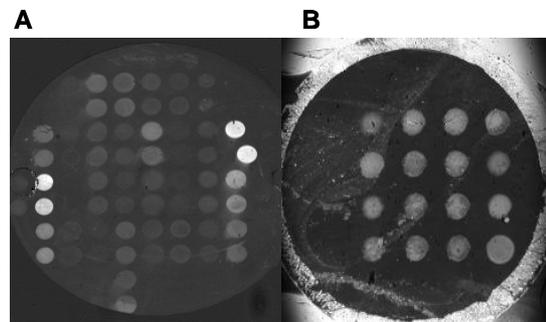
### 1-3 L'électrocopolymérisation

Le processus d'immobilisation des biomolécules basé sur l'électrocopolymérisation est une méthode avantageuse pour réaliser des spots sur un support du fait de sa rapidité et de sa grande simplicité. En effet, les spots sont effectués en une seule étape sans aucun traitement chimique préalable de la surface, contrairement à la majorité des méthodes employées pour lesquelles des supports en verre ou en or doivent être activés, ce qui nécessite différentes étapes de traitement chimique souvent longues et utilisant parfois plusieurs réactifs (Coffinier et al., 2005; Houseman et al., 2002; Wegner et al., 2004). De plus, notre méthode permet une immobilisation directe des petites molécules (tels que des peptides) sur la surface, et la saturation des spots avec une protéine inerte, comme la BSA, n'affecte pas la reconnaissance de ces molécules par leurs cibles, ce qui n'est pas le cas de toutes les méthodes. Par exemple l'approche développée par MacBeath nécessite l'immobilisation de la protéine de saturation (BSA) sur le support dans un premier temps puis la fixation des peptides sur celle-ci (MacBeath and Schreiber, 2000).

De plus, l'électropolymérisation permet la synthèse d'un film de polypyrrole très fin (entre 1 et 5 nm dans nos conditions), ce qui implique une interaction sonde-cible dans un espace en 2-dimensions qui contribue à la compatibilité du système avec l'analyse d'échantillons complexes tels que des sérums non dilués. Contrairement aux supports permettant une analyse en 3-dimensions (matrice de dextran ayant une épaisseur de l'ordre du 100 nm), par exemple les supports employés par la société Biacore, exigent une dilution ou un

traitement préalable de l'échantillon biologique (Gonzales et al., 2002; Hifumi et al., 2002). Outre sa simplicité, l'électropolymérisation permet un contrôle du polymère synthétisé sur la surface : la zone occupée par le polymère est définie par la forme et la taille du cône utilisé comme cellule électrochimique et l'épaisseur du film est contrôlée par la charge qui dépend essentiellement des paramètres électriques du spotting (différence de potentiel et temps), permettant ainsi de vérifier la reproductibilité des spots.

Les puces préparées pour les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisées en utilisant des cônes de micropipette comme cellule électrochimique. Actuellement, nous disposons d'un nouvel automate de dépôt (spotter) automatique qui fonctionne sur le même principe que celui utilisé précédemment (polypotter). Cet appareil comporte une aiguille conçue pour l'électropolymérisation et il est situé dans une enceinte fermée permettant le contrôle de l'humidité afin de limiter les problèmes d'évaporation. Les spots effectués avec une aiguille ont un diamètre d'environ 200  $\mu\text{m}$  (au lieu de 500 $\mu\text{m}$  avec l'ancien système) ; ainsi nous pouvons réaliser une centaine de spots sur une surface inférieure à 1  $\text{cm}^2$  (figure 3.4).



**Figure 3.4.** Image de puce réalisée par le nouveau spotter (A) et par le Polypotter (B).

## **2- Etude des interactions protéine-ligand par imagerie SPR**

### **2-1 Mise au point des puces à protéines**

Dans le but de réaliser des puces à protéines pour une analyse multiparamétrique et dynamique par imagerie SPR, nous avons procédé à la mise au point de plusieurs paramètres :

la chimie de couplage des protéines (nature du bras espaceur et groupement réactif), la densité du couplage et la densité de greffage des protéines. Pour cela, deux modèles d'interactions ont été utilisés : le modèle HEL/ anti-HEL et hCG/ anti-hCG.

Dans un premier temps, pour optimiser les conditions de couplage et de greffage des protéines sur la puce, F10, un Ac monoclonal anti-HEL, a été greffé selon différentes conditions (concentration et rapport molaire initial de pyrrolylation) sur le support, puis l'interaction F10-HEL a été analysée par microscopie de fluorescence. Nous avons montré que le couplage au pyrrole améliore la fixation des protéines, bien que celles-ci puissent rester piégées dans le film de polypyrrole même en absence de pyrrolylation, cet effet est probablement dû à des interactions chimiques qui peuvent avoir lieu au moment du greffage. Nous avons établi d'une part la spécificité de l'interaction, et l'existence d'une corrélation entre l'intensité de fluorescence et la concentration de la protéine immobilisée et sa cible.

Après la mise au point et la validation de la puce par fluorescence, le même modèle a été étudié par imagerie SPR. Les résultats montrent que les stratégies de couplage et d'immobilisation des protéines utilisées sont adaptées à cette méthode de détection : comme lors de l'utilisation de la fluorescence, les signaux obtenus en SPR sont spécifiques et dépendent de la quantité de cible injectée à la surface. De plus, la puce peut être régénérée par une solution acide (solution de glycine pH 2 dans notre cas) permettant l'élimination des molécules cibles sans affecter l'activité des molécules sondes (protéines immobilisées). De ce fait, la puce peut être utilisée successivement un grand nombre de fois (> 35) pour des analyses en série. D'autres solutions de régénération peuvent être utilisées selon le type d'interaction étudiée, par exemple une solution de sel pour une interaction ionique. Rappelons que la détection des interactions par fluorescence nécessite des étapes secondaires conduisant à une amplification du signal alors que la SPR permet une détection directe. Toutefois, dans le cas d'un signal SPR faible, celui-ci peut-être amplifié par l'utilisation de molécules secondaires (non marquées).

## **2-2 Application des puces à protéines**

Nous avons utilisé notre système pour analyser des interactions protéines-protéines dans le cadre d'une étude en collaboration avec l'équipe de B. Horvat (INSERM U 404-

Lyon). Le but était de déterminer s'il existe une interaction directe entre des nucléoprotéines (NP) de différents virus et le CD32 soluble.

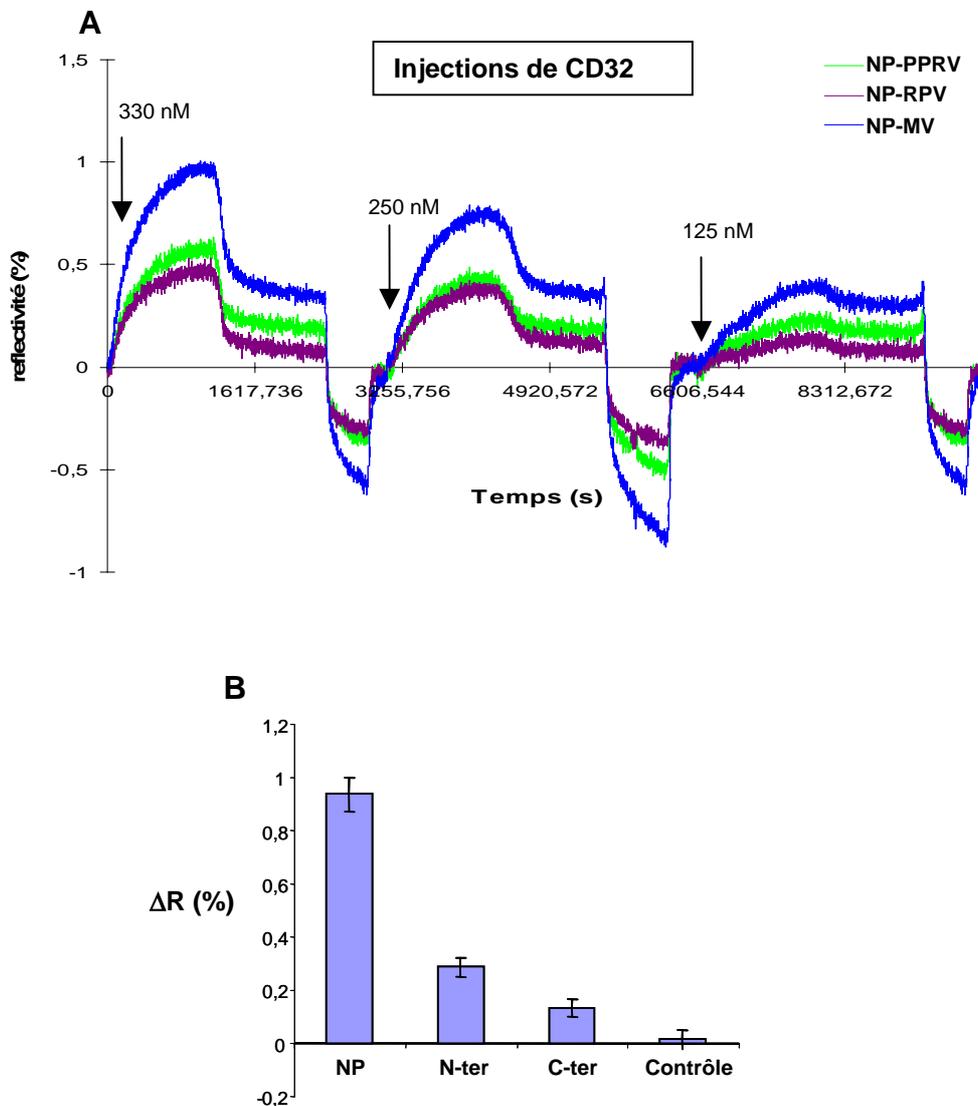
Afin de caractériser ces interactions, nous avons abordé l'analyse des cinétiques obtenues, sachant que nous n'avons aucune donnée relative à la nature de cette interaction, des tentatives de cristallisation du complexe CD32-nucléoprotéine ayant été menées sans succès. Nos expériences réalisées avec différentes concentrations de CD32 montrent que les dynamiques ne suivent pas le modèle de Langmuir avec un seul temps caractéristique de l'interaction (une simple exponentielle), mais semblent correspondre à deux temps caractéristiques (somme de deux exponentielles) qui déterminent l'interaction. En admettant toujours que nos expériences sont réalisées dans des conditions optimales où il n'y a aucune influence de la fluidique et que le CD32 est injecté à des concentrations suffisantes (de l'ordre du 100 nM) (figure 3.5-A), ces observations suggèrent trois hypothèses :

- Suite à une 1<sup>ère</sup> interaction (faible affinité), il y a une modification de conformation induisant une sorte de « verrouillage » de l'interaction (forte affinité). Cette hypothèse peut être étudiée avec différentes vitesses d'injection du CD32.
- L'utilisation du pyrrole-NHS permet une immobilisation semi-aléatoire pouvant entraîner un changement de conformation du site d'interaction dans certains cas et donc une différence d'affinité. Cette suggestion pourrait être vérifiée par l'orientation de la molécule sonde sur le support.
- L'interaction NP-CD32 met en jeu deux sites d'interactions ayant deux affinités différentes. Cette dernière hypothèse est étayée par les résultats obtenus en greffant soit le fragment N-ter soit le fragment C-ter de la NP du virus de la rougeole sur la puce et qui montrent que les deux parties sont impliquées dans l'interaction (figure 3.5-B).

Ces observations nécessitent d'être approfondies : nous travaillons sur l'amélioration du logiciel de traitement des cinétiques pour l'adapter à des modèles d'interactions plus complexes qu'une simple exponentielle. Pour trancher entre les trois hypothèses, il serait important de pouvoir orienter la fixation des NP sur la puce.

La suite de ce travail consistera à déterminer les séquences intervenant dans l'interaction de la nucléoprotéine avec le CD32 en utilisant une puce sur laquelle seront greffés divers peptides correspondant à la séquence de la NP. Ces analyses seront importantes, premièrement pour mieux comprendre la nature de cette interaction et deuxièmement pour la

détermination de la séquence peptidique engagée dans l'interaction. Celle-ci pourra être utilisée lors de la vaccination contre le virus de la rougeole : l'injection simultanée du virus atténué et de séquence devrait permettre de diminuer l'immunosuppression induite, le peptide jouant le rôle de comptiteur pour la fixation de la nucléoprotéine sur le CD32.



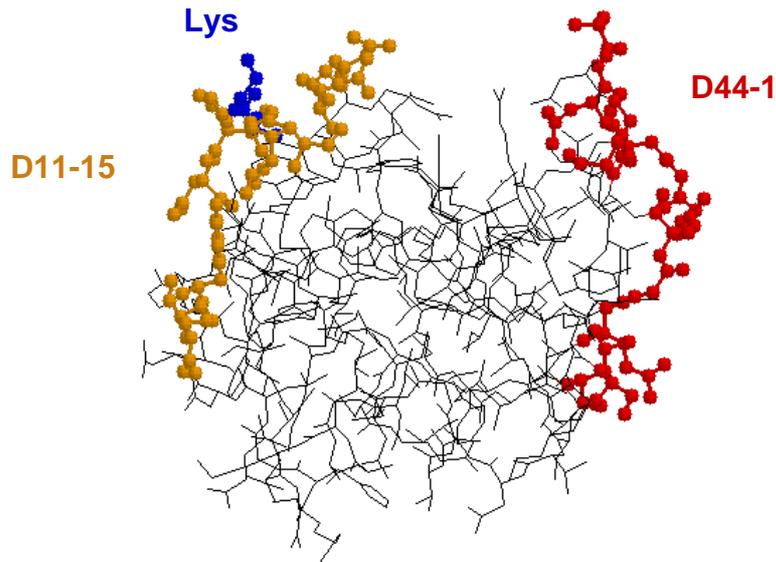
**Figure 3.5.** (A) Sensorgrammes des cinétiques d'interaction de CD32 injecté à 125, 250 et 330 nM sur une puce greffée avec des nucléoprotéines de différents virus (MV, PPRV et RPV). (B) Analyse de l'interaction de CD32 avec la nucléoprotéine entière du virus de la rougeole et ses fragments par imagerie SPR.

### 2-3 Analyse des cinétiques et détermination des constantes d'affinités

Rappelons que la SPR est une méthode d'analyse en temps réel donnant les cinétiques des interactions ayant lieu à la surface de la puce et permettant ainsi la détermination des constantes d'affinité. En se basant sur cette méthode, les mesures des constantes d'affinité

peuvent être effectuées par les dispositifs Biacore qui sont des monocapteurs à détection SPR. Par ailleurs, certaines équipes ont développé des systèmes de mesures multiparamétriques sur des puces: les auteurs ont montré l'efficacité de leurs systèmes avec la possibilité de déterminer des constantes d'affinité à travers divers modèles biologiques : des interactions protéines -protéines (Kanda et al., 2004; Wegner et al., 2003), peptides -ligand (Wegner et al., 2004), ADN-ADN (Wark et al., 2005) et oligosaccharides -ligand (Smith et al., 2003).

Afin de valider notre système pour les analyses des constantes d'affinité, nous avons utilisé un modèle constitué de HEL et de différents anticorps monoclonaux anti-HEL (F10, D44-1 et D11-15) ayant des affinités connues (Tello et al., 1993). Nous avons réalisé une puce greffée avec différentes concentrations de HEL et nous avons analysé la fixation des trois anticorps par imagerie SPR. Les constantes d'affinité établies avec notre système sont bien corrélées avec ceux connus dans la littérature pour les Ac F10 et D44-1 (Cf chapitre 2, commentaire article 1), ce qui n'est pas le cas pour l'Ac D11-15. Les analyses des cinétiques à l'équilibre montrent aussi une grande différence du  $R_{\max}$  du D11-15 par rapport au deux autres Ac. Cette différence peut s'expliquer par la stratégie d'immobilisation de HEL utilisée, basée sur le couplage de l'ester du pyrrole aux amines primaires de la protéine ; hors l'épitope reconnu par le D11-15 contient une lysine, cette caractéristique structurale peut influencer directement la reconnaissance de l'épitope d'où la diminution de la constante d'affinité et du  $R_{\max}$ . La figure 3.6 représente les deux épitopes reconnus par les Ac D44-1 et D11-15, l'épitope reconnu par F10 n'est pas encore bien défini mais certains travaux suggèrent qu'il est très proche de l'épitope de D44-1 (Braden et al., 1994). Ce qui explique le peu de différence entre les  $R_{\max}$  calculés pour ces deux Ac (même accessibilité) et la bonne corrélation entre les  $K_A$  donnés par la littérature pour des interactions en solution et pour nos expériences où l'un des partenaires est fixé (bonne accessibilité dans les deux cas).



**Figure 3.6.** Localisation des épitopes reconnus par les Ac monoclonaux (D44-1 et D11-15) et des lysines confondues au niveau de la structure 3-D de HEL.

### **3- Etude des interactions peptides-ligands par imagerie SPR**

Comme nous l'avons évoqué préalablement, l'utilisation de peptides comme molécules sondes présente de nombreux avantages (détermination de sites spécifiques lors des interactions protéine- protéine, Ag- Ac ou enzyme- substrat). Ainsi, une grande partie de mon travail de thèse a porté sur l'adaptation de la technologie développée par l'équipe de T. Livache pour la conception d'une puce à peptides qui sera utilisée à des fins d'analyses en recherche fondamentale ou clinique, ou pour l'établissement d'un diagnostic médical.

#### **3-1 Mise au point des puces à peptides**

Les premières étapes de conception de la puce consistent à immobiliser les peptides après couplage au pyrrole par électropolymérisation sur une surface en or. Deux stratégies de modification des peptides ont été utilisées (mentionnées précédemment):

- la première consiste à faire un couplage d'un peptide- maléimide avec le pyrrole-SH
- la deuxième est une approche de modification du peptide au cours de sa synthèse.

Dans le premier cas, nous avons eu un rendement de couplage de 20 à 40% (rendement variable selon la séquence peptidique), de plus la purification des conjugués n'est pas possible, car il est difficile de séparer des entités ayant des poids moléculaires égales avec les méthodes de purification classiques ou par HPLC nécessitant des conditions de séparation en

milieu acide qui ne sont pas compatibles avec le pyrrole. La deuxième approche permet l'obtention de 100 % de conjugués quelque soit la séquence du peptide. Ceci permet d'avoir une bonne reproductibilité au niveau du greffage des peptides sur la puce d'un même peptide sur différents spots ou d'un peptide à l'autre. Le seul inconvénient de cette méthode est son coût relativement élevé par rapport à la première stratégie. Cependant, quelque soit la stratégie de couplage au pyrrole employée, nous avons une très bonne spécificité du signal qui est fonction de la concentration du peptide greffé.

Les résultats de mise au point des puces à peptides obtenues permettent de valider pour la première fois la chimie du pyrrole avec des sérums pour une analyse par imagerie SPR. Rappelons que pour des analyses sur des échantillons biologiques, un grand nombre de méthodes utilisent l'ELISA pour détecter les interactions peptides- protéines : celle-ci sont révélées par l'intermédiaire de réactions Ag-Ac et/ou avidine-biotine, couplé à un marquage fluorescent (Shreffler et al., 2004; Uttamchandani et al., 2004). Ce type de détection, coûteuse en temps et matériel, ne permet pas une analyse directe ni une mesure en temps réel avec une détermination des constantes d'affinité. De plus le bruit de fond généré par les milieux biologiques complexes tels que le sérum est très important et nécessite de diluer l'échantillon avant de l'analyser.

Par ailleurs, le système Biacore, largement utilisé, détecte des interactions biomoléculaires par SPR (Kim et al., 2003; Liljeblad et al., 2001). La technologie Biacore offre la possibilité de mesures directes et en temps réel mais elle ne permet d'étudier que 2 ou 3 éléments fixés sur le support (avec la dernière génération du Biacore, le support comporte 4 canaux), excluant la possibilité d'une analyse à grande échelle. De plus, le support utilisé pour fixer les molécules dans le système Biacore est souvent une matrice en 3-dimensions (dextran carboxyméthylé) qui interagit fortement avec les composants des fluides biologiques complexes, ce qui implique un important bruit de fond ne permettant pas l'analyse directe sur des échantillons non dilués (Gonzales et al., 2002; Hifumi et al., 2002). En effet, Hifumi et ses collaborateurs bloquent la surface du biosenseur avec un sérum contrôle et chauffent les échantillons à 56°C avant de les analyser ; selon ces auteurs, ces deux étapes sont nécessaires pour obtenir un signal SPR exploitable.

Dans le domaine des puces à peptides, Corn et son équipe ont réalisé un système de mesure par imagerie SPR (Wegner et al., 2002; Wegner et al., 2004), mais le protocole utilisé pour la conception de la puce nécessite plusieurs étapes relativement longues: obtention d'une surface présentant des groupements thiols protégés, déprotection de ces groupements, fixation

d'un espaceur et fixation des peptides. Les auteurs présentent un système micro-fluidique intéressant, mais ils n'ont pas abordé la possibilité d'analyser des échantillons biologiques complexes.

### **3-2 Application des puces à peptides**

Les expériences de mise au point avec les sérums non dilués nous ont permis de franchir le pas pour analyser des sérums de patients. L'application abordée dans l'article 4 est issue de l'hypothèse selon laquelle la réponse humorale (Ac) est variable selon les individus et dépend de certains critères cliniques. La question posée dans cette étude préliminaire est la suivante: est-ce qu'une différence de profil des Ac est détectable avec les puces ? Pour répondre à cette question, nous avons construit une puce avec une dizaine de peptides du VHC et nous avons analysé une dizaine de sérums de patients infectés par le VHC. Les résultats obtenus montrent que le système permet une évaluation de la spécificité et de l'affinité des Ac pour chaque patient (le choix de patients ayant résolu l'infection a été conditionné par la localisation de l'appareil permettant les mesures SPR, ce qui n'était pas compatible avec l'utilisation d'échantillons infectieux). Ces résultats ouvrent de belles perspectives.

Ainsi, à court terme, en élargissant cette étude préliminaire, il sera intéressant d'évaluer s'il y a une corrélation entre la qualité de la réponse humorale et l'évolution naturelle ou après traitement de l'hépatite C. Dans ce cas, l'analyse du profil des Ac (spécificité, quantité et avidité) pour chaque patient sera déterminée ; ces données seront analysées par rapport au stade de la maladie, de son évolution et de la réponse au traitement. Ainsi, nous avons entrepris la comparaison des profils d'Ac entre différents groupes de patients infectés par le VHC présentant des stades différents de la maladie. Dans un premier temps nous avons choisi de faire une étude transversale, celle-ci porte sur trois groupes de patients présentant soit une hépatite chronique (18), une cirrhose (21) ou un hépatocarcinome (8). Afin de faciliter l'analyse des résultats, les patients choisis ont une dispersion de sexe égale, un même mode de contamination par le virus, pas de complication alcoolique et pas de co-infection (VIH = Virus de l'Immunodéficience Humain ou VHB), ces échantillons sont fournis par le service d'Hépatogastro-Entérologie du CHU de Grenoble. Ces sérums sont analysés sur une puce avec 56 peptides. Ces peptides, d'une vingtaine d'acides aminés, sont issus des différentes protéines du VHC et d'un même génotype. Ces séquences ont été choisies selon une variabilité moindre et une bonne hydrophilicité, ils sont synthétisés selon la

deuxième chimie de modification avec le pyrrole. Cette étude est actuellement en cours. Les résultats seront analysés en prenant en compte deux paramètres importants dans la caractérisation d'une réponse humorale : la spécificité des Ac et leur affinité. Des tests statistiques (Mann-Whitney et Wilcoxon) permettront d'établir s'il y a ou non une corrélation entre le profil des Ac et les différentes données cliniques dont nous disposons (stade de la maladie, réponse ou non à un traitement, charge virale...). Cette étude sera complétée par une analyse longitudinale afin de savoir si la modification du profil des Ac suit ou précède l'évolution de la maladie. Les données issues de cette étude devraient permettre d'établir un profil d'Ac pour le diagnostic mais surtout pour le pronostic de l'évolution de la maladie.

A long terme, puisque la technologie des puces développée n'est pas restreinte aux peptides (technologie validée pour l'ADN, protéines, peptides et oligosaccharides), il sera intéressant de réaliser une puce portant à sa surface les peptides d'intérêt pour l'analyse des Ac, des molécules sondes pour les marqueurs de fibrose et des oligonucléotides pour les données génotypiques. En effet, le stade de fibrose, donnée essentielle dans le suivi de la maladie, est actuellement évalué à partir de biopsies hépatiques, procédé lourd et invasif. Des études récentes montrent une corrélation entre la présence de certains marqueurs sérologiques (peptide du procollagène type III et métalloprotéase matricielle 1 (Leroy et al., 2004)) et le score Métavir, ou des marqueurs protéiques circulants (vibronectine (Paradis et al., 2005)) pour le diagnostic de l'hépatocarcinome. Une telle puce devrait permettre, à partir d'un seul échantillon (sérum ou plasma), d'avoir une analyse diagnostic et/ou pronostic de l'évolution de la maladie et de l'état de fibrose du foie, deux paramètres essentiels dans le suivi et le traitement de l'hépatite C. Elle constituerait un outil performant permettant de limiter les prélèvements invasifs sur les patients, tout en aidant à la prise de décision concernant la thérapie à mettre en œuvre.

#### **4- Conclusions**

Le but de ce travail est de concevoir des puces à protéines/peptides permettant l'étude des interactions biomoléculaires par imagerie SPR. Nous avons pu réaliser des puces à protéines/peptides par chimie de couplage au pyrrole et électropolymérisation sur des surfaces dorées. Nous avons validé la reconnaissance biologique sur la puce par fluorescence et par imagerie SPR à travers les différents modèles utilisés dans cette étude. Ensuite, nous avons utilisé notre système dans une application directe dans le but d'étudier des interactions protéines-protéines (nucléoprotéines-CD32), et enfin, nous avons pu effectuer des analyses quantitatives pour la détermination des constantes d'affinité (Ag-Ac).

De plus, le système développé amène des éléments supplémentaires dans le domaine des puces à peptides par rapport à l'état de l'art. L'originalité et l'intérêt principale de notre système sont : la grande simplicité dans la réalisation de la puce et la neutralité de celle-ci vis-à-vis d'autres molécules existants dans l'échantillon du fait qu'elle ne génère qu'un très faible bruit de fond. Elle est compatible avec l'analyse de fluides biologiques complexes tels que du sérum, plasma, urine ou liquide céphalorachidien. Par ailleurs, la technologie utilisée pour la réalisation des puces a été validée avec d'autres molécules (ADN, Oligosaccharides), ceci représente un grand avantage du fait qu'il est possible de préparer une puce comportant différents types de molécules. Une telle puce représente un grand intérêt aussi bien pour la recherche fondamentale et clinique que pour le diagnostic.

## **Références bibliographiques**

## A-B

- Afanassiev, V., Hanemann, V. and Wolf, S.** (2000). Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film. *Nucleic Acids Res* **28**, E66.
- Alivisatos, A. P.** (1996). Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science* **271**, 933-7.
- Angenendt, P., Glokler, J., Sobek, J., Lehrach, H. and Cahill, D. J.** (2003). Next generation of protein microarray support materials: evaluation for protein and antibody microarray applications. *J Chromatogr A* **1009**, 97-104.
- Arenkov, P., Kukhtin, A., Gemmell, A., Voloshchuk, S., Chupeeva, V. and Mirzabekov, A.** (2000). Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. *Anal Biochem* **278**, 123-31.
- Ast, T., Heine, N., Germeroth, L., Schneider-Mergener, J. and Wenschuh, H.** (1999). Efficient parallel synthesis of peptomers and peptoids on membranes. *Tetrahedron Lettre* **40**, 4317-8.
- Avseenko, N. V., Morozova, T. Y., Ataullakhanov, F. I. and Morozov, V. N.** (2002). Immunoassay with multicomponent protein microarrays fabricated by electrospray deposition. *Anal Chem* **74**, 927-33.
- Azamian, B. R., Davis, J. J., Coleman, K. S., Bagshaw, C. B. and Green, M. L.** (2002). Bioelectrochemical single-walled carbon nanotubes. *J Am Chem Soc* **124**, 12664-5.
- Bartosch, B., Dubuisson, J. and Cosset, F. L.** (2003). Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med* **197**, 633-42.
- Batallan, A., Faucher, P., Poncelet, C., Demaria, F., Benifla, J. L. and Madelenat, P.** (2003). [Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: recent news about the benefit of caesarean sections]. *Gynecol Obstet Fertil* **31**, 964-8.
- Belec, L., Legoff, J., Si-Mohamed, A., Bloch, F., Mbopi Keou, F. X., Becquart, P., Matta, M., Prazuck, T., Petite, J. P., Gutmann, L. et al.** (2003). Mucosal humoral immune response to hepatitis C virus E1/E2 surface glycoproteins and HCV shedding in saliva and cervicovaginal fluids from chronically HCV-infected patients. *J Hepatol* **38**, 833-42.
- Belov, L., de la Vega, O., dos Remedios, C. G., Mulligan, S. P. and Christopherson, R. I.** (2001). Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. *Cancer Res* **61**, 4483-9.
- Benoit, M., Gabriel, D., Gerisch, G. and Gaub, H. E.** (2000). Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat Cell Biol* **2**, 313-7.

- Benters, R., Niemeyer, C. M. and Woehle, D.** (2001). Dendrimer-activated solid supports for nucleic acid and protein microarrays. *Chembiochem* **2**, 686-94.
- Bhattacharjee, V., Prescott, L. E., Pike, I., Rodgers, B., Bell, H., El-Zayadi, A. R., Kew, M. C., Conradie, J., Lin, C. K., Marsden, H. et al.** (1995). Use of NS-4 peptides to identify type-specific antibody to hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3, 4, 5 and 6. *J Gen Virol* **76** ( Pt 7), 1737-48.
- Bigger, C. B., Brasky, K. M. and Lanford, R. E.** (2001). DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. *J Virol* **75**, 7059-66.
- Boas, U. and Heegaard, P. M.** (2004). Dendrimers in drug research. *Chem Soc Rev* **33**, 43-63.
- Borch, J. and Roepstorff, P.** (2004). Screening for enzyme inhibitors by surface plasmon resonance combined with mass spectrometry. *Anal Chem* **76**, 5243-8.
- Bousse, L., Mouradian, S., Minalla, A., Yee, H., Williams, K. and Dubrow, R.** (2001). Protein sizing on a microchip. *Anal Chem* **73**, 1207-12.
- Braden, B. C., Souchon, H., Eisele, J. L., Bentley, G. A., Bhat, T. N., Navaza, J. and Poljak, R. J.** (1994). Three-dimensional structures of the free and the antigen-complexed Fab from monoclonal anti-lysozyme antibody D44.1. *J Mol Biol* **243**, 767-81.
- Buckle, M.** (2001). Surface plasmon resonance applied to DNA-protein complexes. *Methods Mol. Biol.* **148**, 535-46.

## C-D

- Cha, T., Guo, A., Jun, Y., Pei, D. and Zhu, X. Y.** (2004). Immobilization of oriented protein molecules on poly(ethylene glycol)-coated Si(111). *Proteomics* **4**, 1965-76.
- Chang, K. M., Thimme, R., Melpolder, J. J., Oldach, D., Pemberton, J., Moorhead-Loudis, J., McHutchison, J. G., Alter, H. J. and Chisari, F. V.** (2001). Differential CD4(+) and CD8(+) T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology* **33**, 267-76.
- Charles, P. T., Goldman, E. R., Rangasammy, J. G., Schauer, C. L., Chen, M. S. and Taitt, C. R.** (2004). Fabrication and characterization of 3D hydrogel microarrays to measure antigenicity and antibody functionality for biosensor applications. *Biosens Bioelectron* **20**, 753-64.
- Chen, X., Wu, H., Mao, C. and Whitesides, G. M.** (2002). A prototype two-dimensional capillary electrophoresis system fabricated in poly(dimethylsiloxane). *Anal Chem* **74**, 1772-8.

- Chen, X., Xuan, M. and Wu, D.** (1999). [Study of superinfection of HBV and HCV]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* **20**, 141-3.
- Chiu, D. T., Jeon, N. L., Huang, S., Kane, R. S., Wargo, C. J., Choi, I. S., Ingber, D. E. and Whitesides, G. M.** (2000). Patterned deposition of cells and proteins onto surfaces by using three-dimensional microfluidic systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2408-13.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W. and Houghton, M.** (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* **244**, 359-62.
- Choo, Q. L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C., Gallegos, C., Coit, D., Medina-Selby, R., Barr, P. J. et al.** (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2451-5.
- Coffinier, Y., Olivier, C., Perzyna, A., Grandidier, B., Wallart, X., Durand, J. O., Melnyk, O. and Stievenard, D.** (2005). Semicarbazide-functionalized Si(111) surfaces for the site-specific immobilization of peptides. *Langmuir* **21**, 1489-96.
- Coleman, M. A., Miller, K. A., Beernink, P. T., Yoshikawa, D. M. and Albala, J. S.** (2003). Identification of chromatin-related protein interactions using protein microarrays. *Proteomics* **3**, 2101-7.
- Crotta, S., Stilla, A., Wack, A., D'Andrea, A., Nuti, S., D'Oro, U., Mosca, M., Filliponi, F., Brunetto, R. M., Bonino, F. et al.** (2002). Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* **195**, 35-41.
- Dabbousi, B. O., Rodriguez-Viejo, J., Mikulec, F. V., Heine, J. R., Mattoussi, H., Ober, R., Jensen, K. F. and Bawendi, M. G.** (1997). (CdSe)ZnS Core-Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites. *J Phys Chem* **101**, 9463-75.
- Davis, J. J., Green, M. L., Hill, H. A., Leung, P. P., Sadler, P. J., Sloan, J., Xavier, A. V. and Tsang, S. C.** (1998). The immobilization of proteins in carbon nanotubes. *Inorg. Chem. Acta* **272**, 261-6.
- De Feijter, J. A., Benjamins, J. and Veer, F. A.** (1978). Ellipsometry as a tool to study the adsorption behaviour of synthetic and biopolymers at the air-water interface. *Biopolymers* **17**, 1759-72.
- Dolganiuc, A., Kodys, K., Kopasz, A., Marshall, C., Mandrekar, P. and Szabo, G.** (2003). Additive inhibition of dendritic cell allostimulatory capacity by alcohol and hepatitis C is not restored by DC maturation and involves abnormal IL-10 and IL-2 induction. *Alcohol Clin Exp Res* **27**, 1023-31.
- Dostmann, W. R., Taylor, M. S., Nickl, C. K., Brayden, J. E., Frank, R. and Tegge, W. J.** (2000). Highly specific, membrane-permeant peptide blockers of cGMP-dependent protein kinase I $\alpha$  inhibit NO-induced cerebral dilation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14772-7.
- Dufes, C., Uchegbu, I. F. and Schatzlein, A. G.** (2005). Dendrimers in gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 2177-202.

## E-F

- Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. and Bienz, K.** (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**, 5974-84.
- Eisen-Vandervelde, A. L., Waggoner, S. N., Yao, Z. Q., Cale, E. M., Hahn, C. S. and Hahn, Y. S.** (2004). Hepatitis C virus core selectively suppresses interleukin-12 synthesis in human macrophages by interfering with AP-1 activation. *J Biol Chem* **279**, 43479-86.
- Ekins, R. and Chu, F.** (1992). Multianalyte microspot immunoassay. The microanalytical 'compact disk' of the future. *Ann Biol Clin (Paris)* **50**, 337-53.
- Ekins, R., Chu, F. and Biggart, E.** (1990). Multispot, multianalyte, immunoassay. *Ann Biol Clin (Paris)* **48**, 655-66.
- Ekins, R. P.** (1989). Multi-analyte immunoassay. *J Pharm Biomed Anal* **7**, 155-68.
- Emrich, C. A., Tian, H., Medintz, I. L. and Mathies, R. A.** (2002). Microfabricated 384-lane capillary array electrophoresis bioanalyzer for ultrahigh-throughput genetic analysis. *Anal Chem* **74**, 5076-83.
- Eren, R., Landstein, D., Terkieltaub, D., Nussbaum, O., Zauberman, A., Ben-Porath, J., Gopher, J., Buchnick, R., Kovjazin, R., Rosenthal-Galili, Z. et al.** (2006). Preclinical Evaluation of Two Neutralizing Human Monoclonal Antibodies against Hepatitis C Virus (HCV): a Potential Treatment To Prevent HCV Reinfection in Liver Transplant Patients. *J Virol* **80**, 2654-64.
- Ericson, C., Holm, J., Ericson, T. and Hjerten, S.** (2000). Electroosmosis- and pressure-driven chromatography in chips using continuous beds. *Anal Chem* **72**, 81-7.
- Falsey, J. R., Renil, M., Park, S., Li, S. and Lam, K. S.** (2001). Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjug Chem* **12**, 346-53.
- Fano, U.** (1941). The theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces (Sommerfeld's waves). *J Opt Soc Am* **31**, 213-22.
- Florin, E. L., Moy, V. T. and Gaub, H. E.** (1994). Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science* **264**, 415-7.
- Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T. and Solas, D.** (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **251**, 767-73.

- Forns, X., Payette, P. J., Ma, X., Satterfield, W., Eder, G., Mushahwar, I. K., Govindarajan, S., Davis, H. L., Emerson, S. U., Purcell, R. H. et al. (2000). Vaccination of chimpanzees with plasmid DNA encoding the hepatitis C virus (HCV) envelope E2 protein modified the infection after challenge with homologous monoclonal HCV. *Hepatology* **32**, 618-25.
- Frank, R. and Overwin, H. (1996). SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods Mol Biol* **66**, 149-69.
- Frese, M., Pietschmann, T., Moradpour, D., Haller, O. and Bartenschlager, R. (2001). Interferon-alpha inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by an MxA-independent pathway. *J Gen Virol* **82**, 723-33.
- Fu, A. Y., Spence, C., Scherer, A., Arnold, F. H. and Quake, S. R. (1999). A microfabricated fluorescence-activated cell sorter. *Nat Biotechnol* **17**, 1109-11.
- Fuchs, A. B., Romani, A., Freida, D., Medoro, G., Abonnenc, M., Altomare, L., Chartier, I., Guergour, D., Villiers, C., Marche, P. N. et al. (2006). Electronic sorting and recovery of single live cells from microlitre sized samples. *Lab Chip* **6**, 121-6.
- Fukui, S., Feizi, T., Galustian, C., Lawson, A. M. and Chai, W. (2002). Oligosaccharide microarrays for high-throughput detection and specificity assignments of carbohydrate-protein interactions. *Nat Biotechnol* **20**, 1011-7.
- electrophoresis on a microchip. *Anal Chem* **73**, 2669-74.
- Goutagny, N., Fatmi, A., De Ledinghen, V., Penin, F., Couzigou, P., Inchauspe, G. and Bain, C. (2003). Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* **187**, 1951-8.
- Graham, D. L., Ferreira, H. A., Freitas, P. P. and Cabral, J. M. (2003). High sensitivity detection of molecular recognition using magnetically labelled biomolecules and magnetoresistive sensors. *Biosens Bioelectron* **18**, 483-8.
- Grandbois, M., Dettmann, W., Benoit, M. and Gaub, H. E. (2000). Affinity imaging of red blood cells using an atomic force microscope. *J Histochem Cytochem* **48**, 719-24.
- Green, R. J., Frazier, R. A., Shakesheff, K. M., Davies, M. C., Roberts, C. J. and Tendler, S. J. (2000). Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials* **21**, 1823-35.
- Griebel, A., Rund, S., Schonfeld, F., Dorner, W., Konrad, R. and Hardt, S. (2004). Integrated polymer chip for two-dimensional capillary gel electrophoresis. *Lab Chip* **4**, 18-23.
- Gustafsson, M., Hirschberg, D., Palmberg, C., Jornvall, H. and Bergman, T. (2004). Integrated sample preparation and MALDI mass spectrometry on a microfluidic compact disk. *Anal Chem* **76**, 345-50.

## G

- Gao, X., Cui, Y., Levenson, R. M., Chung, L. W. and Nie, S. (2004). In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* **22**, 969-76.
- Ge, H. (2000). UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-DNA, protein-RNA and protein-ligand interactions. *Nucleic Acids Res* **28**, e3.
- Goffard, A. and Dubuisson, J. (2003). Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie* **85**, 295-301.
- Gonzales, N. R., Schuck, P., Schlom, J. and Kashmiri, S. V. (2002). Surface plasmon resonance-based competition assay to assess the sera reactivity of variants of humanized antibodies. *J Immunol Methods* **268**, 197-210.
- Gotoh, M., Hasebe, M., Ohira, T., Hasegawa, Y., Shinohara, Y., Sota, H., Nakao, J. and Tosu, M. (1997). Rapid method for detection of point mutations using mismatch binding protein (MutS) and an optical biosensor. *Genet Anal* **14**, 47-50.
- Gottschlich, N., Jacobson, S. C., Culbertson, C. T. and Ramsey, J. M. (2001). Two-dimensional electrochromatography/capillary

## H

- Haab, B. B., Dunham, M. J. and Brown, P. O. (2001). Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol* **2**, RESEARCH0004.
- Habersetzer, F., Fournillier, A., Dubuisson, J., Rosa, D., Abrignani, S., Wychowski, C., Nakano, I., Trepo, C., Desgranges, C. and Inchauspe, G. (1998). Characterization of human monoclonal antibodies specific to the hepatitis C virus glycoprotein E2 with in vitro binding neutralization properties. *Virology* **249**, 32-41.
- Han, M., Gao, X., Su, J. Z. and Nie, S. (2001). Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat Biotechnol* **19**, 631-5.
- Hansen, K. M., Ji, H. F., Wu, G., Datar, R., Cote, R., Majumdar, A. and Thundat, T. (2001). Cantilever-based optical deflection assay for discrimination of DNA single-nucleotide mismatches. *Anal Chem* **73**, 1567-71.
- Hansen, K. M. and Thundat, T. (2005). Microcantilever biosensors. *Methods* **37**, 57-64.
- Heaney, J., Barrett, T. and Cosby, S. L. (2002). Inhibition of in vitro leukocyte proliferation by morbilliviruses. *J Virol* **76**, 3579-84.

- Heinze, J.** (1991). Electrochemistry of conducting polymers. *Synth Met* **43**, 1805-23.
- Heller, T., Saito, S., Auerbach, J., Williams, T., Moreen, T. R., Jazwinski, A., Cruz, B., Jeurkar, N., Sapp, R., Luo, G. et al.** (2005). An in vitro model of hepatitis C virion production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2579-83.
- Hellier, S., Frodsham, A. J., Hennig, B. J., Klenerman, P., Knapp, S., Ramaley, P., Satsangi, J., Wright, M., Zhang, L., Thomas, H. C. et al.** (2003). Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology* **38**, 1468-76.
- Herr, A. E., Molho, J. I., Drouvalakis, K. A., Mikkelsen, J. C., Utz, P. J., Santiago, J. G. and Kenny, T. W.** (2003). On-chip coupling of isoelectric focusing and free solution electrophoresis for multidimensional separations. *Anal Chem* **75**, 1180-7.
- Hifumi, E., Kubota, N., Niimi, Y., Shimizu, K., Egashira, N. and Uda, T.** (2002). Elimination of ingredients effect to improve the detection of anti HIV-1 p24 antibody in human serum using SPR apparatus. *Anal Sci* **18**, 863-7.
- Higgins, S.** (1997). Conjugated polymers incorporating pendant functional groups – synthesis and characterization. *Chem Soc Reviews* **26**, 247-58.
- Hiller, R., Laffer, S., Harwanegg, C., Huber, M., Schmidt, W. M., Twardosz, A., Barletta, B., Becker, W. M., Blaser, K., Breiteneder, H. et al.** (2002). Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *Faseb J* **16**, 414-6.
- Hirsch, L. R., Jackson, J. B., Lee, A., Halas, N. J. and West, J. L.** (2003a). A whole blood immunoassay using gold nanoshells. *Anal Chem* **75**, 2377-81.
- Hirsch, L. R., Stafford, R. J., Bankson, J. A., Sershen, S. R., Rivera, B., Price, R. E., Hazle, J. D., Halas, N. J. and West, J. L.** (2003b). Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13549-54.
- Hofgartner, W. T., Huhmer, A. F., Landers, J. P. and Kant, J. A.** (1999). Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis using microchip electrophoresis of PCR products. *Clin Chem* **45**, 2120-8.
- Hofmann, O., Che, D., Cruickshank, K. A. and Muller, U. R.** (1999). Adaptation of capillary isoelectric focusing to microchannels on a glass chip. *Anal Chem* **71**, 678-86.
- Homola, J., Dostalek, J., Chen, S., Rasooly, A., Jiang, S. and Yee, S. S.** (2002). Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. *Int J Food Microbiol* **75**, 61-9.
- Houseman, B. T., Huh, J. H., Kron, S. J. and Mrksich, M.** (2002). Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity. *Nat Biotechnol* **20**, 270-4.
- Houseman, B. T. and Mrksich, M.** (2002). Carbohydrate arrays for the evaluation of protein binding and enzymatic modification. *Chem Biol* **9**, 443-54.
- Hu, Y., Das, A., Hecht, M. H. and Scoles, G.** (2005). Nanografting de novo proteins onto gold surfaces. *Langmuir* **21**, 9103-9.
- Huang, R. P., Huang, R., Fan, Y. and Lin, Y.** (2001). Simultaneous detection of multiple cytokines from conditioned media and patient's sera by an antibody-based protein array system. *Anal Biochem* **294**, 55-62.
- Hui, C. K., Yuen, M. F., Sablon, E., Chan, A. O., Wong, B. C. and Lai, C. L.** (2003). Interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C virus genotype 6: a comparison with genotype 1. *J Infect Dis* **187**, 1071-4.

## I-J

- Ihre, H. R., Padilla De Jesus, O. L., Szoka, F. C., Jr. and Frechet, J. M.** (2002). Polyester dendritic systems for drug delivery applications: design, synthesis, and characterization. *Bioconjug Chem* **13**, 443-52.
- Iijima, S.** (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **354**, 56-8.
- Iijima, S. and Ichihashi, T.** (1993). Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* **363**, 603-5.
- Jessner, W., Stauber, R., Hackl, F., Datz, C., Watkins-Riedel, T., Hofer, H., Gangl, A., Kessler, H. and Ferenci, P.** (2003). Early viral kinetics on treatment with pegylated interferon-alpha-2a in chronic hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Viral Hepat* **10**, 37-42.
- Jolivet-Reynaud, C., Dalbon, P., Viola, F., Yvon, S., Paranhos-Baccala, G., Piga, N., Bridon, L., Trabaud, M. A., Battail, N., Sibai, G. et al.** (1998). HCV core immunodominant region analysis using mouse monoclonal antibodies and human sera: characterization of major epitopes useful for antigen detection. *J Med Virol* **56**, 300-9.
- Joos, T. O., Schrenk, M., Hopfl, P., Kroger, K., Chowdhury, U., Stoll, D., Schorner, D., Durr, M., Herick, K., Rupp, S. et al.** (2000). A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis* **21**, 2641-50.
- Jordan, C. E., Frutos, A. G., Thiel, A. J. and Corn, R. M.** (1997). Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA hybridization adsorption and streptavidin/DNA multilayer formation at chemically modified gold surfaces. *Anal Chem* **69**, 4939-47.

## K

- Kanda, V., Kariuki, J. K., Harrison, D. J. and McDermott, M. T.** (2004). Label-free reading of microarray-based immunoassays with surface plasmon resonance imaging. *Anal Chem* **76**, 7257-62.
- Kannan, B., Castelino, K., Chen, F. F. and Majumdar, A.** (2006). Lithographic techniques and surface chemistries for the fabrication of PEG-passivated protein microarrays. *Biosens Bioelectron.*
- Karlsson, R., Michaelsson, A. and Mattsson, L.** (1991). Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J Immunol Methods* **145**, 229-40.
- Karlsson, R. and Stahlberg, R.** (1995). Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities. *Anal Biochem* **228**, 274-80.
- Kato, R., Kunimatsu, M., Fujimoto, S., Kobayashi, T. and Honda, H.** (2004). Angiotensin II inhibitory peptide found in the receptor sequence using peptide array. *Biochem Biophys Res Commun* **315**, 22-9.
- Katz, E. and Willner, I.** (2004). Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: applications in nanobioelectronics. *Chemphyschem* **5**, 1084-104.
- Khan, M. K., Nigavekar, S. S., Minc, L. D., Kariapper, M. S., Nair, B. M., Lesniak, W. G. and Balogh, L. P.** (2005). In vivo biodistribution of dendrimers and dendrimer nanocomposites -- implications for cancer imaging and therapy. *Technol Cancer Res Treat* **4**, 603-13.
- Kheterpal, I., Scherer, J. R., Clark, S. M., Radhakrishnan, A., Ju, J., Ginther, C. L., Sensabaugh, G. F. and Mathies, R. A.** (1996). DNA sequencing using a four-color confocal fluorescence capillary array scanner. *Electrophoresis* **17**, 1852-9.
- Kim, J. Y., Lee, M. H., Jung, K. I., Na, H. Y., Cha, H. S., Ko, E. M. and Kim, T. J.** (2003). Detection of antibodies against glucose 6-phosphate isomerase in synovial fluid of rheumatoid arthritis using surface plasmon resonance (BIAcore). *Exp Mol Med* **35**, 310-6.
- Kim, S., Lim, Y. T., Soltész, E. G., De Grand, A. M., Lee, J., Nakayama, A., Parker, J. A., Mihaljevic, T., Laurence, R. G., Dor, D. M. et al.** (2004). Near-infrared fluorescent type II quantum dots for sentinel lymph node mapping. *Nat Biotechnol* **22**, 93-7.

- Kittlesen, D. J., Chianese-Bullock, K. A., Yao, Z. Q., Braciale, T. J. and Hahn, Y. S.** (2000). Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* **106**, 1239-49.
- Kiyonaka, S., Sada, K., Yoshimura, I., Shinkai, S., Kato, N. and Hamachi, I.** (2004). Semi-wet peptide/protein array using supramolecular hydrogel. *Nat Mater* **3**, 58-64.
- Kondo, K., Suwa, M., Ozaki, A. and Takemoto, K.** (1992). Synthesis and electrochemical analysis of N-substituted pyrrole compounds. *J Electroanal Chem* **333**, 143-51.
- Kopp, M. U., Mello, A. J. and Manz, A.** (1998). Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip. *Science* **280**, 1046-8.
- Kretschmann, E. and Raether, H.** (1968). Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light. *Z Naturforsch* **23A**, 2135-6.
- Kusnezow, W., Jacob, A., Walijew, A., Diehl, F. and Hoheisel, J. D.** (2003). Antibody microarrays: an evaluation of production parameters. *Proteomics* **3**, 254-64.

## L

- Landers, J. P.** (2003). Molecular diagnostics on electrophoretic microchips. *Anal Chem* **75**, 2919-27.
- Large, M. K., Kittlesen, D. J. and Hahn, Y. S.** (1999). Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *J Immunol* **162**, 931-8.
- Larkin, J. E., Frank, B. C., Gaspard, R. M., Duka, I., Gavras, H. and Quackenbush, J.** (2004). Cardiac transcriptional response to acute and chronic angiotensin II treatments. *Physiol Genomics* **18**, 152-66.
- Lechner, F., Wong, D. K., Dunbar, P. R., Chapman, R., Chung, R. T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P. and Walker, B. D.** (2000). Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* **191**, 1499-512.
- Lee, J. W., Sim, S. J., Cho, S. M. and Lee, J.** (2005). Characterization of a self-assembled monolayer of thiol on a gold surface and the fabrication of a biosensor chip based on surface plasmon resonance for detecting anti-GAD antibody. *Biosens Bioelectron* **20**, 1422-7.
- Lee, S. J. and Lee, S. Y.** (2004). Microarrays of peptides elevated on the protein layer for efficient protein kinase assay. *Anal Biochem* **330**, 311-6.
- Lerat, H., Rumin, S., Habersetzer, F., Berby, F., Trabaud, M. A., Trepo, C. and Inchauspe, G.** (1998). In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* **91**, 3841-9.

- Leroy, V., Monier, F., Bottari, S., Trocme, C., Sturm, N., Hilleret, M. N., Morel, F. and Zarski, J. P. (2004). Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* **99**, 271-9.
- Leroy, V., Vigan, L., Mosnier, J. F., Dufeu-Duchesne, T., Pernollet, M., Zarski, J. P., Marche, P. N. and Jouvin-Marche, E. (2003). Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* **38**, 829-41.
- Leruez-Ville, M., Kunstmann, J. M., De Almeida, M., Rouzioux, C. and Chaix, M. L. (2000). Detection of hepatitis C virus in the semen of infected men. *Lancet* **356**, 42-3.
- Lesaicherre, M. L., Lue, R. Y., Chen, G. Y., Zhu, Q. and Yao, S. Q. (2002a). Intein-mediated biotinylation of proteins and its application in a protein microarray. *J Am Chem Soc* **124**, 8768-9.
- Lesaicherre, M. L., Uttamchandani, M., Chen, G. Y. and Yao, S. Q. (2002b). Developing site-specific immobilization strategies of peptides in a microarray. *Bioorg Med Chem Lett* **12**, 2079-83.
- Li, Y., Buch, J. S., Rosenberger, F., DeVoe, D. L. and Lee, C. S. (2004). Integration of isoelectric focusing with parallel sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis for multidimensional protein separations in a plastic microfluidic [correction of microfluidic] network. *Anal Chem* **76**, 742-8.
- Licha, K., Bhargava, S., Becker, A., Schneider-Mergener, J. and Volkmer-Engert, R. (2000). Highly parallel nano-synthesis of cleavable peptide-dye conjugates on cellulose membranes. *Tetrahedron Lett* **41**, 1711-5.
- Liedberg, B., Lundström, I. and Stenberg, E. (1993). Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. *Sens Actuators B* **11**, 63-72.
- Liedberg, B., Nylander, C. and Lundström, I. (1983). Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sens Actuators* **4**, 299-304.
- Liljebblad, M., Ryden, I., Ohlson, S., Lundblad, A. and Pahlsson, P. (2001). A lectin immunosensor technique for determination of alpha(1)-acid glycoprotein fucosylation. *Anal Biochem* **288**, 216-24.
- Lin, Y., Huang, R., Chen, L. P., Lisoukov, H., Lu, Z. H., Li, S., Wang, C. C. and Huang, R. P. (2003). Profiling of cytokine expression by biotin-labeled-based protein arrays. *Proteomics* **3**, 1750-7.
- Liu, R. H., Yang, J., Lenigk, R., Bonanno, J. and Grodzinski, P. (2004). Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection. *Anal Chem* **76**, 1824-31.
- Livache, T., Bazin, H., Caillat, P. and Roget, A. (1998a). Electroconducting polymers for the construction of DNA or peptide arrays on silicon chips. *Biosens Bioelectron* **13**, 629-34.
- Livache, T., Fouque, B., Roget, A., Marchand, J., Bidan, G., Teoule, R. and Mathis, G. (1998b). Polypyrrole DNA chip on a silicon device: example of hepatitis C virus genotyping. *Anal Biochem* **255**, 188-94.
- Livache, T., Roget, A., Dejean, E., Barthet, C., Bidan, G. and Teoule, R. (1994). Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Res* **22**, 2915-21.
- Loiseau, F., Campagna, S., Hameurlaine, A. and Dehaen, W. (2005). Dendrimers made of porphyrin cores and carbazole chromophores as peripheral units. Absorption spectra, luminescence properties, and oxidation behavior. *J Am Chem Soc* **127**, 11352-63.
- Lopez, M. F. and Pluskal, M. G. (2003). Protein micro- and macroarrays: digitizing the proteome. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **787**, 19-27.
- Lovat, V., Pantarotto, D., Lagostena, L., Cacciari, B., Grandolfo, M., Righi, M., Spalluto, G., Prato, M. and Ballerini, L. (2005). Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling. *Nano Lett* **5**, 1107-10.
- Lue, R. Y., Chen, G. Y., Hu, Y., Zhu, Q. and Yao, S. Q. (2004). Versatile protein biotinylation strategies for potential high-throughput proteomics. *J Am Chem Soc* **126**, 1055-62.
- Lueking, A., Horn, M., Eickhoff, H., Bussow, K., Lehrach, H. and Walter, G. (1999). Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Anal Biochem* **270**, 103-11.
- Lueking, A., Possling, A., Huber, O., Beveridge, A., Horn, M., Eickhoff, H., Schuchardt, J., Lehrach, H. and Cahill, D. J. (2003). A nonredundant human protein chip for antibody screening and serum profiling. *Mol Cell Proteomics* **2**, 1342-9.
- Luo, K., Zhou, P. and Lodish, H. F. (1995). The specificity of the transforming growth factor beta receptor kinases determined by a spatially addressable peptide library. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11761-5.

## M-N

- MacBeath, G. and Schreiber, S. L. (2000). Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* **289**, 1760-3.
- Major, M. E., Dahari, H., Mihalik, K., Puig, M., Rice, C. M., Neumann, A. U. and Feinstone, S. M. (2004). Hepatitis C virus kinetics and host responses associated with disease and outcome of infection in chimpanzees. *Hepatology* **39**, 1709-20.

## O-P

- Mao, Q. and Pawliszyn, J.** (1999). Demonstration of isoelectric focusing on an etched quartz chip with UV adsorption imaging detection. *Analyst* **124**, 637.
- Marie, J. C., Kehren, J., Trescol-Biemont, M. C., Evtashev, A., Valentin, H., Walzer, T., Tedone, R., Loveland, B., Nicolas, J. F., Rabourdin-Combe, C. et al.** (2001). Mechanism of measles virus-induced suppression of inflammatory immune responses. *Immunity* **14**, 69-79.
- Marie, J. C., Saltel, F., Escola, J. M., Jurdic, P., Wild, T. F. and Horvat, B.** (2004). Cell surface delivery of the measles virus nucleoprotein: a viral strategy to induce immunosuppression. *J Virol* **78**, 11952-61.
- Mattson, M. P., Haddon, R. C. and Rao, A. M.** (2000). Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth. *J Mol Neurosci* **14**, 175-82.
- McDonnell, J. M.** (2001). Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 572-7.
- Melendez, J., Carr, R., Bartholomew, D. U., Kukanskis, K., Elkind, J., Yee, S., Furlong, C. and Woodbury, R.** (1996). A commercial solution for surface plasmon sensing. *Sens Actuators B* **35**, 212-16.
- Menez, R., Bossus, M., Muller, B. H., Sibai, G., Dalbon, P., Ducancel, F., Jolivet-Reynaud, C., Stura, E. A.** (2003). Crystal structure of a hydrophobic immunodominant antigenic site on hepatitis C virus core protein complexed to monoclonal antibody 19D9D6. *J. Immunol.* **170**, 1917-24.
- Michaud, G. A., Salcius, M., Zhou, F., Bangham, R., Bonin, J., Guo, H., Snyder, M., Predki, P. F. and Schweitzer, B. I.** (2003). Analyzing antibody specificity with whole proteome microarrays. *Nat Biotechnol* **21**, 1509-12.
- Min, D. H., Su, J. and Mrksich, M.** (2004). Profiling kinase activities by using a peptide chip and mass spectrometry. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**, 5973-7.
- Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C. and Storhoff, J. J.** (1996). A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials. *Nature* **382**, 607-9.
- Moody, M. D., Van Arsdell, S. W., Murphy, K. P., Orencole, S. F. and Burns, C.** (2001). Array-based ELISAs for high-throughput analysis of human cytokines. *Biotechniques* **31**, 186-90, 192-4.
- Murray, C. B., Norris, D. J. and Bawendi, M. G.** (1993). Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = s, Se, Te) semiconductor nanocrystallites. *J Am Chem Soc* **115**, 8706-15.
- Nazif, T. and Bogyo, M.** (2001). Global analysis of proteasomal substrate specificity using positional-scanning libraries of covalent inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2967-72.
- Negm, R. S., Verma, M. and Srivastava, S.** (2002). The promise of biomarkers in cancer screening and detection. *Trends Mol Med* **8**, 288-93.
- Otto, A.** (1968). Excitation of surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z. Physik* **216**, 298-310.
- Padilla De Jesus, O. L., Ihre, H. R., Gagne, L., Frechet, J. M. and Szoka, F. C., Jr.** (2002). Polyester dendritic systems for drug delivery applications: in vitro and in vivo evaluation. *Bioconjug Chem* **13**, 453-61.
- Palmaz, J. C.** (2004). Intravascular stents in the last and the next 10 years. *J Endovasc Ther* **11** Suppl 2, II200-206.
- Pantarotto, D., Partidos, C. D., Hoebeke, J., Brown, F., Kramer, E., Briand, J. P., Muller, S., Prato, M. and Bianco, A.** (2003). Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chem Biol* **10**, 961-6.
- Paradis, V., Degos, F., Dargere, D., Pham, N., Belghiti, J., Degott, C., Janeau, J. L., Bezeaud, A., Delforge, D., Cubizolles, M. et al.** (2005). Identification of a new marker of hepatocellular carcinoma by serum protein profiling of patients with chronic liver diseases. *Hepatology* **41**, 40-7.
- Pathak, S., Singh, A. K., McElhanon, J. R. and Dentinger, P. M.** (2004). Dendrimer-activated surfaces for high density and high activity protein chip applications. *Langmuir* **20**, 6075-9.
- Pawlotsky, J. M.** (1999). Hepatitis C virus (HCV) NS5A protein: role in HCV replication and resistance to interferon-alpha. *J Viral Hepat* **6** Suppl 1, 47-8.
- Peluso, P., Wilson, D. S., Do, D., Tran, H., Venkatasubbaiah, M., Quincy, D., Heidecker, B., Poindexter, K., Tolani, N., Phelan, M. et al.** (2003). Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays. *Anal Biochem* **312**, 113-24.
- Perez, B., Pumera, M., del Valle, M., Merkoci, A. and Alegret, S.** (2005). Glucose biosensor based on carbon nanotube epoxy composites. *J Nanosci Nanotechnol* **5**, 1694-8.
- Pfeifer, P., Aldinger, U., Schwotzer, G., Diekmann, S. and Steinrücke, P.** (1999). Real time sensing of specific molecular binding using surface plasmon spectroscopy. *Sens Actuators B* **54**, 166-75.
- Plagemann, P. G.** (1991). Hepatitis C virus. *Arch Virol* **120**, 165-80.

## R

- Radkowski, M., Wang, L. F., Vargas, H., Rakela, J. and Laskus, T.** (1999). Hepatitis C virus in peripheral blood mononuclear cells from a chronically infected patient receiving liver graft from infected donor. *Transplantation* **67**, 627-9.
- Ramsey, J. D., Jacobson, S. C., Culbertson, C. T. and Ramsey, J. M.** (2003). High-efficiency, two-dimensional separations of protein digests on microfluidic devices. *Anal Chem* **75**, 3758-64.
- Ravanel, K., Castelle, C., Defrance, T., Wild, T. F., Charron, D., Lotteau, V. and Rabourdin-Combe, C.** (1997). Measles virus nucleocapsid protein binds to FcγRII and inhibits human B cell antibody production. *J Exp Med* **186**, 269-78.
- Rehermann, B. and Nascimbeni, M.** (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* **5**, 215-29.
- Reimer, U., Reineke, U. and Schneider-Mergener, J.** (2002). Peptide arrays: from macro to micro. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 315-20.
- Richter, R. P. and Brisson, A.** (2004). QCM-D on mica for parallel QCM-D-AFM studies. *Langmuir* **20**, 4609-13.
- Rief, M., Clausen-Schaumann, H. and Gaub, H. E.** (1999). Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules. *Nat Struct Biol* **6**, 346-9.
- Rittner, K., Benavente, A., Bompard-Sorlet, A., Heitz, F., Divita, G., Brasseur, R. and Jacobs, E.** (2002). New basic membrane-destabilizing peptides for plasmid-based gene delivery in vitro and in vivo. *Mol Ther* **5**, 104-14.
- Robinson, W. H., DiGennaro, C., Hueber, W., Haab, B. B., Kamachi, M., Dean, E. J., Fournel, S., Fong, D., Genovese, M. C., de Vegvar, H. E. et al.** (2002). Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat Med* **8**, 295-301.
- Rubina, A. Y., Dementieva, E. I., Stomakhin, A. A., Darii, E. L., Pan'kov, S. V., Barsky, V. E., Ivanov, S. M., Konovalova, E. V. and Mirzabekov, A. D.** (2003). Hydrogel-based protein microchips: manufacturing, properties, and applications. *Biotechniques* **34**, 1008-14, 1016-20, 1022.
- Rubina, A. Y., Pan'kov, S. V., Dementieva, E. I., Pen'kov, D. N., Butygin, A. V., Vasiliskov, V. A., Chudinov, A. V., Mikheikin, A. L., Mikhailovich, V. M. and Mirzabekov, A. D.** (2004). Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. *Anal Biochem* **325**, 92-106.
- Rühe, J., Ezquerro, T. and Wegner, G.** (1989). Conduction polymers from 3-alkylpyrroles. *Makromol Chem Rapid Commun* **10**, 103-8.

## S

- Rychlewski, L., Kschischo, M., Dong, L., Schutkowski, M. and Reimer, U.** (2004). Target specificity analysis of the Abl kinase using peptide microarray data. *J Mol Biol* **336**, 307-11.
- Salamon, Z., Macleod, H. A. and Tollin, G.** (1997). Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. II: Applications to biological systems. *Biochim Biophys Acta* **1331**, 131-52.
- Salvador-Morales, C., Flahaut, E., Sim, E., Sloan, J., Green, M. L. and Sim, R. B.** (2006). Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol Immunol* **43**, 193-201.
- Santini, J. T., Jr., Cima, M. J. and Langer, R.** (1999). A controlled-release microchip. *Nature* **397**, 335-8.
- Sato, M. and Webster, T. J.** (2004). Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. *Expert Rev Med Devices* **1**, 105-14.
- Schlender, J., Schnorr, J. J., Spielhoffer, P., Cathomen, T., Cattaneo, R., Billeter, M. A., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, S.** (1996). Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13194-9.
- Schofield, D. J., Bartosch, B., Shimizu, Y. K., Allander, T., Alter, H. J., Emerson, S. U., Cosset, F. L. and Purcell, R. H.** (2005). Human monoclonal antibodies that react with the E2 glycoprotein of hepatitis C virus and possess neutralizing activity. *Hepatology* **42**, 1055-62.
- Schweitzer, B., Roberts, S., Grimwade, B., Shao, W., Wang, M., Fu, Q., Shu, Q., Laroche, I., Zhou, Z., Tchernev, V. T. et al.** (2002). Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification. *Nat Biotechnol* **20**, 359-65.
- Sen, A., Steele, R., Ghosh, A. K., Basu, A., Ray, R. and Ray, R. B.** (2003). Inhibition of hepatitis C virus protein expression by RNA interference. *Virus Res* **96**, 27-35.
- Shreffler, W. G., Beyer, K., Chu, T. H., Burks, A. W. and Sampson, H. A.** (2004). Microarray immunoassay: association of clinical history, in vitro IgE function, and heterogeneity of allergenic peanut epitopes. *J Allergy Clin Immunol* **113**, 776-82.
- Simmonds, P., Smith, D. B., McOmish, F., Yap, P. L., Kolberg, J., Urdea, M. S. and Holmes, E. C.** (1994). Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in

the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol* **75** (Pt 5), 1053-61.

- Singh-Gasson, S., Green, R. D., Yue, Y., Nelson, C., Blattner, F., Sussman, M. R. and Cerrina, F.** (1999). Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nat Biotechnol* **17**, 974-8.
- Slentz, B. E., Penner, N. A. and Regnier, F. E.** (2002). Capillary electrochromatography of peptides on microfabricated poly(dimethylsiloxane) chips modified by cerium(IV)-catalyzed polymerization. *J Chromatogr A* **948**, 225-33.
- Smith, E. A., Thomas, W. D., Kiessling, L. L. and Corn, R. M.** (2003). Surface plasmon resonance imaging studies of protein-carbohydrate interactions. *J Am Chem Soc* **125**, 6140-8.
- Snapyan, M., Lecocq, M., Guevel, L., Arnaud, M. C., Ghochikyan, A. and Sakanyan, V.** (2003). Dissecting DNA-protein and protein-protein interactions involved in bacterial transcriptional regulation by a sensitive protein array method combining a near-infrared fluorescence detection. *Proteomics* **3**, 647-57.
- Soen, Y., Chen, D. S., Kraft, D. L., Davis, M. M. and Brown, P. O.** (2003). Detection and characterization of cellular immune responses using peptide-MHC microarrays. *PLoS Biol* **1**, E65.
- Southern, E. M.** (1988). Analysing polynucleotide sequences. *Great Britain Patent Application GB 8810400.5*.
- Stenberg, E., Persson, B., Roos, H. and Urbaniczky, C.** (1991). Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. *J Colloid Interface Sci* **143**, 513-26.
- Su, A. I., Pezacki, J. P., Wodicka, L., Brideau, A. D., Supekova, L., Thimme, R., Wieland, S., Bukh, J., Purcell, R. H., Schultz, P. G. et al.** (2002). Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15669-74.

## T

- Takaki, A., Wiese, M., Maertens, G., Depla, E., Seifert, U., Liebetrau, A., Miller, J. L., Manns, M. P. and Rehmann, B.** (2000). Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med* **6**, 578-82.
- Takeda, S., Sbagyo, A., Sakoda, Y., Ishii, A., Sawamura, M., Sueoka, K., Kida, H., Mukasa, K. and Matsumoto, K.** (2005). Application of carbon nanotubes for detecting anti-hemagglutinins based on antigen-antibody interaction. *Biosens Bioelectron* **21**, 201-5.
- Taylor, D. R., Shi, S. T., Romano, P. R., Barber, G. N. and Lai, M. M.** (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* **285**, 107-10.
- Tello, D., Goldbaum, F. A., Mariuzza, R. A., Ysern, X., Schwarz, F. P. and Poljak, R. J.** (1993). Three-dimensional structure and thermodynamics of antigen binding by anti-lysozyme antibodies. *Biochem Soc Trans* **21**, 943-6.
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K. M., Steiger, C., Ray, S. C. and Chisari, F. V.** (2001). Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* **194**, 1395-406.
- Throckmorton, D. J., Shepodd, T. J. and Singh, A. K.** (2002). Electrochromatography in microchips: reversed-phase separation of peptides and amino acids using photopatterned rigid polymer monoliths. *Anal Chem* **74**, 784-9.
- Tseng, C. T. and Klimpel, G. R.** (2002). Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* **195**, 43-9.

## U-V

- Uttamchandani, M., Chan, E. W., Chen, G. Y. and Yao, S. Q.** (2003). Combinatorial peptide microarrays for the rapid determination of kinase specificity. *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 2997-3000.
- Uttamchandani, M., Chen, G. Y., Lesaicherre, M. L. and Yao, S. Q.** (2004). Site-specific peptide immobilization strategies for the rapid detection of kinase activity on microarrays. *Methods Mol Biol* **264**, 191-204.
- Verpoorte, E.** (2002). Microfluidic chips for clinical and forensic analysis. *Electrophoresis* **23**, 677-712.
- Vijayendran, R. A. and Leckband, D. E.** (2001). A quantitative assessment of heterogeneity for surface-immobilized proteins. *Anal Chem* **73**, 471-80.
- Vork, F. T. A., Schuermans, B. C. A. M. and Barendrecht, E.** (1990). Influence of inserted anions on the properties of polypyrrole. *Electrochim Acta* **35**, 567-75.
- Voura, E. B., Jaiswal, J. K., Mattoussi, H. and Simon, S. M.** (2004). Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nat Med* **10**, 993-8.

## W

- Wacker, R., Schroder, H. and Niemeyer, C. M.** (2004). Performance of antibody microarrays fabricated by either DNA-directed immobilization, direct spotting, or streptavidin-biotin attachment: a comparative study. *Anal Biochem* **330**, 281-7.
- Wang, J., Liu, G. and Jan, M. R.** (2004). Ultrasensitive electrical biosensing of proteins and DNA: carbon-nanotube derived amplification of the recognition and transduction events. *J Am Chem Soc* **126**, 3010-1.
- Wang, J. and Musameh, M.** (2003). Carbon nanotube/teflon composite electrochemical sensors and biosensors. *Anal Chem* **75**, 2075-9.
- Wark, A. W., Lee, H. J. and Corn, R. M.** (2005). Long-range surface plasmon resonance imaging for bioaffinity sensors. *Anal Chem* **77**, 3904-7.
- Wegner, G. J., Lee, H. J. and Corn, R. M.** (2002). Characterization and optimization of peptide arrays for the study of epitope-antibody interactions using surface plasmon resonance imaging. *Anal Chem* **74**, 5161-8.
- Wegner, G. J., Lee, H. J., Marriott, G. and Corn, R. M.** (2003). Fabrication of histidine-tagged fusion protein arrays for surface plasmon resonance imaging studies of protein-protein and protein-DNA interactions. *Anal Chem* **75**, 4740-6.
- Wegner, G. J., Wark, A. W., Lee, H. J., Codner, E., Saeki, T., Fang, S. and Corn, R. M.** (2004). Real-time surface plasmon resonance imaging measurements for the multiplexed determination of protein adsorption/desorption kinetics and surface enzymatic reactions on peptide microarrays. *Anal Chem* **76**, 5677-84.
- Wenschuh, H., Volkmer-Engert, R., Schmidt, M., Schulz, M., Schneider-Mergener, J. and Reineke, U.** (2000). Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides. *Biopolymers* **55**, 188-206.
- Wheeler, A. R., Thronset, W. R., Whelan, R. J., Leach, A. M., Zare, R. N., Liao, Y. H., Farrell, K., Manger, I. D. and Daridon, A.** (2003). Microfluidic device for single-cell analysis. *Anal Chem* **75**, 3581-6.
- Wiese, R., Belosludtsev, Y., Powdrill, T., Thompson, P. and Hogan, M.** (2001). Simultaneous multianalyte ELISA performed on a microarray platform. *Clin Chem* **47**, 1451-7.
- Wilding, P., Shoffner, M. A. and Kricka, L. J.** (1994). PCR in a silicon microstructure. *Clin Chem* **40**, 1815-8.
- Willemsen, O. H., Snel, M. M., Cambi, A., Greve, J., De Grooth, B. G. and Figdor, C. G.** (2000). Biomolecular interactions measured by atomic force microscopy. *Biophys J* **79**, 3267-81.
- Williams, C. and Addona, T. A.** (2000). The integration of SPR biosensors with mass spectrometry: possible applications for proteome analysis. *Trends Biotechnol* **18**, 45-8.
- Wilson, J. A., Jayasena, S., Khvorova, A., Sabatino, S., Rodrigue-Gervais, I. G., Arya, S., Sarangi, F., Harris-Brandts, M., Beaulieu, S. and Richardson, C. D.** (2003). RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2783-8.
- Wiltshire, S., O'Malley, S., Lambert, J., Kukanskis, K., Edgar, D., Kingsmore, S. F. and Schweitzer, B.** (2000). Detection of multiple allergen-specific IgEs on microarrays by immunoassay with rolling circle amplification. *Clin Chem* **46**, 1990-3.
- Wong, D. K., Dudley, D. D., Dohrenwend, P. B., Lauer, G. M., Chung, R. T., Thomas, D. L. and Walker, B. D.** (2001). Detection of diverse hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T lymphocytes in peripheral blood of infected persons by screening for responses to all translated proteins of HCV. *J Virol* **75**, 1229-35.
- Woodbury, R. L., Varnum, S. M. and Zangar, R. C.** (2002). Elevated HGF levels in sera from breast cancer patients detected using a protein microarray ELISA. *J Proteome Res* **1**, 233-7.
- Woolley, A. T.** (2004). Biofunctionalization of carbon nanotubes for atomic force microscopy imaging. *Methods Mol Biol* **283**, 305-19.
- Woolley, A. T. and Mathies, R. A.** (1994). Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11348-52.
- Woolley, A. T. and Mathies, R. A.** (1995). Ultra-high-speed DNA sequencing using capillary electrophoresis chips. *Anal Chem* **67**, 3676-80.
- Wu, K., Fei, J. and Hu, S.** (2003a). Simultaneous determination of dopamine and serotonin on a glassy carbon electrode coated with a film of carbon nanotubes. *Anal Biochem* **318**, 100-6.
- Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K. N., Treadway, J. A., Larson, J. P., Ge, N., Peale, F. and Bruchez, M. P.** (2003b). Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* **21**, 41-6.

## X-Y-Z

- Xu, Z., Choi, J., Lu, W. and Ou, J. H.** (2003). Hepatitis C virus f protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J Virol* **77**, 1578-83.
- Xu, Z., Choi, J., Yen, T. S., Lu, W., Strohecker, A., Govindarajan, S., Chien, D., Selby, M. J. and Ou, J.** (2001). Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *Embo J* **20**, 3840-8.

- Yao, S., Anex, D. S., Caldwell, W. B., Arnold, D. W., Smith, K. B. and Schultz, P. G.** (1999). SDS capillary gel electrophoresis of proteins in microfabricated channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5372-7.
- Youn, J. W., Park, S. H., Lavillette, D., Cosset, F. L., Yang, S. H., Lee, C. G., Jin, H. T., Kim, C. M., Shata, M. T., Lee, D. H. et al.** (2005). Sustained E2 antibody response correlates with reduced peak viremia after hepatitis C virus infection in the chimpanzee. *Hepatology* **42**, 1429-36.
- Yuk, C. S., Lee, H. K., Kim, H. T., Choi, Y. K., Lee, B. C., Chun, B. H. and Chung, N.** (2004a). Development and evaluation of a protein microarray chip for diagnosis of hepatitis C virus. *Biotechnol Lett* **26**, 1563-8.
- Yuk, J. S. and Ha, K. S.** (2005). Proteomic applications of surface plasmon resonance biosensors: analysis of protein arrays. *Exp Mol Med* **37**, 1-10.
- Yuk, J. S., Jung, J. W., Jung, S. H., Han, J. A., Kim, Y. M. and Ha, K. S.** (2005). Sensitivity of ex situ and in situ spectral surface plasmon resonance sensors in the analysis of protein arrays. *Biosens Bioelectron* **20**, 2189-96.
- Yuk, J. S., Jung, S. H., Jung, J. W., Hong, D. G., Han, J. A., Kim, Y. M. and Ha, K. S.** (2004b). Analysis of protein interactions on protein arrays by a wavelength interrogation-based surface plasmon resonance biosensor. *Proteomics* **4**, 3468-76.
- Zhang, W., Huang, J., Zhou, M. F., Chen, L. Y., Ding, Y. P., Cao, H. J., Geng, Y. Y. and Wang, S. Q.** (2005). Protein chip for detection of different HCV antibodies: preparation, quality control, and clinical evaluation. *Mol Diagn* **9**, 81-7.
- Zhavnerko, G. and Ha, K. S.** (2004). Biosensor applications: surface engineering. In: *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* (Schwarz JA, Contescu C, Putyera K, eds), 351-60.
- Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., Lan, N., Jansen, R., Bidlingmaier, S., Houfek, T. et al.** (2001). Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* **293**, 2101-5.
- Zhu, H., Klemic, J. F., Chang, S., Bertone, P., Casamayor, A., Klemic, K. G., Smith, D., Gerstein, M., Reed, M. A. and Snyder, M.** (2000). Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat Genet* **26**, 283-9.

# Table des illustrations

## Chapitre 1 : Introduction

- Figure 1.1 (page 6) : Images des nanotubes de carbone.  
Figure 1.2 (page 8) : Les nanocristaux semi- conducteurs (Quantum-dot).  
Figure 1.3 (page 9) : Marquage cellulaire avec les nanocristaux semi-conducteurs.  
Figure 1.4 (page 10) : Structure des dendrimères.  
Figure 1.5 (page 13) : Schéma et image d'un dispositif intégré « lab-on-chip ».  
Figure 1.6 (page 14) : Exemple de dispositif de microfluidique pour l'analyse des protéines.  
Figure 1.7 (page 16) : Quelques applications des dispositifs microfluidiques pour les manipulations cellulaires.  
Figure 1.8 (page 22) : Schéma récapitulatif des différents types d'interaction biologiques sur puce.  
Figure 1.9 (page 25) : Schéma des différents supports utilisés dans la conception des puces.  
Figure 1.10 (page 28) : Stratégie d'immobilisation des protéines (site spécifique).  
Figure 1.11 (page 30) : Immobilisation par chimie sélective de peptides pré-synthétisés.  
Figure 1.12 (page 33) : Principe de synthèse des peptides *in situ* par photolithographie.  
Figure 1.13 (page 37) : Principe de la réaction RCA.  
Figure 1.14 (page 40) : Principe de la microscopie à force atomique.  
Figure 1.15 (page 41) : L'onde évanescente.  
Figure 1.16 (page 43) : Schéma d'un capteur optique basé sur la résonance plasmonique de surface.  
Figure 1.17 (page 44) : Principe de mesure des biocapteurs à SPR.  
Figure 1.18 (page 45) : Montage d'un monocapteur à interrogation angulaire.  
Figure 1.19 (page 46) : Montage d'un monocapteur SPR à interrogation spectrale.  
Figure 1.20 (page 47) : Multicapteur par imagerie de la réflectivité.  
Figure 1.21 (page 48) : Multicapteur par imagerie spectrale.  
Figure 1.22 (page 50) : Sensorgramme obtenu avec des interactions biomoléculaires mesurées par SPR.  
Figure 1.23 (page 56) : Organisation génomique du VHC.  
Figure 1.24 (page 58) : Cycle de réplication du VHC.  
Figure 1.25 (page 64) : Schéma global de la réponse immune anti-VHC.  
Figure 1.26 (page 66) : Evolution des paramètres cliniques au cours des infections par le VHC.

## Chapitre 2 : Résultats

- Figure 2.1 (page 73) : Principe de polymérisation du pyrrole.  
Figure 2.2 (page 75) : Principe de couplage des protéines au pyrrole actif.  
Figure 2.3 (page 76) : Analyse des Ac monoclonaux anti-HEL par SPR.  
Figure 2.4 (page 78) : Variation du  $R_{max}$  en fonction de la concentration de HEL greffée.  
Figure 2.5 (page 81) : Etude de l'effet immunosuppresseur des NP *in vivo*.  
Figure 2.6 (page 82) : Co-localisation de la NP et CD32 dans des compartiments cellulaires.  
Figure 2.7 (page 87) : Analyse de la masse des complexes peptides-pyrrole.

## Chapitre 3 : Discussion et perspectives

- Figure 3.1 (page 95) : Stratégie de pyrrolylation des protéines « site spécifique ».  
Figure 3.2 (page 96) : Complexe peptide-pyrrole selon la chimie 1 et 2.  
Figure 3.3 (page 97) : Différence du signal SPR selon la chimie de couplage du pyrrole aux peptides.  
Figure 3.4 (page 98) : Image de puce réalisée par le nouveau spotter ou par le Polypotter.  
Figure 3.5 (page 101) : Analyse des NP et les fragments de NP par imagerie SPR.  
Figure 3.6 (page 103) : Localisation des épitopes reconnus par les Ac monoclonaux anti-HEL au niveau de la structure 3-D.

## Résumé

Les biopuces sont des systèmes miniaturisés qui permettent des analyses en parallèle et à haut débit. Ainsi, les puces à protéines/peptides sont très utiles dans l'étude des interactions entre diverses molécules biologiques. Nous avons réalisé des puces à protéines et peptides en se basant sur la technologie des polymères conducteurs : la méthode consiste à immobiliser les molécules sondes (protéines ou peptides) sur des supports par électrocopolymérisation à partir d'un mélange de pyrrole et de pyrrole lié à la molécule sonde. Le support consiste en un prisme recouvert d'un film d'or permettant l'analyse des interactions protéine-protéine ou antigène-anticorps par imagerie de la résonance plasmonique de surface. Cette méthode optique, compatible avec des mesures en parallèle, permet une analyse directe, en temps réel et donne accès aux paramètres cinétiques des interactions. Ces puces, de réalisation facile, présentent une très bonne spécificité et une bonne sensibilité. Elles peuvent être régénérées un grand nombre de fois et sont compatibles avec l'analyse d'échantillons biologiques complexes tels que du sérum non dilué. Ces caractéristiques permettent un champ d'application très large, en recherche fondamentale ou clinique mais aussi en diagnostic.

## Abstract

Microarrays are promising devices for high throughput analysis, especially, proteins/peptides chip which is a useful tool for biomedical interactions studies. The chip was designed by electrocopolymerisation of pyrrole and pyrrole-modified biomolecules on gold surfaces. The chip was used to analyse protein-protein or antigen-antibody interactions by surface plasmon resonance imaging which is a direct, real time method suitable for parallel analysis. This method allows dynamic studies to follow the association and the dissociation rates from kinetic curves. This work shows the efficiency of such microarray with high specificity, good sensitivity and possibility of regeneration. Moreover, we demonstrated its compatibility with the analysis of complex biological samples such as undiluted serum. Taken together, these characteristics make this method a powerful tool for numerous applications, including fundamental or clinical researches as well as diagnosis.

**Mots-clés:** puce à protéines, puce à peptides, électropolymérisation, polypyrrole, imagerie SPR, HCV, antigène, anticorps

Thèse préparée au laboratoire d'immunochimie, INSERM U548  
CEA-Grenoble / Département Réponse et Dynamique Cellulaire, Université Joseph Fourier