



HAL
open science

Microarrays fonctionnels de gouttes : de la synthèse chimique combinatoire au criblage de molécules bioactives.

Laurent Mugherli

► To cite this version:

Laurent Mugherli. Microarrays fonctionnels de gouttes : de la synthèse chimique combinatoire au criblage de molécules bioactives.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00174806

HAL Id: tel-00174806

<https://theses.hal.science/tel-00174806>

Submitted on 25 Sep 2007

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : Biotechnologie, Santé et Management

préparée au

CEA-GRENOBLE, DIRECTION DES SCIENCES DU VIVANT,

DEPARTEMENT REPOSE ET DYNAMIQUE CELLULAIRES, LABORATOIRE BIOPUCES

dans le cadre de

L'ECOLE DOCTORALE INGENIERIE POUR LA SANTE, COGNITION ET ENVIRONNEMENT

présentée et soutenue publiquement le 08 Décembre 2006

par

Laurent MUGHERLI

**Microarrays fonctionnels de gouttes :
de la synthèse chimique combinatoire
au criblage de molécules bioactives.**

JURY

DR JEAN-CLAUDE FLORENT	RAPPORTEUR
DR OLEG MELNYK	RAPPORTEUR
DR LAURENCE LAFANECHERE	EXAMINATEUR
PR ERIC DEFRANCQ	PRESIDENT
DR FRANÇOIS CHATELAIN	EXAMINATEUR
DR MAXIM BALAKIREV	DIRECTEUR DE THESE

Rien ne se perd, rien ne se crée, tout se transforme.

Antoine Laurent Lavoisier.

A mes parents, pour leur amour et leur soutien.

A Annelaure, quotidiennement source de bonheur.

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier tous les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ces travaux.

Arrivé à la fin de ces trois années palpitantes, il est agréable de prendre quelques instants pour se retourner et observer le chemin parcouru, et surtout les rencontres qui l'ont jalonné et les gens qui nous y ont accompagné.

Mes premières pensées vont naturellement vers l'un des meilleurs directeurs de thèse que l'on puisse rêver selon moi, Maxim, qui m'a laissé l'autonomie nécessaire à mon épanouissement tout en apportant ses conseils éclairés aux moments opportuns. « Spasibo bolchoï, Maxim » pour tout ce que tu as fait pour moi, à commencer par me faire confiance pour mener à bien ce sujet pluridisciplinaire avec lequel je me suis régalé au cours de ces trois ans, malgré les inévitables moments difficiles inhérents à une thèse. Merci pour la passion que tu investis dans la recherche et pour ce don à motiver les membres de ton équipe. Parler de l'équipe sans mentionner le plaisir immense que j'ai eu à travailler avec Olga serait inimaginable. Sa bonne humeur constante, son léger accent, son talent et son profond investissement étaient des ingrédients indispensables à l'équipe pour la conduite de ce projet. Merci pour tout, Olga, en particulier pour être devenue une amie. L'équipe (le trio ?) chimie a eu la joie d'accueillir différents stagiaires, qui se sont tous intégrés à merveille, et avec qui il a été agréable de travailler, je pense à Céline, Sabrina, Claire et Aurélien, et bien sur à Maud qui m'a si bien accueilli.

Que Patricia L., notre secrétaire adorée, reçoive ma gratitude la plus profonde pour sa capacité à rayonner sa bonne humeur, pour des discussions hilarantes, pour avoir toujours été là quand j'en avais besoin (je pense notamment (entre autre !), à des négociations téléphoniques rondement

menées, à une certaine clé USB, etc.), et pour des attentions personnelles (saviez-vous que les tomates cerises contiennent des vitamines indispensables au bon développement d'un thésard ?). Merci du fond du coeur, Patricia.

Je remercie François C. pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour quelques judicieux conseils (les tableaux croisés dynamiques par exemple!) et pour certaines conversations particulièrement intéressantes (e.g. « the silicon valley story » ou bien les trois éléments importants du darwinisme et leurs applications).

Je souhaite aussi adresser mes remerciements à l'ensemble laboratoire Biopuces. N'ayant pas l'intention d'écrire un chapitre supplémentaire, je ne pourrai malheureusement pas citer tout le monde, mais je tiens à vous dire que, dans l'ensemble (c'est un terme purement rhétorique) j'ai passé trois très bonnes années en votre compagnie.

Merci à Vincent, pour sa relecture minutieuse du manuscrit et pour quelques expériences intéressantes réalisées ensembles et à Nathalie, pour de sympathiques discussions et pour sa relecture critique. Merci et bravo aux thésards pour la bonne entente perpétuelle qui a régné : Juju (compagnon de spotter), Tom (beau voyage en Suède, certes, mais aussi sorties à ski dans des conditions exceptionnelles...), Guillaume (rompu à l'art de l'allumage du fou rire, attention peut s'avérer dangereux sans préparation physique (abdos et zygomatiques principalement) et mentale (activations répétées de l'aire cérébrale gérant le comique)), et Raph' (l'homme qui pouvait combiner trois métiers). Merci aussi à Thomas P. pour la patience et la pédagogie avec laquelle il a su m'enseigner les rudiments de l'AFM, ainsi qu'à Fred L., mon autre compagnon de spotter, qui m'a également aidé pour des acquisitions un peu compliquées avec IMSTAR (Violaine, je compte sur toi pour prendre la relève!). Merci Lamy, pour ta gentillesse et tes bonbons (et le chocolat d'Italie...).

Merci enfin à tous les gens du laboratoire qui ont égayé la vie à l'extérieur et qui se reconnaîtront, les « quiet evening » (cours de cuisine, vkousno perog!, etc.), les compagnons de ski, les lanceurs de fléchettes irlandaises, les organisateurs de (et participants aux) soirées, etc. J'en profite pour saluer Sylvain (bravo pour ton sens de l'humour et ton sens du **dialogue**), Nico (merci pour la carte !) et Marc.

Merci à toi Maud L. (et à ton François), pour les bons moments passés ensembles aux quatre coins de la France (littéralement...). Une pensée spéciale également pour toute la Boulie's team !! Toute mon affection à mes parents, pour avoir toujours été à mes côtés et m'avoir doté d'une éducation extrêmement épanouissante, et à mes deux frères, pour avoir continué à me témoigner le respect du grand frère même après que j'ai cessé d'être assez impressionnant pour leur faire peur. *And last but definitely not least*, merci à la femme de ma vie pour l'être.

Trois belles années, vraiment... Il est désormais temps de continuer à tracer son chemin vers l'avenir avec résolution et optimisme, en espérant que les prochaines années seront au moins aussi agréables, et en emportant une multitude de bon souvenirs.

Merci, et à bientôt j'espère...

Table des matières

LISTE DES ILLUSTRATIONS	15
LISTE DES TABLEAUX	18
LISTE DES ABREVIATIONS	19
INTRODUCTION.....	22
PARTIE I : INTRODUCTION GENERALE. ETAT DE L'ART SUR LES « MICROARRAYS » .	24
PREAMBULE : LES « MICROARRAYS »	26
<i>Définition</i>	26
<i>Trois grandes classes d'applications</i>	27
<i>Trois piliers pour la mise en œuvre</i>	28
1) LES TROIS GRANDES CLASSES D'APPLICATIONS DES MICROARRAYS	30
1.1) Les microarrays de molécules chimiques	30
1.1.1) Les microarrays de petites molécules	30
<i>Recherche de ligands/génétique chimique</i>	30
<i>Activité enzymatique/criblage d'inhibiteurs</i>	32
1.1.2) Les microarrays de polymères.....	33
1.2) Les microarrays de molécules biologiques	34
1.2.1) Les microarrays de sucres et polysaccharides	34
1.2.2) Les microarrays de peptides	35
1.2.3) Les microarrays de protéines	36
1.2.4) Les microarrays d'acides nucléiques.....	38
<i>Détection de l'ADN</i>	39
<i>Détection de l'ARN</i>	39
<i>Interaction Protéines-ADN</i>	40
<i>Déconvolution spatiale</i>	41
1.3) Les microarrays d'entités biologiques complexes	41
1.3.1) Les microarrays de virus	41
1.3.2) Les microarrays cellulaires.....	42
1.3.3) Les microarrays de tissus	44
1.3.4) Les microarrays d'organes ou d'organismes vivants.....	44
1.4) Les approches hybrides	45
2) MISE EN ŒUVRE : LE TRYPTIQUE SUPPORT-FABRICATION-DETECTION ...	46
2.1) Les supports pour microarrays	46
2.1.1) Ancrage par fixation non covalente	46
<i>Immobilisation non spécifique</i>	46
<i>Immobilisation spécifique</i>	47
2.1.2) Ancrage par fixation covalente	48
<i>Immobilisation non chemosélective</i>	48

<i>Immobilisation chemosélective</i>	50
2.1.3) Ancrage par emprisonnement	53
2.2) Fabrication de microarrays	54
2.2.1) Synthèse <i>in situ</i>	54
2.2.2) Electrodeposition.....	55
2.2.3) Dépôt robotisé.....	56
<i>Dispense avec contact</i>	56
<i>Dispense sans contact</i>	57
<i>Vers le robot idéal ?</i>	58
2.3) Les méthodes de détection pour microarrays	59
2.3.1) Méthodes de détection avec marquage	59
2.3.2) Méthodes de détection sans marquage	60
2.3.3) Amélioration de la détection	61
PARTIE II : PARTIE INTRODUCTIVE. LA THESE : OBJECTIFS & ETAPES CLES.	62
1) INTRODUCTION	64
2) OBJECTIFS	64
2.1) Technologie	65
2.1.1) Tensioarrays.....	65
2.1.2) Apports des technologies de dépôt robotisé.....	65
2.2) Synthèse Chimique	66
2.2.1) Synthèse/Immobilisation sur support solide	66
2.2.2) Synthèse en solution sur puce.....	66
2.3) Enzymologie	67
2.3.1) Importance de la détection de l'activité de protéases.....	67
2.3.2) Méthodes de détection de l'activité sur puce.....	67
2.4) Synthèse et criblage d'une banque chimique combinatoire	69
3) ETAPES CLES.....	69
3.1) Mise au point de la technologie.....	71
3.1.1) Le monde de la microgoutte	71
3.1.2) Intérêts et limitations de la goutte comme microréacteur.....	72
3.1.3) L'outil technologique développé au laboratoire.....	73
<i>Tensioarrays</i>	73
<i>Ejecteur piézoélectrique</i>	74
<i>Ejecteur piézoélectrique & tensioarray : un outil adapté</i>	77
3.2) Développement du modèle chimique	78
3.2.1) Formation de bases de Schiff	78
3.1.2) Condensation à trois composés	79
3.3) Développement du modèle biologique	80

3.3.1)	Les protéases, des enzymes d'un intérêt biologique capital.....	80
3.3.2)	Les protéases choisies pour le modèle biologique.....	82
3.4)	Mise en place d'un criblage.....	85
PARTIE III :	RESULTATS & DISCUSSIONS.	86
III-1 :	TECHNOLOGIE	88
1)	INTRODUCTION	90
2)	LES DIFFERENTS TYPES DE SUPPORTS TESTES	90
2.1)	Supports commerciaux	90
2.2)	Supports traités.....	90
2.3)	Optimisation des supports.....	92
2.3.1)	Modification chimique des plots hydrophiles	92
2.3.2)	Agitation.....	94
2.4)	Description et caractérisation du support industriel choisi	97
2.4.1)	Description du tensioarray.....	97
2.4.2)	Caractérisation du tensioarray.....	99
3)	TESTS PRELIMINAIRES DE L'EJECTEUR PIEZOELECTRIQUE.....	103
3.1)	Ejection de liquides d'intérêt	103
3.2)	Etude expérimentale de la diffusion dans la pipette	104
3.3)	Mesure de la fluorescence et validation de la dilution sur puce ..	106
4)	CONCLUSION.....	109
III-2 :	MODELE CHIMIQUE	110
1)	INTRODUCTION	112
2)	FORMATION D'HYDRAZONES SUR PUCE : STRATEGIE D'ASSEMBLAGE....	112
2.1)	Principe de l'assemblage sur puce	112
2.2)	Mise au point de l'assemblage sur puce.....	116
3)	RECHERCHE COMBINATOIRE DE FLUOROPHORES	121
3.1)	La condensation à trois composés	121
3.2)	Validation par HPLC de la condensation à trois composés	123
3.3)	Recherche combinatoire de fluorophores	124
3.3.1)	Description de l'expérience	124
3.3.2)	Visualisation au scanner.....	126
3.3.3)	Observation par microscopie automatisée	128
4)	CONCLUSION	129
III-3 :	MODELE BIOLOGIQUE.....	130
1)	INTRODUCTION	132
2)	ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DE LA PAPAÏNE	132
2.1)	Caractérisation photochimique des fluorophores.....	133

2.2)	Protéolyse sur puce de substrats liés à des billes	135
3)	ETUDE DE L'ACTION D'UNE METALLOPROTEASE SUR PUCE	139
4)	ACTIVITE DE LA PROTEASE NS3 DU VIRUS DE L'HEPATITE C	143
4.1)	Recherche d'un substrat fluorogène adapté	144
4.1.1)	Substrats courts.....	144
4.1.2)	Substrats peptidiques commerciaux.....	146
4.2)	Détermination des paramètres cinétiques sur puce.....	150
4.3)	Conditions optimisées pour le test enzymatique.....	151
5)	CONCLUSION	152
III-4 :	SYNTHESE & CRIBLAGE. RECHERCHE D'INHIBITEURS DE NS3.	154
1)	INTRODUCTION	156
2)	STRATEGIE : DECOUPAGE DE LA SYNTHOTHEQUE & DECONVOLUTION... ..	156
3)	CRIBLAGE : DEROULEMENT D'UNE EXPERIENCE TYPE	157
3.1)	Plan de dépôt.....	157
3.2)	Assemblage de la banque de candidats inhibiteurs.....	158
3.3)	Test enzymatique	159
3.4)	Lecture et analyse des résultats	160
4)	RESULTATS DU CRIBLAGE	162
4.1)	Expériences de croisements	162
4.2)	Caractérisation des « touches » sélectionnées.....	167
5)	CONCLUSION	170
PARTIE IV :	PARTIE EXPERIMENTALE.....	172
1)	MATERIEL UTILISE	174
2)	PRODUITS UTILISES.....	176
3)	CONDITIONS DE REACTIONS SUR TENSIOARRAYS	177
3.1)	Réaction chimiques.....	177
3.2)	Réaction biochimiques.....	178
3.3)	Criblage	178
4)	ANALYSE DES RESULTATS.....	179
CONCLUSION		182
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES		184
ANNEXE I :	ANALYSE DE LA VARIANCE A 2 FACTEURS	200
ANNEXE II :	GROUPES DE LA BANQUE D'HYDRAZIDES	222
ANNEXE III :	PUBLICATION.....	226
ANNEXE IV :	PUBLICATION	230

Liste des illustrations

Figure 1 : Définition générale d'un microarray.	26
Figure 2 : Représentation des applications possibles pour les microarrays.	28
Figure 3 : Représentation schématique des méthodologies nécessaires aux microarrays.	29
Figure 4 : Image d'une puce à ADN en fluorescence représentant les ratios Cy3/Cy5.	40
Figure 5 : Immobilisation du virus de la mosaïque du tabac par hybridation.	42
Figure 6 : Immobilisation covalente non chemosélective de peptides/protéines.	49
Figure 7 : Immobilisation covalente chemosélective de peptides/protéines.	51
Figure 8 : Immobilisation covalente de petites molécules.	52
Figure 9 : Synthèse spatialement localisée par photodéprotection (www.affymetrix.com).	54
Figure 10 : Principe de l'électrodéposition.	55
Figure 11 : Principe du dépôt avec contact (http://www.arrayit.com).	56
Figure 12 : A. Principe de l'éjection thermique. B. Principe de l'éjection piézoélectrique.	58
Figure 13 : Analyse de l'expression différentielle de gènes.	61
Figure 14 : Différentes manières de conduire la protéolyse.	67
Figure 15 : Etapes clés de la thèse.	70
Figure 16 : La forme d'une goutte d'eau de 5 μ L varie en fonction du type de surface.	71
Figure 17 : Prépondérance des forces liées à la tension superficielle à petite échelle.	71
Figure 18 : Définition des rapports surface-volume en puits et en goutte.	72
Figure 19 : Vue d'ensemble du Sciflexarrayer (éjecteur piézoélectrique).	75
Figure 20 : A. Système fluidique du Sciflexarrayer. B. Schéma & photo d'une pipette.	76
Figure 21 : A. Zone de travail pour la fabrication des microarrays. B. Visualisation de l'éjection. ...	76
Figure 22 : Un outil versatile : robot de dispense piézoélectrique et tensioarrays.	77
Figure 23 : Formation de bases de Schiff.	78
Figure 24 : Schéma réactionnel illustrant le principe des condensations à trois composés ²⁰⁵	79
Figure 25 : Structure du génome du virus de l'Hépatite C.	83
Figure 26 : Mesure d'angle de contact θ	91
Figure 27 : Comparaison des angles de contact moyens pour deux méthodes de silanisation.	92
Figure 28 : Influence du support sur la réaction enzymatique.	93
Figure 29 : Billes magnétiques dans des gouttes de liquide ionique.	94
Figure 30 : Observation de la rotation d'un agrégat de microbilles magnétiques.	95
Figure 31 : Principe de fabrication des tensioarrays à partir d'une plaquette de verre.	98
Figure 32 : Microgouttes emprisonnées sur un tensioarray de quatre blocs de 10 x 10 plots.	98
Figure 33 : Schéma d'un tensioarray de huit blocs (les côtes sont indiquées en microns).	99
Figure 34 : Visualisation des plots hydrophiles en microscopie à contraste de phase.	99
Figure 35 : Reconstitution partielle du périmètre d'un plot avec une série de balayages AFM.	101
Figure 36 : Images obtenues par AFM à l'interface des zones hydrophile et hydrophobe.	101
Figure 37 : Comparaison des rugosités du verre et du dépôt de silanes.	102

Figure 38 : Ejection de différents solvants.	103
Figure 39 : Détermination expérimentale de la diffusion dans une pipette.	105
Figure 40 : Concentrations croissantes de fluorescéine.	106
Figure 41 : Tracé de la fluorescence observée en fonction de la concentration en fluorophore. ...	107
Figure 42 : Tracé de la fluorescence en fonction de la concentration.	108
Figure 43 : Relation exponentielle entre la fluorescence et le gain du scanner.	109
Figure 44 : Principe de l'assemblage de la banque sur puce.	113
Figure 45 : Croisement de $n = i = j = 20$ hydrazides.	115
Figure 46 : Illustration de l'assemblage sur puce.	116
Figure 47 : Modélisation des gradients de température.	117
Figure 48 : Influence de la taille des gouttes sur l'avancement de la formation d'hydrazone.	118
Figure 49 : Chromatogramme mettant en évidence la formation d'hydrazones sur puce.	119
Figure 50 : Schéma général de la synthèse des fluorophores potentiels.	121
Figure 51 : Dispositif pour l'ajout d'un réactif gazeux.	123
Figure 52 : Formation d'un dérivé de 3-aminoimidazo[1,2-a]pyridines sur puce.	124
Figure 53 : Plan de dépôt des aldéhydes et des aminopyridines.	125
Figure 54 : Images scanner quatre couleurs du microarray.	126
Figure 55 : Histogrammes issus des images scanner du tensioarray.	127
Figure 56 : Observation en microscopie automatisée.	129
Figure 57 : Multiples formes de la fluorescéine.	133
Figure 59 : Structure des fluorophores.	133
Figure 60 : Propriétés photochimiques des fluorophores.	134
Figure 61 : Structure du substrat fluorogène pour la papaïne.	136
Figure 62 : Protéolyse sur billes.	138
Figure 63 : Analyse de l'activité de la métalloprotéase sur un microarray de gouttelettes.	140
Figure 64 : Influence des concentrations en enzyme et en substrat sur la vitesse de réaction	141
Figure 65 : Influence de la concentration en inhibiteur (1,10-orthophénantroline).	142
Figure 66 : Comparaison de la protéolyse sur puce et en cuve.	142
Figure 67 : Représentation des substrats esters fluorogènes et du produit de protéolyse.	145
Figure 69 : Clivage d'un substrat fluorogène par des protéases à cystéine et à serine.	145
Figure 70 : Structure du substrat fluorogène de Taliani <i>et al</i> ²⁶⁷	147
Figure 71 : Cinétique d'hydrolyse avec et sans protéase (substrat Bachem).	147
Figure 72 : Mesure de la fluorescence du substrat de la société Bachem en microgouttes.	148
Figure 73 : Recouvrement des spectres d'émission de 5-FAM et d'absorption de QXL TM 520.	148
Figure 74 : Mesure de la fluorescence en fonction du temps avec le substrat Anaspec.	149
Figure 75 : Détermination des paramètres cinétiques du substrat sélectionné pour NS3.	151
Figure 76 : Plan de dépôt d'une expérience de criblage.	158
Figure 77 : Méthodologie d'assemblage de la banque sur puce.	159
Figure 78 : Le clivage par NS3 du substrat fluorogène libère la fluorescence.	160
Figure 79 : Image typique d'un tensioarray après un criblage de candidats inhibiteurs.	161

Figure 80 : Croisement de 16 groupes d'hydrazides, analyse graphique.....	163
Figure 81 : Synthons identifiés après les deux premières étapes du criblage.....	165
Figure 82 : Synthons supplémentaires identifiés lors de la troisième étape du criblage.	165
Figure 83 : Effets coopératifs de certains hydrazides.	166
Figure 85 : Courbes d'inhibition de l'acide 3,5-diformylphényl boronique.....	168
Figure 86 : De l'acide 3,5-diformylphénylboronique à la dihydrazone (H5:H17).	169

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les trois principales classes de microarrays et leurs subdivisions.	26
Tableau 2 : Applications des microarrays de petites molécules.....	30
Tableau 3 : Applications des microarrays de polymères.....	33
Tableau 4 : Applications des microarrays de sucres et polysaccharides.....	34
Tableau 5 : Applications des microarrays de peptides.....	35
Tableau 6 : Applications des microarrays de protéines.....	36
Tableau 7 : Applications des microarrays d'acides nucléiques.....	38
Tableau 8 : Applications des microarrays cellulaires.....	42
Tableau 9 : Fixation covalente non chemoselective des peptides/protéines.....	49
Tableau 10 : Fixation covalente chemosélective des peptides/protéines.....	51
Tableau 11 : Influence des méthodes de confinement sur les ratios surface/volume.....	72
Tableau 12 : Liste des aldéhydes.....	122
Tableau 13 : Liste des aminopyridines.....	122
Tableau 14 : Jeux de lasers utilisés pour imager les fluorophores avec le scanner.....	126
Tableau 15 : Structures de candidats fluorophores et longueurs d'ondes correspondantes.....	127
Tableau 16 : Jeux de lasers utilisés pour imager les fluorophores avec le microscope.....	128
Tableau 18 : Comparaison des paramètres cinétiques de différents substrats ²⁶⁸	149
Tableau 19 : Test de Dunett pour le croisement de 20 groupes d'hydrazides avec G5.....	164
Tableau 20 : Synthons-touches issus du criblage.....	167
Tableau 21 : IC50 des monohydrzones et dihydrzones des synthons-touches.....	168

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
SPR	résonance de plasmon de surface
MS	spectrométrie de masse
QCM	microbalance à quartz
AFM	microscopie à force atomique
SMM	microarray de petites molécules
DOS	synthèse ayant pour but la diversité
PNA	acide nucléique peptidique
ATP	adénosine triphosphate
AMP	adénosine monophosphate
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
MIP	polymères à empreinte moléculaire
VHC	virus de l'hépatite C
VHB	virus de l'hépatite B
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
PCR	réaction de la polymérase en chaîne.
CGH	hybridation génomique comparative
SNP	polymorphisme mono-nucléotidique
SAMs	couches autoassemblées
DMSO	diméthyl sulfoxyde
HPLC	chromatographie liquide haute performance
MCR	réaction multicomposés
3CC	condensation à trois composés
FDTs	1H,1H,2H,2H-perfluorodécyltrichlorosilane
AFU	unités arbitraires de fluorescence
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
DAPI	diaminidophényle indole
PhycoE	phycoérythrine
RhodB	rhodamine B
AMC	amino-4-méthyl coumarine
ACC	7-amino-4-carbamoylméthyl coumarine
MFE	3'-méthoxyfluorescéine

Introduction

Les microarrays font l'objet de nombreux travaux de recherche dans le monde et des retombées sont attendues en terme de rapidité, parallélisation, d'économies d'échantillons, etc. Les domaines d'applications, qui se limitaient aux puces à ADN il y a une quinzaine d'années, sont de plus en plus nombreux. Il semble que tout ce qui est suffisamment petit pourrait virtuellement être utilisé sur un microarray. Cela inclut les petites molécules, les peptides, les protéines, les enzymes, les cellules et les tissus. La partie intitulée « introduction générale » a pour but de présenter la multitude d'approches recensées dans la littérature utilisant la technologie microarray. C'est justement le développement de certaines technologies qui a permis l'avènement des microarrays. Ce sera l'objet de la seconde partie de l'« introduction générale », qui traitera de la chimie employée pour la fonctionnalisation des surfaces, des méthodes de fabrication de précision micrométrique (*e.g.* les robots de dispense), et des méthodes de détection.

Deux types de microarrays sont d'un intérêt élevé dans le cadre de cette thèse, ceux de petites molécules et ceux dédiés à la détection de l'activité enzymatique.

A notre connaissance, tous les microarrays de petites molécules sont obtenus par dépôt de composés présynthétisés. Ainsi, si la synthèse d'oligonucléotides ou de peptides est pratiquée sur puce depuis de nombreuses années, la synthèse chimique de petites molécules sur puce est encore peu développée. Les quelques méthodes rapportées se font dans un format macroarray et en greffant au préalable les molécules sur le support.

La détection de l'activité enzymatique sur microarray a fait l'objet de nombreux articles au cours des cinq dernières années. Les kinases et les protéases comptent parmi les enzymes les plus étudiées, eut égard à leurs rôles biologiques clés et à leur potentiel sur le plan médical. Différentes approches ont vu le jour, visant à déterminer des profils spécifiques d'activité ou à rechercher des inhibiteurs.

Le développement d'une technologie particulière, et son utilisation pour la synthèse chimique de petites molécules en solution sur microarray et l'étude de l'activité de protéases contenues dans des microgouttes, constituent les objectifs de cette thèse, qui sont présentés dans la partie intitulée « partie introductive ». L'objectif ultime est de combiner séquentiellement les réactions chimiques et biochimiques en réalisant un criblage d'inhibiteurs potentiels de la protéase NS3 (synthétisés sur puce).

Les résultats sont présentés dans une troisième partie, elle-même divisée en quatre sous-parties.

Dans un premier temps, nous présenterons des caractérisations et des tests effectués sur notre outil technologique, à savoir la combinaison des tensioarrays (microarrays emprisonnant des microgouttes grâce à un différentiel de tension de surface) et d'un éjecteur piézoélectrique (capable de déposer une large gamme de volumes en des positions choisies du tensioarray).

Puis nous aborderons la synthèse chimique avec deux modèles de réactions. Le premier, la formation de bases de Schiff, permettra une première validation, et sera aussi utilisé pour la synthèse de la banque chimique du criblage enzymatique. Le second, une réaction multi-composés démontrera la possibilité de réaliser une chimie plus complexe dans les microgouttes, et sera appliqué à la recherche de nouveaux composés fluorescents.

Ensuite nous testerons l'activité sur tensioarray de trois protéases chacune avec un type de substrat fluorogène différent. La papaïne sera mise en présence d'un substrat peptidique synthétisé sur des billes, qui seront déposées sur le tensioarray. Le clivage sur puce d'un substrat protéique marqué sera réalisé avec une métalloprotéase. La protéase virale NS3 sera le dernier modèle abordé, et elle sera caractérisée avec un substrat peptidique soluble.

Enfin, le savoir-faire acquis sera mis à profit pour synthétiser une banque de composés chimiques dans les microgouttes du tensioarray avant d'ajouter la protéase NS3 et son substrat fluorogène. Un criblage des composés synthétisés sur la puce sera ainsi réalisé afin de rechercher des agents potentiellement antiviraux.

**PARTIE I : INTRODUCTION GENERALE.
ETAT DE L'ART SUR LES « MICROARRAYS ».**

PREAMBULE : LES « MICROARRAYS »

Définition

Le terme anglophone « array » était déjà difficile à traduire dans la langue de Molière, il en va naturellement de même pour « microarray ». Les propositions de traductions pour « array » sont variables selon les domaines : de matrice à réseau en passant par tableau, maille, copie répétitive, ensemble, panoplie, collection...et même « groupe d'éléments » dans les télécommunications pour « array of arrays ». En fait, un « array » est un assemblage organisé d'entités et par extension (il serait plus approprié de dire par réduction) un « microarray » est un assemblage organisé d'entités à l'échelle micrométrique. Toutes les entités présentant un intérêt sont envisageables, du moment qu'elles sont de dimensions submillimétriques : des molécules aux petits organismes vivants (**Figure 1**). L'arrangement des entités étant bidimensionnel, on peut aussi décrire un microarray comme un ensemble de positions (x,y) distinctes d'un plan et chacune caractérisée par un jeu de conditions expérimentales (C) (**Figure 1**). L'absence de terme francophone pour « microarray » constatée, il sera par la suite fait indifféremment usage du mot anglais ou du mot « puce » (pratique, bien qu'imprécis), consacré par les appellations puce à ADN, à peptides ou à protéines.

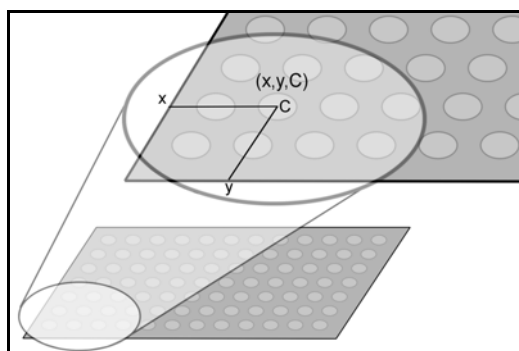


Figure 1 : Définition générale d'un microarray.

Les microarrays sont aujourd'hui utilisés dans un large panel d'applications dont les principales seront décrites au cours de cette première partie (**Tableau 1**). Leur importance en recherche fondamentale et appliquée est illustrée par l'utilisation de ce mot dans plus de 15 000 articles recensés par PubMed depuis 1991.

Classe de Microarray	Molécules chimiques		Molécules biologiques				Entités biologiques complexes			
	Petites molécules	Polymères	Sucres	Peptides	Protéines	ADN	Virus	Cellules	Tissus	Organismes
Puce à										

Tableau 1 : Les trois principales classes de microarrays et leurs subdivisions.

Trois grandes classes d'applications

Tenter de classifier l'ensemble des approches microarrays existantes est une tâche ardue, car les applications sont nombreuses et variées, tout en étant reliées de manière complexe. D'ailleurs, les articles de revue ne traitent jamais des microarrays en général, mais décrivent plutôt des sous-groupes comme les puces à protéines ou les microarrays de sucres. Afin de synthétiser le grand nombre d'applications concernées avec un maximum de clarté, nous diviserons les microarrays en **trois grandes classes** selon qu'ils sont fondés sur l'utilisation de molécules à caractère **chimique**, de molécules à caractère **biologique**, ou bien sur des **entités biologiques complexes (Figure 2)**. Le mot « utilisation » **se réfère aux molécules qui sont exposées sur le microarray** et varient donc d'une position à une autre : par exemple un microarray de peptides verra un grand nombre de peptides différents fixés à sa surface (leur mise en contact avec des protéines permettant par exemple la détermination de profils d'activité enzymatique), tandis qu'un microarray de petites molécules sera constitué de nombreuses molécules différentes (leur mise en contact avec des protéines permettant par exemple de repérer des ligands). Plutôt que la classique approche historique (puces à ADN, puces à protéines, puces à petites molécules, puces fonctionnelles, puces à cellules, puces à tissus, etc.), cette classification suivra une **logique de tailles croissantes**, démarrant avec les petites molécules et finissant avec des organismes vivants. Cette logique est parfaitement compatible avec les trois grandes classes envisagées : les **petites entités** (0,3-10 nm) correspondant aux microarrays de **molécules chimiques**, les **entités de taille supérieure** (1-100 nm) correspondant aux microarrays de **molécules biologiques**, et les **entités les plus grandes** (100 nm à 900 µm) correspondant aux microarrays d'**entités biologiques complexes (Figure 2)**. Enfin, certaines approches transversales échappent à ce classement tripolaire, on parlera alors d'applications **hybrides**.

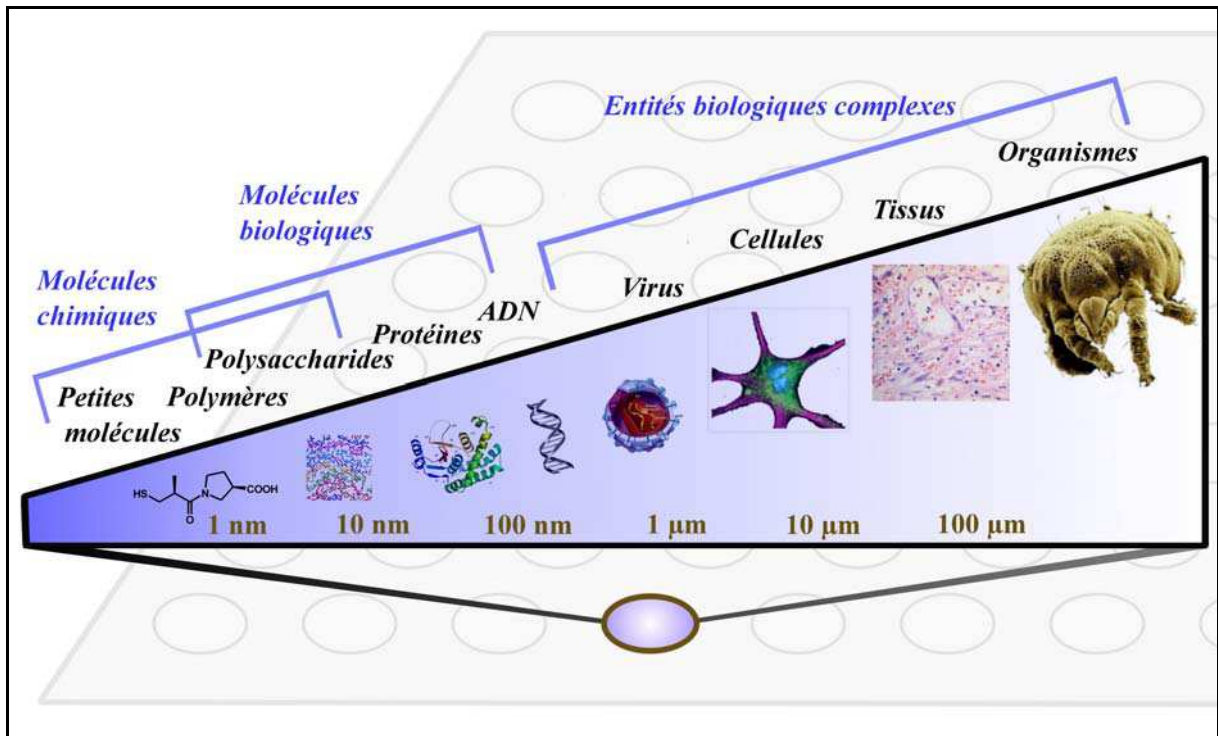


Figure 2 : Représentation des applications possibles pour les microarrays.

Les positions d'un microarray peuvent être occupées par une multitude d'entités de taille et de complexité diverses, que l'on peut découper en trois catégories : molécules chimiques, molécules biologiques, et entités biologiques complexes.

Trois piliers pour la mise en œuvre

La technologie microarray repose sur **trois méthodologies essentielles (Figure 3)** : premièrement le **support**, deuxièmement la **fabrication** à l'aide d'outils de précision micrométrique, et troisièmement les méthodes de **détection** :

- Le support est essentiel au maintien des positions. Il peut être obtenu en fixant l'entité d'intérêt (covalamment ou non), en l'emprisonnant dans un gel, ou en utilisant l'énergie de surface pour la piéger.
- Les microarrays sont généralement fabriqués à l'aide de robots de dispense (« spotteurs »)¹, de procédés de masquages dérivés de la microélectronique (synthèse *in situ* avec des réactifs photolabiles)² ou fixés par électrodéposition³⁻⁵.
- Les méthodes de détection sont nombreuses et classées en deux catégories majeures : avec marquage (fluorescence, radioactivité, luminescence...), en général plus faciles à mettre en œuvre ; et sans marquage (résonance de plasmon de surface, SPR ; spectrométrie de masse, MS ; microbalance à quartz, QCM ; microscopie à force atomique, AFM...), permettant d'éviter les modifications structurales apportées par les marqueurs.

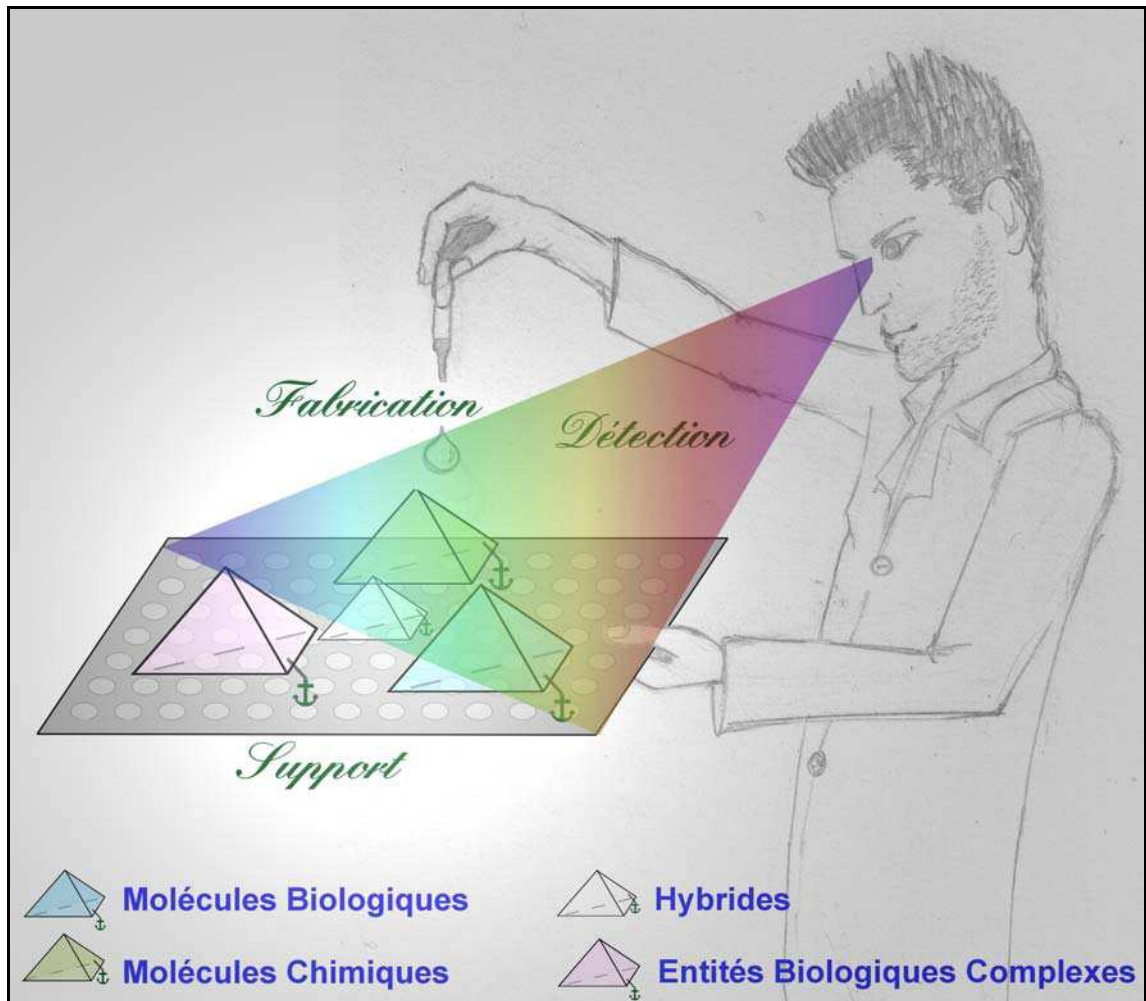


Figure 3 : Représentation schématique des méthodologies nécessaires aux microarrays.

Quelle que soit l'application envisagée, les microarrays découlent avant tout de la création de supports, sur lesquels les microarrays sont construits grâce à diverses méthodes de fabrication, et nécessitant des méthodes de détection.

1) LES TROIS GRANDES CLASSES D'APPLICATIONS DES MICROARRAYS

1.1) Les microarrays de molécules chimiques

Cette appellation regroupe les microarrays fondés sur l'utilisation de molécules & macromolécules « chimiques », par opposition aux molécules & macromolécules propres au vivant (les polysaccharides, les peptides, les protéines et les acides nucléiques).

1.1.1) Les microarrays de petites molécules

L'appellation microarrays de petites molécules (Small Molecules Microarrays en anglais, donnant l'acronyme SMMs), introduite par le groupe de Schreiber ⁶, désigne les microarrays composés de molécules chimiques de petites tailles immobilisées covalamment. On peut étendre cette appellation à des petites molécules ancrées différemment : les microarrays de composés chimiques secs ou en solution, et à des petites molécules liées à des acides nucléiques et interagissant en solution, avant d'être déconvoluées spatialement sur un microarray. Leur capacité à tester rapidement les effets biologiques d'un grand nombre de molécules, en les mettant en contact avec un « analyte » permet des applications en génétique chimique et en criblage à haut débit (**Tableau 2**). Un **analyte** est constitué d'entités (généralement en solution) que l'on désire analyser (e.g. protéines, sérum, cellules, etc.).

Puces à	Petites molécules	
Éléments ancrés	Petites molécules	
Analyte	Protéines	Enzymes & substrat
Applications	Recherche de ligands/inhibiteurs irréversibles	Criblage d'inhibiteurs d'activité enzymatique

Tableau 2 : Applications des microarrays de petites molécules.

Recherche de ligands/génétique chimique

La génétique vise à établir un lien entre mutation du génome et phénotype. Par analogie, la génétique chimique cherche à étudier le rôle de gènes en utilisant des composés chimiques comme éléments perturbateurs du phénotype. La **génétique** se divise en deux approches, **directe** (mutations aléatoires, sélection du phénotype d'intérêt, identification du gène muté correspondant) et **inverse** (mutation sélective, comparaison des phénotypes mutant & naturel, détermination du rôle du gène). La poursuite de l'analogie conduit à distinguer

deux approches en **génétique chimique**⁷ : **directe** (exposition d'organismes vivants à une banque de composés chimiques divers, sélection du phénotype d'intérêt, identification de la molécule responsable, recherche de la protéine affectée par cette molécule puis du gène correspondant) et **inverse** (mise en contact de protéines purifiées avec une banque de composés chimiques, identification d'un ligand, ajout du ligand *in vivo*, comparaison des phénotypes avec et sans ligand, détermination de la fonction de la protéine). Les microarrays de petites molécules sont des outils prometteurs pour l'identification de ligands de protéines en génétique chimique inverse à haut débit.

Le groupe de Schreiber à Harvard, pionnier en **SMMs avec fixation covalente**^{6, 8} et possédant un savoir-faire en synthèse de banques de composés présentant une grande diversité DOS (Diversity Oriented Library)^{9,10}, a exposé un microarray de 3780 composés provenant d'une banque DOS de 1,3-dioxanes à la protéine de levure Ure2p rendue fluorescente, découvrant ainsi huit ligands spécifiques¹¹. C'est déjà intéressant car la protéine Ure2p, régulateur de la transcription des gènes du métabolisme de l'azote chez la levure, n'avait pas de ligand connu. L'un des ligands, baptisé Ureptamine, a en plus sélectivement induit la surexpression *in vivo* un groupe de gènes contrôlés par Ure2p (les mêmes que ceux surexprimés en l'absence de glucose) dans des expériences de profils de transcription portant sur l'intégralité du génome de la levure. Certains gènes régulés par Ure2p ne sont pas affectés par l'Ureptamine, donc la précision de la modulation obtenue est supérieure à celle obtenue par la délétion du gène URE2, ce qui est un des atouts de la génétique chimique. Une approche similaire¹² a permis de découvrir, parmi 12 396 composés (provenant de trois bibliothèques DOS) fixés sur un microarray, des inhibiteurs de la protéine de la levure Hap3p, sous-unité d'un complexe facteur de transcription appartenant au réseau de signalisation de la réponse aux nutriments. Des SMMs, fondés sur une banque DOS de 6336 bi- et tétra-cycles contenant des phénols¹³ ou sur une banque DOS de 18 000 1,3-dioxanes aux squelettes et à la stéréochimie variables¹⁴, ont permis de découvrir des ligands de la calmoduline.

Dans une approche plus simple (évitant la déconvolution nécessaire lors des synthèses « split and pool »), le groupe de Yao, basé à Singapour, a fixé une bibliothèque de 2688 triazines substituées dans le but de trouver des ligands de l'IgG humaine pour offrir une alternative à la purification des IgG utilisant la protéine A¹⁶⁴. Toujours dans l'idée de simplifier, des scientifiques de Graffinity Pharmaceuticals ont mis sur pied une plateforme destinée à mesurer par SPR (sans marquage) les affinités d'une banque composée

uniquement de pharmacophores¹⁵, la signature d'affinités faibles étant ensuite analysée pour générer un « lead ». Un exemple utilisant 1535 pharmacophores pour étudier la poche S1 de la protéase à sérine FVIIa, impliquée dans les processus inflammatoires, a été publié récemment¹⁶.

Le groupe californien de Schultz a mis au point des SMMs fabriqués par positionnement spatial précis de molécules portant des étiquettes PNAs (acides nucléiques peptidiques) via hybridation déconvolutive sur microarray d'acides nucléiques¹⁷, après que l'interaction irréversible avec des protéines ou un lysat ait eu lieu en solution : un inhibiteur peptido-acrylate de la caspase-3 a été identifié par cette méthode¹⁸.

Activité enzymatique/criblage d'inhibiteurs

La recherche de ligands ne permet pas de détecter directement l'inhibition de l'activité catalytique d'une enzyme. C'est pourquoi la détermination de profils d'activités enzymatiques spécifiques et le criblage de petites molécules inhibitrices nécessitent un SMM afin de mettre en présence de chaque petite molécule une enzyme et un substrat dont la catalyse est observable.

L'ajout de mélanges (kinase + ATP radiomarqué + inhibiteur) à un substrat fixé covalamment a permis de tracer des courbes d'inhibition pour plusieurs inhibiteurs¹⁹, constituant une des premières approches de SMMs dédiés à l'inhibition de l'activité enzymatique.

Dans une approche semblable à celle du groupe de Ellman, qui a déterminé des profils d'activité protéolytique avec des **microarrays de peptides fluorogènes**²⁰, le groupe de Yao a apporté la preuve de concept d'un système basé sur des petites molécules fluorogènes dérivées de la coumarine pour détecter l'action d'enzymes hydrolytiques (époxyde hydrolase, protéase, phosphatase) mais avec un débit bien plus faible²¹.

Gosalia et Diamond, de l'université de Pennsylvanie, ont développé une approche haut débit très intéressante dans laquelle les petites molécules sont simplement déposées dans des microgouttes (1,6 nL) de glycérol, et l'enzyme et le substrat fluorogène rapidement ajoutés à l'aide d'un aérosol sur l'ensemble du microarray²². Ils ont ainsi criblé une banque de 352 composés commerciaux et isolé un inhibiteur inactivant les caspases humaines 2, 4 et 6 (à des concentrations millimolaires). Connue sous le nom de DiscoveryDotTM technology, cette approche a été utilisée plusieurs fois pour des **criblages**²³⁻²⁵, la découverte récente du composé MDL28170 (inhibiteur de la cathepsine L testé efficace

pour bloquer l'entrée du SARS coronavirus dans les cellules hôtes) par Simmons *et al.*²⁵ constituant une avancée importante pour cette technologie¹⁵.

La technologie μ ARCS (microARrayed Compounds Screening) mise au point par les laboratoires Abott est fondée sur une feuille de polystyrène présentant des composés chimiques secs (préalablement déposés en solution, puis séchés) et recouverte avec un gel d'agarose contenant enzyme et substrat. Des recherches d'inhibiteurs ont été réalisées pour de nombreuses enzymes, notamment pour l'intégrase du VIH, des protéases et des kinases, mais cette approche μ ARCS présente l'inconvénient de discriminer les inhibiteurs potentiels au cours des processus de re-solubilisation et de diffusion¹⁵, les cinétiques correspondantes pouvant différer d'un composé chimique à l'autre.

1.1.2) Les microarrays de polymères

Outre les petites molécules, il existe des polymères synthétiques dont l'utilisation sur microarray présente aussi un intérêt (**Tableau 3**).

Puces à	Polymères	
Eléments ancrés	Polymères synthétiques	MIPs (Molecularly Imprinted Polymers)
Analyte	Cellules	Molécules, protéines
Applications	Biomatériaux, adhésion	Reconnaissance moléculaire

Tableau 3 : Applications des microarrays de polymères.

Le groupe de Langer réalise des microarrays de polymères afin d'étudier leurs interactions avec des cellules, et en particulier des cellules souches (différentiation) et des cellules primaires, la réaction de polymérisation pouvant avoir lieu directement sur le microarray²⁶ ou les polymères pouvant être synthétisés et caractérisés avant d'être déposés²⁷. De tels microarrays de polymères ont été dédiés à l'étude de l'adhésion de divers types cellulaires incluant des cellules primaires²⁸. Le **criblage à haut débit de biomatériaux** est désormais possible grâce à cette approche²⁹.

Les polymères à empreintes moléculaires³⁰ ou MIPs (Molecularly Imprinted Polymers) sont formés par polymérisation autour d'une molécule servant de gabarit, qui est ensuite retirée. Ce sont par essence d'excellents ligands pour les composés proches de celui sur lequel ils ont été moulés. Leurs applications concernent principalement la reconnaissance de petites molécules comme l'AMP cyclique³¹, mais il existe des exemples de reconnaissance sélective d'albumine, IgG, lysosyme, ribonucléase et streptavidine³². Des microarrays de MIPs pour la détection multiplexée de protéines ou de petites molécules pourraient donc voir le jour prochainement³³.

1.2) Les microarrays de molécules biologiques

Cette appellation regroupe les microarrays fondés sur les molécules & macromolécules « biologiques », c'est-à-dire propres au vivant, à savoir les polysaccharides, les peptides, les protéines et les acides nucléiques.

De tels microarrays donnent lieu à une vaste gamme d'applications (**Tableaux 4 à 7**).

1.2.1) Les microarrays de sucres et polysaccharides

Les sucres et les oligosaccharides sont des composants clés des biopolymères de la surface des cellules (glycolipides et glycoprotéines) impliqués dans les processus de reconnaissance, d'adhésion et de signalisation ³⁴. L'utilisation d'outils chimiques est indispensable à la **glycobiologie** ³⁵, discipline scientifique dédiée à l'étude des interactions impliquant des composés glycosylés ainsi qu'aux réactions de glycosylation des protéines (voir Carbohydrate & Glycobiology, Science, 2001). A l'instar de la génomique et de la protéomique, qui dérivent des deux autres classes majeures de biopolymères (acides nucléiques et protéines), la glycomique ³⁴ possède un potentiel élevé une fois franchie la difficulté de la synthèse de glycopolymères ³⁶.

Puces à	Sucres et polysaccharides		
Éléments ancrés	Sucres et polysaccharides		
Analyte	Protéines, ARN	Sérum, cellules	Enzymes
Applications	Profils d'interaction	Diagnostic	Modification enzymatique, inhibition

Tableau 4 : Applications des microarrays de sucres et polysaccharides.

L'interaction spécifique de lectines a été montrée sur array de monosaccharides ³⁷, disaccharides ³⁸ et oligosaccharides ^{39, 40}, ainsi que l'interaction d'anticorps ^{41, 42}, dont un exemple prometteur pour le diagnostic : un microarray composé de glycoprotéines et de polysaccharides dérivés du dextrane a permis de détecter, dans du sérum humain, des anticorps dirigés contre des bactéries exprimant ce type de polysaccharides ⁴¹. Les interactions avec les cellules ont aussi été étudiées, démontrant l'adhésion spécifique de lymphocytes T CD4+ sur un microarray composé de 45 glycanes différents ⁴³.

Dans une approche originale, le groupe de Seeberger a étudié la liaison de protéines responsables de la résistance bactérienne sur un microarray d'aminoglycosides, des antibiotiques à large spectre ^{44, 45}. De tels microarrays d'aminoglycosides ont aussi été utilisés pour étudier l'interaction d'antibiotiques avec leur ARN cible ⁴⁵. Les profils

spécifiques des interactions de protéines gp120 du VIH avec des microarrays de carbohydrates et glycoprotéines ont aussi été déterminés, ouvrant la voie à des approches thérapeutiques intéressantes ⁴⁶. Enfin, un microarray de glucosaminoglycanes inspirés de l'héparine (un glucosaminoglycane anticoagulant naturel, particulièrement abondant dans le foie) fabriqué récemment et testé sur des facteurs de croissance devrait permettre de mieux comprendre les interactions héparine-protéines présentes dans de nombreux processus biologiques ⁴⁷.

Mrksich *et al.* ont observé l'activité enzymatique de la β -1,4-galactosyltransférase sur la N-acétyl glucosamine fixée ³⁷, et le groupe de Wong la fucosylation de la sialyl-N-acétyl-lactosamine ⁴⁸.

1.2.2) Les microarrays de peptides

Cette appellation regroupe les microarrays exposant à leur surface un grand nombre de peptides.

Puces à	Peptides			
Éléments ancrés	Peptides			
Analyte	Cellules	Métaux	Protéines	Enzymes (kinases, protéases)
Applications	Adhésion cellulaire	Toxicité	Reconnaissance spécifique, cartographie par épitopes	Profils d'activités enzymatiques (puces à substrat)

Tableau 5 : Applications des microarrays de peptides.

Souvent, les activités biologiques des protéines peuvent être résumées par celles d'épitopes peptidiques plus courts ⁴⁹. D'où l'intérêt des microarrays de peptides, qui limitent les problèmes d'immobilisation et de maintien d'activité, étant donné leur moindre fragilité. Leur faible taille les pénalise en revanche en les rendant peu accessible lorsqu'ils sont adsorbés non-spécifiquement sur un support ou s'ils sont mal orientés, ce qui conduit généralement à préférer la fixation covalente des peptides-sondes sur le support ⁵⁰.

Les microarrays de peptides ont été utilisés pour diverses applications, dont l'étude de l'adhésion cellulaire ⁵¹ ou des métaux toxiques ⁵², mais leurs principales applications sont la mise en évidence d'interactions peptides/protéines et d'activités enzymatiques.

Les profils caractéristiques de diverses enzymes (dont l'alpha-amylase et la trypsine) ⁵³ ont été observés sur un microarray composé de 250 peptides. Les puces à peptides ont aussi permis de faire de la cartographie par épitopes, *i.e.* d'étudier les interactions des anticorps

avec des régions spécifiques d'antigènes⁵⁴. Dans le domaine du diagnostic, l'interaction de peptides avec des anticorps dirigés contre divers virus (dont VHB, VHC et VIH) a été détectée par immunofluorescence dans des prélèvements cliniques⁵⁵⁻⁵⁷.

La phosphorylation des substrats de kinases a fait l'objet de nombreuses études, la réaction étant révélée par l'incorporation d'atomes de phosphore radioactifs provenant d'adénosine tri-phosphate radiomarquée ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ou $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$)^{19, 58, 59} ou par des anticorps fluorescents^{60, 61}. Récemment, des études portant sur la spécificité de protéases ont été rapportées. Une des approches soumet des peptides fluorogènes, dérivés de la coumarine et fixés covalamment, à une biocatalyse hétérogène²⁰. L'autre, au contraire, est fondée sur la protéolyse homogène d'un microarray de substrats simplement déposés dans du glycérol, les protéases étant ajoutées au moyen d'un aérosol^{62, 63}. L'utilisation de microarrays de peptides a aussi permis l'optimisation rapide d'inhibiteurs peptidiques de la β -lactamase, impliquée dans la résistance bactérienne aux antibiotiques de la classe des β -lactames⁶⁴.

1.2.3) Les microarrays de protéines

Cette appellation regroupe les microarrays exposant à leur surface un grand nombre de protéines (incluant les protéines particulières que sont les anticorps et les antigènes).

Puces à	Protéines (puces analytiques)	Protéines (puces fonctionnelles)				
Éléments ancrés	Anticorps, antigènes	Protéines				
Analyte	Sérum, mélanges complexes	ADN, ARN	Protéines	Petites Molécules	Inhibiteurs suicides marqués	Enzyme et co-facteurs
Applications	Comparaison des quantités de protéines, diagnostic.	Etude des protéines ligands de l'ADN	Etude des interactions protéines-protéines	Recherche de ligands	Multiplés activités enzymatiques	Protéines substrats

Tableau 6 : Applications des microarrays de protéines.

On peut distinguer deux catégories de puces à protéines (Tableau 6)⁶⁵ : les **microarrays analytiques**, visant à détecter les protéines dans un mélange complexe grâce à leur affinité pour certains composés nommés agents de capture, et les **microarrays fonctionnels**, dédiés à l'observation des activités biochimiques d'un grand nombre de protéines ou d'oligonucléotides.

Les **microarrays analytiques** sont généralement obtenus en immobilisant des anticorps sur une surface, ce qui permet, après mise en contact avec un lysat/sérum, la détection (grâce

au marquage du lysat/sérum ou en utilisant un anticorps secondaire marqué) des antigènes qui se sont liés aux anticorps correspondants. Cette approche permet de déterminer la quantité de protéines contenues dans un mélange complexe ^{66, 67}. Il est aussi possible d'immobiliser des antigènes pour rechercher des anticorps dans le sérum de patients dans les cas d'allergies ⁶⁸ et maladies auto-immunes ⁶⁹ (ce sont en toute rigueur des microarrays chimiques lorsque les antigènes ne sont ni des protéines ni des peptides).

Les **microarrays fonctionnels**, qui exposent un grand nombre de protéines à leur surface, ont un potentiel élevé en recherche, car ils permettent d'étudier de nombreuses fonctions biochimiques par mise en contact avec une pléiade d'analytes (ADN, protéines & peptides (incluant enzymes et substrats), petites molécules (incluant ligands et inhibiteurs)) selon les applications envisagées, comme anticipé par l'article fondateur de McBeath et Schreiber ⁵⁸. La production de protéines à haut débit constitue cependant une difficulté non triviale ⁶⁵, en particulier en ce qui concerne la purification. On peut distinguer deux types de microarrays fonctionnels ⁷⁰, selon qu'ils sont fondés sur la reconnaissance moléculaire ou l'activité enzymatique.

- **La reconnaissance moléculaire**, une fonction de base des protéines, comprend :
 - ◆ L'étude des interactions protéines-ADN ^{58, 71, 72}, qui a par exemple permis de montrer que des enzymes métaboliques peuvent réguler l'expression génique ⁷¹.
 - ◆ L'étude des interactions protéines-protéines ^{58, 73, 74}. L'exemple de Kim *et al.* ⁷³, qui ont obtenu une grande quantité d'informations sur les interactions moléculaires des récepteurs nucléaires des oestrogènes, illustre très bien l'intérêt de telles études.
 - ◆ L'étude des interactions protéines-petites molécules ^{58, 75, 76}, dont la première étude ⁷⁷ de ce type d'interactions sur un array de récepteurs couplés à une protéine G (GPCRs). Ce dernier cas est très intéressant car il s'agit d'un microarray de récepteurs membranaires, la catégorie majoritaire des cibles thérapeutiques (45% des médicaments). Le potentiel de tels microarrays est donc élevé, même si les protéines membranaires sont fragiles et requièrent un environnement lipidique difficile à recréer.
 - ◆ La cartographie par épitopes, qui consiste à étudier les interactions des anticorps avec des régions spécifiques d'antigènes ⁷⁸.

- Lors d'une étude de l'**activité enzymatique**, les protéines disposées sur la surface peuvent jouer le rôle de substrats ou d'enzymes. Les applications incluent :
 - ◆ La catalyse de la sulfonation par une sulfotransférase immobilisée (famille d'enzymes limitant la toxicité de nombreux xénobiotiques en leur transférant un groupe SO_3^- provenant de l'adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate sur les fonctions réactives de type phénols, alcools, amines...) ⁷⁹.
 - ◆ Le suivi en parallèle (multiplexage) de l'activité de plusieurs enzymes (phosphatases, protéases à cystéine et hydrolases à sérine) fixées sur une surface et de leur inhibition, grâce à l'utilisation de marqueurs fluorescents ayant une affinité sélective pour certains mécanismes enzymatiques ⁸⁰⁻⁸².
 - ◆ L'observation de l'activité catalytique des enzymes impliquées dans la voie de synthèse métabolique du tréhalose à partir du glucose ⁸³. Ces enzymes métaboliques étaient exprimées sous forme de fusion avec un brin d'ADN cible permettant de les immobiliser à la surface par hybridation, les quantités d'ADN sondes étant variées d'un plot à l'autre, pour varier la densité de chaque enzyme. Cela a permis d'étudier l'influence des diverses enzymes du chemin métabolique sur la synthèse du tréhalose.
 - ◆ L'utilisation de protéines-substrats pour la phosphorylation montrant quelques cas d'autophosphorylation ⁸⁴.

1.2.4) Les microarrays d'acides nucléiques

Cette appellation regroupe les microarrays exposant à leur surface un grand nombre d'acides nucléiques.

Puces à	ADN			
Éléments ancrés	Acides nucléiques (Oligonucléotides, ADNc, PNAs)			
Analyte	ADN	ARNm	Protéines	Étiquette-ADN, ARN ou PNA
Applications	Séquençage, génotypage, polymorphisme (SNPs)	Profils de transcription	Profils d'interactions	Déconvolution, immobilisation

Tableau 7 : Applications des microarrays d'acides nucléiques.

Deux brins d'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) s'apparient en formant la désormais célèbre double hélice, à condition que la température ne soit pas trop élevée. Cette propriété intrinsèque est utilisée par les microarrays d'acides nucléiques. Les acides nucléiques en

question sont soit des oligonucléotides de synthèse courts (15 à 30 nucléotides) ou longs (jusqu'à 120 nucléotides), soit des ADN complémentaires amplifiés par PCR (100 à 3000 paires de bases) ⁸⁵. Ces microarrays d'acides nucléiques font toujours l'objet d'une littérature importante qui décrit les progrès faits à tous les niveaux : de la préparation d'échantillons ^{86, 87} à l'analyse des données ⁸⁵ en passant par la mesure de la fluorescence ⁸⁸, ainsi que les diverses applications (**Tableau 7**) dérivant entre autre de la détection de l'ADN ou de l'ARN.

Détection de l'ADN

Les microarrays d'acides nucléiques ont été utilisés pour cartographier les gènes ^{89, 90} et identifier des séquences ⁹¹. Leur application à **l'hybridation génomique comparative** (CGH) permet de détecter la variation du nombre de copies d'un gène, ou sa délétion, qui sont associées avec diverses pathologies comme le cancer du sein ⁹², et permet aussi de suivre l'évolution d'organismes pathogènes ⁹³. La forme la plus courante de variation de séquences géniques, les polymorphismes mono-nucléotidiques (SNPs), s'observe environ tous les 1000 nucléotides ⁹⁴ et son effet sur l'activité des gènes est parfois responsable de maladies. Les microarrays d'acides nucléiques permettent de détecter ces SNPs, par exemple huit SNPs ont été identifiés sur l'exon 11 du gène BRCA1 impliqué dans les cancers du sein et des ovaires ⁹⁵. L'étude de l'évolution sur de très longues périodes constitue une autre application des microarrays détectant les SNPs ⁸⁵.

Détection de l'ARN

Les microarrays d'acide nucléiques sont principalement utilisés pour suivre l'expression des gènes, la transcription de l'ADN en ARNm étant la première étape de la synthèse des protéines. La comparaison du profil de transcription (**transcriptome**) étudié avec celui d'un témoin, généralement effectuée en calculant les ratios des deux marqueurs fluorescents Cy3 et Cy5 (**Figure 3**), a conduit à des résultats intéressants, notamment en oncologie ^{96, 97}, pour l'étude des variations d'expression génique au cours du cycle cellulaire ⁹⁸ ou sous l'effet de facteurs externes ^{99, 100}.

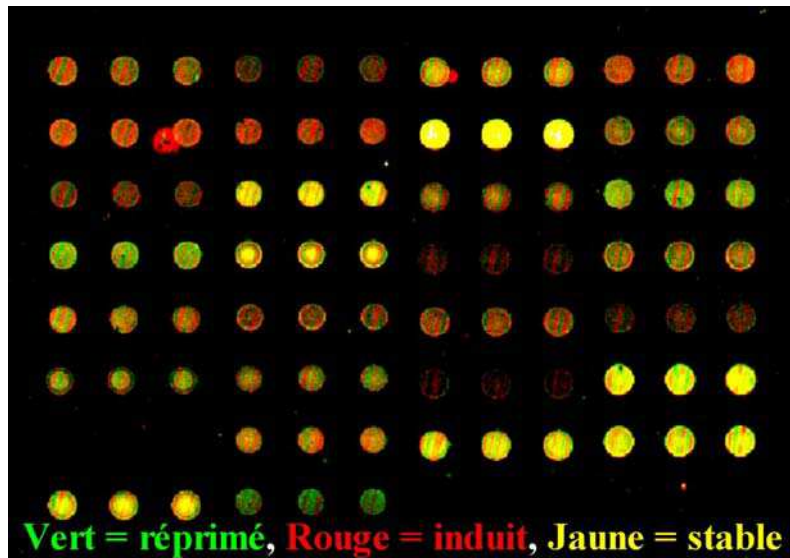


Figure 4 : Image d'une puce à ADN en fluorescence représentant les ratios Cy3/Cy5.

Les plots rouges correspondent à la surexpression d'un gène par rapport à un échantillon témoin, les plots verts à une sous-expression et les plots jaunes à une expression inchangée (Fouqué *et al*, accepté dans *Biosensor and Bioelectronics* en Octobre 2006).

Interaction Protéines-ADN

Les protéines se liant à l'ADN jouent un rôle important dans la régulation de la transcription, dans la réplication des chromosomes et dans la réparation de l'ADN : l'étude de telles **interactions ADN-protéines** est rendue possible par la technologie microarray avec trois méthodes majeures ¹⁰¹ :

- ChIP-chip (Chromatine ImmunoPrecipitation chip) : un anticorps est utilisé pour immunoprécipiter les fragments d'ADN liés à une protéine d'intérêt, qui seront ensuite purifiés, amplifiés et marqués, puis hybridés sur un microarray d'acides nucléiques.
- DamID (DNA adenine methyltransferase IDentification) : la protéine d'intérêt, fusionnée avec l'enzyme Dam (DNA adenine methyltransferase), est surexprimée. Dam méthyle l'ADN à proximité du site de liaison de la protéine. Ces sites méthylés sont ensuite repérés sur un microarray après digestion par une enzyme de restriction méthyl-spécifique, amplification, marquage et hybridation.
- PBM (Protein Binding Microarray) : une protéine purifiée est mise en contact avec un microarray d'ADN double-brins, la protéine ayant été préalablement marquée ou étant révélée par un anticorps marqué.

La réparation enzymatique de l'ADN est d'ailleurs étudiée en utilisant des microarrays, notamment au laboratoire des acides nucléiques du CEA ¹⁰².

Déconvolution spatiale

Enfin, la **déconvolution spatiale, sur microarray d'ADN, de mélanges complexes** d'entités préalablement étiquetées à l'aide d'acides désoxyribonucléiques^{103, 104} ou d'acides nucléiques peptidiques (PNAs)¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ constitue une application élégante des microarrays d'acides nucléiques. Ces différentes approches ont toutes pour principe d'amener les entités d'intérêt à leur position sur le microarray, par hybridation des étiquettes nucléiques qu'elles portent avec leurs partenaires de séquence complémentaire fixés sur le microarray. En pratique, il suffit de mettre en contact la solution contenant le mélange avec le microarray d'ADN contenant les sondes complémentaires, dans des conditions permettant l'hybridation. Cela peut aussi simplement servir de technique d'immobilisation de protéines fusionnées avec un brin d'acide ribonucléique^{83, 108}.

Les PNAs ont aussi un potentiel élevé comme éléments sondes d'un microarray, malgré un coût encore trop élevé¹⁰⁹ : comparés à l'ADN, outre une stabilité chimique et une stabilité enzymatique supérieures, les PNAs présentent de meilleures caractéristiques d'hybridation et sont seuls à permettre l'utilisation de certaines méthodes sans marquage comme la spectrométrie de masse TOF-SIMS (Time Of Flight- Secondary Ions Mass Spectroscopy)¹¹⁰.

1.3) Les microarrays d'entités biologiques complexes

1.3.1) Les microarrays de virus

La réalisation de microarrays de virus serait potentiellement très intéressante, en particulier pour étudier leur interaction avec différents types de molécules ou macromolécules, pour des applications en criblage ou biocapteurs¹¹¹. De tels microarrays peuvent être obtenus par des modifications chimiques localisées¹¹², ou bien en confinant les virus dans des nanopuits creusés dans du polyéthylène glycol par lithographie douce¹¹¹. Dans la même veine, des virus de la mosaïque du tabac ont été immobilisés par hybridation de l'ARN viral, préalablement rendu accessible par modification génétique de la capsid, sur des plots de chitosane portant une séquence d'ADN complémentaire¹¹³. **(Figure 5)**.

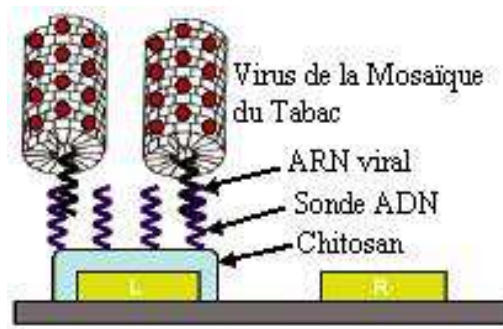


Figure 5 : Immobilisation du virus de la mosaïque du tabac par hybridation.

Cette méthode semble bien adaptée à l'obtention de microarrays (peu onéreuse, permettant l'obtention de matrices de grande taille, et utilisant la technologie des puces à ADN), à condition que les virus à immobiliser puissent subir une modification partielle de leur capsid.

1.3.2) Les microarrays cellulaires

Cette appellation regroupe les microarrays fondés sur l'utilisation de cellules (Tableau 8).

Puces à	Cellules (analyse phénotypique)			
Eléments ancrés	Cellules			Cellules, révélateurs
Eléments perturbateurs	Acides Nucléiques	Matrice extracellulaire	Petites molécules	Peptides et anticorps
Applications	Transfection	Adhésion, différenciation.	Toxicité	Sécrétions cellulaires

Tableau 8 : Applications des microarrays cellulaires.

Le plus souvent, les études portent sur un seul type cellulaire à la fois mais les conditions expérimentales (C) de chaque position (x,y) sont variées et les phénotypes résultants sont donc différents d'un plot à l'autre. Les microarrays non-cellulaires correspondaient à des approches *in vitro*, l'utilisation de la cellule, unité de base du vivant, permet des applications se rapprochant de tests *in vivo* fondées sur l'observation du phénotype (mort cellulaire, expression de protéines, sécrétions cellulaires). Certains microarrays de glycanes, de peptides, de protéines de la matrice extracellulaire ou d'anticorps, mettent à profit des interactions sélectives avec la surface des cellules pour immobiliser spécifiquement certaines cellules¹¹⁴. Parfois limités à la détection de certaines cellules⁴³, ils sont le plus souvent dédiés à une analyse fonctionnelle^{115, 116}.

L'analyse fonctionnelle de cellules, c'est-à-dire **l'observation de paramètres phénotypiques**, dans un format microarray, a été initiée par le groupe de Sabatini. La méthode consiste à incuber des cellules sur un microarray de vecteurs d'expression

prisonniers dans un gel, et à observer les phénotypes par fluorescence directe (GFP) ou par immunofluorescence ¹¹⁷. De nombreux travaux utilisant ce concept ont été réalisés, profitant en particulier de la popularisation des ARN interférences (RNAi) ¹¹⁸. Dans les approches de type « Sabatini », les cellules sont incubées dans un même milieu qui recouvre l'ensemble du microarray, ce qui augmente les risques de contamination croisée. L'utilisation de « tensioarrays » (microarrays emprisonnant les cellules dans des gouttelettes de milieu en utilisant un différentiel de tension de surface) permet de résoudre ce problème ¹¹⁹. En théorie, l'utilisation des tensioarrays pourrait également s'appliquer aux cellules non adhérentes, car celles-ci resteraient confinées avec les ARN interférences dans les microgouttes. A l'inverse, l'approche de Sabatini requiert des cellules adhérentes, limitation qui a été résolue récemment en transfectant des cellules non adhérentes accrochées sur une surface recouverte d'oleyl polyéthylène glycol se liant fortement aux membranes cellulaires ¹²⁰.

On peut également influencer sur le phénotype exprimé par des cellules, et en particulier sur l'adhésion et la différenciation de cellules souches, à l'aide de la Matrice ExtraCellulaire (ECM). Pour cela, on peut utiliser des mélanges variables de composés de la ECM ¹²¹ ou de polymères ²⁶, ou bien imposer une distribution spatiale précise à la ECM ¹²² permettant de contrôler la forme des cellules.

L'effet sur des cellules d'un microarray de petites molécules emprisonnées dans un polymère biodégradable est un bel exemple de l'influence de composés chimiques ¹²³ : le microarray est incubé (selon la méthode de Sabatini) en présence de cellules, dont la survie est affectée par la diffusion des petites molécules dans un rayon de quelques centaines de microns. Cette approche est prometteuse pour la recherche de molécules thérapeutiques ou pouvant servir de perturbateurs en génétique chimique, même si on retrouve le problème de la solubilisation et de la diffusion différentielle entre les composés, déjà évoqué dans le cadre des SMMs μ ARCS. Ici encore, l'utilisation de « tensioarray » constitue une alternative intéressante, les composés chimiques étant simplement dissous dans les gouttes (Lemaire, F. accepté dans *PlosOne*).

Outre la fixation spécifique, la capture des cellules à l'aide de peptides présente l'avantage de permettre des études fonctionnelles, en induisant par exemple la phosphorylation ⁵¹ ou la sécrétion (identifiée à l'aide d'anticorps marqués) de facteurs spécifiques (*e.g.* cytokines) par des lymphocytes T immobilisés par interaction avec des peptides-MHC (Major

Histocompatibility Complex) ¹¹⁵. Cette dernière approche permet d'envisager des applications diagnostiques et pronostiques.

1.3.3) Les microarrays de tissus

L'analyse classique des tissus humains « tranche par tranche » est lente, coûteuse, difficile à standardiser, et consomme d'importantes quantités d'échantillons cliniques précieux. La technologie des microarrays de tissus a été développée pour répondre à ces limitations en permettant d'analyser simultanément jusqu'à 1000 minuscules échantillons de tissus disposés dans un matériau support (typiquement la paraffine) ¹²⁴. Ce nombre a récemment été porté à 10 000 en préparant un bloc par découpe et assemblage de tissus, avant d'en prélever une fine couche pour former le microarray, évitant ainsi la perte d'espace due au matériau support ¹²⁵. Les microarrays ainsi obtenus permettent de réaliser des marquages, et notamment de mettre en évidence l'expression différentielle de gènes par immunohistochimie ¹²⁴. De telles mesures ont permis de valider des cibles thérapeutiques observées sur des microarrays d'ADN, notamment pour de nombreux types de cancer, comme le cancer de la prostate ¹²⁶ ou le cancer du sein ^{127, 128}

1.3.4) Les microarrays d'organes ou d'organismes vivants

L'étape suivant celle des microarrays de tissus serait l'utilisation d'organes fonctionnels dont on étudierait le comportement soumis à des éléments perturbateurs. Réaliser des organes à partir de cellules par croissance contrôlée de tissus reste cependant un défi, que tente de relever le génie tissulaire. Il semble à l'heure actuelle plus simple d'envisager l'étude de l'influence de divers composés sur des organismes entiers.

Le fouille-roche (zebrafish en anglais) est un petit poisson dont les larves sont transparentes et font quelques millimètres de long. Son utilisation pour les criblages sur organisme entier est courante en génétique et en génétique chimique, car c'est un vertébré possédant des organes distincts et de structure proche de leurs homologues humains ⁷. De plus, la croissance de leurs embryons est possible dans les puits d'une microplaque ^{7, 14, 129}. Pour peu que des organismes de dimensions submillimétriques présentent les mêmes avantages que le fouille-roche, il semble envisageable d'appliquer ce type d'approches au format microarray. Les larves de drosophile ou les acariens, par exemple, pourraient être de bons candidats.

1.4) Les approches hybrides

La distinction en trois grands groupes de microarrays (chimiques, biologiques ou d'entités biologiques complexes) présentée dans les paragraphes précédents permet une visualisation compartimentée du très large panel d'applications des microarrays. Ce découpage présente l'avantage d'être didactique. Cependant, les frontières sont ténues entre le vivant et la chimie, et donc entre ces trois groupes. Par conséquent, de nombreuses approches hybrides ont vu le jour : nous appellerons approche hybride toute approche puisant dans les procédés d'au moins deux des trois grands groupes (certaines de ces approches ont déjà été abordées).

Une approche utilisant des cellules semble mériter l'appellation hybride, car elle couple une réaction enzymatique avec l'évaluation de la toxicité de métabolites sur des cellules : répondant au nom de MetaChip pour Metabolizing enzyme toxicology assay Chip, le procédé consiste à encapsuler des enzymes métaboliques P450 dans des gouttes de polymère formées par procédé sol-gel (5 à 100 nL), à leur ajouter une molécule active (« drug »), puis à presser immédiatement une monocouche de cellules sur le microarray obtenu ¹³⁰. L'enzyme catalyse une modification de la molécule active, qui diffuse ensuite vers les cellules, dont on observe la mortalité. L'utilisation de cette technologie pourrait profiter grandement à la recherche de médicaments en permettant d'éliminer plus tôt les candidats ne présentant pas un bon profil ADME/Tox (Absorption Digestion Metabolisation Excretion / Toxicology).

Outre la déconvolution de SMMs sur microarrays d'acides nucléiques (vue au §1.1.1), des approches développées récemment combinent les microarrays de petites molécules avec des techniques de biologie moléculaire. C'est le cas de la stratégie « Expression Display » mise au point par le groupe de Yao ¹³¹ : de multiples complexes ARNm-ribosomes-tyrosines phosphatases, obtenus par transcription et traduction *in vitro*, sont mis en contact avec un inhibiteur suicide. Les ARNm des complexes fixés par ces sondes à activité, qui correspondent aux enzymes d'intérêt, sont élués, amplifiés par RT-PCR, puis déconvolués sur un microarray d'ADN. Autre approche hybride, la synthèse de composés chimiques guidée par l'ADN couplée à une sélection *in vitro* suivie d'étapes d'amplification et d'hybridation a récemment permis de démontrer la formation de liaisons carbone-carbone catalysées par des métaux à partir de banques de conjugués petites molécules-ADN ¹³².

2) MISE EN ŒUVRE : LE TRYPTIQUE SUPPORT-FABRICATION-DETECTION

Les nombreuses applications décrites au cours de la section 1) requièrent toutes une technologie de préparation des puces et un protocole adapté pour la création du microarray et la lecture des résultats. Nous allons décrire au cours de ce paragraphe diverses méthodes de réalisation des **supports**, de **fabrication** de microarray ainsi que les méthodes de **détection** existantes.

2.1) Les supports pour microarrays

Par définition, la réalisation d'un microarray requiert un positionnement spatial précis des entités utilisées. Une pléiade de méthodes d'immobilisation des entités-sondes a vu le jour au fur et à mesure de la complexification des applications.

Les supports de départ sont souvent des surfaces de verre ou de silicium oxydé, des surfaces recouvertes d'or ou encore des membranes (de nylon, par exemple). Il existe deux manières de modifier une surface : le dépôt de couches de macromolécules comme la poly-L-lysine, la nitrocellulose ou le PVDF (Poly(DiFluoroVinylidène)), et les monocouches auto-assemblées (Self-Assembled Monolayers, SAMs) que les silanes forment sur le verre ou sur le silicium oxydé et que les thiols forment sur l'or, avec des espaceurs plus ou moins longs comme les polyéthylènes glycols^{19,79}. Ces modifications primaires sont la première étape de stratégies que l'on peut distinguer selon trois groupes : l'ancrage par fixation non covalente, l'ancrage par fixation covalente, l'ancrage par emprisonnement. Les deux premiers groupes se subdivisent en deux selon que la méthode de liaison est spécifique ou non, ce qui peut avoir des conséquences importantes sur l'activité biologique¹³³. Cela a notamment été montré dans le cas de l'immobilisation de la phénol sulfotransférase, dont l'activité est 5 à 6 fois moindre lorsqu'elle est immobilisée de manière non spécifique⁷⁹.

2.1.1) Ancrage par fixation non covalente

Immobilisation non spécifique

- ◆ ADN : des microarrays d'ADNc ont été réalisés par simple dépôt sur des membranes de nylon⁹⁵.
- ◆ Protéines : des protéines peuvent être déposées par **simple adsorption** sur des supports de verres recouverts de Poly-L-lysine¹³⁴, de nitrocellulose ou de PVDF¹³⁵. Des dérivés de calix-crown-5 ont également été utilisés pour l'immobilisation

des protéines ¹³⁶. Le dépôt des protéines peut même se faire par atterrissage en douceur des protéines d'un mélange complexe triées à l'aide d'un spectromètre de masse modifié ¹³⁷. Enfin, cibles thérapeutiques importantes, les protéines membranaires peuvent être ancrées dans une couche de lipides, nécessaire au maintien de leurs fonctions biologiques, déposée sur du verre recouvert d'une couche de γ -aminopropylsilane ou d'or ⁷⁷.

- ◆ Peptides : leur faible taille les pénalise en les rendant peu accessibles lorsqu'ils sont adsorbés non-spécifiquement sur un support ou s'ils sont mal orientés ⁵⁰.
- ◆ Petites molécules : on peut rappeler ici l'exemple des microarrays chimiques secs ¹⁵, où les composés dissous dans du DMSO sont déposés sur une feuille de polystyrène, puis laissés à sécher. La mise en contact avec leurs cibles potentielles se fait par migration à travers un gel d'agarose.
- ◆ Polymères : le **dépôt de polymères** en solution sur des supports de verre recouverts de pHEMA (poly(HydroxyEthyl MétAcrylate)), de films d'agarose ²⁸ ou de nickel chélaté ¹²³ a été utilisé, les deux premiers films empêchant, le troisième favorisant, l'adhésion de cellules. Une autre approche consiste à polymériser *in situ* des monomères déposés sur des supports de verre recouverts d'un film de pHEMA ²⁶ ou de précurseurs de sol-gel ¹³⁰. Enfin, des glycopolymères de différentes tailles (3,3 à 2000 kDa) ont été spottés sur des membranes de nitrocellulose connues pour leur forte interaction non-covalente avec les sucres : la fixation s'est avérée d'autant plus efficace que le poids moléculaire des glycopolymères était élevé ⁴¹.
- ◆ Cellules : les cellules adhérentes ont la propriété de former une monocouche lorsqu'elles sont en contact avec une surface adéquate (verre ou plastique recouvert de polylysine par exemple).

Immobilisation spécifique

- ◆ Protéines : de nombreux couples moléculaires forment de **solides liaisons non covalentes**. La modification de la surface avec un des partenaires du couple et de l'entité à ancrer avec l'autre permet une fixation robuste et spécifique. La liaison avidine-biotine ¹³⁸, une des plus fortes d'entre elles ($K_d = 10^{-15}$ M), a été largement utilisée pour immobiliser des protéines porteuses d'une étiquette biotine sur des surfaces recouvertes d'avidine ou de ses dérivés ¹³⁹⁻¹⁴¹. De la même manière, des

protéines portant des étiquettes polyhistidines, CBM (Carbohydrate Binding Module) ou GST (Glutathione-S-transférase) ont été immobilisées sur des supports respectivement modifiés avec des ions métalliques chélatés (Ni-NTA : Nickel-NitriloTriAcetic acid ¹⁴² ou Cu-IDA : Copper IminoDiAcetic Acid ⁷⁹, avec de la cellulose ¹⁴³ ou avec de la glutathione ¹⁴⁴. Enfin, l'utilisation de microarrays d'acides nucléiques permet d'immobiliser aisément un mélange de protéines portant des étiquettes ARN ⁸³, ADN ¹⁴⁵ ou PNA ¹⁰⁶.

- ◆ Peptides : les mêmes interactions sont *a priori* utilisables pour les peptides, qui par exemple, modifiés avec une biotine N-terminale, ont été immobilisés sur des films d'avidine ^{60, 146} ou neutravidine ¹⁴⁷.
- ◆ Petites molécules : l'utilisation de microarrays d'acides nucléiques pour l'immobilisation et la déconvolution spatiale de petites molécules ayant interagi avec des protéines constitue une approche élégante ^{17, 18}.
- ◆ Cellules : l'immobilisation spécifique des cellules peut se faire par interaction avec des macromolécules ¹²⁰, des glycanes ¹¹⁴ ou encore des peptides-MHC ^{51, 115}.

2.1.2) Ancrage par fixation covalente

Une fixation covalente peut être chemosélective ou non, l'intérêt d'une liaison chemoselective étant de préserver des fonctions réactives (*e.g.* amine ou thiol) quand elles sont indispensables à l'activité biologique.

Immobilisation non chemosélective

- ◆ ADN : les protocoles standards des supports modifiés par des SAMs présentant des fonctions époxydes ou amine recommandent souvent de parfaire l'immobilisation par une cuisson ou une exposition aux UV, la chaleur et les radicaux produits engendrant des liaisons aléatoires et des réactions parasites ¹⁴⁸.
- ◆ Protéines : la **fixation covalente** non chemosélective de protéines se fait par l'intermédiaire des fonctions amines ou thiols présentes dans la séquence d'acides aminés (le détail des réactions mises en jeu est donné juste après dans le cas des peptides). Il existe aussi une méthode d'immobilisation covalente et non chemosélective des protéines, basée sur la photoactivation UV (350 nm) d'un polysaccharide portant des fonctions aryl diazine ¹⁴⁹.

- ◆ Peptides : les fonctions amines ou thiols présentes dans la séquence d'acides aminés sont utilisées dans les approches non chemosélectives :

Fonction de la protéine ou du peptide	Surface	Références
Amine	Aldéhyde, BSA-NHS (Bovine SerumAlbumine- NHS)	58
	NHS (N-hydroxysuccinimide)	150
	Isothiocyanate	
	Epoxyde	59
Thiol	Maléimide	151
	Bromométhylamide	152
	Pyridyle disulfure	153

Tableau 9 : Fixation covalente non chemoselective des peptides/protéines.

Les réactions en question sont illustrées ci-dessous (**Figure 6**) :

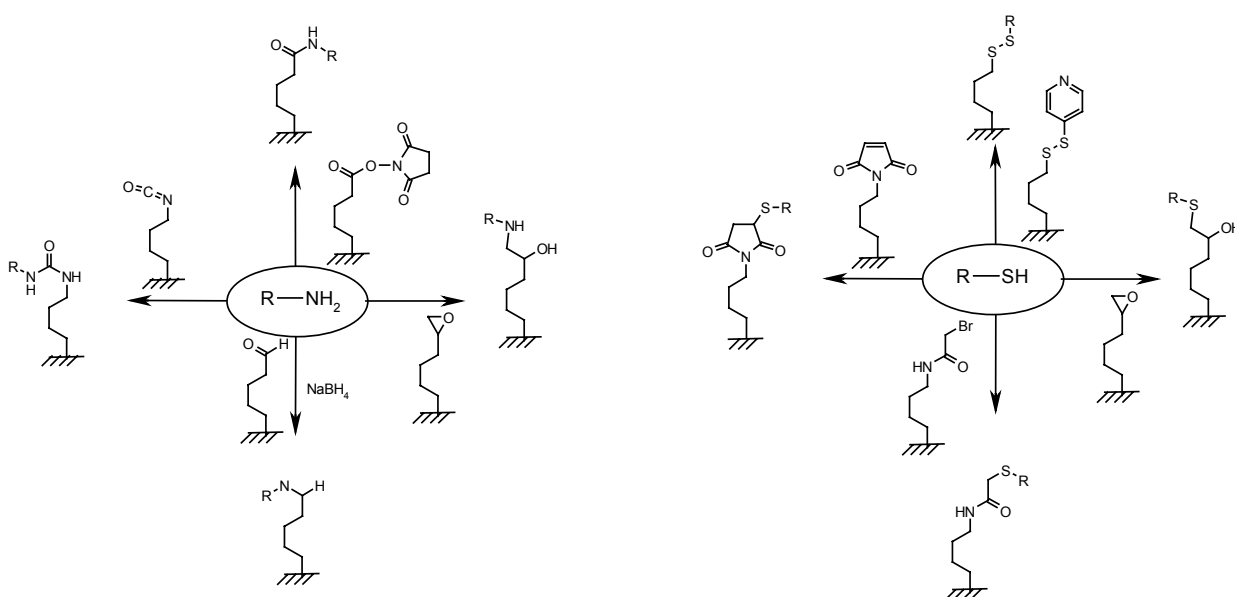


Figure 6 : Immobilisation covalente non chemosélective de peptides/protéines.

- ◆ Petites molécules : l'immobilisation covalente non sélective de petites molécules, obtenue par exposition aux UV en présence de fonctions aryl diazirine liées à la surface, présente deux intérêts majeurs : le premier est d'éliminer la nécessité d'un groupe fonctionnel commun dédié à la réaction d'immobilisation (problématique dans le cas de banques de molécules issues de sources naturelles), le second est de positionner aléatoirement les molécules, exposant ainsi toutes les facettes aux interactions ¹⁵⁴.

Immobilisation chemosélective

- ◆ ADN : les méthodes de **synthèse *in situ*** fondées sur la photolithographie ^{2, 155, 156} correspondent à une succession d'étapes de photodéprotection/fixation covalente avec comme point de départ un support de verre recouvert d'une SAM de silanes portant une fonction amine. Quant à la **fixation covalente** d'oligonucléotides modifiés, elle est possible sur différents types de surfaces : oligo-silane sur verre non modifié ; oligo-NH₂ sur verre modifié isothiocyanate ou aldéhyde ; oligo-disulfure (ou oligo-acrylamide) sur verre modifié thiol ⁹⁴. D'autres approches existent, notamment basées sur la formation d'oximes ¹⁵⁷.
- ◆ Protéines : une méthode de liaison chemoenzymatique a permis de fixer covalamment des protéines-fusion de l'ubiquitine sur des supports de verre recouverts d'un gel polyacrylamide fonctionnalisé avec des cystéines ¹⁵⁸. Les méthodes d'immobilisation covalente chemosélective sont détaillées juste après pour les peptides.
- ◆ Peptides : les **synthèses *in situ*** suivent soit la méthode photolithographique initiée par Fodor ², soit la technique de synthèse sur membrane de cellulose baptisée SPOT ¹⁵⁹. Le problème majeur de la première approche, à savoir l'obtention des 20 acides aminés portant des groupements protecteurs photolabiles, a été récemment contourné par des méthodes plus simples à mettre en œuvre : dans un cas, c'est la photogénération d'un acide qui permet d'utiliser la chimie classique Boc (tert-Butyloxy-carbonyl), les masques optiques étant de surcroît remplacés par des micromiroirs ¹⁶⁰, dans l'autre, la synthèse photolithographique de peptoïdes (oligomères de glycines N-substituées) ne nécessite qu'une seule brique de construction avec groupe protecteur photolabile ¹⁶¹. La densité de peptides est limitée à environ 100 séquences par cm² pour la technique SPOT, dans laquelle les réactifs et les aminoacides sont déposés séquentiellement sur une membrane ¹⁵⁹.

Les approches **covalentes chemosélectives** utilisent des peptides (le plus souvent modifiés) et des surfaces modifiées de manière telle que seule une fonction du peptide va réagir avec la surface, ce qui assure une liaison de la même partie de tous les peptides à la surface (**Tableau 10, Figure 7**).

Fonction de la protéine ou du peptide	Surface	Type de réaction, Liaison formée	Références
Cystéine N-terminale	Thioester	Ligation chimique « native », Amide	146
	Glyoxylyl	Cyclisation, Cycle thiazolidine	51
Alkoxyamine	Glyoxylyl	Schiff, Oxime	162
	Aldéhyde		20
Glyoxylyl	Semicarbazide	Schiff, Semicarbazone	57
Cyclopentadiène	Benzoquinone	Diels-Alder, Adduit tricyclique	19
Phosphorane	Azide	Ligation de Staudinger, Amide	163

Tableau 10 : Fixation covalente chemosélective des peptides/protéines.

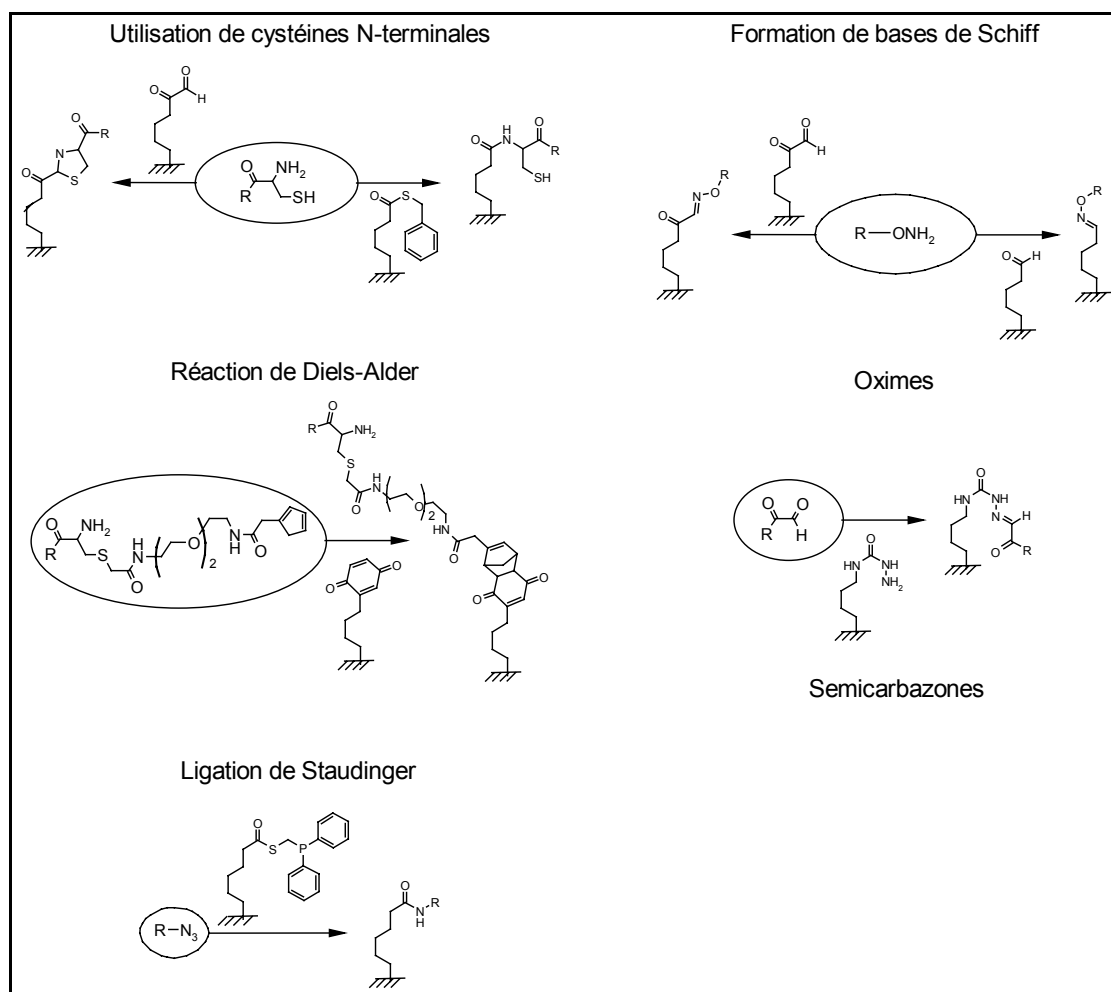


Figure 7 : Immobilisation covalente chemosélective de peptides/protéines.

- ◆ Petites molécules : différentes méthodes de fixation covalente ont été employées (**Figure 8**), par exemple par réaction entre une fonction thiol et une surface maléimide ^{6, 151}, une fonction alcool et une surface chlorée ⁸, une fonction amine et une surface N-hydroxysuccinimide ¹⁶⁴. Plus original, le groupe de Schreiber a immobilisé covalamment des petites molécules par le biais de leurs fonctions phénol ou acide carboxylique en utilisant des supports recouverts de diazobenzylidènes ¹³ et celui de Mrksich a adapté sa méthode fondée sur la réaction de Diels-Alder entre un cyclopentadiène et une benzoquinone obtenue par photodéprotection puis oxydation d'une hydroquinone protégée par un groupement NVOC (NitroVératrylOxyCarbonyle, photolabile) ¹⁶⁵. La ligation de Staudinger, déjà évoquée pour les protéines et les peptides, a aussi été appliquée aux petites molécules ¹⁶⁶.

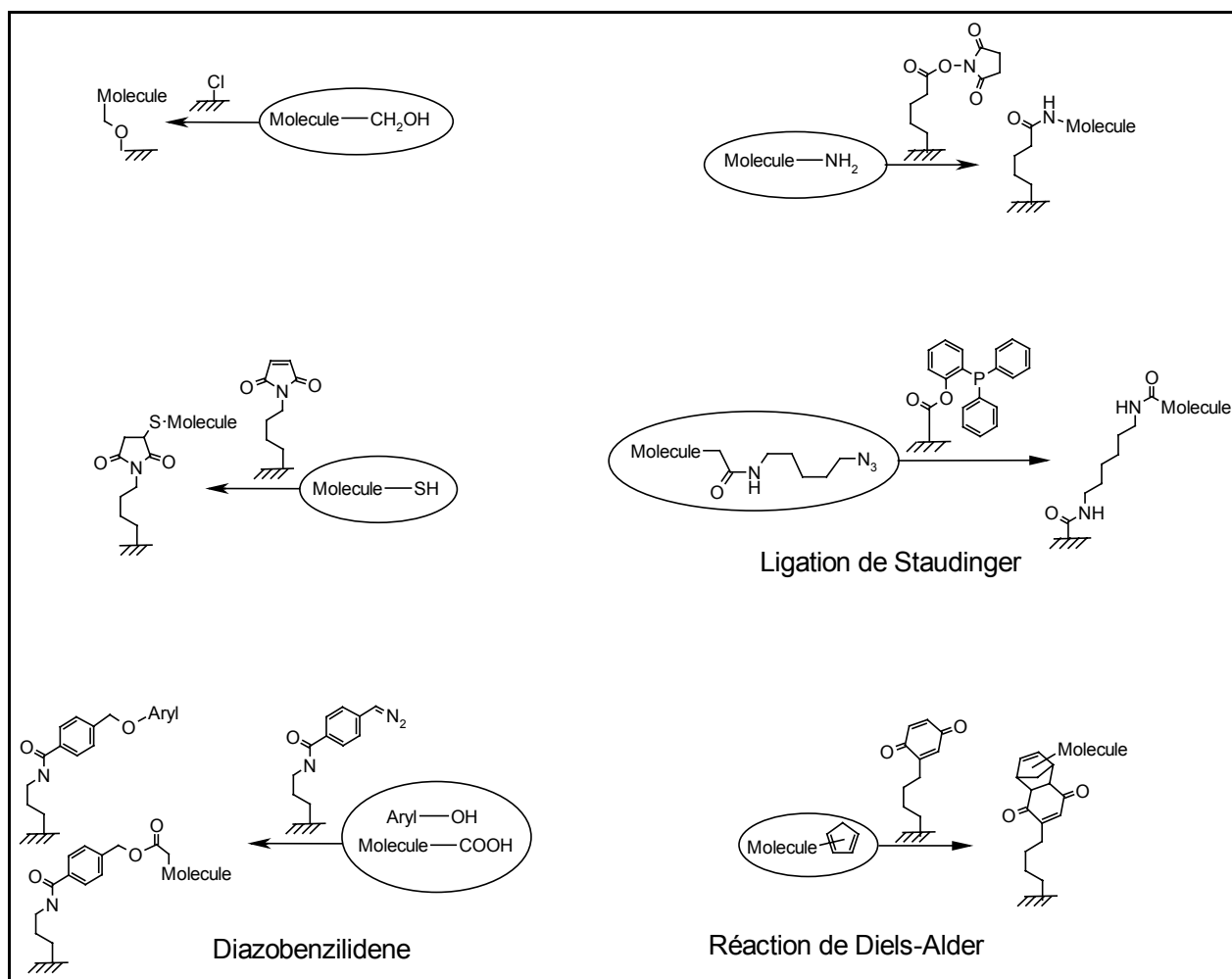


Figure 8 : Immobilisation covalente de petites molécules.

2.1.3) Ancrage par emprisonnement

L'immobilisation présente des limitations, notamment en terme d'accessibilité, de diffusion et de maintien des propriétés biologiques (en particulier pour les protéines), d'où l'intérêt de développer des approches alternatives comme l'ancrage par emprisonnement, qui ont en plus l'avantage d'être génériques (*i.e.* utilisables pour différents types d'entités). Pour ce type d'ancrage, une modification locale de la surface crée des conditions empêchant la dérive spatiale des entités déposées. On peut distinguer deux méthodes principales : l'emprisonnement à l'aide de **polymères** et l'utilisation d'un différentiel de **tension de surface**.

Les gels d'agarose¹⁶⁷ ou de polyacrylamide^{168, 169} ont été souvent employés, ainsi que divers polymères, tels que PGLA (Poly (D), (L)-LActide/Glycolide copolymer)¹²³, chitosane¹⁷⁰, PET (PolyElectrolyte Thin film)¹⁷¹ ; sol-gels¹³⁰; ou hydrogels^{41, 172}. Le simple dépôt de microgouttes de glycérol peut servir à emprisonner des entités d'intérêt, comme par exemple des composés chimiques ou des substrats^{22, 63}.

Une autre approche consiste à délimiter des petites zones hydrophiles entourées de zones hydrophobes, la différence de tension de surface entre les deux revêtements emprisonnant solidement les liquides déposés sur la zone hydrophile : le terme *tensioarray* est bien adapté pour décrire ce type de surfaces (*surface tension array* en anglais)¹⁷³. Cette approche a été mise en œuvre pour détecter les interactions entre petites molécules et cellules¹⁷⁴ ainsi que pour la synthèse d'oligonucléotides *in situ*¹⁷³. Son efficacité a également été démontrée dans le cas de l'ancrage de peptides, protéines et petites molécules¹⁷⁵ et de cellules¹¹⁹.

2.2) Fabrication de microarrays

2.2.1) Synthèse *in situ*

Déjà abordé sous l'angle de la chimie dans la section 2.1), la synthèse *in situ* d'oligonucléotides ou de peptides recourt à la photolithographie, une technologie permettant d'éclairer des portions de quelques μm^2 du support, et à des groupements protecteurs photolabiles. Cela peut être réalisé directement à partir des techniques de la microtechnologie^{2, 155, 156} moyennant le coût important d'un jeu de masques optiques par puce ou bien avec des micromiroirs orientables individuellement, technique plus facile à mettre en oeuvre¹⁶⁰.

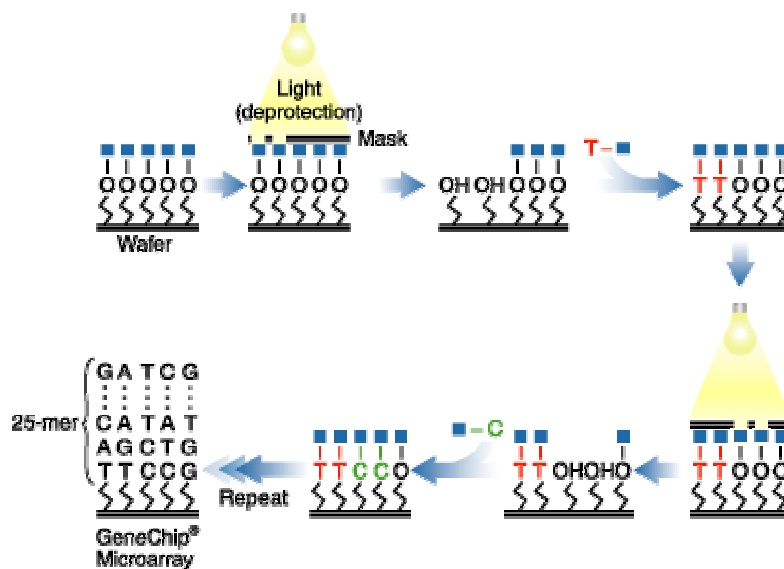


Figure 9 : Synthèse spatialement localisée par photodéprotection (www.affymetrix.com).

La surface est initialement recouverte de groupements photolabiles. En irradiant certaines zones à travers un masque optique, on obtient une déprotection discrète spatialement définie. Le réactif, présent partout, ne pourra réagir que dans les zones déprotégées. Après toute une série de déprotection/ajout de réactif, on arrive à des enchaînements différents à chaque position.

L'utilisation de tensioarrays a permis la synthèse d'oligonucléotides selon une chimie phosphoramidite classique, plus flexible que la synthèse photolithographique, et conduisant à de meilleurs rendements.

Pour les peptides, la technique SPOT, dans laquelle les réactifs et les aminoacides sont déposés séquentiellement sur une membrane (généralement de cellulose), est une alternative intéressante pour les microarrays de faible densité (limitée à environ 100 séquences par cm^2)¹⁵⁹.

2.2.2) Electrodeposition

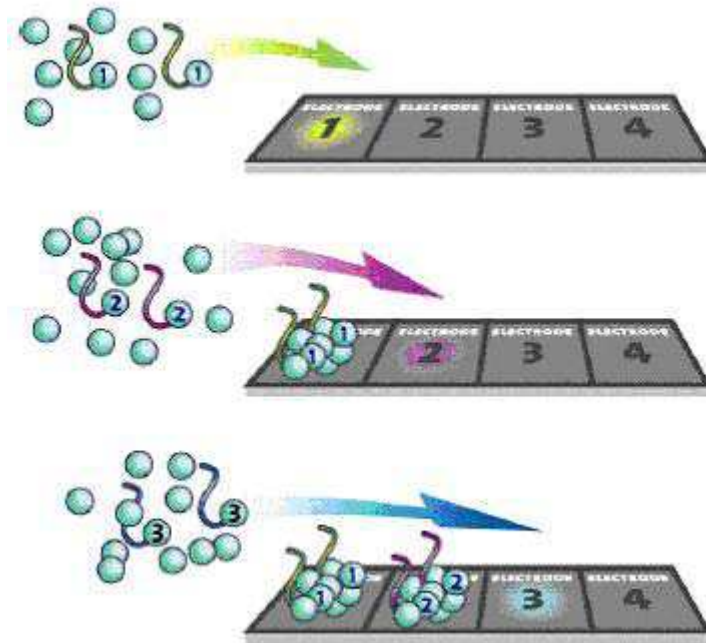


Figure 10 : Principe de l'électrodéposition.

L'électrodéposition consiste à déclencher une réaction chimique de fixation localisée, en appliquant une tension uniquement sur une électrode choisie parmi celles d'une matrice. La puce silicium est introduite dans une solution contenant le mélange pyrrole, pyrrole-oligonucléotide. La tension est alors appliquée sur l'électrode qui doit être fonctionnalisée avec cette oligo-sonde. Après un cycle de rinçage, la puce est immergée dans une nouvelle solution contenant un pyrrole-oligonucléotide ayant une séquence différente, afin de fonctionnaliser l'électrode suivante. Ce protocole est renouvelé jusqu'à fonctionnalisation complète de la puce.

Cette technique de dépôt est employée de manière préférentielle pour la production de microarrays basse densité, c'est-à-dire des puces comportant seulement quelques dizaines de sondes différentes et destinées à des applications spécifiques (identification de séquences ADN bactériennes, par exemple). Lorsque le nombre de sondes/électrodes est trop élevé, il devient préférable de coupler cette méthode avec le dépôt robotisé des solutions contenant le mélange pyrrole, pyrrole-oligonucléotide.

2.2.3) Dépôt robotisé

La dispense robotisée permet de déposer de manière programmable des solutions à des endroits précis sur une surface. Puisque le dépôt robotisé constitue un des points essentiels de notre projet, nous allons passer en revue les robots utilisés pour la fabrication de microarrays, en distinguant les approches **contact** (*i.e.* la partie du robot contenant la solution est en contact avec le support au moment du dépôt) et **non-contact** (la partie du robot contenant la solution n'est jamais en contact avec le support).

Dispense avec contact

Les robots de dispense avec contact utilisent des pointes (pleines ou légèrement creuses à l'extrémité) usinées précisément qui aspirent des volumes faibles de solution (inférieur au μL) par capillarité dans un réservoir (*e.g.* puits de microplaque), puis s'approchent du support et effectuent le dépôt en exerçant une légère pression lors du contact entre la pointe et le support. Les volumes déposés varient typiquement de 0,3 à 1 nL. Une autre approche, connue sous le nom de « pin-and-ring » (pointe et anneau), consiste à emprisonner un film de solution à l'aide d'un anneau grâce à la tension superficielle (comme dans le cas des jouets à bulles de savon pour enfants), puis à déposer une toute petite partie de la solution en traversant le film de haut en bas avec une pointe qui va frapper le support. Une limitation majeure de ces approches est la possibilité de contaminations croisées lors du dépôt d'une même solution à plusieurs endroits, qui va de pair avec l'impossibilité de mélanger plusieurs produits dans un même plot (au premier mélange, le produit contenu dans la pointe sera contaminé). Pour répondre à ce souci, une technologie originale consiste à utiliser un lot de micropipettes jetables, qui défilent comme les cartouches dans une mitrailleuse, en lieu et place des pointes (pipettes Mosquito de TPP LabTech).

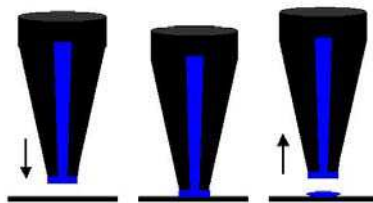


Figure 11 : Principe du dépôt avec contact (<http://www.arrayit.com>).

Les technologies avec contact présentent l'avantage de prélever des volumes particulièrement faibles, et d'éviter les problèmes de fluidique liés à l'aspiration de solutions (en particulier les problèmes liés à la viscosité). Certaines limitations peuvent

toutefois être problématiques. Une limitation majeure de cette approche est la possibilité de contaminations croisées lors du dépôt d'une même solution à plusieurs endroits, qui va de pair avec l'impossibilité de mélanger plusieurs produits dans un même plot (au premier mélange, le produit contenu dans la pointe sera contaminé). Autre problème, les volumes déposés peuvent varier d'un plot à l'autre si les propriétés de surface de la pointe ou du substrat changent au cours du dépôt. De plus, les dilutions *in situ* sont difficiles à réaliser et limitées en gamme dynamique. Enfin, la dépendance des volumes déposés, vis-à-vis du type de surface et de la composition des solutions, oblige à passer par une phase de mise au point si l'on change de types de substrats ou de solutions. Cette technologie avec contact est en fait bien adaptée à la réalisation de microarrays haute densité par transfert de composés dissous dans des solutions identiques.

Dispense sans contact

Dans les approches sans contact, les composés à déposer sont éjectés à distance vers le substrat afin d'éviter tout contact physique entre la pointe et le substrat, ce qui répond aux problèmes de mélange et d'influence du type de surface. Parmi ces technologies sans contact, les vannes solénoïdes sont adaptables au format microarray, mais leur volume minimal de dispense est de l'ordre de 50 nL (en-deçà de ce seuil, les coefficients de variation des volumes déposés deviennent prohibitifs), ce qui leur confère une gamme dynamique faible. Les robots équipés de vannes solénoïdes sont cependant les seuls à permettre de séparer, avec une bulle d'air, la solution prélevée de la solution interne (eau), ce qui empêche toute diffusion, et peut en plus s'avérer utile pour la dispense de composés peu solubles dans l'eau. Il existe aussi des éjecteurs thermiques dans lesquels une résistance chauffante vaporise localement le liquide dans la buse, générant une bulle de vapeur qui éjecte une partie du liquide (**Figure 12 A.**). Même si ce type d'éjection a été appliqué avec succès au dépôt de sondes ADN¹⁷⁶, cette approche ne semble pas idéale pour les composés biologiques, à cause de la forte élévation de température au voisinage de la résistance. Actuellement, le mode de dispense sans contact qui paraît le mieux adapté au format microarray est la technologie piézoélectrique. La compression d'un canal contenant un liquide par une céramique piézoélectrique déformée sous l'effet d'une différence de potentiel, permet d'éjecter une quantité précise et reproductible de liquide (**Figure 12 B.**). L'utilisation d'un signal électrique, généralement en créneaux, à une fréquence de 500 Hz permettra ainsi d'éjecter 500 gouttelettes identiques par seconde, dont le volume sera lié aux dimensions du canal et à la forme du signal électrique appliqué à la céramique

piézoélectrique (pour un liquide donné). Les volumes prélevés dépendent du type de méthode pour l'aspiration de liquides, et les volumes minimum dispensés sont de l'ordre de 0,5 nL (pour une goutte).

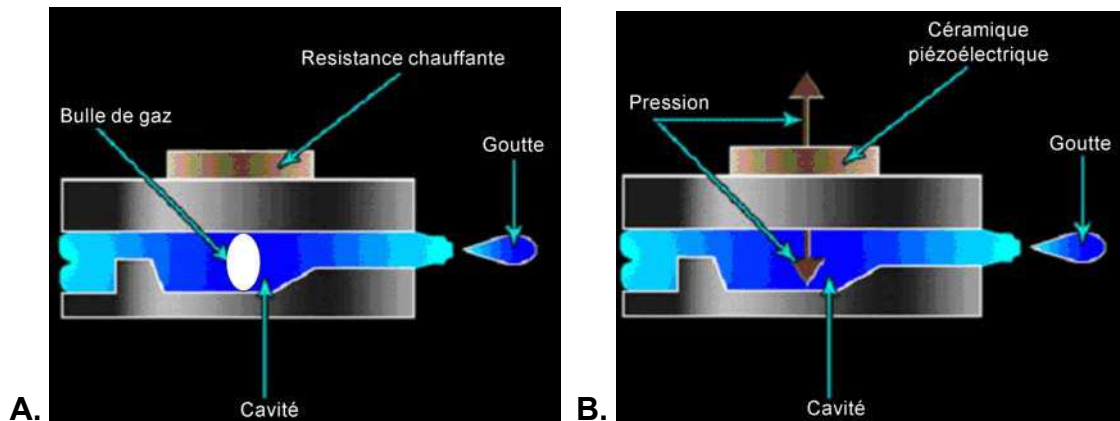


Figure 12 : A. Principe de l'éjection thermique. B. Principe de l'éjection piézoélectrique.

Dans le cas de l'éjection thermique, l'élévation locale de température engendre la création d'une bulle de vapeur dont l'expansion déplace suffisamment de liquide pour éjecter une goutte de la buse (A). Pour l'éjection piézoélectrique, c'est la déformation de la céramique piézoélectrique qui comprime le liquide, provoquant ainsi l'éjection de la goutte (B).

Vers le robot idéal ?

Les robots pour la fabrication de microarrays se cantonnent actuellement à des applications précises, car leurs technologies les limitent en termes de volumes prélevés, de volumes dispensés, de gamme dynamique, de viscosité des solutions, de types de surface, de rapidité (des opérations de prélèvement, dépôt et lavage), de fiabilité, de contrôles de la dispense... Il est nécessaire de clairement définir son application pour déterminer le robot de dépôt le mieux adapté à ses besoins. En réalité, le robot de dispense idéal n'existe pas encore : il serait fort probablement sans contact, pourrait prélever un volume allant de 1 pL à 1 mL, et déposer de 0,01 à 1000 nL, fonctionnerait avec une vaste gamme de solutions (faible ou forte viscosité, présence de tensioactifs, dépôts de solutions concentrées de billes...) et de solvants (*e.g.* DMSO, éthanol), serait rapide, fiable et contrôlerait les éventuelles erreurs de dispense. La technologie d'éjection par ondes acoustiques développée récemment (www.edcbiosystems, www.labcyte.com) pourrait aider à se rapprocher de cet idéal, bien que la présence d'un seul transducteur acoustique rende le procédé un peu lent. Uniquement commercialisée pour le transfert de microplaques à microplaques jusqu'à présent, ce mode de dispense présente un prix encore élevé à ce jour. Enfin, notons qu'il existe une approche permettant de limiter l'utilisation de la dispense robotisée, dans le cas de réactions enzymatiques : pour déclencher quasi-instantanément des

milliers de réactions enzymatiques en parallèle, le groupe de Diamond pulvérise une solution d'enzyme (ou d'un mélange enzyme + substrat) grâce à un aérosol très fin obtenu avec un contrôle précis du débit de l'air et de la solution.

2.3) Les méthodes de détection pour microarrays

De nombreuses méthodes de détection existent Houseman *et al.* en utilisent trois différentes pour évaluer l'activité de kinases : la fluorescence, la radioactivité et la résonance de plasmon de surface (SPR) ¹⁹ présentant chacune des avantages et des inconvénients en terme de coût, rapidité, sensibilité, parallélisation, mise en œuvre. On distingue les méthodes **avec marquage** dont la fluorescence est le représentant favori ¹⁷⁷ ou **sans marquage** avec la SPR comme méthode la plus avancée, dont certaines permettent de suivre en temps réel les interactions ligands-récepteurs.

2.3.1) Méthodes de détection avec marquage

Le marquage se fait directement sur les entités avec lesquelles on réalise l'incubation, ou bien en deux temps, avec par exemple un anticorps secondaire marqué ou un marquage à la biotine révélé par de la streptavidine fluorescente. Les méthodes **avec marquage** comprennent :

- la fluorescence, très employée de par sa simplicité d'utilisation, sa sensibilité élevée et sa compatibilité avec les scanners de fluorescence classiques ^{65, 169, 178}.
- la chemiluminescence, également très sensible, mais présentant une gamme dynamique réduite ¹⁷⁹.
- la colorimétrie, fondé sur une modification de l'absorption de lumière qui met à profit la transformation de substrats chromogènes par des enzymes telles que la phosphatase alcaline ⁵⁰.
- Le marquage avec des nanocolloïdes d'or, fondé sur une modification locale de la réflexion de la lumière ¹⁸⁰. La précipitation d'ions argent sur les colloïdes d'or (« miroir d'argent »), permet d'augmenter la sensibilité ¹⁸⁰.
- la radioactivité, extrêmement sensible, a été utilisée fréquemment, par exemple pour la révélation de microarrays d'ADN ⁹⁵ ou la détection de la phosphorylation ^{6, 19, 51, 59}. Son utilisation n'est pas pour autant triviale et pose des problèmes au niveau de la sécurité et de l'évacuation des déchets.

2.3.2) Méthodes de détection sans marquage

Les méthodes **sans marquage** sont prometteuses car elles ne modifient pas les entités qui interagissent, mais nécessitent généralement un matériel sophistiqué.

- La résonance plasmonique de surface (SPR) mesure la variation de l'angle de réflexion d'une lumière incidente sur une couche métallique déposée sur une surface diélectrique, variation créée par la modification du plasmon de surface (onde électronique de surface, localisée entre la surface métallique et le diélectrique) lors du contact de l'entité portée par le diélectrique avec son partenaire de liaison^{181, 182}, mesurant ainsi la cinétique de l'interaction en temps réel¹⁸³. La parallélisation récemment portée à 400 études d'interactions par puce¹⁸⁴, la possibilité de suivre en temps réel l'association et la dissociation des complexes biomoléculaires et des implémentations technologiques telle que la détection par guide d'ondes¹⁸⁵, justifient l'engouement pour cette technologie.
- La spectrométrie de masse SELDI (Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation) permet de vaporiser et d'analyser en spectrométrie de masse des protéines déposées sur des surfaces métalliques¹⁸⁶ (voir aussi <http://www.ciphergen.co.uk/>). La méthode SAMDI (Self Assembled Monolayer for MALDI) développée par le groupe de Mrksich est particulièrement intéressante : fondée sur l'analyse MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry) de peptides substrats de kinases fixés covalamment à une SAM maléimide-thiol sur or, elle permet de déterminer des profils d'activité de kinases et de quantifier l'inhibition des kinases¹⁸⁷. Le débit de ces méthodes est cependant encore assez limité.
- La microscopie à force atomique (AFM) permet de mesurer des variations de topographie de quelques nm^{136, 188}.
- Les microleviers (microcantilevers) dérivés des leviers supports de pointes AFM¹⁸⁹ portent des ligands qui modifient la position du microlevier ou sa fréquence de résonance par liaison avec une protéine. La sensibilité de ces microleviers est de l'ordre du picogramme¹⁹⁰.
- La microbalance à cristal de quartz (QCM) permet de mesurer des masses de l'ordre du nanogramme/cm²¹⁹¹.
- Enfin, pour les microarrays de cellules, certains paramètres phénotypiques comme la morphologie ou la prolifération sont détectés par observation directe (microscopie, vidéomicroscopie).

2.3.3) Amélioration de la détection

Certains développements ont permis d'augmenter la qualité de la détection. On peut citer à titre d'exemples la préconcentration d'ADN marqué par application de différences de potentiels sur un jeu d'électrodes (US Patent 5,605,662 <http://www.nanogen.com>) ; la RCA (Rolling Circle Amplification) fondée sur la liaison d'un conjugué anticorps-oligonucléotide puis d'un ADN circulaire suivies par une amplification et un marquage *in situ*^{192, 193}, qui augmente la sensibilité de la détection de fluorescence environ mille fois¹⁹⁴ ; ou le renforcement de fluorescence par dépôts de couches réfléchives sous le microarray (B. Fouqué *et al.* accepté dans Biosensors and Bioelectronics) (**Figure 13**). Des lames modifiées pour renforcer la fluorescence sont d'ailleurs commercialisées par la société Genewave, basée à Paris.

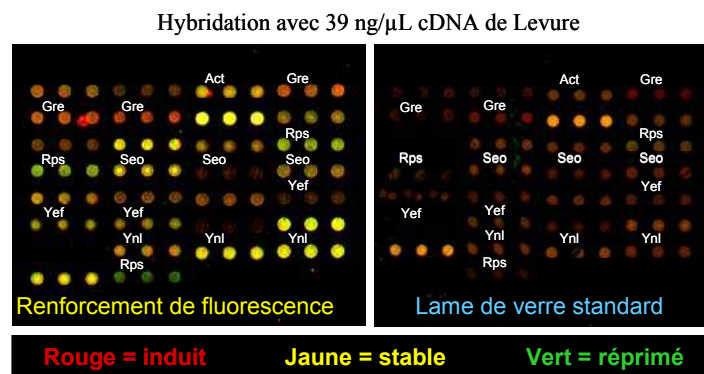


Figure 13 : Analyse de l'expression différentielle de gènes.

Mesure du ratio Cy5/Cy3 suite à un stress toxique au cadmium. La fluorescence sur les deux types de lames a été enregistrée dans les mêmes conditions de gain et de résolution. A puissance de scanner égale, la lame à renforcement de fluorescence génère plus de détails, grâce à un meilleur rapport signal/bruit.

PARTIE II : PARTIE INTRODUCTIVE.
LA THESE : OBJECTIFS & ETAPES CLES.

1) INTRODUCTION

L'objectif de la thèse était de développer des approches originales pour la synthèse chimique et l'enzymologie, fondées sur la technologie microarray. L'organisation spatiale de microgouttes sur une puce devait permettre de réaliser simultanément un grand nombre de réactions chimiques et biochimiques. Face aux lacunes des méthodologies employées dans la littérature, une technologie spécifique a été développée pour atteindre ces objectifs. Ainsi, nous avons privilégié l'emploi de tensioarrays et un dépôt robotisé des composés pour réaliser la matrice de microréacteurs.

Dans cette partie II, nous allons tout d'abord présenter les concepts principaux de l'approche adoptée. La démarche sera ensuite décrite en détails en mettant en exergue les défis concernant la plate-forme technologique, le développement de méthodes de synthèse en solution sur puce, la mise en œuvre de tests d'activité protéolytique sur puce, et la synthèse et le criblage d'une banque chimique combinatoire sur la protéase NS3 du VHC.

2) OBJECTIFS

Notre étude générale de l'état de l'art des microarrays et des méthodologies associées a révélé certains résultats particulièrement significatifs du point de vue de nos thématiques de recherche : le développement de technologies et de méthodes pour la synthèse chimique et l'enzymologie sur puce. Parmi les diverses technologies possibles, celles des tensioarrays et des robots de dépôt sans contact semblent bien adaptées. La synthèse sur microarray est encore une approche marginale, voire même inexistante dans la littérature en ce qui concerne la synthèse en solution dans des microgouttes. Nous nous intéresserons au développement d'une approche originale de synthèse organique sur puce. L'enzymologie sur puce n'est étudiée que depuis quelques années, mais son développement a été rapide, probablement en partie à cause de l'importance diagnostique et thérapeutique des kinases et des protéases. La détection de l'activité des protéases sera au cœur de notre modèle biologique. De manière innovante, la méthode de synthèse en solution sur tensioarray sera ensuite appliquée à l'utilisation, dans un criblage enzymatique, d'une banque de composés chimiques générée *in situ*. Ce paragraphe a pour but d'introduire de synthétiser les objectifs de cette thèse, en termes de technologie, synthèse chimique et enzymologie.

2.1) Technologie

2.1.1) Tensioarrays

La fabrication de tensioarrays, par photolithographie et dépôt de silanes hydrophobes selon un motif spatialement défini, a été décrite pour la première fois en 1994¹⁹⁵. En 1997, Stuart L. Schreiber, à la recherche de méthodes permettant d'analyser des interactions entre petites molécules et protéines dans des cellules, présente des dispositifs qui se rapprochent des tensioarrays, des micropuits (40 à 150µm de profondeur pour 1 mm de diamètre) réalisés dans une surface hydrophobe de PDMS, pour emprisonner des cellules¹⁹⁶. Il explore également la possibilité du dépôt de cellules par aérosol¹⁷⁴. Dans les deux articles, le dépôt est manuel : dans le premier cas, les cellules sont déposées dans les tensioarrays de PDMS en recouvrant les puits avec la suspension cellulaire, dont l'excès est ensuite retiré à la pipette ; dans le second cas, l'aérosol de suspension cellulaire est obtenu par injection à la seringue de la solution dans un flux d'air. Ces dépôts manuels conduisent à une grande hétérogénéité de répartition des cellules. De plus, en raison du nombre élevé d'opérations manuelles et du manque de résolution des dépôts, on ne peut pas envisager de mélanger ainsi plusieurs produits en les ajoutant successivement dans les puits.

2.1.2) Apports des technologies de dépôt robotisé

Avec le recul, il apparaît clairement que la solution de choix pour déposer du matériel biologique sur des tensioarrays, *i.e.* la dispense robotisée sans contact, n'avait pas été envisagée. L'utilisation d'un éjecteur piézoélectrique programmable alimenté par quatre réservoirs distincts, associée à des tensioarrays formés de puits hydrophiles (500 µm de diamètre espacés de 1 mm), a permis en 2001 la synthèse *in situ* d'oligonucléotides par mélanges successifs des quatre nucléotides de l'ADN (A, C, G, T) couplés à l'aide d'une chimie phosphoramidite classique¹⁷³. D'autre part, l'utilisation d'un aérosol ultra-fin obtenu grâce à un contrôle précis du flux d'air et de la solution a été mise à profit par Diamond *et al.* pour déclencher simultanément plusieurs milliers de réactions enzymatiques en parallèle^{22,63}. Ces deux exemples illustrent l'importance de l'évolution des technologies de dépôt, et la synthèse *in situ* d'oligonucléotides montre que la **combinaison d'un support tensioarray et d'un robot de dépôt adapté** peut conduire à des applications élégantes.

Récemment, cette association a été utilisée au sein de notre laboratoire pour des études de toxicité et de transfection sur des cultures de cellules en goutte¹¹⁹. Dans le cadre de notre projet, **l'objectif est de mettre en œuvre les technologies de tensioarrays et de dépôt robotisé pour la synthèse chimique en solution sur puce et pour la détection de l'activité protéolytique sur puce.** Il faudra notamment vérifier que l'éjection des réactifs chimiques est techniquement possible (solvant adapté pour l'éjection et pas de précipitation dans la micropipette de verre qui tient lieu de buse d'éjection), ou encore s'assurer que les protéases ne perdent pas leur activité lors de la dispense piézoélectrique.

2.2) Synthèse Chimique

2.2.1) Synthèse/Immobilisation sur support solide

Jusqu'à présent, les applications de chimie sur puce sont principalement des modifications de surface pour la fixation covalente de molécules ou macromolécules, ou bien des méthodes de synthèses *in situ* de peptides, peptoides ou oligonucléotides (voir la partie I, §2.1)). Des efforts ont aussi été faits au niveau de la synthèse combinatoire de banques sur billes^{197, 198} destinées à être transférées sur des microarrays. Des méthodes de synthèse impliquant des petites molécules fixées sur des macroarrays (technique SPOT) ont également été rapportées^{199, 200}.

2.2.2) Synthèse en solution sur puce

A notre connaissance, le seul exemple de la littérature traitant d'un grand nombre de réactions chimiques en solution réalisées en parallèle sur un microarray est curieusement celui de la polymérisation de monomères précurseurs de biomatériaux potentiels²⁶. Cet unique exemple est d'ailleurs quelque peu biaisé, car le mélange des monomères est effectué dans des plaques 384 puits, avant prélèvement et dépôt sur le microarray à l'aide d'une technologie avec contact. Ainsi, nous n'avons relevé dans la littérature aucune méthode de synthèse chimique en solution sur microarray, impliquant un mélange réellement réalisé sur la puce. Au-delà de la validation technologique, nous avons donc pour **objectif de réaliser les premières synthèses chimiques combinatoires en solution sur microarray.**

2.3) Enzymologie

2.3.1) Importance de la détection de l'activité de protéases

La détermination de l'activité de protéases permet de caractériser la spécificité des substrats et d'obtenir des profils caractéristiques, ou signatures, utilisables pour des applications diagnostiques ²⁰. La recherche d'inhibiteurs de cette activité par criblage de composés chimiques déposés en solution, permet la découverte de nouvelles molécules d'intérêt ou « touches », point de départ de la recherche pharmaceutique ²².

2.3.2) Méthodes de détection de l'activité sur puce

La méthode de détection la plus utilisée pour les microarrays est la fluorescence. Par conséquent, les approches dédiées à l'étude de l'activité des protéases sur puce font majoritairement appel à des substrats peptidiques fluorogènes ^{20, 22, 63} ou encore à des sondes fluorescentes indicatrices d'activités protéolytiques spécifiques ⁸⁰⁻⁸². La **protéolyse sur puce** peut avoir lieu avec toutes les entités libres en solution (biocatalyse homogène, **Figure 13A**) ^{22, 63}, avec un substrat fixé au support (biocatalyse hétérogène, **Figure 13B**) ²⁰ ou avec une enzyme fixée au support et dont l'activité est révélée avec des marqueurs fluorescents ciblant leur mécanisme catalytique (**Figure 13C**). La **protéolyse** peut aussi avoir lieu dans un **réceptacle classique** (**Figure 13D**), puis être suivie d'une déconvolution spatiale sur microarray d'acides nucléiques ¹⁰⁷.

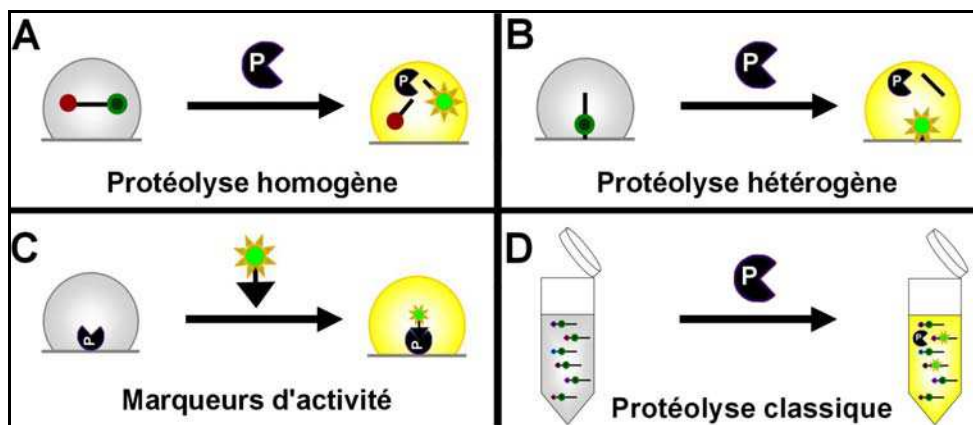


Figure 14 : Différentes manières de conduire la protéolyse.

La protéolyse homogène consiste à conduire la réaction en plaçant l'enzyme et le substrat libres en solution (A). Si le substrat est fixé au support, on peut parler de protéolyse hétérogène, par analogie avec la catalyse des réactions chimiques (B). Si c'est l'enzyme qui est fixée au support, on est toujours dans le cas de la catalyse hétérogène, mais on parle plutôt de marqueurs d'activité, car l'enzyme ne réagit qu'une seule fois (C). Enfin la réaction peut se faire de manière classique, avec un grand volume de solution (tous les substrats portant une étiquette-acide nucléique), le mélange obtenu étant alors séparé par déconvolution spatiale sur un microarray d'acides nucléiques (D).

Dans les approches utilisant des sondes fluorescentes qui ciblent spécifiquement certains mécanismes enzymatiques (leur structure étant généralement dérivés de celles d'inhibiteurs), il est impossible d'observer la constante catalytique réelle (ou *turnover*, k_{cat}), puisque l'enzyme se trouve bloquée après sa réaction irréversible avec la sonde. Ces travaux ont néanmoins permis d'observer l'effet d'inhibiteurs⁸⁰⁻⁸². L'approche développée par Ellman utilisant des substrats peptidiques fluorogènes, tout comme celle de Winssinger de déconvolution spatiale sur microarray, n'ont été utilisées que pour déterminer des profils d'activités protéolytiques.

L'étude de l'activité des protéases sur puces et de leur inhibition par des petites molécules en solution, par le groupe de Diamond, est la méthode qui se rapproche le plus de la nôtre²². L'approche développée par Diamond est **adaptée au très haut débit**, permettant notamment le déclenchement de milliers de réactions simultanément en ajoutant le mélange enzyme-substrat avec un aérosol. Elle présente cependant des **limitations** :

- les réactions ont lieu dans du **glycérol pratiquement pur**, ce qui peut considérablement ralentir les réactions enzymatiques.
- le **dépôt** des composés chimiques est réalisé **par contact**, ce qui rend impossible tout mélange et toute dilution sur puce.
- le mélange enzyme-substrat est déposé avec un aérosol, ce qui pose sans doute des problèmes du point de vue de la **sécurité** ou de la **contamination** à plus ou moins long terme (en particulier avec des substrats fluorogènes). De plus cela oblige à utiliser la même concentration d'enzyme et de substrat dans l'ensemble de l'enceinte, ce qui **nuît à la flexibilité** des applications.

Nous pensons que l'utilisation des tensioarrays et de la dispense robotisée sans contact est particulièrement **adaptée pour dépasser ces limitations** :

- les tensioarrays présentent l'avantage de pouvoir maintenir dans les plots un **large spectre de solutions** (tensioactifs, tampons aqueux, DMSO etc.). Les enzymes sont donc placées dans un milieu aqueux favorable à la biocatalyse, et adaptable à n'importe quel type d'enzyme, notamment en termes de pH, de présence de sels et de tensioactifs.
- Le **dépôt sans contact** de notre approche **permet des mélanges et des dilutions** avec une large gamme dynamique directement sur la puce.

- Le dépôt précisément dirigé dans les gouttes du microarray par le biais d'une tête d'éjection piézoélectrique réduit fortement les problèmes de sécurité et de contamination rencontrés avec un aérosol. On peut de plus **varier à volonté les concentrations** de substrat et d'enzyme en chaque position du microarray, ce qui permet par exemple de déterminer rapidement les paramètres cinétiques d'une réaction enzymatique.

2.4) Synthèse et criblage d'une banque chimique combinatoire

L'outil constitué du robot piézoélectrique et des tensioarrays que nous venons de décrire est théoriquement adapté à la chimie et à la biochimie dans les microgouttes. Une fois la validation expérimentale de cette technologie effectuée, nous avons mis en oeuvre une approche originale consistant à assembler une banque chimique combinatoire *in situ*, puis à réaliser, directement à la suite de la synthèse, le test enzymatique sur puce. Nous n'avons pas relevé dans la littérature d'articles faisant état de méthodes d'assemblage de banques chimiques sur puce, qui permettraient pourtant de réaliser des criblages avec des efforts de synthèse et de stockage réduits.

Le but de ce criblage sera la recherche de nouveaux inhibiteurs de la protéase NS3, son rôle essentiel dans la maturation de la polyprotéine du virus de l'hépatite C la désignant comme une cible thérapeutique de choix (application à la recherche d'antiviraux).

3) ETAPES CLES

Ainsi, la thèse se subdivise en quatre objectifs majeurs : la mise au point de la technologie, la mise en place d'un modèle chimique, la mise en place d'un modèle biologique, et la mise en place d'un criblage fondé sur les trois étapes précédentes. **La thèse comporte donc 4 étapes clés (Figure 15) :**

- adapter l'outil technologique développé au laboratoire à l'enzymologie et à la chimie sur microarray.
- concevoir des méthodes de synthèse en solution sur puce.
- développer des tests d'activité protéolytique sur puce.
- mettre en place un criblage, fondé sur un test d'activité protéolytique, mettant à profit le premier assemblage d'une banque chimique combinatoire sur puce pour la recherche d'inhibiteurs de la protéase NS3 du VHC.

L'**originalité** de cette thèse réside principalement dans la synthèse chimique en solution sur puce, ainsi que dans l'approche séquentielle de constitution d'une banque chimique *in situ*, immédiatement suivie d'un criblage enzymatique.

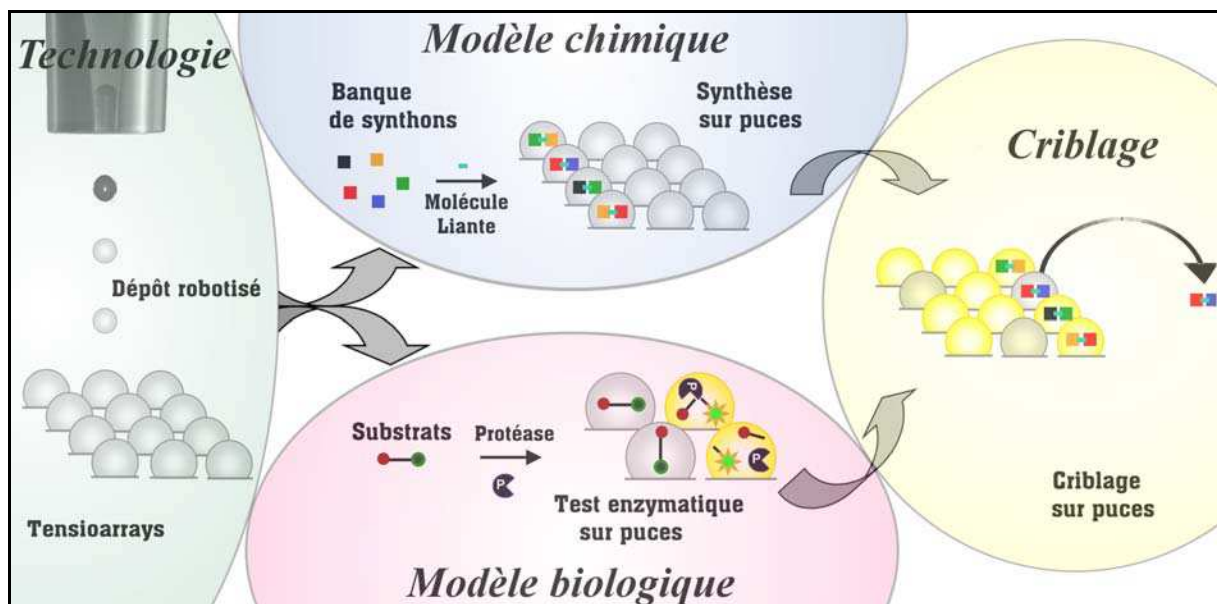


Figure 15 : Etapes clés de la thèse.

Avec notre outil constitué des tenseoarrays et de l'éjecteur piézoélectrique, des modèles chimiques et biologiques vont être développés. Certains développements seront appliqués à la synthèse et au criblage d'une banque chimique avec une enzyme (la protéase NS3 du VHC).

3.1) Mise au point de la technologie

3.1.1) Le monde de la microgoutte

Une goutte de liquide en apesanteur possède une forme sphérique. La forme d'une goutte soumise à un champ gravitationnel sur une surface est liée à trois facteurs principaux : l'énergie de surface (degré d'hydrophobicité), la taille (le volume, la masse) de la goutte, et la nature de la goutte (solvant hydrophile ou hydrophobe). Sous gravité terrestre, au-dessus d'une certaine taille, la goutte sur une surface ne peut maintenir sa forme sphérique ou hémisphérique et s'aplatit sous l'effet de la pesanteur. En revanche, en-dessous de cette limite, on peut obtenir des microgouttes d'eau hémisphériques voire quasi sphériques, selon la nature de la surface (**Fig16a & 16b**). Cela est dû au fait que, pour les petites gouttes, les forces engendrées par l'énergie de surface sont importantes devant celles liées à la gravité (**Figure 17**).

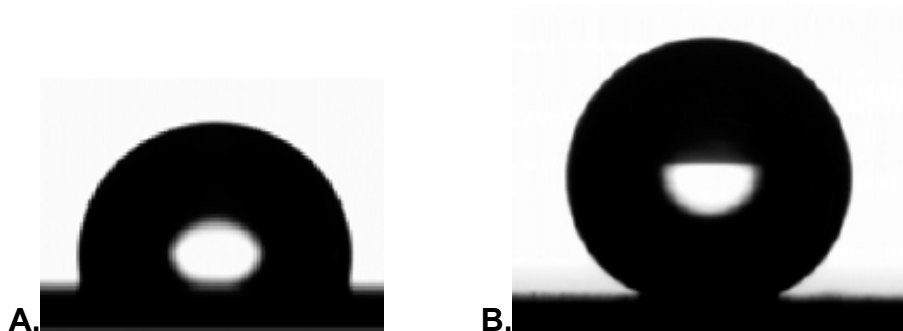


Figure 16 : La forme d'une goutte d'eau de 5 µL varie en fonction du type de surface.

Forme hémisphérique sur une surface hydrophobe de PDMS. (A). Forme quasi-sphérique sur une surface superhydrophobe de PDMS incorporant des particules de silice (B) ²⁰¹.



Figure 17 : Prépondérance des forces liées à la tension superficielle à petite échelle.

Image extraite du film *FourmiZ*.

3.1.2) Intérêts et limitations de la goutte comme microréacteur

Le principal avantage des réactions en gouttes est de permettre la réalisation d'un très grand nombre de réactions en parallèle, avec des quantités minimales de réactifs. Le format microgoutte présente des caractéristiques particulières, en particulier en ce qui concerne les rapports surface/volume (**Figure 18, Tableau 11**).

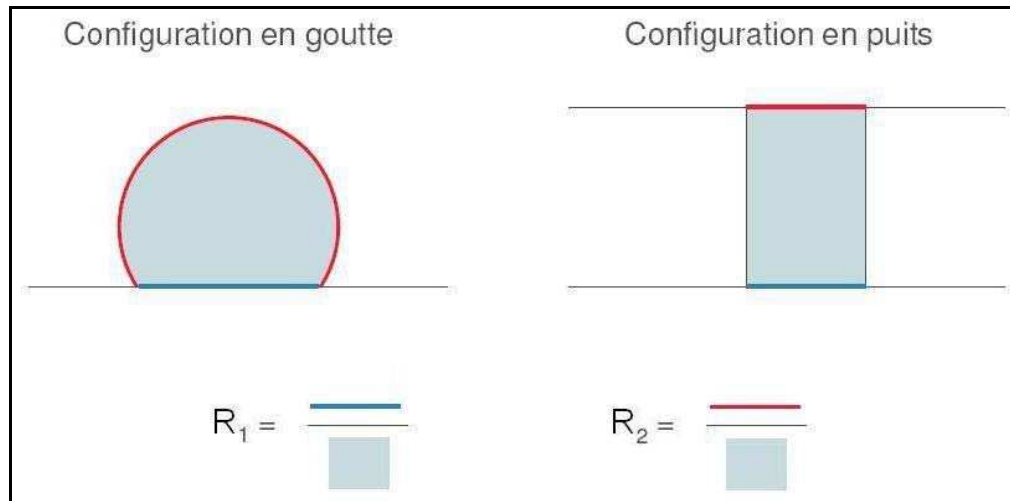


Figure 18 : Définition des rapports surface-volume en puits et en goutte.

Le rapport R_1 concerne la surface de contact entre le verre et la solution, le rapport R_2 concerne la surface de contact entre l'atmosphère extérieure et la solution. Image adaptée de la thèse de J. Reboud (CEA-Laboratoire Biopuces).

Dispositif	Diamètre du réservoir (mm)	Volume (μl)	R_1 ($\text{mm}^2/\mu\text{l}$)	R_2 ($\text{mm}^2/\mu\text{l}$)
Plaque 96 puits	6,4	100	0,32	0,32
Plaque 384 puits	3,2	50	0,16	0,16
Plaque 1536 puits	1,6	5	0,40	0,40
Tensioarray Prolabo	2	5	0,63	1,26
Tensioarray (Memscap)	0,5	0,51	10	38,36

Tableau 11 : Influence des méthodes de confinement sur les ratios surface/volume.

Le rapport R_1 concerne la surface de contact entre le verre et la solution, le rapport R_2 concerne la surface de contact entre l'atmosphère extérieure et la solution. Ces rapports sont calculés pour différentes méthodes de confinement de solution. Les tensioarrays haute densité voient une forte augmentation de ces ratios. Tableau adapté de la thèse de J. Reboud (CEA-Laboratoire Biopuces).

La forte augmentation des rapports surface sur volume a des conséquences non négligeables, qui peuvent être avantageuse ou problématique selon les applications envisagées. Le rapport R_1 élevé favorise le contact entre la solution et la surface, ce qui facilite l'adsorption non spécifique des composés présents. Le rapport R_2 élevé favorise les échanges à l'interface solution-atmosphère, ce qui amplifie les caractères volatils ou

hygroscopiques des solutions, mais aussi la dissolution d'un réactif présent dans l'atmosphère sous forme de vapeur.

Dans le cas particulier de la synthèse chimique, des avantages supplémentaires peuvent apparaître, dépendant du type de réaction chimique envisagé, comme par exemple la possibilité de concentrer les réactifs par évaporation ou la possibilité d'ajouter d'un réactif gazeux commun dans tous les microréacteurs en mettant à profit le rapport R_2 élevé d'une goutte. L'impossibilité de purifier les produits obtenus ne permet pas de réaliser des réactions complexes dans les gouttes, et génère des mélanges pour les réactions non quantitatives ou conduisant à plusieurs produits. Le chauffage et l'agitation ne sont pas aussi contrôlables qu'en chimie classique.

Dans le cas particulier de l'enzymologie, nos expériences (décrites dans la partie III), nous ont montré que recréer un environnement favorable pour les enzymes utilisées en adaptant le tampon qui compose les gouttes ne pose pas de problèmes majeurs, à condition de disposer de méthodes adaptées pour le dépôt et le maintien des gouttes. L'adsorption non spécifique, due au rapport R_1 élevé, peut cependant gêner l'activité des enzymes, tandis que la sensibilité des microgouttes aux conditions de température et d'humidité, due au rapport R_2 élevé, rend approximative l'évaluation des concentrations.

3.1.3) L'outil technologique développé au laboratoire

Tensioarrays

Une gouttelette d'eau maintient sa forme sur une surface hydrophobe (**Figure 16**), mais elle ne maintient pas sa position (ce qui pose un problème d'après la définition que nous avons donné d'un microarray). De plus, lorsque l'on passe de l'eau à d'autres liquides (*e.g.* des solvants ou des tampons), les propriétés physico-chimiques de la goutte (viscosité, tension de surface, tension de vapeur saturante) changent, ce qui affecte sa forme. Par exemple, l'ajout d'un tensioactif peut conduire à un fort aplatissement de la goutte. Afin de remédier à ce problème, nous utilisons des substrats de verre modifiés chimiquement pour contenir des zones hydrophiles (ou plots), entourées par une surface hydrophobe, qui constituent de **véritables pièges à gouttes ou tensioarray**. Ainsi, les gouttes sont positionnées de manière stable sur le microarray pendant toute la durée de l'expérience, et ce quelle que soit la composition du liquide. Même inversé (« la tête en bas ») ou lors de déplacements rapides, le microarray de gouttelettes ainsi formé est parfaitement conservé. L'utilisation d'eau, de

DMSO, de tampons contenant des pourcentages élevés de tensioactifs et même de milieu cellulaire contenant des protéines amphiphiles¹¹⁹ ne nuit pas non plus au maintien du microarray. C'est un avantage conséquent qui permet par exemple d'étudier une enzyme dans un tampon qui lui est parfaitement adapté (eau, tensioactif, pH, glycérol, DTT...), contrairement à certaines approches où les enzymes sont placées dans du glycérol^{22, 62, 63}, qui peut gêner le fonctionnement des enzymes à des concentrations trop élevées. Parmi les propriétés intéressantes des tensioarrays, il faut signaler la possibilité de créer un microarray de gouttelettes par simple mouillage de la surface, suivi du retrait de l'excès de solution, à la pipette ou par inclinaison du support. Le volume des gouttes est alors le même dans tous les plots, imposé par le différentiel d'énergie de surface et la nature du liquide. Cette méthode est élégante et illustre bien l'efficacité des tensioarrays. Cependant, ses applications sont limitées au remplissage de l'ensemble des plots par une même solution homogène. Si la solution est amphiphile, ce type de remplissage ne s'effectue plus aussi aisément. De plus, toute possibilité de mélange est exclue. Enfin, dans le cas de solutions non homogènes (billes ou cellules), le nombre d'objets par plot peut varier fortement¹⁷⁴. La seule méthode vraiment flexible pour déposer des réactifs dans des tensioarrays est l'utilisation de robots de dépôt sans contact (offrant en particulier la possibilité de faire des mélanges et des dilutions sur le microarray).

Ejecteur piézoélectrique

Parmi les méthodes précédemment évoquées (Partie I, §2.2.3), le choix de la dispense piézoélectrique a été guidé par le besoin de réaliser des mélanges de différents composés (chimiques et biologiques) sur le microarray (donc selon un mode sans contact), avec une forte gamme dynamique pour autoriser la dilution *in situ* (ce qui exclut les vannes solénoïdes). En outre, la réalisation de microarrays avec des composés biologiques fragiles était en défaveur d'un éjecteur thermique. En revanche, l'éjecteur piézoélectrique Sciflexarrayer (**Figure 19**) de la société allemande Scienion, basée à Berlin, semblait bien correspondre à ces attentes.



Figure 19 : Vue d'ensemble du Sciflexarrayer (éjecteur piézoélectrique).

Noter le boîtier électronique blanc sur l'enceinte, le compresseur du système de refroidissement bleu sous la paillasse et la partie fluïdique dans l'enceinte à gauche).

Le Sciflexarrayer est un robot de dispense piézoélectrique équipé d'une partie fluïdique (une pompe péristaltique pour le prélèvement de la solution à déposer (**Figure 20 A.**) et une autre pour gérer l'approvisionnement en liquide de la station de lavage), d'un boîtier électronique, d'un bras robotisé à trois axes de déplacement X, Y et Z, et de supports pour microplaques et lames de verre reliés à un système de refroidissement (**Figure 21 A.**). Il est en outre équipé d'une caméra vidéo et d'une diode électroluminescente (DEL) stroboscopique afin de contrôler la qualité de l'éjection (**Figure 21 B.**). Les pipettes de dispense sont en verre, une grande partie (dont la céramique piézoélectrique responsable de l'éjection) étant encapsulée par un matériau métallique (**Figure 20 B.**). Le robot et la dispense sont pilotés à l'aide d'un logiciel permettant de gérer la fluïdique, le positionnement du bras robotisé et le déclenchement des éjections.

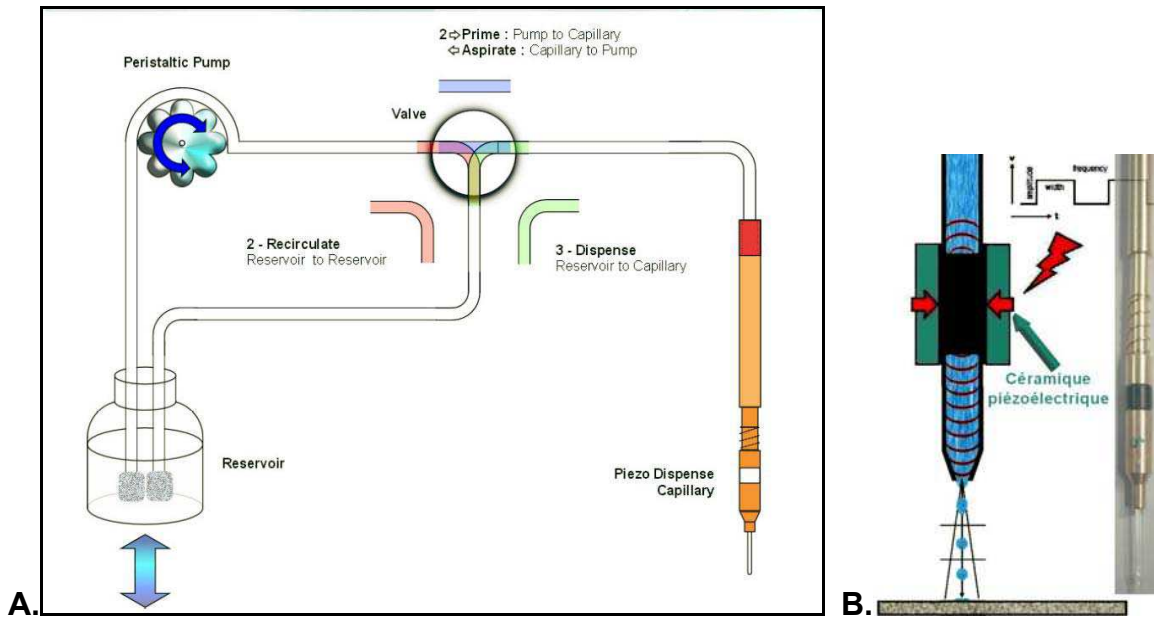


Figure 20 : A. Système fluide du Sciflexarrayer. B. Schéma & photo d'une pipette.

A. La pompe péristaltique permet d'aspirer ou de faire couler du liquide dans la pipette, lorsque la vanne en T est en « position bleue ». Lorsque la vanne en T est en position verte, le réservoir génère une légère surpression dans la pipette, indispensable à l'éjection. Enfin, la position rouge de la vanne est utilisée pour faire circuler le liquide en boucle du réservoir au réservoir, en passant par la pompe et par la vanne, ce qui s'avère très utile lors de la formation de bulles d'air indésirables quelque part dans cette boucle.

B. Schéma de fonctionnement d'une pipette (à gauche) : les alternances de tension découlant du signal crénelée compressent et relâchent alternativement la céramique piézoélectrique. La pression est transférée au liquide par l'intermédiaire de la pipette de verre, éjectant ainsi une succession de gouttelettes. Photo d'une pipette (à droite) : noter le fragile capillaire de verre émergeant de la partie métallique.

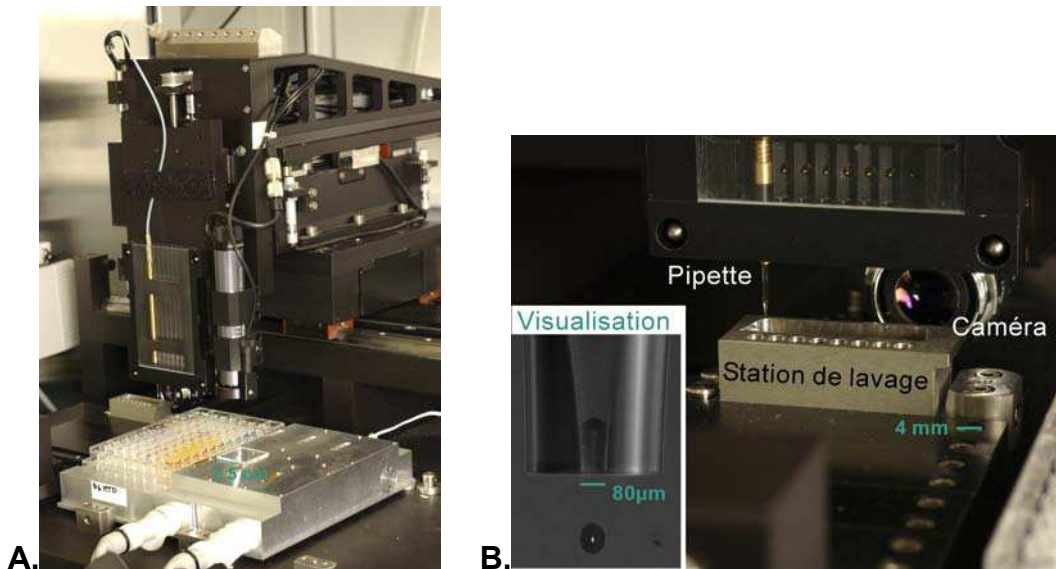


Figure 21 : A. Zone de travail pour la fabrication des microarrays. B. Visualisation de l'éjection.

A. Le bras XYZ du robot (partie massive noire) permet de déplacer la pipette (jaune dorée) entre la station de lavage (complètement à gauche, la plaque de prélèvement (quelques puits sont colorés en jaune) et la lame de verre posée sur le support en aluminium connecté au réfrigérant par les tuyaux en bas de la photo.

B. Lorsque la pipette est amenée devant la caméra, une diode stroboscopique permet de visualiser l'éjection des gouttelettes de liquide (encart en bas à gauche). La proximité de la station de lavage permet de minimiser la durée des cycles lavages/visualisation lors de la résolution de problèmes d'éjection.

Les étapes d'un protocole de dispense sont les suivantes :

- 1/ Lavage de la pipette (intérieur et extérieur) dans la station de lavage.
- 2/ Prélèvement de l'échantillon dans la microplaque à puits.
- 3/ Rinçage de l'extérieur de la pipette dans la station de lavage.
- 4/ Contrôle de l'éjection devant la caméra.
- 5/ Dépôt de l'échantillon sur le substrat.
- 6/ Retour à 1/.

Ejecteur piézoélectrique & tensioarray : un outil adapté

La combinaison d'un éjecteur piézoélectrique et des tensioarrays (**Figure 22**) nous procure un outil particulièrement versatile, permettant de générer plusieurs centaines de **réacteurs indépendants** dans lesquels il est possible d'ajouter **individuellement** tous les réactifs désirés (en respectant les contraintes d'aspiration et dispense), des concentrations différentes pouvant être obtenues en variant le nombre de gouttes déposées. Cette flexibilité rend cet équipement parfaitement adapté à la synthèse chimique combinatoire, aux mesures dose-effet avec dilution sur puce, au dépôt d'une ou de plusieurs enzymes sur une même puce, etc....Il est à noter que l'utilisation d'un tel outil n'a jamais été relaté pour des applications en synthèse chimique combinatoire ou en enzymologie sur puce.

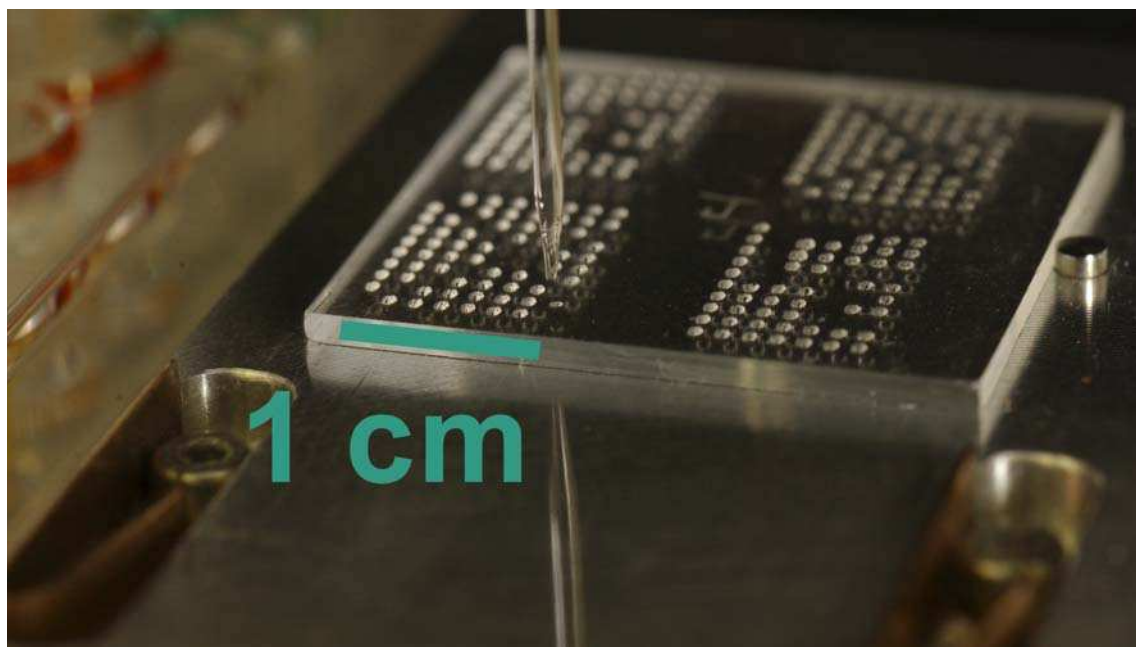


Figure 22 : Un outil versatile : robot de dispense piézoélectrique et tensioarrays.

Cette image a été prise lors du dépôt de gouttes d'eau d'environ 200 nL sur un tensioarray de quatre blocs de 10 x 10 plots. Chaque goutte est prisonnière d'un plot de 500 μm de diamètre et l'espacement entre chaque goutte est de 1 mm. La facilité à programmer le dépôt uniquement dans certains plots du tensioarrays est illustrée par l'écriture négative de deux croix « X » et de deux logos « CEA ».

3.2) Développement du modèle chimique

Pour valider la capacité de notre outil à réaliser des expériences de synthèse combinatoire sur puce, nous avons opté pour deux sortes de réactions chimiques, compatibles avec les contraintes du format microgouttes. Plus particulièrement, ce sont des réactions en solution (homogènes), qui ne sont pas perturbées par la présence d'oxygène ou d'eau, et dont les rendements sont bons. En effet, il est difficile d'éviter la présence d'eau ou d'oxygène à cause du caractère hygroscopique des microgouttes, et le rendement doit être élevé puisqu'il est impossible de purifier les produits obtenus. Ces deux types de réactions chimiques étudiées sont la formation de bases de Schiff à partir d'aldéhydes et d'hydrazides, et la formation de d'hétérocycles aromatiques substitués à partir d'aminopyridines, d'aldéhydes et d'isonitriles (condensation à trois composés de Ugi, catalysée par du triflate de scandium). La formation de base de Schiff est propre et conduit à des bons rendements, et les hydrazones, formées par réaction d'un hydrazide et d'un aldéhyde, résistent bien à l'hydrolyse. La condensation à trois composés se caractérise par des rendements plus variables, mais constitue un bon modèle de réactions complexes, permettant d'amener rapidement de la diversité à partir de réactifs simples.

3.2.1) Formation de bases de Schiff

Une base de Schiff est à l'origine le produit de la réaction entre un composé carbonylé et une amine primaire. Par extension, on appelle base de Schiff tout produit comportant une double liaison C=N issue de la réaction entre un azote nucléophile et un composé carbonylé. (**Figure 23**)

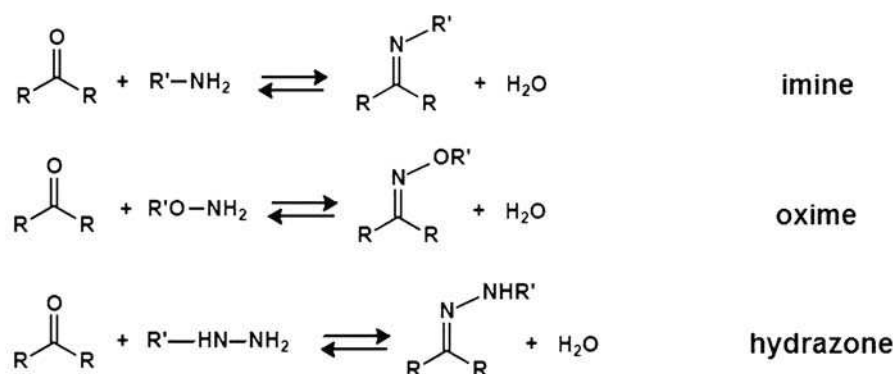


Figure 23 : Formation de bases de Schiff.

L'addition d'un azote nucléophile sur un carbonyle, suivie de l'élimination d'une molécule d'eau, conduit à des bases de Schiff (formation d'une double liaison C=N).

Les hydrazides sont plus réactifs que les amines, et les hydrazones sont plus stables que les imines vis-à-vis de l'hydrolyse ²⁰². Notre choix s'est donc porté sur la formation d'**hydrazones** par addition d'un hydrazide sur un aldéhyde, suivie d'élimination d'eau. Ce type de réaction, simple et efficace, conduisant à des rendements élevés, et ne générant pas de produits secondaires, est un bon moyen de valider la réaction chimique dans des microgouttes. Si cette réaction fonctionne sur puce, l'utilisation d'un dialdéhyde comme molécule liante, capable de créer des liaisons avec deux hydrazides différents, permettra de générer rapidement un grand nombre de molécules différentes. Le suivi analytique par HPLC de ces réactions permettra d'en suivre l'évolution.

3.1.2) Condensation à trois composés

Le deuxième type de réaction envisagé est plus complexe, il s'agit d'une réaction multicomposés (MCR). Classiquement, une synthèse se compose de plusieurs étapes impliquant deux réactifs (et éventuellement un catalyseur). Les MCR sont différentes des réactions séquentielles à plusieurs étapes : elles sont réalisées en mélangeant dans un même récipient plusieurs réactifs de départ (3 ou plus), qui réagissent en une séquence ordonnée de réactions ²⁰³. Parmi les MCR, on trouve les réactions de condensation multicomposés ²⁰⁴⁻²⁰⁶, particulièrement intéressantes pour la synthèse d'hétérocycles en parallèle, car elles permettent de générer des composés avec une grande diversité de substituants. Parmi ces réactions de condensations conduisant à des composés hétérocycliques, certaines sont relativement simples à mettre en œuvre car elles font appel à des conditions de réaction douces (*e.g.* pas de chauffage). C'est le cas des **condensations à trois composés** (3-Component condensation, ou 3CC) décrites par Blackburn *et al* ²⁰⁵. Ces conditions douces seront les plus faciles à adapter dans les microgouttes, c'est pourquoi nous nous proposons d'utiliser ces 3CC pour la synthèse sur puce, fondées sur la réaction entre une aminopyridine, un aldéhyde et un isonitrile, et catalysées par du triflate de scandium (**Figure 24**).

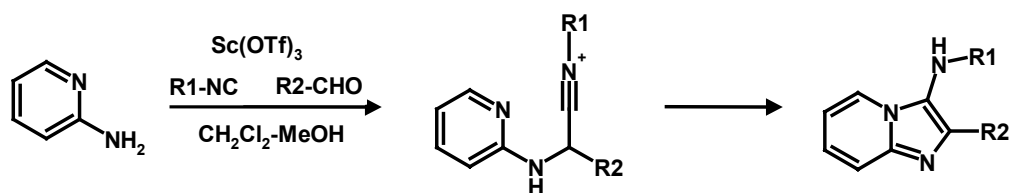


Figure 24 : Schéma réactionnel illustrant le principe des condensations à trois composés ²⁰⁵.

Blackwell *et al.* ont développé une méthode de synthèse adaptée de la réaction à 4 composés de Ugi, en fixant le réactif portant la fonction amine sur un macroarray²⁰⁰. Ils ont aussi utilisé la technique SPOT, pour la synthèse d'hétérocycles sur macroarray appliqués à la recherche de fluorophores¹⁹⁹.

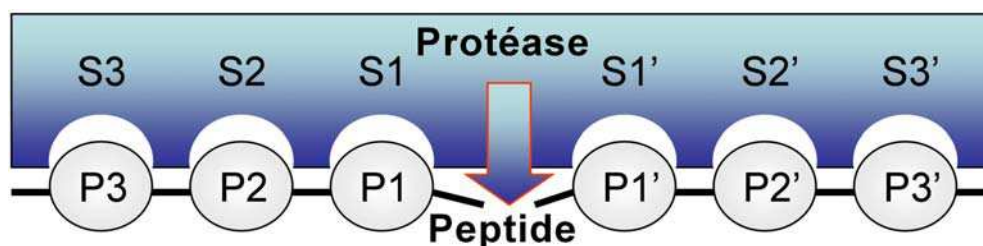
Nous envisageons de caractériser nos réactions 3CC en solution sur puce par HPLC, comme pour la formation d'hydrazones, mais aussi par fluorescence, espérant ainsi développer en même temps une nouvelle méthode de synthèse combinatoire de fluorophores. Le grand nombre de réactions réalisables en parallèle avec nos tensioarrays est très avantageux par comparaison avec les travaux fondés sur des macroarrays.

3.3) Développement du modèle biologique

Afin de vérifier si notre outil est permis de réaliser des expériences d'enzymologie sur puce, nous avons choisi d'observer l'action de trois enzymes, révélées par trois types de substrats fluorogènes différents. Ces enzymes sont toutes des protéases, une catégorie d'enzymes indispensables au fonctionnement des organismes vivants, et qui présente un potentiel thérapeutique élevé. La plus simple, la protéase à cystéine papaïne, présente une activité protéolytique efficace mais peu spécifique. La collagénase IV nous a servi de modèle pour les métalloprotéases. Enfin, plus complexe, mais aussi plus intéressante en terme d'applications médicales potentielles, la protéase virale NS3, du virus de l'hépatite C, dont l'activité protéolytique est essentielle à la maturation de la polyprotéine, qui est une étape indispensable à la réplication des virions.

3.3.1) Les protéases, des enzymes d'un intérêt biologique capital

Les protéases sont des enzymes de la famille des hydrolases qui catalysent le clivage de liaisons peptidiques. Les positions des acides aminés placés d'un côté de la liaison clivée sont nommées P1, P2, P3... et correspondent à des « poches » S1, S2, S3... de l'enzyme; la nomenclature pour l'autre côté de la liaison clivée est P' et S'²⁰⁷.



Enzymes ubiquitaires, on retrouve les protéases dans de nombreux organismes : des virus aux animaux, en passant par les plantes et les bactéries. Selon leur mécanisme catalytique, les protéases ont été divisées en 4 classes principales : les protéases à sérine, à cystéine, à aspartate et les métalloprotéases. Une liste détaillée des protéases est accessible sur la base de données Merops (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Initialement considérées comme des enzymes dégradant les protéines de façon non spécifique, les protéases ont ensuite révélé un monde extrêmement complexe et diversifié, allant des catalyseurs très simples comme les tripeptidyl peptidases à des machineries sophistiquées comme le protéasome²⁰⁸. Le clivage ultra-spécifique réalisé par la protéase NS3, qui la rend peu sensible aux inhibiteurs usuels des protéases à sérines, illustre la haute spécificité que certaines protéases peuvent présenter²⁰⁹. De plus, les protéases sont régulées, dans les organismes vivants, à la fois par des modifications post-traductionnelles et par des inhibiteurs spécifiques.

Cette diversité dans la complexité et la spécificité permet aux protéases de contrôler un grand nombre de processus biologiques essentiels comme la réplication de l'ADN, la division, la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire, la cicatrisation, l'angiogenèse et l'apoptose : le dysfonctionnement d'une protéase est par conséquent souvent synonyme de pathologie (cancer, arthrite, maladies cardiovasculaires et neurodégénératives)²¹⁰. Les protéases sont de plus indispensables à de nombreux agents pathogènes comme les virus²¹¹ et bactéries. Elles sont aussi des éléments actifs des venins animaux²¹⁰.

Tout ceci fait des protéases des cibles thérapeutiques et des marqueurs diagnostiques d'intérêt²¹². D'ailleurs de nombreux inhibiteurs de protéases sont déjà des médicaments, dirigés par exemple contre l'ACE (AngioConverting Enzyme), dans le traitement de l'hypertension artérielle, et contre la protéase du VIH, dans le cadre des trithérapies²¹³. La possibilité de prendre pour cibles les protéases virales ou bactériennes, ainsi qu'une analyse récente du génome humain révélant l'existence de plus de 500 enzymes de cette famille²⁰⁸, confèrent aux protéases **un énorme potentiel en recherche pharmaceutique** (<http://www.nibr.novartis.com>).

3.3.2) Les protéases choisies pour le modèle biologique

L'importance des protéases étant constatée, nous avons choisi trois protéases pour notre modèle biologique.

- Tout d'abord, **la papaine**, une protéase à cystéine avec une préférence pour les substrats présentant un acide aminé phénylalanine en position P2, et leucine en position P'1, constituera notre modèle protéolytique le plus simple ²⁰⁷.
- Ensuite, les métalloprotéases sont impliqués dans bon nombre de pathologies cancéreuses ²¹⁴⁻²¹⁶ et leur étude présente donc un intérêt particulier. La deuxième protéase à laquelle nous nous intéresserons est une métalloprotéase : il s'agit de la **collagénase type IV** provenant de *Clostridium histolyticum*.
- La dernière protéase, qui constitue un modèle très intéressant en terme de potentiel thérapeutique, est la **protéase NS3, du virus de l'hépatite C**. Nous allons entrer un peu plus dans les détails pour cette protéase, car c'est le modèle qui a été retenu pour la réalisation du criblage de notre banque de composés chimiques.

Le VHC, un des virus causant des hépatites, infecte plus de 170 millions de personnes, soit près de 3% de la population mondiale ²¹⁷. On rapporte 3 à 4 millions de personnes nouvellement infectées annuellement ²¹⁸. En France, on estime que plus de 600 000 personnes seraient contaminées. L'infection par le VHC est à l'origine du développement de maladies auto-immunes ainsi que de désordres du système immunitaire. Près de 80% des personnes infectées par le VHC développent des pathologies chroniques. De ce nombre, 10 à 20% vont développer une cirrhose et 1 à 5% un cancer du foie. L'hépatite C chronique est principalement responsable de cirrhoses du foie et d'hépatocarcinome ²¹⁹.

Le génome du virus est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive de 9600 nucléotides qui code pour une polyprotéine de 3010 acides aminés contenus dans un seul cadre de lecture ouvert. La traduction de cette polyprotéine est sous le contrôle d'un IRES (internal ribosome entry site) qui est indépendant de la coiffe 5' de 7-méthylguanosine retrouvée chez les organismes eucaryotes. Le clivage de la polyprotéine en dix protéines virales est ensuite effectué par des protéases virales et cellulaires. Les protéines structurales (C, E1 et E2) codent pour la protéine de la capsidie et les protéines de l'enveloppe du virion tandis que les protéines non-structurales (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A et NS5B) seront impliquées dans le clivage et la réplication. À l'intérieur de la cellule, l'ARN libéré

de la capside peut être immédiatement traduit en polyprotéine virale, qui est ensuite clivée en 10 protéines virales (**Figure 25**).

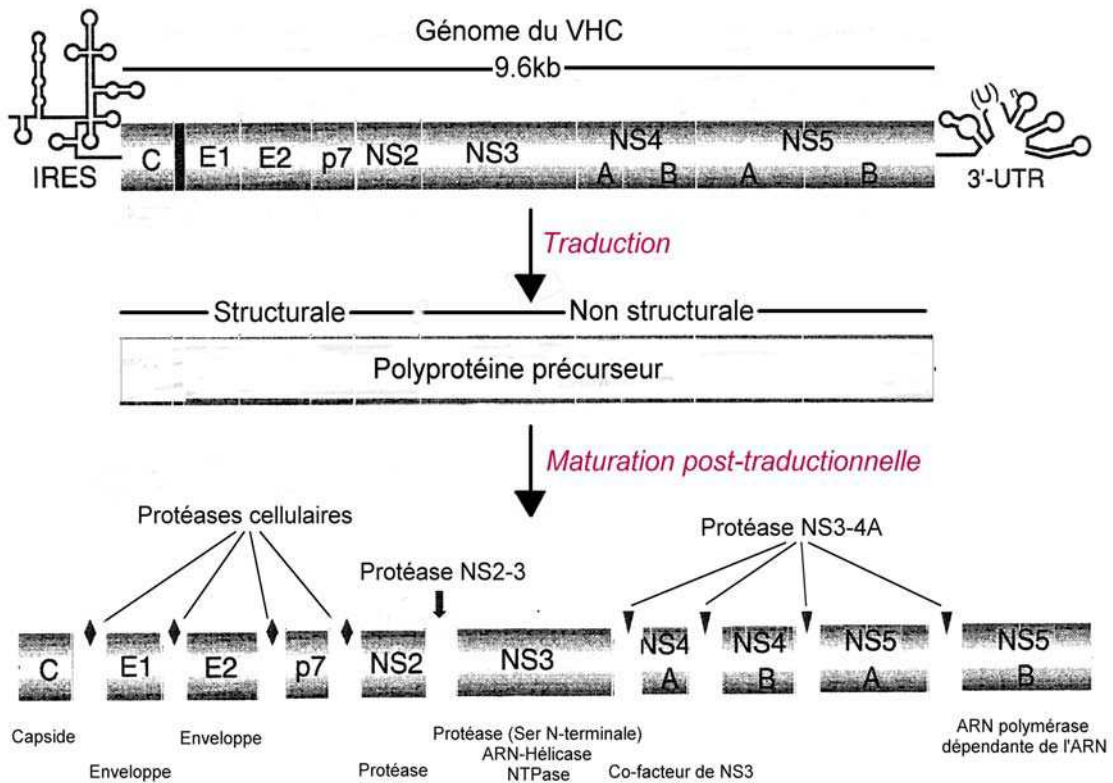


Figure 25 : Structure du génome du virus de l'Hépatite C.

Le génome du VHC code pour deux protéases différentes, incluant une protéase à cystéine dimérique (NS2 /3) ²²⁰ et une protéase à sérine (NS3). La famille des protéases à sérine est bien caractérisée et plusieurs inhibiteurs de ces enzymes ont été approuvés pour leurs propriétés antivirales sur le VIH. Sur la base de ces succès, la protéase NS3 du VHC représente une cible virale attrayante pour le développement de molécules antivirales. La structure et les propriétés biochimiques de cette enzyme ont été étudiées de façon intensive ces dernières années à la suite de son clonage et de son expression dans différents systèmes. NS3 est une protéine hydrophile de 67 kDa possédant trois activités enzymatiques : protéase, NTPase et hélicase. Le premier tiers N-terminal contient l'activité protéase et le reste de la protéine est responsable des activités NTPase et hélicase. L'action de la protéase à sérine NS3 sur les jonctions NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A et NS5A/NS5B n'est efficace que lorsqu'elle forme un hétérodimère avec la protéine co-facteur NS4A. La résolution de la structure 3D de NS3 et du complexe NS3-NS4A montre qu'elle est proche des chymotrypsines. Les activités hélicase et NTPase sont probablement impliquées dans la

réplication de l'ARN du VHC (par exemple pour la séparation des doubles brins d'ARN, pour rendre les structures repliés comme l'IRES ou la région X accessible à l'ARN polymérase ou bien encore pour séparer le génome des acides nucléiques des protéines).

De manière surprenante, la protéase NS3 du VHC présente des différences structurales et fonctionnelles en comparaison avec les autres protéases à sérine décrites jusqu'à présent. Cela inclut l'hétéro-dimérisation de NS3 avec un co-facteur (NS4A) qui accroît sa stabilité ainsi que son activité protéolytique, ainsi que la présence d'un site d'attachement au zinc qui stabilise le complexe. Une découverte importante en matière de développement d'antiviraux fut que le site catalytique de NS3, contrairement à d'autres protéases à sérine, est long, peu profond et de conformation plane, rendant difficile la conception d'inhibiteurs capables de s'y lier efficacement. Rétrospectivement, ceci explique pourquoi la protéine était particulièrement réfractaire à une inhibition par les inhibiteurs de protéase à sérine conventionnels. Des inhibiteurs, peptidiques ou non, de la NS3 ont été identifiés et sont en cours d'évaluation : l'un d'entre eux est entré en Phase I clinique, BILN-2061 (Boehringer Ingelheim, Germany)²²¹ mais les essais ont été suspendus suite à la détection sur l'animal d'une potentielle toxicité cardiaque, alors que VX-950 (Vertex Pharmaceuticals, PA, USA/Lilly, IN, USA) a récemment démontré une puissante activité antivirale au cours de la phase Ib de l'étude clinique²²².

3.4) Mise en place d'un criblage

La mise en place du criblage est une rencontre des modèles chimiques et biologiques, qui consistera à développer une méthode séquentielle en deux étapes. Seront effectués, dans un premier temps l'assemblage d'une banque de composés chimiques sur puce à partir d'une banque de synthons hydrazides, et, dans un deuxième temps, le test enzymatique de la protéase NS3 en présence de ces composés.

La banque de synthons hydrazides, intégralement synthétisée par Olga Burchak, chercheuse post-doctorante au laboratoire, contient 200 composés différents. L'utilisation de ces synthons pour l'assemblage d'une banque de pharmacophores *in situ* découlera des résultats obtenus pour la formation des hydrazones lors du développement du modèle chimique. La stratégie envisagée consiste à faire réagir dans chaque goutte un même dialdéhyde avec un couple d'hydrazides différent, pour générer un grand nombre de dihydrazones sur la puce.

Le suivi de l'activité protéolytique de NS3 avec un substrat fluorogènes, mis en place lors de la validation du modèle biologique, sera ensuite réalisé. La mesure quantitative de la fluorescence de chaque microgoutte sera mise à profit évaluer dans quelle mesure le déroulement de la protéolyse est affecté par la présence des composés chimiques issus de l'assemblage de la banque.

Le but recherché est de découvrir de nouvelles molécules qui soient des agents antiviraux potentiels.

PARTIE III : RESULTATS & DISCUSSIONS.

III-1 : TECHNOLOGIE

1) INTRODUCTION

Ce chapitre présente les développements technologiques effectués pour la mise au point du tensioarray et la caractérisation du robot de dispense. Plusieurs types de supports, d'origine commerciale ou préparés dans le laboratoire, ont été testés avant de choisir un tensioarray sur lequel l'ensemble des opérations de chimie et de biochimie peut être réalisé. La diffusion moléculaire dans l'éjecteur piézoélectrique a été mesurée afin d'estimer la dilution éventuelle des composés pendant l'étape de dépôt. De même, nous avons étudié la possibilité de réaliser des dilutions sur microarray par simple addition de gouttelettes dans des gouttes déjà existantes.

2) LES DIFFERENTS TYPES DE SUPPORTS TESTES

La technologie microarray développée au sein du laboratoire est fondée sur l'utilisation de tensioarrays pour former des matrices de gouttelettes isolées les unes des autres. Chaque gouttelette peut être considérée comme un **réacteur individuel**, les **parois** des réacteurs étant matérialisées par les **interfaces** liquide/atmosphère et liquide/surface. Le format tensioarray permet d'ajouter aisément des réactifs, dont le **mélange** est assuré par **la diffusion et la convection**.

2.1) Supports commerciaux

Différents supports commerciaux ont été utilisés : des lames de verre simples (fournies par les sociétés Menzel-Glaser ou Objektträger), des lames de verre recouvertes d'une matrice de 4x10 plots hydrophiles de 2 mm de diamètre séparés par une surface de Téflon de 30 μm d'épaisseur (fournies par Prolabo), et des lames de verre recouvertes d'une matrice de 4x10x10 ou 8x10x10 plots hydrophiles de 500 μm de diamètre et séparés par une surface de silanes perfluorés (fournies par la société Memscap).

2.2) Supports traités

Deux types de supports ont été fabriqués dans le laboratoire à partir des lames de verre simples : des lames de verre entièrement recouvertes d'une couche de silanes perfluorés, et des tensioarrays de densité élevée (100 plots/cm²) obtenus par une technique de masquage

chimique. Ces deux types de lames ont surtout été utilisés dans les étapes de mise au point de réactions chimiques et enzymatiques sur des puces.

Après nettoyage avec une solution 70% H_2SO_4 -30% H_2O_2 (« piranha »), les lames de verres sont immergées dans un bain contenant 0,5% de silane en solution dans du toluène, puis rincées à l'acétone et cuites à 120°C pendant une heure à l'étuve. Le substrat est rendu très hydrophobe par ce traitement. Néanmoins, des traces blanches sont observées à l'œil nu sur la surface des lames de verre, indiquant des polymérisations inhomogènes sur la surface. Le remplacement du dépôt en solution dans le toluène par un dépôt en phase gazeuse (silanes à 0,5% dans du pentane) a permis d'obtenir une surface entièrement dépourvue de traces blanches et donc un dépôt supposé plus homogène. Le degré d'hydrophobicité de ces surfaces a été caractérisé en mesurant les angles de contact de gouttes d'eau, pour dix gouttes différentes réparties sur la surface traitée. Pour cela, un objectif de caméra photographie la goutte tangentiellement à la surface, puis un logiciel (WinDrop) intégré dans l'appareil (Digidrop) permet de mesurer l'angle formé entre la surface et la goutte (**Figure 26**).

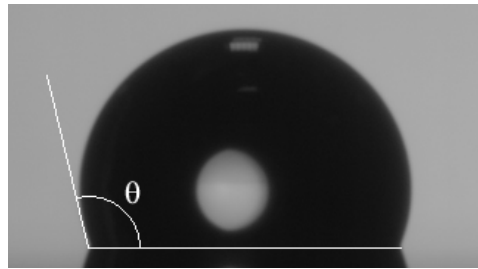


Figure 26 : Mesure d'angle de contact θ .

Les angles de contact obtenus pour cette méthode de dépôt sont de l'ordre de $99^\circ \pm 6^\circ$ pour des gouttes d'eau de 3 μL , valeur qui a pu être augmentée jusqu'à $106^\circ \pm 3^\circ$ en plaçant les lames dans une atmosphère d'argon avant le dépôt en phase gazeuse (**Figure 27**). Le coefficient de variation (rapport écart-type/moyenne) est de plus abaissé avec la méthode de silanisation dans une atmosphère d'argon : il passe de 6% à 3%, indiquant un dépôt plus homogène.

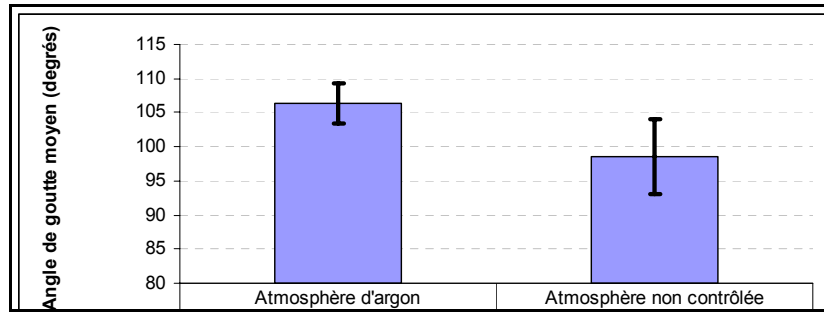


Figure 27 : Comparaison des angles de contact moyens pour deux méthodes de silanisation.

Des tensioarrays sont également produits dans le laboratoire en masquant certaines parties de la lame (*i.e.* les futurs plots du microarray) avant le dépôt de silanes perfluorés. Ce masquage est obtenu en déposant, avec un éjecteur piézoélectrique, un mélange de sucrose et de glycérol. Après silanisation, la couche de silane est stabilisée par chauffage (120°C pendant 1 h dans une étuve). Les gouttelettes de sucrose et de glycérol, qui protègent localement la surface pendant le greffage et le recuit des silanes, sont ensuite retirées avec un lavage à l'eau desionisée.

2.3) Optimisation des supports

Le verre est un matériau qui semble bien adapté pour la chimie, mais pourrait poser des problèmes en ce qui concerne les réactions enzymatiques, notamment en terme d'adsorption non spécifique. La possibilité d'optimiser une réaction enzymatique a donc été étudiée, en apportant des modifications chimiques aux surfaces, et en testant une méthode d'agitation. C'est le modèle d'une métalloprotéase (la collagénase de type IV) et d'un substrat protéique fluorogène « self-quenched » (gélatine fortement marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine), dont l'augmentation de fluorescence est liée à l'activité de l'enzyme, que nous avons choisi pour ces études (cf. Partie III-3).

2.3.1) Modification chimique des plots hydrophiles

L'étude a été réalisée avec des lames Prolabo, l'enzyme et le substrat étant déposés manuellement dans les plots de 2 mm de diamètre. Dans différents plots, plusieurs modifications de surface ont été testées pour évaluer leur influence sur la vitesse de réaction enzymatique :

- Greffage de silane-PEG (1% dans le DMSO) et silane anhydride succinique (1% dans le DMSO) par dépôt de 5 μ L de la solution de silane dans les plots, suivi de 2h de réaction à température ambiante, puis 2h de cuisson à 115°C à l'étuve.

- Greffage de chitosane dans certains plots par dépôt (5 μ L ; pendant 18h) d'un mélange chitosane (1%), EDC (5%).
- Dépôt de 2 μ L d'une solution aqueuse à 5% de polyvinyl pyrrolidone (PVP) et à 2% d'acide 4,4'-biazidostilbène-2,2'-disulfonique (DIAS), suivi d'un séchage à température ambiante et d'une irradiation UV de 5 min, conduisant à la formation d'un gel²²³.

Ensuite, 1 μ L de substrat fluorogène est déposé dans tous les plots sauf les plots témoins négatifs. Certains plots se voient alors ajouter 0,4 μ L d'un inhibiteur de la métalloprotéase, la 1,10-orthophénantroline (10 mM). Après séchage par évaporation, 2 μ L d'enzyme à 0,4 U/mL sont ajoutés en solution dans un tampon commercial contenant 10% de glycérol.

Le graphique de la figure 28 indique l'évolution de la fluorescence au cours du temps pour les diverses modifications de surface effectuées.

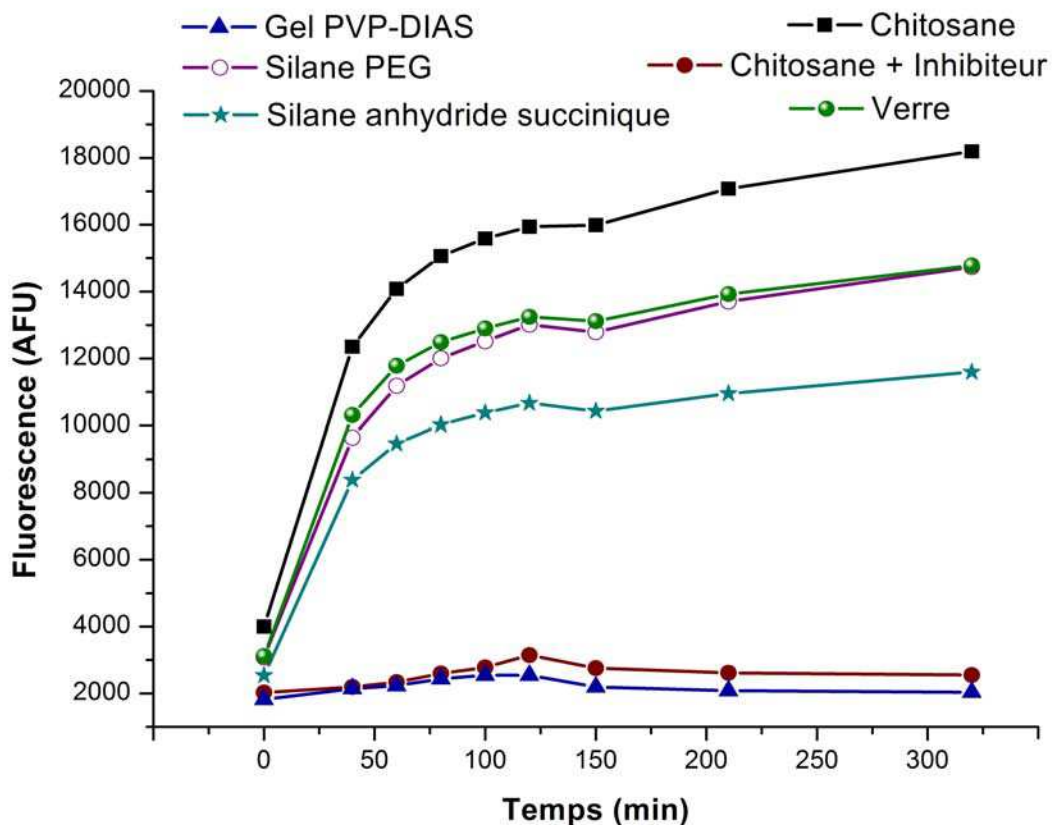


Figure 28 : Influence du support sur la réaction enzymatique.

L'augmentation de fluorescence mesurée au cours du temps est proportionnelle à la vitesse de réaction enzymatique. Parmi les différentes modifications de la surface dans les plots hydrophiles, le greffage de chitosane est la seule modification à induire une augmentation de la vitesse. Cette accélération est relativement faible.

Le verre ne semble pas gêner la réaction enzymatique. La réaction est un peu plus rapide sur le chitosane, tandis que la présence du gel PVP-DIAS ralentit énormément l'hydrolyse. Au vu de ces résultats, nous avons choisi de mettre en œuvre les réactions enzymatiques **sur la surface de verre**, car cette surface semble être le meilleur compromis en termes d'activité et de simplicité d'utilisation.

2.3.2) Agitation

Nous avons évalué la possibilité d'agiter les solutions présentes dans les microgouttes à l'aide de microbilles magnétiques.

Des billes magnétiques de 4 μm de diamètre ont été déposées sur une lame de verre dans des gouttelettes de liquide ionique (**Figure 29**). Ce type de liquide a été choisi afin d'éviter l'évaporation des gouttelettes placées dans le faisceau lumineux d'un microscope optique. Un petit moteur de modélisme équipé d'aimants ou un agitateur magnétique commercial (de marque IKA) ont été placés sous la lame de verre afin d'entraîner les billes.

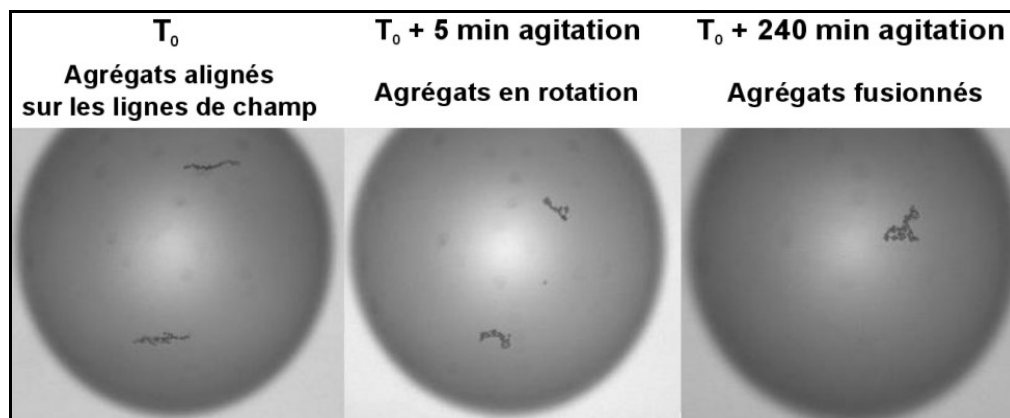


Figure 29 : Billes magnétiques dans des gouttes de liquide ionique.

Les agrégats, alignés sur les lignes de champ à T_0 , entrent en rotation dès la mise en rotation des aimants sous le microarray ($T_0 + 5 \text{ min}$). Après un temps assez long, les agrégats sont fusionnés ($T_0 + 240 \text{ min}$).

Lorsque les aimants sont au repos (pas de rotation), les billes tendent à se regrouper et à s'aligner le long du champ magnétique (**Figure 29**, T_0). A la mise en rotation de l'aimant, on peut observer des groupes de billes tourner lentement sur eux-mêmes dans les gouttes (**Figure 30**). Les agrégats de billes sont formés de 2 à quelques dizaines de billes (on observe aussi des billes seules isolées qui tournent sur elles-mêmes). Les assemblages peuvent être compacts ou à peu près linéaires. L'arrangement des billes dans l'agrégat est conservé lors de la rotation (pas de déplacement de billes à l'intérieur de l'agrégat). Les agrégats en suspension ne sont pas tous dans le même plan, il faut ajuster la focale du

microscope pour observer un agrégat de billes. Certains agrégats ne sont pas sensibles à la rotation des aimants. Il s'agit probablement des billes adsorbées sur la surface de la lame de verre, car elles sont presque toujours dans le plan focal de la lame. Les billes sont parfois entraînées par les mouvements de convection à l'intérieur des gouttes, mais ne sortent jamais des gouttes. Ainsi, la tension superficielle de la goutte est suffisante pour retenir les billes magnétiques.

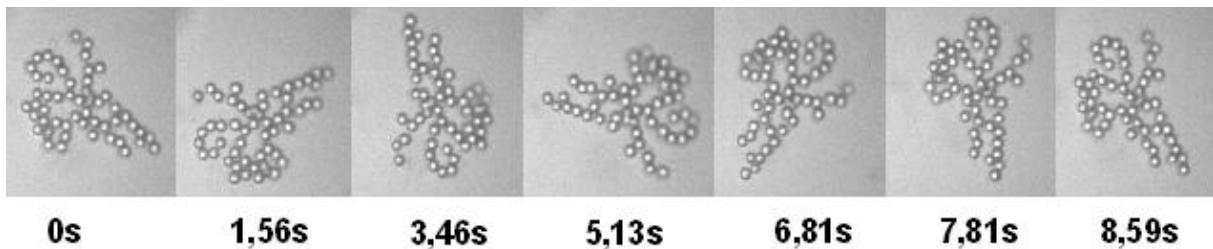


Figure 30 : Observation de la rotation d'un agrégat de microbilles magnétiques.

Certains agrégats en suspension tournent jusqu'à deux fois plus vite que d'autres. Cette différence ne semble pas être due au nombre de billes dans l'agrégat, mais plutôt à son étalement car les agrégats larges tournent plus lentement. La rotation des agrégats de billes, avec une vitesse d'environ un tour en 10 secondes, est beaucoup plus lente que la rotation du moteur ou de l'aimant de la plaque (plusieurs dizaines de tours par seconde). Les billes sont probablement ralenties par la viscosité du liquide. Nous supposons que les agrégats sont poussés par les aimants lorsque ceux-ci passent près de la goutte.

Le **sens de rotation** des agrégats en suspension est toujours **conforme avec celui des aimants**. Si on arrête la rotation de l'aimant, les agrégats s'arrêtent aussitôt. Lorsqu'on redémarre la rotation de l'aimant, les agrégats se remettent à tourner aussitôt. Si on inverse le sens de rotation de l'aimant, les agrégats changent aussitôt de sens de rotation.

Ayant démontré la rotation des agrégats de billes magnétiques sous l'effet d'un champ magnétique tournant, nous avons tenté d'appliquer cette agitation miniaturisée à l'accélération d'une réaction enzymatique. L'accélération éventuelle de la réaction enzymatique doit être mise en évidence par une augmentation de la fluorescence plus rapide en présence des microbilles. Des conditions identiques sont testées en présence et en absence de billes. Une augmentation de la fluorescence de 3% a été mise en évidence, en appliquant une démarche statistique utilisant l'analyse de la variance à deux facteurs (au seuil de 0,5%) (**Annexe 1**).

L'effet observé est cependant trop faible pour justifier l'utilisation de cette méthode d'agitation de manière systématique dans les réactions enzymatiques sur puce.

2.4) Description et caractérisation du support industriel choisi

Les différents supports décrits dans ce chapitre ont été utilisés au cours de la phase de mise au point et d'optimisation. La facilité à transférer les résultats des modèles chimiques et biochimiques au criblage de petites molécules, ainsi que la qualité des supports produits en salle blanche, nous ont conduit à choisir les tenseoarrays fabriqués industriellement par la société Memscap, sans modification ultérieure du support.

2.4.1) Description du tenseoarray

Les supports utilisés sont des plaquettes de verre présentant une matrice de plots hydrophiles de 500 μm de diamètre espacés de 1 mm (de centre à centre), et séparés par une surface hydrophobe. Ils sont fabriqués industriellement par photolithographie pour masquer les futures zones hydrophiles, greffage de 1H,1H,2H,2H-perfluorodécyltrichlorosilane (FDTS) en solution dans l'isooctane, puis dissolution de la photorésine (**Figure 31**). Le FDTS, qui a pour formule semi-développée $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7(\text{CH}_2)_2\text{SiCl}_3$, constitue la zone hydrophobe, formant une couche de silanes perfluorés sur la surface de verre qui n'est pas protégée par la résine, par réaction entre les atomes d'oxygène de la surface et les atomes de silicium des molécules FDTS, avec départ des atomes de chlore nucléofuges. Les zones circulaires protégées par la résine restent hydrophiles, et deviennent des plots de verre hydrophiles entourés d'une surface FDTS hydrophobe.

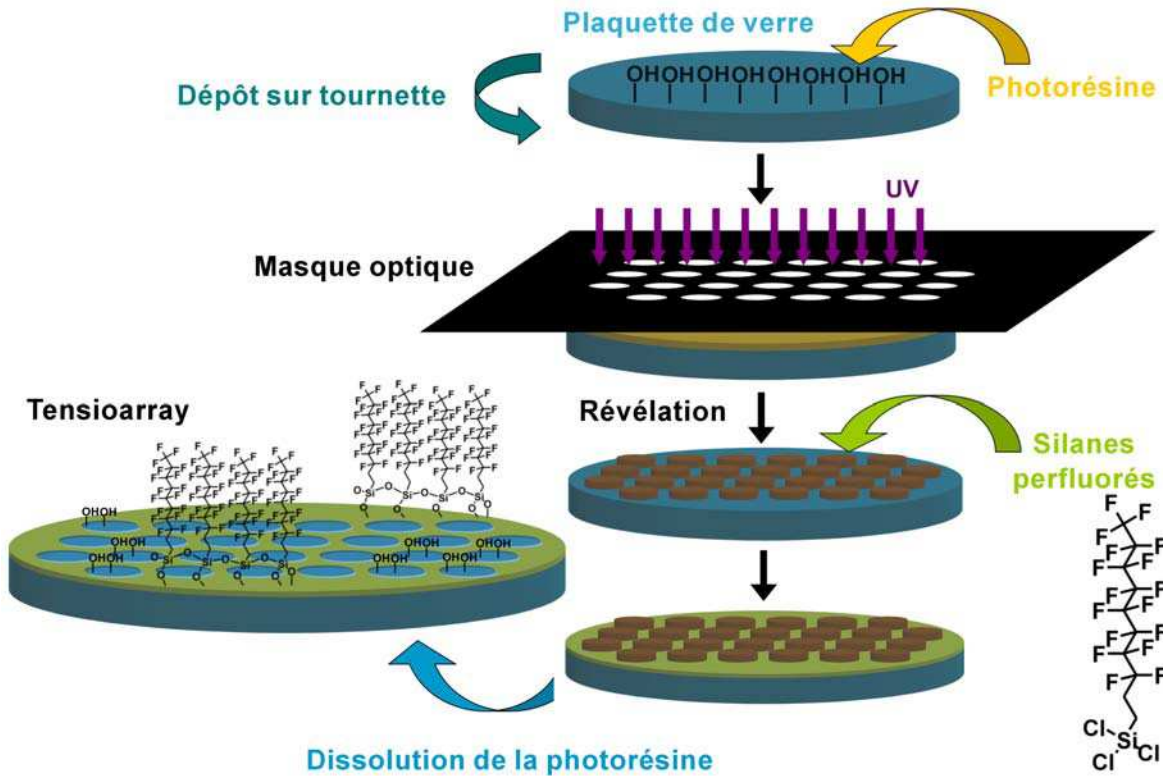


Figure 31 : Principe de fabrication des tensioarrays à partir d'une plaquette de verre.

La plaquette de verre est recouverte d'une couche homogène de phtorésine, déposée à la tournette. Après irradiation UV à travers un masque optique, la résine non durcie est éliminée (révélation). Le dépôt hydrophobe de 1H,1H,2H,2H-perfluorodécyltrichlorosilane (FDTs) n'a lieu que sur la surface de verre non protégée par la résine. La dissolution de cette dernière à l'aide d'un solvant approprié découvre les zones circulaires hydrophiles (surface de verre) de 500 µm de diamètre qui étaient protégées par des plots de phtorésine lors du greffage de la couche hydrophobe de silane perfluorés.

Les supports sont ensuite découpés sur la plaquette de verre sous la forme de 4 blocs de 10 x 10 plots (morceau de verre de 2,5 x 2,5 cm), soit 400 réacteurs indépendants (**Figure 32**), ou 8 blocs de 10 x 10 plots (morceau de verre de 2,5 x 7,5 cm), soit 800 réacteurs indépendants (**Figure 33**).

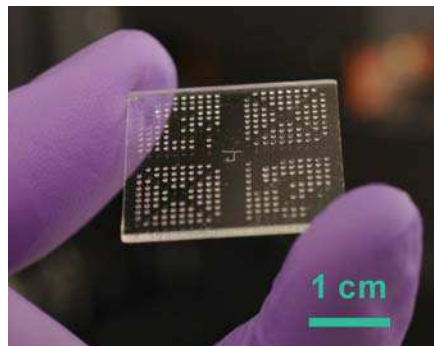


Figure 32 : Microgouttes emprisonnées sur un tensioarray de quatre blocs de 10 x 10 plots.

Chaque goutte est prisonnière d'un plot de 500 µm de diamètre et l'espacement entre chaque goutte est de 1 mm. La facilité à programmer le dépôt uniquement dans certains plots du tensioarrays est illustrée par l'écriture négative de deux croix « X » et de deux logos « CEA ».

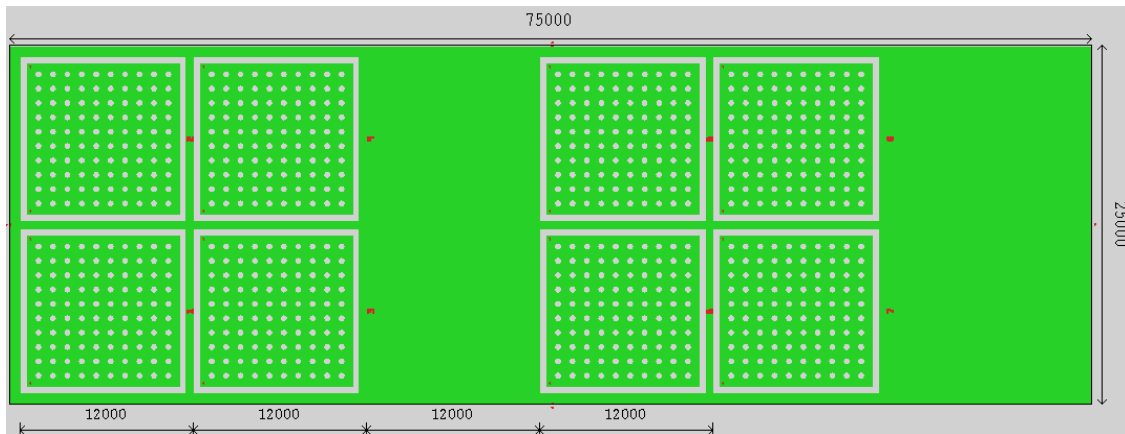


Figure 33 : Schéma d'un tensioarray de huit blocs (les côtes sont indiquées en microns).

2.4.2) Caractérisation du tensioarray

Ces tensioarrays de fabrication industrielle ont été initialement développés pour la préparation et le maintien d'une matrice de microgouttes de culture cellulaire (thèse de J. Reboud, CEA-Laboratoire Biopuces). Au cours de ces études, les tensioarrays ont démontré leur capacité à retenir les gouttes (angles de contact jusqu'à 90°) et une biocompatibilité vis-à-vis des cellules. En plus de ces données, nous avons entrepris de caractériser physiquement la couche de FDTS entre les plots, en microscopie optique à contraste de phase et en microscopie à champ proche.

Ayant noté que l'on peut deviner les tensioarrays à l'œil nu sous certaines conditions de luminosité ou d'humidité, une observation en microscopie à contraste de phase a été réalisée. Celle-ci a montré une coloration légèrement plus foncée sur la partie perfluorée autour de plots parfaitement réguliers, ce qui va dans le sens d'un dépôt homogène de FDTS (**Figure 34**). Le repérage des plots a été facilité en déposant une solution colorée dans certains d'entre eux.

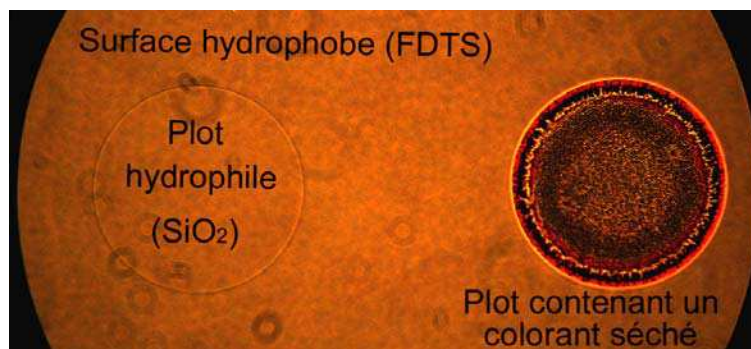


Figure 34 : Visualisation des plots hydrophiles en microscopie à contraste de phase.

Afin d'obtenir des informations plus précises, notamment en termes d'épaisseur et de rugosité du dépôt, les tensioarrays ont été caractérisés par microscopie à force atomique. L'AFM permet, grâce au repérage laser d'une pointe extrêmement fine mue par une céramique piézoélectrique, de déterminer la topographie d'un échantillon avec une précision sub-nanométrique. Plusieurs images AFM obtenues en balayant les bords d'un plot hydrophile à plusieurs endroits ont donné des résultats de topographie et de rugosité similaires. Ces images se placent quasi-parfaitement sur le périmètre d'un cercle de 500 μm de diamètre, ce qui correspond bien à la taille de nos plots (**Figure 35**).

Les mesures effectuées sur ces images AFM ont permis d'estimer que la hauteur de la couche de silanes est approximativement égale à 25 nm à tous les endroits mesurés (**Figure 36**). Un rapide calcul (extrêmement simplifié), en prenant pour longueurs 154 pm pour la liaison C-C, 185 pm pour la liaison C-Si, et 135 pm pour la liaison C-F, conduit à une valeur d'environ 1,7 nm pour la molécule de FDTS étirée. Contrairement à ce qui était supposé (thèse de J. Reboud, CEA-Laboratoire Biopuces), les supports industriels Memscap ne sont pas constitués d'une monocouche, mais d'un dépôt dont l'épaisseur correspond à plus d'une quinzaine de monocouches de molécules FDTS. L'épaisseur de ce dépôt est néanmoins très reproductible, ce qui explique sans doute les qualités excellentes de maintien des microgouttes exhibées par ces plots sur l'ensemble des tensioarrays. Lors de la transition verre-FDTS, la hauteur mesurée passe de 0 à 25 nm pour une avancée de la pointe de seulement 0,5 μm (**Figure 36**) : cela correspond à un angle d'environ 3° ($\tan^{-1}(25/500)$) seulement entre la pente de dépôt de silane et le support de verre. Il faut néanmoins noter que la forme exacte de la marche peut être modifiée par la courbure de la pointe AFM.

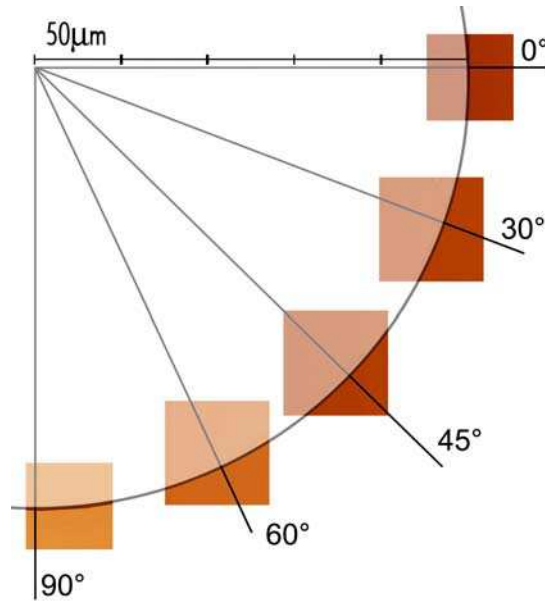


Figure 35 : Reconstitution partielle du périmètre d'un plot avec une série de balayages AFM.

Des images AFM ont été réalisées à différents endroits de l'interface entre plot hydrophile et surface hydrophobe. Ces endroits, répartis sur un quart de cercle, sont situés à des positions correspondant à des angles de 0°, 30°, 45°, 60° et 90°.

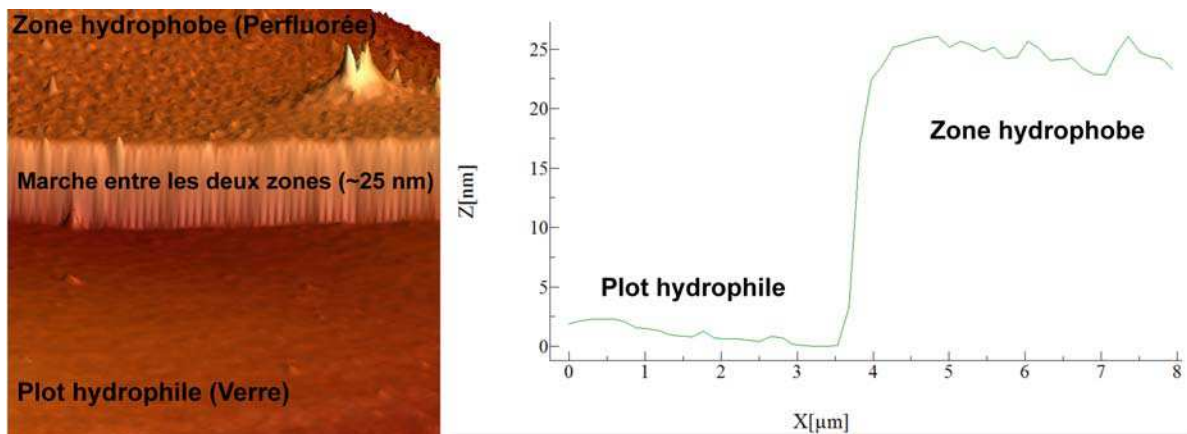


Figure 36 : Images obtenues par AFM à l'interface des zones hydrophile et hydrophobe.

Image (3D à gauche) illustrant la différence de hauteur et de rugosité entre les zones hydrophile et hydrophobe. La courbe de droite est une mesure de la topologie au niveau de la marche entre les deux zones.

Les balayages effectués pour reconstituer partiellement un plot ont été effectués sur des surfaces comprises entre 50 x 50 et 80 x 80 μm , ce qui contraignait le tube piézoélectrique à une déformation importante. Cela a entraîné une déformation de l'image, qui apparaissait bombée, et nécessitait une correction par traitement mathématique. Afin d'obtenir une estimation correcte de la rugosité, il était nécessaire de travailler sur des zones plus petites (typiquement 2 x 2 μm). Il ne s'agit que d'une estimation, car en toute rigueur il faut mesurer la rugosité sur un très grand nombre de zones, et avec plusieurs pointes différentes,

pour déterminer la rugosité avec précision. La partie silanisée est caractérisée par une rugosité RMS (Root Mean Square) d'approximativement 5 nm, soit 10 fois plus élevée que celle de 0,5 nm de la partie hydrophile (**Figure 37**).

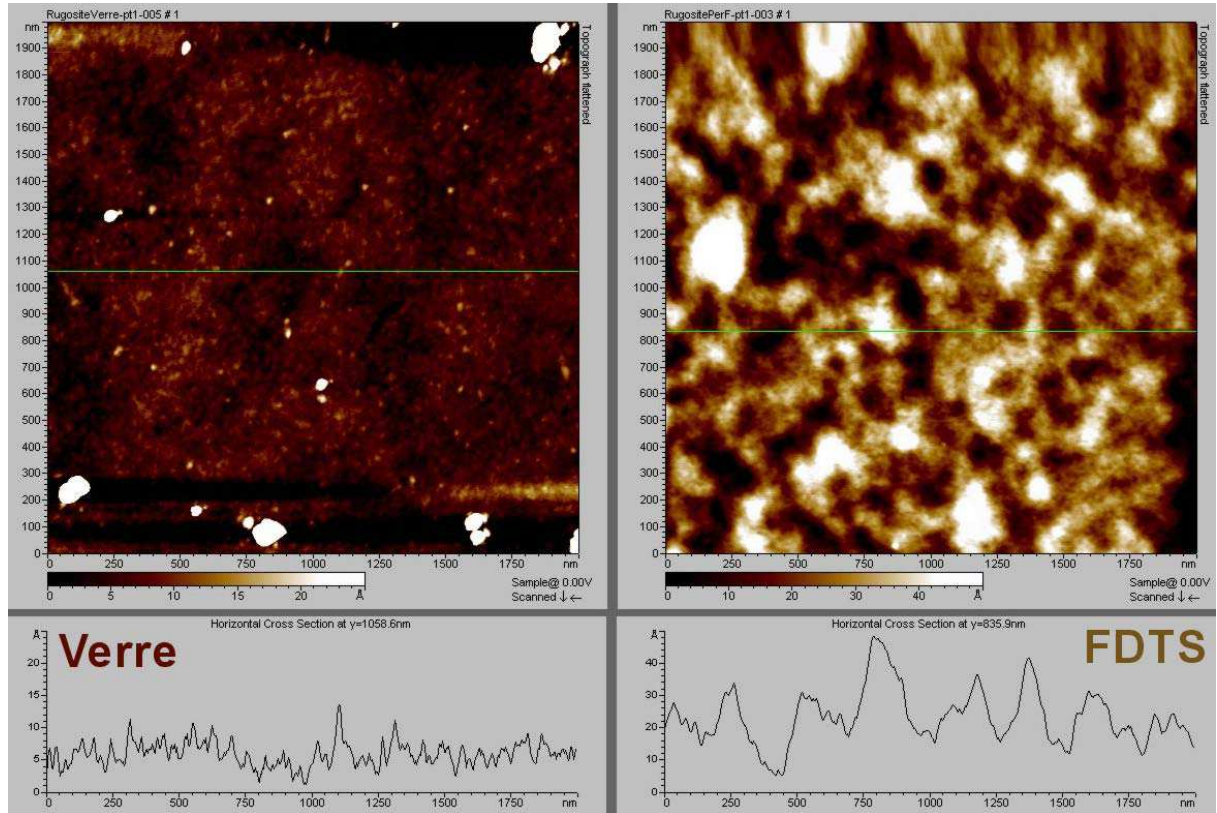


Figure 37 : Comparaison des rugosités du verre et du dépôt de silanes.

Les images sont des carrés de 2 μm x 2 μm , sous lesquels sont tracés les profils topologiques des surfaces (correspondant au trait vert sur l'image). L'image de gauche a été obtenue sur la zone en verre, celle de droite sur la zone silanisée (FDTS). La rugosité est beaucoup plus importante dans le cas des silanes. Noter l'échelle deux fois plus petite sur la figure de gauche.

3) TESTS PRELIMINAIRES DE L'ÉJECTEUR PIEZOELECTRIQUE

Le support ayant été caractérisé et testé, nous nous sommes intéressés à la seconde partie de l'outil, l'éjecteur piézoélectrique. En particulier, nous avons testé sa capacité à éjecter différentes solutions présentant un intérêt pour nos applications, quantifié le phénomène de diffusion qui prend place dans les pipettes, et vérifié la possibilité d'effectuer des dilutions sur puce en variant le nombre de gouttes éjectées.

3.1) Ejection de liquides d'intérêt

Les deux liquides principaux que nous aurons à dispenser sont l'eau et le DMSO, avec parfois la présence d'un pourcentage de glycérol compris entre 10 et 20% (**Figure 38**). La dispense de glycérol dans l'eau est réalisée sans problème jusqu'à 20 %, il suffit d'augmenter de 5 à 25 % la tension qui commande la force de la pression exercée sur la pipette. Le test de la dispense de quelques solutions amène à conclure que l'eau et le mélange eau-DMSO (1:1) ne posent aucun problème, mais qu'en revanche le DMSO (pur, ou avec glycérol) est problématique.

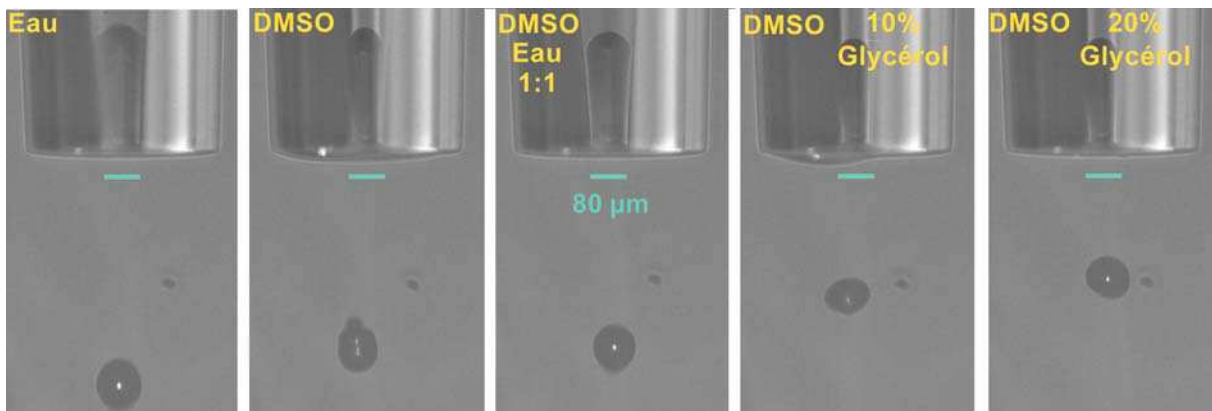


Figure 38 : Ejection de différents solvants.

L'éjection est considérée comme étant correcte lorsque l'on observe une goutte stable (point blanc au centre de la goutte net) et ronde ainsi que l'absence de ménisque au bout de la pipette. L'éjection avec l'eau est optimale. Avec le DMSO, l'éjection est très mauvaise : léger ménisque, instabilité (deux points blancs). L'éjection avec le mélange eau/DMSO (1:1) est optimale. Le glycérol (10%) dans le DMSO donne une mauvaise éjection : goutte déformée et ménisque important. Le glycérol (20%) dans le DMSO donne une éjection acceptable (goutte légèrement déformée) mais qui tend à se dégrader au cours de l'ajout dans de nombreux plots.

Cela va nous obliger à diluer nos composés chimiques dans l'eau, au risque de faire précipiter ceux qui y sont peu solubles. Il faudra donc être vigilant en ce qui concerne la formation de tels précipités. Diverses solutions ont été testées au cours de l'avancée du projet. Un résultat permet d'illustrer la **difficulté à prévoir la capacité ou l'incapacité à**

spotter un type donné de solution : un des tampons utilisés contenant 1% de CHAPS (tensioactif) était absolument impossible à dispenser, mais l'ajout de 20% de glycérol a donné une solution possible à dispenser avec un minimum de problèmes.

3.2) Etude expérimentale de la diffusion dans la pipette

Outre les problèmes d'éjection de certains solvants, la diffusion des composés à l'intérieur de la pipette pourrait aussi être problématique. En effet, entre le prélèvement et la dispense d'un produit, il se passe un certain temps, typiquement de quelques secondes à quelques minutes. Le faible diamètre interne (80 μm) par rapport à la longueur de la pipette contenant du liquide (plusieurs mm) permet de penser que le phénomène de diffusion est faible, voire négligeable, pendant l'intervalle de temps nécessaire à la dispense d'un produit. Une vérification expérimentale s'imposait cependant, car si un phénomène de diffusion important a lieu dans les pipettes, il pourrait conduire à une variation des concentrations déposées au cours de la dispense.

Pour vérifier si c'est le cas, nous allons prélever un oligonucléotide marqué dCTP-Cy5 et le déposer sur tous les plots d'un tensioarray, puis quantifier la fluorescence de chaque goutte. Si la fluorescence n'est pas la même dans tous les plots (plus exactement si elle **diminue progressivement** au cours du dépôt), cela montrera qu'il y a bien un phénomène de diffusion, et cela permettra de le quantifier. Dans une deuxième expérience, deux oligonucléotides marqués (dCTP-Cy5, puis dCTP-Cy3) seront prélevés l'un après l'autre, puis immédiatement déposés. S'il y a diffusion, un **mélange des deux oligonucléotides fluorescents** sera constaté dans certaines gouttes.

Les solutions aqueuses de fluorophore contenant 10% de glycérol sont aspirées dans la pipette pendant 4s. Puis, 200 gouttes de solution (soit un total d'environ 60 nL d'après les indications du constructeur) sont déposées dans chacun des 400 plots d'une lame Memscap. Sur une première lame, on dispense l'oligonucléotide marqué dCTP-Cy5. Sur la deuxième lame, on prélève d'abord dCTP-Cy3, puis immédiatement après dCTP-Cy5 (sans lavage entre les deux prélèvements), avant d'effectuer le dépôt des oligonucléotides fluorescents l'un après l'autre. Après séchage la fluorescence de chaque plot (acquisitions à 560 nm et 675 nm pour Cy3 et Cy5 respectivement) est quantifiée à l'aide d'un scanner de fluorescence (GenTac LSIV de Genomic solutions). Les intensités de fluorescence sont présentées sous forme d'histogrammes avec en ordonnée la fluorescence et en abscisse les plots dans l'ordre de dépôt (**Figure 39**, histogrammes formant des gaussiennes ou des

demi-gaussiennes). Chaque barre de l’histogramme correspond donc à 200 gouttes de solution déposée. De plus, le temps de dépôt et de déplacement de la pipette d’un plot jusqu’au suivant étant constant, la forme du graphique est exactement la même que celle du profil de concentration dans la pipette. Le temps de dépôt total est de trois minutes.

Pour le dépôt d’un seul fluorophore, le profil idéal (*i.e.* sans diffusion) serait un rectangle parfait, mais le profil réellement observé, en forme de demi-gaussienne, indique qu’un phénomène de diffusion a lieu dans la pipette (**Figure 39 A.**). Pour le dépôt de deux fluorophores le profil idéal (*i.e.* sans diffusion) serait composé de deux rectangles parfaits ne se chevauchant pas, mais ici aussi les profils réellement observés, une gaussienne et une demi-gaussienne qui se chevauchent, mettent en évidence la diffusion des deux produits fluorescents, qui conduit à leur mélange (**Figure 39 B.**).

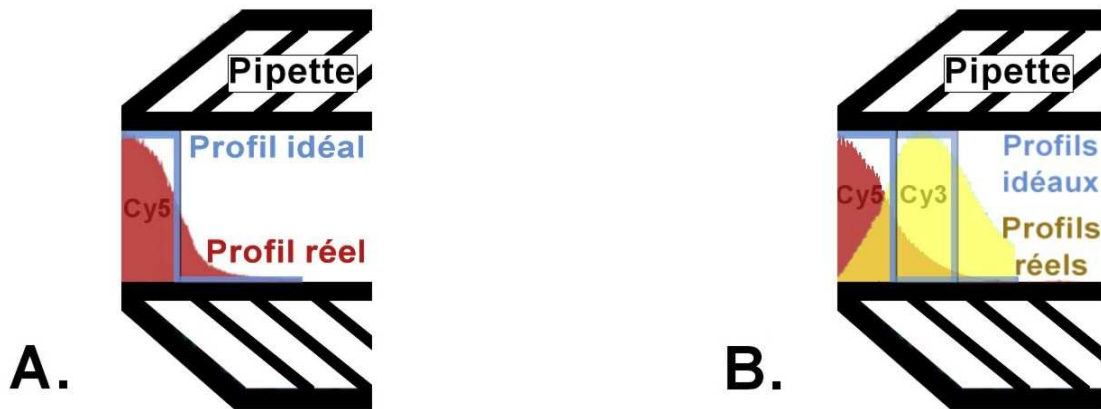


Figure 39 : Détermination expérimentale de la diffusion dans une pipette.

La diffusion expérimentale est représentée par les gaussiennes pleines (rouge et jaune), les profils théoriques sans diffusion sont en bleu clair. Dans le cas d’un fluorophore seul, la concentration varie au delà d’un certain volume ajouté (A). Dans le cas du prélèvement successif de deux fluorophores, on observe un mélange (orange) des deux oligonucléotides fluorescents (B).

Le volume de fluorophore éjecté permet d’évaluer le volume prélevé à environ 7,5 μL (le calcul s’effectue en utilisant un rectangle de même surface que la gaussienne, et en observant le nombre de plots fluorescents correspondants, soit environ 125, d’où $125 \times 60 \text{ nL} = 7500 \text{ nL}$). L’éjection d’un fluorophore conduit cependant à une variation de la concentration moyenne d’une ligne ($10 \times 60 \text{ nL}$) de moins de 10%, à condition de ne pas dépasser la cinquième ligne (50 plots), soit 3 μL de produit déposé. Ainsi, la diffusion peut-être considérée comme négligeable (*i.e.* égale au CV garanti par le constructeur), si l’on **dispense moins de 50 % du produit prélevé**. Dans les expériences réalisées par la suite, nous nous placerons donc toujours en dessous de ce seuil critique. Notons que pour le dépôt de grandes quantités de solutions, il est possible d’augmenter le temps d’aspiration, afin de permettre de dispenser plusieurs blocs avec une seule étape d’aspiration.

3.3) Mesure de la fluorescence et validation de la dilution sur puce

Enfin, nous avons tenu à caractériser la fluorescence observée sur le microarray avec le scanner, et à vérifier la capacité de l'éjecteur à effectuer des dilutions sur puces précises.

Dans un premier temps, pour quantifier le lien entre concentration de fluorophore et fluorescence mesurée au scanner, nous avons effectué une dilution manuelle dans les puits d'une microplaque. Des solutions aqueuses de fluorescéine de concentrations croissantes (1 à 3000 μM), contenant 10% de glycérol, ont été prélevées dans la microplaque et le même nombre de gouttes (100) a été déposé sur un tensioarray en six répliquats. Le tensioarray a alors été imagé avec un scanner de fluorescence, par excitation à 488 nm, et lecture à 512 nm (Figure 40).

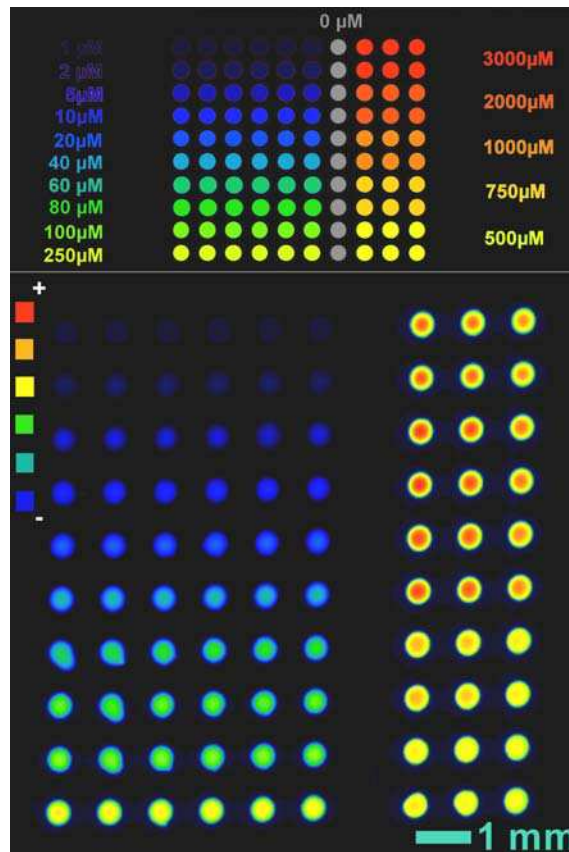


Figure 40 : Concentrations croissantes de fluorescéine.

Plan de dépôt de la fluorescéine à différentes concentrations, et image correspondante de la fluorescence mesurée au scanner.

Visuellement, on observe une bonne corrélation entre les concentrations déposées et la fluorescence observée. Un effet de saturation se devine pour les concentrations supérieures à 1 mM. C'est classique pour les fluorophores, qui ont tendance à absorber la fluorescence émise par les molécules voisines au delà d'une certaine concentration. On parle de filtrage

interne (*inner filter effect* en anglais). Les niveaux de fluorescence mesurés corroborent les observations visuelles et indiquent que l'augmentation de la fluorescence est linéaire entre 1 et 100 μM (pente de 174,2 AFU/ μM avec un coefficient de détermination R^2 de 0,9978), puis s'atténue aux plus fortes concentrations (**Figure 41**).

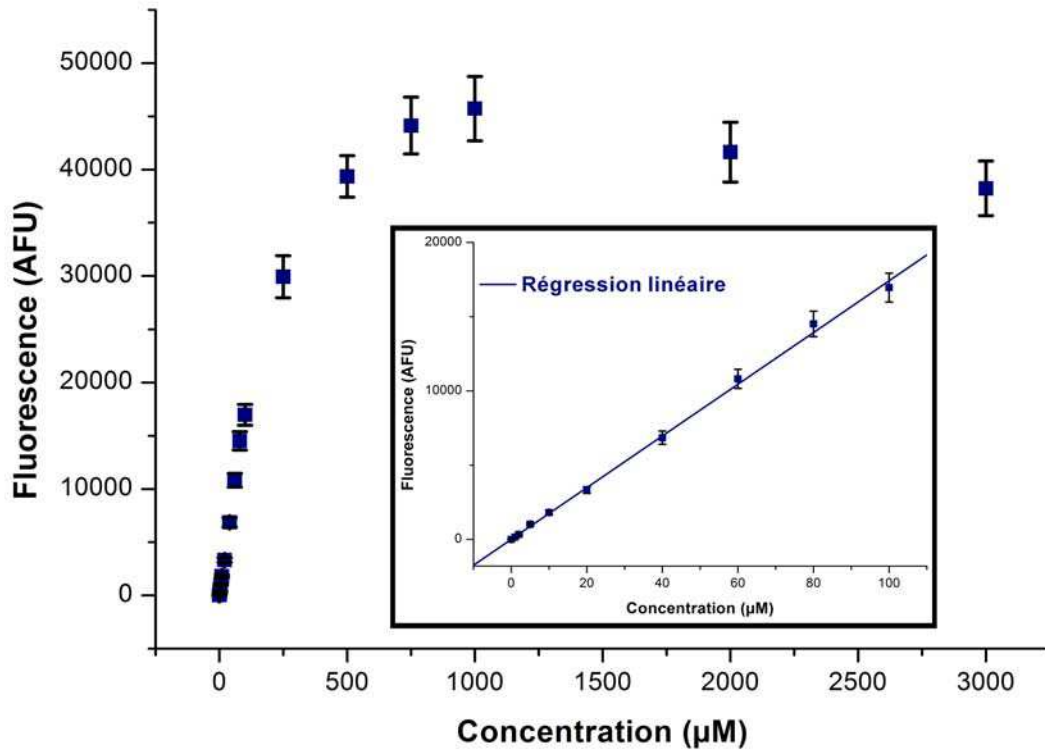


Figure 41 : Tracé de la fluorescence observée en fonction de la concentration en fluorophore.

Droite dans l'encart : relation linéaire entre la fluorescence et la concentration dans la gamme des faibles concentrations ($< 100\mu\text{M}$).

Connaissant les résultats de cette dilution manuelle, nous allons maintenant réaliser des dilutions, directement sur la puce et à de faibles concentrations, typiques de celles que nous rencontrerons dans nos expériences ultérieures. La dilution sur puce par éjection d'un nombre variable de gouttes sur différentes positions est un paramètre très important pour la suite. En effet, c'est cette méthode que nous avons utilisée pour réaliser les dilutions et les mélanges lors des réactions chimiques et biochimiques sur puce. Pour valider cette méthode de dilution, et vérifier la reproductibilité du nombre de gouttes ajoutées, nous déposons sur un tensioarray une solution aqueuse de fluorophore (5-carboxy-fluorescéine, 5-FAM) à 1 μM . Le nombre de gouttes, éjectées dans des microgouttes obtenues en déposant 100 gouttes d'un mélange eau-glycérol (20%) varie de 0 à 128 (0-2-4-8-16-32-64-128 gouttes), faisant varier la concentration de 0 à 1280 nM (0-20-40-80-160-320-640-1280). Ces valeurs

absolues de concentrations sont par essence approximatives, car on ne connaît pas avec exactitude le volume final des gouttes, mais les concentrations relatives sont néanmoins correctes. Les intensités de fluorescence mesurées montrent une parfaite linéarité entre la fluorescence et les concentrations obtenues par dilution sur puce : pente de 12,54 AFU/nM avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,9989$ (Figure 42).

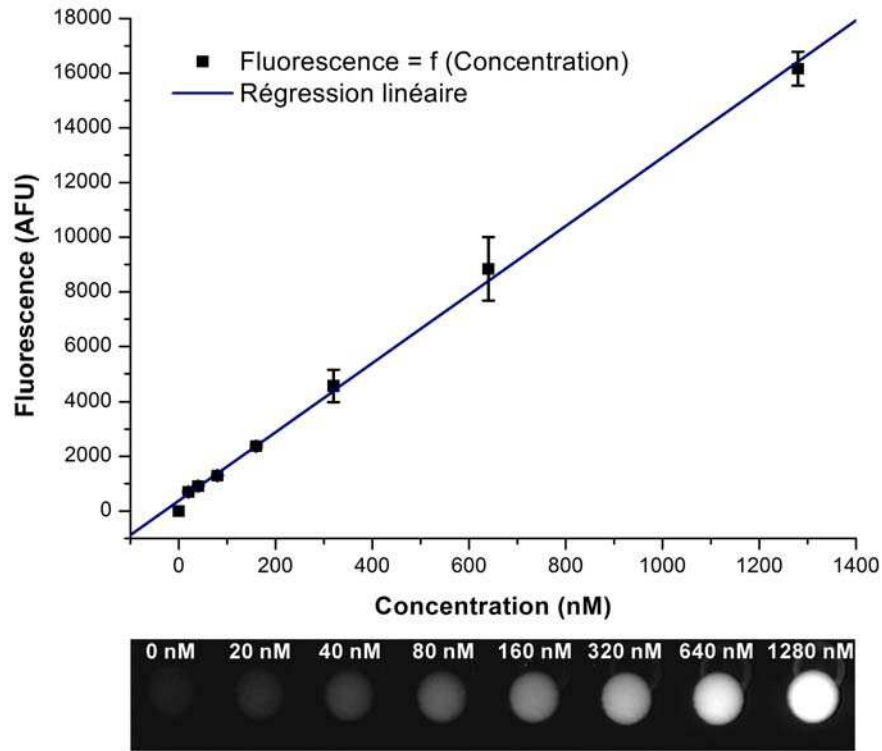


Figure 42 : Tracé de la fluorescence en fonction de la concentration.

La variation de la fluorescence avec la concentration est linéaire sur la gamme de concentrations utilisée (0 à 1280 nM). La dilution étant réalisée directement sur la puce, en ajoutant un nombre de gouttes différent (0 à 128 gouttes) d'une solution de fluorophore (1 μ M) dans chaque microgoutte. La photo au bas du graphique montre les plots correspondants aux points expérimentaux de la droite.

Ceci valide la méthode d'éjection piézo-électrique pour la dilution et nous permettra de relier la fluorescence et la concentration de nos substrats, en utilisant des courbes étalon comme celle-ci.

L'observation est souvent réalisée avec plusieurs réglages du gain du scanner, selon que l'on désire observer des signaux faibles ou au contraire éviter la saturation de certains plots du microarray. Le gain idéal est, lorsque c'est possible, celui qui permet d'observer tous les signaux répartis sur la totalité de la gamme dynamique d'observation (sans saturation). Afin de pouvoir comparer des observations faites à différents gains, nous avons cherché une relation mathématique permettant de les relier. Pour différentes concentrations de 5-FAM disposées sur un même tensioarray (0 à 1280 nM), les pentes (y) de la fluorescence mesurée

en fonction de la concentration, obtenues à différents gains de scanner, ont été tracées en fonction du gain de scanner (x), mettant en évidence une relation de type exponentielle :

$y = 0,00560.e^{(0,305.x)}$, avec un coefficient de détermination $R^2 = 0,995$ (Figure 43).

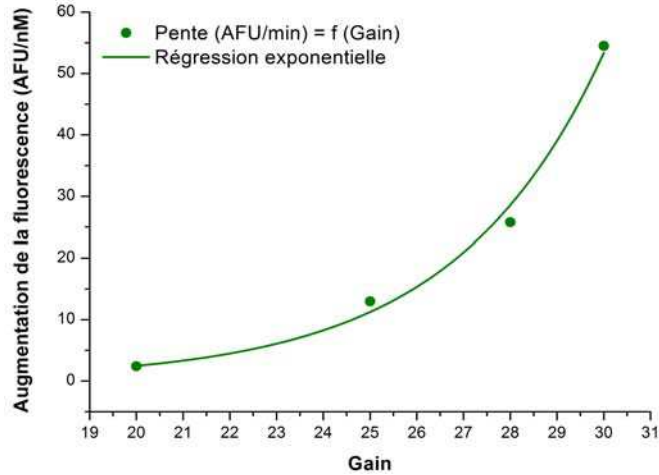


Figure 43 : Relation exponentielle entre la fluorescence et le gain du scanner.

4) CONCLUSION

Après plusieurs études réalisées sur plusieurs types de supports, d'origine commerciale ou préparés dans le laboratoire, notre choix s'est porté sur l'utilisation des tensioarrays fabriqués industriellement par la société Memscap. L'homogénéité du dépôt de silanes hydrophobes a été observée en microscopie à contraste de phase et par AFM. De plus, la compatibilité avec la réactivité enzymatique d'une métalloprotéase a été démontrée. La diffusion moléculaire dans l'éjecteur piézoélectrique a été quantifiée, mettant en évidence la nécessité de prélever un volume double de celui que l'on désire déposer. La possibilité de réaliser des dilutions sur puce par addition de gouttelettes dans des gouttes déjà existantes a été démontrée, ainsi que la capacité à générer de cette manière des courbes d'étalonnage reliant la fluorescence et la concentration en fluorophore. Fait notable, un lien de type exponentiel entre les pentes de droites d'étalonnage de la 5-carboxy-fluorescéine réalisées à différents gains a été observé. Cela pourra permettre de comparer des valeurs de fluorescence obtenues à différents gains.

III-2 : MODELE CHIMIQUE

1) INTRODUCTION

La goutte est un réacteur ouvert, qui ne permet pas la séparation des produits de réaction et qui requiert des solvants peu volatils. La chimie envisagée dans les gouttes doit tenir compte de ces contraintes. Le premier type de chimie abordé implique la réaction entre un hydrazide et un aldéhyde, c'est une réaction d'addition-élimination qui conduit à une hydrazone, nettement plus stable que les imines vis-à-vis de l'hydrolyse²⁰² : c'est une chimie relativement simple, qui convient bien pour démontrer la faisabilité de la synthèse chimique en microgoutte. Cette chimie est aussi adaptée à la création d'une banque chimique sur puce, en utilisant un dialdéhyde comme molécule liante, apte à réagir avec un couple d'hydrazides différent dans chaque microréacteur. Le second type de chimie est plus complexe, il s'agit d'une condensation à trois composés, qui produit, en présence d'un catalyseur de type acide de Lewis, des hétérocycles substitués à partir de trois réactifs : un aldéhyde, une aminopyridine et un isonitrile. Cette chimie permet de valider la possibilité d'effectuer des réactions chimiques complexes sur puce, et peut être utilisée pour obtenir des composés fluorescents.

2) FORMATION D'HYDRAZONES SUR PUCE : STRATEGIE D'ASSEMBLAGE

2.1) Principe de l'assemblage sur puce

La synthèse chimique que nous utilisons pour la construction des banques de molécules est du type « click chemistry »²²⁴ : nous utilisons un nombre limité de blocs chimiques, appelés des « synthons », pour assembler *in situ* une banque de molécules plus complexes. Deux types de synthons sont utilisés : la « base » qui est commune pour toutes les molécules de la banque, et les synthons (variables) qui s'attachent sur la « molécule-base » et déterminent les caractéristiques structurales uniques de chaque molécule. Pour associer les synthons, nous avons choisi une réaction, propre et de rendement élevé, d'hydrazides avec des aldéhydes, qui se déroule dans des conditions douces et conduit à la formation de bases de Schiff (hydrazones) relativement stables^{202, 225}. Par conséquent, les « variables » que nous utilisons portent des groupements hydrazide et les « bases » sont des aldéhydes (dialdéhydes de préférence). Nous disposons d'une collection de 200 synthons hydrazides qui peuvent être assemblés sur une « base » dialdéhyde symétrique, soit une banque de 20100 molécules différentes (40000 dans le cas de dialdéhydes dissymétriques) (**Figure 44 C**). Dans notre concept, pour focaliser la banque sur une cible thérapeutique donnée, le

choix de la « base » jouet un rôle primordial. Etant commune à toutes les molécules de la banque, c'est elle qui détermine l'affinité initiale des molécules pour la protéine cible.

Le cas de la protéase NS3 représente un défi, car trouver des petites molécules inhibitrices s'avère très difficile. En effet, la poche catalytique de NS3, de forme allongée, peu profonde et très exposée aux solvants ²²⁶, limite probablement les interactions d'une petite molécule avec le site actif. Les acides boroniques sont des composés présentant un intérêt pharmaceutique, en particulier pour le développement d'inhibiteurs d'enzymes efficaces ²²⁷ et dans le cas des protéases à sérine, les dérivés peptidiques d'acides boroniques interagissent avec la sérine du site catalytique par l'intermédiaire de l'atome de bore ²²⁸. En ce qui concerne NS3, son site actif à sérine présente une affinité vis-à-vis des acides boroniques ^{206, 229-231}, nous avons donc choisi l'acide 3,5-diformylphénylboronique comme molécule-base. L'acide 3,5-diformylphénylboronique, disponible dans le commerce, convient parfaitement à ce type d'approche, car il peut aisément être substitué par des synthons portant des fonctions hydrazides au niveau des sites réactifs aldéhydes tout en possédant l'atome de bore responsable d'une interaction faible avec la sérine du site catalytique de NS3 (**Figure 44 A**). D'autres dialdéhydes d'acides boroniques, présentant un plan de symétrie ou non, peuvent aussi être utilisés, comme par exemple l'acide 2-fluoro-3,5-diformylphénylboronique (**Figure 44 B**).

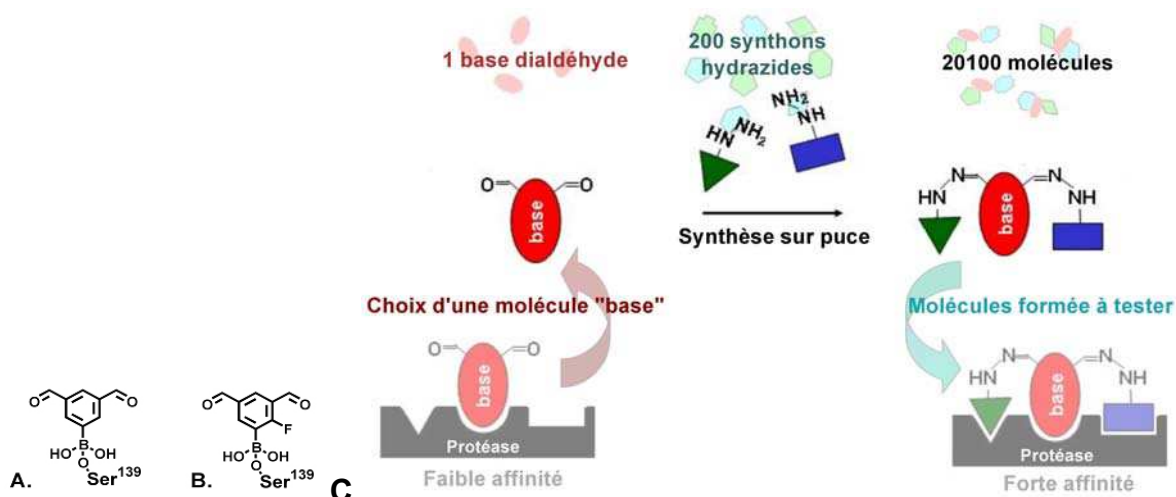


Figure 44 : Principe de l'assemblage de la banque sur puce.

La molécule base peut être symbolisée de différentes manières (A) (B). Le composé que nous avons utilisé est l'acide 3,5-diformylphénylboronique (C). Des molécules liantes non symétriques sont également possibles, et permettent de générer un nombre de composés plus élevé (D).

E. Principe général : 1. Choisir une molécule, base de l'inhibition, présentant une affinité faible pour la protéase cible. 2. générer un grand nombre de molécules dérivées de cette molécule base grâce à la synthèse sur puce. 3. tester ensuite les molécules formées pour leur affinité avec l'enzyme.

L'utilisation d'une telle molécule base, permet d'ajouter des substituants portant une fonction hydrazide, par formation d'hydrazones. L'acide boronique confèrera aux composés obtenus une interaction faible avec le site catalytique de NS3, qui sera modulée par les substituants. Si le nombre de composés générés par cette méthode est grand, la probabilité d'identifier des inhibiteurs présentant une activité bien supérieure à celle de la molécule liante seule est élevée.

Une banque d'hydrazides synthons (synthothèque d'hydrazides) comprenant seulement **200 éléments** permet, par mélanges séparés sur puce de l'ancre boronique et de deux hydrazides, la synthèse de **20 100 composés** différents, nombre qui peut être porté à 40 000 par l'utilisation d'une molécule liante dissymétrique.

Ce résultat, que l'on peut retrouver en observant **l'exemple d'un tableau du croisement de 20 hydrazides (Figure 45)**, peut être formalisé ainsi : soit n le nombre de mélanges de p hydrazides ($p=2$).

Dans le **cas d'une molécule liante dissymétrique**, le nombre total de mélanges possibles, N_1 , est égal à n^2 , $N_1 = n^2$. Cela correspond à $N_1 = 400$ pour $n = 20$ (**Figure 45**) et $N_1 = 40 000$ pour $n = 200$.

Dans le **cas d'une molécule liante symétrique**, le nombre de mélanges ne tenant pas compte de l'ordre, N_2 , est égal au nombre de combinaisons possibles (au sens mathématique probabiliste du terme, c'est à dire le nombre de tirages sans remise et sans tenir compte de l'ordre) augmenté de n (pour les mélanges du même hydrazide, positionnés sur la diagonale), soit $N_2 = [n! / (p!(n-p)!)] + n$. Comme $p = 2$, on a : $N_2 = [n! / (2!(n-2)!)] + n = (n(n-1))/2 + n$, donc $N_2 = (n^2 + n)/2$. Cela correspond à $N_2 = 210$ pour $n = 20$ (**Figure 45**) et $N_2 = 20 100$ pour $n = 200$.

j \ i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7	1:8	1:9	1:10	1:11	1:12	1:13	1:14	1:15	1:16	1:17	1:18	1:19	1:20
2	2:1	2:2	2:3	2:4	2:5	2:6	2:7	2:8	2:9	2:10	2:11	2:12	2:13	2:14	2:15	2:16	2:17	2:18	2:19	2:20
3	3:1	3:2	3:3	3:4	3:5	3:6	3:7	3:8	3:9	3:10	3:11	3:12	3:13	3:14	3:15	3:16	3:17	3:18	3:19	3:20
4	4:1	4:2	4:3	4:4	4:5	4:6	4:7	4:8	4:9	4:10	4:11	4:12	4:13	4:14	4:15	4:16	4:17	4:18	4:19	4:20
5	5:1	5:2	5:3	5:4	5:5	5:6	5:7	5:8	5:9	5:10	5:11	5:12	5:13	5:14	5:15	5:16	5:17	5:18	5:19	5:20
6	6:1	6:2	6:3	6:4	6:5	6:6	6:7	6:8	6:9	6:10	6:11	6:12	6:13	6:14	6:15	6:16	6:17	6:18	6:19	6:20
7	7:1	7:2	7:3	7:4	7:5	7:6	7:7	7:8	7:9	7:10	7:11	7:12	7:13	7:14	7:15	7:16	7:17	7:18	7:19	7:20
8	8:1	8:2	8:3	8:4	8:5	8:6	8:7	8:8	8:9	8:10	8:11	8:12	8:13	8:14	8:15	8:16	8:17	8:18	8:19	8:20
9	9:1	9:2	9:3	9:4	9:5	9:6	9:7	9:8	9:9	9:10	9:11	9:12	9:13	9:14	9:15	9:16	9:17	9:18	9:19	9:20
10	10:1	10:2	10:3	10:4	10:5	10:6	10:7	10:8	10:9	10:10	10:11	10:12	10:13	10:14	10:15	10:16	10:17	10:18	10:19	10:20
11	11:1	11:2	11:3	11:4	11:5	11:6	11:7	11:8	11:9	11:10	11:11	11:12	11:13	11:14	11:15	11:16	11:17	11:18	11:19	11:20
12	12:1	12:2	12:3	12:4	12:5	12:6	12:7	12:8	12:9	12:10	12:11	12:12	12:13	12:14	12:15	12:16	12:17	12:18	12:19	12:20
13	13:1	13:2	13:3	13:4	13:5	13:6	13:7	13:8	13:9	13:10	13:11	13:12	13:13	13:14	13:15	13:16	13:17	13:18	13:19	13:20
14	14:1	14:2	14:3	14:4	14:5	14:6	14:7	14:8	14:9	14:10	14:11	14:12	14:13	14:14	14:15	14:16	14:17	14:18	14:19	14:20
15	15:1	15:2	15:3	15:4	15:5	15:6	15:7	15:8	15:9	15:10	15:11	15:12	15:13	15:14	15:15	15:16	15:17	15:18	15:19	15:20
16	16:1	16:2	16:3	16:4	16:5	16:6	16:7	16:8	16:9	16:10	16:11	16:12	16:13	16:14	16:15	16:16	16:17	16:18	16:19	16:20
17	17:1	17:2	17:3	17:4	17:5	17:6	17:7	17:8	17:9	17:10	17:11	17:12	17:13	17:14	17:15	17:16	17:17	17:18	17:19	17:20
18	18:1	18:2	18:3	18:4	18:5	18:6	18:7	18:8	18:9	18:10	18:11	18:12	18:13	18:14	18:15	18:16	18:17	18:18	18:19	18:20
19	19:1	19:2	19:3	19:4	19:5	19:6	19:7	19:8	19:9	19:10	19:11	19:12	19:13	19:14	19:15	19:16	19:17	19:18	19:19	19:20
20	20:1	20:2	20:3	20:4	20:5	20:6	20:7	20:8	20:9	20:10	20:11	20:12	20:13	20:14	20:15	20:16	20:17	20:18	20:19	20:20

Cas d'une molécule liante non symétrique

$$N_1 = n^2$$

Cas d'une molécule liante symétrique

$$N_2 = \frac{n^2 + n}{2}$$

Figure 45 : Croisement de $n = i = j = 20$ hydrazides.

Les nombres de 1 à 20 du tableau correspondent à des numéros d'hydrazides. Le résultat de leur mélange est matérialisé en les plaçant bout à bout (e.g. les deux mélanges possibles de 17 et 20 sont 1720 et 2017). La diagonale grise correspond aux mélanges contenant un seul hydrazide ((e.g. 1717). Dans le cas d'une molécule liante non symétrique chaque case du tableau est différente (e.g. 1720 \neq 2017), et on a donc 400 possibilités de mélange. Dans le cas d'une molécule liante symétrique les cases des triangles blanc inférieur et supérieur sont les mêmes (e.g. 1720 = 2017), et on a donc 210 possibilités de mélange (un triangle blanc + la diagonale grise).

L'originalité de cette thèse repose en partie sur l'assemblage de la banque directement sur la puce. Cela consiste à faire réagir, dans chaque microgoutte, un couple d'hydrazides avec l'acide 3,5-diformylphénylboronique. A l'aide de l'éjecteur piézoélectrique, les différents réactifs (hydrazide i (H_i), hydrazide j (H_j) et acide 3,5-diformylphénylboronique (B); $1 \leq i \leq 200$ et $1 \leq j \leq 200$), dissous dans un mélange eau/DMSO/glycérol, sont prélevés individuellement dans une microplaque 96 puits, et ajoutés dans chaque microréacteur du tensioarray. Chaque goutte est alors le siège d'une réaction chimique conduisant à une dihydrazone dissymétrique. En réalité, dans chaque goutte, on obtient un mélange H_i - B - H_i / H_i - B - H_j / H_j - B - H_j dans des proportions proches de 1:2:1 (Figure 46).

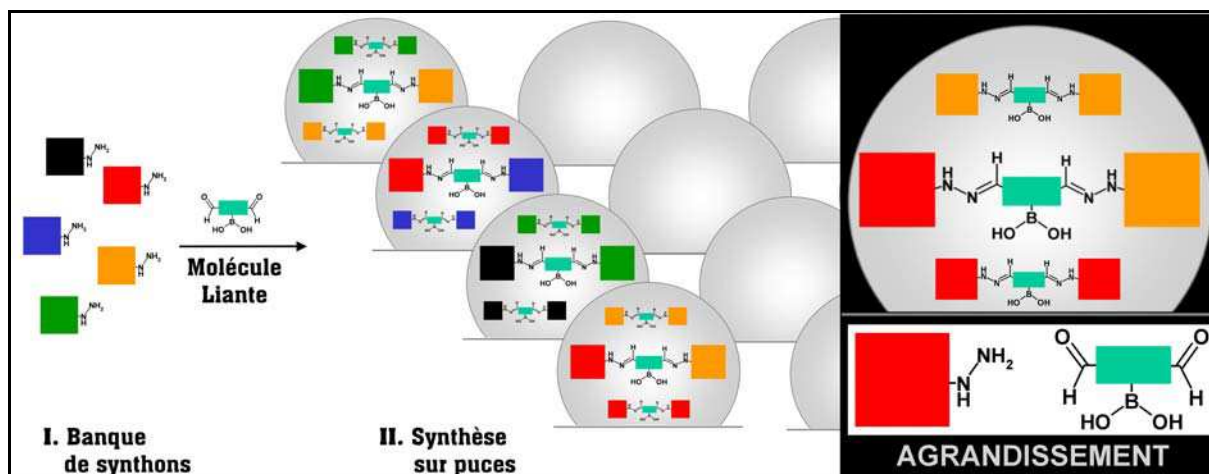


Figure 46 : Illustration de l'assemblage sur puce.

Les réactifs, synthons hydrazides (carrés de couleur) et molécule base (rectangle turquoise), sont ajoutés dans les gouttes, en vue d'obtenir une banque chimique de dihydrazones non symétriques. Les mélanges obtenus dans les gouttes contiennent en plus deux dihydrazones symétriques de concentration environ deux fois inférieure à leur homologue non symétrique. L'agrandissement montre un réactif hydrazide, le dialdéhyde, et les produits dans une des microgouttes.

2.2) Mise au point de l'assemblage sur puce

La réaction entre un aldéhyde et un hydrazide, qui conduit à la formation d'une hydrazone, peut être catalysée par un acide ou par une base²³², dans divers solvants. Par exemple, la préparation d'hydrazones peut se faire en quelques heures à reflux dans le méthanol, catalysée par l'acide acétique. La chimie en goutte nécessite de recourir à un solvant peu volatil, comme le DMSO, pour éviter l'évaporation des gouttes qui stopperaient la réaction. Dans le cas d'un chauffage, il faut en général ajouter du glycérol, car le DMSO peut aussi s'évaporer.

Pour mettre au point l'assemblage sur puce, la méthode analytique qui nous a paru la mieux adaptée est la chromatographie liquide haute performance. Le volume d'une goutte (environ 200 nL), ne fournit pas une quantité d'échantillon suffisante pour une caractérisation par HPLC. La même réaction est donc réalisée dans plusieurs gouttes, le mélange des produits de réaction étant ensuite prélevé manuellement à la pipette. Plusieurs conditions de réaction ont été étudiées, notamment l'influence du chauffage, de la taille des gouttes, et de la concentration.

Nous avons pensé que pour obtenir un chauffage rapide et homogène des microgouttes, le chauffage par micro-ondes serait bien adapté. La synthèse organique assistée par micro-ondes (MAOS) consiste à utiliser les micro-ondes pour élever la température du milieu réactionnel. Les réacteurs dédiés à la chimie, tout comme les fours domestiques, opèrent à

la fréquence de 2,45 GHz. A cette fréquence, les molécules présentes dans le milieu convertissent l'énergie reçue sous forme de micro-ondes en chaleur, et ce d'autant plus efficacement que leur facteur de perte ($\tan \delta$) est élevé²³³. Par exemple, à 20°C et 2,45 GHz, le DMSO ($\tan \delta = 0,825$) restitue bien plus de chaleur que l'eau ($\tan \delta = 0,123$), ce qui en fait un solvant plus efficace pour le chauffage par micro-ondes. La principale différence entre chauffage classique (type bain d'huile) et chauffage par micro-ondes réside dans la vitesse d'élévation de température. L'irradiation micro-onde chauffe l'ensemble du volume de réaction simultanément, tandis que seul le milieu réactionnel au contact des parois d'un bain d'huile est chauffé dans un premier temps (**Figure 47**).

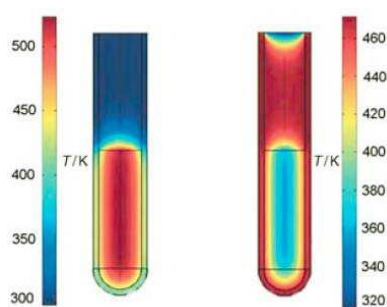


Figure 47 : Modélisation des gradients de température.

Après 1 min de chauffage au micro-onde (à gauche) ou avec un bain d'huile²³⁴.

Si la tendance actuelle est à l'usage de réacteurs scellés avec contrôle de température, il existe aussi des exemples de réaction avec des réacteurs ouverts à pression atmosphérique, utilisant des solvants à point d'ébullition élevé. Dans le cas de la synthèse sur microarray, une telle approche nous a permis d'activer certaines réactions chimiques, en chauffant les microgouttes de manière uniforme. La réaction en goutte à température ambiante est lente et conduit à la formation quantitative d'hydrazones après environ 12 heures, grâce à l'évaporation complète de l'eau et du DMSO dans les gouttes. Nous avons trouvé que le chauffage par micro-onde du microarray permet de réduire très fortement ce temps (jusqu'à deux minutes à 650 W). Parmi les différentes conditions de puissance et de temps testées, le meilleur compromis s'est avéré être la puissance minimale dont nous disposions (80 W) pendant une durée de 15 minutes. En réalité, l'important est d'obtenir une **évaporation complète** de l'eau et du DMSO contenus dans les gouttes, ne laissant que du glycérol. Cette évaporation favorise la formation des hydrazones en éliminant l'eau, et en augmentant en même temps la concentration des réactifs. Nous avons d'ailleurs pu nous affranchir du catalyseur (acide acétique) utilisé pour ces réactions dans des récipients classiques.

L'augmentation de la puissance diminue le temps nécessaire à l'évaporation totale, mais pourrait conduire à l'apparition de produits secondaires.

Pour une méthode de chauffage donnée, l'avancement de la réaction chimique dépend de la taille des gouttes. Des gouttes d'une centaine de nanolitres permettent une réaction totale, tandis que les volumes supérieurs au microlitre conduisent seulement à une conversion partielle des réactifs de départ (**Figure 48**).

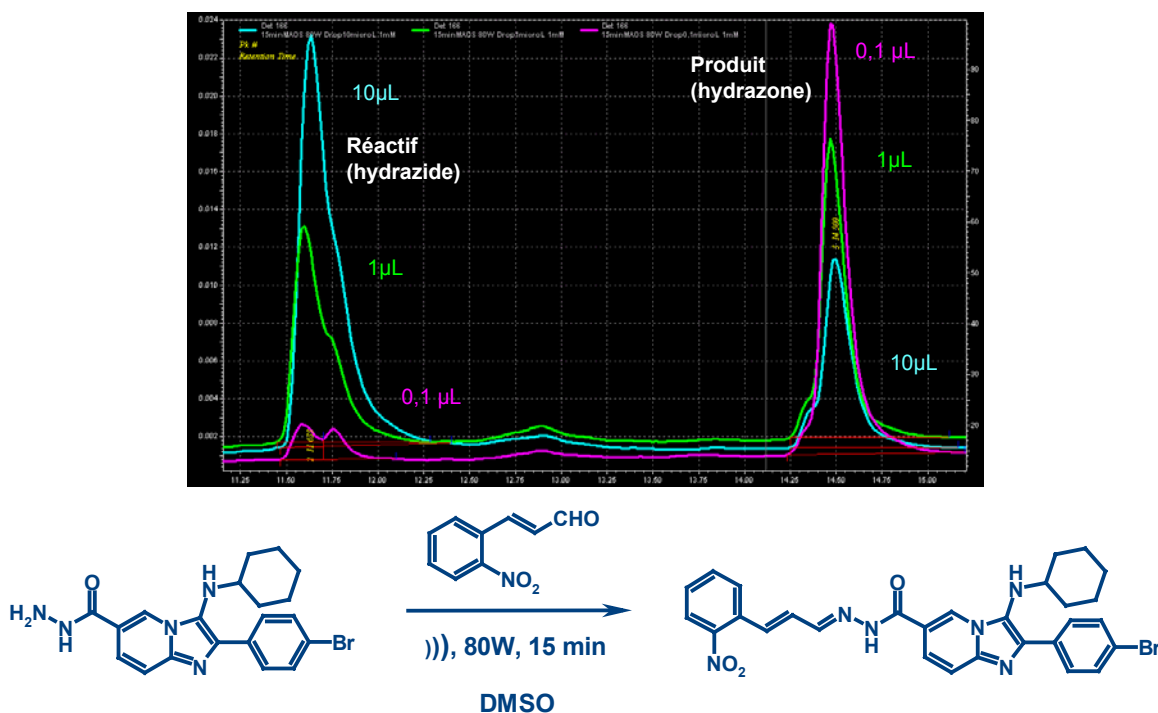


Figure 48 : Influence de la taille des gouttes sur l'avancement de la formation d'hydrazone.

La réaction chimique entre un hydrazide et un aldéhyde dans un mélange eau/DMSO/glycérol. Les pics de gauche correspondent à l'hydrazide (réactif), et les pics de droite à l'hydrazone (produit). Les chromatogrammes cyan (goutte de 10 µL) et vert (1 µL) témoignent d'une réaction incomplète, contrairement au chromatogramme rose (0,1 µL) qui montre une disparition totale du réactif de départ.

Lorsque la concentration initiale totale en réactifs dans les gouttes est de 1 mM ou 10 mM, les résultats pour ces deux concentrations initiales sont semblables, probablement à cause du phénomène d'évaporation. Nous utiliserons donc une concentration 1 mM en réactifs. Pour ce qui est des ratios de concentrations, nous avons opté pour un ratio 1:1:1 entre les trois réactifs (hydrazide 1, dialdéhyde, hydrazide 2), afin qu'il ne reste pas de réactifs n'ayant pas réagi dans les microgouttes.

Les conditions optimales sont finalement des **gouttes de volume de l'ordre de 100 nL**, un **ratio de concentrations 1:1:1** pour les trois réactifs de départ, et un **chauffage par micro-ondes** à une puissance de **80 watts** pendant **quinze minutes**.

Plusieurs couples d'hydrazides ont été testés dans les conditions optimales, et ont montré une réactivité comparable à celle de la réaction modèle, composé de l'hydrazide de l'acide nicotinique, de l'acide 3,5-diformylphénylboronique, et de l'hydrazide de l'acide 2-(4-bromo-phényl)-3-cyclohexylamino-imidazo[1,2-a]pyridine-6-carboxylique (**Figure 49**). Les chromatogrammes obtenus pour le mélange initial montrent les trois réactifs de départ, parmi lesquels l'acide 3,5-diformylphénylboronique se distingue par un pic étalé. Les chromatogrammes après réaction dans les conditions optimales montrent la disparition presque complète des réactifs de départ et la formation de trois hydrazones, le pic majoritaire correspondant à l'hydrazone dissymétrique.

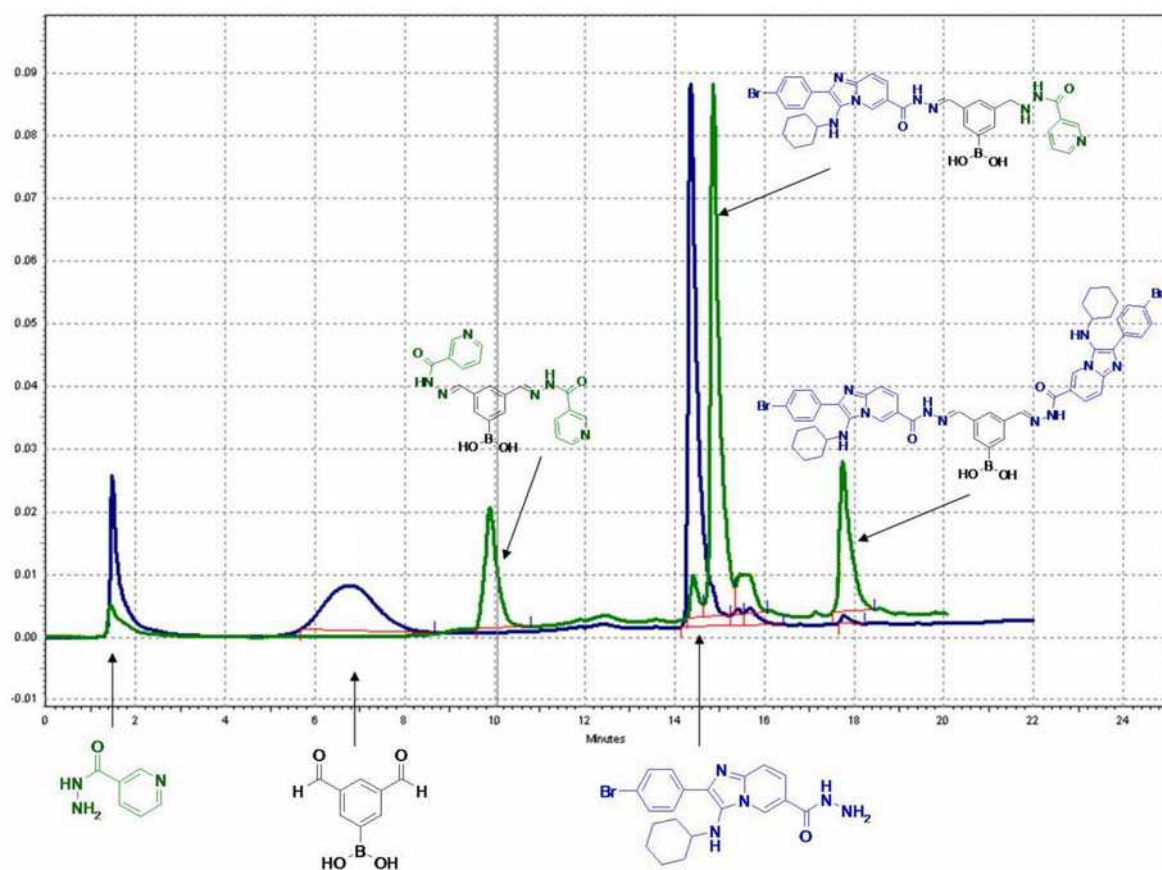


Figure 49 : Chromatogramme mettant en évidence la formation d'hydrazones sur puce.

Le chromatogramme bleu correspond au mélange de départ : hydrazide de l'acide nicotinique (en vert), acide 3,5-diformylphénylboronique (en noir), et hydrazide polycyclique (en bleu). Le chromatogramme vert correspond aux dihydrazones d'arrivée, pour lesquelles on observe une ratio environ 1:3:1.

Ce résultat, qui était espéré, est très encourageant, car il valide le fait que la réaction est quasiment totale (les réactifs de départ ont été consommés pratiquement intégralement) et que l'hydrazone dissymétrique est le composé majoritaire du mélange. Ce dernier point est important car l'intérêt de cette approche est de rechercher une dihydrazone s'adaptant au mieux au site actif d'une protéase, qui n'est généralement pas symétrique. Il faut cependant noter que cette validation n'a été réalisée que sur quelques réactions modèles, on ne peut que supposer que c'est aussi le cas pour la majorité des centaines de réactions différentes abritées par les gouttes lors de la formation d'une banque sur puce.

Ainsi, la réaction entre des synthons fonctionnalisés hydrazides et un dialdéhyde servant de base pour l'inhibition a permis à la fois de démontrer la validité de la synthèse organique en solution sur puce avec notre technologie, et de mettre au point les conditions de la création *in situ* de la banque chimique destinée au criblage de NS3. Un autre modèle chimique était nécessaire pour déterminer si la synthèse chimique en solution homogène sur tensioarray peut être appliquée à des cas plus complexes. C'est pourquoi nous avons réalisé des réactions multicomposés sur puce. Plus précisément, il s'agissait de condensation à trois composés, qui nous ont permis de synthétiser des produits fluorescents dans les microgouttes des tensioarrays.

3) RECHERCHE COMBINATOIRE DE FLUOROPHORES

Dans le cadre de la synthèse en goutte sur puce, une synthèse monoétape est plus que souhaitable, étant donné qu'il est impossible de séparer les produits de réaction. Cette étape doit nécessairement être complexe dans le cas de l'approche divergente envisagée, puisqu'il faut pouvoir faire varier plusieurs substituants. Une condensation à trois composés (Partie II, §3.1.2) semble tout à fait adaptée. Elle conduira à l'obtention d'un produit cyclique insaturé dont les substituants peuvent être variés en changeant les produits de départ : aminopyridine, aldéhyde et isonitrile.

Sachant que certaines aminopyridines présentent un certain niveau de fluorescence²³⁵, il est raisonnable de penser que certains dérivés hétérocycliques obtenus par la réaction de condensation à trois composés (3-Component Condensation ou 3CC) seront fluorescents²³⁶. L'utilisation de la réaction 3CC sur puce générera rapidement un grand nombre de molécules fluorescentes présentant des propriétés variées, grâce à un squelette fluorescent acceptant des groupements susceptibles de moduler cette fluorescence (rendement quantique, longueurs d'onde d'absorption et d'émission, forme des spectres). L'observation de la fluorescence émise avec divers substituants permet alors d'optimiser rapidement les fluorophores obtenus.

3.1) La condensation à trois composés

Les réactions de condensation à trois composés (voir Partie II, §3.1.2), ont été réalisées selon les protocoles décrits par Blackburn²⁰⁵. Le mélange d'une aminopyridine, d'un aldéhyde et d'un isonitrile, en présence de triflate de scandium, conduit à des dérivés de 3-aminoimidazo[1,2-a]pyridines (**Figure 50**).

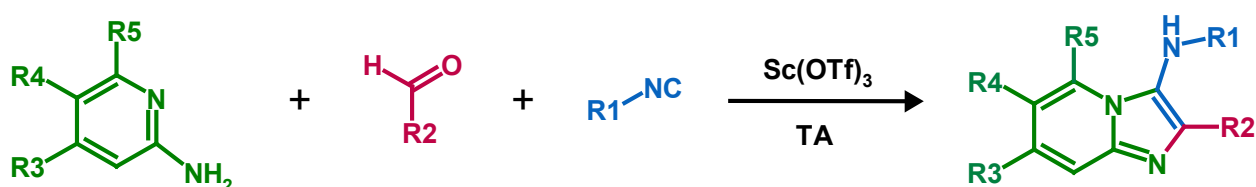


Figure 50 : Schéma général de la synthèse des fluorophores potentiels.

Nous avons choisi 40 aldéhydes pour varier les substituants R2 et quatre aminopyridines conduisant à différents substituants en R3, R4 et R5 (**Tableau 12 et 13**).



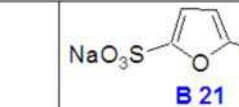
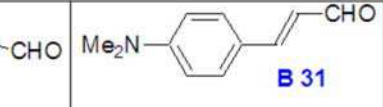
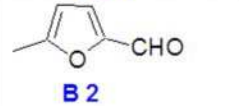
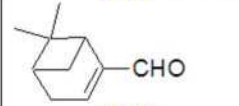
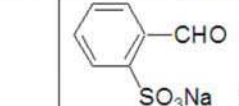
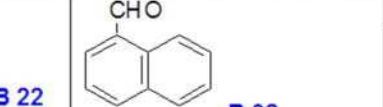
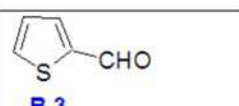
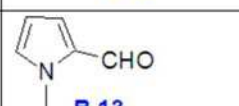
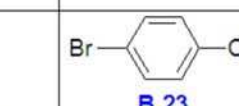
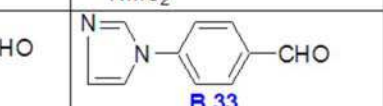
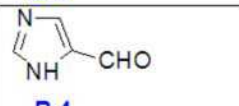
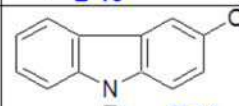
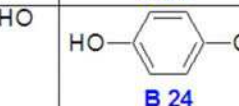
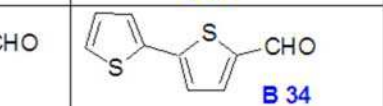
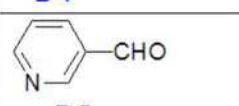
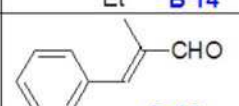
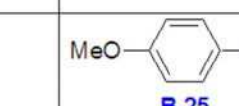
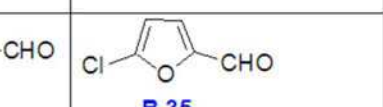
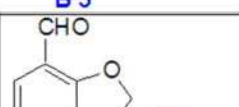
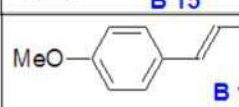
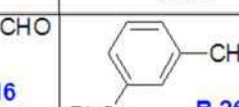
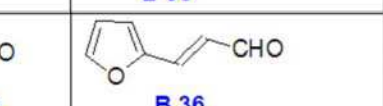
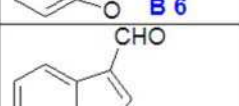
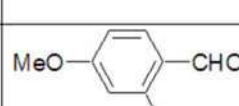
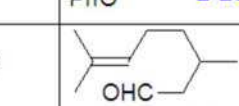
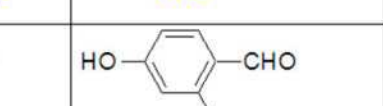
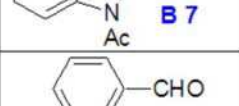
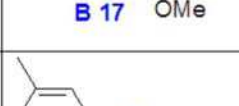
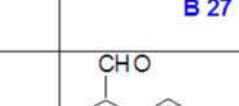
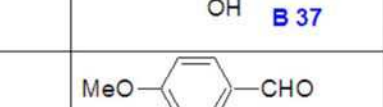
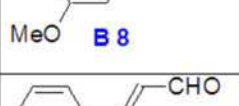
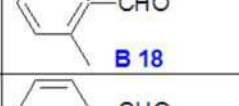
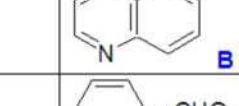
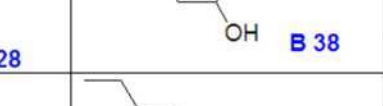
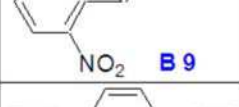
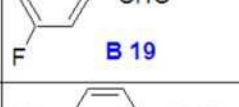
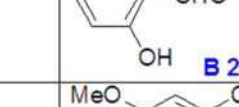
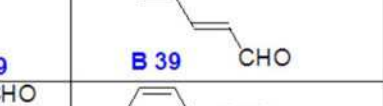
 B 1	 B 11	 B 21	 B 31
 B 2	 B 12	 B 22	 B 32
 B 3	 B 13	 B 23	 B 33
 B 4	 B 14	 B 24	 B 34
 B 5	 B 15	 B 25	 B 35
 B 6	 B 16	 B 26	 B 36
 B 7	 B 17	 B 27	 B 37
 B 8	 B 18	 B 28	 B 38
 B 9	 B 19	 B 29	 B 39
 B 10	 B 20	 B 30	 B 40

Tableau 12 : Liste des aldéhydes.

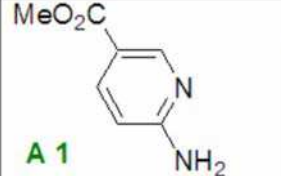
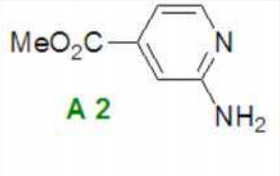
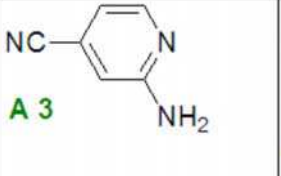
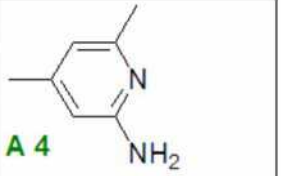
 A 1	 A 2	 A 3	 A 4
---	---	--	---

Tableau 13 : Liste des aminopyridines.

3.2) Validation par HPLC de la condensation à trois composés

Suivant une démarche identique à celle employée pour la validation de la formation d'hydrazones, un mélange de 3-méthoxycinnamaldéhyde et d'acide nicotinique est déposé dans tous les plots du microarray, et mis en contact avec du cyclohexylisonitrile. Le cyclohexylisonitrile est un réactif volatil. Or les gouttes du microarrays sont des réacteurs qui présentent une surface d'échange importante avec l'atmosphère ambiante. Aussi, il est intéressant de tenter de mettre cette propriété à profit en plaçant dans le microarray contenant toutes les combinaisons possibles aldéhydes-aminopyridines dans une atmosphère saturée en cyclohexylisonitrile. Cela revient à ajouter du cyclohexylisonitrile dans tous les microréacteurs chimiques simultanément, tout en préservant l'individualité de chaque réacteur. Cela évite de manipuler l'isonitrile pour le diluer et le déposer dans toutes les microgouttes, ce qui génère un gain de temps. C'est d'autant plus intéressant que l'isonitrile employé est un composé toxique et extrêmement malodorant. Afin de maintenir le tensioarray dans une atmosphère saturée en isonitrile, le tensioarray était au départ simplement enfermé dans une boîte de Pétri en verre, au fond de laquelle quelques microlitres d'isonitrile pur étaient déposés. Mais lors des premiers essais, il est apparu que l'évaporation progressive des gouttes n'était pas favorable à la réaction, ce qui a conduit à ajouter du DMSO dans notre dispositif pour saturer aussi l'atmosphère en solvant de réaction (**Figure 51**).

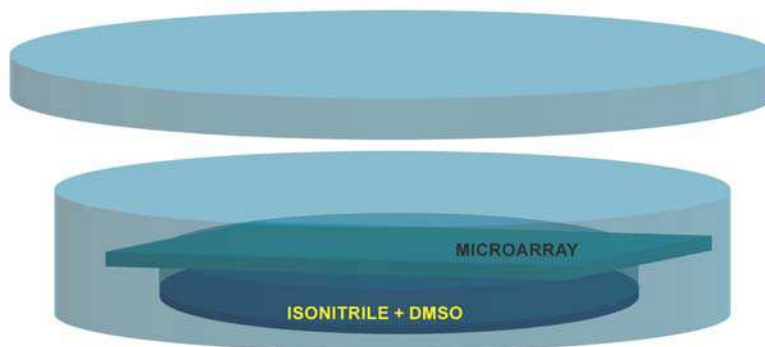


Figure 51 : Dispositif pour l'ajout d'un réactif gazeux.

Le liquide déposé au fond de la petite boîte de pétri (bleu foncé) contient l'isonitrile, qui est ajouté dans les microgouttes en phase gazeuse, et du DMSO, pour saturer l'atmosphère et éviter ainsi l'évaporation des gouttes.

En utilisant ce dispositif, la formation du produit de la condensation à trois composés a été mise en évidence. Le chromatogramme indique la formation du dérivé de 3-aminoimidazo[1,2-a]pyridine attendu, mais aussi la présence d'impuretés (**Figure 52**). Nous avons ainsi validé la possibilité de réaliser des réactions chimiques complexes en solution dans les microgouttes.

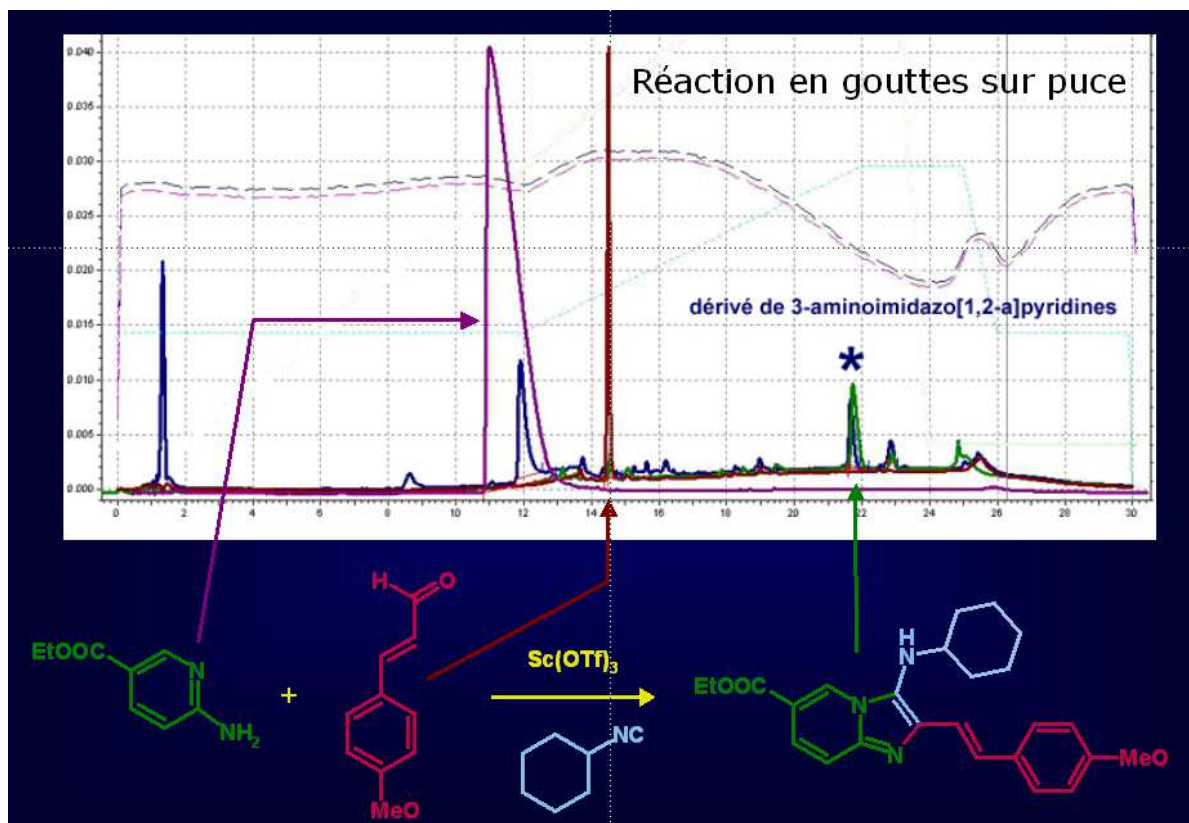


Figure 52 : Formation d'un dérivé de 3-aminoimidazo[1,2-a]pyridines sur puce.

Les réactifs sont matérialisés par le chromatogramme marron (p-méthoxycinnamaldéhyde) et le chromatogramme prune (ester de l'acide aminonicotinique). Le chromatogramme bleu, du mélange après réaction à température ambiante pendant une nuit, indique bien la formation du produit attendu, correspondant au chromatogramme vert. Ne pas tenir compte des courbes en pointillés (ce sont des paramètres de fonctionnement de l'HPLC).

3.3) Recherche combinatoire de fluorophores

3.3.1) Description de l'expérience

Les quarante aldéhydes du **tableau 12** sont déposés à l'aide de l'éjecteur piézoélectrique dans les plots du microarray (B1 à B10 sur les lignes 1 & 6, B11 à B20 sur les lignes 2 & 7, B21 à B30 sur les lignes 3 & 8, B31 à B40 sur sur les lignes 4 & 9), les lignes 5 & 10 étant réservées aux fluorophores de référence utilisés comme contrôles (**Figure 53**). Les aminopyridines A1, A2, A3, A4 du **tableau 13** sont déposées respectivement dans les blocs 1 & 5, 2 & 6, 3 & 7, 4 & 8 (**Figure 53**). Du triflate de scandium ($\text{Sc}(\text{OTf})_3$ 10% mol.) a été préalablement mélangé aux aminopyridines. Aldéhydes et aminopyridines sont à une concentration 10 mM dans un mélange eau/DMSO (1:1).

A1	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5	Col6	Col7	Col8	Col9	Col10
Row1	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
Row2	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20
Row3	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30
Row4	B31	B32	B33	B34	B35	B36	B37	B38	B39	B40
Row5	C-	No B	DAPI	FITC	Cy3	TR	Cy5	C-	No B	No B
Row6	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
Row7	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20
Row8	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30
Row9	B31	B32	B33	B34	B35	B36	B37	B38	B39	B40
Row10	C-	No B	DAPI	FITC	Cy3	TR	Cy5	C-	No B	No B

A2	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5	Col6	Col7	Col8	Col9	Col10
Row1	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
Row2	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20
Row3	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30
Row4	B31	B32	B33	B34	B35	B36	B37	B38	B39	B40
Row5	C-	No B	DAPI	FITC	Cy3	TR	Cy5	C-	No B	No B
Row6	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
Row7	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20
Row8	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30
Row9	B31	B32	B33	B34	B35	B36	B37	B38	B39	B40
Row10	C-	No B	DAPI	FITC	Cy3	TR	Cy5	C-	No B	No B

A3	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5	Col6	Col7	Col8	Col9	Col10
Row1	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
Row2	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20
Row3	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30
Row4	B31	B32	B33	B34	B35	B36	B37	B38	B39	B40
Row5	C-	No B	DAPI	FITC	Cy3	TR	Cy5	C-	No B	No B
Row6	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
Row7	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20
Row8	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30
Row9	B31	B32	B33	B34	B35	B36	B37	B38	B39	B40
Row10	C-	No B	DAPI	FITC	Cy3	TR	Cy5	C-	No B	No B

A4	Col1	Col2	Col3	Col4	Col5	Col6	Col7	Col8	Col9	Col10
Row1	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
Row2	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20
Row3	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30
Row4	B31	B32	B33	B34	B35	B36	B37	B38	B39	B40
Row5	C-	No B	DAPI	FITC	Cy3	TR	Cy5	C-	No B	No B
Row6	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10
Row7	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20
Row8	B21	B22	B23	B24	B25	B26	B27	B28	B29	B30
Row9	B31	B32	B33	B34	B35	B36	B37	B38	B39	B40
Row10	C-	No B	DAPI	FITC	Cy3	TR	Cy5	C-	No B	No B

Figure 53 : Plan de dépôt des aldéhydes et des aminopyridines.

Les colonnes et les lignes de chaque blocs sont indiquées. Chaque bloc reçoit une aminopyridine (avec du triflate de scandium 10% mol.) différente A1, A2, A3, A4 (voir **tableau 13** pour les structures). Tous les blocs ont la même disposition d'aldéhydes (B1-B40, voir **tableau 12** pour les structures) et de fluorophores de référence pour plusieurs types de longueurs d'ondes (DAPI, FITC, Cy3, TexasRed = TR et Cy5, voir **tableaux 14 et 15** pour les longueurs d'ondes correspondantes)

Après ajout du mélange des aldéhydes et des (aminopyridines + triflate de scandium) sur les plots conformément au plan de dépôt, le tensioarray est placé dans le dispositif d'ajout du réactif gazeux cyclohexylisonitrile à température ambiante et dans l'obscurité pendant 15 heures (**Figure 51**). Le tensioarray est alors extrait du dispositif et laissé à évaporer, puis un mélange contenant 20% de glycérol, 30% d'eau ultrapure et 50% de DMSO est ajouté dans tous les plots, avant de passer à la lecture des résultats. L'étape d'évaporation a pour but d'enlever toute trace d'isonitrile.

3.3.2) Visualisation au scanner

La lecture du microarray est effectuée avec un scanner de fluorescence pour quatre jeux de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission différents (**Tableau 14**).

Fluorophore de référence	FITC	Cy3	Texas Red	Cy5
$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	488	543,5	594	632,8
λ_{lecture} (nm)	512	560	615	675

Tableau 14 : Jeux de lasers utilisés pour imager les fluorophores avec le scanner.

De nombreuses microgouttes sont fluorescentes, en particulier celles des blocs correspondant aux aminopyridines A2 et A3 (**Figure 54**). Certaines gouttes fluorescent principalement à une seule longueur d'onde, comme le mélange A2-B24 qui ne brille que dans la couleur FITC (vert), tandis que d'autres sont fluorescentes sur un spectre plus large (mélange de couleurs). Une simple lecture de la fluorescence permet ainsi d'identifier directement des fluorophores potentiels.

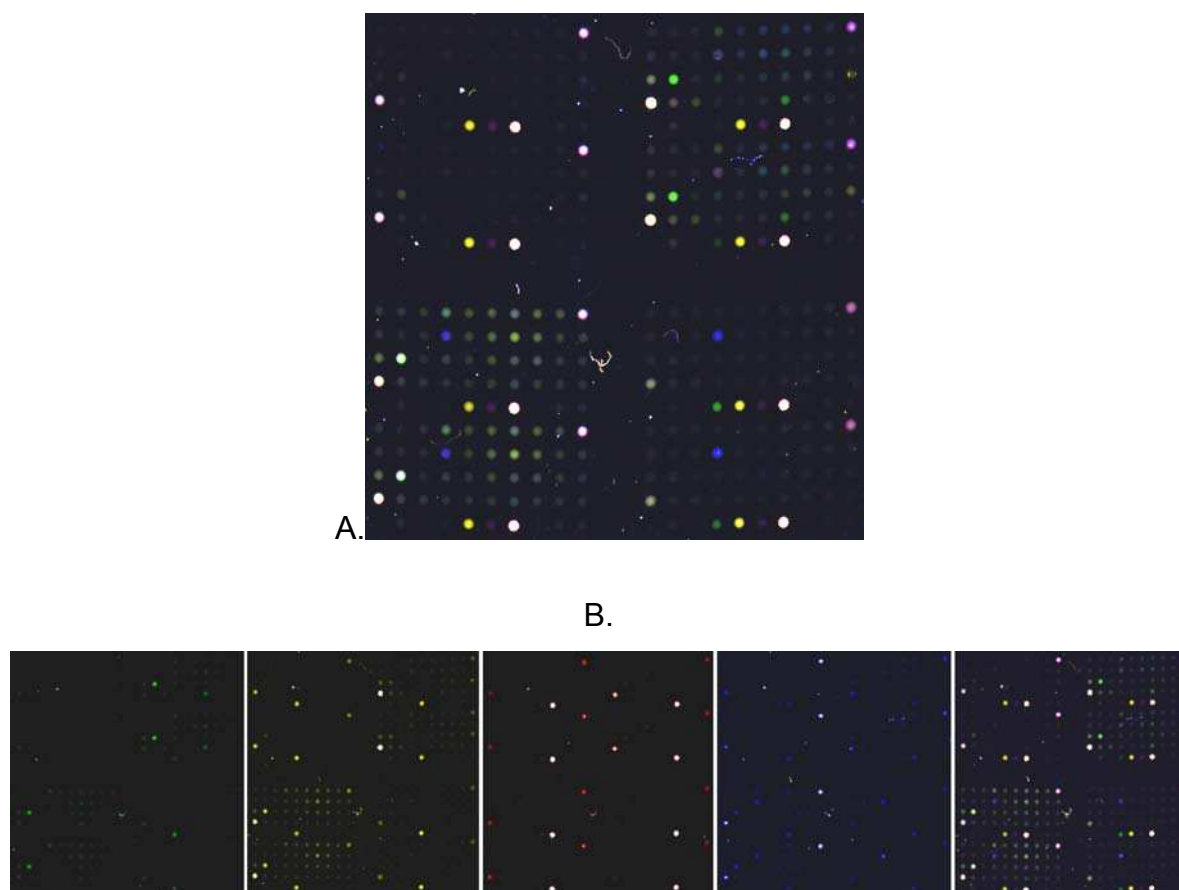


Figure 54 : Images scanner quatre couleurs du microarray.

A. Superposition des quatre longueurs d'ondes FITC (vert), Cy3 (jaune), TexasRed (rouge) et Cy5 (Bleu).

B. Images pour chaque longueur d'onde : de gauche à droite FITC (vert), Cy3 (jaune), TexasRed (rouge) et Cy5 (Bleu). La cinquième image correspond à la superposition des quatre premières.

La quantification de la fluorescence dans chaque goutte, et le traitement des données à l'aide des tableaux croisés dynamiques d'Excel, permet de construire et de manipuler aisément des histogrammes représentant les intensités de fluorescence, à différentes longueurs d'onde, des combinaisons aldéhydes-aminopyridines (**Figure 55**).

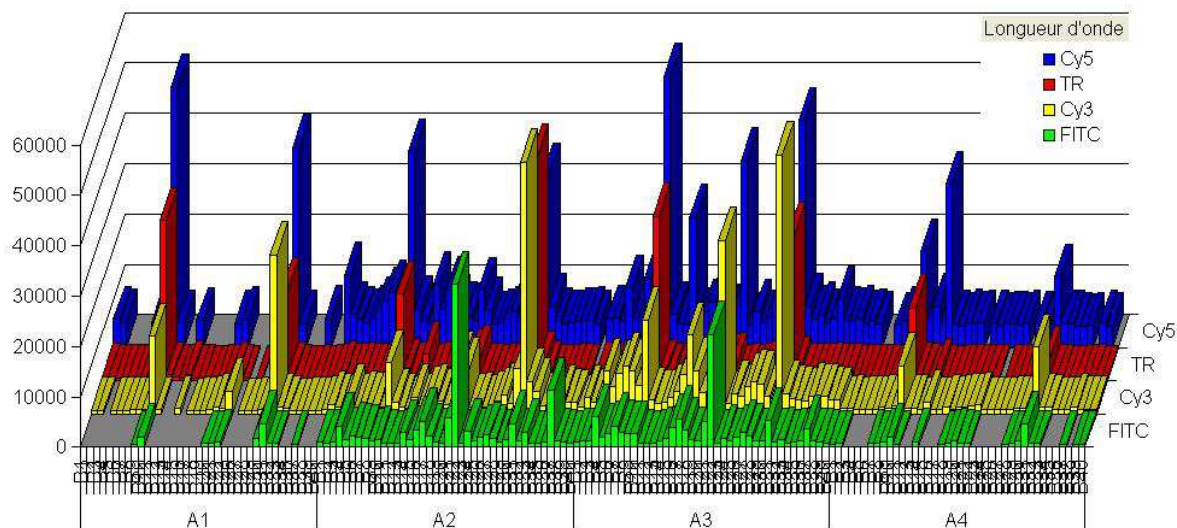


Figure 55 : Histogrammes issus des images scanner du tensioarray.

Cet histogramme représente l'intensité de fluorescence observée pour chaque plot du tensioarray et pour quatre longueurs d'ondes différentes (FITC en vert, Cy3 en jaune, TR en rouge et Cy5 en bleu). L'axe des abscisses est divisé par blocs (*i.e.* par type d'aminopyridine) puis sous-divisé par aldéhydes (dans l'ordre B1, B2, ..., B20). Les contrôles ont été omis pour plus de clarté.

Ces résultats permettent d'identifier des candidats fluorophores pour les différentes longueurs d'onde en sélectionnant les molécules émettant des niveaux de fluorescence élevés, et sélectivement dans une gamme de longueur d'onde (**Tableau 15**).

Longueurs d'onde	FITC	Cy3	Texas Red	Cy5
Structures				

Tableau 15 : Structures de candidats fluorophores et longueurs d'ondes correspondantes.

3.3.3) Observation par microscopie automatisée

Une fois les microgouttes contenant les candidats d'intérêt identifiées, il est nécessaire de resynthétiser, de purifier, et de caractériser, du point de vue photochimique, les composés fluorescents pour confirmer les résultats. En effet des artéfacts d'émission de fluorescence pourraient survenir du fait d'impuretés et ou de précipités présents dans les gouttes. Un des moyens possibles pour affiner l'analyse est de recourir à la microscopie à fluorescence automatisée. En effet, la résolution supérieure permise par cette technologie peut permettre de visualiser la formation de précipités. Outre la résolution plus élevée, le microscope apporte aussi la possibilité d'exciter dans l'UV avec le jeu de filtres DAPI (Di Aminido Phenyl Indol), ce qui pourrait permettre de trouver des composés fluorescents autres que ceux observés avec le scanner. Le microarray est positionné sur une plateforme motorisée, et le microscope photographie chaque plot un par un avec quatre jeux de filtres fluorescents (**Tableau 16**).

Fluorophore de référence	DAPI	FITC	PhycoE	Rhod B
$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	350	480	535	545
λ_{lecture} (nm)	460	535	605	620

Tableau 16 : Jeux de lasers utilisés pour imager les fluorophores avec le microscope.

Les images obtenues pour les filtres FITC, PhycoE (PhycoErythrine) et RhodB (Rnhodamine B) corroborent les résultats obtenus au scanner. L'excitation UV montre une faible fluorescence résiduelle à 460 nm dans la majorité des gouttelettes des blocs correspondant aux aminopyridines A2 et A3. Les images précises obtenues apportent des informations supplémentaires : comme prévu, les précipités formés dans les gouttes ont pu être visualisés (**Figure 56 A**). Plus surprenant, la présence de monocristaux de taille importante a également été observée (**Figure 56 B**). Nous avons déjà observé la formation de monocristaux de grande taille en forme d'aiguille, en laissant se faire une réaction de condensation à trois composés en goutte pendant trois jours (**Figure 56 C**). Ces résultats révèlent que notre approche présente également un intérêt potentiel pour la cristallogénèse²³⁷. En même temps, ils illustrent aussi une limitation importante de la chimie combinatoire en gouttes : la différence de solubilité d'un produit à l'autre peut altérer l'observation.

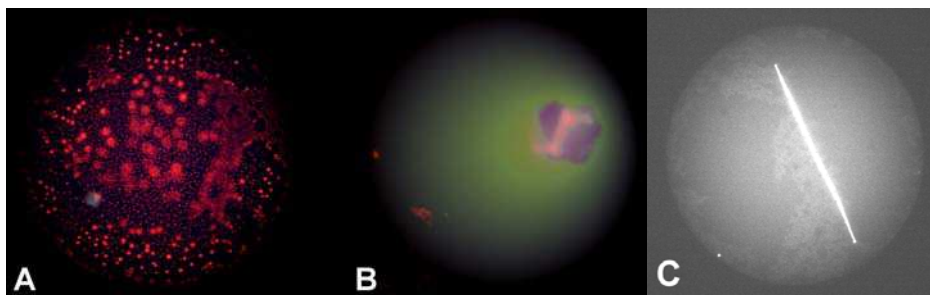


Figure 56 : Observation en microscopie automatisée.

A. Précipité pseudo-colloïdal. B. Monocristal de grandes dimensions. C. Cristal en forme d'aiguille.

4) CONCLUSION

La possibilité de réaliser des réactions chimiques dans les microgouttes a été démontrée, avec la formation d'hydrazones et de composés hétérocycliques.

La stratégie visant à assembler une banque chimique combinatoire sur puce, à partir d'un dialdéhyde et de synthons hydrazides, a été validée par l'obtention de mélanges de dihydrazones avec comme composé majoritaire la dihydrazone dissymétrique. Sur ce principe, une construction de banque par synthèse *in situ* sera réalisée pour le criblage de la protéase NS3 (cf. Partie III-4). Il faut souligner la puissance de cette approche, qui permet d'obtenir un très grand nombre de composé à partir d'une petite banque de synthons, limitant ainsi les soucis de stockage, de resynthèse et de lourdes manipulations inhérents aux grandes bibliothèques de composés. D'autre part, cette méthodologie est transférable à de nombreuses cibles, il suffit d'adapter la molécule base au problème posé.

La démonstration de la faisabilité d'une chimie plus complexe avec les condensations à trois composés a permis d'illustrer le potentiel de la synthèse combinatoire sur puce avec la recherche de composés fluorescents, mais également les limitations de la conduite en parallèle de plusieurs centaines de réactions sur un tensioarray. En effet, la précipitation ou la formation de cristaux dans certains plots peut générer des artéfacts. Ceux-ci peuvent cependant être repérés par l'observation de résolution élevée permise par la microscopie automatisée, notamment en adaptant aux cristaux des protocoles de repérage automatique des cellules.

Finalement, la synthèse chimique sur puce présente un potentiel élevé pour les approches combinatoires, et son principal inconvénient est le manque de contrôle individualisé des réactions. D'autres caractéristiques sont ambivalentes, et peuvent s'avérer utiles ou gênant selon le type de réaction envisagée. Par exemple, l'évaporation permet d'activer la formation des hydrazones alors qu'elle empêche la réaction à trois composés.

III-3 : MODELE BIOLOGIQUE

1) INTRODUCTION

Les protéases sont des enzymes vitales pour tous les organismes vivants et leur étude peut donc conduire à une meilleure connaissance des processus biologiques où elles interviennent et permettre de corriger d'éventuels dysfonctionnements, ou bien empêcher un pathogène de se développer correctement. L'étude sur puce de l'activité des protéases est un des objectifs de la thèse. Parmi les méthodes envisageables, la protéolyse en solution présente de nombreux avantages dont celui d'être très bien adaptée à notre technologie, l'éjection piézoélectrique sur les tensioarrays permettant de réaliser des mélanges et des dilutions des enzymes et des substrats directement dans les microgouttes (Partie II, §2.3). La protéolyse en solution peut être conduite en présence de différents substrats. La validation biochimique sur puce a été réalisée sur trois catégories de substrats fluorogènes différents :

- un substrat peptidique de la papaïne synthétisé sur billes et déposé sur un tensioarray ,
- un substrat protéique des métalloprotéases de type gélatinase en solution,
- un substrat peptidique soluble de la protéase NS3.

2) ACTIVITE PROTEOLYTIQUE DE LA PAPAÏNE

Des fluorophores et un substrat peptidique fluorogène ont été développés pour l'étude de l'activité protéolytique. Les synthèses de fluorophores et d'un peptide fluorogène substrat de la papaïne ont donc été réalisées par Olga Burchak ²³⁸, chercheuse post-doctorante au laboratoire Biopuces. Ces nouveaux dérivés de la fluorescéine, aisément utilisables au cours d'une synthèse peptidique, ont ensuite été caractérisés photochimiquement, puis le peptide substrat de la papaïne, incorporant un des fluorophores et toujours greffé aux billes ayant servi pour la synthèse sur support solide, a été testé biologiquement sur un tensioarray. Ainsi, la protéase à cystéine papaïne nous a permis de valider la possibilité d'observer la protéolyse dans des plots hydrophiles de tensioarrays avec une méthode d'analyse originale de la protéolyse de substrats fluorogènes sur billes. Ces substrats sont fondés sur l'utilisation de nouveaux dérivés de la fluorescéine. Pour plus de détails sur les expériences de cette section 2), voir l'**Annexe III**.

2.1) Caractérisation photochimique des fluorophores

Notre but étant de caractériser l'activité sur puce nous avons besoin d'un substrat peptidique fluorogène. Pour avoir la possibilité de développer nous-mêmes les substrats peptidiques fluorogènes, il était nécessaire de développer d'abord des fluorophores efficaces, peu coûteux, et faciles à intégrer lors d'une synthèse peptidique. Le jeu de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission que nous voulions utiliser était celui correspondant à la fluorescéine, car il est facile à utiliser avec les appareils d'analyse courants (scanners et microscopes). Mais si la fluorescéine est un fluorophore relativement bon marché, elle présente une sensibilité au pH et à la lumière liée à son existence sous plusieurs formes : un équilibre tautomère entre une spirolactone et un acide carboxylique (en position 2'), et divers degrés de protonation²³⁹⁻²⁴¹ (**Figure 57**).

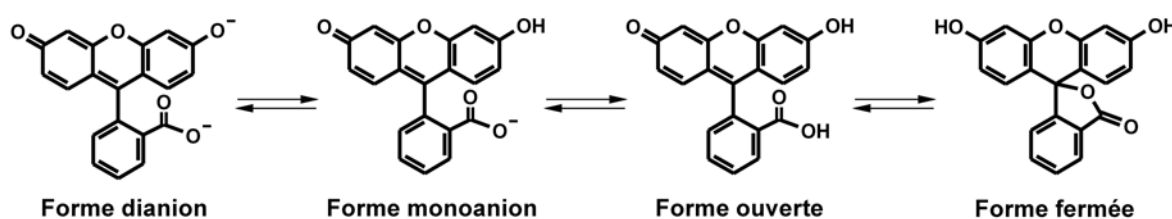


Figure 57 : Multiples formes de la fluorescéine.

La fluorescéine et les composés de structure similaire ont par conséquent des applications limitées en biologie²⁴². Les fluorophores que nous avons caractérisés sont des dérivés d'esters d'aminofluorescéine (**Figure 59**) et il était donc nécessaire de déterminer les propriétés de ces fluorophores avant de les incorporer dans un substrat, en particulier en terme de photostabilité et d'influence du pH.

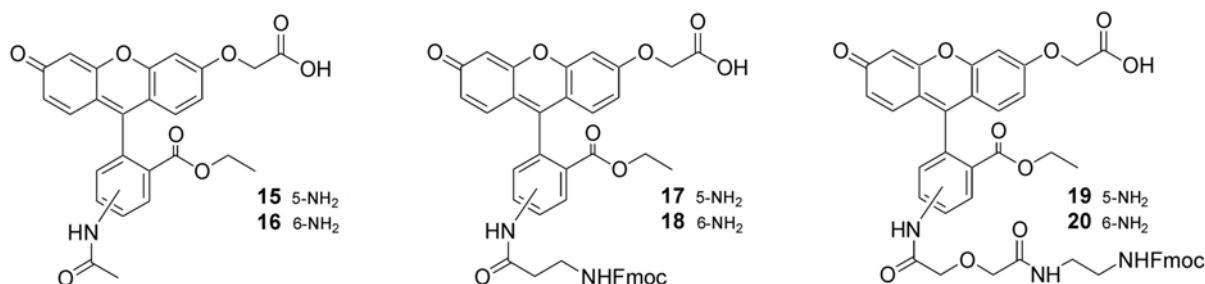


Figure 59 : Structure des fluorophores.

Les spectres d'absorption UV-visible des composés 15 à 20 montrent deux maxima d'absorption à 456 et 481 nanomètres (**Figure 60 A**). Les sources excitatrices de la

fluorescéine (490 nm) peuvent donc être utilisées avec nos fluorophores. Les spectres d'émission de fluorescence des composés 15 à 20 sont élargis et décalé vers le rouge ($\lambda_{\max} = 520$ nm) par rapport à celui de la fluorescéine ($\lambda_{\max} = 512$ nm) (**Figure 60 A**). En accord avec la littérature parue sur les éthers de 3-O-alkyl fluorescéine²⁴³⁻²⁴⁵, les rendements quantiques des composés 15 à 20 restent pratiquement inchangés sur la gamme de pH 4,0-10,0 (**Figure 60 B**). Cela s'explique par l'absence d'équilibres ioniques pour les dérivés de 3-O-alkyl fluorescéine bloqués dans la forme tautomère quinoïde ouverte par une estérification en position 2'.

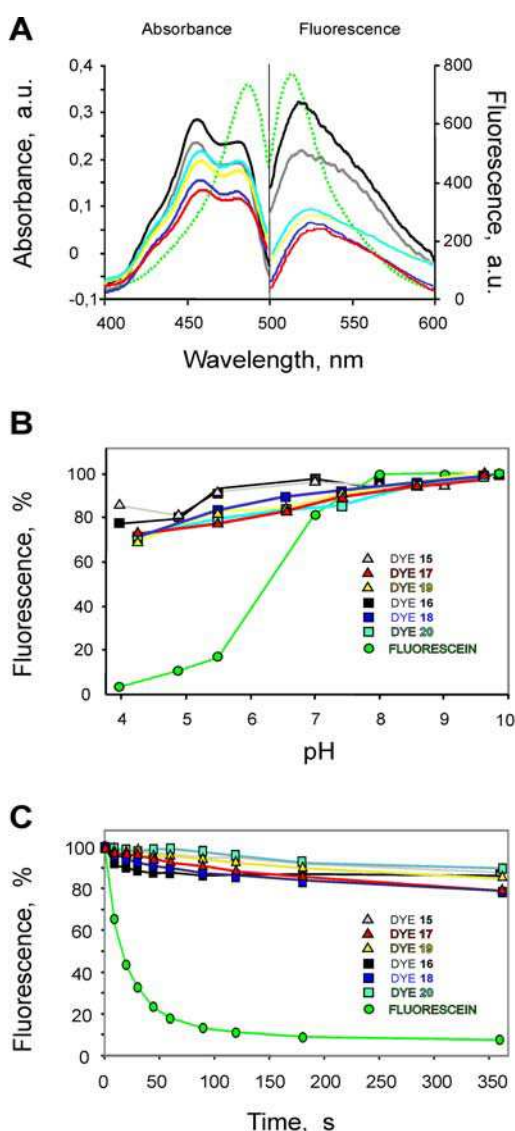


Figure 60 : Propriétés photochimiques des fluorophores.

A. Spectre d'absorption et d'émission de fluorophores 15 (gris), 16 (noir), 17 (rouge), 18 (bleu), 19 (jaune), 20 (cyan), et fluorescéine (pointillés vert). Les rendements quantiques mesurés sont : 0.19 (15), 0.18 (16), 0.07 (17), 0.04 (18), 0.12 (19), et 0.07 (20). B. Dépendance de l'intensité de fluorescence vis-à-vis du pH pour les composés 15 à 20 et la fluorescéine (même code couleur que pour A.). C. Photostabilité des composés.

La destruction irréversible des fluorophores limite le seuil de détection dans les cas où l'on dispose d'une petite quantité d'échantillon ou de molécules fluorescentes, comme par exemple en immunofluorescence. **Ce phénomène est d'une grande importance dans le cas des microarrays, étant donné les faibles volumes mis en jeu.** C'est pourquoi nous avons développé une méthode pour évaluer la photostabilité de nos fluorophores dans des conditions d'acquisition avec un microscope à fluorescence. Les échantillons, déposés dans les puits de tensioarrays de 4 x 10 plots hydrophiles (2 mm de diamètre) séparés par une surface de Téflon de 30 µm d'épaisseur (Prolabo) ont été recouvert avec une lamelle, ce qui a créé des chambres cylindriques d'environ 380 nL de volume. Une fois placée sous un microscope, l'intégralité de la chambre était éclairée avec un jeu de filtres standard pour fluorescéine, l'intensité mesurée au niveau de la chambre étant d'environ 6 mW/cm². Des images des plots ont été prises à différents temps, et la fluorescence moyenne mesurée avec le logiciel IMSTAR⁸⁸. Soumise à de telles conditions, la fluorescéine perd rapidement sa fluorescence (50% de diminution en 14 secondes), tandis que les composés 15 à 20 résistaient extrêmement bien, montrant moins de 20% de diminution de la fluorescence après 6 minutes (**Figure 60 C**).

2.2) Protéolyse sur puce de substrats liés à des billes

Afin de valider l'utilité de ces fluorophores pour des applications biologiques sur tensioarray, un substrat fluorogène pour la protéase à cystéine papaïne a été synthétisé (par Olga Burchak) sur des billes de Tentagel (20µm de diamètre), avec une chimie de type Fmoc. Ce substrat incorpore le composé fluorescent 18 et le chromophore rouge de méthyle, séparés par la séquence peptidique GGFGLG (**Figure 61**). Il a été montré que cette séquence est clivée efficacement par la papaïne au niveau de la liaison G-L²⁴⁶, la spécificité pour la papaïne étant déterminée par la phénylalanine en position P2 et la leucine en position P'1²⁴⁷. Le rouge de méthyle éteint la fluorescence dans la zone d'émission de la fluorescéine et trouve une utilisation étendue dans les sondes oligonucléotidiques « self-quenched » pour la PCR en temps réel²⁴⁸. La validation du clivage par la protéase a été réalisée directement sur les billes, par souci de simplicité et dans l'optique de possibles applications haut débit. Même si la résine de Tentagel n'ont pas été décrites comme optimales pour la protéolyse sur billes, notamment en terme de rapport signal/bruit²⁴⁶, elles présentent des propriétés avantageuses, comme une excellente capacité à s'imprégner des solvants aqueux et organiques, une bonne stabilité mécanique et une faible distribution de

tailles^{249, 250}. L'ajout d'un espaceur PEG ($n = 7$) a permis de rendre le substrat plus accessible pour la protéase (**Figure 61**).

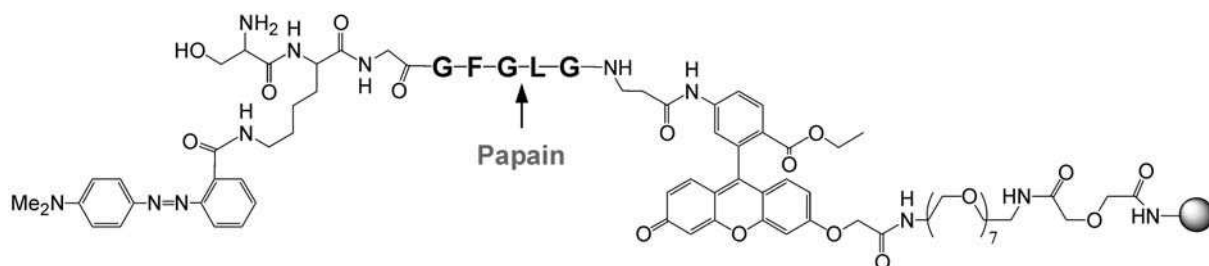


Figure 61 : Structure du substrat fluorogène pour la papaïne.

Le clivage par la protéase du substrat fluorogène conduit à une augmentation de la fluorescence des billes lorsque la partie contenant le « quencher » rouge de méthyle est détachée. Le distinguo entre les billes ayant subi l'action de la protéase et les autres billes se fait donc en comparant les niveaux de fluorescence. De manière surprenante, la plupart des criblages dans la littérature se font par une détermination visuelle des niveaux de fluorescence avec un microscope²⁴⁹. Cette analyse subjective ne permet pas de distinguer des différences faibles, ce qui limite la sensibilité de la méthode. C'est problématique pour les peptides « self-quenched », qui ont déjà une certaine fluorescence intrinsèque et d'autant plus avec les billes dérivées du polystyrène comme le Tentagel, qui présente une autofluorescence de large gamme spectrale²⁵⁰. La variation, d'une bille à l'autre, de la densité de polymère, du nombre de groupes fonctionnels et de la proportion d'attachement du substrat induit une hétérogénéité de la fluorescence supplémentaire²⁴⁹. Tout ceci suggère un besoin d'analyser quantitativement la distribution de la fluorescence des billes.

Notre méthode de quantification développée pour les tensioarray est assez simple : elle consiste à utiliser les mêmes chambres cylindriques que pour le test de photosensibilité, les billes (5 à 500 par plot) étant déposées avec notre éjecteur piézo-électrique de manière assez homogène. Les billes ont été préincubées avant le dépôt, ou bien la protéase a été ajoutée après le dépôt. La fluorescence a ensuite été mesurée avec un scanner de fluorescence et un microscope à fluorescence. Les billes incubées avec la papaïne sont plus brillantes que les billes de contrôles sur l'image obtenue au scanner (**Figure 62 A**), et ce résultat est encore plus évident avec les images de meilleure résolution obtenues avec le microscope (**Figure 62 B et 62 C**). Le logiciel d'analyse du microscope (IMSTAR) permet en plus de mesurer la fluorescence individuelle de chaque bille d'un plot, générant des

données que l'on peut représenter sous formes de classes d'effectifs (**Figure 62 D**), *i.e.* d'histogrammes représentant le pourcentage de billes appartenant à des domaines de fluorescence définis arbitrairement. Cela a permis de mettre en évidence que 2 heures d'incubation avec de la papaïne à 0,5 μM conduit à une augmentation de la fluorescence moyenne d'un facteur environ 2,7 qui s'accompagne d'une augmentation du coefficient de variation (CV) (**Figure 62 D**). La protéase inhibée par le N-éthyl-maléimide ne donne pas lieu à cette augmentation de fluorescence ce qui permet de penser que c'est bien le clivage enzymatique qui en est responsable. L'augmentation du CV peut alors s'expliquer par une efficacité de protéolyse qui diffère d'une bille à l'autre.

Ainsi, nous avons développé une méthode pour l'étude sur puce de la protéolyse de substrats liés à des billes. Les résultats obtenus montrent une sensibilité élevée, et le procédé est en plus facilement automatisable, en s'appuyant sur des masques utilisant des seuils d'intensité permettant de détecter les billes fluorescentes. Aussi cette méthode est tout à fait adaptable au criblage à haut débit sur tensioarray, moyennant l'utilisation d'un robot adapté pour le dépôt de billes, comme un robot à vannes solénoïdes. Ce dernier type de robot semble mieux adapté qu'un éjecteur piézoélectrique, dont nous avons noté que les pipettes se bouchaient rapidement lors de l'utilisation de billes.

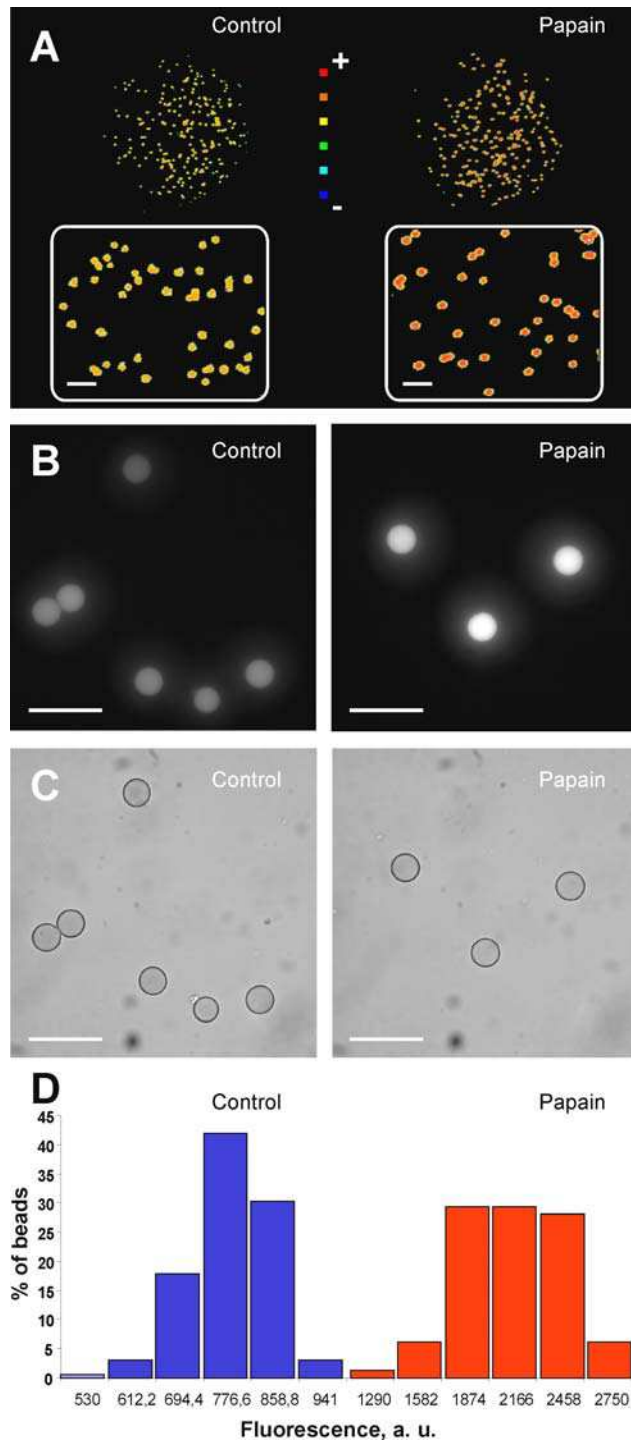


Figure 62 : Protéolyse sur billes.

Des billes de TentaGel portant le substrat fluorogène de la papaïne (**Figure 61**) ont été incubées avec de la papaïne 0.5 μM papaïne (notée «papaïne»), avec une solution contrôle (notée «control») ou avec de la papaïne inhibée avec du N-éthyl-maléimide (résultats identiques à «control»). Après 2 h, les billes ont été spottées sur des tenseoarrays et analysées. A. Images (résolution 5 μm) des plots contenant chacun une des deux populations de billes obtenues au scanner. Noter l'échelle de couleur. Les encarts montrent de agrandissements (3X) des images des populations de billes. L'échelle indiquée par des traits blancs sur les images A–C représente 50 μM . B. Images des billes en microscopie à fluorescence obtenues avec un jeu de filtres fluorescéine. C. Images des billes en microscopie visible (lumière blanche) de la même population de billes qu'en B. D. Histogramme montrant la distribution de l'intensité de fluorescence des populations de billes du contrôle et des populations de billes traitées avec de la papaïne (200 billes par plots environ).

3) ETUDE DE L'ACTION D'UNE METALLOPROTEASE SUR PUCE

L'observation de la protéolyse par la papaïne constitue une première étape, il était logique de poursuivre la validation en utilisant des protéases plus complexes. Les métalloprotéases sont des protéases dont le mécanisme implique un ion métallique, comme par exemple l'ion zinc. De telles protéases sont fréquemment mises en causes dans diverses pathologies, et en particulier dans des cas de cancers²¹⁴⁻²¹⁶. Les métalloprotéases présentant une activité gélatinolytique, comme les protéases humaines MMP-2 et MMP-9 participent notamment à l'invasion des tissus en dégradant la matrice extra-cellulaire²⁵¹. Nous avons choisi de tester l'activité protéolytique d'une collagénase de type IV provenant de *Clostridium histolyticum*, et connue pour sa capacité à dégrader la gélatine (EC 3.4.24.3). Un substrat protéique fluorogène commercial est de surcroît disponible pour tester cette activité, ce qui permet de réaliser la réaction enzymatique dans un milieu complètement homogène et simplifie l'analyse par rapport au système sur bille utilisé pour la papaïne.

Nous avons eu recours à un kit commercial fournissant le substrat, l'enzyme et un tampon réactionnel, que nous avons adapté pour réaliser la protéolyse sur puce. Le substrat protéique en question est un dérivé de la gélatine obtenu par marquage avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Le marquage excessif de cette protéine à l'aide de isothiocyanate de fluorescéine conduit à une macromolécule dont la fluorescence est éteinte, à cause de l'absorption, par ses homologues voisins, de la lumière excitatrice que reçoit une molécule de fluorescéine donnée. Lorsque la collagénase dégrade la gélatine, les parties fluorophores sont relarguées en solution, ce qui entraîne une augmentation de la fluorescence. Les expériences de protéolyse ont été réalisées sur des tensioarrays (fabriqués par la société Memscap) comptant 400 plots hydrophiles de 500 µm de diamètre.

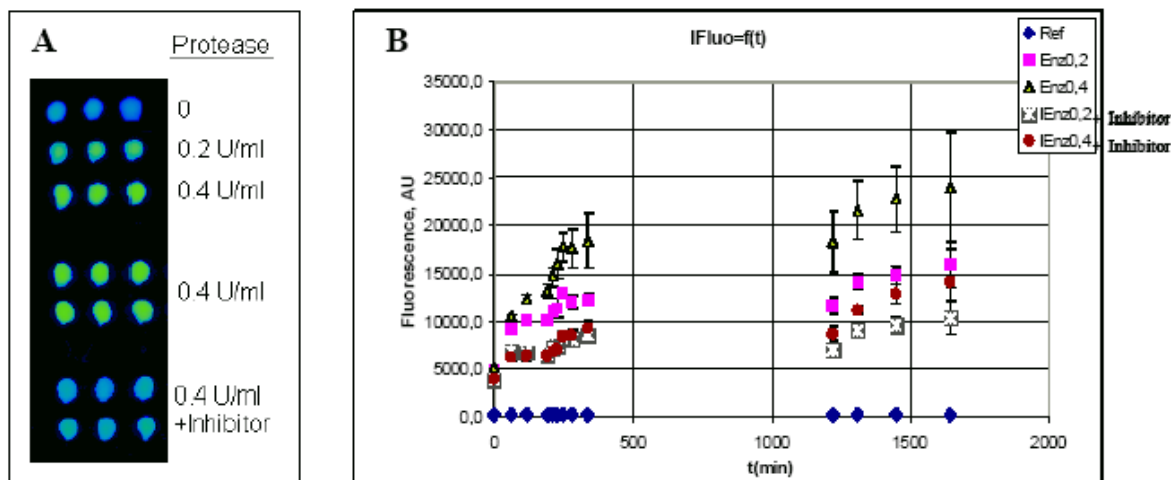


Figure 63 : Analyse de l'activité de la métalloprotéase sur un microarray de gouttelettes.

(A) Image de la réaction de protéolyse dans les microgouttes obtenues avec un scanner, (B) Cinétique de la protéolyse dans les microgouttes.

Le substrat protéique fluorogène, le tampon et la protéase, sont déposés tour à tour dans les gouttes du microarray, à l'aide de l'éjecteur piézoélectrique. Du glycérol (10%) a été ajouté au tampon de réaction afin de limiter l'évaporation des gouttes. Les dépôts se font suivant un ordre et des volumes facilement programmables, ce qui permet de varier à loisir les conditions dans les microgouttes (concentrations, contrôle sans enzyme, inhibiteurs etc.). Le déroulement de chaque réaction individuelle est suivi à travers la libération progressive de la fluorescence, mesurée avec un scanner.

La validation du concept a été obtenue dans une première expérience de suivi, dans chaque goutte, du déroulement de la protéolyse au cours du temps. Les mesures montrent une augmentation de la fluorescence au cours du temps en présence de protéase, une fluorescence stable en absence de protéase, et une augmentation plus faible en présence de 1,10-orthophénantroline, un inhibiteur spécifique des métalloprotéases (**Figure 63**). De plus, la vitesse de réaction à température ambiante est extrêmement lente (340 à 1220 min), tandis qu'à 37°C elle se déroule en quelques heures (0 à 340 min et 1220 à 1645 min).

La technologie microarray est ici très utile pour optimiser rapidement les conditions expérimentales. Il a été possible de tester simultanément, sur une surface de 4 cm², 40 conditions différentes (huit concentrations de protéases et cinq concentrations de substrats) en six répliquats, tout en incluant différents contrôles. Ce nombre peut aisément être porté à plus de 200 en travaillant avec des dupliquats. Les résultats indiquent que l'augmentation

initiale de la fluorescence est proportionnelle à la concentration d'enzyme. Par exemple, pour une concentration en substrat de 100 µg/mL, la fluorescence (y) est liée à la concentration d'enzyme (x) par l'équation $y = 29,354.x$ avec $R^2 = 0,999$ (**Figure 64 A.**). L'effet de la concentration en substrat est plus compliqué. L'augmentation de la fluorescence augmente avec la concentration en substrat de manière non linéaire et ne répond donc pas à un profil de type Michaelis-Menten (**Figure 64 B.**). Cela s'explique par la structure du substrat. La gélatine marquée par un grand nombre de molécules de fluorescéine est peu fluorescente car les molécules de fluorescéine absorbent la lumière excitatrice que devrait recevoir leurs voisines. Lorsque la collagénase dégrade le substrat, des morceaux peptidiques portant des molécules de fluorescéine sont relargués en solution, ce qui génère une augmentation de la fluorescence. Mais ce relarguage diminue en même temps le nombre de molécules portées par la gélatine, ce qui diminue l'effet d'absorption par les molécules voisines et a pour effet d'accroître encore un peu plus le niveau de fluorescence. Au final, l'augmentation de fluorescence observée est due à la combinaison de ces deux facteurs.

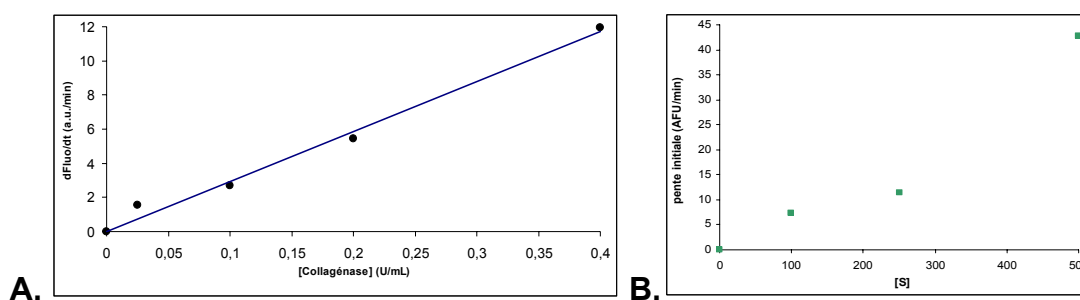


Figure 64 : Influence des concentrations en enzyme et en substrat sur la vitesse de réaction

A. Influence de la concentration (en U/mL) en enzyme ($C_{\text{substrat}} = 100 \mu\text{g/mL}$). **B.** Influence de la concentration en substrat (en µg/mL) ($C_{\text{enzyme}} = 0,1 \text{ U/mL}$).

L'effet d'une dose croissante d'1-10-orthophénantroline (inhibiteur de la collagénase) sur la protéolyse a également été mesuré, indiquant une diminution de l'activité de 50% pour une concentration de 50 µM (**Figure 65**).

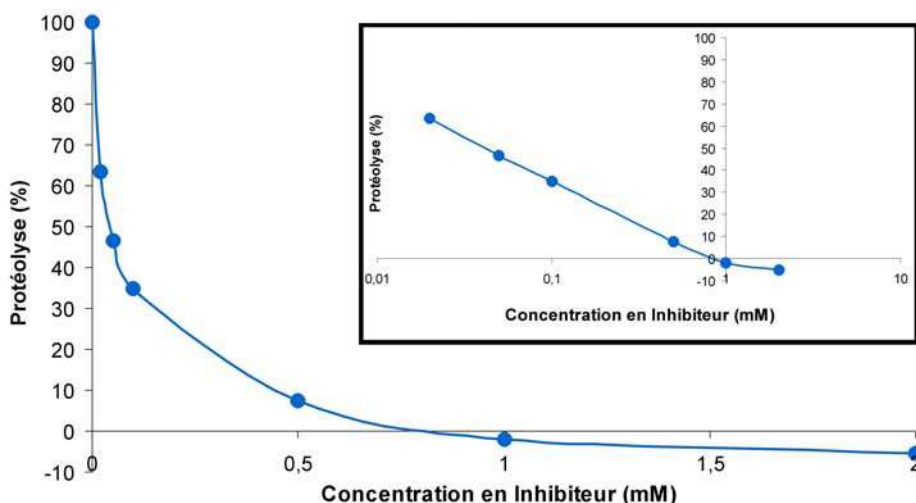


Figure 65 : Influence de la concentration en inhibiteur (1,10-orthophénantroline).
(Echelle logarithmique en encart.)

Enfin, une comparaison, dans les mêmes conditions, des vitesses de réaction obtenues sur puce (la lecture étant réalisée avec un scanner) et en cuve (la lecture étant réalisée avec un fluorimètre) indique une diminution, d'un facteur deux, de la vitesse de réaction lorsqu'elle est réalisée sur puce (**Figure 66**). Cela peut s'expliquer par une adsorption non spécifique de l'enzyme ou du substrat sur le verre du plot hydrophile.

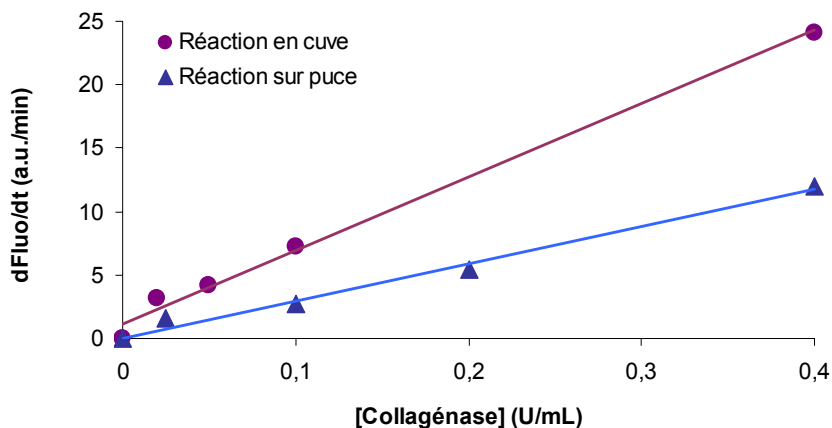


Figure 66 : Comparaison de la protéolyse sur puce et en cuve.

Réaction à 37°C avec une concentration en substrat protéique égale à 100 µg/mL. Réaction effectuées dans des cuves de 400 µL (disques violets) ou dans des microgouttes sur puce (triangles bleu).

Dans ce cas précis, les propriétés intrinsèques du substrat protéique empêchent de déterminer simplement les paramètres cinétiques. Un ralentissement notable de la vitesse de protéolyse a été observé sur puce, par rapport aux réactions en cuve. Probablement liée à des phénomènes d'adsorption non spécifique de l'enzyme ou du substrat, cette différence de vitesse reste acceptable, dans le sens où elle n'empêche pas l'étude de la réaction enzymatique et l'étude de son inhibition. Cet outil et les méthodes associées ont d'ailleurs fait l'objet d'un dépôt de brevet ²⁵². Ainsi, cette série d'expériences a permis de montrer que l'outil (constitué de l'éjecteur piézo-électrique et du tensioarray) développé est très efficace pour le suivi de centaines de réactions de protéolyse simultanément, avec dans chaque goutte, des conditions de réaction particulières (substrat, enzyme, concentrations, tampons, inhibiteurs, etc.), et en particulier a démontré que l'on peut quantifier l'effet d'un inhibiteur en fonction de sa concentration.

4) ACTIVITE DE LA PROTEASE NS3 DU VIRUS DE L'HEPATITE C

Le potentiel de notre outil pour l'étude des protéases ayant été démontré, son application à un problème plus complexe peut être envisagé. Dans l'optique de réaliser un criblage avec une enzyme présentant un intérêt thérapeutique, nous avons voulu appliquer cet outil à l'étude de la protéase NS3. La première étape a consisté à rechercher un substrat fluorogène révélant l'activité de cette protéase. Une fois le substrat trouvé, les paramètres cinétiques de la réaction enzymatique sur puce correspondante ont été déterminés. Enfin les conditions optimales pour un test enzymatique ont été recherchées. De nombreuses méthodes pour visualiser l'activité enzymatique avec des substrats chromogènes ou fluorogènes sont apparues récemment ²⁵³. Pour les protéases, les peptides dont la lumière émise par le fluorophore est absorbée par un chromophore interne (« internally quenched fluorescence ») sont couramment employés. De tels substrats fluorogènes, conçus pour s'adapter au mieux au site catalytique sont optimaux pour étudier la spécificité du substrat d'une protéase donnée ²⁵⁴. Toutefois, les petits substrats moins spécifiques sont souvent utiles pour la seule détection de l'activité catalytique des protéases ²⁵⁵. Pour la détection de l'activité enzymatique, le rapport signal sur bruit (S/N) est un facteur essentiel, défini comme le rapport entre la valeur correspondant à une activité de 100% (enzyme et substrat sans inhibiteur) et celle correspondant à une activité de 0% (substrat sans enzyme). On considère habituellement que sa valeur doit être supérieure à trois pour garantir une

détection acceptable. Dans le cas d'un criblage, le rapport signal sur bruit exigé est supérieur à celui requis pour une détection acceptable ($S/N=3$). Pour les criblages haut débit, on utilise généralement une valeur supérieure à 8 pour distinguer clairement l'inhibition totale, partielle ou nulle²⁵⁶. Pour la détection de l'activité de NS3, nous avons tout d'abord envisagé d'utiliser des substrats peptidiques en utilisant les fluorophores dérivés de la fluorescéine développés pour l'étude de la papaïne sur tenseoarrays, puis des petits substrats dérivés de la fluorescéine, et enfin nous nous sommes revenus vers des substrats peptidiques commerciaux plus longs.

4.1) Recherche d'un substrat fluorogène adapté

Les tentatives d'utilisation des fluorophores (validés avec la protéolyse de la papaïne) pour la synthèse de substrats peptidiques longs spécifique de NS3 se sont avérées infructueuses, notamment à cause de problèmes de solubilité due à l'hydrophobicité du substrat. Nous avons alors décidé d'essayer d'utiliser des petits substrats peptidiques.

4.1.1) Substrats courts

Les substrats courts comportent un ou deux acides aminés liés à des fluorophores comme l' amino-4-méthyl coumarine AMC²⁵⁷, la 7-amino-4-carbamoylméthyl coumarine ACC²¹, la rhodamine 110²⁵⁸ ou le crésyl violet²⁵⁹. Le substrat de structure Z-F-R-AMC est le plus largement utilisé pour les protéases à cystéine de la famille de papaïne, démontrant l'importance de ces petits substrats.

L'activité estérase des protéases à sérine et à cystéine est connue de longue date²⁵⁹. Grâce à une transestérification rapide conduisant à l'intermédiaire acyl-enzyme, l'hydrolyse des liaisons esters insérées dans une séquence peptidique par ces enzymes se déroule plusieurs dizaines de fois plus vite que l'hydrolyse enzymatique des liaisons peptidiques correspondantes²⁶⁰. Les esters peptidiques sont donc des structures prometteuses pour fournir des substrats fluorogènes.

Des substrats ont été synthétisés au laboratoire par Olga Burchak avec pour formule générale PGAA-MFE, où PG signifie groupe protecteur, AA veut dire acide aminé et MFE est l'acronyme de 3'-MéthylEther Fluorescéine (**Figure 67**). Stabilisés dans la forme spiro-lactone, ils ne sont pas fluorescents. Les protéases sont supposées «déverrouiller» le fluorophore en hydrolysant la liaison ester entre AA et MFE, libérant ainsi la forme

quinoïde ouverte fluorescente (**Figure 67**, flèche verte). En plus, trois composés ne comportant pas d'acides aminés ont été prévus comme contrôles, leur partie PGAA étant remplacée par un groupe acétyle, tosyl, ou para-nitrobenzènesulfonyle.

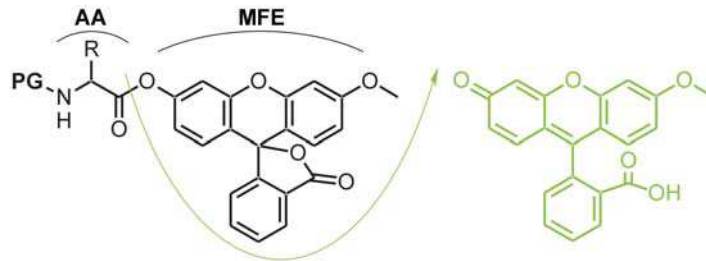


Figure 67 : Représentation des substrats esters fluorogènes et du produit de protéolyse.

Nous avons voulu savoir si le substrat qui présentait les meilleurs paramètres cinétiques avec la cathepsine B, Boc-Ala-MFE (Voir ²⁶¹ ou **Annexe IV** pour plus de détails) pouvait être utilisé pour détecter des protéases autres que la cathepsine B. Une autre protéase à cystéine, la papaïne (EC 3.4.22.2), et deux protéases à sérine, la chymotrypsine (EC 3.4.21.1) et surtout, **la protéase virale NS3** ²⁶², ont été testées. La protéolyse était analysée à l'aide de Boc-Ala-MFE (5 μ M) dans des tampons appropriés. La cathepsine B et les protéases à sérine ont présenté des vitesses de clivage relativement proches, tandis que la papaïne exhibe une vitesse d'hydrolyse considérablement plus élevée (**Figure 69a**). En revanche, pour une concentration 500 nM de NS3, l'augmentation spécifique de la fluorescence observée pour les substrats esters de MFE était juste au-dessus de la limite de détection (S/N = 3).

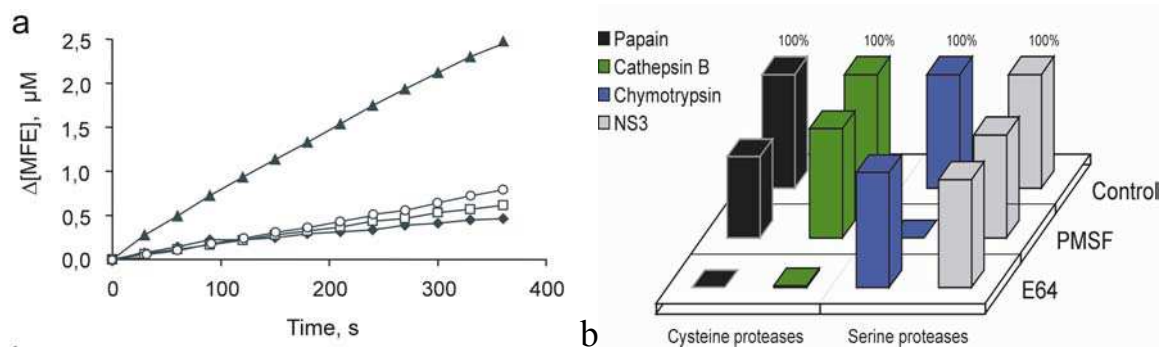


Figure 69 : Clivage d'un substrat fluorogène par des protéases à cystéine et à sérine.

(a) Clivage de Boc-Ala-MFE 5 μ M par la papaïne 12,5 nM, $V_0 = 6,78$ nM/s (\blacktriangle); la chymotrypsine 250 nM, $V_0 = 2,23$ nM/s (\circ); la cathepsine B 250 nM, $V_0 = 1,71$ nM/s (\square); et NS3 500 nM, $V_0 = 1,19$ nM/s (\blacklozenge). Les valeurs sont calculées en faisant la différence de la vitesse d'hydrolyse du substrat avec et sans protéase. Les valeurs sont des moyennes de deux ou trois expériences, avec un CV moyen inférieur à 0,2. (b) Effet d'inhibition spécifique sur les protéases à sérine et à cystéine. Noter l'absence d'effet sur NS3.

Ainsi, ces substrats présentent sans doute un intérêt pour la détection de diverses protéases à sérine et à cystéine. Malheureusement, certainement à cause des particularités catalytiques de NS3, la sensibilité exhibée par cette protéase virale avec le substrat universel Boc-Ala-MFE est trop faible pour espérer développer un test enzymatique. Ces substrats sont néanmoins bien adaptés pour le test d'inhibiteurs, car ils ont permis d'observer l'inhibition spécifique des protéases à sérine (avec PMSF, PhenylMethylSulfonyl Fluoride) et des protéases à cystéine (avec l'inhibiteur E-64) (**Figure 69b**). Ce test illustre aussi la difficulté d'inhiber la protéase NS3, puisqu'elle est pratiquement insensible aux inhibiteurs testés.

4.1.2) Substrats peptidiques commerciaux

L'impossibilité d'obtenir des rapports signal/bruit suffisamment élevés avec les substrats courts, nous a conduit à revenir vers les substrats longs, plus précisément ceux disponibles dans le commerce. Les peptides spécifiques de la protéase NS3 sont dérivés de la séquence d'acides aminés de la jonction NS5A/B de la polyprotéine exprimée à partir de l'ARN monobrin du virus de l'hépatite C : **NH₂-Glu-Ala-Gly-Asp-Asp-Ile-Val-Pro-Cys↓Ser-Met-Ser-Tyr-Thr-Trp-Thr-Gly-Ala-COOH**, le clivage ayant lieu entre les résidus Cys et Ser ²⁶³. Plusieurs peptides dérivés de cette séquence ont été employés. Parmi eux, un peptide de type P'1-chromophore dérivé de la partie P : **Ac-Asp-Thr-Glu-Asp-Val-Val-Pro-Nva-4-PAP** (Nva = N-norvaline, PAP = PhenylAzoPhenyl ester) a été synthétisé pour des tests enzymatiques spectrophotométriques ²⁶⁴ et utilisé pour tester des inhibiteurs macrocycliques de NS3 ²⁶⁵. Un peptide à chromophore interne utilisant le couple fluorophore-chromophore MCA-Dnp (MCA = (7-méthoxycoumarin-4-yl) acetyl et Dnp = 2,4-dinitrophénol) a été publié : **MCA-Asp-Asp-Ile-Val-Pro-Cys-Ser-Met-Lys(Dnp)-Arg-Arg** ²⁶⁶, mais les substrats peptidiques fluorogènes à chromophore interne commerciaux pour la protéase NS3 sont tous inspirés de celui décrit par Taliani *et al.* ²⁶⁷ (**Figure 70**). Ce dernier, fondé sur le couple fluorophore-chromophore EDANS-DABCYL (**Figure 70**), est celui qui a montré les meilleurs paramètres cinétiques (**Tableau 18**). En effet, la coupure enzymatique ne se fait pas au niveau d'une liaison peptidique mais au niveau d'une liaison ester (**Figure 70**, liaison encadrée), ce qui permet, grâce à une transestérification rapide conduisant à l'intermédiaire acyl-enzyme, une protéolyse plus rapide ²⁶⁰.

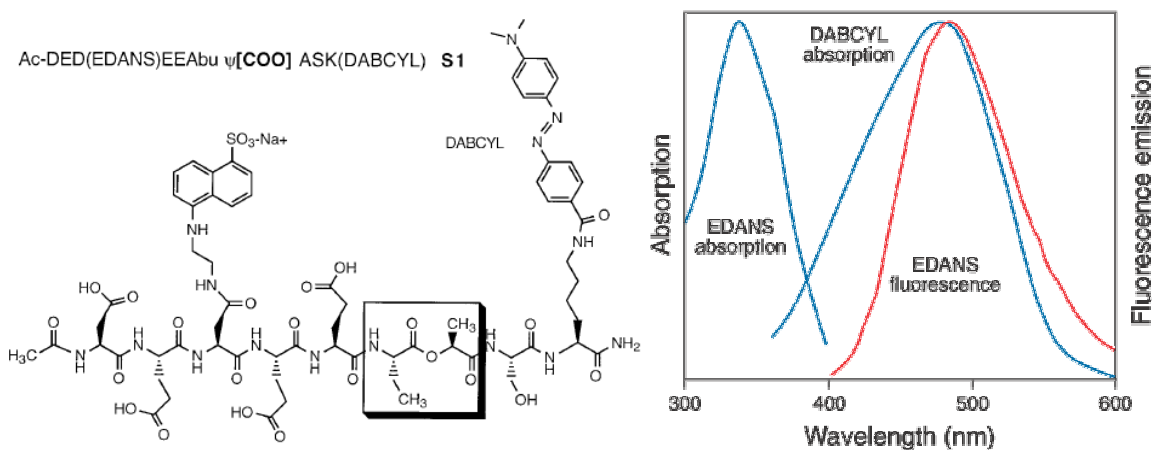


Figure 70 : Structure du substrat fluorogène de Taliani *et al*²⁶⁷.

EDANS = 5-((2-aminoethyl)amino)naphthalene-1- sulfonic acid, sodium salt

DABCYL = 4-(dimethylamino)phenylazobenzoic acid

Un substrat exactement identique à celui de Taliani est commercialisé par la société allemande Bachem : **Ac-Asp-Glu-Asp(EDANS)-Glu-Glu-Abu-L-lactoyl-Ser-Lys(DABCYL)-NH₂**. Les tests au fluorimètre ont été réalisés avec une excitation à 355 nm et une lecture à 495 nm. Pour une concentration en substrat de 2 μM et une concentration en enzyme de 20 nM environ, les courbes obtenues montrent que l'on peut aisément détecter la protéolyse de notre enzyme, avec un bon rapport signal sur bruit $S/N = 84/11,2 = 7,5$ (Figure 71). De plus le clivage du substrat dans les microgouttes a aussi été observé (Figure 72).

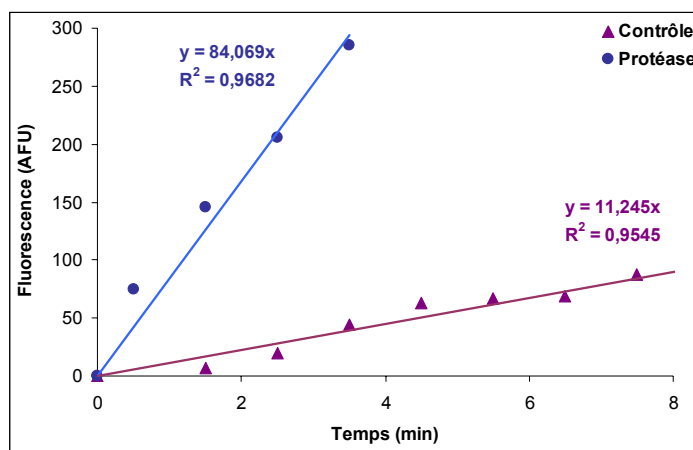


Figure 71 : Cinétique d'hydrolyse avec et sans protéase (substrat Bachem).

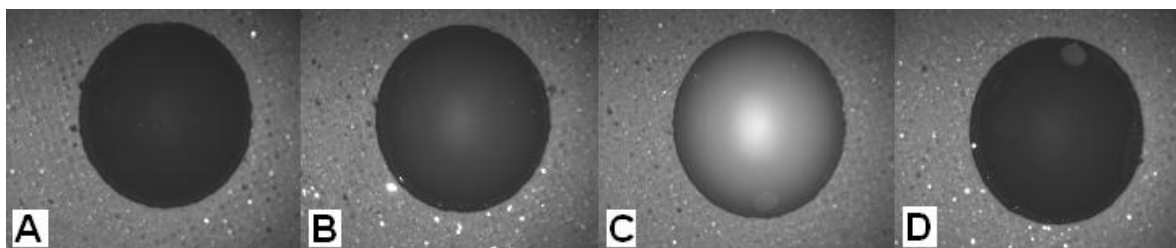


Figure 72 : Mesure de la fluorescence du substrat de la société Bachem en microgouttes.

La fluorescence est observée avec un microscope à fluorescence ($\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$ & $\lambda_{em} = 460 \text{ nm}$) : A. Tampon seul. B. Tampon et substrat. C. Tampon, substrat et NS3. D. Tampon et NS3.

Malheureusement, le fait de travailler avec ce substrat nous obligerait à faire toutes nos acquisitions avec le microscope à fluorescence, car le scanner dont nous disposons ne permet pas d'excitation en-dessous de 488 nm. Cette solution n'est pas aisément applicable dans le cas d'un criblage en raison du processus d'acquisition qui est long. De plus, des phénomènes d'absorption parasite de la part de certains pharmacophores sont très probables dans ces gammes de longueur d'onde.

La société Anaspec a récemment ajouté à son catalogue (fin de l'année 2005) trois peptides fluorogènes dont la séquence peptidique est identique, mais avec des couples fluorophores permettant de travailler à différentes longueurs d'ondes. L'un d'entre eux correspondait à nos besoins, le couple fluorophore-chromophore 5-FAM-QXL520 : **Ac-Asp-Glu-Dap(QXL520)-Glu-Glu-Abu- ψ -[COO]-Ala-Ser-Cys(5-FAMsp)-NH₂**. 5-FAM étant la 5-carboxyfluorescéine et QXLTM 520 un colorant qui absorbe la lumière émise par 5-FAM (**Figure 73**).

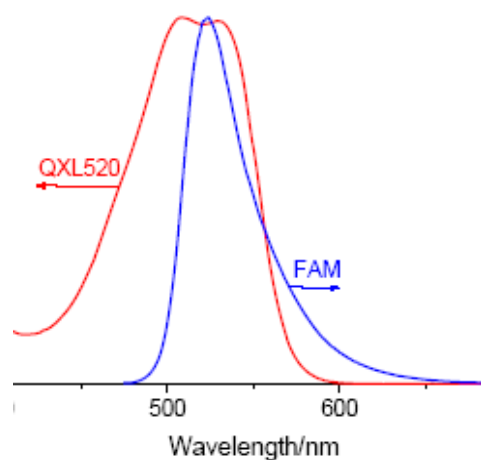


Figure 73 : Recouvrement des spectres d'émission de 5-FAM et d'absorption de QXLTM 520.

Ce substrat fluorogène présente l'avantage d'émettre sa fluorescence à une longueur d'onde suffisamment élevée pour se situer hors de la zone d'absorption de la majorité des pharmacophores classiques. De plus, les paramètres cinétiques de ce substrat sont meilleurs que ceux obtenus avec le substrat commercialisé par la société Bachem (**Tableau 18**).

Substrat	EDANS-DABCYL	5-FAM-QXL520
Fabriquant	Bachem	Anaspec
K_m (μM)	69,4	3,2
K_{cat} (min^{-1})	16,5	2,7
K_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	3961	14127

Tableau 18 : Comparaison des paramètres cinétiques de différents substrats ²⁶⁸.

Les tests au fluorimètre (**Figure 74**) montrent que le rapport signal sur bruit ($S/N = 0,86/0,08 = 10,8$) est bien meilleur qu'avec le substrat Bachem ($S/N = 7,5$), pour une concentration en enzyme trois fois inférieure (7 nM au lieu de 20 nM).

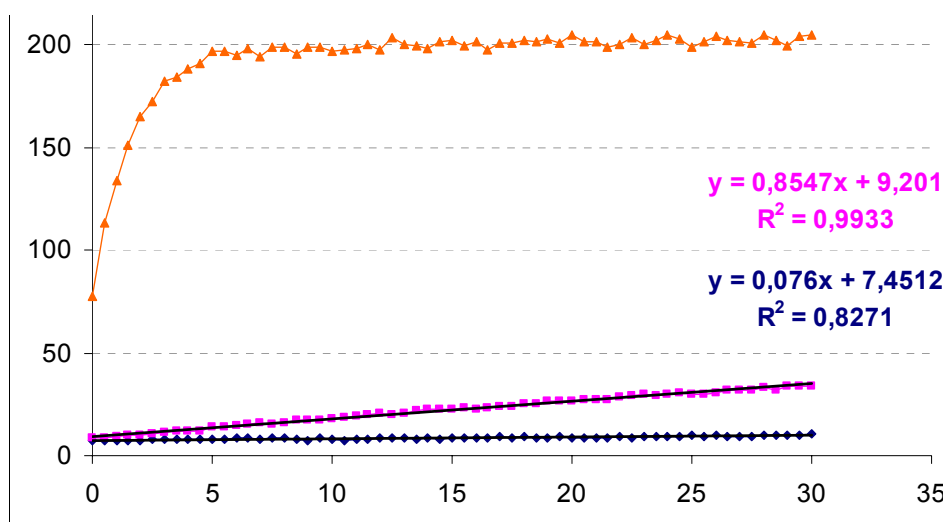


Figure 74 : Mesure de la fluorescence en fonction du temps avec le substrat Anaspec.

Les mesures sont réalisées en cuve à 37°C. L'hydrolyse du substrat est très faible (en bleu), tandis que le clivage enzymatique est rapide même avec une faible concentration en enzyme (7nM, en rose). La courbe orange correspond à une concentration 70 nM en enzyme, et l'intégralité du substrat est consommée en 10 minutes.

Les tests réalisés sur puce montrent qu'on peut suivre la réaction sur puce mais aussi que le rapport signal/bruit diminue de façon notable par rapport à la réaction en cuve. La diminution du rapport signal/bruit est d'autant plus grande que les gouttes sont petites. En effet la réaction est plus rapide sur les tensioarrays Prolabo que sur les tensioarrays

Memscap. Cela suggère que ce ralentissement peut être dû à une adsorption non spécifique de l'enzyme ou du substrat sur la surface des plots hydrophiles.

En conclusion, ce dernier substrat (Anaspec) est le mieux adapté dans l'optique d'un criblage sur la protéase NS3, aussi bien au niveau de la longueur d'onde de la fluorescence qu'en ce qui concerne la sensibilité. Le rapport signal sur bruit est moindre sur puce (**entre 2 et 3**) qu'en cuve (**>10**). L'augmentation de la concentration d'enzyme de 7 nM à 50 nM, a permis d'augmenter ce rapport S/N jusqu'à 6 lors des expériences de criblage.

4.2) Détermination des paramètres cinétiques sur puce

Ayant décidé du substrat le mieux adapté, il était alors nécessaire de caractériser les paramètres cinétiques de son clivage par la protéase NS3/4A. Ils ont été obtenus sur puce en utilisant les possibilités de haut débit des puces pour varier les conditions de concentration en enzyme et en substrat dans les gouttes. L'augmentation de la fluorescence a été observée au cours du temps pour diverses concentrations en substrat (**Figure 75 A**), comme l'indique le tracé de la concentration en fluorophore libéré au cours du temps pour toutes les concentrations en substrat (**Figure 75 B**). Une régression non linéaire indique que les vitesses initiales répondent précisément à l'équation de Michaelis-Menten (**Figure 75 C**), et permet de déterminer les paramètres cinétiques : la constante d'équilibre K_m est de 14 μM , la constante catalytique k_{cat} de 3,1 min^{-1} , ce qui donne une constante de spécificité de 3410 $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. La valeurs de k_{cat} obtenues au fluorimètre par les chercheurs d'Anaspec sont en adéquation (2,7 min^{-1}), mais la valeur de K_m est plus faible (3,2 μM), ce qui porte la constante de spécificité à 14 130 $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ²⁶⁸. Ils ont toutefois utilisés une construction de NS3 différente.

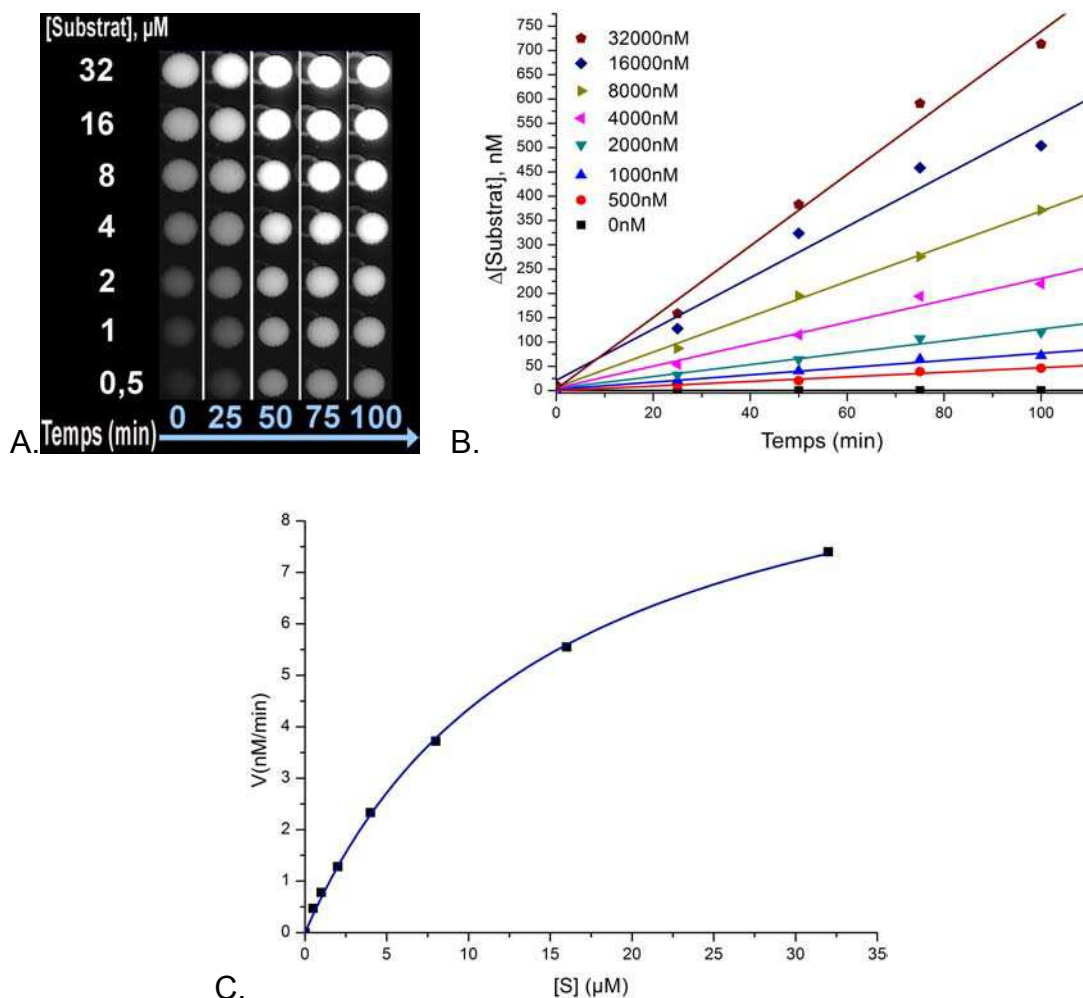


Figure 75 : Détermination des paramètres cinétiques du substrat sélectionné pour NS3.

A. Images prises à différents temps de plots contenant différentes concentrations en substrat ($[\text{NS3}] = 5 \text{ nM}$).
 B. Evolution linéaire de la fluorescence en fonction du temps pour les différentes concentrations en substrat.
 C. Vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat et régression avec l'équation de Michaelis-Menten (en bleu). La fluorescence mesurée a été convertie en concentration de substrat clivé à l'aide d'une courbe étalon (celle présentée dans la partie III-1 pour 5-FAM).

4.3) Conditions optimisées pour le test enzymatique

Le tampon pour la réaction enzymatique Enzolyte est fourni avec le kit contenant le substrat Anaspec, sa composition est probablement très proche de 50mM Tris pH 7,5; 1% CHAPS; 15% glycérol²⁶⁸. C'est ce tampon que nous avons utilisé pour les réactions enzymatiques sur puce. Pour être dans les bonnes conditions pour un test enzymatique, le mieux est de se situer dans une gamme de concentration et de temps où la variation de la fluorescence dans le temps est linéaire. De plus, la concentration en substrat doit être proche de la valeur de K_m pour assurer une vitesse de réaction acceptable. Enfin, la concentration en enzyme doit être très inférieure à la concentration en substrat et à la

concentration en inhibiteur, pour éviter que ceux-ci soient consommés en intégralité. L'ensemble de ces conditions et les tests que nous avons réalisés nous ont amené à définir comme paramètres optimaux de notre réaction biochimique une concentration en enzyme de 50 nM, une concentration en substrat de 15 μ M, et un temps d'incubation de deux heures. Le rapport signal/bruit obtenu avec ces conditions variait entre 5 et 6, ce qui est acceptable pour réaliser le criblage d'inhibiteurs.

5) CONCLUSION

La protéolyse homogène sur tensioarray a été validée avec succès. L'utilisation de trois protéases de catégories différentes : protéase à cystéine, métalloprotéase, et protéase à sérine ultraspécifique, ainsi que le recours à trois types de substrats fluorogènes différents : substrat peptidique fixé sur des billes, substrat protéique et substrat peptidique en solution, démontrent l'universalité de notre outil technologique. Un ralentissement notable de la vitesse de la réaction a toutefois été observé à plusieurs reprises, probablement à cause de phénomènes d'adsorption non spécifique.

Nous avons développé une méthode originale et facile à mettre en œuvre pour l'analyse du clivage de substrats fluorogène sur billes. Sensible et automatisable, elle est donc particulièrement intéressante du point de vue du criblage à haut débit. De plus, le lien entre la concentration et l'effet d'un inhibiteur générique des métalloprotéases a été mis en évidence sur tensioarray. Enfin, un substrat adapté au criblage sur puce de la protéase NS3 a été identifié, ses paramètres cinétiques caractérisés, et les conditions optimales pour le criblage d'inhibiteurs déterminés.

**III-4 : SYNTHÈSE & CRIBLAGE.
RECHERCHE D'INHIBITEURS DE NS3.**

1) INTRODUCTION

Le but du criblage d'inhibiteur était double. D'une part, montrer qu'il était possible de combiner, de manière séquentielle, la formation *in situ* de la banque d'hydrazones et le test enzymatique développé pour NS3. D'autre part, nous espérons identifier des molécules présentant un potentiel comme agents antiviraux.

Après avoir expliqué la stratégie mise en place, nous décrivons le déroulement d'une expérience type de criblage, puis nous en viendrons aux résultats du criblage d'inhibiteurs réalisé sur NS3.

2) STRATEGIE : DECOUPAGE DE LA SYNTHOTHEQUE & DECONVOLUTION

L'ensemble des résultats nécessaires à la mise en place du criblage n'a été réuni qu'au cours de la troisième année de thèse. Nous avons donc opté pour une approche par déconvolutions successives, mieux adaptée pour aboutir rapidement à des résultats. En effet, un rapide calcul montre que pour tester les 20100 mélanges possibles en dupliquats, en réservant 20% des plots à des contrôles, le nombre total de microgouttes nécessaire pour tester la synthothèque complète est d'environ 50 000. Cela correspond à environ 60 tensioarrays de 8 blocs. Réaliser tous ces mélanges en l'espace de quelques mois n'était pas envisageable, compte tenu des délais de la thèse et du débit autorisé par notre technologie qui, bien qu'adaptée à notre approche, est encore jeune et n'affiche pas une fiabilité de 100%.

Ainsi, nous nous sommes adaptés en préférant une approche par déconvolutions successives. Pour cela, nous avons divisé la synthothèque de 200 hydrazides en 20 groupes de dix hydrazides chacun, en essayant au maximum de mettre dans un même groupe les éléments de structures chimiques proches (**Annexe II**). Les expériences à réaliser avec ces groupes sont les suivantes :

- **Recherche des meilleurs groupes** (au sens de l'inhibition). Cela consiste à croiser deux à deux les 20 groupes entre eux, et à sélectionner les groupes qui inhibent le mieux la protéolyse.
- **Recherche des meilleurs synthons des meilleurs groupes** (au sens de l'inhibition). Cela consiste à croiser deux à deux, pour chaque groupe, les 10 synthons d'un des

meilleurs groupes avec les 20 groupes comportant 10 hydrazides. Les synthons qui conduisent à l'inhibition la plus importante avec le plus grand nombre possible de groupes sont sélectionnés pour l'étape suivante.

- **Recherche des meilleurs synthons parmi les autres groupes** (au sens de l'inhibition). Les meilleurs synthons des meilleurs groupes sont croisés deux à deux avec chacun des membres de la synthothèque au complet. A l'issue de cette étape, un seuil de concentration est choisi de manière à sélectionner un petit groupe de synthons parmi le reste de la banque, petit groupe qui viendra s'ajouter aux meilleurs synthons des meilleurs groupes identifiés lors de la précédente étape.

Une fois ces 3 étapes réalisées, nous aurons **suffisamment réduit le nombre de synthons pour pouvoir les croiser entre eux**, et espérer découvrir au moins un couple de synthons inhibant fortement la protéase NS3. Cette approche par déconvolutions successives n'est pas idéale, à cause du risque augmenté de faux positifs (effet coopératif de certains membres d'un groupe) et de faux négatifs (effet perturbateur de certains membres d'un groupe) mais c'était *a priori* la seule méthode permettant d'atteindre rapidement nos objectifs.

3) CRIBLAGE : DEROULEMENT D'UNE EXPERIENCE TYPE

Pour les différents croisements envisagés, la procédure employée est toujours la même. Une expérience type comporte quatre étapes : tout d'abord la conception du plan de dépôt, ensuite la formation *in situ* de la banque, puis la réalisation du test enzymatique et enfin la lecture de la fluorescence et l'analyse quantitative des résultats.

3.1) Plan de dépôt

Le plan de dépôt est toujours un croisement entre deux séries de composés hydrazides. Après la formation *in situ* de la banque, l'enzyme et le substrat sont ajoutés par la suite dans toutes les microgouttes contenant des mélanges d'hydrazones. De plus, un plan de dépôt comporte un contrôle positif : enzyme + substrat, un contrôle négatif : absence d'enzyme, et des contrôles d'inhibition : enzyme + inhibiteur peptidique ($IC_{50} \sim 1\mu M$), enzyme + inhibiteur BILN 2061 (**Figure 76**). L'inhibiteur BILN 2061, de la société Boehringer Ingelheim, est un inhibiteur macrocyclique de NS3 très efficace (IC_{50} d'environ 1 nM).

tensioarrays du réfrigérateur et de déposer la solution eau/DMSO (1:1) dans tous leurs plots.

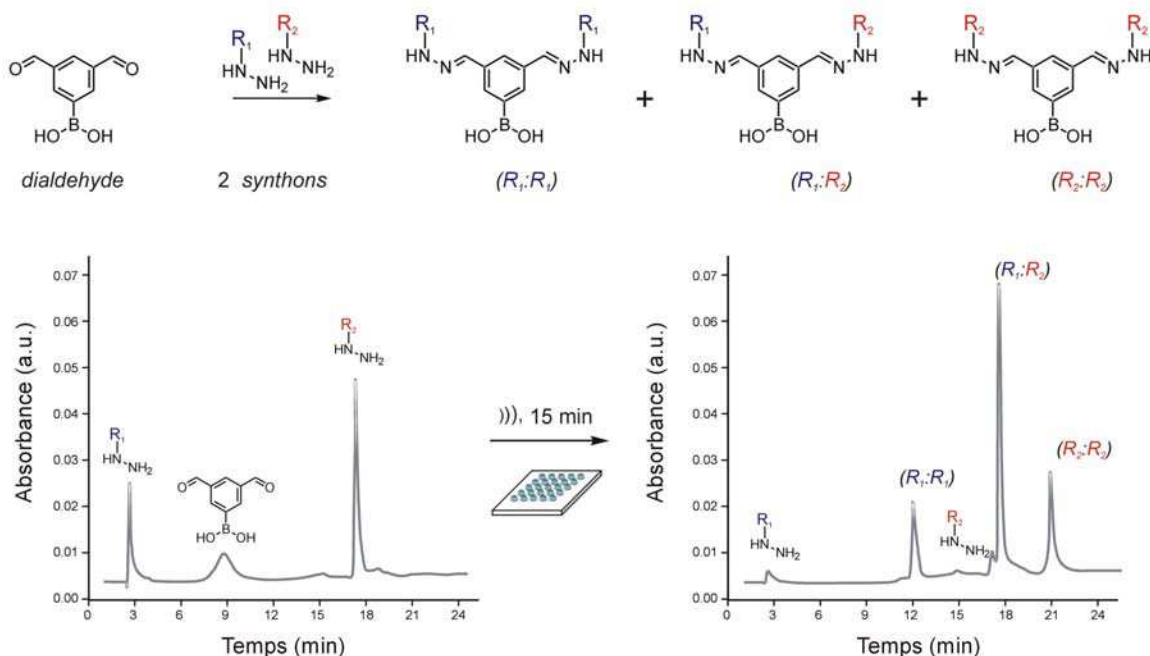


Figure 77 : Méthodologie d'assemblage de la banque sur puce.

A gauche des flèches: Les réactifs, un dialdéhyde et deux synthons hydrazides, sont déposés sur le tensioarray. La synthèse est ensuite accélérée par chauffage micro-ondes, et conduit (à droite des flèches) à un mélange de dihydrazones dans les microgouttes, dans un ratio environ 1:2:1.

3.3) Test enzymatique

Une fois le tensioarray contenant la banque chimique (fraîchement préparée ou sortie du réfrigérateur) positionné sur le support refroidi (juste au-dessus du point de rosée), il suffit d'ajouter le tampon de réaction, l'enzyme et le substrat.

Lors de l'ajout du tampon, on se retrouve face à une limitation majeure des éjecteurs piézoélectriques, à savoir l'impossibilité de prélever de grandes quantités de produit à déposer. Cet inconvénient augmente le nombre d'opérations effectuées par le robot de dispense lors du dépôt des solutions sur le tensioarray. De plus, la diffusion dans la pipette nous oblige à prélever deux fois plus de solution que ce que l'on veut réellement dispenser (cf. partie III-1). Ainsi, l'ajout du tampon est l'étape la plus longue, car il est nécessaire de prélever 8 fois le tampon (1 fois par bloc) pour ajouter 200 gouttes dans chaque plot du tensioarray.

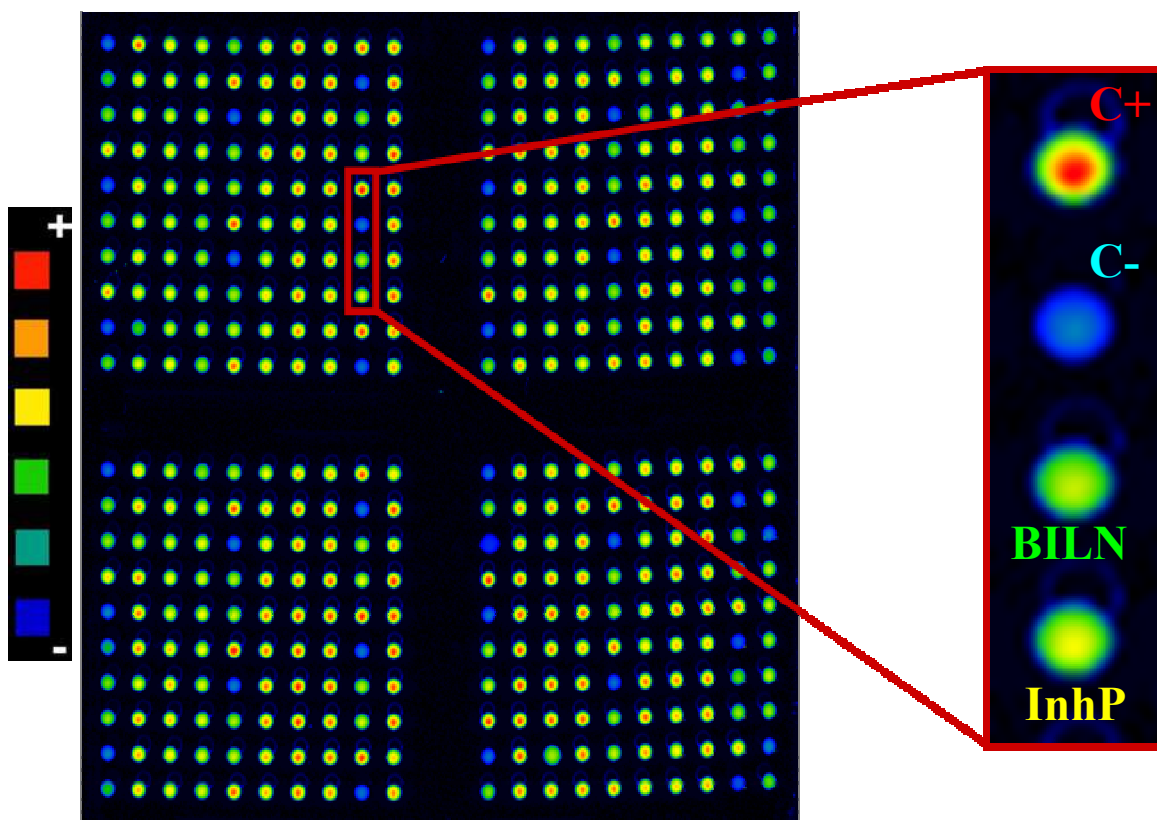


Figure 79 : Image typique d'un tensioarray après un criblage de candidats inhibiteurs.

L'image a été obtenue avec un scanner de fluorescence et les couleurs correspondent à une échelle dite «rainbow», qui s'étend progressivement du bleu foncé au rouge en passant par le turquoise, puis le vert, puis le jaune, puis l'orange (encart à gauche). L'agrandissement montre les différents contrôles, avec de haut en bas : contrôle positif (NS3 et substrat), contrôle négatif (substrat sans NS3), contrôle avec un inhibiteur peptidique et contrôle avec BILN 2061. La répartition des contrôles sur le tensioarray est faite suivant le plan de dépôt de la **figure 76**. Noter que les intensités varient dans les plots qui abritent les composés de la banque chimique formée *in situ*.

Les images obtenues sont ensuite traitées avec un logiciel d'analyse d'images (GenepixPro) qui permet de quantifier la fluorescence dans chaque plot. La fluorescence est moyennée sur toute la surface du plot. Le résultat d'une telle analyse est un tableau Excel de 800 lignes (une ligne par plot) contenant les valeurs d'une multitude de paramètres, dont seuls deux nous intéressent : la position du plot (Bloc i ($1 \leq i \leq 8$), ligne j ($1 \leq j \leq 10$), colonne k ($1 \leq k \leq 10$)) et la fluorescence moyenne du plot. Le meilleur moyen de traiter un tel tableau est d'utiliser la fonction «tableaux croisés dynamiques» d'Excel, qui permet de changer l'apparence du tableau en déplaçant les paramètres à la souris, en cochant certains paramètres d'une liste, et aussi de calculer des moyennes, des écarts-types, des différences par rapport à une référence, etc. De nombreux graphiques peuvent ainsi être générés en un temps raisonnable, même avec un grand nombre de données. Ces graphiques permettent de

comparer les valeurs de la fluorescence, ce qui donne une bonne indication des inhibitions relatives, et permet donc d'identifier des inhibiteurs. Cependant, une telle approche n'est pas correcte selon la théorie des statistiques. En effet, lorsque que l'on compare des moyennes, dès qu'il y en a plus de deux, il convient de prendre en compte la variabilité globale de l'expérience. Sachant cela nous avons aussi utilisé un traitement statistique plus avancé.

Pour ce traitement plus avancé, nous avons eu recours à l'analyse de la variance à un facteur. Cette méthode, qui généralise les tests de comparaison de deux moyennes, est la seule qui convienne à la comparaison de trois moyennes ou plus. Pour la comparaison des moyennes deux à deux, nous avons eu recours au test de Tukey, et pour la comparaison de l'ensemble des valeurs à une valeur de référence, au test de Dunnett. Ces tests impliquent des calculs particulièrement lourds, qui ont été réalisés avec le logiciel de statistiques Minitab (Voir **Annexe I** pour des exemples de tests de Tukey dans le cas d'une analyse de la variance à deux facteurs). Par exemple, dans le cas d'une comparaison avec le contrôle BILN, les quelques composés qui ne sont pas significativement différents de BILN seront ceux qui présentent un pouvoir inhibiteur élevé.

4) RESULTATS DU CRIBLAGE

4.1) Expériences de croisements

Conformément à la stratégie choisie, les premières expériences ont été réalisées en utilisant des mélanges de dix hydrazides (appartenant à un même groupe) G1, G2, G3, etc. (**Annexe II**). A l'issue de cette première étape, les meilleurs groupes identifiés sont G1, G5, G6, G7, G8, G9 et G12 et ceux qui se distinguent véritablement sont G1, G5 et G6 (**Figure 80**). Le groupe G1 correspond à des hétérocycles, et les groupes G5 et G6 correspondent à des dérivés de 3-aminoimidazo[1,2-a]pyridines portant des substituants hétérocycliques (G5) ou bien des substituants aliphatiques (G6).

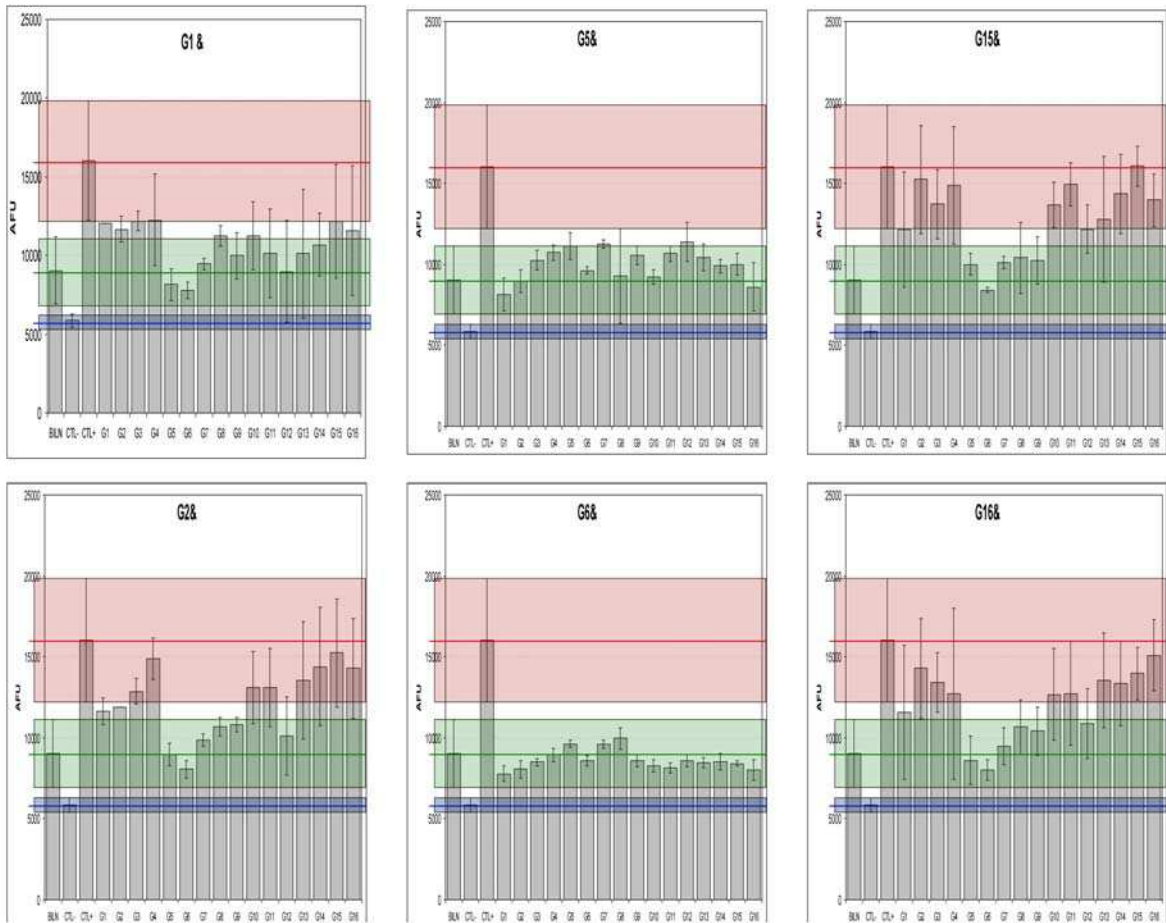


Figure 80 : Croisement de 16 groupes d'hydrazides, analyse graphique.

Chaque graphique correspond au croisement d'un groupe avec les 15 autres et lui-même (*de gauche à droite* : BILN, C-, C+, G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9, G10, G11, G13, G14, G15, G16). La bande rouge correspond à la zone qu'occupent les valeurs prises par le contrôle positif. La bande rouge correspond à la zone qu'occupent les valeurs prises par le contrôle positif. La bande verte correspond à la zone qu'occupent les valeurs prises par le contrôle BILN. La bande bleue correspond à la zone qu'occupent les valeurs prises par le contrôle négatif. On observe bien que G5 et G6 donnent les meilleures inhibitions (« creux » au centre de tous les histogrammes). G1 est le groupe qui donne le meilleur croisement avec G5 et G6.

Chaque hydrazide de ces 3 groupes est ensuite individuellement croisé avec les 20 groupes de la banque, afin de déterminer les meilleurs synthons à l'intérieur de ces groupes G1, G5 et G6. Les tests de Dunett (voir l'exemple pour G5, **Tableau 19**) ont été effectués en comparant toutes les valeurs avec le contrôle négatif.

Niveau Nom	Différence des moyennes	Valeur de T	Valeur ajustée de P
C+	15724	39,0004	0
BILN	5703	13,7027	0
InhP	3373	8,0639	0
G10-H41	5679	4,4344	0,0015
G10-H50	3629	2,3337	0,9775
G10-H42	6029	4,7077	0,0002
G10-H43	5392	3,4673	0,0998
G10-H44	7150	5,5828	0
G10-H45	14273	9,1779	0
G10-H46	3753	2,9308	0,4851
G10-H47	4804	3,7509	0,0348
G10-H48	9734	6,259	0
G10-H49	5452	3,5059	0,0871
G11-H41	5184	4,0477	0,0104
G11-H50	2485	1,9405	1
G11-H42	5251	4,1	0,0083
G11-H43	4217	2,7115	0,7289
G11-H44	5628	4,3949	0,0019
G11-H45	9161	7,1533	0
G11-H46	3859	3,0133	0,399
G11-H47	5791	4,5221	0,0009
G11-H48	6239	4,012	0,0121
G11-H49	4153	3,2426	0,2098
G12-H41	7136	5,5723	0
G12-H50	3072	2,3986	0,9586
G12-H42	4884	3,8139	0,0272
G12-H43	6013	3,8666	0,022
G12-H44	7175	5,6028	0
G12-H45	12719	9,9317	0
G12-H46	3737	2,9178	0,4994
G12-H47	6660	5,2004	0
G12-H48	11834	7,6096	0
G12-H49	6703	5,2337	0
G13-H41	5036	3,9324	0,0168
G13-H50	2310	1,8041	1
G13-H42	6189	4,8329	0
G13-H43	4388	2,8214	0,6073
G13-H44	5463	4,266	0,0038
G13-H45	6423	5,0151	0
G13-H46	3138	2,4503	0,9368
G13-H47	5653	4,4139	0,0017
G13-H48	6653	4,2782	0,0036
G13-H49	3768	2,9425	0,4726
G14-H41	8941	6,9817	0
G14-H50	3146	2,4566	0,9338
G14-H42	5926	4,627	0,0004
G14-H43	6266	4,029	0,0112
G14-H44	9730	7,5973	0
G14-H45	14930	11,6581	0
G14-H46	4046	3,1593	0,269
G14-H47	6643	5,1874	0
G14-H48	11190	7,1955	0
G14-H49	6762	5,2801	0
G15-H41	11819	9,2289	0
G15-H50	3378	2,638	0,8021
G15-H42	7256	5,6655	0
G15-H43	7517	4,8337	0
G15-H44	12145	9,4832	0
G15-H45	15978	12,4759	0
G15-H46	4454	3,4777	0,0962
G15-H47	7658	5,9797	0
G15-H48	15694	10,0917	0
G15-H49	8603	6,7173	0
G16-H41	10079	7,8701	0
G16-H50	3582	2,7968	0,6353
G16-H42	7215	5,634	0
G16-H43	6877	4,4219	0,0017
G16-H44	9889	7,722	0

Niveau Nom	Différence des moyennes	Valeur de T	Valeur ajustée de P
G16-H45	16055	12,5365	0
G16-H46	4726	3,6903	0,0441
G16-H47	7350	5,7389	0
G16-H48	14775	9,5004	0
G16-H49	8212	6,4123	0
G17-H41	10496	8,1957	0
G17-H50	3566	2,7843	0,6491
G17-H42	6984	5,4534	0
G17-H43	7081	4,5531	0,0006
G17-H44	9473	7,3969	0
G17-H45	17221	13,4467	0
G17-H46	4260	3,3264	0,1607
G17-H47	6763	5,2808	0
G17-H48	15358	9,8756	0
G17-H49	7171	5,9592	0
G18-H41	5390	4,2085	0,0051
G18-H50	2028	1,5834	1
G18-H42	6282	4,9053	0
G18-H43	5638	3,6252	0,0563
G18-H44	7431	5,8027	0
G18-H45	14593	11,3947	0
G18-H46	3577	2,7931	0,6393
G19-H47	6027	3,3262	0,0002
G18-H48	12083	7,7697	0
G18-H49	6204	4,8441	0
G19-H41	4990	3,8964	0,0195
G19-H50	2628	2,0521	0,9996
G19-H42	5617	4,3863	0,002
G19-H43	5167	3,3227	0,1627
G19-H44	6928	5,4097	0
G19-H45	9559	6,1464	0
G19-H46	3455	2,6979	0,7431
G19-H47	5229	4,0833	0,0089
G19-H48	10413	6,8956	0
G19-H49	5219	4,0755	0,0092
G1-H41	1590	1,0223	1
G1-H50	1994	1,2824	1
G1-H43	3815	1,7497	1
G1-H44	3760	1,7244	1
G1-H45	5384	3,4622	0,1016
G1-H46	2716	1,7466	1
G1-H47	3918	1,7969	1
G1-H48	5635	2,5844	0,8492
G1-H49	4442	2,0372	0,9997
G20-H41	5329	4,1611	0,0063
G20-H50	2835	1,8228	1
G20-H42	5097	3,9802	0,0138
G20-H43	5127	3,2966	0,177
G20-H44	6681	5,2168	0
G20-H45	8302	5,3385	0
G20-H46	3183	2,4857	0,9181
G20-H47	5397	4,2145	0,0049
G20-H48	10724	6,8956	0
G20-H49	4425	2,8452	0,5806
G2-H41	4463	2,87	0,5525
G2-H50	2131	1,3705	1
G2-H42	4630	2,1235	0,9986
G2-H43	3728	1,7098	1
G2-H44	1568	0,7191	1
G2-H45	6123	3,9374	0,0165
G2-H46	2019	1,2981	1
G2-H47	3294	1,5107	1
G2-H48	7001	3,2109	0,2309
G2-H49	5200	2,3849	0,9632
G3-H41	3579	2,3016	0,9839
G3-H50	1778	1,3887	1
G3-H42	3462	1,5878	1
G3-H43	2898	1,3291	1

Niveau Nom	Différence des moyennes	Valeur de T	Valeur ajustée de P
G3-H44	4260	1,9538	1
G3-H45	7769	4,9955	0
G3-H46	2620	2,0456	0,9996
G3-H47	5510	4,3025	0,0032
G3-H48	7545	4,8514	0
G3-H49	4656	3,6356	0,0542
G4-H41	3902	2,5089	0,9043
G4-H50	2366	1,8478	1
G4-H42	1899	0,8709	1
G4-H43	3915	1,7955	1
G4-H44	6126	2,8096	0,6209
G4-H45	9288	5,9722	0
G4-H46	2936	2,2926	0,9854
G4-H47	7045	5,5013	0
G4-H48	12736	8,1893	0
G4-H49	6598	5,1523	0
G5-H41	3010	2,3501	0,9735
G5-H50	2291	1,789	1
G5-H42	4491	3,5068	0,0868
G5-H43	3953	2,5417	0,8821
G5-H44	4926	3,8462	0,0239
G5-H45	6173	4,8202	0,0001
G5-H46	3026	2,3626	0,9701
G5-H47	5366	4,19	0,0056
G5-H48	6032	3,8785	0,021
G5-H49	4046	3,1596	0,2688
G6-H41	3573	2,7897	0,6431
G6-H50	2607	2,0357	0,9997
G6-H42	4232	3,3046	0,1725
G6-H43	4109	2,6423	0,7981
G6-H44	4593	3,5867	0,065
G6-H45	5555	4,3373	0,0026
G6-H46	2006	1,5667	1
G6-H47	5427	4,2377	0,0043
G6-H48	5996	3,8557	0,023
G6-H49	3714	2,9004	0,5188
G7-H41	3606	2,816	0,6135
G7-H50	2674	2,0883	0,9992
G7-H42	4302	3,3595	0,1442
G7-H43	4122	2,6507	0,7903
G7-H44	4598	3,5906	0,0641
G7-H45	5813	4,5388	0,0007
G7-H46	2744	2,1424	0,998
G7-H47	5346	4,1744	0,0059
G7-H48	5922	3,8081	0,0278
G7-H49	3981	3,1086	0,3105
G8-H41	4472	3,4922	0,0915
G8-H50	2581	2,0157	0,9998
G8-H42	5036	3,9326	0,0168
G8-H43	3978	2,5581	0,8701
G8-H44	5577	4,3548	0,0024
G8-H45	6082	4,7491	0,0001
G8-H46	3033	2,3684	0,9684
G8-H47	5451	4,2564	0,004
G8-H48	7266	4,672	0,0002
G8-H49	4204	3,2824	0,1852
G9-H41	3194	2,4943	0,9132
G9-H50	2527	1,973	0,9999
G9-H42	4365	3,4082	0,1224
G9-H43	3799	2,4427	0,9404
G9-H44	4900	3,8264	0,0259
G9-H45	4648	3,6291	0,0555
G9-H46	3047	2,3796	0,965
G9-H47	3060	2,3894	0,9617
G9-H48	5463	3,5127	0,085
G9-H49	3691	2,8821	0,5388

Tableau 19 : Test de Dunett pour le croisement de 20 groupes d'hydrazides avec G5.

La sélection des synthons les plus prometteurs a été effectuée avec le test de Dunett, en prenant comme niveau de contrôle le contrôle négatif. Les lignes colorées en jaune (valeur de P supérieure à 0,3) indiquent les composés les plus proches du contrôle négatif, et donc les inhibitions de la réaction les plus fortes. Les composés H46 et H50 sont nettement ceux qui donnent les meilleurs résultats tous groupes confondus. Le groupe G1 conduit à une inhibition élevée avec presque tous les membres de G5.

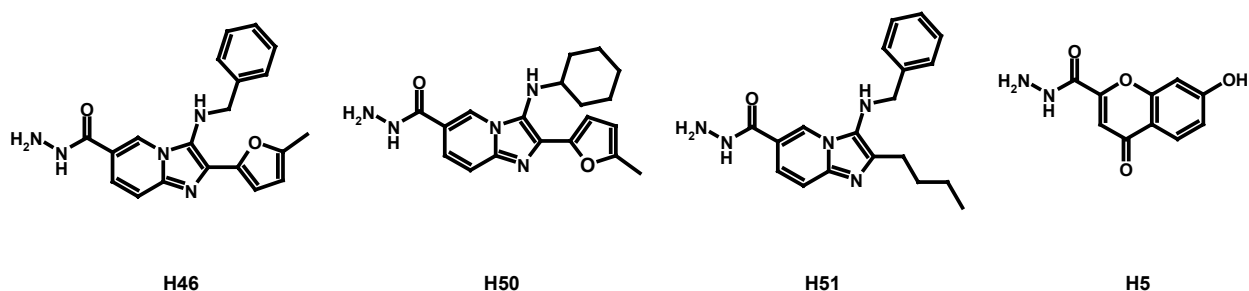


Figure 81 : Synthons identifiés après les deux premières étapes du criblage.

Les résultats nous ont permis d'extraire un synthon du groupe G1, H5 ; deux synthons du groupe G5, H46 et H50 ; et un synthon du groupe G6, H51. Au total quatre synthons ont été ainsi identifiés : H5, H46, H50, H51 (**Figure 81**). Ces quatre synthons ont été utilisés dans une troisième étape, au cours de laquelle ils ont été croisés individuellement avec chacun des composés de la synthothèque d'hydrazides. Ce croisement a été réalisé avec quatre concentrations différentes pour les mélanges (2, 8, 16, et 32 μM). A 2 μM , l'effet des inhibiteurs est impossible à distinguer. A 32 μM , on observe un nombre relativement important de touches. La concentration 8 μM donne un nombre de touches limité, ce qui nous permet d'extraire quelques synthons, rapidement, et en étant sélectif. A l'issue de cette dernière étape, six synthons supplémentaires, présentant tous une inhibition élevée à une concentration de 8 μM ont ainsi été sélectionnés (**Figure 82**).

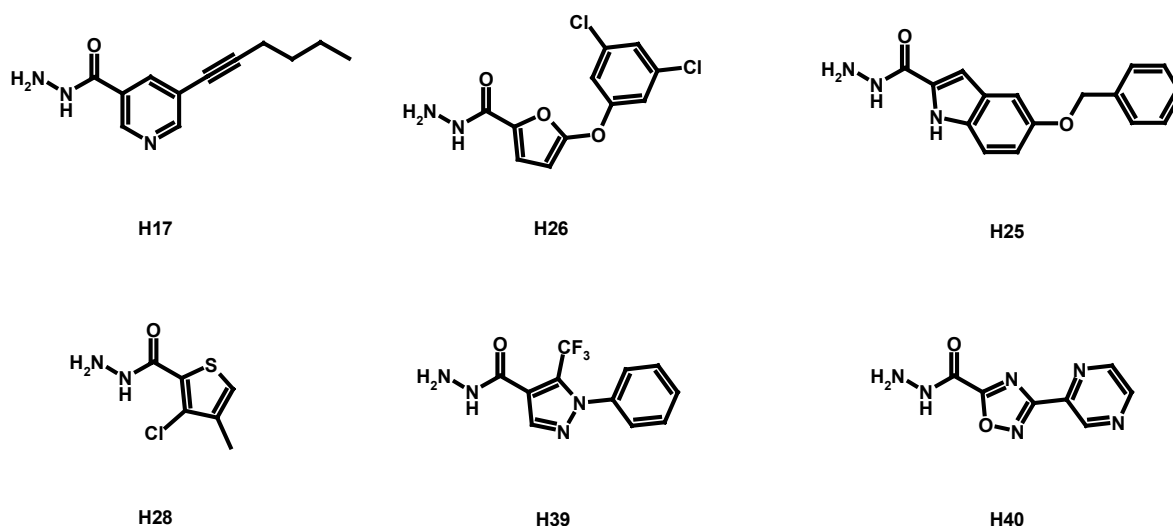


Figure 82 : Synthons supplémentaires identifiés lors de la troisième étape du criblage.

Les trois étapes de déconvolution nous ont ainsi permis de présélectionner 10 synthons. Nous les croiser entre eux afin de trouver les couples conduisant à la meilleure inhibition.

Les résultats des 55 mélanges du croisement ont montré deux types de comportements distincts, ce qui amène à séparer les synthons en deux classes C1 et C2. Les synthons de la classe C1 montrent un effet coopératif (augmentation sensible de l'inhibition) lorsqu'ils sont croisés avec certains des autres synthons (synthons partenaires), tandis que le pouvoir inhibiteur de ceux de la classe C2 ne sont affectés par aucun des autres synthons. Nous pensons que l'appartenance à ces deux classes est dictée par le positionnement des molécules inhibitrices dans le site actif (**Figure 83 A**).

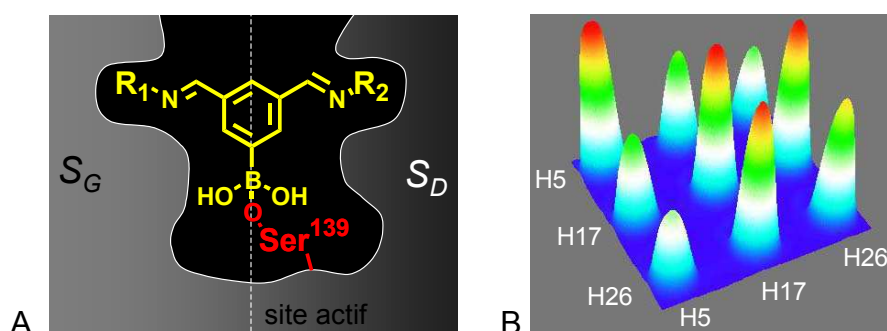


Figure 83 : Effets coopératifs de certains hydrazides.

A. Positionnement d'une dihydrazone dans le site actif, non symétrique, de NS3. Des substituant R1 et R2 de structures différentes s'adapteront mieux aux poches de formes différentes S_G et S_D . Une dihydrazone dissymétrique interagira donc mieux avec le site actif, à condition que les groupement R1 et R2 soient tous les deux adaptés à la poche qu'ils occupent.

B. Les hydrazides seuls présentent un faible pouvoir inhibiteur. La diminution de la fluorescence pour les croisements H5:H26 et H5:H17 indique un effet coopératif entre ces hydrazides. En revanche, cet effet n'est pas du tout observé pour le couple H17:H26. Cela suggère que H17 et H26 sont adapté à une des poches du site actif, et H5 à l'autre poche.

En effet, ce dernier n'est pas symétrique, donc une molécule symétrique ne peut pas être optimale pour maximiser les interactions. Par conséquent, cela suggère qu'une dihydrazone formée à partir de deux synthons partenaires de la classe C1 fait probablement l'objet d'une interaction spécifique avec le site actif. Pour ce qui est du comportement des synthons de la classe C2, le fait de ne pas avoir observé de synthons partenaires peut s'expliquer de plusieurs manières, comme par exemple une interaction non spécifique avec le site acif ou bien l'absence de partenaires appropriés parmi les synthons. Ces résultats, et la volonté d'obtenir une **molécule-touche dissymétrique** (a priori plus optimale qu'une molécule symétrique), nous ont conduit à nous concentrer sur la classe C1.

La classe C1, qui regroupe donc les synthons-touche issus du criblage, peut être subdivisée formellement en deux sous-classes, C1-G (correspondant à la poche gauche S_G) et C1-D (correspondant à la poche gauche S_D) (**Tableau 20**). Les synthons d'une même sous-classe ne montrent pas d'effet lorsqu'ils sont croisés entre eux mais affichent un effet coopératif

s'ils sont croisés avec ceux de l'autre sous-classe. Cette répartition est probablement liée à un positionnement préférentiel soit dans la poche à gauche du site actif S_G , soit dans la poche à droite S_D (**Figure 83 A**). Par exemple, les gouttes contenant uniquement l'hydrazide H5 inhibent peu la réaction à $8\mu\text{M}$, mais celles contenant H5 et H17, ou bien H5 et H26 ont un effet inhibiteur important (**Figure 83 B**). A l'inverse, le croisement de H17 et H26 ne conduit pas à une meilleure inhibition. On peut ainsi placer H5 dans une des sous-classes (C1-G), et H17 et H26 dans l'autre (C1-D).

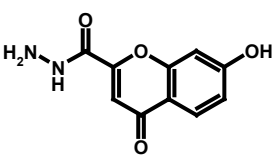
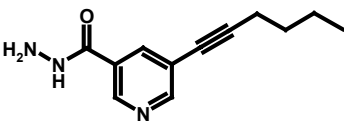
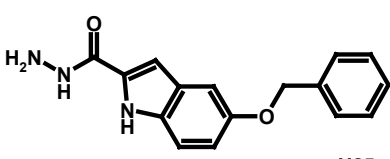
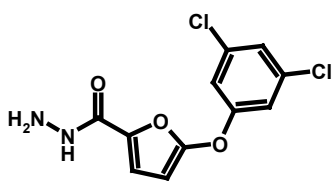
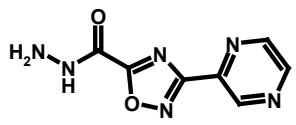
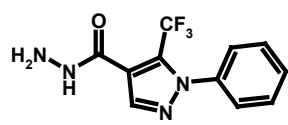
Sous-classe C1-G	Sous-classe C1-D
 <p style="text-align: center;">H5</p>	 <p style="text-align: center;">H17</p>
 <p style="text-align: center;">H25</p>	 <p style="text-align: center;">H26</p>
 <p style="text-align: center;">H40</p>	 <p style="text-align: center;">H39</p>

Tableau 20 : Synthons-touches issus du criblage.

4.2) Caractérisation des « touches » sélectionnées

Une fois les synthons-touches identifiés, nous avons voulu les caractériser plus en détail. Nous avons mis à profit les tensioarrays pour mesurer rapidement les IC_{50} des hydrazones symétriques. Pour obtenir un IC_{50} , on mesure l'activité protéolytique en présence de différentes concentrations d'inhibiteurs, généralement étagées sur plusieurs ordres de grandeur, et l' IC_{50} est la concentration pour laquelle la vitesse de protéolyse observée vaut 50% de la vitesse maximale (*i.e.* sans inhibiteur). Sur la base des IC_{50} mesurés et des résultats précédemment obtenus, nous avons choisi une dihydrazone dissymétrique comme molécule touche et nous l'avons caractérisé de manière classique (en cuve).

Dans un premier temps, nous avons déterminé l'IC₅₀ de la molécule servant de base à l'interaction avec NS3, l'acide 3,5-diformylphényl boronique. Les IC₅₀ obtenus sur tensioarray et en cuve sont du même ordre, respectivement 4,0 et 3,4 mM (**Figure 85**), ce qui confirme la validité de la méthode de mesure des IC₅₀ sur puce.

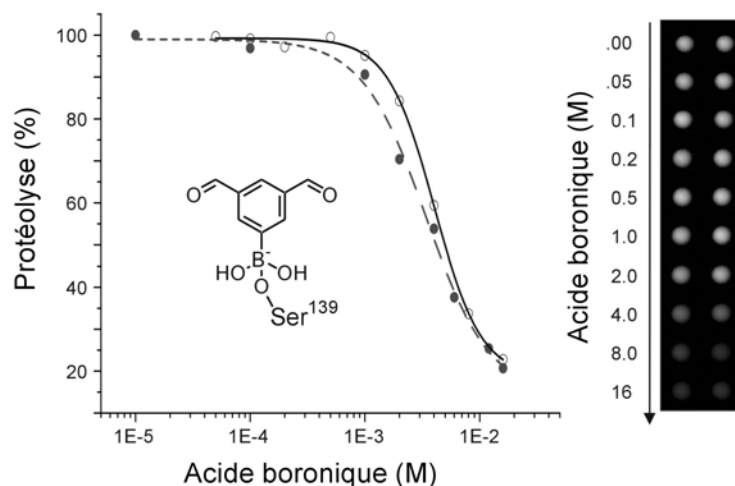


Figure 85 : Courbes d'inhibition de l'acide 3,5-diformylphényl boronique.

Influence de la concentration en acide 3,5-diformylphényl boronique sur la protéolyse, réalisées en cuve (disques, IC₅₀ = 4,0 mM) ou sur puce (cercles, IC₅₀ = 3,4 mM). Les courbes d'inhibition sont obtenues par une régression sigmoïdale effectuée avec le logiciel OriginPro.

Puis, des expériences d'inhibition sur tensioarray ont été effectuées, avec les monohydrzones et les dihydrzones symétriques correspondant aux synthons-touches identifiés (**Tableau 21**). Ces composés purs ont été resynthétisés de manière classique, purifiés et caractérisés par Olga Burchak, chercheuse post-doctorante au laboratoire.

Sous-classe	Synthon	IC ₅₀ monohydrzones (µM)	IC ₅₀ dihydrzones (µM)
C1-G	H5	> 100	31
	H25	> 100	27
	H40	> 100	90
C1-D	H17	> 100	56
	H26	> 100	92
	H39	> 100	89

Tableau 21 : IC₅₀ des monohydrzones et dihydrzones des synthons-touches.

Les monohydrzones montrent toutes un IC₅₀ supérieur à 100 µM, indiquant que l'interaction avec une seule partie du site actif est insuffisante pour créer une interaction forte avec NS3.

Dans la classe C1-D, nous avons choisi le synthon H17, car il présente l'IC₅₀ le plus bas. Dans la classe C1-G, nous avons sélectionné le synthon H5 car son IC₅₀ est presque aussi bas que celui de H25, et que de plus, H5 conduisait aux effets coopératifs les plus marqués lors des expériences de croisement des meilleurs synthons sur puce.

Finalement, la dihydrazone dissymétrique (H5:H17) a été testée en cuve (**Figure 86**). Elle présente un IC₅₀ de 2,1 μ M, ce qui constitue une augmentation du pouvoir inhibiteur de trois ordres de grandeur par rapport à la molécule servant de base à l'inhibition, l'acide 3,5-diformylphénylboronique (**Figure 86**). Compte tenu du défi que représente la cible NS3 pour les petites molécules, c'est un bon résultat. De plus, à partir de cette molécule-touche, la réalisation d'études de relation structure-activité devrait permettre d'obtenir des IC₅₀ submicromolaires.

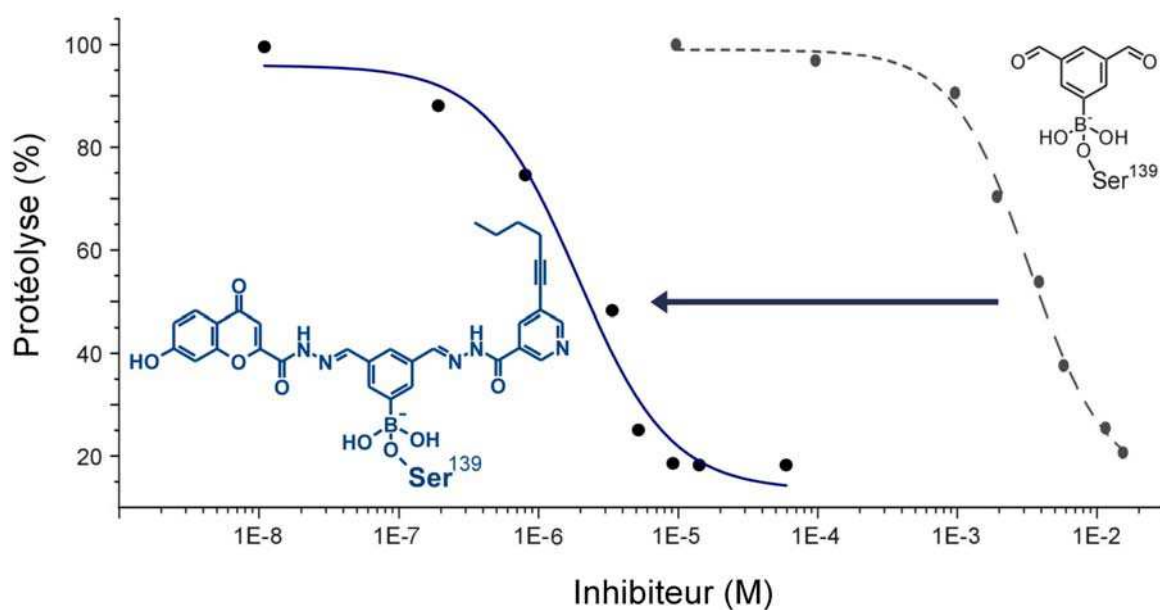


Figure 86 : De l'acide 3,5-diformylphénylboronique à la dihydrazone (H5:H17).

La dihydrazone dissymétrique (H5:H17) présente un IC₅₀ de 2,1 μ M (courbe bleue, à gauche). Par rapport à la molécule servant de base à l'inhibition, l'acide 3,5-diformylphénylboronique (courbe en pointillés gris), cela constitue un gain de trois ordres de grandeur.

5) CONCLUSION

La possibilité de réaliser un criblage enzymatique sur une banque de composés chimiques synthétisée *in situ* a été démontrée. De plus, une stratégie de recherche des synthons optimaux par déconvolutions successives a permis de découvrir rapidement quelques synthons d'intérêt. L'hydrazone dissymétrique (H5:H17) formée à partir des deux meilleurs synthons est caractérisée par un IC₅₀ de 2,1 µM. Ce gain de trois ordres de grandeur par rapport à la molécule de départ servant de base à l'inhibition (l'acide 3,5-diformylphénylboronique), valide l'efficacité de la méthode employée. La molécule-touche (H5:H17) constitue un point de départ intéressant pour le développement de nouveaux agents antiviraux dirigés contre le virus de l'hépatite C.

Le succès de l'approche employée est d'autant plus important que la méthode est générale, et il sera donc possible d'utiliser ce savoir-faire pour d'autres cibles thérapeutiques, en adaptant la molécule servant de base à l'inhibition.

PARTIE IV : PARTIE EXPERIMENTALE.

1) MATERIEL UTILISE

Différents supports commerciaux ont été utilisés : des lames de verre simples (fournies par les sociétés Menzel-Glaser ou Objektträger), des lames de verre recouvertes d'une matrice de 4x10 plots hydrophiles de 2 mm de diamètre séparés par une surface de Téflon de 30 μm d'épaisseur (fournies par Prolabo), et des lames de verre recouvertes d'une matrice de 4x10x10 ou 8x10x10 plots hydrophiles de 500 μm de diamètre et séparés par une surface de silanes perfluorés (fournies par la société Memscap Inc., Parc Technologique des Fontaines, Bernin, 38926 CROLLES Cedex, www.memscap.com)

Les images AFM ont été obtenues en mode contact, à l'air et à température ambiante, avec un appareil Picomaps de la société Molecular Imaging. Nous avons utilisés des pointes à leviers triangulaires, en nitrure de silicium, avec une constante de raideur de 0,58 N/m. Les déplacements fins de l'échantillon étaient gérés avec une platerforme permettant des déplacements avec une précision de 10 μm , et nous avons marqué certains plots avec un colorant pour faciliter le repérage des positions et le placement du levier. Les images placées sur le quart de périmètre du plot hydrophile ont été réalisées en calculant les déplacements en x et en y correspondant à différents angles. Enfin, la rugosité a été mesurée sur des petites zones de 2 μm x 2 μm .

L'éjecteur utilisé pour la fabrication des microarrays est un Sciflexarrayer de la société Scienion, basée à Berlin en Allemagne, équipé d'un système de refroidissement pour les supports de lame de verre. Cette technologie correspondait à nos besoins et nous permis de réaliser de nombreuses expériences sur tensioarray, notamment grâce à des fonctionnalités intéressantes, incluant la visualisation des gouttes avec la caméra et une programmation facile. Il faut néanmoins citer certaines limitations :

- Fiabilité : il a fallu changer plusieurs fois de boîtier électronique et une fois d'ordinateur. De plus, nous avons du faire face à des problèmes logiciels récurrent (*e.g.* effacement de liens USB et de fichiers).
- Pipettes : onéreuses et fragiles, certaines fonctionnent dès la mise en place, d'autres nécessite une période de conditionnement qui peut durer quelques heures. Le constructeur insiste sur l'importance de conditionner les pipettes avant usage, ce qui

empêche de changer de pipette plusieurs fois par jour, tout en rendant difficile le passage d'un type de solution à un autre (*e.g.* DMSO à tampon). Les pipettes ont tendance à se boucher aisément, mais ce problème a pu être surmonté en partie grâce à l'amélioration des procédures de lavage, en particulier une augmentation du débit et l'ajout d'un bain permettant de prélever des solutions de lavage (1%TFA dans l'acétonitrile par exemple).

Les mesures d'absorption UV-visible ont été réalisées sur un spectrophotomètre UV-visible Varian Cary 300 et des cuves en verre ou en quartz de 400 μ L ayant un chemin optique de 1 cm. Les mesures classiques de fluorescence ont été réalisées avec un spectrofluorimètre PerkinElmer LS50B et des cuves en verre ou en quartz de 400 μ L avec un chemin optique de 1 cm.

Pour la fluorescence sur tensioarray, elle se mesurait avec un scanner de fluorescence ou avec un microscope. Le scanner de fluorescence utilisé est un GeneTAC LSIV de la société Genomic solutions (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI, USA). La quantification de la fluorescence dans les gouttes des microarrays a été réalisée à l'aide du logiciel Genepix Pro 4.0 (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Le microscope automatique de fluorescence Olympus BX51 était équipé d'une caméra Hamamatsu ORCA R et d'une lampe Olympus URFL-T. Les acquisitions automatiques et l'analyse des images ont été réalisées avec le logiciel d'analyse IMSTAR (société IMSTAR, Paris, France).

Les analyses HPLC étaient effectuées sur un système Gold de la société Beckman-Coulter, géré par le logiciel 32 Karat. Le système était équipé d'une colonne Beckman Utrasphère C8 de 15 cm x 2.0 mm, et d'un détecteur UV monolongueur d'onde.

2) PRODUITS UTILISES

Tous les produits chimiques commerciaux utilisés provenaient des sociétés Sigma-Aldrich, Fluka, ACROS, ou Maybridge, sauf les silanes qui étaient fournis par ABCR. L'eau utilisée était desionisée sur un système MilliQ de Millipore. L'acétonitrile utilisé pour l'HPLC était de qualité HPLC. Les billes de TentaGel (20 µm de diamètre) étaient fournies par Rapp Polymere GmbH (Tübingen, Allemagne).

La banque de synthons hydrazides a été synthétisée par Olga Burchak, chercheuse post-doctorante au laboratoire Biopuces. Elle était conservée à -20°C dans des boîtes hermétiques contenant un agent dessicant.

Trois substrats fluorogènes commerciaux ont été utilisés :

- la gélatine marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine qui était fournie avec le kit Enzcheck (protease assay kit green fluorescence) de la société Molecular Probes, qui contenait également la 1,10-orthophénantroline (un inhibiteur spécifique des métalloprotéases), et un tampon de réaction.
- le substrat peptidique pour NS3 de la société Bachem.
- le substrat peptidique pour NS3 de la société Anaspec, fourni avec un kit (Enzolute520 HCV protease assay kit) contenant un inhibiteur peptidique de la protéase NS3, et un tampon de réaction.

Les autres substrats ont été synthétisés par Olga Burchak, chercheuse post-doctorante au laboratoire Biopuces. Pour la méthode de synthèse sur bille du substrat peptidique de la papaïne, voir l'**Annexe III**. Pour la méthode de synthèse des substrats courts pour protéases à sérine ou à cystéine, voir l'**Annexe IV**.

Les protéases employées étaient toutes d'origine commerciale (sigma-aldrich), sauf NS3 qui a été produite dans des bactéries à partir d'une construction fournie par Christian Drouet du laboratoire d'immunologie de l'Université Joseph Fourier (Grenoble)²⁶².

3) CONDITIONS DE REACTIONS SUR TENSIOARRAYS

Dans tous les cas, les tensioarrays étaient nettoyés et séchés avant usage. La procédure de lavage comprenait trois étapes :

- agitation orbitale pendant 15 minutes dans un bain d'acide nitrique à 5%,
- rinçage à l'eau desionisée avec léger frottement mécanique, puis agitation orbitale pendant 15 minutes dans de l'éthanol
- agitation orbitale pendant 15 minutes dans l'eau desionisée.

Le séchage s'effectuait en soufflant de l'azote sur le tensioarray.

3.1) Réaction chimiques

Les réactions chimiques sur puce étaient réalisées en ajoutant dans chaque plot, à l'aide de l'éjecteur piézoélectrique, les différents réactifs dissous dans le solvant de réaction. Les synthèses chimiques sur tensioarray étaient de deux types : formation d'hydrazones et condensation à trois composés.

- Formation d'hydrazones (procédure générale):

Les hydrazides et le dialdéhydes sont en solution dans un mélange eau/DMSO (1:1) contenant 10% de glycérol, à une concentration de 1 mM. Un même nombre de gouttes de chaque hydrazide est déposé dans chaque plot à l'aide de l'éjecteur piézoélectrique. Le dialdéhyde est ensuite ajouté (même nombre de gouttes que les hydrazides), et, immédiatement après, le tensioarray est placé dans un four micro-onde conventionnel réglé sur une puissance de 80 W pour 15 min. A l'issue de ce chauffage, seul le glycérol n'est pas évaporé, et les hydrazones sont formées.

La formation de monohydrazones suit la même procédure, mais en ajoutant le même nombre de gouttes d'un seul hydrazide et d'un aldéhyde.

- Condensation à trois composés (procédure générale):

Les aminopyridines (concentration 10 mM) sont en solution dans un mélange DMSO/eau (1:1) contenant du triflate de scandium (10% mol). Les aldéhydes (concentration 10 mM) sont en solution dans un mélange eau/DMSO (1:1). Les aldéhydes (100 gouttes) sont ajoutés dans les plots du tensioarray, ainsi que les mélanges aminopyridines/triflate de scandium (100 gouttes). Le tensioarray est alors placé dans une boîte de pétri contenant

environ 20 mL de DMSO avec 0,1% de cyclohexylisonitrile (dispositif pour l'ajout d'un réactif gazeux, voir Partie III-2, **figure 51**), et laissé à réagir toute la nuit.

3.2) Réaction biochimiques

Les réactions biochimiques sur puce étaient réalisées en ajoutant dans chaque plot, à l'aide de l'éjecteur piézoélectrique, l'enzyme et le substrat dissous dans le tampon de réaction. Les réactions enzymatiques sur puce étaient de trois types : clivage d'un substrat sur bille par la papaïne, protéolyse de gélatine marquée par la Collagénase type IV, activité de NS3 vis-à-vis de différents substrats.

- Protéolyse sur bille par la papaïne: voir **Annexe III**.
- Collagénase : la gélatine marquée du kit (DQ-Gelatin) est diluée à 1% dans le tampon de réaction, puis déposé à l'aide de l'éjecteur piézoélectrique. L'aspiration de cette solution est réalisée lentement à cause de sa viscosité. Le tampon de réaction (fourni avec le kit) est alors ajouté. Enfin, on ajoute l'enzyme et on incube le tensioarray à 37°C dans une boîte de pétri contenant une solution PBS/DMSO/glycérol (dispositif analogue à celui pour l'ajout d'un réactif gazeux, voir Partie III-2, **figure 51**).
- Concernant l'activité de NS3, les paramètres cinétiques avec le substrat Anaspec ont été obtenus sur puce en ajoutant, à l'aide de l'éjecteur piézoélectrique, le tampon (fourni avec le kit), puis l'enzyme, puis le substrat. Les concentrations d'enzyme et de substrats étaient variées en changeant le nombre de gouttes déposées dans les gouttes de tampon.

3.3) Criblage

La banque chimique est synthétisée dans les microgouttes du tensioarray, selon la procédure décrite pour la synthèse des hydrazones au paragraphe 3.1) de cette section. Ensuite, l'ensemble de la banque est redissous par ajout d'une solution eau/DMSO (1:1) dans chaque plot du tensioarray, à l'aide de l'éjecteur piézoélectrique. Puis le tampon de réaction est ajouté, suivi de l'enzyme, et enfin du substrat. Dès que le substrat a été ajouté, le tensioarray est placé dans une boîte de pétri contenant une solution PBS/DMSO/glycérol (dispositif analogue à celui pour l'ajout d'un réactif gazeux, voir Partie III-2, **figure 51**), puis mis à l'étuve à 37°C pendant 2 heures. Le tensioarray est alors sorti de l'étuve et la fluorescence de chaque microgoutte mesurée.

4) ANALYSE DES RESULTATS

Le traitement des images AFM a été réalisé avec le logiciel Picomaps (fourni avec l'appareil) ainsi qu'avec le logiciel WSxM 4.0, disponible gratuitement sur internet.

Les caractérisations classiques des fluorophores et des substrats réalisées avec le spectrophotomètre et le fluorimètre étaient ensuite analysées avec les logiciels Excel et OriginPro v7.5.

Dans le cadre des réactions chimiques et biochimiques sur tensioarray, les mesures obtenues au cours des différentes expériences étaient soit des intensités de fluorescence, soit des chromatogrammes.

Ces derniers étaient obtenus en réalisant la même réaction dans un grand nombre de plots (en général une centaine), puis en récupérant les mélanges après réaction avec une micropipette. Les mélanges récupérés (dans le DMSO) étaient alors dilués dans un mélange 20% acétonitrile – 80% eau désionisé avant d'être injectés dans la colonne de l'HPLC.

Les intensités de fluorescence, quantifiées dans chaque goutte des microarrays, soit à l'aide du logiciel Genepix Pro 4.0 (pour le scanner), soit avec le logiciel d'analyse IMSTAR (pour la microscopie), étaient ensuite exportées sous forme de feuilles Excel.

La fonction tableaux croisés dynamiques d'Excel est un très bon outil pour gérer des tableaux de données de grande taille obtenus lors de la quantification de la fluorescence dans les microgouttes des tensioarrays. Le principe consiste à mettre un paramètre (numéro de bloc, concentration, fluorescence, temps) par colonne dans le tableau, puis à choisir les paramètres que l'on veut visualiser dans le tableau croisé dynamique. On peut déplacer à volonté les paramètres pour les placer dans une en ligne, dans une colonne ou comme valeur dans le tableau. Une fois le tableau croisé dynamique créé, on peut sélectionner ou désélectionner les différentes valeurs prises par chaque paramètre pour ne visualiser que ceux qui nous intéressent. De plus il est possible de faire des opérations de calcul sur les valeurs du tableau, comme des différences par rapport à un contrôle, des pourcentages, etc. Cet outil est très puissant, même si on peut regretter que les seules graphiques automatiques possibles soient des histogrammes, ce qui oblige à copier le tableau de valeur pour faire un

graphique autre (nuage de points, courbes). Cela se révèle parfois gênant, notamment dans le cas où l'on se sert des tableaux croisés dynamiques pour des expériences de cinétique.

Le logiciel Origin Pro v7.5. a été utilisé pour les régressions non linéaires, comme par exemple les cinétiques de type Michaelis-Menten, pour les régression sigmoïdales lors de la détermination des IC50, ainsi que pour certaines régression linéaires. Ce logiciel permet entre autre de définir soit même l'équation de régression.

Dans les cas où des analyses statistiques plus poussées se sont avérées nécessaires, nous avons eu recours au logiciel Minitab v13.0 développé à l'université Louis Pasteur de Strasbourg. C'est un logiciel de traitement statistique avancé, qui comprend un grand nombre de fonctionnalités. Il prend par exemple en charge tous les calculs d'analyse de la variance à un ou deux facteurs, les comparaisons de moyennes, de nombreux types de graphiques, etc. (voir **Annexe I**).

CONCLUSION

Les caractérisations et les tests effectués sur notre outil technologique, à savoir la combinaison des tensioarrays et d'un éjecteur piézoélectrique ont montré qu'il était adapté à la création d'arrays de microgoutte pour l'étude de réactions chimiques et enzymatiques. Cependant, un problème de diffusion dans la pipette nécessite un prélèvement double de la quantité à déposer.

La synthèse chimique a été réalisée avec deux modèles de réactions. Le premier, la formation d'hydrazones à partir d'hydrazides et d'aldéhydes, a permis une première validation, et a aussi été utilisé pour la synthèse de la banque chimique du criblage enzymatique. Le second, une réaction de condensation à trois composés a démontré la possibilité de réaliser une chimie plus complexe dans les microgouttes, et a été appliqué avec succès à la recherche de nouveaux composés fluorescents. Le potentiel de la chimie combinatoire sur puce a ainsi été mis en évidence, tout en montrant que le manque de contrôle du à la conduite de centaines de réactions en parallèle doit être pris en compte.

La possibilité de suivre sur tensioarrays l'activité de trois protéases, chacune avec un type de substrat fluorogène différent, a été validée. La papaïne, mise en présence d'un substrat peptidique synthétisé sur bille, a conduit à une augmentation de la fluorescence des billes, quantifiée grâce à un scanner et aussi en microscopie à fluorescence. La méthode développée est potentiellement intéressante pour le criblage sur billes à haut débit. Le clivage sur puce d'un substrat protéique marqué a ensuite été réalisé avec une métalloprotéase. L'augmentation progressive de l'inhibition avec la concentration en substrat a été mesurée, ce qui a confirmé de la possibilité de réaliser le criblage. La protéase virale NS3, dernier modèle abordé, a été caractérisée avec un substrat peptidique commercial soluble, après des tentatives infructueuses pour obtenir nous-même un substrat basé sur la fluorescéine.

Enfin, le savoir-faire acquis a été mis à profit pour synthétiser une banque de composés chimiques dans les microgouttes du tensioarray avant d'ajouter la protéase NS3 et son substrat fluorogène. Le criblage des composés synthétisés sur la puce a permis de découvrir des molécules présentant un potentiel comme agent antiviral. Ceci valide l'intérêt de cette méthode, d'autant plus qu'elle est généralisable à d'autres cibles.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Comley, J., Continued miniaturisation of assay technologies drives market for nanolitre dispensing. *Drug Discovery World* **2004**, 43-54.
2. Fodor, S. P.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A. T.; Solas, D., Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **1991**, 251, (4995), 767-73.
3. Livache, T.; Bazin, H.; Caillat, P.; Roget, A., Electroconducting polymers for the construction of DNA or peptide arrays on silicon chips. *Biosensors & Bioelectronics* **1998**, 13, (6), 629-34.
4. Livache, T.; Fouque, B.; Roget, A.; Marchand, J.; Bidan, G.; Teoule, R.; Mathis, G., Polypyrrole DNA chip on a silicon device: example of hepatitis C virus genotyping. *Analytical Biochemistry* **1998**, 255, (2), 188-94.
5. Livache, T.; Roget, A.; Dejean, E.; Barthet, C.; Bidan, G.; Teoule, R., Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Research* **1994**, 22, (15), 2915-21.
6. MacBeath, G.; Koehler, A. N.; Schreiber, S. L., Printing Small Molecules as Microarrays and Detecting Protein-Ligand Interactions en Masse. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, 121, (34), 7967-7968.
7. Walsh, D. P.; Chang, Y. T., Chemical genetics. *Chemical Reviews* **2006**, 106, (6), 2476-530.
8. Hergenrother, P. J.; Depew, K. M.; Schreiber, S. L., Small-molecule microarrays: Covalent attachment and screening of alcohol-containing small molecules on glass slides. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, (32), 7849-7850.
9. Schreiber, S. L., Target-oriented and diversity-oriented organic synthesis in drug discovery. *Science* **2000**, 287, (5460), 1964-9.
10. Sternson, S. M.; Louca, J. B.; Wong, J. C.; Schreiber, S. L., Split-pool synthesis of 1,3-dioxanes leading to arrayed stock solutions of single compounds sufficient for multiple phenotypic and protein-binding assays. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, (8), 1740-7.
11. Kuruvilla, F. G.; Shamji, A. F.; Sternson, S. M.; Hergenrother, P. J.; Schreiber, S. L., Dissecting glucose signalling with diversity-oriented synthesis and small-molecule microarrays. *Nature* **2002**, 416, (6881), 653-657.
12. Koehler, A. N.; Shamji, A. F.; Schreiber, S. L., Discovery of an inhibitor of a transcription factor using small molecule microarrays and diversity-oriented synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (28), 8420-8421.
13. Barnes-Seeman, D.; Park, S. B.; Koehler, A. N.; Schreiber, S. L., Expanding the functional group compatibility of small-molecule microarrays: discovery of novel calmodulin ligands. *Angewandte Chemie (International Edition)* **2003**, 42, (21), 2376-9.
14. Wong, J. C.; Sternson, S. M.; Louca, J. B.; Hong, R.; Schreiber, S. L., Modular synthesis and preliminary biological evaluation of stereochemically diverse 1,3-dioxanes. *Chemistry & Biology* **2004**, 11, (9), 1279-91.
15. Ma, H.; Horiuchi, K. Y., Chemical microarray: a new tool for drug screening and discovery. *Drug Discovery Today* **2006**, 11, (13-14), 661-8.
16. Dickopf, S.; Frank, M.; Junker, H. D.; Maier, S.; Metz, G.; Otteleben, H.; Rau, H.; Schellhaas, N.; Schmidt, K.; Sekul, R.; Vanier, C.; Vetter, D.; Czech, J.; Lorenz, M.; Matter, H.; Schudok, M.; Schreuder, H.; Will, D. W.; Nestler, H. P., Custom chemical microarray production and affinity fingerprinting for the S1 pocket of factor VIIa. *Analytical Biochemistry* **2004**, 335, (1), 50-7.
17. Winssinger, N.; Harris, J. L.; Backes, B. J.; Schultz, P. G., From Split-Pool Libraries to Spatially Addressable Microarrays and Its Application to Functional Proteomic Profiling. *Angewandte Chemie (International Edition)* **2001**, 40, (17), 3152-3155.

18. Winssinger, N.; Ficarro, S.; Schultz, P. G.; Harris, J. L., Profiling protein function with small molecule microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, 99, (17), 11139-44.
19. Houseman, B. T.; Huh, J. H.; Kron, S. J.; Mrksich, M., Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity. *Nature Biotechnology* **2002**, 20, (3), 270-4.
20. Salisbury, C. M.; Maly, D. J.; Ellman, J. A., Peptide microarrays for the determination of protease substrate specificity. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (50), 14868-14870.
21. Zhu, Q.; Uttamchandani, M.; Li, D.; Lesaichere, M. L.; Yao, S. Q., Enzymatic profiling system in a small-molecule microarray. *Organic Letters* **2003**, 5, (8), 1257-60.
22. Gosalia, D. N.; Diamond, S. L., Printing chemical libraries on microarrays for fluid phase nanoliter reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100, (15), 8721-6.
23. Horiuchi, K. Y.; Wang, Y.; Diamond, S. L.; Ma, H., Microarrays for the functional analysis of the chemical-kinase interactome. *Journal of Biomolecular Screening* **2006**, 11, (1), 48-56.
24. Ma, H.; Horiuchi, K. Y.; Wang, Y.; Kucharewicz, S. A.; Diamond, S. L., Nanoliter homogenous ultra-high throughput screening microarray for lead discoveries and IC50 profiling. *Assay and Drug Development Technologies* **2005**, 3, (2), 177-87.
25. Simmons, G.; Gosalia, D. N.; Rennekamp, A. J.; Reeves, J. D.; Diamond, S. L.; Bates, P., Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, (33), 11876-81.
26. Anderson, D. G.; Levenberg, S.; Langer, R., Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* **2004**, 22, (7), 863-6.
27. Anderson, D. G.; Putnam, D.; Lavik, E. B.; Mahmood, T. A.; Langer, R., Biomaterial microarrays: rapid, microscale screening of polymer-cell interaction. *Biomaterials* **2005**, 26, (23), 4892-7.
28. Tourniaire, G.; Collins, J.; Campbell, S.; Mizomoto, H.; Ogawa, S.; Thaburet, J. F.; Bradley, M., Polymer microarrays for cellular adhesion. *Chemical Communications (Cambridge, England)* **2006**, (20), 2118-20.
29. Hubbell, J. A., Biomaterials science and high-throughput screening. *Nature Biotechnology* **2004**, 22, (7), 828-9.
30. Haupt, K.; Mosbach, K., Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chemical Reviews* **2000**, 100, (7), 2495-504.
31. Turkewitsch, P.; Wandelt, B.; Darling, G. D.; Powell, W. S., Fluorescent Functional Recognition Sites through Molecular Imprinting. A Polymer-Based Fluorescent Chemosensor for Aqueous cAMP. *Analytical Chemistry* **1998**, 70, (10), 2025-2030.
32. Shi, H.; Tsai, W. B.; Garrison, M. D.; Ferrari, S.; Ratner, B. D., Template-imprinted nanostructured surfaces for protein recognition. *Nature* **1999**, 398, (6728), 593-7.
33. Tomizaki, K. Y.; Usui, K.; Mihara, H., Protein-detecting microarrays: current accomplishments and requirements. *Chembiochem* **2005**, 6, (5), 782-99.
34. Love, K. R.; Seeberger, P. H., Carbohydrate arrays as tools for glycomics. *Angewandte Chemie (International Edition)* **2002**, 41, (19), 3583-6, 3513.
35. Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L., Chemical glycobiology. *Science* **2001**, 291, (5512), 2357-64.
36. Seeberger, P. H.; Werz, D. B., Automated synthesis of oligosaccharides as a basis for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2005**, 4, (9), 751-63.
37. Houseman, B. T.; Mrksich, M., Carbohydrate arrays for the evaluation of protein binding and enzymatic modification. *Chemistry & Biology* **2002**, 9, (4), 443-54.
38. Sungjin Park, I. S., Fabrication of Carbohydrate Chips for Studying Protein-Carbohydrate Interactions. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (17), 3180-3182.
39. Bryan, M. C.; Plettenburg, O.; Sears, P.; Rabuka, D.; Wacowich-Sgarbi, S.; Wong, C. H., Saccharide display on microtiter plates. *Chemistry & Biology* **2002**, 9, (6), 713-20.

40. Ratner, D. M.; Adams, E. W.; Su, J.; O'Keefe, B. R.; Mrksich, M.; Seeberger, P. H., Probing protein-carbohydrate interactions with microarrays of synthetic oligosaccharides. *Chembiochem* **2004**, 5, (3), 379-82.
41. Wang, D.; Liu, S.; Trummer, B. J.; Deng, C.; Wang, A., Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells. *Nature Biotechnology* **2002**, 20, (3), 275-81.
42. Willats, W. G.; Rasmussen, S. E.; Kristensen, T.; Mikkelsen, J. D.; Knox, J. P., Sugar-coated microarrays: a novel slide surface for the high-throughput analysis of glycans. *Proteomics* **2002**, 2, (12), 1666-71.
43. Nimrichter, L.; Gargir, A.; Gortler, M.; Altstock, R. T.; Shtevi, A.; Weisshaus, O.; Fire, E.; Dotan, N.; Schnaar, R. L., Intact cell adhesion to glycan microarrays. *Glycobiology* **2004**, 14, (2), 197-203.
44. Disney, M. D.; Magnet, S.; Blanchard, J. S.; Seeberger, P. H., Aminoglycoside microarrays to study antibiotic resistance. *Angewandte Chemie (International Edition)* **2004**, 43, (12), 1591-4.
45. Disney, M. D.; Seeberger, P. H., Aminoglycoside microarrays to explore interactions of antibiotics with RNAs and proteins. *Chemistry* **2004**, 10, (13), 3308-14.
46. Adams, E. W.; Ratner, D. M.; Bokesch, H. R.; McMahon, J. B.; O'Keefe, B. R.; Seeberger, P. H., Oligosaccharide and glycoprotein microarrays as tools in HIV glycobiochemistry; glycan-dependent gp120/protein interactions. *Chemistry & Biology* **2004**, 11, (6), 875-81.
47. dePaz, J. L.; Noti, C.; Seeberger, P. H., Microarrays of Synthetic Heparin Oligosaccharides. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, (9), 2766-2767.
48. Fazio, F.; Bryan, M. C.; Blixt, O.; Paulson, J. C.; Wong, C. H., Synthesis of Sugar Arrays in Microtiter Plate. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (48), 14397-14402.
49. Min, D. H.; Mrksich, M., Peptide arrays: towards routine implementation. *Current Opinion in Chemical Biology* **2004**, 8, (5), 554-8.
50. Cretich, M.; Damin, F.; Pirri, G.; Chiari, M., Protein and peptide arrays: recent trends and new directions. *Biomolecular Engineering* **2006**, 23, (2-3), 77-88.
51. Falsey, J. R.; Renil, M.; Park, S.; Li, S.; Lam, K. S., Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjugate Chemistry* **2001**, 12, (3), 346-53.
52. Gao, X.; Zhou, X.; Gulari, E., Light directed massively parallel on-chip synthesis of peptide arrays with t-Boc chemistry. *Proteomics* **2003**, 3, (11), 2135-41.
53. Usui, K.; Ojima, T.; Takahashi, M.; Nokihara, K.; Mihara, H., Peptide arrays with designed secondary structures for protein characterization using fluorescent fingerprint patterns. *Biopolymers* **2004**, 76, (2), 129-39.
54. Shreffler, W. G.; Lencer, D. A.; Bardina, L.; Sampson, H. A., IgE and IgG4 epitope mapping by microarray immunoassay reveals the diversity of immune response to the peanut allergen, Ara h 2. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2005**, 116, (4), 893-9.
55. Duburcq, X.; Olivier, C.; Desmet, R.; Halasa, M.; Carion, O.; Grandidier, B.; Heim, T.; Stievenard, D.; Auriault, C.; Melnyk, O., Polypeptide semicarbazide glass slide microarrays: characterization and comparison with amine slides in serodetection studies. *Bioconjugate Chemistry* **2004**, 15, (2), 317-25.
56. Duburcq, X.; Olivier, C.; Malingue, F.; Desmet, R.; Bouzidi, A.; Zhou, F.; Auriault, C.; Gras-Masse, H.; Melnyk, O., Peptide-protein microarrays for the simultaneous detection of pathogen infections. *Bioconjugate Chemistry* **2004**, 15, (2), 307-16.
57. Melnyk, O.; Duburcq, X.; Olivier, C.; Urbes, F.; Auriault, C.; Gras-Masse, H., Peptide arrays for highly sensitive and specific antibody-binding fluorescence assays. *Bioconjugate Chemistry* **2002**, 13, (4), 713-20.
58. MacBeath, G.; Schreiber, S. L., Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* **2000**, 289, (5485), 1760-3.
59. Zhu, H.; Klemic, J. F.; Chang, S.; Bertone, P.; Casamayor, A.; Klemic, K. G.; Smith, D.; Gerstein, M.; Reed, M. A.; Snyder, M., Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nature Genetics* **2000**, 26, (3), 283-9.

60. Lesaichere, M. L.; Uttamchandani, M.; Chen, G. Y.; Yao, S. Q., Antibody-based fluorescence detection of kinase activity on a peptide array. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, 12, (16), 2085-8.
61. Uttamchandani, M.; Chan, E. W.; Chen, G. Y.; Yao, S. Q., Combinatorial peptide microarrays for the rapid determination of kinase specificity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, 13, (18), 2997-3000.
62. Gosalia, D. N.; Salisbury, C. M.; Ellman, J. A.; Diamond, S. L., High throughput substrate specificity profiling of serine and cysteine proteases using solution-phase fluorogenic peptide microarrays. *Molecular and Cellular Proteomics* **2005**, 4, (5), 626-36.
63. Gosalia, D. N.; Salisbury, C. M.; Maly, D. J.; Ellman, J. A.; Diamond, S. L., Profiling serine protease substrate specificity with solution phase fluorogenic peptide microarrays. *Proteomics* **2005**, 5, (5), 1292-8.
64. Huang, W.; Beharry, Z.; Zhang, Z.; Palzkill, T., A broad-spectrum peptide inhibitor of beta-lactamase identified using phage display and peptide arrays. *Protein Eng* **2003**, 16, (11), 853-60.
65. Zhu, H.; Snyder, M., Protein chip technology. *Current Opinion in Chemical Biology* **2003**, 7, (1), 55-63.
66. Hamelinck, D.; Zhou, H.; Li, L.; Verweij, C.; Dillon, D.; Feng, Z.; Costa, J.; Haab, B. B., Optimized normalization for antibody microarrays and application to serum-protein profiling. *Molecular and Cellular Proteomics* **2005**, 4, (6), 773-84.
67. Sreekumar, A.; Nyati, M. K.; Varambally, S.; Barrette, T. R.; Ghosh, D.; Lawrence, T. S.; Chinnaiyan, A. M., Profiling of cancer cells using protein microarrays: discovery of novel radiation-regulated proteins. *Cancer Research* **2001**, 61, (20), 7585-93.
68. Hiller, R.; Laffer, S.; Harwanegg, C.; Huber, M.; Schmidt, W. M.; Twardosz, A.; Barletta, B.; Becker, W. M.; Blaser, K.; Breiteneder, H.; Chapman, M.; Cramer, R.; Duchene, M.; Ferreira, F.; Fiebig, H.; Hoffmann-Sommergruber, K.; King, T. P.; Kleber-Janke, T.; Kurup, V. P.; Lehrer, S. B.; Lidholm, J.; Muller, U.; Pini, C.; Reese, G.; Scheiner, O.; Scheynius, A.; Shen, H. D.; Spitzauer, S.; Suck, R.; Swoboda, I.; Thomas, W.; Tinghino, R.; Van Hage-Hamsten, M.; Virtanen, T.; Kraft, D.; Muller, M. W.; Valenta, R., Microarrayed allergen molecules: diagnostic gatekeepers for allergy treatment. *Faseb Journal* **2002**, 16, (3), 414-6.
69. 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.; Skriver, K.; Hirschberg, D. L.; Morris, R. I.; Muller, S.; Pruijn, G. J.; van Venrooij, W. J.; Smolen, J. S.; Brown, P. O.; Steinman, L.; Utz, P. J., Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nature Medicine* **2002**, 8, (3), 295-301.
70. Merkel, J. S.; Michaud, G. A.; Salcius, M.; Schweitzer, B.; Predki, P. F., Functional protein microarrays: just how functional are they? *Current Opinion in Biotechnology* **2005**, 16, (4), 447-52.
71. Hall, D. A.; Zhu, H.; Zhu, X.; Royce, T.; Gerstein, M.; Snyder, M., Regulation of gene expression by a metabolic enzyme. *Science* **2004**, 306, (5695), 482-4.
72. Kersten, B.; Possling, A.; Blaesing, F.; Mirgorodskaya, E.; Gobom, J.; Seitz, H., Protein microarray technology and ultraviolet crosslinking combined with mass spectrometry for the analysis of protein-DNA interactions. *Analytical Biochemistry* **2004**, 331, (2), 303-13.
73. Kim, S. H.; Tamrazi, A.; Carlson, K. E.; Katzenellenbogen, J. A., A proteomic microarray approach for exploring ligand-initiated nuclear hormone receptor pharmacology, receptor selectivity, and heterodimer functionality. *Molecular and Cellular Proteomics* **2005**, 4, (3), 267-77.
74. Nakar, D.; Handelsman, T.; Shoham, Y.; Fierobe, H. P.; Belaich, J. P.; Morag, E.; Lamed, R.; Bayer, E. A., Pinpoint mapping of recognition residues on the cohesin surface by progressive homologue swapping. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, 279, (41), 42881-8.
75. Huang, J.; Zhu, H.; Haggarty, S. J.; Spring, D. R.; Hwang, H.; Jin, F.; Snyder, M.; Schreiber, S. L., Finding new components of the target of rapamycin (TOR) signaling network through chemical genetics and proteome chips. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, (47), 16594-9.
76. Lee, Y.; Kang, D. K.; Chang, S. I.; Han, M. H.; Kang, I. C., High-throughput screening of novel peptide inhibitors of an integrin receptor from the hexapeptide library by using a protein microarray chip. *Journal of Biomolecular Screening* **2004**, 9, (8), 687-94.

77. Fang, Y.; Frutos, A. G.; Lahiri, J., Membrane Protein Microarrays. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (11), 2394-2395.
78. Poetz, O.; Ostendorp, R.; Brocks, B.; Schwenk, J. M.; Stoll, D.; Joos, T. O.; Templin, M. F., Protein microarrays for antibody profiling: specificity and affinity determination on a chip. *Proteomics* **2005**, 5, (9), 2402-11.
79. Cha, T.; Guo, A.; Zhu, X. Y., Enzymatic activity on a chip: the critical role of protein orientation. *Proteomics* **2005**, 5, (2), 416-9.
80. Chen, G. Y.; Uttamchandani, M.; Zhu, Q.; Wang, G.; Yao, S. Q., Developing a strategy for activity-based detection of enzymes in a protein microarray. *ChemBiochem* **2003**, 4, (4), 336-9.
81. Eppinger, J.; Funeriu, D. P.; Miyake, M.; Denizot, L.; Miyake, J., Enzyme microarrays: On-chip determination of inhibition constants based on affinity-label detection of enzymatic activity. *Angewandte Chemie (International Edition)* **2004**, 43, (29), 3806-10.
82. Funeriu, D. P.; Eppinger, J.; Denizot, L.; Miyake, M.; Miyake, J., Enzyme family-specific and activity-based screening of chemical libraries using enzyme microarrays. *Nature Biotechnology* **2005**, 23, (5), 622-7.
83. Jung, G. Y.; Stephanopoulos, G., A functional protein chip for pathway optimization and in vitro metabolic engineering. *Science* **2004**, 304, (5669), 428-31.
84. Boutell, J. M.; Hart, D. J.; Godber, B. L.; Kozlowski, R. Z.; Blackburn, J. M., Functional protein microarrays for parallel characterisation of p53 mutants. *Proteomics* **2004**, 4, (7), 1950-8.
85. Epstein, C. B.; Butow, R. A., Microarray technology - enhanced versatility, persistent challenge *Current Opinion in Biotechnology* **2000**, 11, (1), 36-41.
86. Degenkolbe, T.; Hannah, M. A.; Freund, S.; Hincha, D. K.; Heyer, A. G.; Kohl, K. I., A quality-controlled microarray method for gene expression profiling. *Analytical Biochemistry* **2005**, 346, (2), 217-24.
87. Mahadevappa, M.; Warrington, J. A., A high-density probe array sample preparation method using 10- to 100-fold fewer cells. *Nature Biotechnology* **1999**, 17, (11), 1134-6.
88. Khomyakova, E. B.; Dreval, E. V.; Tran-Dang, M.; Potier, M. C.; Soussaline, F. P., Innovative instrumentation for microarray scanning and analysis: application for characterization of oligonucleotide duplexes behavior. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)* **2004**, 50, (3), 217-24.
89. Hoheisel, J. D.; Maier, E.; Mott, R.; McCarthy, L.; Grigoriev, A. V.; Schalkwyk, L. C.; Nizetic, D.; Francis, F.; Lehrach, H., High resolution cosmid and P1 maps spanning the 14 Mb genome of the fission yeast *S. pombe*. *Cell* **1993**, 73, (1), 109-20.
90. Sapolsky, R. J.; Lipshutz, R. J., Mapping genomic library clones using oligonucleotide arrays. *Genomics* **1996**, 33, (3), 445-56.
91. Meier-Ewert, S.; Maier, E.; Ahmadi, A.; Curtis, J.; Lehrach, H., An automated approach to generating expressed sequence catalogues. *Nature* **1993**, 361, (6410), 375-6.
92. Pinkel, D.; Seagraves, R.; Sudar, D.; Clark, S.; Poole, I.; Kowbel, D.; Collins, C.; Kuo, W. L.; Chen, C.; Zhai, Y.; Dairkee, S. H.; Ljung, B. M.; Gray, J. W.; Albertson, D. G., High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nature Genetics* **1998**, 20, (2), 207-11.
93. Behr, M. A.; Wilson, M. A.; Gill, W. P.; Salamon, H.; Schoolnik, G. K.; Rane, S.; Small, P. M., Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* **1999**, 284, (5419), 1520-3.
94. Lindroos, K.; Liljedahl, U.; Raitio, M.; Syvanen, A. C., Minisequencing on oligonucleotide microarrays: comparison of immobilisation chemistries. *Nucleic Acids Research* **2001**, 29, (13), E69-9.
95. Ramsay, G., DNA chips: state-of-the art. *Nature Biotechnology* **1998**, 16, (1), 40-4.
96. Perou, C. M.; Jeffrey, S. S.; van de Rijn, M.; Rees, C. A.; Eisen, M. B.; Ross, D. T.; Pergamenschikov, A.; Williams, C. F.; Zhu, S. X.; Lee, J. C.; Lashkari, D.; Shalon, D.; Brown, P. O.; Botstein, D., Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, 96, (16), 9212-7.

97. Vernell, R.; Helin, K.; Muller, H., Identification of target genes of the p16INK4A-pRB-E2F pathway. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, (46), 46124-37.
98. Cho, R. J.; Campbell, M. J.; Winzeler, E. A.; Steinmetz, L.; Conway, A.; Wodicka, L.; Wolfsberg, T. G.; Gabrielian, A. E.; Landsman, D.; Lockhart, D. J.; Davis, R. W., A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Molecular Cell* **1998**, 2, (1), 65-73.
99. Ferea, T. L.; Botstein, D.; Brown, P. O.; Rosenzweig, R. F., Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, 96, (17), 9721-6.
100. Lee, C. K.; Klopp, R. G.; Weindruch, R.; Prolla, T. A., Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* **1999**, 285, (5432), 1390-3.
101. Bulyk, M. L., DNA microarray technologies for measuring protein-DNA interactions. *Current Opinion in Biotechnology* **2006**, 17, (4), 422-30.
102. Sauvaigo, S.; Guerniou, V.; Rapin, D.; Gasparutto, D.; Caillat, S.; Favier, A., An oligonucleotide microarray for the monitoring of repair enzyme activity toward different DNA base damage. *Analytical Biochemistry* **2004**, 333, (1), 182-92.
103. Boozer, C.; Ladd, J.; Chen, S.; Yu, Q.; Homola, J.; Jiang, S., DNA directed protein immobilization on mixed ssDNA/oligo(ethylene glycol) self-assembled monolayers for sensitive biosensors. *Analytical Chemistry* **2004**, 76, (23), 6967-72.
104. Lovrinovic, M.; Spengler, M.; Deutsch, C.; Niemeyer, C. M., Synthesis of covalent DNA-protein conjugates by expressed protein ligation. *Molecular Biosystem* **2005**, 1, (1), 64-9.
105. Harris, J.; Mason, D. E.; Li, J.; Burdick, K. W.; Backes, B. J.; Chen, T.; Shipway, A.; Van Heeke, G.; Gough, L.; Ghaemmaghami, A.; Shakib, F.; Debaene, F.; Winssinger, N., Activity profile of dust mite allergen extract using substrate libraries and functional proteomic microarrays. *Chemistry & Biology* **2004**, 11, (10), 1361-72.
106. Lovrinovic, M.; Seidel, R.; Wacker, R.; Schroeder, H.; Seitz, O.; Engelhard, M.; Goody, R. S.; Niemeyer, C. M., Synthesis of protein-nucleic acid conjugates by expressed protein ligation. *Chemical Communications (Cambridge, England)* **2003**, (7), 822-3.
107. Winssinger, N.; Damoiseaux, R.; Tully, D. C.; Geierstanger, B. H.; Burdick, K.; Harris, J. L., PNA-encoded protease substrate microarrays. *Chemistry & Biology* **2004**, 11, (10), 1351-60.
108. Weng, S.; Gu, K.; Hammond, P. W.; Lohse, P.; Rise, C.; Wagner, R. W.; Wright, M. C.; Kuimelis, R. G., Generating addressable protein microarrays with PROfusion covalent mRNA-protein fusion technology. *Proteomics* **2002**, 2, (1), 48-57.
109. Brandt, O.; Hoheisel, J. D., Peptide nucleic acids on microarrays and other biosensors. *Trends in Biotechnology* **2004**, 22, (12), 617-22.
110. Brandt, O.; Feldner, J.; Stephan, A.; Schroder, M.; Schnolzer, M.; Arlinghaus, H. F.; Hoheisel, J. D.; Jacob, A., PNA microarrays for hybridisation of unlabelled DNA samples. *Nucleic Acids Research* **2003**, 31, (19), e119.
111. Suh, K. Y.; Khademhosseini, A.; Jon, S.; Langer, R., Direct confinement of individual viruses within polyethylene glycol (PEG) nanowells. *Nano Letters* **2006**, 6, (6), 1196-201.
112. Cheung, C. L.; Camarero, J. A.; Woods, B. W.; Lin, T.; Johnson, J. E.; De Yoreo, J. J., Fabrication of Assembled Virus Nanostructures on Templates of Chemoselective Linkers Formed by Scanning Probe Nanolithography. In 2003; Vol. 125, pp 6848-6849.
113. Yi, H.; Nisar, S.; Lee, S. Y.; Powers, M. A.; Bentley, W. E.; Payne, G. F.; Ghodssi, R.; Rubloff, G. W.; Harris, M. T.; Culver, J. N., Patterned assembly of genetically modified viral nanotemplates via nucleic acid hybridization. *Nano Letters* **2005**, 5, (10), 1931-6.
114. Castel, D.; Pitaval, A.; Debily, M. A.; Gidrol, X., Cell microarrays in drug discovery. *Drug Discovery Today* **2006**, 11, (13-14), 616-22.
115. Chen, D. S.; Soen, Y.; Stuge, T. B.; Lee, P. P.; Weber, J. S.; Brown, P. O.; Davis, M. M., Marked differences in human melanoma antigen-specific T cell responsiveness after vaccination using a functional microarray. *PLoS medicine* **2005**, 2, (10), e265.
116. Soen, Y.; Chen, D. S.; Kraft, D. L.; Davis, M. M.; Brown, P. O., Detection and characterization of cellular immune responses using peptide-MHC microarrays. *PLoS biology* **2003**, 1, (3), E65.

117. Ziauddin, J.; Sabatini, D. M., Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature* **2001**, 411, (6833), 107-10.
118. Wheeler, D. B.; Carpenter, A. E.; Sabatini, D. M., Cell microarrays and RNA interference chip away at gene function. *Nature Genetics* **2005**, 37 Suppl, S25-30.
119. Schaack, B.; Reboud, J.; Combe, S.; Fouqué, B.; Berger, F.; Boccard, S.; Filhol-Cochet, O.; Chatelain, F., A "DropChip" Cell Array for DNA and siRNA Transfection Combined with Drug Screening. *Nanobiotechnology* **2005**, 1, (2), 183-189.
120. Kato, K.; Umezawa, K.; Miyake, M.; Miyake, J.; Nagamune, T., Transfection microarray of nonadherent cells on an oleyl poly(ethylene glycol) ether-modified glass slide. *Biotechniques* **2004**, 37, (3), 444-8, 450, 452.
121. Flaim, C. J.; Chien, S.; Bhatia, S. N., An extracellular matrix microarray for probing cellular differentiation. *Nature Methods* **2005**, 2, (2), 119-25.
122. They, M.; Racine, V.; Pepin, A.; Piel, M.; Chen, Y.; Sibarita, J. B.; Bornens, M., The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nature Cell Biology* **2005**, 7, (10), 947-53.
123. Bailey, S. N.; Sabatini, D. M.; Stockwell, B. R., Microarrays of small molecules embedded in biodegradable polymers for use in mammalian cell-based screens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, 101, (46), 16144-9.
124. Simon, R.; Sauter, G., Tissue microarray (TMA) applications: implications for molecular medicine. *Expert reviews in Molecular Medicine* **2003**, 2003, 1-12.
125. LeBaron, M. J.; Crismon, H. R.; Utama, F. E.; Neilson, L. M.; Sultan, A. S.; Johnson, K. J.; Andersson, E. C.; Rui, H., Ultrahigh density microarrays of solid samples. *Nature Methods* **2005**, 2, (7), 511-3.
126. Bubendorf, L., High-throughput microarray technologies: from genomics to clinics. *European Urology* **2001**, 40, (2), 231-8.
127. Ginestier, C.; Charafe-Jauffret, E.; Bertucci, F.; Eisinger, F.; Geneix, J.; Bechlian, D.; Conte, N.; Adelaide, J.; Toiron, Y.; Nguyen, C.; Viens, P.; Mozziconacci, M. J.; Houlgatte, R.; Birnbaum, D.; Jacquemier, J., Distinct and complementary information provided by use of tissue and DNA microarrays in the study of breast tumor markers. *American Journal of Pathology* **2002**, 161, (4), 1223-33.
128. Hyman, E.; Kauraniemi, P.; Hautaniemi, S.; Wolf, M.; Mousses, S.; Rozenblum, E.; Ringner, M.; Sauter, G.; Monni, O.; Elkahloun, A.; Kallioniemi, O. P.; Kallioniemi, A., Impact of DNA amplification on gene expression patterns in breast cancer. *Cancer Research* **2002**, 62, (21), 6240-5.
129. Peterson, R. T.; Link, B. A.; Dowling, J. E.; Schreiber, S. L., Small molecule developmental screens reveal the logic and timing of vertebrate development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, 97, (24), 12965-9.
130. Lee, M. Y.; Park, C. B.; Dordick, J. S.; Clark, D. S., Metabolizing enzyme toxicology assay chip (MetaChip) for high-throughput microscale toxicity analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, (4), 983-7.
131. Hu, Y.; Chen, G. Y.; Yao, S. Q., Activity-based high-throughput screening of enzymes by using a DNA microarray. *Angewandte Chemie (International Edition)* **2005**, 44, (7), 1048-53.
132. Kanan, M. W.; Rozenman, M. M.; Sakurai, K.; Snyder, T. M.; Liu, D. R., Reaction discovery enabled by DNA-templated synthesis and in vitro selection. *Nature* **2004**, 431, (7008), 545-9.
133. Yeo, D. S.; Panicker, R. C.; Tan, L. P.; Yao, S. Q., Strategies for immobilization of biomolecules in a microarray. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2004**, 7, (3), 213-21.
134. Haab, B. B.; Dunham, M. J.; Brown, P. O., Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biology* **2001**, 2, (2), RESEARCH0004.
135. Bussow, K.; Cahill, D.; Nietfeld, W.; Bancroft, D.; Scherzinger, E.; Lehrach, H.; Walter, G., A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library. *Nucleic Acids Research* **1998**, 26, (21), 5007-8.

136. Lee, Y.; Lee, E. K.; Cho, Y. W.; Matsui, T.; Kang, I. C.; Kim, T. S.; Han, M. H., ProteoChip: a highly sensitive protein microarray prepared by a novel method of protein immobilization for application of protein-protein interaction studies. *Proteomics* **2003**, 3, (12), 2289-304.
137. Ouyang, Z.; Takats, Z.; Blake, T. A.; Gologan, B.; Guymon, A. J.; Wiseman, J. M.; Oliver, J. C.; Davisson, V. J.; Cooks, R. G., Preparing protein microarrays by soft-landing of mass-selected ions. *Science* **2003**, 301, (5638), 1351-4.
138. Green, N. M.; Toms, E. J., The properties of subunits of avidin coupled to sepharose. *The Biochemical Journal* **1973**, 133, (4), 687-700.
139. Pavlickova, P.; Jensen, N. M.; Paul, H.; Schaeferling, M.; Giammasi, C.; Kruschina, M.; Du, W. D.; Theisen, M.; Ibba, M.; Ortigao, F.; Kambhampati, D., Antibody detection in human serum using a versatile protein chip platform constructed by applying nanoscale self-assembled architectures on gold. *Journal of Proteome Research* **2002**, 1, (3), 227-31.
140. Lue, R. Y.; Chen, G. Y.; Hu, Y.; Zhu, Q.; Yao, S. Q., Versatile protein biotinylation strategies for potential high-throughput proteomics. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (4), 1055-62.
141. Lesaichere, M. L.; Lue, R. Y.; Chen, G. Y.; Zhu, Q.; Yao, S. Q., Intein-mediated biotinylation of proteins and its application in a protein microarray. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (30), 8768-9.
142. Zhu, H.; Bilgin, M.; Bangham, R.; Hall, D.; Casamayor, A.; Bertone, P.; Lan, N.; Jansen, R.; Bidlingmaier, S.; Houfek, T.; Mitchell, T.; Miller, P.; Dean, R. A.; Gerstein, M.; Snyder, M., Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* **2001**, 293, (5537), 2101-5.
143. Ofir, K.; Berdichevsky, Y.; Benhar, I.; Azriel-Rosenfeld, R.; Lamed, R.; Barak, Y.; Bayer, E. A.; Morag, E., Versatile protein microarray based on carbohydrate-binding modules. *Proteomics* **2005**, 5, (7), 1806-14.
144. Kawahashi, Y.; Doi, N.; Takashima, H.; Tsuda, C.; Oishi, Y.; Oyama, R.; Yonezawa, M.; Miyamoto-Sato, E.; Yanagawa, H., In vitro protein microarrays for detecting protein-protein interactions: application of a new method for fluorescence labeling of proteins. *Proteomics* **2003**, 3, (7), 1236-43.
145. Lovrinovic, M.; Niemeyer, C. M., DNA microarrays as decoding tools in combinatorial chemistry and chemical biology. *Angewandte Chemie (International Edition)* **2005**, 44, (21), 3179-83.
146. Lesaichere, M. L.; Uttamchandani, M.; Chen, G. Y.; Yao, S. Q., Developing site-specific immobilization strategies of peptides in a microarray. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, 12, (16), 2079-83.
147. Aina, O. H.; Sroka, T. C.; Chen, M. L.; Lam, K. S., Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers* **2002**, 66, (3), 184-99.
148. Sobek, J.; Bartscherer, K.; Jacob, A.; Hoheisel, J. D.; Angenendt, P., Microarray technology as a universal tool for high-throughput analysis of biological systems. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2006**, 9, (5), 365-80.
149. Caelen, I.; Gao, H.; Sigrist, H., Protein Density Gradients on Surfaces. *Langmuir* **2002**, 18, (7), 2463-2467.
150. Benters, R.; Niemeyer, C. M.; Wohrle, D., Dendrimer-activated solid supports for nucleic acid and protein microarrays. *ChemBiochem* **2001**, 2, (9), 686-94.
151. Houseman, B. T.; Gawalt, E. S.; Mrksich, M., Maleimide-Functionalized Self-Assembled Monolayers for the Preparation of Peptide and Carbohydrate Biochips. *Langmuir* **2003**, 19, (5), 1522-1531.
152. Takahashi, M.; Nokihara, K.; Mihara, H., Construction of a protein-detection system using a loop peptide library with a fluorescence label. *Chemistry & Biology* **2003**, 10, (1), 53-60.
153. Wegner, G. J.; Lee, H. J.; Corn, R. M., Characterization and optimization of peptide arrays for the study of epitope-antibody interactions using surface plasmon resonance imaging. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, (20), 5161-8.
154. Kanoh, N.; Kumashiro, S.; Simizu, S.; Kondoh, Y.; Hatakeyama, S.; Tashiro, H.; Osada, H., Immobilization of natural products on glass slides by using a photoaffinity reaction and the detection

- of protein-small-molecule interactions. *Angewandte Chemie (International Edition)* **2003**, 42, (45), 5584-7.
155. McGall, G.; Labadie, J.; Brock, P.; Wallraff, G.; Nguyen, T.; Hinsberg, W., Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1996**, 93, (24), 13555-60.
156. Singh-Gasson, S.; Green, R. D.; Yue, Y.; Nelson, C.; Blattner, F.; Sussman, M. R.; Cerrina, F., Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nature Biotechnology* **1999**, 17, (10), 974-8.
157. Defrancq, E.; Hoang, A.; Vinet, F.; Dumy, P., Oxime bond formation for the covalent attachment of oligonucleotides on glass support. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, 13, (16), 2683-2686.
158. Burchak, O. N.; Jaquinod, M.; Cottin, C.; Mugherli, L.; Iwai, K.; Chatelain, F.; Balakirev, M. Y., Chemoenzymatic Ubiquitination of Artificial Substrates. *ChemBiochem* **2006**, 7, (11), 1667-1669.
159. Frank, R., The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *Journal of Immunological Methods* **2002**, 267, (1), 13-26.
160. Pellois, J. P.; Zhou, X.; Srivannavit, O.; Zhou, T.; Gulari, E.; Gao, X., Individually addressable parallel peptide synthesis on microchips. *Nature Biotechnology* **2002**, 20, (9), 922-6.
161. Li, S.; Bowerman, D.; Marthandan, N.; Klyza, S.; Luebke, K. J.; Garner, H. R.; Kodadek, T., Photolithographic synthesis of peptoids. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126, (13), 4088-9.
162. Xu, Q.; Lam, K. S., An efficient approach to prepare glyoxylyl functionality on solid-support. *Tetrahedron Letters* **2002**, 43, (25), 4435-4437.
163. Soellner, M. B.; Dickson, K. A.; Nilsson, B. L.; Raines, R. T., Site-specific protein immobilization by Staudinger ligation. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (39), 11790-1.
164. Uttamchandani, M.; Walsh, D. P.; Khersonsky, S. M.; Huang, X.; Yao, S. Q.; Chang, Y. T., Microarrays of tagged combinatorial triazine libraries in the discovery of small-molecule ligands of human IgG. *Journal of Combinatorial Chemistry* **2004**, 6, (6), 862-8.
165. Dillmore, W. S.; Yousaf, M. N.; Mrksich, M., A Photochemical Method for Patterning the Immobilization of Ligands and Cells to Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **2004**, 20, (17), 7223-7231.
166. Kohn, M.; Wacker, R.; Peters, C.; Schroder, H.; Soulere, L.; Breinbauer, R.; Niemeyer, C. M.; Waldmann, H., Staudinger ligation: a new immobilization strategy for the preparation of small-molecule arrays. *Angewandte Chemie (International Edition)* **2003**, 42, (47), 5830-4.
167. Afanassiev, V.; Hanemann, V.; Wolf, S., Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film. *Nucleic Acids Research* **2000**, 28, (12), E66.
168. Arenkov, P.; Kukhtin, A.; Gemmell, A.; Voloshchuk, S.; Chupeeva, V.; Mirzabekov, A., Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. *Analytical Biochemistry* **2000**, 278, (2), 123-31.
169. Guschin, D.; Yershov, G.; Zaslavsky, A.; Gemmell, A.; Shick, V.; Proudnikov, D.; Arenkov, P.; Mirzabekov, A., Manual manufacturing of oligonucleotide, DNA, and protein microchips. *Analytical Biochemistry* **1997**, 250, (2), 203-11.
170. Fukuda, J.; Khademhosseini, A.; Yeo, Y.; Yang, X.; Yeh, J.; Eng, G.; Blumling, J.; Wang, C. F.; Kohane, D. S.; Langer, R., Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures. *Biomaterials* **2006**, 27, (30), 5259-67.
171. Zhou, X.; Zhou, J., Protein microarrays on hybrid polymeric thin films prepared by self-assembly of polyelectrolytes for multiple-protein immunoassays. *Proteomics* **2006**, 6, (5), 1415-26.
172. Fesenko, D. O.; Nasedkina, T. V.; Prokopenko, D. V.; Mirzabekov, A. D., Biosensing and monitoring of cell populations using the hydrogel bacterial microchip. *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, 20, (9), 1860-5.
173. Butler, J. H.; Cronin, M.; Anderson, K. M.; Biddison, G. M.; Chatelain, F.; Cummer, M.; Davi, D. J.; Fisher, L.; Frauendorf, A. W.; Frueh, F. W.; Gjerstad, C.; Harper, T. F.; Kernahan, S. D.; Long, D. Q.; Pho, M.; Walker, J. A., 2nd; Brennan, T. M., In situ synthesis of oligonucleotide arrays by using surface tension. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123, (37), 8887-94.

174. Borchardt, A.; Liberles, S. D.; Biggar, S. R.; Crabtree, G. R.; Schreiber, S. L., Small molecule-dependent genetic selection in stochastic nanodroplets as a means of detecting protein-ligand interactions on a large scale. *Chemistry & Biology* **1997**, 4, (12), 961-8.
175. Mugerli, L.; Chatelain, F.; Balakirev, M., Monitoring proteolytic activity in droplet microarray : a new tool for drug discovery and diagnostic. *Proceedings of μ TAS 2004 8th International Conference on miniaturized Systems in Chemistry and Life Sciences. Malmö, Sweden. 2004.*
176. Okamoto, T.; Suzuki, T.; Yamamoto, N., Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology. *Nature Biotechnology* **2000**, 18, (4), 438-41.
177. Angenendt, P., Progress in protein and antibody microarray technology. *Drug Discovery Today* **2005**, 10, (7), 503-11.
178. Finnskog, D.; Ressine, A.; Laurell, T.; Marko-Varga, G., Integrated protein microchip assay with dual fluorescent- and MALDI read-out. *Journal of Proteome Research* **2004**, 3, (5), 988-94.
179. Schweitzer, B.; Predki, P.; Snyder, M., Microarrays to characterize protein interactions on a whole-proteome scale. *Proteomics* **2003**, 3, (11), 2190-9.
180. Alexandre, I.; Hamels, S.; Dufour, S.; Collet, J.; Zammateo, N.; De Longueville, F.; Gala, J. L.; Remacle, J., Colorimetric silver detection of DNA microarrays. *Analytical Biochemistry* **2001**, 295, (1), 1-8.
181. McDonnell, J. M., Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Current Opinion in Chemical Biology* **2001**, 5, (5), 572-7.
182. Salamon, Z.; Brown, M. F.; Tollin, G., Plasmon resonance spectroscopy: probing molecular interactions within membranes. *Trends in biochemical sciences* **1999**, 24, (6), 213-9.
183. Maillart, E.; Brengel-Pesce, K.; Capela, D.; Roget, A.; Livache, T.; Canva, M.; Levy, Y.; Soussi, T., Versatile analysis of multiple macromolecular interactions by SPR imaging: application to p53 and DNA interaction. *Oncogene* **2004**, 23, (32), 5543-50.
184. Usui-Aoki, K.; Shimada, K.; Nagano, M.; Kawai, M.; Koga, H., A novel approach to protein expression profiling using antibody microarrays combined with surface plasmon resonance technology. *Proteomics* **2005**, 5, (9), 2396-401.
185. Sapsford, K. E.; Liron, Z.; Shubin, Y. S.; Ligler, F. S., Kinetics of antigen binding to arrays of antibodies in different sized spots. *Analytical Chemistry* **2001**, 73, (22), 5518-24.
186. Bischoff, R.; Luidner, T. M., Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life* **2004**, 803, (1), 27-40.
187. Min, D. H.; Su, J.; Mrksich, M., Profiling kinase activities by using a peptide chip and mass spectrometry. *Angewandte Chemie (International Edition)* **2004**, 43, (44), 5973-7.
188. Lee, K. B.; Park, S. J.; Mirkin, C. A.; Smith, J. C.; Mrksich, M., Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography. *Science* **2002**, 295, (5560), 1702-5.
189. Lee, J. H.; Hwang, K. S.; Park, J.; Yoon, K. H.; Yoon, D. S.; Kim, T. S., Immunoassay of prostate-specific antigen (PSA) using resonant frequency shift of piezoelectric nanomechanical microcantilever. *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, 20, (10), 2157-62.
190. Ilic, B.; Caplewski, D.; Craighead, H. G.; Neuzil, P.; Campagnolo, C.; Batt, C., Mechanical resonant immunospecific biological detector. *Applied Physical Letters* **2000**, 77, (3), 450-452.
191. Matsuno, H.; Niikura, K.; Okahata, Y., Design and characterization of asparagine- and lysine-containing alanine-based helical peptides that bind selectively to A.T base pairs of oligonucleotides immobilized on a 27 mhz quartz crystal microbalance. *Biochemistry* **2001**, 40, (12), 3615-22.
192. Lizardi, P. M.; Huang, X.; Zhu, Z.; Bray-Ward, P.; Thomas, D. C.; Ward, D. C., Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nature Genetics* **1998**, 19, (3), 225-32.
193. Schweitzer, B.; Roberts, S.; Grimwade, B.; Shao, W.; Wang, M.; Fu, Q.; Shu, Q.; Laroche, I.; Zhou, Z.; Tchernev, V. T.; Christiansen, J.; Velleca, M.; Kingsmore, S. F., Multiplexed protein profiling on microarrays by rolling-circle amplification. *Nature Biotechnology* **2002**, 20, (4), 359-65.

194. Kingsmore, S. F.; Patel, D. D., Multiplexed protein profiling on antibody-based microarrays by rolling circle amplification. *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, 14, (1), 74-81.
195. Brennan, T. M. Method and apparatus for conducting an array of chemical reactions on a support surface **1994**.
196. You, A. J.; Jackman, R. J.; Whitesides, G. M.; Schreiber, S. L., A miniaturized arrayed assay format for detecting small molecule-protein interactions in cells. *Chemistry & Biology* **1997**, 4, (12), 969-75.
197. Blackwell, H. E.; Perez, L.; Stavenger, R. A.; Tallarico, J. A.; Cope Eatough, E.; Foley, M. A.; Schreiber, S. L., A one-bead, one-stock solution approach to chemical genetics: part 1. *Chemistry & Biology* **2001**, 8, (12), 1167-82.
198. Spring, D. R.; Krishnan, S.; Blackwell, H. E.; Schreiber, S. L., Diversity-oriented synthesis of biaryl-containing medium rings using a one bead/one stock solution platform. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (7), 1354-63.
199. Bowman, M. D.; Jacobson, M. M.; Blackwell, H. E., Discovery of fluorescent cyanopyridine and deazalumazine dyes using small molecule macroarrays. *Organic Letters* **2006**, 8, (8), 1645-8.
200. Lin, Q.; O'Neill, J. C.; Blackwell, H. E., Small molecule macroarray construction via Ugi four-component reactions. *Organic Letters* **2005**, 7, (20), 4455-8.
201. Ming, W.; Wu, D.; van Benthem, R.; de With, G., Superhydrophobic films from raspberry-like particles. *Nano Letters* **2005**, 5, (11), 2298-301.
202. Carey; Sundberg, *Chimie Organique Avancée*. DeBoeck Université **1997**; Vol. 2, p 38.
203. Domling, A.; Ugi, I. I., Multicomponent Reactions with Isocyanides. *Angewandte Chemie (International Edition)* **2000**, 39, (18), 3168-3210.
204. Bienayme, H.; Bouzid, K., A new heterocyclic multicomponent reaction for the combinatorial synthesis of fused 3-aminoimidazoles. *Angewandte Chemie (International Edition)* **1998**, 37, (16), 2234-2237.
205. Blackburn, C.; Guan, B.; Fleming, P.; Shiosaki, K.; Tsai, S., Parallel synthesis of 3-aminoimidazo[1,2-a]pyridines and pyrazines by a new three-component condensation. *Tetrahedron Letters* **1998**, 39, (22), 3635-3638.
206. Zhuang, Z. P.; Kung, M. P.; Wilson, A.; Lee, C. W.; Plossl, K.; Hou, C.; Holtzman, D. M.; Kung, H. F., Structure-activity relationship of imidazo[1,2-a]pyridines as ligands for detecting beta-amyloid plaques in the brain. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, 46, (2), 237-43.
207. Schechter, I.; Berger, A., On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1967**, 27, (2), 157-62.
208. Puente, X. S.; Sanchez, L. M.; Overall, C. M.; Lopez-Otin, C., Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nature Reviews Genetics* **2003**, 4, (7), 544-58.
209. Cicero, D. O.; Barbato, G.; Koch, U.; Ingallinella, P.; Bianchi, E.; Nardi, M. C.; Steinkuhler, C.; Cortese, R.; Matassa, V.; De Francesco, R.; Pessi, A.; Bazzo, R., Structural characterization of the interactions of optimized product inhibitors with the N-terminal proteinase domain of the hepatitis C virus (HCV) NS3 protein by NMR and modelling studies. *Journal of Molecular Biology* **1999**, 289, (2), 385-96.
210. Lopez-Otin, C.; Overall, C. M., Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nature Reviews Molecular and Cellular Biology* **2002**, 3, (7), 509-19.
211. Tong, L., Viral proteases. *Chemical Reviews* **2002**, 102, (12), 4609-26.
212. Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P., Protease inhibitors: current status and future prospects. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, 43, (3), 305-41.
213. Temesgen, Z.; Warnke, D.; Kasten, M. J., Current status of antiretroviral therapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **2006**, 7, (12), 1541-54.
214. Borgono, C. A.; Michael, I. P.; Diamandis, E. P., Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer. *Molecular Cancer Research* **2004**, 2, (5), 257-80.
215. Joyce, J. A.; Baruch, A.; Chehade, K.; Meyer-Morse, N.; Giraudo, E.; Tsai, F. Y.; Greenbaum, D. C.; Hager, J. H.; Bogyo, M.; Hanahan, D., Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell* **2004**, 5, (5), 443-53.

216. Wilson, S. R.; Gallagher, S.; Warpeha, K.; Hawthorne, S. J., Amplification of MMP-2 and MMP-9 production by prostate cancer cell lines via activation of protease-activated receptors. *The Prostate* **2004**, 60, (2), 168-74.
217. OMS., **1998**.
218. OMS., **2000**.
219. Berenguer, M.; Wright, T. L., Hepatitis C virus in the transplant setting. *Antiviral therapy* **1998**, 3, 125-136.
220. Lorenz, I. C.; Marcotrigiano, J.; Dentzer, T. G.; Rice, C. M., Structure of the catalytic domain of the hepatitis C virus NS2-3 protease. *Nature* **2006**, 442, (7104), 831-5.
221. Pause, A.; Kukulj, G.; Bailey, M.; Brault, M.; Do, F.; Halmos, T.; Lagace, L.; Maurice, R.; Marquis, M.; McKercher, G.; Pellerin, C.; Pilote, L.; Thibeault, D.; Lamarre, D., An NS3 serine protease inhibitor abrogates replication of subgenomic hepatitis C virus RNA. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, (22), 20374-20380.
222. Lin, K.; Perni, R. B.; Kwong, A. D.; Lin, C., VX-950, a novel hepatitis C virus (HCV) NS3-4A protease inhibitor, exhibits potent antiviral activities in HCV replicon cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2006**, 50, (5), 1813-1822.
223. Anrather, D.; Smetazko, M.; Saba, M.; Alguel, Y.; Schalkhammer, T., Supported membrane nanodevices. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2004**, 4, (1-2), 1-22.
224. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie (International Edition)* **2001**, 40, (11), 2004-2021.
225. Bunyapaiboonsri, T.; Ramstrom, O.; Lohmann, S.; Lehn, J. M.; Peng, L.; Goeldner, M., Dynamic deconvolution of a pre-equilibrated dynamic combinatorial library of acetylcholinesterase inhibitors. *ChemBiochem* **2001**, 2, (6), 438-44.
226. De Francesco, R.; Pessi, A.; Steinkuhler, C., The hepatitis C virus NS3 proteinase: structure and function of a zinc-containing serine proteinase. *Antiviral Therapy* **1998**, 3, (Suppl 3), 99-109.
227. Wenqian, Y.; Gao, X.; Wang, B., Boronic acid compounds as potential pharmaceutical agents *Medicinal Research Reviews* **2003**, 23, (3), 346-368.
228. Kettner, C. A.; Shenvi, A. B., Inhibition of the serine proteases leukocyte elastase, pancreatic elastase, cathepsin G, and chymotrypsin by peptide boronic acids. *Journal of Biological Chemistry* **1984**, 259, (24), 15106-14.
229. Bennett, J. M.; Campbell, A. D.; Campbell, A. J.; Carr, M. G.; Dunsdon, R. M.; Greening, J. R.; Hurst, D. N.; Jennings, N. S.; Jones, P. S.; Jordan, S.; Kay, P. B.; O'Brien, M. A.; King-Underwood, J.; Raynham, T. M.; Wilkinson, C. S.; Wilkinson, T. C.; Wilson, F. X., The identification of alpha-ketoamides as potent inhibitors of hepatitis C virus NS3-4A proteinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, 11, (3), 355-7.
230. Priestley, E. S.; Decicco, C. P., 1-Aminocyclopropaneboronic acid: synthesis and incorporation into an inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease. *Organic Letters* **2000**, 2, (20), 3095-7.
231. Zhang, X.; Schmitt, A. C.; Jiang, W.; Wasserman, Z.; Decicco, C. P., Design and synthesis of potent, non-peptide inhibitors of HCV NS3 protease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, 13, (6), 1157-60.
232. Sayer, J. M.; Peskin, M.; Jencks, W. P., Imine-Forming Elimination Reactions. I. General Base Acid Catalysis and Influence of the Nitrogen Substituent on Rates and Equilibria for Carbinolamine Dehydration. *Journal of the American Chemical Society* **1973** 95, (13), 4277 - 4287.
233. Hayes, B. L., *Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light*. CEM Publishing: **2002**.
234. Kappe, C. O., Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angewandte Chemie (International Edition)* **2004**, 43, (46), 6250-84.
235. Dogra, S. K., Solvatochromism and prototropism in 6-aminonicotinic acid. *Journal of Luminescence* **2005**, (114), 213-226.
236. Kovalska, V. B.; Losytskyy, M. Y.; Kryvorotenko, D. V.; Balanda, A. O.; Tokar, V. P.; Yarmoluk, S. M., Synthesis of novel fluorescent styryl dyes based on the imidazo[1,2-a]pyridinium

- chromophore and their spectral-fluorescent properties in the presence of nucleic acids and proteins. *Dyes and Pigments* **2006**, 68, 39-45.
237. Aizenberg, J.; Black, A. J.; Whitesides, G. M., Control of crystal nucleation by patterned self-assembled monolayers. *Nature* **1999**, 398, (6727), 495-498.
238. Burchak, O. N.; Mughlerli, L.; Chatelain, F.; Balakirev, M. Y., Fluorescein-based amino acids for solid phase synthesis of fluorogenic protease substrates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, 14, (8), 2559-68.
239. Klonis, N.; Sawyer, W. H., Spectral properties of the prototropic forms of fluorescein in aqueous solution *Journal of Fluorescence* **1996**, 6, (3), 147-157.
240. Martin, M. M.; Lindqvist, L., The pH dependence of fluorescein fluorescence. *Journal of Luminescence* **1975**, 10, (6), 381-390
241. Orndorff, W. R.; Hemmer, A. J., Fluorescein and some of its derivatives. *Journal of the American Chemical Society* **1927**, 49, (5), 1272 - 1280.
242. Tsien, R. Y., Fluorescent indicators of ion concentrations. *Methods Cell Biol* **1989**, 30, 127-56.
243. Adamczyk, M.; Grote, J.; Moore, J. A., Chemoenzymatic synthesis of 3'-O-(carboxyalkyl)fluorescein labels. *Bioconjugate Chemistry* **1999**, 10, (3), 544-7.
244. Gao, J.; Wang, P.; Giese, R. W., Xanthamide fluorescent dyes. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, (24), 6397-401.
245. Lohse, J.; Nielsen, P. E.; Harrit, N.; Dahl, O., Fluorescein-conjugated lysine monomers for solid phase synthesis of fluorescent peptides and PNA oligomers. *Bioconjugate Chemistry* **1997**, 8, (4), 503-9.
246. Leon, S.; Quarrell, R.; Lowe, G., Evaluation of resins for on-bead screening: a study of papain and chymotrypsin specificity using PEGA-bound combinatorial peptide libraries. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1998**, 8, (21), 2997-3002.
247. Schechter, I.; Berger, A., On the active site of proteases. 3. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1968**, 32, (5), 898-902.
248. McKeen, C. M.; Brown, L. J.; Nicol, J. T.; Mellor, J. M.; Brown, T., Synthesis of fluorophore and quencher monomers for use in scorpion primers and nucleic acid structural probes. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2003**, 1, (13), 2267-75.
249. Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchnak, V., The "One-Bead-One-Compound" Combinatorial Library Method. *Chemical Reviews* **1997**, 97, (2), 411-448.
250. Olivos, H. J.; Bachhawat-Sikder, K.; Kodadek, T., Quantum dots as a visual aid for screening bead-bound combinatorial libraries. *ChemBiochem* **2003**, 4, (11), 1242-5.
251. Ria, R.; Loverro, G.; Vacca, A.; Ribatti, D.; Cormio, G.; Roccaro, A. M.; Selvaggi, L., Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 agree with progression of ovarian endometriomas. *European Journal of Clinical Investigation* **2002**, 32, (3), 199-206.
252. Balakirev, M.; Mughlerli, L.; Chatelain, F. Méthode d'analyse hautement parallèle de réactions enzymatiques et ses applications. **2004**.
253. Goddard, J. P.; Reymond, J. L., Recent advances in enzyme assays. *Trends in Biotechnology* **2004**, 22, (7), 363-70.
254. Portaro, F. C.; Santos, A. B.; Cezari, M. H.; Juliano, M. A.; Juliano, L.; Carmona, E., Probing the specificity of cysteine proteinases at subsites remote from the active site: analysis of P4, P3, P2' and P3' variations in extended substrates. *The Biochemical Journal* **2000**, 347 Pt 1, 123-9.
255. Szabelski, M.; Rogiewicz, M.; Wicz, W., Fluorogenic peptide substrates containing benzoxazol-5-yl-alanine derivatives for kinetic assay of cysteine proteases. *Analytical Biochemistry* **2005**, 342, (1), 20-7.
256. Eisenthal, R. R.; Danson, M. J., *Enzyme Assays: A Practical Approach*. Oxford university press: **2002**.
257. Melo, R. L.; Barbosa Pozzo, R. C.; Alves, L. C.; Perissutti, E.; Caliendo, G.; Santagada, V.; Juliano, L.; Juliano, M. A., Synthesis and hydrolysis by cathepsin B of fluorogenic substrates with

- the general structure benzoyl-X-ARG-MCA containing non-natural basic amino acids at position X. *Biochimica Biophysica Acta* **2001**, 1547, (1), 82-94.
258. Leytus, S. P.; Patterson, W. L.; Mangel, W. F., New class of sensitive and selective fluorogenic substrates for serine proteinases. Amino acid and dipeptide derivatives of rhodamine. *The Biochemical Journal* **1983**, 215, (2), 253-60.
259. Boonacker, E.; Elferink, S.; Bardai, A.; Fleischer, B.; Van Noorden, C. J., Fluorogenic substrate [Ala-Pro]2-cresyl violet but not Ala-Pro-rhodamine 110 is cleaved specifically by DPPiV activity: a study in living Jurkat cells and CD26/DPPiV-transfected Jurkat cells. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **2003**, 51, (7), 959-68.
260. Fersht, A., *Enzyme Structure and Mechanism*. W.H. Freeman & Co: New York, **1985**.
261. Mughlerli, L.; Burchak, O. N.; Chatelain, F.; Balakirev, M. Y., Fluorogenic ester substrates to assess proteolytic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, 16, (17), 4488-91.
262. Drouet, C.; Bouillet, L.; Csopaki, F.; Colomb, M. G., Hepatitis C virus NS3 serine protease interacts with the serpin C1 inhibitor. *FEBS Letters* **1999**, 458, (3), 415-8.
263. Shimizu, Y.; Yamaji, K.; Masuho, Y.; Yokota, T.; Inoue, H.; Sudo, K.; Satoh, S.; Shimotohno, K., Identification of the sequence on NS4A required for enhanced cleavage of the NS5A/5B site by hepatitis C virus NS3 protease. *Journal of Virology* **1996**, 70, (1), 127-32.
264. Zhang, R.; Beyer, B. M.; Durkin, J.; Ingram, R.; Njoroge, F. G.; Windsor, W. T.; Malcolm, B. A., A continuous spectrophotometric assay for the hepatitis C virus serine protease. *Analytical Biochemistry* **1999**, 270, (2), 268-75.
265. Venkatraman, S.; Njoroge, F. G.; Girijavallabhan, V. M.; Madison, V. S.; Yao, N. H.; Prongay, A. J.; Butkiewicz, N.; Pichardo, J., Design and synthesis of depeptidized macrocyclic inhibitors of hepatitis C NS3-4A protease using structure-based drug design. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48, (16), 5088-91.
266. Kakiuchi, N.; Nishikawa, S.; Hattori, M.; Shimotohno, K., A high throughput assay of the hepatitis C virus nonstructural protein 3 serine proteinase. *Journal of Virological Methods* **1999**, 80, (1), 77-84.
267. Taliani, M.; Bianchi, E.; Narjes, F.; Fossatelli, M.; Urbani, A.; Steinkuhler, C.; De Francesco, R.; Pessi, A., A continuous assay of hepatitis C virus protease based on resonance energy transfer depeptide substrates. *Analytical Biochemistry* **1996**, 240, (1), 60-7.
268. Tang, Y.; Lu, J.; Sheng, L.; Tong, X.; Diwu, Z.; Hong, A. In *A Sensitive Fluorimetric Assay for Detection of Hepatitis C NS3/4A Viral Protease Using a Novel FRET Peptide Substrate*, **2005**

ANNEXE I : ANALYSE DE LA VARIANCE A 2 FACTEURS

Effet du facteur M et de diverses concentrations d'enzyme

1. Construction de l'expérience

La concentration en substrat S est fixée. La concentration en enzyme prend cinq valeurs différentes dont une correspond en fait à la présence d'un inhibiteur. La moitié des micro-réacteurs contiennent le **facteur M**, c'est-à-dire des **billes magnétiques**, l'autre moitié non. Chaque condition est répétée vingt fois pour un total de 200 mesures. Le schéma de l'expérience est détaillé dans le tableau ci-dessous :

				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Column
				M	M	M	M	M	Non M	Non M	Non M	Non M	Non M	Facteur M
100µg/mL	1	1	Inh+0,4 U/mL											
		2	0,05 U/mL											
		3	0,1 U/mL											
		4	0,2U/mL											
		5	0,4U/mL											
		6	Inh+0,4 U/mL											
		7	0,05 U/mL											
		8	0,1 U/mL											
		9	0,2U/mL											
		10	0,4U/mL											
	2	1	Inh+0,4 U/mL											
		2	0,05 U/mL											
		3	0,1 U/mL											
		4	0,2U/mL											
		5	0,4U/mL											
		6	Inh+0,4 U/mL											
		7	0,05 U/mL											
		8	0,1 U/mL											
		9	0,2U/mL											
		10	0,4U/mL											
S	Block	Row	C											

Les grandeurs reportées dans les tableaux de données seront toujours en *unités arbitraires de fluorescence (AFU)*. Les mesures sont effectuées dans des micro-réacteurs séparés et les cycles de lavages du robot garantissent l'absence de contamination d'un échantillon par le précédent, les mesures effectuées sont donc *a priori indépendantes*.

1. Données brutes

Les données obtenues sont reportées dans le tableau suivant :

				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Column
				M	M	M	M	M	Non M	Non M	Non M	Non M	Non M	Facteur M
100µg/mL	1	1	Inh+0,4 U/mL	2285	2373	2413	2486	2455	2413	2442	2479	2553	2638	
		2	0,05 U/mL	3032	3228	3388	3509	3422	3228	3271	3279	3243	3288	
		3	0,1 U/mL	3633	4086	4257	4218	4267	4054	4009	3956	4013	3812	
		4	0,2U/mL	4717	5232	5511	5436	5484	5132	4990	5164	5083	5144	
		5	0,4U/mL	6201	6955	7301	7198	8039	6809	6969	6830	6838	6831	
		6	Inh+0,4 U/mL	2416	2492	2643	2673	2642	2617	2600	2598	2648	2732	
		7	0,05 U/mL	3227	3486	3606	3701	3687	3555	3507	3458	3469	3569	
		8	0,1 U/mL	3843	4107	4396	4411	4403	4168	4167	4133	4123	4228	
		9	0,2U/mL	4881	5307	5530	5630	5650	5368	5294	5259	5269	5353	
		10	0,4U/mL	6135	6822	7707	7444	7399	7005	6885	6912	6997	6997	
	2	1	Inh+0,4 U/mL	2563	2519	2461	2566	2557	2491	2504	2589	2475	2567	
		2	0,05 U/mL	3448	3362	3434	3469	3470	3337	3343	3300	3161	3103	
		3	0,1 U/mL	4274	4213	4228	4289	4311	4118	4109	4077	3852	3509	
		4	0,2U/mL	5393	5302	5463	5524	5554	5380	5353	5366	5009	4632	
		5	0,4U/mL	7153	7177	7112	7203	7306	7210	7388	7310	6756	6228	
		6	Inh+0,4 U/mL	2730	2626	2605	2589	2609	2688	2800	2662	2546	2582	
		7	0,05 U/mL	3807	3598	3665	3627	3663	3595	3612	3569	3340	3285	
		8	0,1 U/mL	4597	4419	4438	4406	4456	4325	4353	4323	3980	3934	
		9	0,2U/mL	5853	5547	5566	5641	5655	5549	5601	5520	5127	4991	
		10	0,4U/mL	7355	7300	7362	7355	7409	7452	7219	6698	6625	6243	
S	Block	Row	C											

2. Analyse statistique

a) Méthode employée : ANOVA à 2 facteurs contrôlés

La méthode de l'analyse de la variance à deux facteurs contrôlés semble ici parfaitement adaptée, avec comme premier facteur à cinq modalités, la concentration en enzyme C, et comme deuxième facteur à deux modalités, la présence ou non du facteur M. Les deux facteurs contrôlés ont été croisés dans le tableau de construction de l'expérience.

Au vu du grand nombre de valeurs mesurées (n = 200), il paraît approprié de choisir un seuil alpha de 0,005 pour les tests (soit 10 fois inférieur au seuil 5% utilisé habituellement). En effet, les tests statistiques sont très conservatifs, ce qui diminue fortement les chances de décider H_0 pour de grandes valeurs de n.

On utilise le modèle linéaire généralisé de Minitab afin d'obtenir le tableau d'analyse de la variance à deux facteurs contrôlés C et M :

Facteur	Type	Niveaux	Valeurs
C	fixe	5	C0,05 C0,1 C0,2 C0,4 C0,4+I
M	fixe	2	M Non M

Analyse de la variance pour AFU, en utilisant la SC ajustée pour les tests

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
C	4	489666056	489666056	122416514	2104,59	0,000
M	1	1191659	1191659	1191659	20,49	0,000
C*M	4	648363	648363	162091	2,79	0,028
Erreur	190	11051639	11051639	58167		

Total 199 502557716

Les p-valeurs des facteurs C et M sont très inférieures à 0,005 tandis que l'interaction de ces deux facteurs C*M conduit à une p-valeur supérieure au seuil 0,005, donc **au seuil de 0,5%, le facteur concentration C et le facteur M ont tous les deux un effet sur la fluorescence mesurée AFU, mais pas leur interaction.**

Les comparaisons multiples sont également obtenues avec le modèle linéaire généralisé de Minitab, avec un test de Tukey. Les résultats des calculs (à la fin de cette annexe) permettent de construire les tableaux suivants :

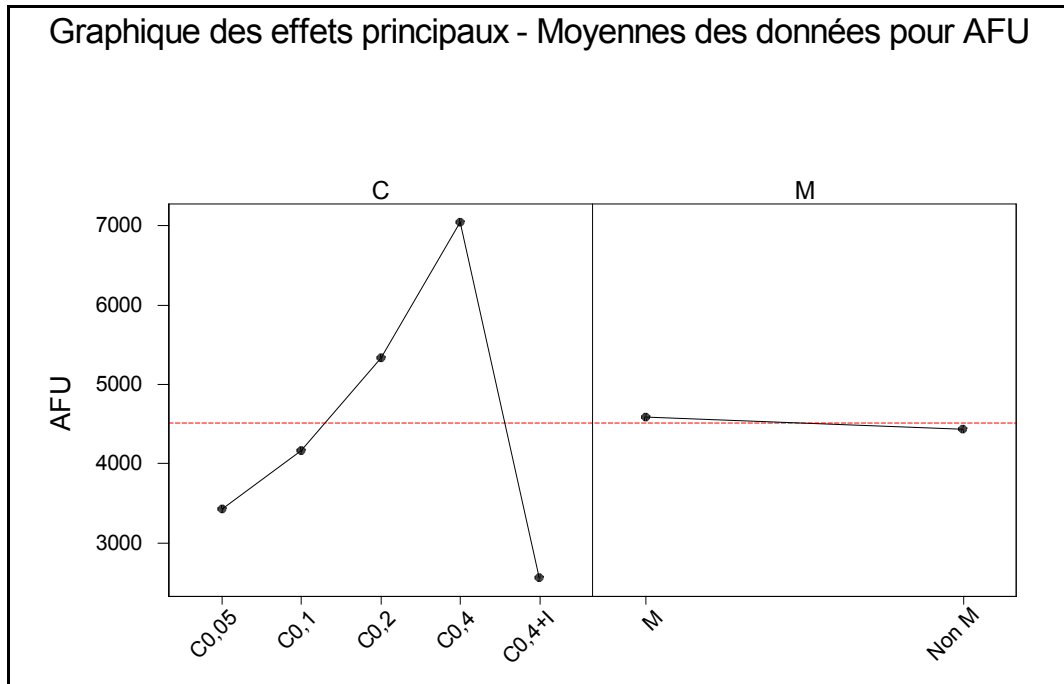
Facteur C :

Variable	C	N	Moyenne	Groupes homogènes
AFU	C0,4+I	40	2558,2	A
	C0,05	40	3433,3	B
	C0,1	40	4162,4	C
	C0,2	40	5336,5	D
	C0,4	40	7053,4	E

Facteur M :

Variable	M	N	Moyenne	Groupes homogènes
AFU	M	100	4586	A
	Non M	100	4432	B

Ce qui revient à dire que **toutes les modalités des facteurs ont un effet différent au seuil de 0,5%**. De plus le facteur M conduit à une valeur AFU plus élevée et donc il accélère la réaction. De même, plus la concentration en enzyme est élevée, plus la réaction est rapide, ce qui correspond bien au résultat attendu. Enfin, la concentration maximale d'enzyme en présence de l'inhibiteur I conduit logiquement à la plus petite valeur de fluorescence observée. Pour ce qui est de l'interaction, on a vu qu'il n'y avait pas d'effet sur AFU, il est donc inutile d'analyser les comparaisons deux à deux. **Attention, il reste encore à vérifier les conditions d'application de l'ANOVA**, à savoir la normalité des résidus et l'homogénéité des variances.



b) Vérification des conditions d'application des méthodes

L'indépendance est *a priori* garantie par la mise en oeuvre de l'observation.

La normalité des résidus n'est pas vérifiée d'après les calculs effectués avec la méthode de Ryan-Joiner de Minitab.

On peut appliquer le test de Bartlett pour vérifier l'homogénéité des variances, puisque l'on a plus de 5 mesures par échantillon :

```
Test de Bartlett (loi normale)      Statistique du test : 65,122
P :                                0,000
```

L'homogénéité des variances n'est pas vérifiée non plus.

c) Résultats

L'analyse de la variance à deux facteurs contrôlés nous a permis de conclure à un effet pour chaque facteur (différent pour chaque modalité) *mais les conditions d'applications ne sont pas vérifiées.*

Différentes transformations mathématiques des données ont alors été tentées :

Logarithme népérien : On observe l'effet des facteurs C et M (toutes les modalités sont différentes) mais pas de l'interaction; Homogénéité des variances vérifiée; Normalité des résidus non vérifiée.

Racine carrée : On observe l'effet des facteurs C et M (toutes les modalités sont différentes) mais pas de l'interaction; Homogénéité des variances non vérifiée ; Normalité des résidus non vérifiée.

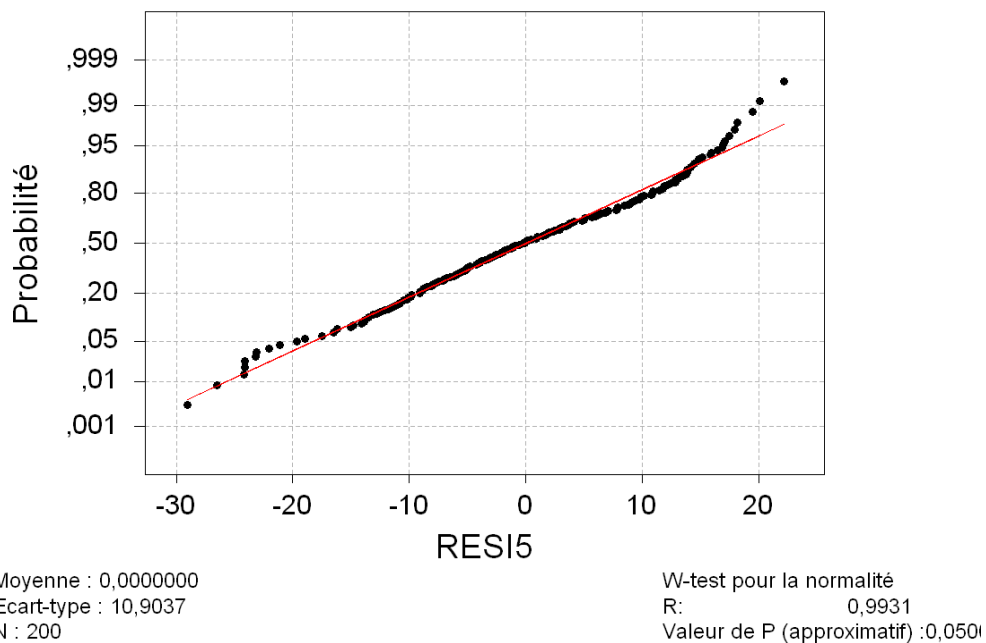
Racine cubique : On observe l'effet des facteurs C et M (toutes les modalités sont différentes) mais pas de l'interaction; Homogénéité des variances vérifiée; Normalité des résidus non vérifiée.

Mais la normalité des résidus de l'analyse de la variance n'est jamais vérifiée.

La seule solution permettant d'obtenir la normalité et l'homogénéité des variances consiste à transformer les mesures de fluorescence en rangs, puis à utiliser les rangs obtenus comme des observations.

La normalité des résidus est alors vérifiée :

Graphique de la courbe normale ou droite de Henry



L'homogénéité des variances est également vérifiée :

Test de Bartlett (loi normale) Statistique du test : 2,462

P : 0,982

Cela permet de valider *l'effet des facteurs C et M* sur les rangs de la fluorescence AFU mesurée et *l'absence d'effet de l'interaction C*M*. Les comparaisons multiples (test de Tukey, détail à la fin de cette annexe) permettent d'établir que *toutes les modalités des facteurs ont un effet différent* sur les rangs de la fluorescence AFU :

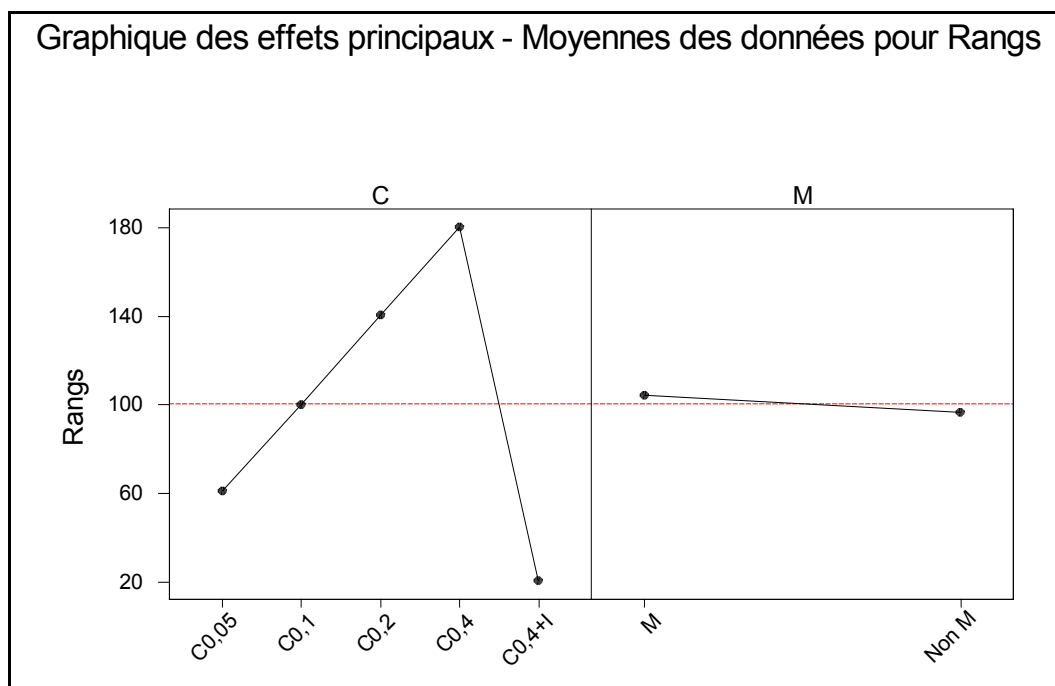
Facteur C :

Variable	C	N	Moyenne	Groupes homogènes
Rangs	C0,4+I	40	20,50	A
	C0,05	40	60,96	B
	C0,1	40	100,04	C
	C0,2	40	140,50	D
	C0,4	40	180,50	E

Facteur M :

Variable	M	N	Moyenne	Groupes homogènes
Rangs	M	100	104,20	A
	Non M	100	96,80	B

Par cette méthode on valide que, au seuil de 0,5% la présence du facteur M conduit à des rangs plus élevés que son absence, que plus la concentration en enzyme est élevée, plus les rangs le sont et que la présence de l'inhibiteur I correspond aux rangs les plus faibles.



4. Discussion

Les données ainsi que toutes les transformations envisagées conduisent toujours à la conclusion que les deux facteurs ont un effet, mais pas leur interaction, et indiquent aussi que toutes les modalités des facteurs ont un effet différent. Après classement des moyennes de chaque modalité, cela nous amène à deux conclusions importantes :

- La réaction biochimique se déroule correctement dans les micro-réacteurs de la puce, et on observe bien la *dépendance attendue vis-à-vis de la concentration* en enzyme (plus elle est élevée, plus la réaction est rapide) ainsi qu'un fort ralentissement en présence d'inhibiteur.
- Le *facteur M accélère la réaction*, mais l'augmentation en AFU n'est que de quelques pourcents (3 à 4%).

Toutes les transformations utilisant des fonctions continues étant bijectives et croissantes, elles n'altèrent pas l'ordre des données.

La seule transformation permettant d'obtenir la normalité, à savoir celle qui associe à chaque valeur son rang (il n'est alors pas surprenant que les *données transformées soient normales*) *conserve également l'ordre des données. Même si elle engendre une perte d'information* (à savoir la « distance en AFU » entre deux valeurs consécutives), *cette*

transformation semble légitime, sachant que l'on désire classer les différentes modalités des facteurs les unes par rapport aux autres.

En conclusion, *le faible effet du facteur M et l'effet très net de la dépendance concentration-vitesse de réaction sont observés significativement au seuil de 0,5%*. La difficulté principale résidait dans la validation des conditions d'application de l'analyse de la variance à deux facteurs, qui a nécessité une transformation des données en leur rang.

Détail des calculs (logiciel Minitab)

Modèle linéaire généralisé : AFU en fonction de C; M

Facteur	Type	Niveaux	Valeurs				
C	fixe	5	C0,05	C0,1	C0,2	C0,4	C0,4+I
M	fixe	2	M	Non M			

Analyse de la variance pour AFU, en utilisant la SC ajustée pour les tests

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
C	4	489666056	489666056	122416514	2104,59	0,000
M	1	1191659	1191659	1191659	20,49	0,000
C*M	4	648363	648363	162091	2,79	0,028
Erreur	190	11051639	11051639	58167		
Total	199	502557716				

Observations aberrantes pour AFU

Obs	AFU	Ajust	Er-T ajust	Val résid	Val résid norm
1	6201,00	7196,65	53,93	-995,65	-4,24R
2	6135,00	7196,65	53,93	-1061,65	-4,52R
6	7707,00	7196,65	53,93	510,35	2,17R
9	8039,00	7196,65	53,93	842,35	3,58R
21	4717,00	5443,80	53,93	-726,80	-3,09R
22	4881,00	5443,80	53,93	-562,80	-2,39R
41	3633,00	4262,60	53,93	-629,60	-2,68R
112	7452,00	6910,10	53,93	541,90	2,31R
113	7388,00	6910,10	53,93	477,90	2,03R
119	6228,00	6910,10	53,93	-682,10	-2,90R
120	6243,00	6910,10	53,93	-667,10	-2,84R
139	4632,00	5229,20	53,93	-597,20	-2,54R
159	3509,00	4062,15	53,93	-553,15	-2,35R

R indique une observation avec une valeur résiduelle normalisée importante.

Tests de simultanéité de Tukey

Variable de réponse AFU

Toutes comparaisons deux à deux entre niveaux de C

C = C0,05 soustraites de :

Niveau	Différence des moyennes	Er-T de la différence	Valeur de T	Valeur ajustée de P
C0,1	729,1	53,93	13,52	0,0000
C0,2	1903,2	53,93	35,29	0,0000
C0,4	3620,1	53,93	67,13	0,0000
C0,4+I	-875,1	53,93	-16,23	0,0000

C = C0,1 soustraites de :

Niveau	Différence des moyennes	Er-T de la différence	Valeur de T	Valeur ajustée de P
C0,2	1174	53,93	21,77	0,0000
C0,4	2891	53,93	53,61	0,0000
C0,4+I	-1604	53,93	-29,75	0,0000

C = C0,2 soustraites de :

Niveau	Différence des moyennes	Er-T de la différence	Valeur de T	Valeur ajustée de P
C0,4	1717	53,93	31,84	0,0000
C0,4+I	-2778	53,93	-51,52	0,0000

C = C0,4 soustraites de :

Niveau	Différence des moyennes	Er-T de la différence	Valeur de T	Valeur ajustée de P
C0,4+I	-4495	53,93	-83,35	0,0000

Tukey 99.0% Intervalles de confiance simultanés

Variable de réponse AFU

Toutes comparaisons deux à deux entre niveaux de M

Tests de simultanéité de Tukey

Variable de réponse AFU

Toutes comparaisons deux à deux entre niveaux de M

M = M soustraites de :

Niveau	Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
M	des moyennes	la différence	de T	de P
Non M	-154,4	34,11	-4,526	0,0000

Tests de simultanéité de Tukey

Variable de réponse AFU

Toutes comparaisons deux à deux entre niveaux de C*M

C = C0,05

M = M soustraites de :

Niveau		Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C	*M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,05	Non M	-116,3	76,27	-1,53	0,8804
C0,1	M	771,1	76,27	10,11	0,0000
C0,1	Non M	570,7	76,27	7,48	0,0000
C0,2	M	1952,3	76,27	25,60	0,0000
C0,2	Non M	1737,7	76,27	22,79	0,0000
C0,4	M	3705,2	76,27	48,58	0,0000
C0,4	Non M	3418,6	76,27	44,82	0,0000
C0,4+I	M	-956,3	76,27	-12,54	0,0000
C0,4+I	Non M	-910,3	76,27	-11,94	0,0000

C = C0,05

M = Non M soustraites de :

Niveau		Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C	*M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,1	M	887,5	76,27	11,64	0,0000
C0,1	Non M	687,0	76,27	9,01	0,0000
C0,2	M	2068,7	76,27	27,12	0,0000
C0,2	Non M	1854,1	76,27	24,31	0,0000
C0,4	M	3821,5	76,27	50,11	0,0000
C0,4	Non M	3535,0	76,27	46,35	0,0000
C0,4+I	M	-840,0	76,27	-11,01	0,0000
C0,4+I	Non M	-793,9	76,27	-10,41	0,0000

C = C0,1

M = M soustraites de :

Niveau		Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C	*M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,1	Non M	-200	76,27	-2,63	0,2120
C0,2	M	1181	76,27	15,49	0,0000
C0,2	Non M	967	76,27	12,67	0,0000

C0,4	M	2934	76,27	38,47	0,0000
C0,4	Non M	2648	76,27	34,71	0,0000
C0,4+I	M	-1727	76,27	-22,65	0,0000
C0,4+I	Non M	-1681	76,27	-22,05	0,0000

C = C0,1

M = Non M soustraites de :

Niveau		Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C	*M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,2	M	1382	76,27	18,12	0,0000
C0,2	Non M	1167	76,27	15,30	0,0000
C0,4	M	3134	76,27	41,10	0,0000
C0,4	Non M	2848	76,27	37,34	0,0000
C0,4+I	M	-1527	76,27	-20,02	0,0000
C0,4+I	Non M	-1481	76,27	-19,42	0,0000

C = C0,2

M = M soustraites de :

Niveau		Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C	*M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,2	Non M	-215	76,27	-2,81	0,1394
C0,4	M	1753	76,27	22,98	0,0000
C0,4	Non M	1466	76,27	19,23	0,0000
C0,4+I	M	-2909	76,27	-38,14	0,0000
C0,4+I	Non M	-2863	76,27	-37,53	0,0000

C = C0,2

M = Non M soustraites de :

Niveau		Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C	*M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,4	M	1967	76,27	25,80	0,0000
C0,4	Non M	1681	76,27	22,04	0,0000
C0,4+I	M	-2694	76,27	-35,32	0,0000
C0,4+I	Non M	-2648	76,27	-34,72	0,0000

C = C0,4

M = M soustraites de :

Niveau		Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C	*M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,4	Non M	-287	76,27	-3,76	0,0085
C0,4+I	M	-4661	76,27	-61,12	0,0000

C0,4+I Non M	-4615	76,27	-60,52	0,0000
--------------	-------	-------	--------	--------

C = C0,4

M = Non M soustraites de :

Niveau	Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C *M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,4+I M	-4375	76,27	-57,36	0,0000
C0,4+I Non M	-4329	76,27	-56,76	0,0000

C = C0,4+I

M = M soustraites de :

Niveau	Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C *M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,4+I Non M	46,05	76,27	0,6038	0,9998

Exécution depuis le fichier : C:\Program Files\MTB13FR\MACROS\GFMAIN.MAC

La macro exécute ... Veuillez patienter

Graphique des effets principaux pour AFU

Exécution depuis le fichier : C:\Program Files\MTB13FR\MACROS\GFINT.MAC

La macro exécute ... Veuillez patienter

Diagramme d'interaction pour AFU**Statistiques descriptives : AFU par C**

Variable	C	N	Moyenne	Médiane	Moyenne TR	EcarType
AFU	C0,05	40	3433,3	3453,0	3435,8	179,3
	C0,1	40	4162,4	4190,5	4175,0	229,9
	C0,2	40	5336,5	5367,0	5350,1	266,7
	C0,4	40	7053,4	7132,5	7057,0	403,8
	C0,4+I	40	2558,2	2566,5	2559,4	106,6

Variable	C	Er-T moy	Minimum	Maximum	Q1	Q3
AFU	C0,05	28,4	3032,0	3807,0	3285,8	3588,5
	C0,1	36,3	3509,0	4597,0	4023,3	4324,5
	C0,2	42,2	4632,0	5853,0	5149,0	5542,8

C0,4	63,9	6135,0	8039,0	6830,3	7343,8
C0,4+I	16,9	2285,0	2800,0	2480,8	2635,0

Statistiques descriptives : AFU par M

Variable	M	N	Moyenne	Médiane	Moyenne TR	EcarType
AFU	M	100	4586	4282	4541	1645
	Non M	100	4432	4093	4381	1536

Variable	M	Er-T moy	Minimum	Maximum	Q1	Q3
AFU	M	165	2285	8039	3397	5614
	Non M	154	2413	7452	3273	5368

La macro exécute ... Veuillez patienter

Droite de Henry : RESI1

La macro est en cours d'exécution ... Veuillez patienter

Test de l'égalité des variances

Réponse AFU
Facteurs C M
NivConf 95,0000

Intervalles de confiance de Bonferroni pour les écarts-types

Infér	Sigma	Supér	N	Niveaux de facteur	
128,331	188,251	330,418	20	C0,05	M
104,379	153,115	268,748	20	C0,05	Non M
150,111	220,200	386,496	20	C0,1	M
134,366	197,104	345,957	20	C0,1	Non M
179,513	263,331	462,199	20	C0,2	M
156,001	228,840	401,660	20	C0,2	Non M
294,872	432,552	759,216	20	C0,4	M
220,283	323,136	567,170	20	C0,4	Non M
76,322	111,957	196,508	20	C0,4+I	M
67,074	98,392	172,698	20	C0,4+I	Non M

Test de Bartlett (loi normale)

Statistique du test : 65,122

P : 0,000

Test de Levene (pour toute loi de probabilité continue)

Statistique du test : 2,343

P : 0,016

Modèle linéaire généralisé : Rangs en fonction de C; M

Facteur	Type	Niveaux	Valeurs				
C	fixe	5	C0,05	C0,1	C0,2	C0,4	C0,4+I
M	fixe	2	M	Non M			

Analyse de la variance pour Rangs, en utilisant la SC ajustée pour les tests

Source	DL	SC séq	SC ajust	CM ajust	F	P
C	4	638537	638537	159634	1281,97	0,000
M	1	2738	2738	2738	21,99	0,000
C*M	4	1711	1711	428	3,44	0,010
Erreur	190	23659	23659	125		
Total	199	666645				

Observations aberrantes pour Rangs

Obs	Rangs	Ajust	Er-T ajust	Val résid	Val résid norm
1	162,000	185,200	2,495	-23,200	-2,13R
2	161,000	185,200	2,495	-24,200	-2,22R
21	122,000	146,100	2,495	-24,100	-2,22R
22	123,000	146,100	2,495	-23,100	-2,12R
41	77,000	106,075	2,495	-29,075	-2,67R
42	84,000	106,075	2,495	-22,075	-2,03R
61	41,000	65,125	2,495	-24,125	-2,22R
112	198,000	175,800	2,495	22,200	2,04R
159	67,500	94,000	2,495	-26,500	-2,44R

R indique une observation avec une valeur résiduelle normalisée importante.

Tests de simultanéité de Tukey

Variable de réponse Rangs

Toutes comparaisons deux à deux entre niveaux de C

C = C0,05 soustraites de :

Niveau	Différence des moyennes	Er-T de la différence	Valeur de T	Valeur ajustée de P
C0,1	39,07	2,495	15,66	0,0000
C0,2	79,54	2,495	31,88	0,0000
C0,4	119,54	2,495	47,91	0,0000
C0,4+I	-40,46	2,495	-16,22	0,0000

C = C0,1 soustraites de :

Niveau	Différence des moyennes	Er-T de la différence	Valeur de T	Valeur ajustée de P
C				
C0,2	40,46	2,495	16,22	0,0000
C0,4	80,46	2,495	32,25	0,0000
C0,4+I	-79,54	2,495	-31,88	0,0000

C = C0,2 soustraites de :

Niveau	Différence des moyennes	Er-T de la différence	Valeur de T	Valeur ajustée de P
C				
C0,4	40,0	2,495	16,03	0,0000
C0,4+I	-120,0	2,495	-48,09	0,0000

C = C0,4 soustraites de :

Niveau	Différence des moyennes	Er-T de la différence	Valeur de T	Valeur ajustée de P
C				
C0,4+I	-160,0	2,495	-64,12	0,0000

Tests de simultanéité de Tukey

Variable de réponse Rangs

Toutes comparaisons deux à deux entre niveaux de M

M = M soustraites de :

Niveau	Différence des moyennes	Er-T de la différence	Valeur de T	Valeur ajustée de P
M				
Non M	-7,400	1,578	-4,689	0,0000

Tests de simultanéité de Tukey

Variable de réponse Rangs

Toutes comparaisons deux à deux entre niveaux de C*M

C = C0,05

M = M soustraites de :

Niveau	Différence des moyennes	Er-T de la différence	Valeur de T	Valeur ajustée de P
C *M				
C0,05 Non M	-8,33	3,529	-2,36	0,3566
C0,1 M	40,95	3,529	11,60	0,0000
C0,1 Non M	28,87	3,529	8,18	0,0000
C0,2 M	80,97	3,529	22,95	0,0000
C0,2 Non M	69,77	3,529	19,77	0,0000
C0,4 M	120,07	3,529	34,03	0,0000

C0,4	Non M	110,67	3,529	31,36	0,0000
C0,4+I	M	-46,63	3,529	-13,21	0,0000
C0,4+I	Non M	-42,63	3,529	-12,08	0,0000

C = C0,05

M = Non M soustraites de :

Niveau		Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C	*M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,1	M	49,27	3,529	13,96	0,0000
C0,1	Non M	37,20	3,529	10,54	0,0000
C0,2	M	89,30	3,529	25,31	0,0000
C0,2	Non M	78,10	3,529	22,13	0,0000
C0,4	M	128,40	3,529	36,39	0,0000
C0,4	Non M	119,00	3,529	33,72	0,0000
C0,4+I	M	-38,30	3,529	-10,85	0,0000
C0,4+I	Non M	-34,30	3,529	-9,72	0,0000

C = C0,1

M = M soustraites de :

Niveau		Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C	*M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,1	Non M	-12,08	3,529	-3,42	0,0258
C0,2	M	40,03	3,529	11,34	0,0000
C0,2	Non M	28,83	3,529	8,17	0,0000
C0,4	M	79,13	3,529	22,42	0,0000
C0,4	Non M	69,73	3,529	19,76	0,0000
C0,4+I	M	-87,57	3,529	-24,82	0,0000
C0,4+I	Non M	-83,57	3,529	-23,68	0,0000

C = C0,1

M = Non M soustraites de :

Niveau		Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C	*M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,2	M	52,10	3,529	14,76	0,0000
C0,2	Non M	40,90	3,529	11,59	0,0000
C0,4	M	91,20	3,529	25,84	0,0000
C0,4	Non M	81,80	3,529	23,18	0,0000
C0,4+I	M	-75,50	3,529	-21,40	0,0000
C0,4+I	Non M	-71,50	3,529	-20,26	0,0000

C = C0,2

M = M soustraites de :

Niveau		Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C	*M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,2	Non M	-11,2	3,529	-3,17	0,0542
C0,4	M	39,1	3,529	11,08	0,0000
C0,4	Non M	29,7	3,529	8,42	0,0000
C0,4+I	M	-127,6	3,529	-36,16	0,0000
C0,4+I	Non M	-123,6	3,529	-35,03	0,0000

C = C0,2

M = Non M soustraites de :

Niveau		Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C	*M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,4	M	50,3	3,529	14,25	0,0000
C0,4	Non M	40,9	3,529	11,59	0,0000
C0,4+I	M	-116,4	3,529	-32,99	0,0000
C0,4+I	Non M	-112,4	3,529	-31,85	0,0000

C = C0,4

M = M soustraites de :

Niveau		Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C	*M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,4	Non M	-9,4	3,529	-2,66	0,1963
C0,4+I	M	-166,7	3,529	-47,24	0,0000
C0,4+I	Non M	-162,7	3,529	-46,11	0,0000

C = C0,4

M = Non M soustraites de :

Niveau		Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C	*M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,4+I	M	-157,3	3,529	-44,58	0,0000
C0,4+I	Non M	-153,3	3,529	-43,44	0,0000

C = C0,4+I

M = M soustraites de :

Niveau		Différence	Er-T de	Valeur	Valeur ajustée
C	*M	des moyennes	la différence	de T	de P
C0,4+I	Non M	4,000	3,529	1,134	0,9806

Exécution depuis le fichier : C:\Program Files\MTB13FR\MACROS\GFMAIN.MAC

La macro exécute ... Veuillez patienter

Graphique des effets principaux pour Rangs

Exécution depuis le fichier : C:\Program Files\MTB13FR\MACROS\GFINT.MAC

La macro exécute ... Veuillez patienter

Diagramme d'interaction pour Rangs

La macro exécute ... Veuillez patienter

Droite de Henry : RESI5

Enregistrement du fichier sous :

C:\DOCUME~1\COMPAQ~1\BUREAU\MEMOIR~1\ANOVA2FACT_C_M.MPJ

* REMARQUE * Le fichier existant a été remplacé.

La macro est en cours d'exécution ... Veuillez patienter

Test de l'égalité des variances

Réponse Rangs
Facteurs C M
NivConf 95,0000

Intervalles de confiance de Bonferroni pour les écarts-types

Infér	Sigma	Supér	N	Niveaux de facteur	
8,66035	12,7040	22,2981	20	C0,05	M
7,20377	10,5673	18,5478	20	C0,05	Non M
8,01146	11,7521	20,6274	20	C0,1	M
7,26430	10,6561	18,7036	20	C0,1	Non M
7,64538	11,2151	19,6848	20	C0,2	M
6,42032	9,4181	16,5306	20	C0,2	Non M
7,78628	11,4218	20,0476	20	C0,4	M
6,93565	10,1740	17,8574	20	C0,4	Non M
8,16921	11,9835	21,0335	20	C0,4+I	M
7,72605	11,3335	19,8925	20	C0,4+I	Non M

Test de Bartlett (loi normale)

Statistique du test : 2,462

P : 0,982

Test de Levene (pour toute loi de probabilité continue)

Statistique du test : 0,392

P : 0,938

Test de l'égalité des variances : Rangs fn de C - M

Statistiques descriptives : Rangs par C

Variable	C	N	Moyenne	Médiane	Moyenne TR	EcarType
Rangs	C0,05	40	60,96	60,50	60,90	12,28
	C0,1	40	100,04	100,50	100,50	12,65
	C0,2	40	140,50	140,50	140,50	11,69
	C0,4	40	180,50	180,50	180,50	11,69
	C0,4+I	40	20,50	20,50	20,50	11,69

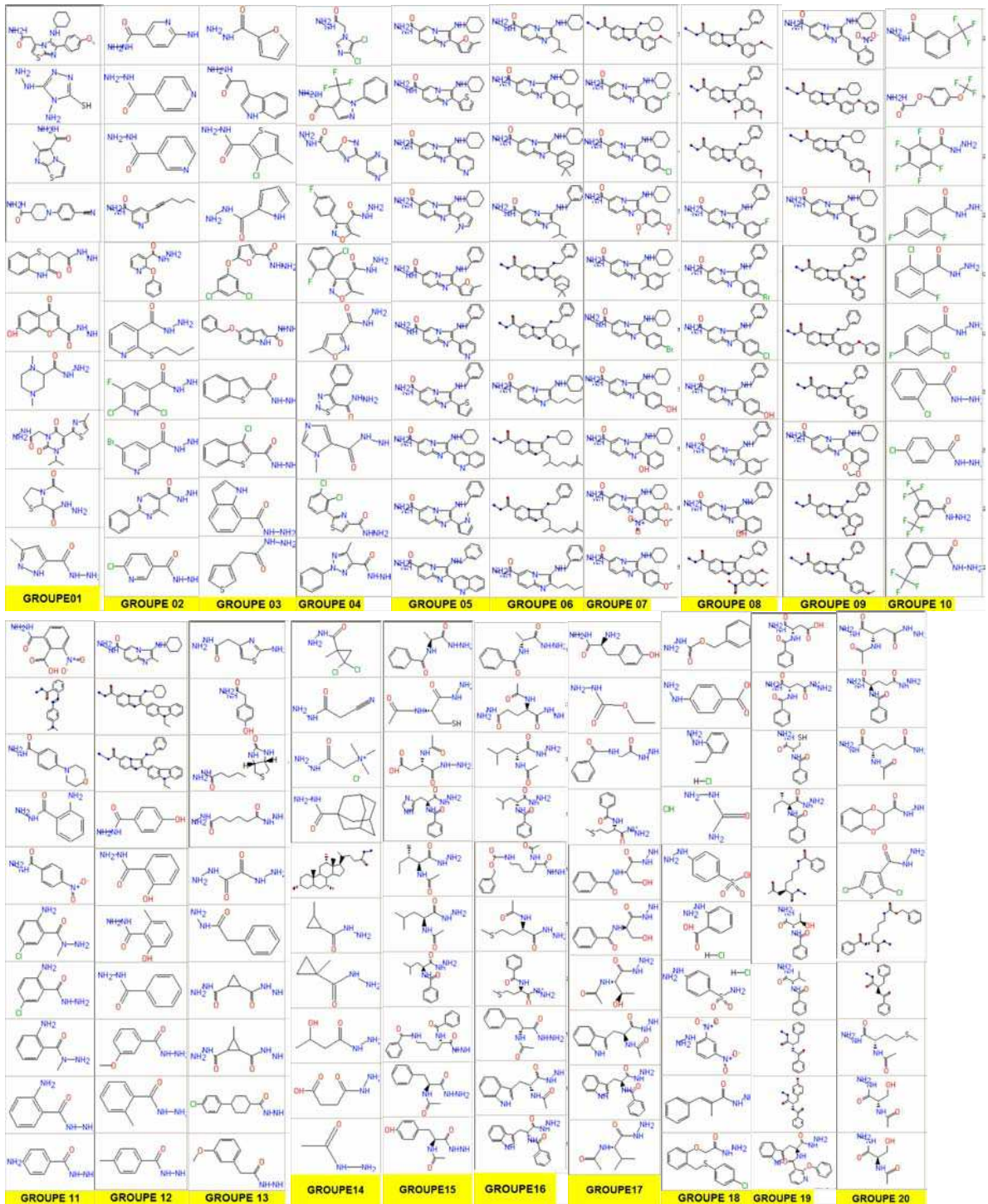
Variable	C	Er-T moy	Minimum	Maximum	Q1	Q3
Rangs	C0,05	1,94	41,00	82,00	50,25	71,75
	C0,1	2,00	67,50	120,00	90,25	110,75
	C0,2	1,85	121,00	160,00	130,25	150,75
	C0,4	1,85	161,00	200,00	170,25	191,13
	C0,4+I	1,85	1,00	40,00	10,25	30,75

Statistiques descriptives : Rangs par M

Variable	M	N	Moyenne	Médiane	Moyenne TR	EcarType
Rangs	M	100	104,20	107,50	104,61	60,06
	Non M	100	96,80	93,50	96,52	55,67

Variable	M	Er-T moy	Minimum	Maximum	Q1	Q3
Rangs	M	6,01	1,00	200,00	57,25	155,50
	Non M	5,57	3,50	198,00	48,25	140,75

ANNEXE II : GROUPES DE LA BANQUE D'HYDRAZIDES



ANNEXE III : PUBLICATION

Fluorescein-based amino acids for solid phase synthesis of fluorogenic protease substrates

Olga N. Burchak, Laurent Mugherli, François Chatelain and Maxim Y. Balakirev*

Laboratoire Biopuces, Département Réponse et Dynamique Cellulaires, Commissariat à l'Energie Atomique, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

Received 22 July 2005; revised 5 October 2005; accepted 18 November 2005
Available online 27 December 2005

Abstract—An efficient synthesis of new type fluorescent amino acids is described. The Fmoc-protected dyes can be prepared in a four-step procedure with ~30% overall yield from aminofluoresceins and other inexpensive commercially available precursors. The dyes are much more photostable compared to fluorescein and exhibit constant pH-independent fluorescence that is advantageous in biological applications. The Fmoc-protected fluorescent amino acids are ready for use in solid phase peptide synthesis. As a proof of concept, a fluorogenic papain substrate was synthesized and employed for on-bead detection of the protease activity. By using a novel technique for quantitative analysis of bead fluorescence, a ~2.7-fold increase in mean bead brightness was measured and was attributed to substrate cleavage by papain. The new type fluorescent amino acids seem to be a promising tool for the synthesis of fluorescent peptide ligands and fluorogenic protease substrates.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Proteases perform essential functions in all living organisms. The human genome data suggest that more than 550 genes encode proteases or protease homologues.^{1–3} Besides mediating nonspecific protein hydrolysis, proteases also act as key post-translational modifiers that perform highly selective, and efficient, cleavage of specific cellular substrates.³ Therefore, an improved understanding of protease functions not only will provide insight into biological systems but will likely provide new important therapeutic targets.

Fluorogenic substrates allow for the continuous kinetic analysis of proteases and are useful reagents for screening potential protease inhibitors and for determining protease substrate specificity.^{4–13} Two types of fluorogenic substrates are commonly used: one having an amino-fluorophore in the P1' position,^{5–8} and the other containing a fluorescence donor-acceptor couple.^{9–13} Typically, P1'-fluorogenic substrates are based on amino-methylcoumarin, AMC⁵ or ACC,⁶ as well as on

red-shifted amino-fluorophores such as rhodamine 110⁷ or cresyl violet.⁸ However, these substrates have limited value in studying proteases, which are sensitive toward substitution in P' positions. For such specific endopeptidases, the complex fluorogenic substrates containing fluorescence donor-acceptor couple (two fluorophores or fluorophore-quencher) are generally employed.^{9–13} These substrates can accommodate a peptide sequence mapping both P and P' sites. The synthesis of such substrates is rather difficult and involves fluorescent dyes, which either are very expensive^{10,11} or fluoresce in the UV region¹² not appropriate for inhibitor screening. Indeed, absorbance (inner-filter effect) and autofluorescence of library compounds are well-known problems when using UV-excited fluorophores for high-throughput screening of chemical libraries.¹³ The stability toward chemical environment and photobleaching is another concern of the fluorophores. Peptide labeling with a dye is usually performed at the end of peptide assembly prior to cleavage from solid support that often requires the use of a complicated orthogonal protection strategy.¹¹ There is thus a pressing need to develop fluorescent amino acid monomers that could be incorporated in selected position during solid phase synthesis. To our knowledge, only one paper, which describes a synthesis of fluorescein-conjugated lysine, has addressed this issue.¹⁴

Keywords: Aminofluorescein; Peptide synthesis; Fluorogenic substrate; Proteases.

* Corresponding author. Tel.: +33 438782103; fax: +33 438785917; e-mail: mbalakirev@cea.fr

We report herein a general method for the synthesis of fluorescent amino acids from commercially available fluorescein derivatives. These fluorescent compounds demonstrate excellent chemical- and photostability and can be used directly in solid phase peptide synthesis. As a proof of concept, we synthesized a fluorogenic papain substrate based on one of these fluorophores using Methyl red as a fluorescence quencher and demonstrated its application for directly measuring the papain activity on TentaGel beads.

2. Results and discussion

2.1. Design and synthesis of fluorescein-based amino acids

Because of their commercial availability and low cost, fluorescein and its derivatives provide an attractive starting material for the synthesis of fluorescent amino acids. One obvious way to the modification of fluorescein derivatives is a conjugation of the 2' carboxylic group with a nucleophile. However, such functionalization chemistry is complicated by tautomeric equilibrium between a locked non-fluorescent spiro-lactone form and an open fluorescent quinoid form as well as by ionic

equilibrium of multiple (de)protonated forms of fluorescein.^{17,18,21} This results in a highly heterogeneous chemical composition, which depends on pH and solvent. Of note, the multiplicity of fluorescein forms having different spectral properties^{17,18,21} also limits its application as a fluorescent probe.²² Two methods to avoid the tautomerization problem described in the literature are a coupling of the 2' carboxylic group to secondary amines^{23,24} and its esterification.^{14,16} While the formation of 2' secondary amide of *N,N,N',N'*-tetrasubstituted rhodamines proceeds with a relatively high yield,²⁴ the reaction is less efficient with fluorescein and requires an additional activation step.²³ On the other hand, the esterification of the 2' carboxylic group of fluorescein has been reported to give an excellent yield.¹⁶ Consequently, we chose to use esterification in our synthesis. Furthermore, we thought it appropriate to start from commercially available 5'- and 6'-aminofluorescein derivatives in the synthesis of fluorescent amino acids.

As shown in Figure 1, the esterification of aminofluoresceins in refluxing acidic ethanol afforded the corresponding esters **3** and **4** with >85% yield. A new carboxylic moiety was then introduced by alkylation of aminofluorescein ethyl ester with *tert*-butyl bromoacetate

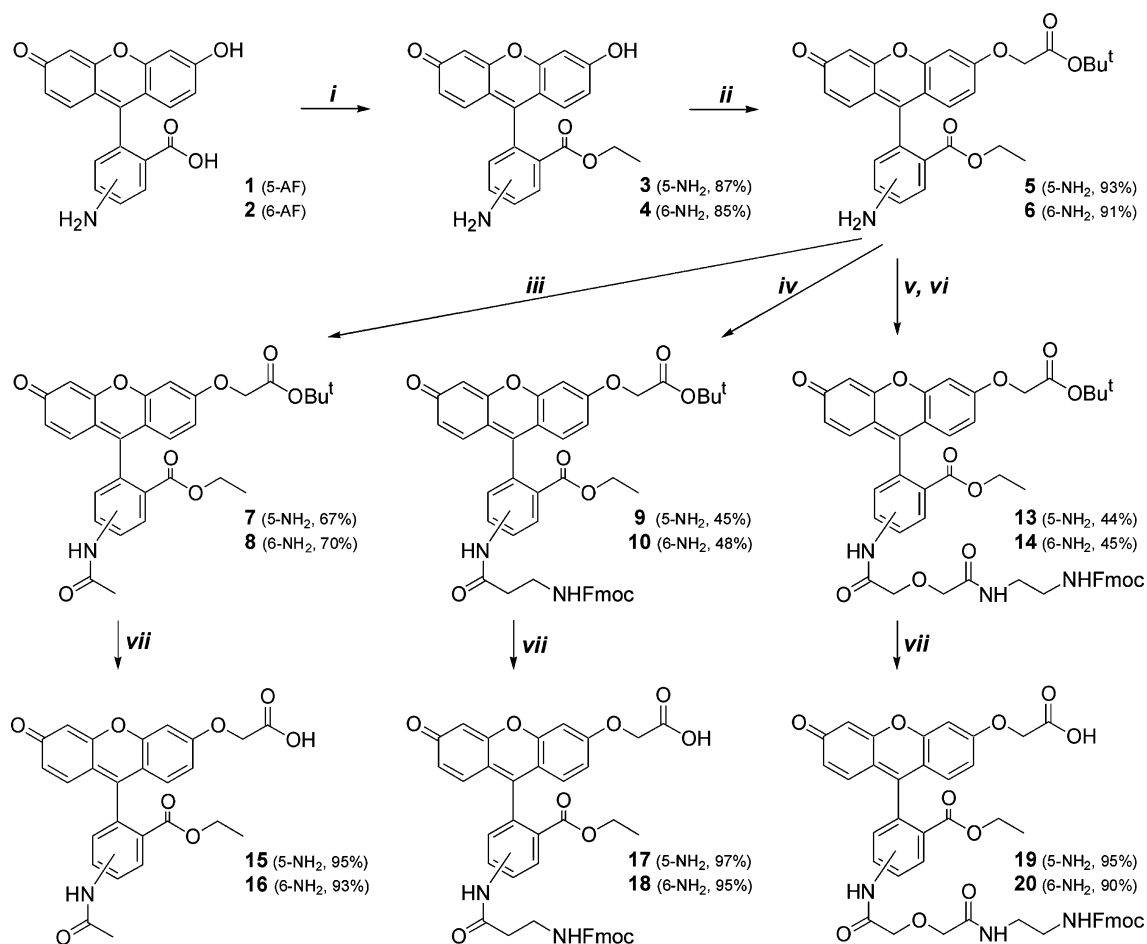


Figure 1. Synthetic scheme for Fmoc-protected fluorescent amino acids. Reagents: (i) H₂SO₄, EtOH; (ii) BrCH₂COOBu^t, K₂CO₃, DMF; (iii) Ac₂O, DIEA, DCM; (iv) Fmoc-β-Ala, DCC, DCM; (v) diglycolic anhydride, DMAP, DIEA, DCM; (vi) NH₂(CH₂)₂NHFmoc, DCC, DCM; (vii) TFA, DCM.

(Fig. 1(ii)). The alkylation proceeded selectively on the 3-phenol and did not involve the amino group. First we tried to obtain Fmoc-protected amino acid derivatives directly from the esters **5** and **6**. However, the acylation of these compounds with either Fmoc chloride or Fmoc-hydroxysuccinimide ester failed to produce appreciable yields of the desired Fmoc-amino acid esters. The reactions proceeded with low levels of conversion and the silica gel purification was ineffective due to the instability of the products. On the other hand, we have found that both 5'- and 6'-amino groups of amino-fluoresceins could be acylated in reasonable yield with carboxylic acid anhydrides such as acetic acid anhydride (compounds **7** and **8**; Fig. 1(iii)). Therefore, Fmoc-protected amino acid esters **9** and **10** were synthesized by acylation of the compounds **5** and **6** with *N*-Fmoc- β -alanine and DCC as a coupling agent (Fig. 1(iv)). The reaction proceeded very slowly (~ 2 days), probably due to steric hindrance of the reacting compounds and low reactivity of the amino group, and, after silica gel chromatography, afforded the pure products with $>45\%$ yield. In parallel, the compounds **13** and **14** were synthesized with $\sim 45\%$ overall yield by a two-step procedure, which involves the acylation of **5** and **6** with diglycolic anhydride followed by the coupling of the resulting acids **11** and **12** to Fmoc-ethylene diamine (see Section 4 and Fig. 1(v and vi)). Compared with **9** and **10** the latter compounds have a longer polar linker between Fmoc-protected amino group and fluorophore that is often required in biological applications. Finally, Fmoc-protected fluorescent amino acids **15–20** were produced in a nearly quantitative yield by TFA hydrolysis of the corresponding *tert*-butyl esters **7–10**, **13**, and **14** (Fig. 1(vii)).

2.2. Physico-chemical characterization of the dyes

Low photostability and dependence of the fluorescence on pH are the two most important drawbacks limiting biological applications of fluorescein analogues.²² We therefore examined the photochemical properties of the synthesized fluorescein derivatives.

The UV–vis absorbance spectra of compounds **15–20** exhibit two absorbance maxima at 456 and 481 nm (Fig. 2A). The maximum at 481 nm corresponds to the absorbance maximum of fluorescein at 490 nm, suggesting that the same light sources can be used for excitation of these fluorophores. The shorter wavelength maximum at 456 nm is characteristic of 3-*O*-fluorescein ethers²⁵ and has been observed in absorbance spectra of various fluorescein ethers having 2'-ester^{14,16} or 2'-secondary amide residues.²³ The molar extinction coefficients determined at 456 nm for **15–20** ($2.0\text{--}2.4 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) are also close to reported values for 3-*O*-alkyl fluorescein 2'-esters¹⁶ ($2.0\text{--}3.5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). This means that the presence of the 5'- or 6'-amido groups does not significantly affect the electronic properties of 3-*O*-alkyl fluoresceins.

The fluorescence emission spectra of compounds **15–20** are broadened and redshifted ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$) relative to that of fluorescein ($\lambda_{\text{max}} = 512 \text{ nm}$) (Fig. 2A). The

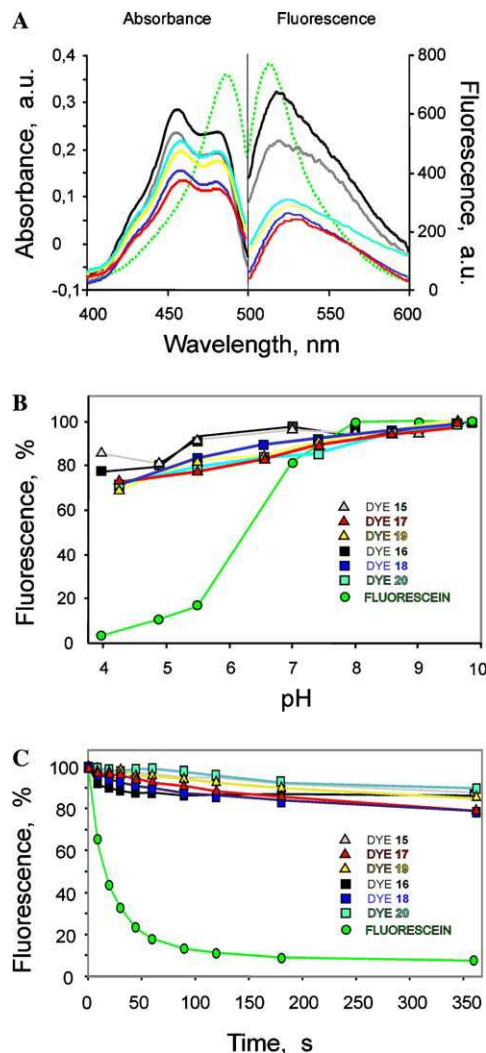


Figure 2. Photochemical properties of new dyes. (A) Absorbance and fluorescence spectra of dye **15** (grey), dye **16** (black), **17** (red), **18** (blue), **19** (yellow), **20** (cyan), and fluorescein (dotted green). The fluorescence quantum yields were measured to be 0.19 (**15**), 0.18 (**16**), 0.07 (**17**), 0.04 (**18**), 0.12 (**19**), and 0.07 (**20**). (B) pH-dependence of the fluorescence intensity of dye **15–20** and fluorescein (the color code is the same as in (A)). (C) Dye photobleaching.

fluorescence quantum yields determined for **15** ($\phi = 0.19$) and for **16** ($\phi = 0.18$) were notably lower than the quantum yield of fluorescein dianion ($\phi = 0.92\text{--}0.93$),^{17,18,26} and were consistent with the values reported for other 3-*O*-alkyl fluorescein ethers ($\phi = 0.18\text{--}0.31$).^{14,16} The broadening of emission spectra and decrease in quantum efficiency is probably due to alteration of D_{2h} molecular symmetry of xanthene moiety in these compounds,²⁷ which results in changes in molecule vibrational modes²⁷ and in increased rate of non-radiative internal conversion from excited to ground states. The loss of D_{2h} symmetry in fluorescein monoanion results in a similar broadening of emission spectrum and in a comparable drop in quantum yield ($\phi = 0.25\text{--}0.37$).^{17,18} The fluorescence quantum yields of Fmoc-protected amino acids **17–20** ($\phi = 0.04\text{--}0.12$, see Fig. 2A caption) are noticeably lower than those of the dyes **15** and **16**. This may result from fluorescence

quenching induced by Fmoc chromophore. Indeed, Fmoc-deprotection produced a significant increase in fluorescence of the compounds **17–20** (not shown).

Consistent with the previous studies on 3-*O*-alkyl fluorescein 2'-esters,^{14,16,23} the fluorescence and the quantum yields determined for compounds **15–20** are virtually pH-independent throughout the range of pH 4.0–10.0 (Fig. 2B). This is explained by the absence of ionic equilibrium in 3-*O*-alkyl fluorescein derivatives trapped in a tautomeric quinoid form by 2'-esterification. The stability of 2'-ester toward an alkaline hydrolysis was also checked by measuring the absorbance and fluorescence spectra. No significant changes were observed after incubation of the fluorophores **15** and **16** for several hours in aqueous pH 9.8 buffer. The pH independence exhibited by these fluorophores is advantageous in applications requiring quantification and comparison of fluorescence intensity in different environments, as, for example, for the fluorescence measurement in acidic intracellular compartments,²⁸ or in the studies of the pH-dependence of enzymatic activity with fluorogenic substrates.²⁹

In fluorescence measurements such as immunofluorescence, dealing with small amounts of fluorescent molecules and/or small sample volume, the irreversible destruction or photobleaching of the excited fluorophore becomes the factor limiting fluorescence detectability. We have developed an assay allowing comparison of the photostability of fluorophores under the condition of signal acquisition with a fluorescent microscope. The sample was placed in a well on the surface of a glass slide containing 40 circular wells of 2 mm diameter, separated by 30 μm -thick Teflon coating. The well was then enclosed with a coverslip producing a cylindrical sample chamber of ~ 380 nL volume. The slide was mounted on the microscope stage and the well was irradiated with light using standard 'fluorescein' filters set. In order to prevent a heterogeneous photobleaching and associated macrodiffusion phenomena, the microscope objective was adjusted to irradiate an entire sample chamber. The resulting light intensity at the chamber level was measured to be ~ 6 mW/mm². The fluorescence images of the well were taken at different intervals and the mean fluorescence intensity was calculated using IMSTAR software.¹⁵ As seen in Figure 2C, under these conditions fluorescein was rapidly bleached with a characteristic time of 50% decay $t_{1/2} \sim 14$ s. Compounds **15** and **16** demonstrated remarkable photostability: only a $\sim 10\%$ decrease in fluorescence was observed for both fluorophores after 6 min

of irradiation. This result is corroborated by a previous observation that under an exposure to white light some 3-*O*-alkyl 2'-amide fluorescein derivatives demonstrate up to 10-fold increased photostability compared to fluorescein.²³ The various photochemical reactions leading to fluorescein photobleaching have been investigated and described in considerable detail.³⁰ In all cases, photobleaching originates from the triplet excited state, which is created from the singlet state S_1 via an excited-state process called intersystem crossing. It seems probable that the same cause, which results in a drop in quantum yield, i.e., the alteration of D_{2h} molecular symmetry of xanthene moiety and reorganization of molecule vibrational modes, may be responsible for the increased photostability of fluorescein 3-*O*-ethers. Consistent with this hypothesis, it has been shown that the photostability of 3-*O*-alkyl 2'-amide fluorescein derivatives results mainly from the 3-etherification of the xanthene ring.²³

2.3. Solid phase synthesis of fluorogenic substrate and measurement of proteolytic activity

To demonstrate the utility of the synthesized fluorophores for the solid phase synthesis of fluorogenic substrates, we have designed a fluorogenic substrate for cysteine protease papain. The substrate contains fluorescein amino acid **18** and Methyl red (MR) chromophore separated by peptide sequence GGFGLG (Fig. 3). This sequence has been described as a good papain substrate with a cleavage taking place at the G–L bond.³¹ The specificity for the papain is determined by the phenylalanine at the P2 position and the leucine at the P1' position.³² The MR dye has been shown to quench efficiently the fluorescence of fluorescein derivatives and is widely used in the design of self-quenched oligonucleotide probes for real-time PCR.³³ The substrate was synthesized by Fmoc-chemistry on TentaGel resin (20 μm beads). For reasons of simplicity and potential high-throughput applications, we have evaluated the validity of on-bead protease screening. The major concern of such heterophase screening assay is the permeability of resins to biomolecules, which determines the accessibility of the resin-bound substrate for the enzymes. Although TentaGel resin has been shown not to be optimal for on-bead enzymatic screening,³¹ it has some important advantages such as excellent swelling properties in organic and aqueous media, mechanical stability, and narrow size distribution.^{34,35} Furthermore, we have found that the introduction of a PEG ($n = 7$) linker between the peptide and TentaGel functional group (Fig. 3) rendered the fluorogenic substrate more accessi-

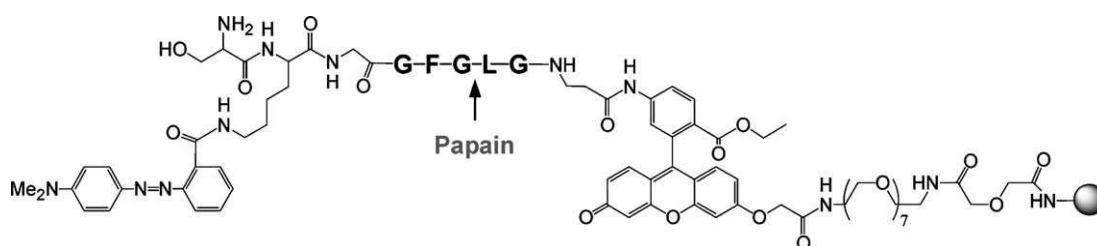


Figure 3. Structure of fluorogenic papain substrate.

ble for protease cleavage. The fluorophore **18** was coupled first after the linker followed by peptide sequence and the quencher MR, which was coupled to the side chain of the lysine at the end of the synthesis (Fig. 3).

Regardless of the biochemical model used, the on-bead screening assay requires methods for determination and analysis of the ‘positive’ beads. In our case, a peptide sequence susceptible to proteolysis should be cleaved from the solid phase support, thereby releasing the MR quenching moiety and resulting in an enhancement of the fluorescence of the resin-bound fluorophore. Therefore, to detect a proteolytic activity, the fluorescent proteolyzed beads should be distinguished from the control beads, which have not been exposed to a protease. Curiously, the majority of on-bead screening methods employ the visual assessment of the beads under a standard fluorescence microscope.³⁵ The subjective nature of this analysis does not allow us to discriminate a small difference in bead brightness and limits seriously the sensitivity of the method. This is particularly important when using quenched fluorogenic substrates, which possess significant intrinsic fluorescence. Furthermore, TentaGel, like many polystyrene-based resins, exhibits high-level, broad-wavelength autofluorescence complicating the analysis.³⁴ Finally, even under the same conditions, the population of beads shows significant brightness heterogeneity because of the bead-to-bead variation in polymer density, in functional group substitution, and in substrate loading.³⁵ All these considerations suggest a need for quantitative analysis of the distribution of bead brightness. The bead population can be analyzed and the positive beads isolated with a fluorescence-activated cell sorter;^{35,36} however, the method becomes cumbersome when multiple bead samples have to be analyzed. Some modern techniques employed in genotyping and diagnostics, such as Luminex microfluidic technology³⁷ and Illumina fiber optic Bead Array,³⁸ provide quantitative measurements of bead fluorescence, but require special equipment and have not been tested for enzymatic screening.

We have developed a rather simple method to measure the distribution of bead fluorescence. The bead suspension was spotted on the surface of a microscope slide by using a piezo-electric dispenser. The 40-well patterned glass slides with 30 μm -thick Teflon frame were used to delimit the bead solution, although a higher density format (several thousands of hydrophilic wells patterned on a perfluorated glass surface³⁹) can also be used. The well was then enclosed with a coverslip as described above for photobleaching assays. The measurements can also be performed in arrayed droplets without covering, but glycerol should be added to the bead suspension to prevent evaporation. To avoid the clogging of the piezoelectric pipette, the beads were maintained in suspension by sonication pulses. Under these conditions, rather homogeneous dispensing of the beads 5–500 per droplet, depending on the bead concentration, can be achieved. The beads were preincubated with protease prior to spotting or protease was added afterwards to the arrayed beads.

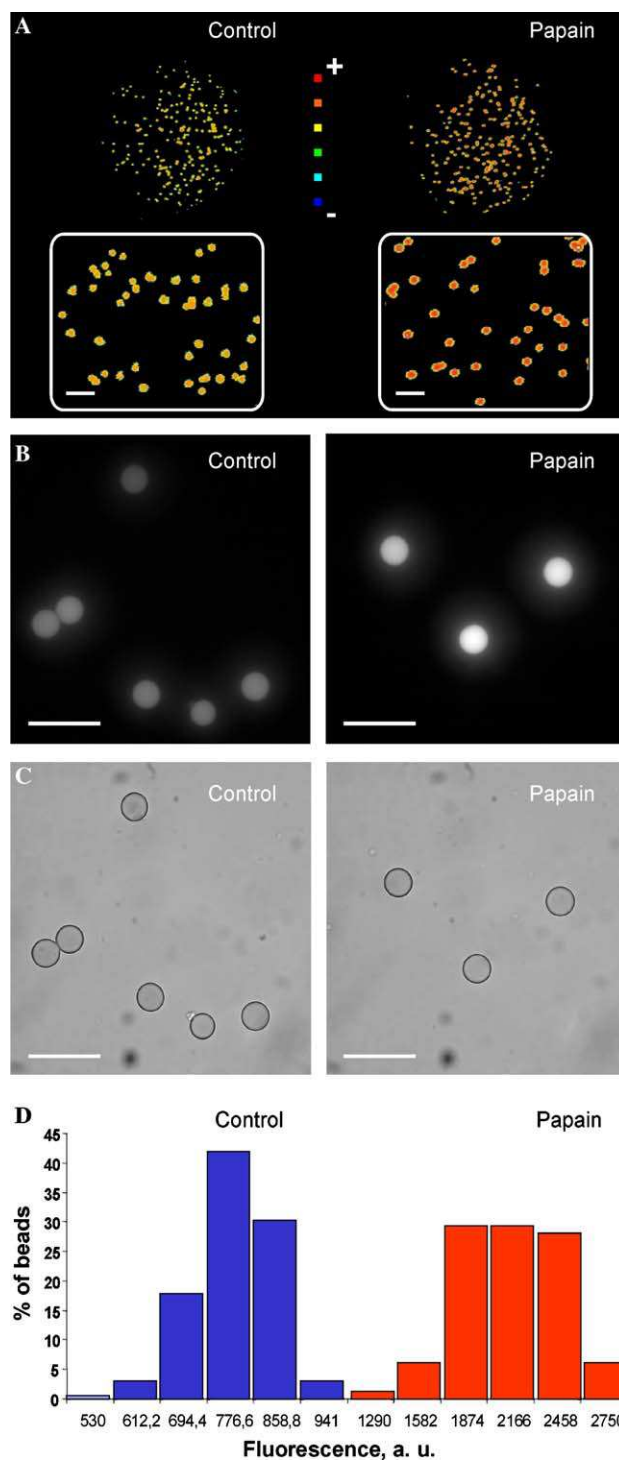


Figure 4. On-bead assay for proteolytic activity. The 20 μm TentaGel beads carrying the fluorogenic papain substrate (Fig. 3) were incubated with 0.5 μM papain (marked ‘papain’), with mock solution (marked ‘control’) or with NEM-inhibited papain (results indistinguishable from ‘control’). After 2 h, the beads were spotted on Super-Teflon glass slide and analyzed. (A) 5 μm -resolution scanner images of two bead populations. The relative fluorescence intensity scale is shown by color squares. The insets show 3 \times zoom images of bead populations. The white bars on the images A–C represent 50 μm . (B) Fluorescence micrographs of the beads obtained with fluorescein filter set. (C) Bright field images of the same bead populations as in B. (D) Histogram showing the distribution of the bead brightness in control and in papain-treated bead populations (200 beads in each case).

After incubation, the proteolysis of the bead-bound substrate was measured by using a microarray scanner or a fluorescent microscope. As shown in Figure 4A the beads incubated with papain appeared significantly brighter on scanner images than the control beads. Even though the scanning did not produce a high resolution image of each bead, it allowed us to obtain a quantitative comparison of two bead samples (not shown). Automated fluorescence microscopy provides even more precise data on brightness variation within the bead population (Fig. 4B and C). Due to narrow size distribution of TentaGel beads, the proteolytic activity can be characterized by a histogram representing the percentage of beads having fluorescence in the given intensity range (IMSTAR software, Fig. 4D). The obtained data are quantitative and allow detection of small changes in bead brightness, which is impossible by a visual examination. Thus, the analysis of a 200 beads population showed that the incubation of the beads with 0.5 μM solution of papain for 2 h results in ~ 2.7 -fold increase in mean fluorescence with some increase in standard deviation (SD) of brightness distribution (Fig. 4D). This rise in bead brightness was not observed with *N*-ethylmaleimide-inhibited papain, suggesting that it results from the enzymatic cleavage of resin-bound substrate. Therefore, the increase in brightness heterogeneity measured through an increase of SD may be explained by the bead-to-bead variation in substrate cleavage.

3. Conclusion

We describe here cost-efficient synthesis, photochemical characterization, and application of new fluorescent amino acids. Being synthesized from inexpensive fluorescein derivatives, these fluorophores have several important advantages compared to fluorescein such as significantly increased photostability and pH-independent quantum yield. The synthesized fluorescent amino acids are ready for use in solid phase organic synthesis and can be employed directly in the synthesis of fluorescent peptide ligands and fluorogenic protease substrates. Collectively, these dyes seem to be very promising for various biological applications.

4. Experimental

4.1. Materials

All chemicals were from Fluka (Sigma–Aldrich Chimie, St. Quentin Fallavier, France). TentaGel beads (20 μm) were from Rapp Polymere GmbH (Tübingen, Germany). Column chromatography was carried out on Merck Silica Gel 60. Thin-layer chromatography was performed with Silica Gel 60 F₂₅₄ plates. ¹H NMR spectra were recorded on a Bruker (300 MHz); high resolution mass spectra (HRMS) were recorded on a Finnigan MAT 8200 spectrometer (50–100 °C, 70 eV). UV–vis spectra were acquired with a Varian Cary 300 Scan spectrophotometer and fluorescence emission spectra with a

Perkin-Elmer LS-50B luminescence spectrometer. The sciFLEXARRAYER piezoelectric dispensing system (Sciencion, Berlin, Germany) was used for spotting of beads. Olympus BX51 microscope equipped with a Hamamatsu ORCA R camera and an Olympus U-RFL-T lamp was used for photobleaching study and beads imaging. Bead scanner images were obtained with a GeneTAC LS IV scanner (Genomic Solutions, Ann Arbor, MI, USA). Microscope images were analyzed quantitatively using IMSTAR software (Imstar, Paris, France,¹⁵), and scanner images were analyzed with Genepix Pro 4.0 software (Axon Instruments, Union City, CA, USA).

4.2. 5-Amino-2-(6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-benzoic acid ethyl ester (dye 3)

H₂SO₄ (266 μL , 5.0 mmol) was added dropwise to the suspension of 5-aminofluorescein **1** (347 mg, 1.0 mmol) in 10 mL of EtOH at room temperature. After stirring at reflux for 24 h, EtOH was evaporated and the resulting mixture was diluted with CHCl₃. Solid NaHCO₃ was added to the solution until gas evolution ceased. Heterogeneous mixture was filtered and the organic phase was dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated under reduced pressure. The residue was subjected to silica gel chromatography with EtOAc/hexane (1:1), MeOH/DCM (1:9), giving 326 mg of dye **3** (87%). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.80 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 3.87 (q, 2H, *J* = 7.5 Hz), 5.86 (br s, 2H), 6.55 (m, 4H), 6.90 (m, 3H), 7.04 (m, 1H), 7.33 (m, 1H). HRMS calcd. for C₂₂H₁₇NO₅ (M)⁺ 375.1107, found 375.1103.

4.3. 4-Amino-2-(6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-benzoic acid ethyl ester (dye 4)

Dye **4** was obtained by the same method from 6-aminofluorescein **2** (347 mg, 1.0 mmol) with 85% yield (319 mg). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.83 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 3.83 (q, 2H, *J* = 7.5 Hz), 5.85 (br s, 2H), 6.47 (m, 1H), 6.78 (m, 1H), 7.02 (m, 2H), 7.07 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.92 (m, 1H). HRMS calcd. for C₂₂H₁₇NO₅ (M)⁺ 375.1107, found 375.1104.

4.4. 5-Amino-2-(6-*tert*-butoxycarbonylmethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-benzoic acid ethyl ester (dye 5)

BrCH₂COOBu^t (215 mg, 1.1 mmol) was added to the mixture of compound **3** (375 mg, 1.0 mmol) and K₂CO₃ (150 mg, 1.1 mmol) in 5 mL of DMF at room temperature. After stirring for 3 h, the reaction mixture was diluted with H₂O and extracted with ethyl acetate. The organic phase was washed with 1 M NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was subjected to silica gel chromatography with EtOAc/hexane (1:1), MeOH/DCM (1:9), giving 455 mg of dye **5** (93%). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.82 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 1.42 (s, 9H), 3.88 (m, 2H), 4.85 (s, 2H), 5.87 (br s, 2H), 6.20 (m, 1H), 6.37 (m, 1H), 6.82–7.05 (m, 5H), 7.14 (m, 1H), 7.35 (s, 1H). HRMS calcd. for C₂₈H₂₇NO₇ (M)⁺ 489.1788, found 489.1787.

4.5. 4-Amino-2-(6-*tert*-butoxycarbonylmethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-benzoic acid ethyl ester (dye 6)

Dye **6** was synthesized by the same method from compound **4** (375 mg, 1.0 mmol) with 91% yield (445 mg). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.85 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 1.42 (s, 9H), 3.84 (m, 2H), 4.85 (s, 2H), 6.22 (m, 1H), 6.30 (br s, 2H), 6.37 (m, 1H), 6.44 (m, 1H), 6.77 (m, 1H), 6.88–6.96 (m, 3H), 7.15 (m, 1H), 7.90 (m, 1H). HRMS calcd. for C₂₈H₂₇NO₇ (M)⁺ 489.1788, found 489.1789.

4.6. 5-Acetylamino-2-(6-*tert*-butoxycarbonylmethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-benzoic acid ethyl ester (dye 7)

Ac₂O (47 μL, 0.5 mmol) was added to the solution of amine **5** (98 mg, 0.2 mmol) and DIEA (88 μL, 0.5 mmol) in 5 mL of DCM at room temperature. After stirring overnight, DCM was evaporated, the residue was diluted with H₂O and EtOAc, and the mixture was stirred. Organic layer was separated and washed with 1 M HCl, 1 M NaHCO₃, brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was subjected to silica gel chromatography with EtOAc/hexane (1:1), MeOH/DCM (1:9), giving 71 mg of dye **7** (67%). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.85 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 1.42 (s, 9H), 2.12 (s, 3H), 3.94 (m, 2H), 4.86 (s, 2H), 6.22 (m, 1H), 6.38 (m, 1H), 6.85–6.95 (m, 3H), 7.13 (m, 1H), 7.46 (m, 1H), 8.08 (m, 1H), 8.41 (s, 1H), 10.46 (s, 1H). HRMS calcd. for C₃₀H₂₉NO₈ (M)⁺ 531.1894, found 531.1892.

4.7. 4-Acetylamino-2-(6-*tert*-butoxycarbonylmethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-benzoic acid ethyl ester (dye 8)

Dye **8** was obtained by the same method from amine **6** (98 mg, 0.2 mmol) with 70% yield (74 mg). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.85 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 1.41 (s, 9H), 2.08 (s, 3H), 3.85 (m, 2H), 4.93 (s, 2H), 6.41 (m, 1H), 6.54 (m, 1H), 7.95–7.02 (m, 3H), 7.29 (m, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.88 (m, 1H), 8.19 (m, 1H), 10.52 (s, 1H). HRMS calcd. for C₃₀H₂₉NO₈ (M)⁺ 531.1894, found 531.1890.

4.8. 2-(6-*tert*-Butoxycarbonylmethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-5-[3-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxy-carbonyl-amino)-propionylamino]-benzoic acid ethyl ester (dye 9)

DCC (412 mg, 2.0 mmol) was added to the solution of Fmoc-β-alanine (622 mg, 2.0 mmol) in 10 mL DCM at room temperature, after stirring for 30 min a solution of amine **5** (489 mg, 1.0 mmol) in 5 mL DCM was added to the mixture. After stirring for 2 days, DCM was evaporated, the residue was diluted with H₂O, and the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic phase was washed with 1 M HCl, 1 M NaHCO₃, brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure. The residue was subjected to silica gel chromatography with EtOAc/hexane (1:1), EtOAc, giving 352 mg of dye **9** (45%). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.85 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 1.41 (s, 9H), 2.55 (m, 2H), 3.35 (m, 2H), 3.96 (m, 2H), 4.21 (m, 1H), 4.60 (m, 2H), 4.92 (s, 2H), 6.18 (m, 1H), 6.22 (s, 1H), 6.38 (m,

1H), 6.49–6.61 (m, 3H), 6.69 (m, 1H), 6.96 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.26–7.39 (m, 4H), 7.64 (m, 2H), 7.86 (m, 1H), 7.88 (m, 2H), 10.48 (s, 1H). HRMS calcd. for C₄₆H₄₂N₂O₁₀ (M)⁺ 782.2840, found 782.2842.

4.9. 2-(6-*tert*-Butoxycarbonylmethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-4-[3-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-amino)-propionylamino]-benzoic acid ethyl ester (dye 10)

Dye **10** was obtained by the same method from amine **6** (489 mg, 1.0 mmol) with 48% yield (375 mg). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.86 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 1.42 (s, 9H), 2.38 (m, 2H), 3.39 (m, 2H), 3.92 (m, 2H), 4.19 (m, 1H), 4.58 (m, 2H), 4.85 (s, 2H), 6.30 (s, 1H), 6.42 (m, 1H), 6.78 (m, 1H), 6.84–6.97 (m, 3H), 7.17 (m, 1H), 7.23 (m, 2H), 7.25–7.42 (m, 4H), 7.64 (m, 2H), 7.87 (m, 2H), 10.53 (s, 1H). HRMS calcd. for C₄₆H₄₂N₂O₁₀ (M)⁺ 782.2840, found 782.2841.

4.10. 2-(6-*tert*-Butoxycarbonylmethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-5-(2-carboxymethoxy-acetyl-amino)-benzoic acid ethyl ester (dye 11)

Diglycolic anhydride (23 mg, 0.2 mmol) was added to the solution of amine **5** (98 mg, 0.2 mmol), DIEA (35 μL, 0.2 mmol) and DMAP (24 mg, 0.2 mmol) in 5 mL of DCM at room temperature. After stirring overnight, DCM was evaporated, the residue was diluted with H₂O and extracted with ethyl acetate. The organic phase was washed with 1 M HCl, brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was diluted with Et₂O, and precipitate was filtered off, washed with Et₂O, and dried to afford 109 mg of dye **11** (90%). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.83 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 1.42 (s, 9H), 3.95 (m, 2H), 4.22 (s, 2H), 4.24 (s, 2H), 4.87 (s, 2H), 6.23 (m, 1H), 6.39 (m, 1H), 6.84–6.92 (m, 3H), 7.17 (m, 1H), 7.44 (m, 1H), 8.12 (m, 1H), 8.52 (m, 1H), 10.42 (s, 1H). HRMS calcd. for C₃₂H₃₁NO₁₁ (M)⁺ 605.1898, found 605.1894.

4.11. 2-(6-*tert*-Butoxycarbonylmethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-4-(2-carboxymethoxy-acetylamino)-benzoic acid ethyl ester (dye 12)

Dye **12** was obtained by the same method from amine **6** (98 mg, 0.2 mmol) with 92% yield (112 mg). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.87 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 1.42 (s, 9H), 3.93 (m, 2H), 4.11 (s, 2H), 4.18 (s, 2H), 4.86 (s, 2H), 6.24 (m, 1H), 6.39 (m, 1H), 6.83–6.96 (m, 3H), 7.19 (m, 1H), 7.76 (m, 1H), 8.03 (m, 1H), 8.18 (m, 1H), 10.48 (s, 1H). HRMS calcd. for C₃₂H₃₁NO₁₁ (M)⁺ 605.1898, found 605.1897.

4.12. 2-(6-*tert*-Butoxycarbonylmethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-5-(2-[(2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxy-carbonyl-amino)-ethylcarbonyl)-methoxy]-acetylamino)-benzoic acid ethyl ester (dye 13)

DCC (41 mg, 0.2 mmol) was added to the solution of acid **11** (121 mg, 0.2 mmol) in 5 mL of DCM at room temperature, after stirring for 30 min, the solution of Fmoc-ethylenediamine (56 mg, 0.2 mmol) in 2 mL of

DCM was added to the mixture. After stirring overnight, DCM was evaporated, the residue was diluted with H₂O and extracted with ethyl acetate. The organic phase was washed with 1 M HCl, 1 M NaHCO₃, brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure. The residue was subjected to silica gel chromatography with EtOAc/hexane (1:1), EtOAc, MeOH/DCM (1:20), giving 101 mg of dye **13** (58%). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.85 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 1.42 (s, 9H), 3.11 (m, 2H), 3.19 (m, 2H), 3.92 (m, 2H), 4.08 (s, 2H), 4.16 (m, 1H), 4.21 (s, 2H), 4.28 (m, 2H), 4.86 (s, 2H), 6.24 (m, 1H), 6.37 (m, 1H), 6.80–6.97 (m, 3H), 7.19 (m, 1H), 7.27–7.42 (m, 4H), 7.65 (m, 2H), 7.64 (m, 1H), 7.88 (m, 2H), 7.82 (m, 1H), 8.05 (m, 1H), 10.49 (s, 1H). HRMS calcd. for C₄₉H₄₇N₃O₁₂ (M)⁺ 869.3160, found 869.3164.

4.13. 2-(6-*tert*-Butoxycarbonylmethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-4-(2-{[2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-amino)-ethylcarbamoyl]-methoxy}-acetyl-amino]-benzoic acid ethyl ester (dye 14)

Dye **14** was obtained by the same method from acid **12** (121 mg, 0.2 mmol) with 64% yield (111 mg). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.86 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 1.42 (s, 9H), 3.07 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 3.91 (m, 2H), 4.04 (s, 2H), 4.16 (m, 1H), 4.19 (s, 2H), 4.26 (m, 2H), 4.85 (s, 2H), 6.22 (m, 1H), 6.48 (m, 1H), 6.82–6.95 (m, 3H), 7.17 (m, 1H), 7.27–7.41 (m, 4H), 7.64 (m, 2H), 7.77 (m, 1H), 7.86 (m, 2H), 8.00 (m, 1H), 8.16 (m, 1H), 10.49 (s, 1H). HRMS calcd. for C₄₉H₄₇N₃O₁₂ (M)⁺ 869.3160, found 869.3162.

4.14. Removal of Boc-protection (dyes 15–20)

TFA (2.0 g, 1.3 mL) was added to the solution of ester in DCM (2.0 g, 1.5 mL) at room temperature. After 3 h, DCM and TFA were evaporated, the residue was solidified by addition of diethyl ester, washed thoroughly with the same solvent, and dried.

4.15. 5-Acetylamino-2-(6-carboxymethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-benzoic acid ethyl ester (dye 15)

Dye **15** was obtained by ester **7** (53 mg, 0.1 mmol) deprotection with 95% yield (45 mg). NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.85 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 2.12 (s, 3H), 3.96 (m, 2H), 4.87 (s, 2H), 6.22 (m, 1H), 6.39 (m, 1H), 6.84–6.92 (m, 3H), 7.17 (m, 1H), 7.40 (m, 1H), 8.04 (m, 1H), 8.40 (s, 1H), 10.45 (s, 1H). HRMS calcd. for C₂₆H₂₁NO₈ (M)⁺ 475.1268, found 475.1269.

4.16. 4-Acetylamino-2-(6-carboxymethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-benzoic acid ethyl ester (dye 16)

Dye **16** was obtained from ester **8** (53 mg, 0.1 mmol) with 93% yield (44 mg). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.83 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 2.10 (s, 3H), 3.83 (m, 2H), 4.93 (s, 2H), 6.41 (m, 1H), 6.55 (m, 1H), 6.95–7.02 (m, 3H), 7.29 (m, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.89 (m, 1H), 8.19 (m, 1H), 10.52 (s, 1H). HRMS calcd. for C₂₆H₂₁NO₈ (M)⁺ 475.1268, found 475.1267.

4.17. 2-(6-Carbonylmethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-5-[3-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-amino)-propionyl-amino]-benzoic acid ethyl ester (dye 17)

Dye **17** was obtained from ester **9** (782 mg, 1.0 mmol) with 97% yield (704 mg). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.85 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 2.58 (m, 2H), 3.39 (m, 2H), 3.93 (m, 2H), 4.32 (m, 1H), 4.66 (m, 2H), 4.87 (s, 2H), 6.21 (m, 1H), 6.40 (m, 1H), 6.50–6.59 (m, 3H), 6.69 (m, 1H), 6.70 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.26–7.39 (m, 4H), 7.64 (m, 2H), 7.88 (m, 1H), 7.89 (m, 2H), 10.49 (s, 1H). HRMS calcd. for C₄₂H₃₄N₂O₁₀ (M)⁺ 726.2214, found 726.2212.

4.18. 2-(6-Carbonylmethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-4-[3-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-amino)-propionyl-amino]-benzoic acid ethyl ester (dye 18)

Dye **18** was obtained from ester **10** (782 mg, 1.0 mmol) with 95% yield (690 mg). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.85 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 2.36 (m, 2H), 3.23 (m, 2H), 3.92 (m, 2H), 4.25 (m, 1H), 4.51 (m, 2H), 4.85 (s, 2H), 6.21 (m, 1H), 6.33 (s, 1H), 6.44 (m, 1H), 6.80 (m, 1H), 6.83–6.95 (m, 3H), 7.15 (m, 1H), 7.22 (m, 2H), 7.26–7.42 (m, 4H), 7.64 (m, 2H), 7.85 (m, 2H), 10.50 (s, 1H). HRMS calcd. for C₄₂H₃₄N₂O₁₀ (M)⁺ 726.2214, found 726.2211.

4.19. 2-(6-Carbonylmethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-5-(2-{[2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-amino)-ethyl-carbamoyl]-methoxy}-acetyl-amino)-benzoic acid ethyl ester (dye 19)

Dye **19** was obtained from ester **13** (87 mg, 0.1 mmol) with 95% yield (77 mg). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.85 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 3.07 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 3.95 (m, 2H), 4.04 (s, 2H), 4.16 (m, 1H), 4.19 (s, 2H), 4.26 (m, 2H), 4.85 (s, 2H), 6.32 (m, 1H), 6.43 (m, 1H), 6.94–7.00 (m, 3H), 7.26 (m, 1H), 7.24–7.36 (m, 4H), 7.64 (m, 2H), 7.78 (m, 1H), 7.86 (m, 2H), 8.01 (m, 1H), 8.28 (m, 1H), 10.49 (s, 1H). HRMS calcd. for C₄₅H₃₉N₃O₁₂ (M)⁺ 813.2534, found 813.2537.

4.20. 2-(6-Carbonylmethoxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-4-(2-{[2-(9*H*-fluoren-9-ylmethoxycarbonyl-amino)-ethyl-carbamoyl]-methoxy}-acetyl-amino)-benzoic acid ethyl ester (dye 20)

Dye **20** was obtained from ester **14** (87 mg, 0.1 mmol) with 90% yield (73 mg). ¹H NMR ((CD₃)₂SO, ppm): 0.87 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz), 3.05 (m, 2H), 3.15 (m, 2H), 3.93 (m, 2H), 4.02 (s, 2H), 4.18 (m, 1H), 4.19 (s, 2H), 4.25 (m, 2H), 4.86 (s, 2H), 6.42 (m, 1H), 6.53 (m, 1H), 6.93–6.99 (m, 3H), 7.25 (m, 1H), 7.29–7.40 (m, 4H), 7.64 (m, 2H), 7.80 (m, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.99 (m, 1H), 8.18 (m, 1H), 10.51 (s, 1H). HRMS calcd. for C₄₅H₃₉N₃O₁₂ (M)⁺ 813.2534, found 813.2534.

4.21. Physico-chemical characterization of the dyes

Standard UV–vis and fluorescence spectra in 50 mM sodium tetraborate buffer, pH 9.8, were recorded at 0.5–10 μM dye concentration. The fluorescence

quantum yield of the dyes was determined as described (16) using alkaline solution of fluorescein as a reference ($\phi = 0.92$) (14, 16–18). To measure an effect of pH on fluorescence, 50 nM dye solution in 50 mM sodium tetraborate buffer (pH 9.8) was slowly titrated with HCl, aliquots were taken between pH 9.8 and 4, and fluorescence was measured at λ_{ex} 488 nm/ λ_{em} 515 nm.

For studying dye photostability Super-Teflon glass slides (VWR International) were used, which carry 40 circular wells of 2 mm diameter, separated by 30 μm -thick Teflon coating. A well was filled with 1 μL of 5 μM dye solution in 50 mM sodium tetraborate buffer, pH 9.8, and was enclosed with a coverslip. The entire well volume was irradiated under the microscope using standard 'fluorescein' filters set. The intensity delivered by the source on the surface of the slide was measured with a COHERENT LaserCheck probe and found to be $\sim 6 \text{ mW/cm}^2$ at 488 nm. Well images were recorded regularly with IMSTAR software and the mean fluorescence intensity was calculated. The snapshots took 8–120 ms, that was considerably shorter than the characteristic time of photobleaching kinetics $t_{1/2} > 14 \text{ s}$.

4.22. Solid phase synthesis of fluorogenic substrate

The substrate was synthesized semi-manually on Tenta-Gel S NH_2 resin (20 μm beads, 0.25 mmol/g) using Bohdan MiniBlock synthesizer (Mettler Toledo, Viroflay France). The resin (100 mg, 0.025 mmol) preswollen for 3 h in dry DCM was resuspended in 2 mL of dry DCM, and the solution of Boc-PEG-acid ($n = 7$) (44 mg, 0.075 mmol), DIC (16 mg, 0.125 mmol), HOBt (17 mg, 0.125 mmol), and DMAP (3 mg, 0.025 mmol) in 0.5 mL of dry DMF was added. The reaction mixture was shaken overnight at room temperature. The resin was washed with dry DMF (3 \times 3 mL) and dry DCM (3 \times 3 mL), and treated with a mixture of acetic anhydride (18 μL , 0.2 mmol), pyridine (16 μL , 0.2 mmol) in 2 mL of dry DMF for 2 h. As revealed by ninhydrin test, this procedure capped all non-reacted amino groups remaining on the resin. After thorough washing with dry DMF and dry DCM, the resin was deprotected with 20% TFA in DCM.

The resulting TentaGel-PEG(7)- NH_2 resin was used for substrate synthesis by standard Fmoc protocol.¹⁹ Ten-fold excess of Fmoc-protected amino acids for 2 h was used in each coupling cycle to ensure the completion of coupling reaction (3-fold excess overnight for Fmoc-protected fluorescent amino-acid **18**). Each successive coupling was verified by ninhydrin test and by measuring the resin weight. Prior to Methyl red coupling, the synthesized sequence was confirmed by Edman sequencing. In order to attach Methyl red, N ϵ -Boc lysine was introduced in the peptide chain. Prior to final N α -Fmoc deprotection the N ϵ -Boc-protecting group was removed with 20% TFA in DCM. The resin was resuspended in 2 mL of dry DCM and was treated with a solution of Methyl red (34 mg, 0.125 mmol), DIC (16 mg, 0.125 mmol), HOBt (17 mg, 0.125 mmol), and DMAP (3 mg, 0.025 mmol) in 0.5 mL of dry DMF. The reaction mixture was stirred for 6 h at room

temperature. The resin was washed thoroughly with dry DMF and dry DCM, and fully deprotected.

4.23. On-bead proteolysis assay

The beads were swollen overnight in 0.4 M sodium phosphate buffer (pH 6.8), centrifuged, and resuspended in the same buffer containing 8 mM DTT and 4 mM EDTA.²⁰ The samples of bead suspension were incubated with 0.5 μM papain for 2 h, then washed and examined for fluorescence. For inhibitor assays, 5 μM stock papain solution was preincubated with 1 mM *N*-ethylmaleimide for 15 min at 37 $^\circ\text{C}$ before adding to beads.

For bead imaging, the bead samples were spotted in the wells of Super-Teflon glass slides and were enclosed with coverslips. The scanning was performed on GeneTAC LS IV scanner using a 488 nm argon ion laser and a 512 nm emission filter (512BP). The usual instrument settings were gain = 26.0, black = 1.5, and scanning resolution of 5 μm . The obtained images were analyzed with Genepix Pro 4.0 software. Microscope measurements were performed on an Olympus BX51 fluorescent microscope with standard 'fluorescein' filters set. A random population of 200 beads was analyzed for each sample. Individual beads were localized automatically with IMSTAR software, which was also used to measure fluorescence intensity. Data were converted into histograms representing a percentage of bead population with a fluorescence in a given range.

Acknowledgment

This work was supported by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer to M.Y.B.

References and notes

1. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, *409*, 860–921.
2. Venter, J. C. et al. *Science* **2001**, *291*, 1304–1351.
3. Puente, X. S.; Sánchez, L. M.; Overall, C. M.; López-Otín, C. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*, 544–558.
4. (a) Goddard, J. P.; Reymond, J. L. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 363–370; (b) Boonacker, E.; Van Noorden, C. J. F. *J. Histochem. Cytochem.* **2001**, *49*, 1473–1486.
5. (a) Rano, T. A.; Timkey, T.; Peterson, E. P.; Rotonda, J.; Nicholson, D. W.; Becker, J. W.; Chapman, K. T.; Thornberry, N. A. *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 149–155; (b) Backes, B. J.; Harris, J. L.; Leonetti, F.; Craik, C. S.; Ellman, J. A. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 187–193; (c) Thornberry, N. A.; Chapman, K. T.; Nicholson, D. W. *Methods Enzymol.* **2000**, *322*, 100–110; (d) Edwards, P. D.; Mauger, R. C.; Cottrell, K. M.; Morris, F. X.; Pine, K. K.; Sylvester, M. A.; Scott, C. W.; Furlong, S. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 2991–2994.
6. (a) Harris, J. L.; Backes, B. J.; Leonetti, F.; Mahrus, S.; Ellman, J. A.; Craik, C. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, *97*, 7754–7759; (b) Maly, D. J.; Leonetti, F.; Backes, B. J.; Dauber, D. S.; Harris, J. L.; Craik, C. S.; Ellman, J. A. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 910–915; (c) Zhu, Q.; Li, D. B.; Uttamchandani, M.; Yao, S. Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1033–1036.

7. (a) Leytus, S. P.; Melhado, L. L.; Mangel, W. F. *Biochem. J.* **1983**, *209*, 299–307; (b) Leytus, S. P.; Patterson, W. L.; Mangel, W. F. *Biochem. J.* **1983**, *215*, 253–260; (c) Williams, J.; McGrath, W. J.; Mangel, W. F. *Biotechniques* **2000**, *29*, 1108–1113; (d) Winssinger, N.; Damoiseaux, R.; Tully, D. C.; Geierstanger, B. H.; Burdick, K.; Harris, J. L. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1351–1360.
8. (a) Van Noorden, C. J. F.; Boonacker, E.; Bissell, E. R.; Meijer, A. J.; van Marle, J.; Smith, R. E. *Anal. Biochem.* **1997**, *252*, 71–77; (b) Boonacker, E.; Elferink, S.; Bardai, A.; Wormmeester, J.; Van Noorden, C. J. *Biotechniques* **2003**, *35*, 766–768.
9. George, J.; Teear, M. L.; Norey, C. G.; Burns, D. D. *J. Biomol. Screen.* **2003**, *8*, 72–80.
10. Shi, X. P.; Tugusheva, K.; Bruce, J. E.; Lucka, A.; Wu, G. X.; Chen-Dodson, E.; Price, E.; Li, Y.; Xu, M.; Huang, Q.; Sardana, M. K.; Hazuda, D. J. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 21286–21294.
11. Cummings, R. T.; Salowe, S. P.; Cunningham, B. R.; Wiltsie, J.; Park, Y. W.; Sonatore, L. M.; Wisniewski, D.; Douglas, C. M.; Hermes, J. D.; Scolnick, E. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 6603–6606.
12. (a) Meldal, M.; Svendsen, I.; Breddam, K.; Auzanneau, F. I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 3314–3318; (b) Meldal, M.; Svendsen, I. B.; Juliano, L.; Juliano, M. A.; Nery, E. D.; Scharfstein, J. J. *Peptide Sci.* **1998**, *4*, 83–91; (c) St. Hilaire, P. M.; Willert, M.; Juliano, M. A.; Juliano, L.; Meldal, M. *J. Comb. Chem.* **1999**, *1*, 509–523; (d) Matayoshi, E. D.; Wang, G. T.; Krafft, G. A.; Erickson, J. *Science* **1990**, *247*, 954–958.
13. Pope, A. J.; Hapts, U. M.; Moore, K. J. *Drug Discovery Today* **1999**, *4*, 350–362.
14. Lohse, J.; Nielsen, P. E.; Harrit, N.; Dahl, O. *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 503–509.
15. Khomyakova, E. B.; Dreval, E. V.; Tran-Dang, M.; Potier, M. C.; Soussaline, F. P. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* **2004**, *50*, 217–224.
16. Adamczyk, M.; Grote, J.; Moore, J. A. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 544–547.
17. Klonis, N.; Sawyer, W. H. *J. Fluoresc.* **1996**, *6*, 147–159.
18. Martin, M. M.; Lindqvist, L. *J. Luminesc.* **1975**, *10*, 381–390.
19. Chan, W. C.; White, P. D. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis a Practical approach*; Oxford University Press: New York, 2002.
20. Szabelski, M.; Stachowiak, K.; Wicz, W. *Acta Biochim. Pol.* **2001**, *48*, 995–1002.
21. (a) Orndorff, W. R.; Hemmer, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1927**, *49*, 1272–1280; (b) Fompeydie, D.; Levillain, P. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1980**, 459–465.
22. Tsien, R. Y. *Methods Cell. Biol.* **1989**, *30*, 127–156.
23. Gao, J.; Wang, P.; Giese, R. W. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 6397–6401.
24. Nguyen, T.; Francis, M. B. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3245–3248.
25. He, J.; Chen, F.; Zhao, J.; Hidaka, H. *Colloids Surf., A* **1998**, *142*, 49–57.
26. Flemming, G. R.; Knight, A. W. E.; Morris, J. M.; Morrison, R. J. S.; Robinson, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 4306–4311.
27. Wang, L.; Roitberg, A.; Meuse, C.; Gaigalas, A. K. *Spectrochim. Acta, Part A* **2001**, *57*, 1781–1791.
28. (a) Falck, J. R.; Krieger, M.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7396–7398; (b) Galloway, C. J.; Dean, G. E.; Marsh, M.; Rudnick, G.; Mellman, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1983**, *80*, 3334–3338.
29. (a) Andrews, P. C.; Hines, C. M.; Dixon, J. E. *Biochemistry* **1980**, *19*, 5494–5500; (b) Fiorucci, L.; Erba, F.; Bolognesi, M.; Coletta, M.; Ascoli, F. *FEBS Lett.* **1997**, *408*, 85–88.
30. (a) Song, L.; Hennink, E. J.; Young, I. T.; Tanke, H. J. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 2588–2600; (b) Song, L.; Varma, C. A.; Verhoeven, J. W.; Tanke, H. J. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 2959–2968.
31. Leon, S.; Quarrell, R.; Lowe, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2997–3002.
32. Schechter, I.; Berger, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1968**, *32*, 898–902.
33. McKeen, C. M.; Brown, L. J.; Nicol, J. T.; Mellor, J. M.; Brown, T. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2267–2275.
34. Olivos, H. J.; Bachhawat-Sikder, K.; Kodadek, T. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1242–1245.
35. Lam, K. S.; Lebl, M.; Krchnak, V. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 411–448.
36. Needels, M. C.; Jones, D. G.; Tate, E. H.; Heinkel, G. L.; Kochersperger, L. M.; Dower, W. J.; Barrett, R. W.; Gallop, M. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 10700–10704.
37. Oliver, K. G.; Kettman, J. R.; Fulton, R. J. *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 2057–2060.
38. Walt, D. R. *Science* **2000**, *287*, 451–452.
39. Mugherli, L.; Chatelain, F.; Balakirev, M. Y. *Abstracts of Papers, Volume 1*, 8th International Conference on Miniaturized Systems in Chemistry and Life Science, Malmo, Sweden, September 26–30; *MicroTAS* **2004**, 542–544.

ANNEXE IV : PUBLICATION

Fluorogenic ester substrates to assess proteolytic activity

Laurent Mugherli, Olga N. Burchak, François Chatelain and Maxim Y. Balakirev*

*Laboratoire Biopuces, Département Réponse et Dynamique Cellulaires,
Commissariat à l'Énergie Atomique, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France*

Received 25 April 2006; revised 9 June 2006; accepted 10 June 2006

Available online 27 June 2006

Abstract—The synthesis of a new type of fluorogenic ester substrates is described. Prepared from fluorescein in three steps with common commercially available precursors, they all generate bright green fluorescence upon proteolysis. Their particular structure allows the same substrate to be used to report enzymatic activity of various proteases from serine and cysteine superfamilies. The substrate cleavage is sensitive to specific protease inhibitors providing a tool for inhibitor screening.
© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Proteases are involved in numerous crucial cellular processes varying from protein degradation and re-cycling to specific post-translational modifications.¹ Protease malfunctions often lead to pathologies, making them biomarkers and therapeutic targets of choice.² Assessing their catalytic activity is therefore essential.

Various methods for visualizing enzyme activity by using chromogenic or fluorogenic substrates have emerged recently.³ For proteases, peptide substrates with internally quenched fluorescence have been intensively employed. There are more than forty papers referenced in the Pubmed database for the last 10 years.⁴ These fluorogenic peptides, designed to perfectly match a substrate binding site,⁵ are optimally suited to assess the substrate specificity of a given protease.⁶ At the same time, short less-specific substrates are often useful for the simple detection of the catalytic activity of proteases. These substrates include one or two amino acid residues bound to amino-fluorophore such as amino-coumarins AMC⁷ and ACC,⁸ Rhodamine 110^{9a} or cresyl violet.^{9b} Z-F-R-AMC, the most widely used substrate for cysteine proteases of the papain family,^{4a} shows how important such substrates can be.

It has been known for a long time that serine and cysteine proteases possess an esterase activity.¹⁰ Due to ready transesterification of the scissile bond to the acyl-enzyme intermediate, the hydrolysis of peptide

esters by these enzymes proceeds orders of magnitude faster than the corresponding enzymatic hydrolysis of peptide bonds.¹⁰ This makes peptide esters a promising scaffold for the synthesis of fluorogenic protease substrates. To our knowledge, esters of fluorescein have often been employed for studying various esterase activities,¹¹ phosphodiesterases¹² and phosphatases,¹³ but their use to sense protease activity has only been reported twice.¹⁴

We report here an easy, and low-cost, synthesis of new convenient short substrates based on single amino-acid fluorescein monoesters and demonstrate their use in universal and sensitive detection of protease activity.

Substrates were designed with the general formula PG-AA-MFE where PG is a protecting group (Boc or Fmoc), AA is an amino acid residue, and MFE stands for the 6'-methylfluorescein ether (Fig. 1). Due to the locked spiro-lactone structure, these compounds are non-fluorescent. Proteases were expected to hydrolyze

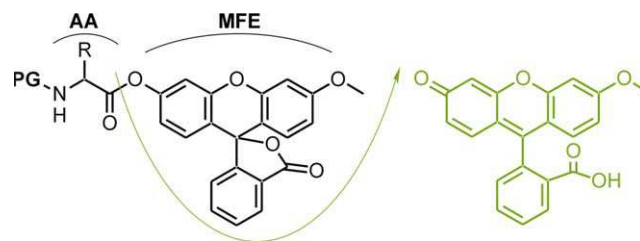


Figure 1. Schematic representation of fluorogenic ester substrates and protease cleaved product.

Keywords: Fluorescein ester; Fluorogenic substrate; Proteases.

* Corresponding author. Tel.: +33 438782103; fax: +33438785917; e-mail: balakirev@dsvgre.cea.fr

the ester bond between AA and MFE thus ‘unlocking’ the fluorophore and releasing the fluorescent quinoid form (Figure 1, green arrow, determined quantum yield $\phi_{\text{MFE}} = 0.37$). In addition, three amino acid-free control compounds were synthesized, having PG-AA moiety replaced by an acetyl, a tosyl or a *p*-nitrobenzenesulfonyl group (Scheme 1).

Synthesis was started from fluorescein in open quinoid form **1**, which was methylated¹⁵ by methyl iodide yielding dimethylfluorescein ether ester **2** (Scheme 1). The ester group was hydrolyzed by aqueous alkali and after acidic extraction, 6'-methylfluorescein ether **3** (MFE) was obtained in a lactone pale yellow form. Fluorogenic substrates **4a–e** were synthesized by acylation of MFE with protected amino acids and DCC as a coupling agent. Control molecules **4g–i** were obtained by reacting MFE with acetyl, tosyl or *p*-nitrobenzenesulfonyl chloride in the presence of DIEA in DCM. This three-step, fast, and cost-effective synthesis gave six amino acid substrates and three control molecules with good overall yield (30–50%).

There are four major classes of proteases: serine proteases, cysteine proteases, aspartic proteases, and metalloproteases. The cysteine protease cathepsin B (EC 3.4.22.1) is a papain-related enzyme involved in lysosomal protein processing.¹⁶ The overexpression of this enzyme was found to be implicated in the tumor angiogenesis process¹⁷ and linked with many etiologically different cancers.¹⁸ This protease of medical interest¹⁹ was chosen to test the synthesized MFE substrates.

The substrates were incubated at 37 °C with cathepsin B in a phosphate buffer (pH 6.7) containing EDTA and DTT, and the proteolysis was monitored by reading fluorescence emission at 515 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm). Since, like all known ester substrates, MFE esters undergo slow spontaneous hydrolysis, the rate of proteolysis was estimated as a difference of the substrate hydrolysis with and without protease (Fig. 2). Although all amino acid substrates were cleaved by cathepsin B, the comparison of initial reaction rates showed that Boc-protected-AA-MFE substrates are cleaved more readily than Fmoc-protected ones. The latter may be explained by higher steric hindrance of the Fmoc residue. The nature of AA residue influenced also the cleavage. Reaction rate order Gly, Ala > Abu > Leu seems to indicate that the smaller the amino acid hydrocarbon chain, the faster

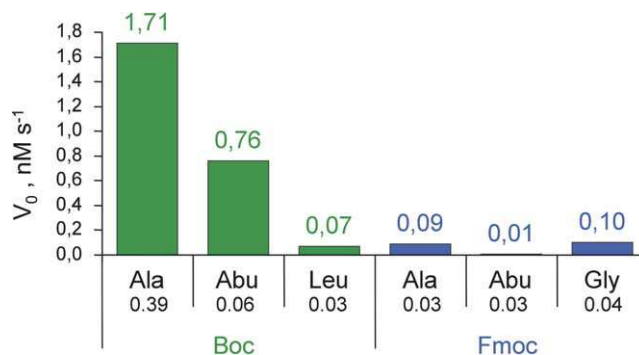


Figure 2. Comparison of initial rates of cathepsin B cleavage for six ester substrates. The values were calculated as a difference of the substrate hydrolysis rate with and without protease (the corresponding rates of spontaneous substrate hydrolysis are indicated below the histogram). The fluorescence units were converted into concentration equivalents by using a calibration curve made with known dilutions of MFE. All values were means of two or three experiments (average CVs < 0.2).

the hydrolysis. No enzymatic cleavage was observed with the control compounds Ac-MFE, Ts-MFE, and *p*-NO₂PhSO₂-MFE demonstrating that the presence of amino acid residue is essential for cathepsin B cleavage.

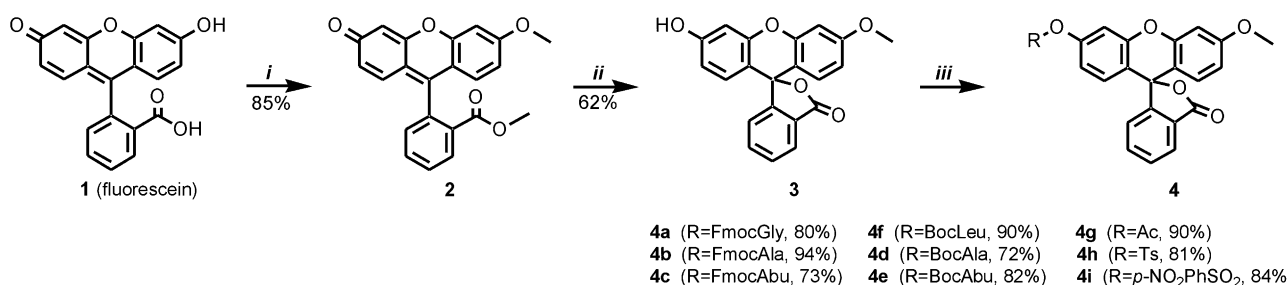
To address substrate cleavage in more detail, the initial reaction rates were measured with a substrate concentration ranging from 0 to 40 μM. The kinetic parameters were then obtained by fitting to Michaelis–Menten equation with OriginPro 7.5 software. The results listed in Table 1 show that hydrolysis of the Boc-protected substrates is approximately 10 times more efficient than

Table 1. Kinetic parameters for substrate cleavage by cathepsin B

Substrate	V_{max}^a (nM s ⁻¹)	K_m^a (μM)	k_{cat}^b (min ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
Boc-Ala-MFE	3.02 ± 0.48	4.5 ± 2.8	0.73 ± 0.12	2700
Fmoc-Ala-MFE	0.28 ± 0.04	7.6 ± 3.3	0.07 ± 0.01	150
Boc-Abu-MFE	1.05 ± 0.08	2.2 ± 0.6	0.25 ± 0.02	1910
Fmoc-Abu-MFE	0.11 ± 0.04	7.2 ± 6.9	0.03 ± 0.01	60
Boc-Leu-MFE	0.16 ± 0.48	2.7 ± 1.3	0.04 ± 0.01	240
Fmoc-Gly-MFE	0.37 ± 0.04	7.9 ± 3.3	0.09 ± 0.01	190

^a Values obtained by fitting experimental data to Michaelis–Menten equation using OriginPro 7.5 software.

^b Values calculated from V_{max} knowing concentration of cathepsin B (250 nM).



Scheme 1. Three-step synthesis of fluorogenic ester substrates. Reagents and conditions: i—MeI, K₂CO₃, DMF; ii—(1) 10% NaOH, MeOH, (2) 0.1 M HCl; iii—(4a–e) PG-AA, DCC, DCM, (4g) AcCl, (4h) TsCl, (4i) *p*-NO₂PhSO₂Cl, DIEA, DCM.

that of Fmoc analogues, mainly because of an order of magnitude higher turnover number. Close K_m values indicate that interaction of Boc-AA-MFE and Fmoc-AA-MFE with cathepsin B is similar, and Fmoc steric hindrance would then slow down the catalytic transformation once in the active site. The increase in size of the AA side chain also results in a decrease in k_{cat} without significant changes in K_m value.

Earlier k_{cat}/K_m values reported for cleavage of Z-FR-AMC by cathepsin B were of the order of 10^5 – 10^6 $M^{-1}s^{-1}$, depending on reaction conditions.^{20,4a} These values are two to three orders of magnitude higher than that obtained for Boc-Ala-MFE; probably because Boc-Ala does not fit S_1 and S_2 substrate-binding sites like Arg and Phe, known to be preferred P_1 and P_2 residues, respectively, for cathepsin B.²¹

We next examined whether Boc-Ala-MFE can be used to detect proteases distinct from cathepsin B. One other cysteine protease, papain (3.4.22.2), and two serine proteases, chymotrypsin (3.4.21.1) and hepatitis C virus (HCV) NS3 protease,²² were tested. The proteolysis was analyzed with 5 μ M Boc-Ala-MFE in appropriate buffers. As shown in Figure 3a, cathepsin B and serine proteases exhibited close cleavage rates, but papain proved to cleave this substrate considerably faster than other enzymes. This is consistent with exceptionally high activity and wide specificity of papain.²³ The observed difference in Boc-Ala-MFE cleavage may also be related to the organization of S_2 – S_1 substrate-binding site of the proteases. The preferred residues in P_2 – P_1 positions are F-G for papa-

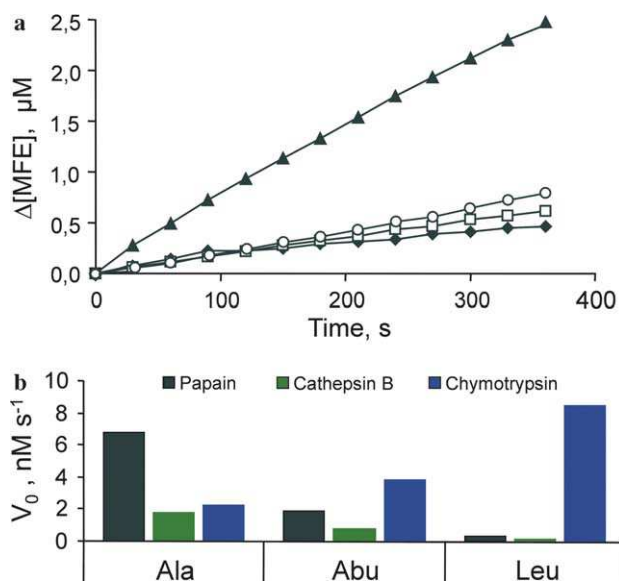


Figure 3. Cleavage of fluorogenic substrates by cysteine and serine proteases. (a) Cleavage of 5 μ M Boc-Ala-MFE by 12.5 nM papain, $V_0 = 6.78$ nM/s (\blacktriangle); 250 nM chymotrypsin, $V_0 = 2.23$ nM/s (\circ); 250 nM cathepsin B, $V_0 = 1.71$ nM/s (\square); and 500 nM NS3, $V_0 = 1.19$ nM/s (\blacklozenge). The values were calculated as a difference of the substrate hydrolysis rate with and without protease. All values are means of two or three experiments (average CVs < 0.2). (b) Comparison of the initial rates of protease cleavage for three Boc substrates.

in,²⁴ F-R for cathepsin B,²¹ and V-Y or A-F for chymotrypsin.²⁵ It is possible that P_1 -Ala mimics better the nonpolar residue in the P_1 -position of papain substrates than the charged P_1 -residue of cathepsin B or bulky aromatic P_1 -amino acid of chymotrypsin substrates. Indeed, comparison of the efficiency of the cleavage of three Boc substrates by these proteases showed that chymotrypsin has a reverse rate order compared to papain and cathepsin B preferring the substrates with bulkier side chains (Fig. 3b). Thus, formally, Boc-Leu-MFE could be considered as a chymotrypsin-specific substrate, while Boc-Ala-MFE is an universal substrate cleavable by all proteases including highly specific HCV NS3 enzyme.²⁶ The sensitivity obtained for papain (4 nM), for cathepsin B (54 nM), and for chymotrypsin (15 nM) was comparable with other analogous fluorimetric protease assays.²⁷ It should be noted, however, that for 500 nM NS3 the specific fluorescence increase showed by MFE-ester substrates was just above the defined limit of detection (S/N = 3).

One of the important applications of fluorogenic substrates is in screening protease inhibitors. We thus examined whether the proteolysis of Boc-Ala-MFE is sensitive to general cysteine protease inhibitor E-64 and to PMSF, the inhibitor of serine proteases. The proteolysis assay conditions were the same as described in Figure 3 except that 1 μ M E-64 or 0.5 mM PMSF was present in the reaction buffer (Fig. 4).

Cysteine proteases were strongly inhibited by E-64, while PMSF had very moderate effect. On the other hand, E-64 did not affect at all the cleavage by chymotrypsin, while PMSF inhibited completely this serine protease. As expected, NS3 protease was not affected much by these inhibitors, probably due to its particularly shallow active site that renders inefficient an interaction with small molecule inhibitors.²⁶ The proteolysis of the substrate by NS3 could, however, be inhibited by 1 μ M BILN 2061, a specific inhibitor of this enzyme²⁸ (data not shown). All together, the inhibition profile observed for Boc-Ala-MFE proteolysis suggests that the cleavage of this substrate represents correctly the enzyme catalysis and can be used for inhibitor assays. Moreover, such substrates are well suited for screening of chemical libraries because small molecules usually

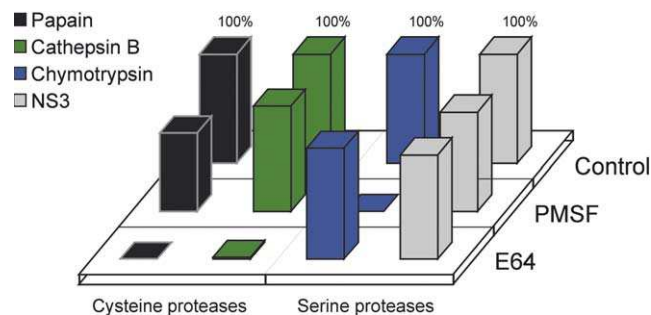


Figure 4. Effect of protease inhibitors on the initial rate of Boc-Ala-MFE proteolysis. The reaction conditions were the same as in Figure 3 except that 1 μ M E-64 or 0.5 mM PMSF were added where indicated.

display low absorption within the fluorescein excitation/emission range and will not interfere with fluorescence measurements.²⁹ Inhibitor assay could easily be performed in microtiter plates provided that purified enzymes with a high enough cleavage efficiency are used.

In conclusion, new fluorogenic MFE-ester substrates have been synthesized in a fast and convenient way. The substrates may be used as sensitive indicators of a wide range of proteolytic activities, and show promise for screening libraries of protease inhibitors.

Acknowledgment

This work was supported by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer to M.Y.B.

Supplementary data

Supporting information contains experimental information and characterization data for all new compounds. Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.bmcl.2006.06.037](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.06.037).

References and notes

- Puente, X. S.; Sánchez, L. M.; Overall, C. M. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*, 544–558.
- (a) Leung, D.; Abbenante, G.; Fairlie, D. P. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 305–341; (b) Weissleder, R.; Ntziachristos, V. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 123–128.
- Goddard, J.-P.; Reymond, J.-L. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 1–15.
- (a) Melo, R. L.; Alves, L. C.; Del Nery, E.; Juliano, L.; Juliano, M. A. *Anal. Biochem.* **2001**, *293*, 71–77; (b) Szabelski, L.; Rogiewicz, M.; Wiczak, W. *Anal. Biochem.* **2005**, *342*, 20–27; (c) Burchak, O. N.; Mugherli, L.; Chatelain, F.; Balakirev, M. Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2559–2568.
- Barett, A. J. *Methods Enzymol.* **1994**, *244*, 1–15.
- Portaro, F. C. V.; Santos, A. B. F.; Cezari, M. H. S.; Juliano, M. A.; Juliano, L.; Carmona, E. *Biochem. J.* **2000**, *347*, 123–129.
- (a) Melo, R. L.; Barbosa Pozzo, R. C.; Alves, L. C.; Perissutti, E.; Caliendo, G.; Santagada, V.; Juliano, L.; Juliano, M. A. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1547*, 82–94; (b) Birney, Y. A.; O'Connor, B. F. *Protein Expr. Purif.* **2001**, *22*, 286–298.
- Zhu, Q.; Uttamchandani, M.; Li, D. B.; Lesaicherre, M. L.; Yao, S. Q. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 1257–1260.
- (a) Leytus, S. P.; Patterson, W. L.; Mangel, W. F. *Biochem. J.* **1983**, *215*, 253–260; (b) Boonacker, E.; Elferink, S.; Bardai, A.; Fleischer, B.; Van Noorden, C. J. F. *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, *51*, 959–968.
- Fersht, A. In *Enzyme Structure and Mechanism*; W.H. Freeman & Co: New York, 1985.
- (a) Breeuwer, P.; Drocourt, J. L.; Bunschoten, N.; Zwietering, M. H.; Rombouts, F. M.; Abee, T. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *611*, 614–619; (b) Lomolino, G.; Lante, A.; Crapisi, A.; Spettoli, P.; Curioni, A. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 1021–1023; (c) Kierat, R. M.; Kraemer, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 4824–4827.
- (a) Caturla, F.; Enjo, J.; Bernabeu, C. M.; Le Serre, S. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1903–1911; (b) Takakusa, H.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1653–1657.
- (a) Qingping, W.; Scheigetz, J.; Roy, B.; Ramachandran, C.; Gresser, M. J. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1601*, 19; (b) Gee, K. R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1395.
- (a) Melhado, L. L.; Stuart, P. W.; Steven, L. P.; Mangel, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7299; (b) Thomas, J. J.; Eveland, W. C.; Medzon, E. L.; Christian, W.; Wylie, D. E.; Burckhalter, J. H.; Jones, R. H. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1972**, *140*, 179.
- Zaikova, T. O.; Rukavishnikov, A. V.; Birrell, G. B.; Griffith, O. H.; Keana, J. F. *Bioconjug. Chem.* **2001**, *12*, 307.
- Kirschke, H.; Barrett, A. J. In *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown*; Glaumann, H., Ballard, F. J., Eds.; Academic Press: London, 1987; p 193.
- (a) Mikkelsen, T.; Yan, P. S.; Ho, K. L.; Sameni, M.; Sloane, B. F.; Rosenblum, M. L. *J. Neurosurg.* **1995**, *83*, 285; (b) Sloane, B. F.; Dunn, J. R.; Honn, K. V. *Science* **1981**, *212*, 1151.
- Keppeler, D.; Sameni, M.; Moin, K.; Mikkelsen, T.; Diglio, C. A.; Sloane, B. F. *Biochem. Cell. Biol.* **1996**, *74*, 799.
- (a) Nägler, D. K.; Storer, A. C.; Portaro, F. C. V.; Carmona, E.; Juliano, L.; Ménard, R. *Biochemistry* **1997**, *36*, 12608; (b) Willenbrock, F.; Brocklehurst, K. *Biochem. J.* **1984**, *222*, 805.
- Handbook of Proteolytic Enzymes*; Barret, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F., Jr., Eds.; Academic Press: London, 1998.
- Barrett, A. J. *Biochem. J.* **1980**, *187*, 909.
- Drouet, C.; Bouillet, L.; Csopaki, F.; Colomb, M. G. *FEBS Lett.* **1999**, *458*, 415–418.
- Arnon, R. In *Papain, Methods in Enzymology*; Perlmann, G., Lorand, L., Eds.; Academic Press: New York, 1970, pp 226.
- Leon, S.; Quarrell, R.; Lowe, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 2997–3002.
- Boes, B.; Hengel, H.; Ruppert, T.; Multhaup, G.; Kosziniowski, U. H.; Kloetzel, P.-M. *J. Exp. Med.* **1994**, *179*, 901–909.
- Cicero, D. O.; Barbato, G.; Koch, U.; Ingallinella, P.; Bianchi, E.; Nardi, C. M.; Steinkühler, C.; Cortese, R.; Matassa, V.; De Francesco, R.; Pessi, A.; Bazzo, R. *J. Mol. Biol.* **1999**, *289*, 385–396.
- Molecular Probes, The Handbook—A Guide to Fluorescent and Labeling Techniques, Chapter 10, 10th ed. <http://probes.invitrogen.com/handbook/>.
- Tsantrizos, Y. S. *Biopolymers* **2004**, *76*, 309–323.
- Pope, A. J.; Haupts, U. M.; Moore, K. J. *Drug Discov. Today* **1999**, *4*, 350–362.

TITRE : Microarrays fonctionnels de gouttes : de la synthèse chimique combinatoire au criblage de molécules bioactives.

RESUME : Les microarrays, assemblages organisés d'entités chimiques, biologiques ou cellulaires sont en pleine expansion, car ils présentent un potentiel élevé en recherche fondamentale et appliquée. La mise en œuvre de la technologie microarray repose sur trois méthodes essentielles : la chimie de surface pour la fonctionnalisation des supports, l'utilisation de technologies de précision micrométrique pour fabriquer les microarrays et la détection. Parmi toutes les applications, les microarrays visant à détecter l'activité enzymatique ont connus un développement rapide car ils permettent de tester l'efficacité d'un grand nombre de substrats ou d'inhibiteurs en parallèle. Les protéases, enzymes indispensables aux organismes vivants, et cibles thérapeutiques reconnues, sont des modèles biologiques de choix pour les études d'activité enzymatique sur microarray. La synthèse chimique sur puce n'est en revanche pas très développée.

La technologie développée au sein du laboratoire nous permet de former sur quelques cm² des microarrays de centaines de microgouttes constituant chacune un microréacteur indépendant. Le but de cette thèse est d'appliquer pour la première fois cette technologie à la synthèse chimique et à l'étude de l'activité protéolytique, avant de combiner de manière novatrice les deux approches pour réaliser un criblage.

L'application de ces microarrays en synthèse chimique a été utilisée avec succès pour la synthèse d'une banque de molécules chimiques et pour la recherche combinatoire de nouveaux fluorophores. En ce qui concerne l'enzymologie, l'observation de la protéolyse a été validée en utilisant trois types de substrats fluorogènes, dans un premier temps avec la papaïne, puis avec une métalloprotéase, et enfin avec la protéase virale NS3 du virus de l'hépatite C. Finalement, l'utilisation séquentielle de la synthèse chimique et de la biochimie sur un même microarray, qui constitue une approche inédite, a été dédiée à la recherche de nouveaux inhibiteurs de la protéase virale NS3. Ce criblage a conduit à la découverte de molécules potentiellement intéressantes comme agents antiviraux.

Mots clés : *Microarray, puce, technologie, synthèse chimique combinatoire, molécules bioactives, substrats fluorogènes, protéases, NS3, VHC, antiviraux.*

TITLE : Functional droplet microarrays : from combinatorial chemical synthesis to bioactive molecules screening.

ABSTRACT : Microarrays are orderly arrangement of chemical, biological or cellular entities. This research field is rapidly growing because of high expectations in fundamental and applied sciences. The microarray technology is supported by three main methods: surface chemistry for slides functionalisation, accurate technologies for manufacturing, and detection. Among possible applications, studying enzymatic activity is of high interest as it allows for monitoring the behaviour of enzymes in parallel, in the presence of a variety of substrates or inhibitors. Proteases play a key role in all living organisms and are therapeutic targets of choice, which make them promising enzymological models for microarrays.

Fast creation of microarrays made of hundreds of separated microdroplets on surface of a few cm² is achieved with the technology developed in our lab. Each droplet behaves as an individual microreactor. The aim is to use for the first time this technology for chemical synthesis and proteolysis monitoring. These two approaches are then to be combined in an original way to carry out a screening experiment.

These microdroplets arrays were applied successfully to chemical synthesis of a library of inhibitors as well as for the screening of fluorescent products. Enzymology on chip was performed with papain, a metalloprotease and HCV protease NS3, using three different kinds of fluorogenic substrates. Finally, a sequential method based on the library assembly by chemical synthesis on microarray, followed by NS3 assay on the same microarray was tried for the first time and applied to the screening of NS3 inhibitors. Promising hits displaying were discovered.

Keywords : *Microarray, chip, technology, combinatorial chemical synthesis, bioactive molecules, fluorogenic substrates, proteases, NS3, VHC, antiviral agent.*

Laboratoire d'accueil:

Laboratoire Biopuces, CEA Grenoble / DSV / DRDC, 17 rue des Martyrs, 38054 GRENOBLE Cedex 9.