

Ecole Centrale de Lyon

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE CENTRALE DE LYON

Spécialité : Chimie et chimie physique

Présentée par

Graziella EL KHOURY

Le 25 janvier 2008

**TESTS IMMUNOLOGIQUES MINIATURISES POUR
LE DEVELOPPEMENT DE PUCES A PEPTIDES ET A PROTEINES**

JURY

M^{me} Rosaria FERRIGNO
M^{me} Claire-Marie PRADIER
M^r Oleg MELNYK
M^r Dominique RIGAL
M^r Jean WALLACH
M^r Jean-Pierre CLOAREC
M^{me} Emmanuelle LAURENCEAU

Présidente
Rapporteur, Paris VI
Rapporteur, Lille
Membre
Membre invité
Directeur de thèse
Co-directrice de thèse



ECOLE CENTRALE DE LYON
DIRECTION DE LA RECHERCHE

Liste des personnes Habilitées à Diriger des Recherches en poste à l'Ecole Centrale de Lyon

Nom-Prénom	Corps grade	Laboratoire ou à défaut département ECL	Etablissement
AURIOL Philippe	professeur	AMPERE	ECL
BEROUAL Abderrahmane	professeur	AMPERE	ECL
BURET François	maître de conférences	AMPERE	ECL
JAFFREZIC-RENAULT Nicole	directeur de recherche	AMPERE	CNRS/ECL
KRÄHENBÜHL Laurent	directeur de recherche	AMPERE	CNRS/ECL
MARTELET Claude	professeur	AMPERE	ECL
NICOLAS Alain	professeur	AMPERE	ECL
NICOLAS Laurent	directeur de recherche	AMPERE	CNRS/ECL
SIMONET Pascal	chargé de recherche	AMPERE	CNRS/ECL
THOMAS Gérard	professeur	AMPERE	ECL
VOLLAIRE Christian	maître de conférences	AMPERE	ECL

Nbre Ampère 11

HELLOUIN Yves	maître de conférences	DER EEA	ECL
LE HELLEY Michel	professeur	DER EEA	ECL

Nbre DER EEA 2

GUIRALDENQ Pierre	professeur émérite	DER STMS	ECL
VINCENT Léo	professeur	DER STMS	ECL

Nbre DER STMS 2

LOHEAC Jean-Pierre	maître de conférences	ICJ	ECL
MAITRE Jean-François	professeur émérite	ICJ	ECL
MARION Martine	professeur	ICJ	ECL
MOUSSAOUI Mohand	professeur	ICJ	ECL
MUSY François	maître de conférences	ICJ	ECL
ROUY MIRONESCU Elisabeth	professeur	ICJ	ECL
ZINE Abdel-Malek	maître de conférences	ICJ	ECL

Nbre ICJ 7

DAVID Bertrand	professeur	ICTT	ECL
----------------	------------	------	-----

Nbre ICTT 1

CALLARD Anne-Ségolène	maître de conférences	INL	ECL
CLOAREC Jean-Pierre	maître de conférences	INL	ECL
GAFFIOT Frédéric	professeur	INL	ECL
GAGNAIRE Alain	maître de conférences	INL	ECL
GARRIGUES Michel	directeur de recherche	INL	CNRS/ECL
GENDRY Michel	directeur de recherche	INL	CNRS/ECL
GRENET Geneviève	directeur de recherche	INL	CNRS/ECL
HOLLINGER Guy	directeur de recherche	INL	CNRS/ECL
JOSEPH Jacques	professeur	INL	ECL
KRAWCZYK Stanislas	directeur de recherche	INL	CNRS/ECL
MARTIN Jean-René	professeur émérite	INL	ECL

O'CONNOR Ian	maître de conférences	INL	ECL
PHANER-GOUTORBE Magali	professeur	INL	ECL
ROBACH Yves	professeur	INL	ECL
SEASSAL Christian	chargé de recherche	INL	CNRS/ECL
SOUTEYRAND Eliane	directeur de recherche	INL	CNRS/ECL
TARDY Jacques	directeur de recherche	INL	CNRS/ECL
VIKTOROVITCH Pierre	directeur de recherche	INL	CNRS/ECL

Nbre INL 18

CHEN Liming	professeur	LIRIS	ECL
-------------	------------	-------	-----

Nbre LIRIS 1

BAILLY Christophe	professeur	LMFA	ECL
BERTOGLIO Jean-Pierre	directeur de recherche	LMFA	CNRS/ECL
BLANC-BENON Philippe	directeur de recherche	LMFA	CNRS/ECL
BOGEY Christophe	chargé de recherche	LMFA	CNRS/ECL
GAMBON Claude	directeur de recherche	LMFA	CNRS/ECL
CARRIERE Philippe	chargé de recherche	LMFA	CNRS/ECL
CHAMPOUSSIN J-Claude	professeur émérite	LMFA	ECL
COMTE-BELLOT genevièvre	professeur émérite	LMFA	ECL
FERRAND Pascal	directeur de recherche	LMFA	CNRS/ECL
GALLAND Marie-Annick	maître de conférences	LMFA	ECL
GODEFERD Fabien	chargé de recherche	LMFA	CNRS/ECL
HENRY Daniel	directeur de recherche	LMFA	CNRS/ECL
JEANDEL Denis	professeur	LMFA	ECL
JUVE Daniel	professeur	LMFA	ECL
LE RIBAUT Catherine	chargée de recherche	LMFA	CNRS/ECL
LEBOEUF Francis	professeur	LMFA	ECL
PERKINS Richard	professeur	LMFA	ECL
ROGER Michel	professeur	LMFA	ECL
SCOTT Julian	professeur	LMFA	ECL
SHAO Liang	chargé de recherche	LMFA	CNRS/ECL
SIMOENS Serge	chargé de recherche	LMFA	CNRS/ECL
TREBINJAC Isabelle	maître de conférences	LMFA	ECL

Nbre LMFA 22

BENAYOUN Stéphane	professeur	LTDS	ECL
CAMBOU Bernard	professeur	LTDS	ECL
COQUILLET Bernard	maître de conférences	LTDS	ECL
DANESCU Alexandre	maître de conférences	LTDS	ECL
FOUVRY Siegfried	chargé de recherche	LTDS	CNRS/ECL
GEORGES Jean-Marie	professeur émérite	LTDS	ECL
GUERRET Chrystelle	chargé de recherche	LTDS	CNRS/ECL
HERTZ Dominique	past	LTDS	ECL
ICHCHOU Mohamed	maître de conférences	LTDS	ECL
JEZEQUEL Louis	professeur	LTDS	ECL
JUVE Denyse	ingénieur de recherche	LTDS	ECL
KAPSA Philippe	directeur de recherche	LTDS	CNRS/ECL
LE BOT Alain	chargé de recherche	LTDS	CNRS/ECL
LOUBET Jean-Luc	directeur de recherche	LTDS	CNRS/ECL
MARTIN Jean-Michel	professeur	LTDS	ECL
MATHIA Thomas	directeur de recherche	LTDS	CNRS/ECL
MAZUYER Denis	professeur	LTDS	ECL
PERRET-LIAUDET Joël	maître de conférences	LTDS	ECL
SALVIA Michelle	maître de conférences	LTDS	ECL
SIDOROFF François	professeur	LTDS	ECL
SINOU Jean-Jacques	maître de conférences	LTDS	ECL
STREMSDOERFER Guy	professeur	LTDS	ECL
THOUVEREZ Fabrice	professeur	LTDS	ECL

TREHEUX Daniel	professeur	LTDS	ECL
VANNES André-Bernard	professeur émérite	LTDS	ECL

Nbre LTDS 25

Total HdR ECL 89

Dieu, je te remercie...

*A mes parents,
et mes deux sœurs*

*A toute ma famille,
et mes meilleurs amis*

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier M^{me} Emmanuelle Laurenceau et M^l Jean-Pierre Floarec pour avoir dirigé ma thèse et pour leurs conseils, remarques, patience, support et tout le temps qu'ils m'ont consacré tout au long de ma thèse et de la rédaction de ce mémoire.

Je remercie M^l Guy Hollinger pour m'avoir accueillie dans le laboratoire de l'équipe Chimie et Nanobiotechnologies de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL) et je remercie également Mme Eliane Souteyrand, chef du département Biotechnologies et Santé à l'INL. Comme je tiens à remercier la région Rhône-Alpes pour le support financier de cette thèse...

Mes remerciements vont aussi à Mr Dominique Rigal et Mr Yves Mérieux pour m'avoir accueillie dans le laboratoire d'Immunologie de l'Établissement Français du Sang de Lyon (EFS).

J'exprime mes vifs remerciements à M^{me} Claire-Marie Pradier et à M^l Oleg Melnyk d'avoir accepté de juger mon travail. Leur présence en tant que rapporteurs dans mon jury de thèse était un grand honneur pour moi.

Je voudrais remercier M^{me} Rosaria Ferrigno d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, ainsi que M^l Dominique Rigal et M^l Jean Wallach (Laboratoire de Biochimie Analytique et de Synthèse Bio-organique, LBAOS de l'Université Claude Bernard, Lyon 1) pour le grand plaisir qu'ils m'ont fait d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse et pour leurs précieux conseils.

Je tiens à remercier M^{me} Marie-Christine Duclos du LBAOS pour sa gentillesse, pour les conversations qu'on a eues sur la synthèse peptidique et pour la synthèse des peptides sur résine.

Je présente toute ma reconnaissance et gratitude à Mr Yann Chevrolot pour la fabrication des supports des biopuces... et pour son sens de l'humour !!! d'ailleurs, tout le monde avait le sens de l'humour dans l'équipe... et c'est ce qui animait toujours les repas et les réunions...

Je remercie également Mesdames Nicole Fabien et Agnès Desbos du service d'Immunologie de l'Hôpital Lyon Sud pour leur aimable collaboration et pour m'avoir fourni les échantillons de sérums humains, ainsi que pour les tests Western Blot.

Je remercie aussi toutes les filles du laboratoire d'Immunologie de l'EFOS pour leur disponibilité et leur gentillesse... à chaque fois que j'occupais leurs paillasse...

J'aimerais remercier profondément les deux Tsas (Isabel Nabeth et Isabelle Vial) pour leur soutien et leur amabilité..

Je tiens à remercier Mesdames Thérèse Martin et Nicole Durand pour leur sympathie et leur bonne humeur...

Je remercie M^{me} Magalie Phaner-Goutorbe, M Guy Stremdoerfer, Haoufèl Haddour, Radoslaw Mazurczyk, tous les membres de l'équipe Chimie et Nanobiotechnologies de l'INL, tous les stagiaires et les thésards que j'ai rencontrés tout au long de ma thèse... ainsi que tout le personnel de l'INL.

Grand merci à tous mes amis et proches, et à toute ma famille...

Grand merci à mes chères sœurs...

Un très grand merci à mes très chers parents....

SOMMAIRE

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS -----	9
SOMMAIRE -----	15
LISTE DES ABREVIATIONS -----	23
INTRODUCTION GENERALE -----	27
CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE -----	35
I. Introduction -----	37
II. Acides aminés, protéines et peptides -----	37
II.1. Acides aminés-----	37
II.1.1. Propriétés physico-chimiques des acides aminés-----	40
II.1.1.1. Propriétés ioniques-----	40
II.1.1.2. Caractère hydrophile ou hydrophobe-----	42
II.1.1.3. Réactivité des groupements carboxylates-----	43
II.1.1.4. Réactivité des groupements amines-----	44
II.1.1.5. Réactivité des fonctions chimiques autres que les groupements amines et carboxyles-----	45
II.1.1.6. Formation d'une liaison amide entre deux acides aminés-----	46
II.2. Protéines-----	47
II.2.1. La biosynthèse des protéines-----	47
II.2.2. Modifications post-traductionnelles-----	49
II.2.3. Structure tridimensionnelle des protéines-----	50
II.2.3.1. Structure primaire-----	50
II.2.3.2. Structure secondaire-----	51
II.2.3.3. Structure tertiaire-----	52
II.2.3.4. Structure quaternaire-----	53
II.2.4. Propriétés physico-chimiques des protéines-----	54
II.2.4.1. Dénaturation-----	54
II.2.4.2. Caractère amphotère-----	54
II.2.4.3. Solubilité-----	55
II.2.4.4. Masse moléculaire-----	55
II.2.3. Les protéines histones-----	56
II.2.3. Les anticorps-----	60
II.2.3.1. Anticorps anti-histones au cours de maladies auto-immunes-----	62
II.3. Peptides-----	65

II.3.1. Synthèse peptidique en phase solide-----	66
II.3.1.1. Synthèse peptidique sur résine -----	66
II.3.1.2. Synthèse en SPOT sur membrane -----	69
III. Les tests immunologiques classiques-----	71
III.1. Technique ELISA -----	72
III.2. Technique Western blot ou immunotransfert-----	75
IV. Les biopuces à protéines et à peptides -----	77
IV.1. Introduction-----	77
IV.2. Les verrous technologiques -----	81
IV.3. Supports solides et chimie de surface -----	82
IV.4. Les puces à protéines-----	83
IV.4.1. Stratégies d'immobilisation des protéines sur supports -----	83
IV.4.2. Les domaines d'applications des puces à protéines -----	87
IV.5. Les puces à peptides-----	89
IV.5.1. Stratégies d'élaboration des puces à peptides-----	89
IV.5.1.1. Immobilisation de peptides présynthétisés-----	89
IV.5.1.2. Synthèse par photolithographie-----	91
IV.6. Techniques de détection -----	95
IV.6.1. Techniques de détection avec marquage -----	95
IV.6.2. Techniques de détection sans marquage -----	98
CHAPITRE II: MATERIELS ET METHODES-----	101
I. Introduction -----	103
II. Matériels -----	103
II.1. Réactifs biochimiques et produits chimiques-----	103
II.2. Solutions tampons et autres solutions -----	106
II.3. Solutions biologiques et biomolécules -----	107
II.4. Sérums humains -----	107
II.5. Supports solides -----	108
III. Protocole expérimental - 1^{ère} partie - Puces à peptides : Déprotection de sondes peptidiques sur supports aminés-----	109
III.1. Synthèse peptidique sur résine -----	109
III.2. Evaluation de la reconnaissance biologique des peptides synthétisés par l'anticorps polyclonal anti-histone H3 en test ELISA -----	111
III.2.1. Solutions utilisées -----	111

III.2.2. Test ELISA	111
III.3. Fonctionnalisation chimique des supports plans	112
III.4. Immobilisation de peptide protégé par voie <i>ex situ</i> sur surfaces aminées	113
III.4.1. Influence de la concentration du peptide immobilisé sur le rendement de greffage	113
III.4.3. Evaluation de la stabilité des surfaces de verre vis-à-vis du traitement acide	114
III.4.4. Test de l'activité biologique du peptide immobilisé, avant et après le traitement acide	114
III.5. Synthèse peptidique <i>in situ</i> sur supports plans aminés	115
III.5.1. Synthèse peptidique selon la stratégie Fmoc	115
III.5.2. Evaluation du rendement du couplage covalent du peptide synthétisé <i>in situ</i>	117
III.5.3. Evaluation de la stabilité de la surface vis-à-vis de la synthèse peptidique et du traitement acide	118
III.5.4. Caractérisation de l'activité biologique des sondes peptidiques synthétisées <i>in situ</i>	118
IV. Protocole expérimental - 2^{ème} partie - Puces à protéines : Détection d'anticorps anti-histones dans le sérum	120
IV.1. Immunoessais sur anticorps commercial	120
IV.1.1. Technique ELISA	120
IV.1.2. Immunoessais sur lames de verre fonctionnalisées	120
IV.1.2.1. Lames NHS esters	121
IV.1.2.2. Lames AMMVE	122
IV.2. Détection d'anticorps anti-histones dans le sérum humain	123
IV.2.1. Technique Western blot	123
IV.2.2. Technique ELISA	123
IV.2.3. Immunoessais sur lames AMMVE	124
V. Détection de la fluorescence et analyse des images	124
V.1. Analyse des images de fluorescence	125
VI. Calculs statistiques	126
VI.1. Coefficient de variation	126
VI.2. Valeurs seuil	126
VI.3. Rapport	127

VII. Définitions utilisées pour les performances de nos techniques d'analyse -----	128
CHAPITRE III: PUCES A PEPTIDES: DEPROTECTION DE SONDES PEPTIDIQUES SUR SUPPORTS AMINES -----	133
I. Introduction -----	135
II. Résultats et discussion -----	135
II.1. Choix du système biologique peptide / anticorps anti-peptide-----	135
II.2. Validation du système biologique par la technique ELISA-----	137
II.3. Validation de la déprotection des peptides protégés immobilisés par voie <i>ex situ</i> -----	139
II.3.1. Influence de la concentration du peptide immobilisé par voie <i>ex situ</i> sur le rendement de greffage-----	139
II.3.2. Validation de la stabilité des surfaces de verre fonctionnalisées vis-à-vis du traitement de déprotection -----	142
<i>II.3.2.1. Influence du temps de déprotection sur la stabilité des surfaces</i> -----	142
II.3.3. Conservation de l'activité biologique du peptide après la déprotection--	147
II.3.4. Conclusion -----	150
II.4. Synthèse peptidique <i>in situ</i> sur substrat de dioxyde de silicium aminé -----	151
II.4.1. Caractérisation des analyses de fluorescence -----	152
II.4.2. Validation du couplage covalent du peptide synthétisé-----	155
II.4.3. Déprotection du peptide synthétisé <i>in situ</i> -----	157
<i>II.4.3.1. Evaluation de la stabilité de la surface aminée après le traitement de déprotection et la synthèse peptidique</i> -----	157
<i>II.4.3.2. Caractérisation de l'activité biologique du peptide synthétisé</i> -----	158
III. Conclusion et perspectives -----	160
CHAPITRE IV: PUCES A PROTEINES: DETECTION D'ANTICORPS ANTI-HISTONES DANS LE SERUM -----	163
I. Introduction -----	165
II. Résultats et discussion -----	165
II.1. Immunoessais sur anticorps commercial-----	165
II.1.2. Technique ELISA-----	165
<i>II.1.2.1. Spécificité de l'anticorps primaire pour l'histone H3</i> -----	165
<i>II.1.2.1. Limite inférieure de détection</i> -----	166
II.1.3. Immunoessais sur lames de verre silanisées-----	170
<i>II.1.3.1. Lames NHS ester</i> -----	170

II.1.3.2. Lames AMMVE -----	178
II.1.4. Comparaison générale des performances des tests -----	186
II.2. Détection d'anticorps anti-histones dans le sérum humain-----	188
II.2.1. Technique Western blot -----	188
II.2.2. Technique ELISA-----	189
II.2.3. Immunoessais sur lames AMMVE-----	192
III. Conclusions et perspectives -----	198
CONCLUSION GENERALE-----	201
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -----	207
ANNEXES -----	221
ANNEXE 1 - Spectres HPLC des peptides synthétisés sur résine-----	223
1. Spectre du peptide protégé biotinylé-----	223
2. Spectre du peptide déprotégé biotinylé -----	224
ANNEXE 2 - Valeurs critiques de la distribution du <i>t</i> de Student -----	225
ANNEXE 3 - Montage utilisé pour la synthèse peptidique <i>in situ</i> sur support de dioxyde de silicium-----	226
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS-----	229

LISTE DES
ABBREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

ACR	American College of Rheumatology	NVOC	Nitroveratryloxycarbonyl
ADN	Acide désoxyribonucléique	OPD	<i>ortho</i> -phénylènediamine
AMMVE	Anhydride Maléique- <i>alt</i> -Méthyl Vinyl Ether	OPfp	O-Pentafluorophényl
ARNm	Acide ribonucléique messenger	OtBu	O- <i>tertio</i> -butyl
APTES	Aminopropyltriéthoxysilane	PBS	Phosphate Buffered Saline
<i>t</i>-Boc	<i>tertio</i> -Butyloxycarbonyle	PCR	Polymerase Chain Reaction
BSA	Bovin Serum Albumin	PDMS	Poly(diméthylsiloxane)
CD	Cluster of Differentiation	PEG	Polyéthylène glycol
Cy3	Cyanine 3	PGA-P	Photo-generated acid precursor
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide	pl	Point Isoélectrique
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyléthylamine	Pmc	Pentaméthylchromane
DMF	<i>N, N</i> -Diméthylformamide	PNA	Peptide Nucleic Acid
DMSO	Diméthylsulfoxyde	SAM	Self-Assembled Monolayer
DVB	Divinylbenzène	SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
2D-PAGE	Two dimensional – polyacrylamide gel electrophoresis	SPPS	Solid Phase Peptide Synthesis
EDC	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)-carbodiimide	SPR	Surface Plasmon Resonance
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay	TFA	Trifluoroacetic acid
Fmoc	Fluorénylméthoxycarbonyle	THF	Tétrahydrofurane
GPTS	3-Glycidoxypropyltriméthoxysilane	TIS	Triisopropylsilane
GST	Glutathione-S-transférase	Trt	Trityl
HAT	Histone acétyltransférase		
HOBt	<i>N</i> -Hydroxybenzotriazole		
HPLC	High Performance Liquid Chromatography		
LES	Lupus Erythémateux Systémique		
MHC	Major Histocompatibility Complex		
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimide		
MPTS	Mercaptopropyltriméthoxysilane		
MS	Mass Spectrometry		
NMI	<i>N</i> -méthylimidazole		
NMP	<i>N</i> -méthyl-2-pyrrolidone		

INTRODUCTION
GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les puces à ADN sont devenues un outil indispensable dans le domaine de la recherche en biologie et devraient rapidement être utilisées comme outils de diagnostic médical [1]. Leur conception est relativement bien maîtrisée et les recherches actuelles portent essentiellement sur l'amélioration de leurs performances (sensibilité, fiabilité ...), et leur adaptation à des problèmes spécifiques. Aujourd'hui, quelques années après celui des puces à ADN, a commencé à émerger le concept de puces pour la protéomique, que nous appellerons "puces protéomiques".

Ce domaine est dynamisé par la perspective de l'analyse à « haut débit » du protéome, c'est à dire l'ensemble des protéines synthétisées à partir du génome. Le défi de la protéomique consiste à trouver des moyens d'analyser les protéines actives à l'échelle du protéome et de connaître avec quels composants de la cellule elles interagissent (ADN, ARN, autre protéines, molécules). Ces puces devraient donc servir à identifier, en parallèle, des milliers de protéines.

Une puce protéomique est essentiellement constituée d'un réseau de plots répartis sur un substrat, généralement en verre, sur lequel sont greffées, soit des protéines complètes (ex : anticorps), soit des protéines modifiées ou partielles (ex : protéines recombinantes, épitope d'anticorps), soit des oligopeptides ou même des ADN. Ces molécules "sondes" (ou récepteur) servent alors à capturer des protéines "cibles" (ou ligand) par interaction affine. On parlera ainsi de puces à protéines, à anticorps, ou à peptides. Les applications, issues de l'étude de n'importe quel système ligand/récepteur, permettent l'identification, la purification, la caractérisation structurale et la détermination des propriétés fonctionnelles des protéines, l'analyse des interactions intermoléculaires et la recherche de marqueurs de processus pathologiques.

Si les puces protéomiques semblent des outils potentiellement très intéressants pour l'analyse des protéines [2], leur mise en œuvre sera longue et difficile. Les recherches sur les puces à ADN ont permis d'aborder et de dépasser certains verrous technologiques (chimie de surface, machines de dépôt de sonde, synthèse

in situ de sondes, systèmes d'hybridation) concernant les acides nucléiques. Cette expérience a d'ores et déjà permis d'orienter les recherches pour les puces à protéines. Toutefois, la difficulté de mise en œuvre de puces à protéines est sans commune mesure avec les puces à ADN [3]. Ce fait tient à la différence de nature et de comportement de ces deux classes de biomolécules. Alors que l'ADN peut être considéré, du moins pour un fragment comportant un nombre relativement restreint de nucléotides, comme un polymère linéaire, robuste et au comportement relativement prévisible, il n'en est pas de même des peptides et des protéines. Le grand nombre des acides aminés constitutifs (combinatoire sur 20 acides aminés, alors que l'ADN ne possède qu'une combinatoire sur 4 nucléotides) et leurs différences structurales conduit à une importante variété de structures, certaines posant d'importants problèmes de synthèse, en particulier à cause de leur insolubilité. De plus, la nécessité de protéger les chaînes latérales lors de la synthèse peptidique et l'utilisation de solvants organiques rendent difficile la prédiction des problèmes susceptibles d'être rencontrés. L'altération ou la modification de tout ou partie d'une structure peptidique aura pourtant des conséquences importantes sur les propriétés de la molécule synthétisée ou immobilisée, en particulier au niveau de leur structure tridimensionnelle et des interactions avec leur environnement.

L'équipe Nanochimie & Biotechnologies de l'INL possède depuis plusieurs années un savoir-faire en matière de silanisation de verre et de silice, d'immobilisation de biomolécules (oligonucléotides, ADN, PNA, peptides) et de synthèse directe d'oligonucléotides sur puce.

L'ensemble des supports utilisés au cours de cette thèse a été silanisé par un silane comportant un acide carboxylique terminal, selon un protocole couramment utilisé dans notre plate-forme. Ce type de surface a ensuite été modifié selon les besoins au cours de la thèse. Trois types de modifications ont été mises en œuvre : activation des groupements acides en fonctions esters, amination de surface par couplage d'une diamine, et greffage de polymère d'anhydride maléique (de type P(AMMVE)). Nos travaux ont également bénéficié d'un protocole déjà mis au point pour immobiliser des oligopeptides protégés [4]. Ce protocole a été validé avec des peptides simples (G_8 , H_6), non reliés à une problématique biologique définie. La méthode consiste à activer l'extrémité C-terminale d'un oligopeptide, pour la coupler

sur des supports aminés. Les chaînes latérales du peptide étant protégées, seule l'extrémité C-terminale peut réagir avec la surface. Ceci permet de contrôler le site de couplage des peptides sur la surface. Enfin, une étude préalable, basée sur les réactions classiquement utilisées en synthèse peptidique, avait permis d'établir les premières étapes de couplage d'acides aminées par la chimie des Fmoc pour la mise en œuvre de synthèses peptidiques complètes sur nos puces (travaux de Pascale Hazot, non publiés).

L'objectif général de la présente thèse était d'explorer des méthodes de fabrication de puces protéomiques, en s'appuyant sur les savoir-faire préalables de l'équipe. Notre objectif n'était pas de fabriquer des puces de moyenne ou haute densité, mais d'identifier des voies générales de fabrication à l'échelle macroscopique : chimie de surface, validation de méthodes de couplage ou de synthèse de biomolécules, mise en œuvre d'interactions protéine/ligand à l'interface liquide/solide. Les critères de qualité des voies de fabrication explorées étaient les performances analytiques des prototypes: seuil inférieur de détection, sensibilité, spécificité, répétabilité, ainsi que les quantités de réactifs mises en œuvre pour la fabrication et l'analyse. Il était donc important de comparer nos prototypes à des méthodes classiques telles que l'ELISA et le Western blot. Afin de pouvoir tester nos prototypes dans des conditions proches de conditions réelles, il était nécessaire d'employer un modèle biologique permettant l'analyse de sérums.

Le premier chapitre de ce mémoire est une étude bibliographique. Il présente d'abord des notions fondamentales sur les acides aminés, les protéines et les peptides. Il aborde ensuite une présentation des protéines histones, le modèle biologique utilisé au cours de la thèse, et les questions d'auto-immunité. Enfin, il traite de l'état de l'art en matière de puces à peptides et de puces à protéines.

Le second chapitre regroupe les réactifs, matériels et méthodes utilisés au cours de la thèse. En matière d'élaboration, il présente les différentes voies de fonctionnalisation chimique et biologique de supports abordées au cours de l'étude : immobilisation de peptides sur lames de verre aminées, synthèse peptidique directe sur lame de verre aminé, immobilisation de protéines sur lames de verre comportant des esters activés, et immobilisation de protéines sur lames de verre modifiées par

AMMVE. Il indique également les méthodes de caractérisations utilisées au cours de la thèse : les méthodes classiques ELISA et Western blot, et différentes caractérisations des puces faisant intervenir des mesures de fluorescence.

Le troisième chapitre rassemble les résultats obtenus sur les puces à peptides. Dans un premier temps, le modèle biologique choisi (peptide H3 / anticorps anti-histone H3) est validé par ELISA, puis le comportement des lames aminées pour l'immobilisation du peptide H3 protégé est étudié. Dans un deuxième temps, la stabilité des supports fonctionnalisés vis-à-vis du traitement de déprotection du peptide H3 immobilisé est évaluée. Enfin, la synthèse directe sur puce du peptide H3 est présentée et caractérisée avant et après déprotection, par rapport au peptide immobilisé.

Le quatrième chapitre concerne le développement de puces à protéines. Les protéines utilisées sont les histones H1 et H3. L'interaction entre H1 ou H3 et un anticorps commercial anti-H3 est d'abord étudiée par ELISA, puis après immobilisation des protéines histones sur lames de verre fonctionnalisées. Les lames testées sont des lames comportant des groupements esters activés, et des lames fonctionnalisées avec un polymère (AMMVE). Nous montrons ainsi dans quelles conditions les supports modifiés par AMMVE fournissent les meilleures performances analytiques pour la détection d'anticorps anti-H3 commercial. Dans un dernier temps, des sérums humains sont testés sur les lames AMMVE optimisées. Les performances analytiques de ces lames sont comparées à des analyses par ELISA et Western blot des mêmes sérums.

CHAPITRE I
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Introduction

Le développement de tests immunologiques, qu'ils soient classiques tels que l'ELISA ou le Western blot, ou bien miniaturisés tels que ceux utilisant les biopuces, nécessite la compréhension des phénomènes d'immobilisation des protéines, ou des peptides, sur support solide et des interactions antigène-anticorps. Ainsi, après un rappel sur les structures et les propriétés physico-chimiques des acides aminés et des protéines (notamment les protéines histones et les anticorps), la synthèse chimique de peptide en phase solide sera présentée. Puis, cette étude bibliographique décrira le principe des tests ELISA et Western blot, utilisés pour la détection d'anticorps anti-histones au cours d'une maladie rhumatologique, le lupus érythémateux systémique (LES). Enfin, les méthodes d'élaboration de puces à peptides et à protéines seront présentées, ainsi que leurs domaines d'application. Une attention particulière a été portée aux différentes stratégies d'immobilisation des protéines et des peptides, étape clé dans la fonctionnalisation biologique des puces. Quelques techniques de détection classiques des interactions entre sondes et cibles, dont certaines utilisées au cours de cette thèse, seront également brièvement décrites.

II. Acides aminés, protéines et peptides

II.1. Acides aminés

Les acides aminés sont les éléments constitutifs des protéines et des peptides. Ce sont des molécules organiques qui possèdent une fonction amine primaire et une fonction carboxyle (acide carboxylique). Leur structure générale est représentée sur la figure I.1.

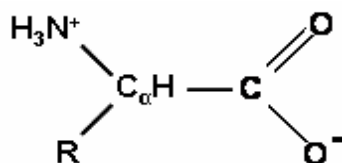


Fig.I.1. Structure générale des acides aminés (sauf la proline).

Vingt acides aminés constituent les unités de structure de base de toutes les protéines des organismes vivants, et jouent des rôles métaboliques importants pour le fonctionnement des cellules. Ils sont répertoriés dans le tableau I.1. Des dérivés de ces aminoacides se trouvent aussi à l'état libre et ont souvent des rôles métaboliques importants

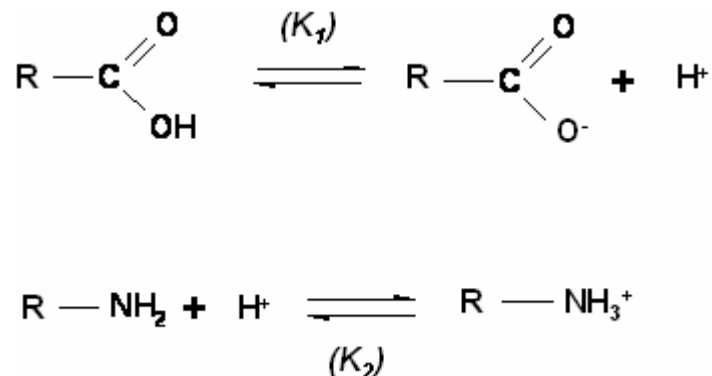
Caractère de la chaîne latérale	Aminoacide <small>(Abréviations à 3 lettres, et à 1 lettre)</small>	Structure	Masse Molaire <small>(g.mol⁻¹)</small>	Point Isoélectrique <small>(pI)</small>	pK ₁	pK ₂	pK ₃	
Hydrophobe	Glycine (Gly, G)		75,07	6,06	2,35	9,78		
	Alanine (Ala, A)		89,09	6,01	2,35	9,87		
	Valine (Val, V)		117,15	6,00	2,39	9,74		
	Leucine (Leu, L)		131,17	6,061	2,33	9,74		
	Isoleucine (Ile, I)		131,17	6,05	2,32	9,76		
	Méthionine (Met, M)		149,21	5,74	2,13	9,28		
	Phénylalanine (Phe, F)		165,19	5,49	2,20	9,31		
	Tryptophane (Trp, W)		204,23	5,89	2,46	9,41		
	Proline (Pro, P)		115,13	6,30	1,95	10,64		
Hydrophile	Neutre	Sérine (Ser, S)		105,09	5,68	2,19	9,21	
		Thréonine (Thr, T)		119,12	5,60	2,09	9,10	
		Asparagine (Asn, N)		132,12	5,41	2,14	8,72	
		Glutamine (Gln, Q)		146,15	5,65	2,17	9,13	
		Cystéine (Cys, C)		121,16	5,05	1,92	10,70	8,18
		Tyrosine (Tyr, Y)		181,19	5,64	2,20	9,21	10,46
	Basique	Lysine (Lys, K)		146,19	9,60	2,16	9,06	10,54
		Arginine (Arg, R)		174,20	10,76	1,82	8,99	12,48
		Histidine (His, H)		155,16	7,60	1,80	9,33	6,04
	Acide	Aspartate (Asp, D)		133,10	2,85	1,99	9,90	3,90
		Glutamate (Glu, E)		147,13	3,15	2,10	9,47	4,07

Tableau I.1. Classification des vingt acides aminés.

II.1.1. Propriétés physico-chimiques des acides aminés

II.1.1.1. Propriétés ioniques

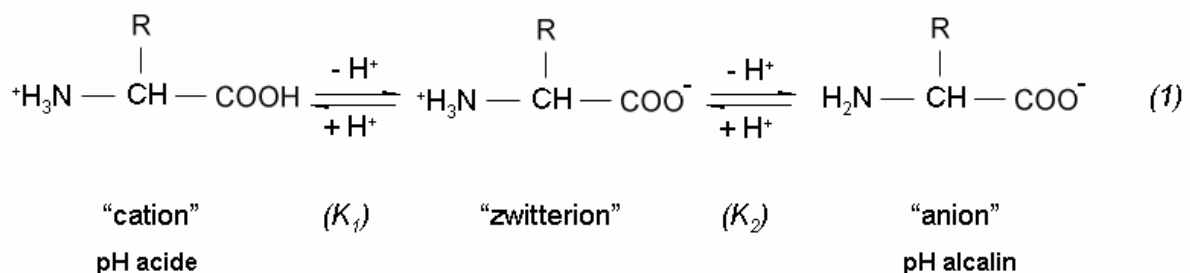
Tous les acides aminés ont deux groupements ionisables, un groupement carboxyle et un groupement amine primaire, liés au C α ; ce sont des composés amphotères. Selon le pH de la solution, le groupement carboxyle peut céder un proton et le groupement amine peut en fixer un :



K_1 et K_2 sont les constantes de dissociation correspondants aux deux équilibres :

$$K_1 = \frac{[\text{R-COO}^-][\text{H}^+]}{[\text{R-COOH}]} \quad K_2 = \frac{[\text{R-NH}_2][\text{H}^+]}{[\text{R-NH}_3^+]}$$

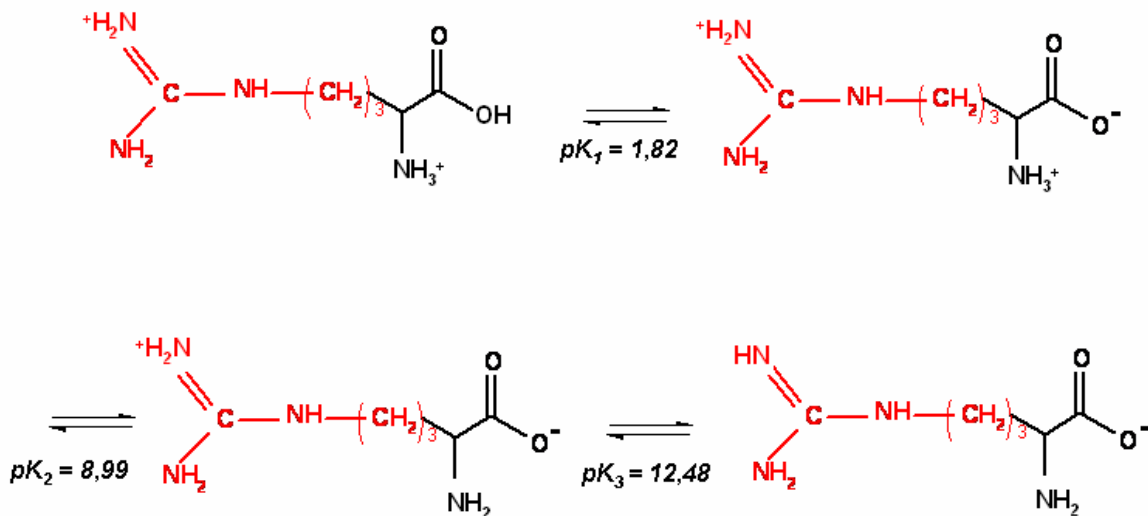
Ainsi, pour une solution d'un acide aminé, en passant d'un pH acide à un pH alcalin, on obtient les transformations suivantes :



A pH acide, l'acide aminé est sous forme de cation (charge nette = +1), et à pH basique, il est sous forme d'anion (charge nette = -1). En passant par une certaine valeur de pH, les molécules d'acide aminé sont sous une forme dite zwitterion, et la charge totale de la molécule est nulle. Cette valeur de pH correspond au point

isoélectrique (pI ou pH_i) de l'acide aminé. La solubilité d'un acide aminé est minimale à son pH_i et elle dépend des propriétés de sa chaîne latérale.

Les valeurs de pK_1 , pK_2 et pK_3 données dans le tableau I.1, correspondent, aux pH de demi-dissociation des protons des groupements carboxyle et amine liés au $C\alpha$ et des fonctions ionisables des chaînes latérales. Par exemple, pour l'arginine, les valeurs de pK (1,82; 8,99 et 12,48) correspondent respectivement aux pH de demi-dissociation des protons des groupements carboxyle et amine liés au $C\alpha$, et du groupement amine de la chaîne latérale (groupement guanidique) :



La fonction amine de la chaîne latérale de la lysine ou de l'histidine est également protonée à des valeurs de pH inférieures à leur pK (pK (ϵ -amine) de la lysine $\sim 10,54$; et le pK du noyau imidazole de l'histidine = 6,04). Si une protéine est riche en Lys, Arg et His, à pH physiologique, ces résidus confèrent une charge nette positive à la protéine.

Les fonctions carboxyles de la chaîne latérale des acides aspartique et glutamique peuvent aussi s'ioniser. A des pH supérieurs à leur pK , ils sont chargés négativement.

De même, les groupements thiol ($-SH$) de la cystéine et phénol de la tyrosine peuvent s'ioniser en perdant un proton en milieu alcalin.

Selon le pH d'une solution protéique, les groupements ionisables des chaînes latérales déterminent donc la charge nette de la protéine. La macromolécule pourra être chargée positivement, négativement ou avoir une charge nette nulle (à son pH_i).

II.1.1.2. Caractère hydrophile ou hydrophobe

Les acides aminés peuvent être classés selon les caractéristiques de leur chaîne latérale (hydrophobe ou hydrophile), comme le montre le tableau I.1 On distingue, les acides aminés à chaînes latérale hydrophobe non polaire aliphatique (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Met) ou aromatique (Phe, Trp et Pro).

La glycine est l'acide aminé dont la structure est la moins complexe, sa chaîne latérale ne consistant qu'en un atome d'hydrogène. La méthionine est l'acide aminé à chaîne latérale aliphatique le plus réactif, grâce à son groupement thioéther avec le doublet électronique de l'atome de soufre. Il peut aussi accepter des liaisons hydrogènes. La proline est le seul acide aminé qui possède une fonction amine secondaire liée au C α . Parmi les acides aminés à chaîne latérale hydrophobe aromatique, le tryptophane est capable d'absorber la lumière ultraviolette (UV) à 280 nm, grâce à son noyau indole. La présence de cet aminoacide dans les protéines peut permettre leur dosage spectrophotométrique à cette longueur d'onde.

On distingue aussi, les acides aminés à chaîne latérale hydrophile polaire neutre (Ser, Thr, Asn, Gln, Cys et Tyr), basique (Lys, Arg, et His) ou acide (Asp, Glu).

Les résidus d'acides aminés hydrophiles se trouvent généralement à la surface des protéines, ils réagissent en solution avec le milieu environnant aqueux. La cystéine a un caractère polaire grâce à son groupement thiol (-SH), donneur de liaisons hydrogène. Le noyau phénol de la tyrosine peut absorber la lumière UV à 280nm et peut, comme le tryptophane, permettre le dosage des protéines.

Les acides aminés à chaîne latérale hydrophobe non polaire peuvent interagir par des liaisons de type van der Waals ou par interaction hydrophobe, par exclusion des molécules d'eau de leur milieu environnant. Par contre, les acides aminés à chaîne latérale hydrophile polaire peuvent s'associer par des liaisons ioniques ou hydrogène. Le caractère hydrophobe et la polarité des chaînes latérales des acides aminés influent sur la solubilité des protéines et sur leurs interactions avec d'autres protéines ou biomolécules.

Par ailleurs, les groupements carboxyle et amine et les autres fonctions réactives des chaînes latérales (ex : thiols, hydroxyles...) des acides aminés

confèrent aux protéines la possibilité de réagir avec différents groupements chimiques fonctionnels.

II.1.1.3. Réactivité des groupements carboxylates

Le groupement carboxylate libre lié au C α d'un acide aminé, ou celui de la chaîne latérale du glutamate ou de l'aspartate, peut être activé en ester ou en carbonyle, capables de réagir avec des groupements chimiques fonctionnels. Les esters activés peuvent réagir avec des fonctions amines primaires et former des liaisons amides, ou avec des hydrazines pour former des dérivés hydrazides. Les intermédiaires carbonyles réactifs peuvent réagir avec des fonctions alcools ou thiols et former, respectivement, des liaisons ester ou thioester, (fig.1.2).

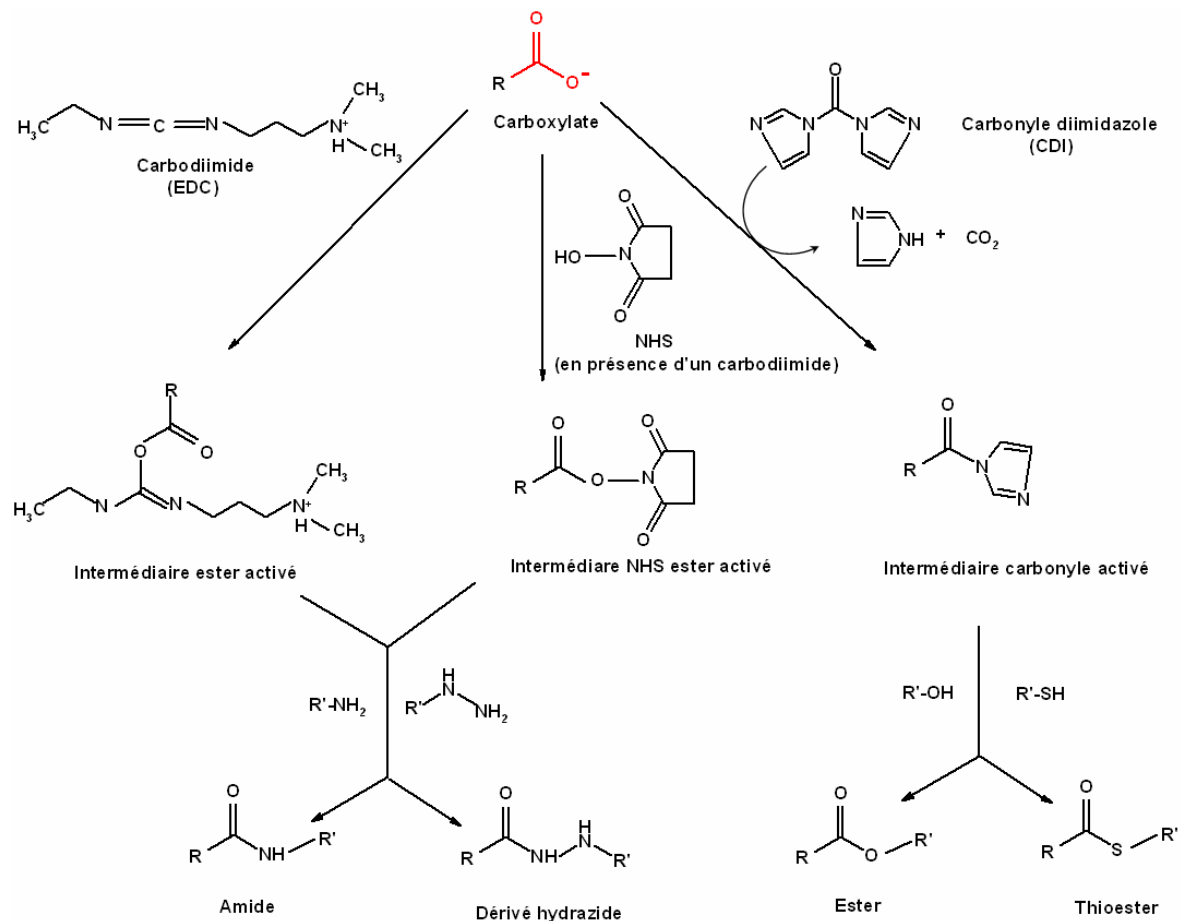


Fig.1.2. Activation du groupement carboxylate et formation d'intermédiaires capables de réagir avec différents groupements fonctionnels [5].

II.1.1.4. Réactivité des groupements amines

Les groupements α -amine primaire déprotoné et les groupements amine des chaînes latérales de la lysine et de l'arginine, peuvent subir des acétylations et des alkylations (*fig.1.3*). La réaction d'acétylation s'effectue par attaque nucléophile du groupement amine sur un groupement acyle actif. L'alkylation s'effectue par transfert d'un groupement alkyle sur l'amine nucléophile avec perte d'un atome d'hydrogène, (*fig.1.4*).

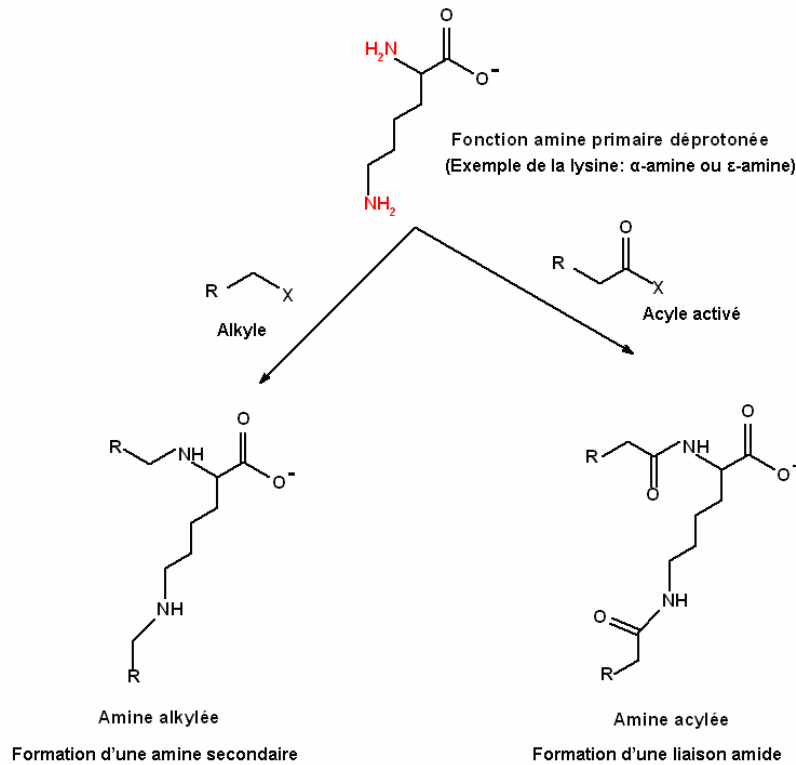


Fig.1.3. Réactions d'alkylation et d'acylation des fonctions amines [5].

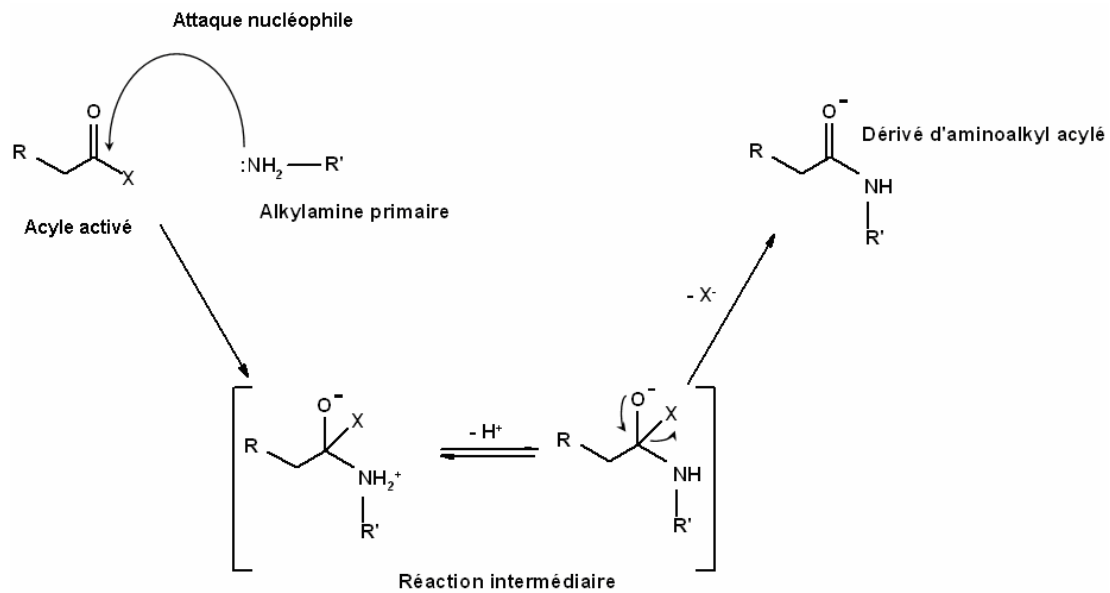


Fig.1.4. Mécanisme de la réaction d'acylation par attaque nucléophile de l'amine primaire[5].

II.1.1.5. Réactivité des fonctions chimiques autres que les groupements amines et carboxyles

Les groupements thiols de la cystéine : la cystéine est le seul acide aminé qui contient un groupement thiol ou sulfhydryle. A pH physiologique (pH = 7,4), ce résidu est protoné (pK ~ 8). La réaction la plus importante des groupements thiols est la formation des ponts disulfure stables entre deux résidus cystéines d'une protéine ou d'un peptide (*fig.1.5*) :

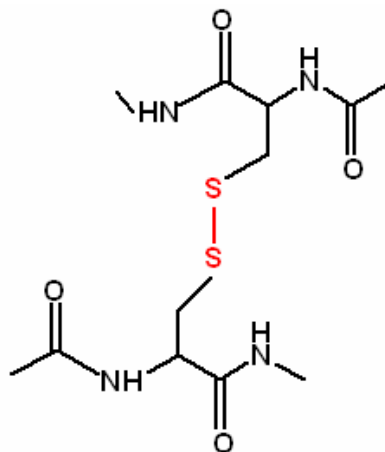


Fig.1.5. Deux résidus cystéines liés par un pont disulfure.

L'atome d'hydrogène du groupement thiol est mobile, il est peut être substitué par des radicaux acyles ou alkyles formant, respectivement, des dérivés thioesters ou thioéthers, (fig.1.6).

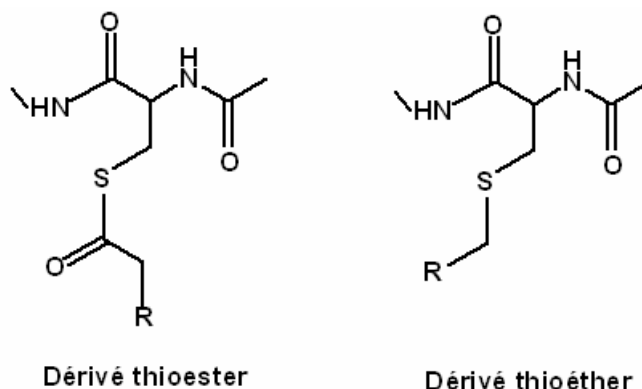


Fig.1.6. Dérivés formés par acylation ou alkylation des fonctions thiols des résidus cystéines.

Les fonctions hydroxyles alcooliques des résidus sérine, thréonine ou tyrosine, peuvent être estérifiées par phosphorylation. La phosphorylation des protéines enzymatiques permet la modification de leur structure et la régulation de leur fonction. Le groupement phénol de la tyrosine est ionisable, l'ion phénolate pouvant également subir des réactions d'acylation ou d'alkylation (fig.1.7).

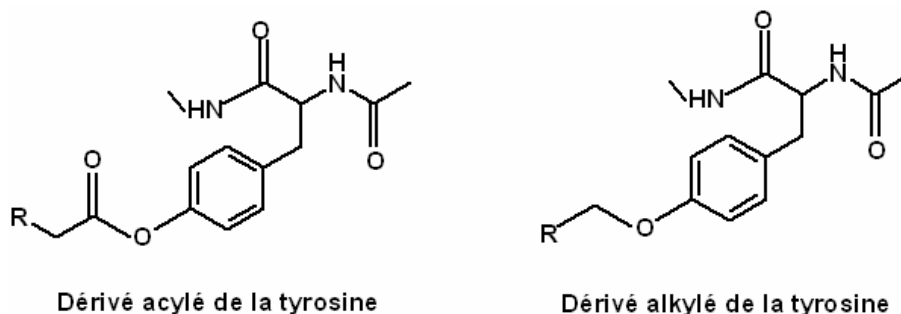


Fig.1.7. Dérivés formés par acylation ou alkylation du groupement phénol des résidus tyrosines.

II.1.1.6. Formation d'une liaison amide entre deux acides aminés

Deux acides aminés peuvent se lier entre eux par une liaison amide qui s'établit entre le groupement α -carboxyle de l'un et le groupement α -amine de l'autre, avec élimination d'une molécule d'eau. Cette liaison covalente dite liaison peptidique, lie entre eux les aminoacides consécutifs qui constituent les séquences des peptides et des protéines. Les quatre atomes de carbone de la liaison peptidique sont coplanaires. Le plan de la structure de cette liaison est donc rigide, ce qui empêche la rotation des atomes qui l'entourent, alors que l'orientation des autres

liaisons qui entourent les atomes de carbone $C\alpha$, reste libre. La figure 1.8 montre deux aminoacides liés entre eux par une liaison peptidique, formant un dipeptide :

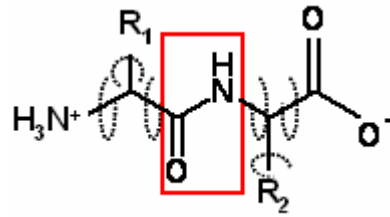


Fig.1.8. Liaison peptidique entre deux acides aminés.

Les fonctions amine primaire et acide carboxylique du $C\alpha$ des résidus d'acides aminés étant engagées dans des liaisons peptidiques, les chaînes latérales confèrent alors leurs propriétés de réactivité chimique aux protéines.

II.2. Protéines

Les protéines sont des macromolécules constituées de séquences d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. L'ordre dans lequel sont enchaînés les acides aminés d'une protéine est déterminé par la séquence des gènes de l'ARNm (acide ribonucléique messager).

II.2.1. La biosynthèse des protéines

La synthèse des protéines consiste en deux étapes importantes : la transcription des gènes de l'ADN (acide désoxyribonucléique) en ARN messager (ARNm) et la traduction de l'ARNm en séquences d'acides aminés. Chez les eucaryotes, la transcription se déroule dans le noyau de la cellule, et la traduction se déroule dans le cytoplasme, au niveau des ribosomes (*fig.1.9*). Chez les procaryotes, ces deux étapes s'effectuent dans le cytoplasme, ces organismes unicellulaires ne possédant pas de noyau séparé du cytoplasme par une enveloppe nucléaire.

Chez les eucaryotes, les gènes sont constitués d'exons (séquences codantes) et d'introns (séquences non codantes). La transcription du gène de l'ADN double brin aboutit à la production d'un transcrit primaire ou précurseur de l'ARNm (pré-ARNm), molécule d'ARN simple brin. Le pré-ARNm subit des excisions (élimination des introns) et des épissages (réunion des exons), ainsi que d'autres modifications post-transcriptionnelles, pour donner l'ARNm mature. Cette étape de maturation est très délicate, une erreur au niveau de l'épissage pouvant conduire, lors de la traduction, à une protéine tronquée, différente, active ou inactive.

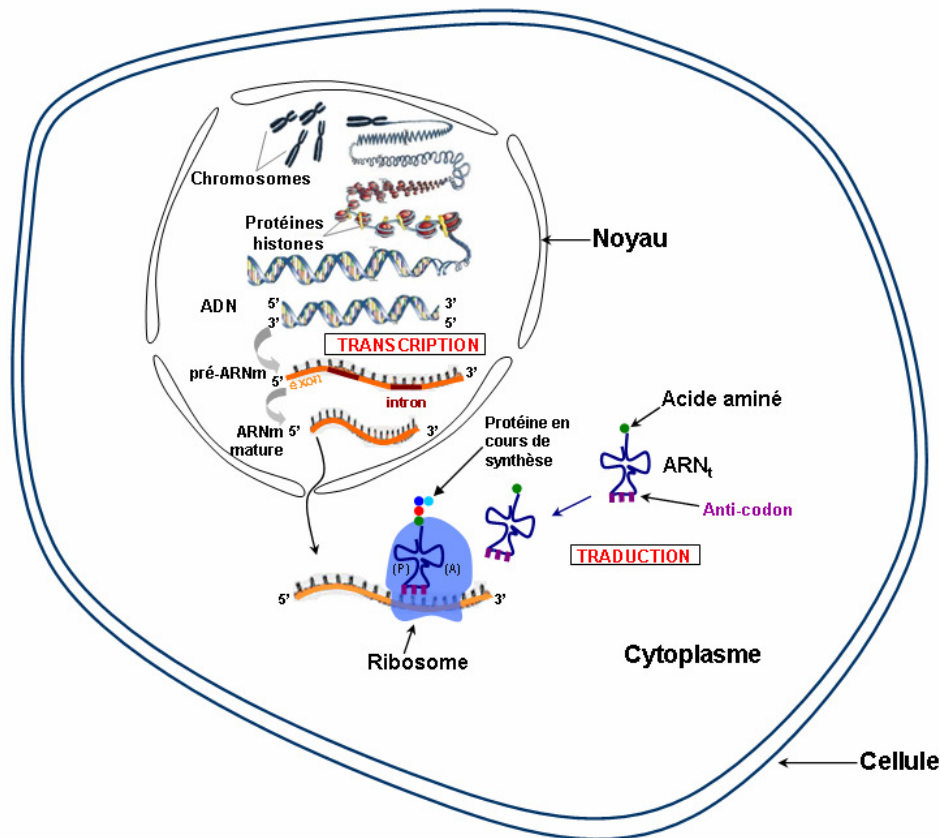


Fig.1.9. Représentation schématique générale de la biosynthèse des protéines dans une cellule eucaryote.

L'ARNm mature passe du noyau vers le cytoplasme où s'effectue la traduction au niveau des ribosomes. Le ribosome est constitué d'une petite et d'une grande sous-unités qui sont dissociées et libres dans le cytoplasme, avant la traduction. Il reçoit les éléments nécessaires pour la synthèse des protéines : l'ARNm et les ARNt (ARN de transfert) qui transportent les acides aminés (aminoacyl-ARNt). L'ARNt est lié d'un côté à un acide aminé et de l'autre côté, il possède une séquence de trois bases dite anti-codon complémentaire d'un codon (3 bases) présent sur l'ARNm. A la phase initiale de la traduction, la petite sous-unité du ribosome forme un complexe, d'une part avec l'ARNm au niveau de trois bases dites codon initiateur, et d'autre part avec l'ARNt portant l'acide aminé initial, qui est une méthionine protégée au niveau de sa fonction α -amine par l'acide formique. Toutes les chaînes protéiques ont donc une formylméthionine comme acide aminé initial, qui sera clivée, le plus souvent, après la synthèse de la protéine. La grande sous-unité du ribosome s'ajoute ensuite au complexe. Le ribosome est alors fonctionnel. Il a deux sites pour lier les ARNt, un site A pour recevoir l'aminoacyl-ARNt, et un site P porteur de la chaîne peptidique en

cours d'élongation. L'ARNt qui porte la méthionine est logé directement dans le site peptidique P, un nouveau ARNt portant un deuxième acide aminé, vient se fixer sur le site A. La liaison entre la méthionine et le premier ARNt est rompue et une liaison peptidique se forme entre le (-COOH) de la méthionine et le (-NH₂) du deuxième acide aminé. La synthèse des protéines s'effectue du côté NH₂-terminal vers le côté COOH-terminal. Le dipeptide alors formé est logé dans le site A du ribosome et le premier ARNt est libéré du site P. Le ribosome va avancer ensuite de 3 nucléotides sur l'ARNm, le site A est alors libre pour recevoir un nouvel aminoacyl-ARNt. Une nouvelle liaison peptidique se forme entre le deuxième et le troisième acide aminé, et le ribosome avance de nouveau d'un codon sur l'ARNm. De nombreux cycles se succèdent, à chaque cycle, la chaîne s'allonge d'un acide aminé. La traduction se termine lorsque le ribosome arrive sur l'un des codons dits codons stops de l'ARNm qui ne codent aucun acide aminé. Aucun ARNt ne vient donc se loger dans le site A du ribosome. Il y aura une coupure entre le dernier ARNt et la chaîne peptidique de la protéine. Cette chaîne sera alors libérée. Le ribosome se dissocie en deux sous-unités qui pourront commencer une nouvelle lecture d'ARNm.

II.2.2. Modifications post-traductionnelles

Après leur synthèse, les protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles [6, 7]. Certaines modifications sont réversibles, comme l'acétylation de la fonction amine de la chaîne latérale des lysines. C'est le cas des protéines nucléaires qui entrent dans la constitution de la chromatine, comme les protéines histones [8]. Cette modification joue un rôle dans la régulation de la transcription et des interactions protéines-ADN [9, 10]. Certaines protéines enzymatiques, les protéines kinases, subissent des modifications réversibles comme la phosphorylation de la thréonine, de la tyrosine ou de la sérine, au niveau de la fonction alcool primaire de leur chaîne latérale. La phosphorylation des protéines est impliquée dans la régulation de presque tous les processus cellulaires, notamment le contrôle des activités enzymatiques, la régulation du métabolisme, la transduction du signal [11], la croissance cellulaire [12], le contrôle de la transcription des gènes et de la synthèse des protéines...[13].

D'autres types de modifications sont irréversibles, comme le raccourcissement de la chaîne peptidique d'une protéine par clivage d'un ou de plusieurs acides aminés (ex :

clivage de la formylméthionine initiale) ou le clivage du précurseur d'une protéine. La plupart des protéines sont synthétisées sous forme de précurseurs dont les chaînes plus longues subissent des clivages protéolytiques pour aboutir à la protéine mature biologiquement active [14]. D'autres modifications irréversibles peuvent aussi se produire, comme la formation de ponts disulfures entre deux fonctions thiols (-SH) de deux cystéines, ou l'hydroxylation de la proline ou de la lysine.

La glycosylation des protéines est aussi l'une des modifications post-traductionnelles les plus importantes pour la stabilisation de la structure des protéines, la transduction du signal, ou les phénomènes de reconnaissance biologique. Des résidus de sucres sont liés de façon covalente à la protéine après sa synthèse. Ces glycoprotéines sont formées par couplage covalent de polysaccharides par une liaison O-glycosidique au niveau d'un résidu d'hydroxylysine, de sérine, ou de thréonine, ou par une liaison N-glycosidique, entre la fonction hydroxyle d'un sucre et la fonction amine de la chaîne latérale de l'asparagine par exemple [15-18].

Les modifications post-traductionnelles des protéines déterminent leur structure ou conformation spatiale, et régulent leurs activités et leurs fonctions biologiques. Etant donné les différents types de modifications que peuvent subir les protéines après leur synthèse, l'étude de l'expression des gènes ne suffit pas pour comprendre et étudier la fonction des protéines et leurs activités. En effet, une faible corrélation a été démontrée entre le niveau d'expression de l'ARNm d'un gène et celui de la protéine codée [19, 20].

L'analyse d'un processus biologique doit donc aussi s'effectuer au niveau de l'étude des fonctions et activités des protéines.

II.2.3. Structure tridimensionnelle des protéines

II.2.3.1. Structure primaire

La structure primaire d'une protéine correspond à la séquence en acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. L'acide aminé situé à l'extrémité NH₂-terminale (N-ter) possède une fonction α-amine libre, et celui qui est situé du côté COOH-terminale (C-ter) possède une fonction α-carboxyle libre (*fig.1.10*).

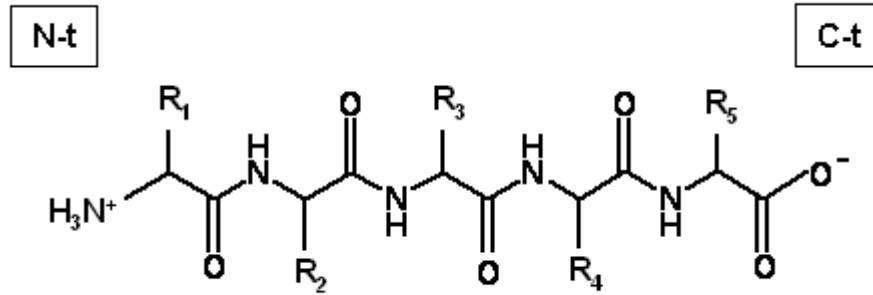


Fig.I.10. Séquence d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques.

En plus des liaisons peptidiques covalentes, d'autres types d'interactions (liaisons hydrogènes, ioniques, hydrophobes, ponts disulfures) peuvent s'établir entre les différents aminoacides, ce qui confère à chaque protéine sa propre conformation ou structure tridimensionnelle (secondaire, tertiaire ou quaternaire). La protéine est alors dite native.

II.2.3.2. Structure secondaire

On distingue deux types principaux de structure secondaire : l'hélice α et le feuillet β . La figure I.11 montre une structure en hélice α , stabilisée par des liaisons hydrogène intra-chaînes (représentées en pointillés). Les chaînes latérales liées au $C\alpha$ dirigées vers l'extérieur, peuvent interagir entre elles ou avec le milieu environnant.

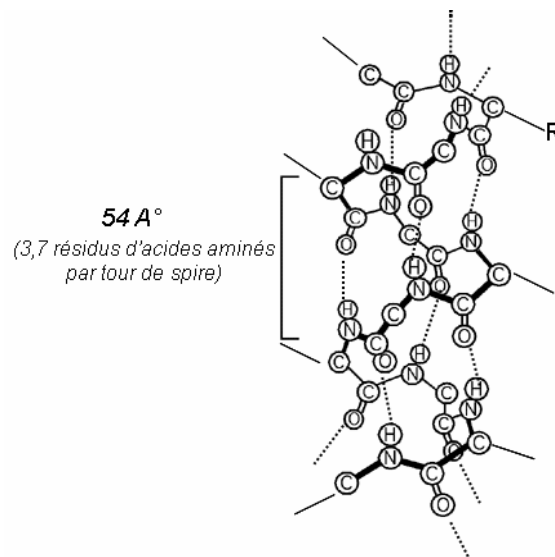


Fig.I.11. Structure en hélice α .

Pour une conformation en feuillet β , des chaînes polypeptidiques parallèles ou antiparallèles interagissent par des liaisons hydrogène entre les fonctions carbonyles des liaisons peptidiques d'une chaîne et les fonctions amines des liaisons peptidiques de l'autre chaîne (*fig.I.12*).

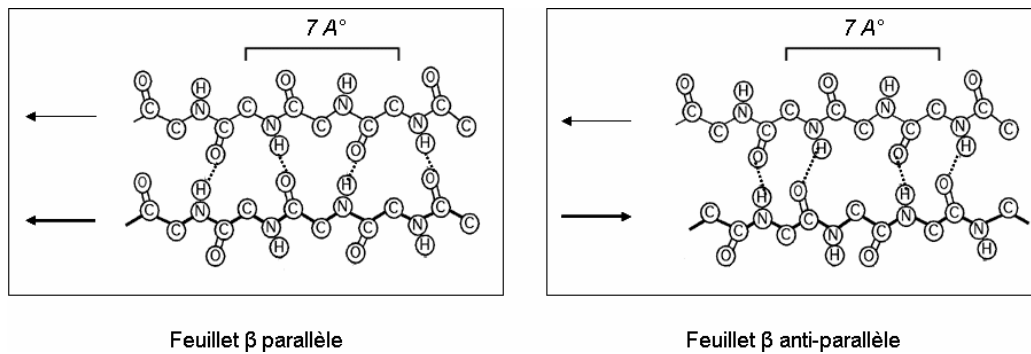


Fig.I.12. Structures en feuillets β .

II.2.3.3. Structure tertiaire

La structure tertiaire d'une protéine résulte de plusieurs types de liaisons (hydrogènes, hydrophobes, électrostatiques, ponts disulfures) entre des résidus acides aminés de la chaîne peptidique de cette protéine. Les liaisons hydrophobes s'établissent entre les chaînes latérales hydrophobes apolaires des acides aminés. Les liaisons électrostatiques se font entre les charges électriques des radicaux des aminoacides. Les liaisons covalentes disulfures s'établissent entre deux résidus de cystéine (*fig.I.13*).

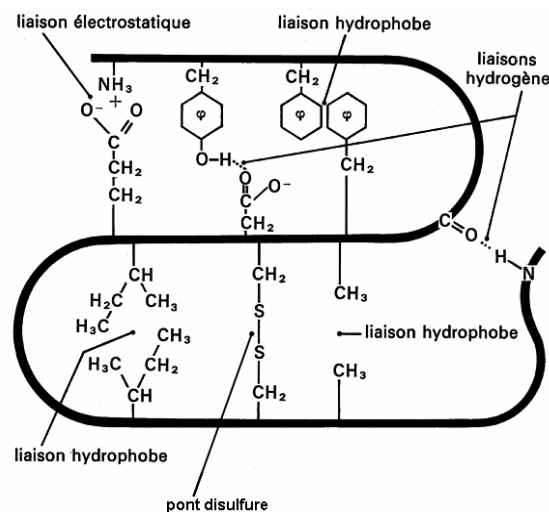


Fig.I.13. Liaisons chimiques intervenant dans la structure tertiaire des protéines.

Les repliements dans la structure tertiaire de la protéine sont indispensables à son activité biologique, ils forment par exemple le site actif des enzymes.

La figure I.14 montre la structure tertiaire de la myoglobine, protéine comportant 8 hélices α et ayant un rôle dans le transport de l'oxygène dans les tissus musculaires grâce au groupement hème.

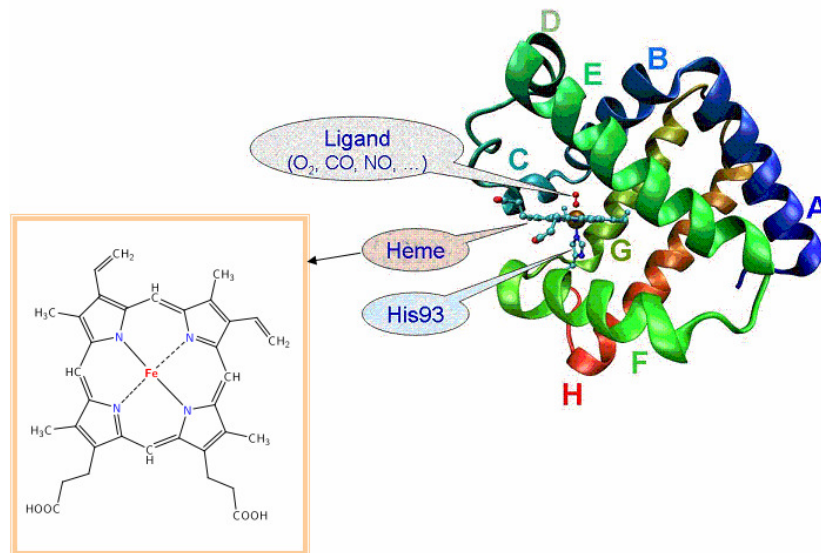


Fig.I.14. Structure tertiaire de la myoglobine.

II.2.3.4. Structure quaternaire

La structure quaternaire d'une protéine est l'association par des liaisons hydrogènes, électrostatiques, hydrophobes, de plusieurs chaînes polypeptidiques identiques ou différentes. Lorsque des chaînes polypeptidiques (ou sous-unités) identiques s'associent entre elles, chacune constitue un protomère, l'association de plusieurs protomères forme des oligomères (dimère : deux chaînes, tétramère : quatre chaînes...). Cette structure quaternaire est aussi indispensable à l'activité catalytique de plusieurs enzymes. Ces enzymes consistent en oligomères où les sites actifs sont situés au niveau de chacun des protomères de la protéine.

La figure I.15 représente la structure quaternaire de l'hémoglobine, protéine tétramérique chargée de transporter l'oxygène dans les globules rouges. Chacune de ses quatre sous-unités est semblable à la structure tertiaire de la myoglobine.

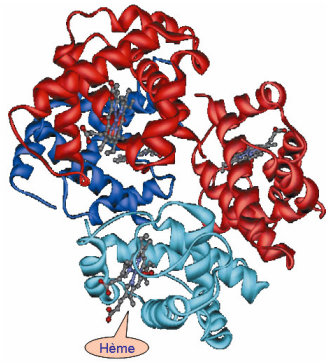


Fig.I.15. Structure quaternaire de l'hémoglobine.

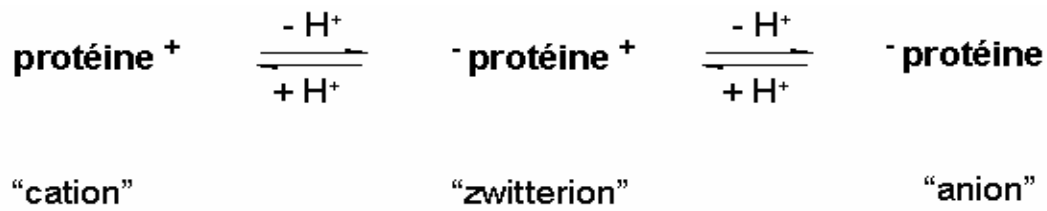
II.2.4. Propriétés physico-chimiques des protéines

II.2.4.1. Dénaturation

Les liaisons qui maintiennent la conformation tridimensionnelle des protéines peuvent être rompues. Les protéines sont alors dénaturées et perdent leurs activités et leurs propriétés biologiques. Plusieurs agents peuvent provoquer la dénaturation des protéines, comme la chaleur : l'agitation thermique destabilise les liaisons faibles telles que les liaisons hydrogène entre les chaînes latérales des résidus d'acides aminés ; les variations du pH peuvent aussi entraîner une dénaturation : si le pH est très bas ou très élevé, il peut y avoir modification de l'ionisation des chaînes latérales et déstabiliser les liaisons ioniques et les liaisons hydrogènes. Les solutions d'urée, de chlorure de guanidium, le SDS (sodium dodecyl sulfate) sont des agents chimiques classiquement utilisés pour dénaturer des protéines.

II.2.4.2. Caractère amphotère

Comme abordé dans le paragraphe II.1.1.1, selon le pH de la solution, les groupements fonctionnels des chaînes latérales des acides aminés peuvent être ionisés en fonction de leur pK. Ces groupements confèrent aux protéines un caractère amphotère. A pH acide, la protéine est chargée positivement (cation), à pH alcalin, elle est chargée négativement (anion). Comme dans le cas des acides aminés, il existe une valeur de pH où la charge nette de la protéine est nulle, c'est son point isoélectrique, la protéine est sous forme de zwitterion, elle ne migre plus lorsqu'on la place dans un champ électrique :



II.2.4.3. Solubilité

La solubilité des protéines dépend de plusieurs facteurs, tels que le pH, la force ionique de la solution, la température, la nature du solvant... En solution aqueuse, les acides aminés hydrophobes des protéines ont tendance à interagir entre eux, alors que les acides aminés hydrophiles sont exposés à la surface de la protéine et interagissent avec les molécules d'eau. A forte force ionique ou à des concentrations salines élevées, la solubilité des protéines diminue : les molécules d'eau interagissent avec les ions en solutions et le nombre de molécules disponibles pour interagir avec les charges de la protéine diminue ; on assiste alors à la précipitation des protéines.

La solubilité des protéines est minimale au voisinage du point isoélectrique, la charge nette de la protéine est nulle ; les macromolécules en solution ont tendance à réagir entre elles, plutôt qu'avec les molécules d'eau. Les protéines forment alors des agrégats et précipitent.

Les solvants organiques miscibles à l'eau, tels que l'acétone ou l'éthanol sont de bons agents pour précipiter les protéines, à des températures proches ou inférieures à 0°. A des températures plus élevées, ces solvants peuvent provoquer la dénaturation des protéines. D'autres solvants organiques miscibles à l'eau (constante diélectrique $\epsilon_{\text{eau}} = 80$) comme le diméthyl sulfoxide (DMSO) ou le *N,N*-diméthyl formamide (DMF), ont des constantes diélectriques élevées, de 48 et 39, respectivement, et sont de bons solvants pour les protéines.

II.2.4.4. Masse moléculaire

La masse moléculaire est une caractéristique fondamentale de chaque protéine, elle est généralement supérieure à 10 000 Da (10 kDa) ou 10 000 g/mol. Elle peut être déterminée par différentes méthodes, comme la filtration sur gel de dextran, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, ou la spectrométrie de masse.

Parmi les différents types de protéines, nous présentons maintenant un type particulier de protéines mis en jeu au cours de la thèse, les protéines histones.

II.2.3. Les protéines histones

Les histones, découvertes en 1884 par Albrecht Kossel, sont des protéines étroitement associées à l'ADN des cellules eucaryotes et constituent le composant protéique principal de la chromatine. Elles représentent la moitié de la masse des chromosomes (*fig.I.16*).

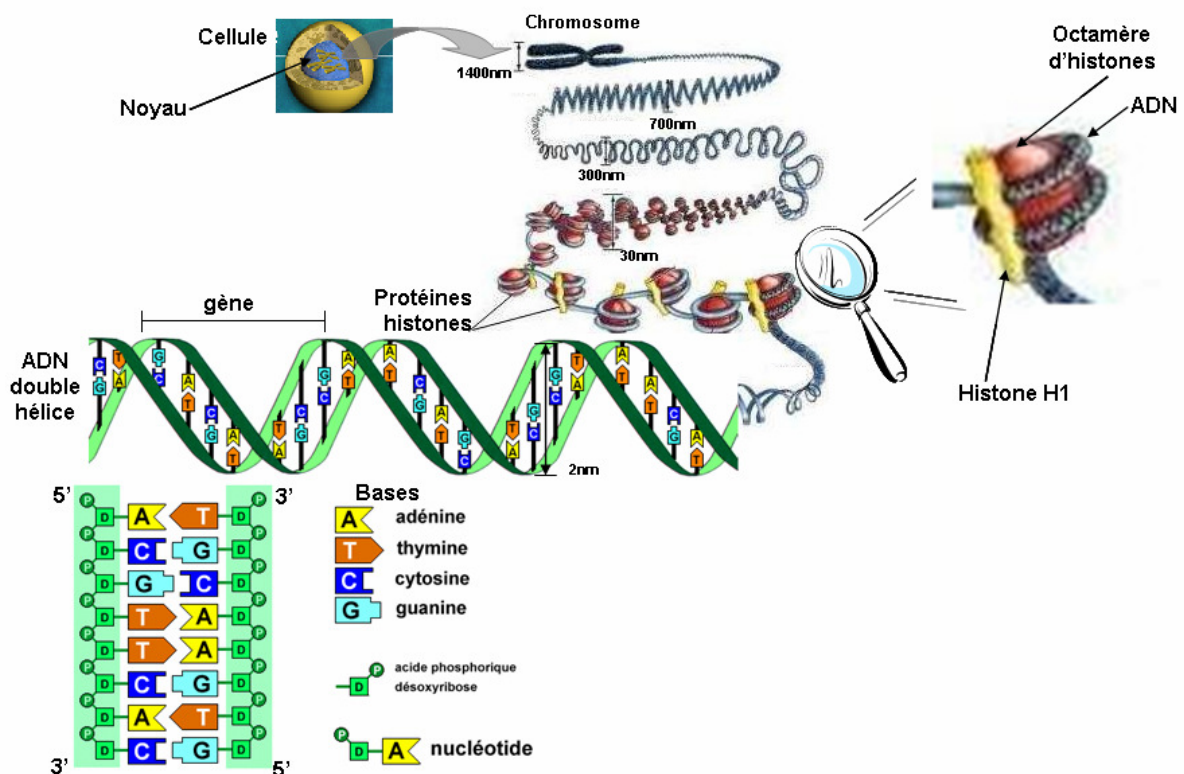


Fig.I.16. De la cellule à l'ADN.

Ces protéines sont réparties en cinq classes principales : les histones H1, H2A, H2B, H3 et H4. Ce sont des protéines basiques, riches en acides aminés chargés positivement, notamment l'arginine et la lysine (*fig.I.17*), ce qui leur permet de former des liaisons ioniques avec les groupements phosphates de l'ADN chargés négativement. Les protéines histones sont hautement conservées entre les espèces. La composition et la séquence en acides aminés des histones des tissus humains sont ainsi très similaires à celles des tissus de veau. Plusieurs études expérimentales effectuées sur les histones ont été réalisées sur les protéines du thymus de veau (*Tableau I.2*) [21-25].

Histone H1

1 TENSTSTPAA KPKRAKASKK STDHPKYSDM IVAAIQAEKN RAGSSRQSIQ KYIKSHYKVG
 61 ENADSIKLS IKRLVTTGVL KQTKGVGASG SFRLAKSDEP KRSVAFKKT KEVKKVATPK
 121 KAAKPKKAAAS KAPSKKPKAT PVKKAKKKPA ATPKKTKKPK TVKAKPVKAS KPKKTKPVKP
 181 KAKSSAKRTG KKK

Histone H2A

1 SGRGKQGGKA RAKAKTRSSR AGLQFPVGRV HRLLRKGNYA ERVGAGAPVY LAAVLEYLTA
 61 EILELAGNAA RDNKKTRIIP RHLQLAIRND EELNKLLGKV TIAQGGVLPN IQAVLLPKKT
 121 ESHHKAKGK

Histone H2B

1 PEPAKSAPAP KKGSKKAVTK AQKKGKKRK RSRKESYSVY VYKVLKQVHP DTGISSKAMG
 61 IMNSFVNDIF ERIAGEASRL AHYNKRSTIT SREIQTAVRL LLPGELAKHA VSEGTKAVTK
 121 YTSSK

Histone H3

1 ARTKQTARKS TGGKAPRKQL ATKAARKSAP ATGGVKKPHR YRPGTVALRE IRRYQKSTEL
 61 LIRKLPFQRL VREIAQDFKT DLRFQSSAVM ALQEACEAYL VGLFEDTNLC AIHAKRVTIM
 121 PKDIQLARRI RGERA

Histone H4

1 SGRGKGGKGL GKGGAKRHRK VLRDNIQGIT KPAIRRLARR GGVKRISGLI YEETRGLVKV
 61 FLENVIRDAV TYTEHAKRKT VTAMDVVYAL KRQGRTLYGF GG

Fig.I.17. Séquences en acides aminés des histones du thymus de veau, les résidus d'acides aminés soulignés sont conservés entre l'homme et le veau [26].

Histone	Nombre de résidus	Masse (kDa)	% Arg	% Lys
H1	193	21	1	29
H2A	129	14	9	11
H2B	125	14	6	16
H3	135	15	13	10
H4	102	11	14	11

Tableau I.2. Protéines histones du thymus de veau [21, 26].

L'analyse par microscopie électronique montre que la chromatine est formée d'un ensemble de particules de diamètre d'environ 10 nm. Elles sont reliées entre elles par des brins d'ADN, selon un modèle dit « en collier de perles » [27]. La digestion

partielle de la chromatine par la nucléase micrococcale (enzyme qui clive l'ADN double brin) produit des particules appelées *nucléosomes*, correspondant chacune à un octamère d'histones $(H2A)_2(H2B)_2(H3)_2(H4)_2$ associé avec environ 200 pb d'ADN. Une digestion enzymatique prolongée dégrade l'ADN, et produit un fragment d'ADN plus court, de 145 pb, associé à l'octamère d'histones. Le complexe formé par ce fragment d'ADN et l'octamère d'histones constitue la particule centrale du nucléosome [24]. L'ADN qui est dégradé après cette digestion enzymatique est appelé ADN de liaison. L'histone H1 est liée en partie à ce fragment d'ADN. Elle se lie à l'ADN nucléosomique dans une cavité formée par le segment central de son ADN et les segments qui entrent et sortent de la particule centrale (*fig.I.16*). L'histone H1 permet de sceller le nucléosome.

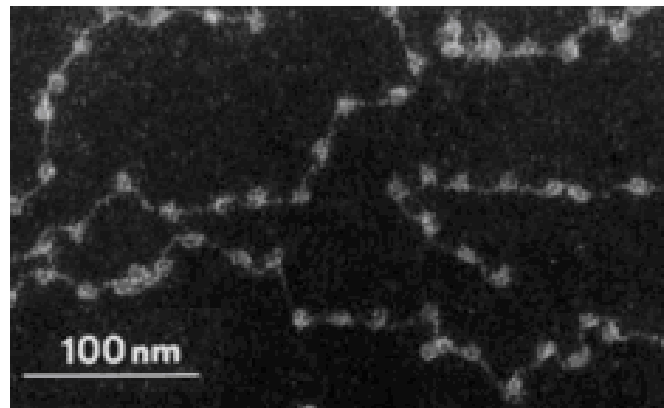


Fig.I.18. Micrographie électronique de la chromatine montrant sa structure en collier de perles [27].

La structure tridimensionnelle du nucléosome a été déterminée par des analyses de cristallographie aux rayons X (*fig.I.18*) [28]. Cette structure montre le nucléosome en forme de disque de diamètre $\sim 110 \text{ \AA}$ et d'épaisseur $\sim 60 \text{ \AA}$. L'ADN double brin est enroulé autour de l'octamère d'histones à raison de 1,65 tour en super hélice gauche.

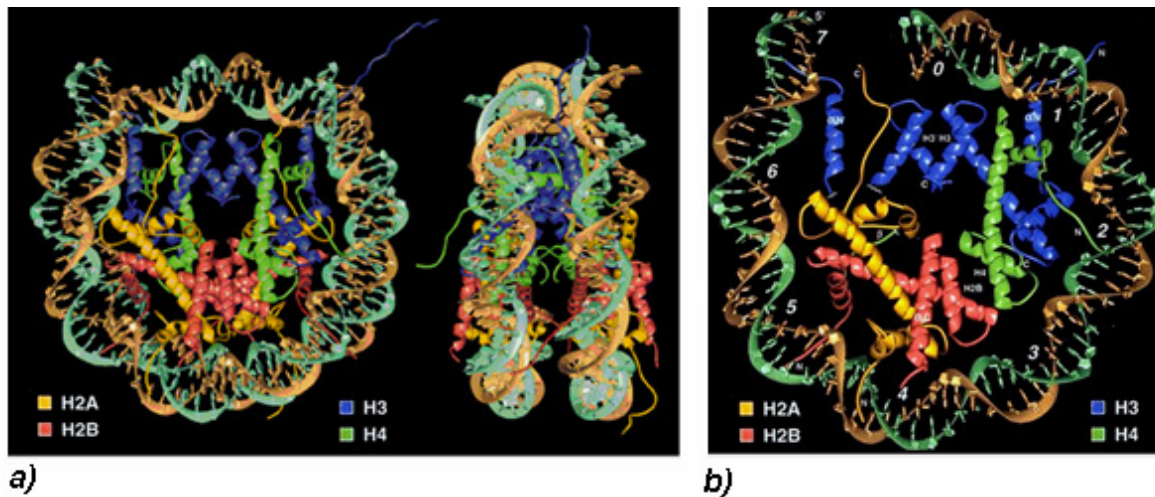


Fig.1.19. Structure par rayons X du cœur de la particule du nucléosome. a) Le cœur du nucléosome vu selon un axe superhélicoïdal (à gauche) et après une rotation de 90° autour d'un axe vertical (à droite). Le fragment d'ADN double brin de 146 pb est enroulé autour de l'octamère d'histones. b) Moitié supérieure du cœur de la particule du nucléosome. Les nombres de 0 à 7 disposés le long de la face interne de la superhélice d'ADN de 73 pb indiquent les positions successives correspondant à un tour de double hélice [21].

L'octamère d'histones est organisé dans le cœur du nucléosome sous forme d'un tétramère $(H3)_2(H4)_2$ avec lequel interagit chaque paire des dimères $(H2A-H2B)$.

Les histones du nucléosome ne réagissent qu'avec la face interne de l'ADN, principalement avec le squelette phosphodiester, par des liaisons hydrogènes, ioniques et des liaisons dues aux dipôles des hélices (extrémités N-t riches en résidus lysines et arginines chargés positivement). Des interactions hydrophobes ont aussi lieu avec le désoxyribose de la chaîne sucre-phosphate de l'ADN.

Les protéines histones du nucléosome ont des queues N-t étendues à l'extérieur du cœur de la particule. Ces fragments polypeptidiques sont riches en résidus lysines et arginines et sortent du nucléosome entre les tours de la superhélice de l'ADN. Ils interviennent au niveau des interactions inter-nucléosomiques. Au niveau des queues N-t, les histones peuvent subir des modifications post-traductionnelles (ex : acétylation ou méthylation des lysines, méthylation des arginines, phosphorylation des sérines). Ces modifications covalentes jouent un rôle essentiel dans la modulation de l'affinité des protéines histones pour l'ADN et l'activation de la transcription. Elles permettent de faciliter le dépliement de la chromatine pour rendre l'ADN accessible et lui permettre ainsi de participer aux processus de réplication, de transcription, de recombinaison et de réparation.

Par exemple, l'acétylation des chaînes latérales des résidus lysines, chargés positivement, s'effectue selon une séquence de réactions catalysées par des

enzymes spécifiques appelées histone acétyltransférases (HAT), en présence de l'acétyl-CoA. L'addition de l'acétyle génère un groupement amide non chargé, ce qui réduit l'affinité de la queue N-t à l'ADN et par suite l'affinité du complexe d'histones à l'ADN, ceci provoque le dépliement de la chromatine. Ce phénomène de modification facilite l'accessibilité de l'ADN aux éléments intervenant dans la transcription des gènes. En plus, les résidus de lysines acétylés interagissent avec des protéines permettant le remodelage de la structure de la chromatine.

Selon les besoins de la cellule, les résidus lysines acétylés peuvent être déacétylés. La réaction de déacétylation est catalysée par des enzymes spécifiques appelées histones déacétylases, ces enzymes contribuent à la répression de la transcription des gènes [21, 27].

Les protéines histones jouent donc un rôle essentiel dans le contrôle de la transcription des gènes.

Au cours de certaines maladies auto-immunes, le système immunitaire déclenche une réponse dirigée contre les composants de la chromatine (ADN natif, histones, nucléosomes). Cette réponse immunitaire est caractérisée par la production d'une variété d'auto-anticorps, dont les anti-ADN natifs, les anti-nucléosomes et les anti-histones.

II.2.3. Les anticorps

Les anticorps sont des immunoglobulines sécrétées par les plasmocytes (lymphocytes B différenciés), dans le sang ou présents sous forme de récepteurs membranaires à la surface des lymphocytes B (BCR : B cell receptor). Les anticorps sériques sont les effecteurs de l'immunité humorale. Ils sont produits par l'organisme pour lutter contre les antigènes qui sont des substances étrangères, des constituants modifiés de l'organisme ou des agents pathogènes, comme les bactéries, les virus, les champignons... Les auto-antigènes sont des substances capables d'induire la production d'auto-anticorps ou de lymphocytes T auto-réactifs au sein même de l'organisme dont elles sont issues.

Les anticorps interagissent de façon spécifique par leur site appelé paratope avec la structure complémentaire des antigènes dite épitope ou déterminant antigénique.

La plupart des antigènes sont complexes et contiennent de nombreux déterminants antigéniques différents. Le système immunitaire répond généralement par la

production d'anticorps spécifiques de certains des épitopes. Cette réponse nécessite la participation de plusieurs clones de cellules B. Ces derniers produisent des anticorps monoclonaux qui se lient chacun spécifiquement à un seul épitope. L'ensemble de ces anticorps monoclonaux constitue la réponse anticorps polyclonale hétérogène du sérum à un antigène immunisant.

Les anticorps sont classés en cinq catégories d'immunoglobulines : les IgG, les IgM, les IgA, les IgD et les IgE. L'IgG est l'anticorps le plus abondant dans le sérum (~75% des immunoglobulines sériques totales). L'IgA est sécrétée en majorité dans les muqueuses (bronches et intestins), la salive, les larmes. Elle constitue la première défense de l'organisme contre les antigènes bactériens et viraux. L'IgM est la première classe d'immunoglobuline qui se retrouve dans le sérum après l'exposition à un antigène. Le rôle de l'IgD est encore mal connu. L'IgE assure la protection de l'organisme contre les parasites et participe aussi aux réactions allergiques.

Ces immunoglobulines ont une même structure de base en forme de Y, d'une masse moléculaire de 150 KDa, constituée de deux chaînes légères (L : Light, κ ou λ) identiques, de 25 KDa chacune et deux chaînes lourdes (H : Heavy) identiques, de 50 KDa chacune (*fig.1.20*). Les chaînes lourdes des IgG sont désignées par les chaînes γ et celles des autres immunoglobulines A, M, D et E sont désignées respectivement par α , μ , δ et ϵ . Il existe aussi des sous-classes d'immunoglobulines, qui sont déterminées par les différentes combinaisons entre la chaîne légère (soit κ ou λ) et la chaîne lourde (α , μ , δ ou ϵ) de chacune des classes.

Chaque chaîne légère est liée à une chaîne lourde par une liaison covalente disulfure et par des interactions électrostatiques, hydrogènes et hydrophobes. Ces deux chaînes polypeptidiques s'associent deux à deux par liaison disulfure pour former la structure de base à quatre chaînes polypeptidiques.

Pour chacune des classes d'immunoglobuline, les chaînes légères et les chaînes lourdes ont un domaine, sur leur extrémité N-t, variable d'un anticorps à l'autre. Ces domaines sont désignés par V_L et V_H . Les autres domaines (C_L , C_{H1} , C_{H2} , et C_{H3}) de l'immunoglobuline sont des domaines constants.

Le traitement d'une molécule d'IgG avec une protéase, la papaïne, provoque son clivage en trois fragments : deux fragments Fab (fragment antigen binding) qui contiennent chacun un site unique de liaison à l'antigène (le paratope), et un

fragment Fc (fragment cristallisable). Les domaines variables des anticorps sont situés au niveau des fragments Fab [27].

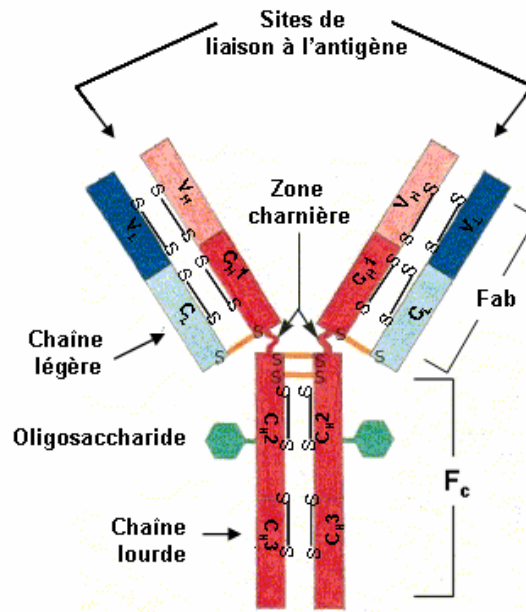


Fig.1.20. Représentation schématique de la structure de base des immunoglobulines.

La figure 1.20 présente les différents groupements chimiques fonctionnels des anticorps: les fonctions amines et carboxyliques terminales, les fonctions amines des chaînes latérales de leurs résidus lysines et arginines, les fonctions carboxyles des résidus aspartates et glutamate, et les résidus oligosaccharidiques du fragment Fc. Les fragments Fab des anticorps, issus du clivage par la papaïne, possèdent des groupements thiols libres. L'ensemble de ces fonctions réactives permet d'immobiliser les anticorps sur des supports solides [29].

II.2.3.1. Anticorps anti-histones au cours de maladies auto-immunes

La reconnaissance des constituants du soi ou l'auto-réactivité n'est pas un phénomène en lui-même pathogène. En effet, des auto-anticorps anti-ADN natif, anti-histones et anti-nucléosomes peuvent être produits dans des cellules normales. Ainsi, des auto-anticorps anti-nucléaires peuvent être détectés chez presque un tiers de sujets sains, ces anticorps étant contre des antigènes nucléaires comme les ribonucléoprotéines [30, 31], ou les protéines histones; 6% de sujets sains possèdent des auto-anticorps anti-histones [32]. Par ailleurs, l'altération de la sélection clonale,

de la régulation ou de l'apoptose des lymphocytes T et/ou B peut induire des maladies auto-immunes.

Les maladies auto-immunes touchent plus de 5 % de la population dans le monde et leur pathologie est encore mal comprise. Elles peuvent être associées à des facteurs génétiques, hormonaux, environnementaux, ou des agents infectieux. Elles peuvent être classées en deux catégories : 1) les maladies spécifiques d'un organe (diabète de type 1, thyroïdite...), et 2) les maladies systémiques (lupus érythémateux systémique LES, polyarthrite rhumatoïde...) [33].

Les auto-anticorps anti-histones peuvent être détectés au cours de différentes maladies auto-immunes: le Lupus Erythémateux Systémique ou LES [34] , la polyomyosite/dermatomyosite [35] , la sclérodermie [36] , la polyarthrite rhumatoïde [37] et les maladies auto-immunes du foie (cirrhose biliaire primitive) [38].

La prévalence des auto-anticorps anti-histones est de 90 % chez les patients atteints de LES [34]. Cette maladie est caractérisée par la production d'auto-anticorps dirigés contre des composants de la chromatine dont les nucléosomes, l'ADN et les histones. Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à la détection d'anticorps anti-histones dans le sérum de patients atteints de LES.

Le LES est une maladie systémique où le système immunitaire s'attaque aux tissus conjonctifs de plusieurs organes du corps : la peau, les muscles, les os, les poumons, le cœur, les reins. Le LES atteint aussi les systèmes sanguin, immunologique et nerveux. Il survient trois fois plus chez les femmes que chez les hommes, et sa prévalence est généralement estimée à 1‰. Sa pathogenèse peut être associée à des facteurs génétiques (predisposition génétique, déficit en protéines du système du complément), environnementaux (exposition aux rayons UV), ou une infection virale (ex : virus Epstein-Barr) [34, 39]. Le LES peut aussi être induit par des médicaments contenant de la procainamide ou de l'hydralazine, qui provoquent une autre variante de la maladie dite lupus induit [40].

Les symptômes du LES sont variés, certains ne sont pas très spécifiques de la maladie : une fatigue extrême, une perte de poids, de la fièvre. D'autres symptômes sont plus spécifiques et constituent les critères de l'*American College of Rheumatology (ACR)* pour le diagnostic du LES. Ces symptômes sont : une rougeur au niveau des joues en forme d'ailes de papillon (rash malar), une éruption cutanée

rouge de forme discoïde, une photosensibilité qui se manifeste par une éruption cutanée après exposition au soleil, des ulcères dans la bouche, une inflammation et des enflures des articulations, des douleurs musculaires, des douleurs au thorax durant les respirations, une inflammation du péricarde, un désordre rénal, neurologique, une dépression, un désordre au niveau du système sanguin (hémolyse, leucémie). Les tests sérologiques révèlent la présence d'une variété d'anticorps antinucléaires dirigés contre des ribonucléoprotéines (RNP, Sm, Ro) et contre les composants de la chromatine (anti-nucléosomes, anti-ADN, anti-histones). Des protéines inflammatoires sont également détectées comme la protéine C réactive (CRP). Une personne est atteinte de LES si elle présente au moins quatre des critères de l'ACR.

La détection des anticorps anti-nucléaires n'est donc pas un critère suffisant pour évaluer l'activité de la maladie chez les patients atteints de LES, bien qu'ils soient présents chez la plupart de ces patients. Parmi ces anticorps, les anti-ADN natif sont les plus spécifiques pour le diagnostic du LES.

La présence des auto-anticorps dans le sérum au cours du LES reste encore mal comprise. Elle peut être associée à un phénomène de déficience au niveau de l'élimination de cellules apoptotiques de l'organisme.

Au cours du LES, l'exposition aux rayons UV et l'infection virale déclenche la formation des éruptions cutanées ou « rash » chez les patients [41-43]. Dans les conditions physiologiques normales, les cellules apoptotiques sont éliminées par phagocytose. Une défaillance de la phagocytose des cellules apoptotiques entraîne la fragmentation de ces cellules et la libération d'antigènes intracellulaires. Ces fragments ne sont pas reconnus par le système immunitaire comme des substances du « soi » et déclenchent alors une réponse immunitaire qui peut se manifester par la production d'auto-anticorps. Cette défaillance peut être due à une déficience en protéine du système du complément, la protéine C1q. Les récepteurs de cette protéine à la surface des phagocytes sont extrêmement importants pour les mécanismes d'élimination des cellules apoptotiques. Les complexes immuns (auto-antigène/auto-anticorps) qui sont formés en réponse aux antigènes intracellulaires, entraînent une consommation de plus en plus importante de la protéine (C1q), déjà déficiente, et provoquent une inflammation au niveau des vaisseaux sanguins. La déficience en C1q diminue alors la possibilité d'éliminer ces complexes immuns par

opsonisation par les phagocytes, donc d'éliminer les corps apoptotiques (dont les auto-antigènes) par phagocytose [41].

Parmi la variété d'auto-anticorps produits alors au cours du LES, les anticorps anti-histones détectés peuvent être dirigés contre des complexes d'histone, des dimères (H2A-H2B) ou contre les protéines histones individuelles.

II.3. Peptides

Les peptides sont constitués de chaînes d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques covalentes. Une chaîne composée de deux ou trois acides aminés constitue un oligopeptide. A partir de quatre acides aminés (térapeptide), la molécule est dite polypeptide. En général, les peptides ont une masse moléculaire inférieure à 10 kDa [44].

La structure primaire ou la séquence d'un peptide, est l'ordre dans lequel sont enchaînés les résidus d'acides aminés de la molécule. Les peptides peuvent avoir une structure linéaire, ramifiée, cyclique ou semi-cyclique. Les peptides linéaires sont les plus fréquents. Par convention, le premier acide aminé de la séquence d'un peptide linéaire est celui dont le groupement amine lié au C α est libre et n'est pas engagé dans une liaison peptidique : c'est l'extrémité N-terminale. Le dernier acide aminé est celui dont le groupement carboxyle en C α est libre : c'est l'extrémité C-terminale du peptide.

Des fragments peptidiques bien définis constituent les sites actifs des protéines (antigènes, enzymes...). Ils ont un rôle essentiel au niveau des interactions biologiques entre les protéines et leurs ligands. Ces sites peuvent être constitués de séquences d'acides aminés consécutifs au niveau de la structure primaire d'une protéine (ce site constitue un épitope linéaire s'il s'agit d'un antigène), ou peuvent être formés par le repliement des chaînes peptidiques de la protéine, qui rapproche les résidus d'acides aminés responsables de l'interaction biologique avec le ligand (ce site constitue l'épitope conformationnel d'un antigène).

Les peptides ont une structure moins complexe et plus stable que celle des protéines. L'analyse des activités et des fonctions biologiques des protéines peut être effectuée en étudiant les interactions entre des fragments peptidiques synthétiques constitutifs du site actif d'une protéine et leurs ligands. C'est le cas pour

l'étude des interactions spécifiques entre un peptide épitope d'une protéine et son anticorps spécifique.

Les peptides, contrairement aux protéines, peuvent être synthétisés chimiquement en phase solide. ce qui représente un intérêt considérable au niveau des applications biologiques et biomédicales (ex : criblage d'épitopes, production de vaccins synthétiques) [21].

II.3.1. Synthèse peptidique en phase solide

Les peptides peuvent être synthétisés en phase solide selon plusieurs approches, on distingue : la synthèse sur billes de résine en polystyrène ou en polyacrylamide [45], et la synthèse en SPOT sur membrane de cellulose ou de polypropylène [46].

II.3.1.1. Synthèse peptidique sur résine

La synthèse peptidique sur résine peut s'effectuer selon deux stratégies : la stratégie Boc (*t*-Butyloxycarbonyle), et la stratégie Fmoc (9-Fluorénylméthoxycarbonyle), basées toutes les deux sur le même principe (*fig.1.21*).

La synthèse peptidique en phase solide (SPPS) a été mise au point par Bruce Merrifield, en 1963. Elle consiste à fixer par liaison covalente le premier acide aminé sur un support solide et ajouter ensuite les acides aminés consécutifs, en les liant par couplage covalent l'un après l'autre, à l'extrémité de la chaîne peptidique en cours de synthèse. A la fin de la synthèse, le peptide peut être clivé du support, purifié par chromatographie liquide (LC) et caractérisé par spectrométrie de masse (MS). La synthèse peut être manuelle ou automatisée à l'aide d'un synthétiseur peptidique.

Selon la stratégie Boc, selon Merrifield, la synthèse s'effectue sur un support solide constitué de billes de résine en polystyrène (PS, 1% DVB ou divinylbenzène). Il s'agit d'un support stable et insoluble dans les solvants utilisés au cours de la synthèse. La résine est substituée par un groupement chlorométhyle. Le premier acide aminé est fixé par une liaison ester *via* son groupement acide α -carboxylique. La synthèse s'effectue de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale du peptide, donc la chaîne en cours d'élongation présente un groupement amine libre. La fonction

α -amine de chaque acide aminé incorporé à la chaîne doit être protégée, sinon les acides aminés pourraient réagir avec des molécules analogues. Cette fonction est protégée par un groupement Boc (*t*-Butyl-oxycarbonyl), clivable après un traitement à l'acide trifluoroacétique CF_3COOH (TFA). Après le couplage du premier acide aminé, sa fonction α -amine est déprotégée, pour permettre le couplage à l'acide aminé suivant. Les chaînes latérales des acides aminés portant des groupements réactifs (NH_2 , COOH , OH , SH) doivent également être protégées afin d'éviter des réactions secondaires au cours des couplages. Ces groupements protecteurs résistent au TFA, mais ils sont clivables à l'acide fluorhydrique liquide (HF) ou à l'acide trifluorométhanesulfonique (TFMSA). Ces deux acides forts permettent de cliver en même temps le peptide du support, à la fin de la synthèse [47]. L'utilisation des acides forts est une limitation à cette stratégie.

La stratégie Fmoc a été introduite par Carpino en 1973 [48]. La fonction α -amine est protégée par un groupement Fmoc clivable en milieu basique, et les chaînes latérales des acides aminés sont protégées par des groupements acido-labiles stables en milieu basique, comme le groupement *t*-Boc. Elles sont déprotégées au moment du clivage du peptide de la résine par un traitement au TFA (*fig.1.21*). Par comparaison à la stratégie Boc, les réactions de déprotection du groupement α -amine et de clivage du peptide se déroulent dans des conditions plus douces.

Au cours de notre travail, la synthèse peptidique sur résine a été effectuée selon la stratégie Fmoc. La résine en polystyrène (PS, 1% DVB) est substituée par un groupement hydroxyméthyle [49]. Le premier acide aminé, est dissous dans un solvant organique comme le diméthylformamide (DMF), sa fonction α -carboxyl est activée en présence d'un carbodiimide (ex : diisopropyl carbodiimide ou DIC) et d'un activateur (ex : hydroxybenzotriazole ou HOBt). Il est ensuite couplé à la résine *via* une liaison ester. La réaction de couplage s'effectue sur ~ 90 min.

Le clivage du groupement Fmoc s'effectue dans des conditions basiques (20% pipéridine/diméthylformamide ou DMF). Le clivage du groupement Fmoc engendre un produit chromophore, le dibenzofulvène-pipéridine (DBF-pipéridine), détecté par spectrophotométrie UV (~ 301 nm), ce qui permet d'évaluer quantitativement le rendement de déprotection des groupements α -amines.

Après plusieurs cycles de couplage/déprotection, les chaînes latérales du peptide sont déprotégées au cours du clivage du peptide de la résine, par un traitement dans un mélange à 95%TFA dans du dichlorométhane CH₂Cl₂ (DCM), pendant 1 - 2h.

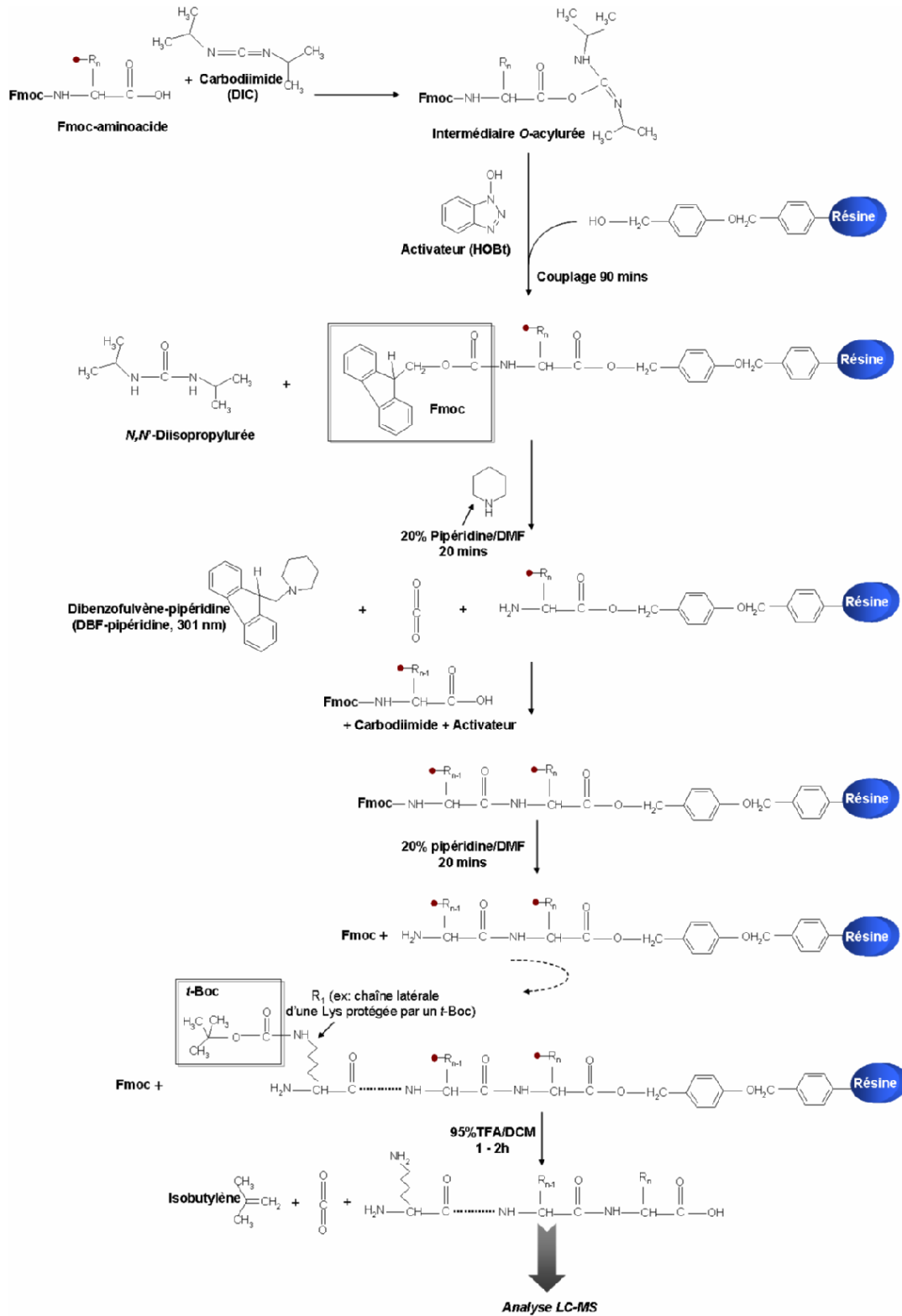


Fig.I.21. Synthèse peptidique sur résine selon la stratégie Fmoc (• : groupement protecteur de la chaîne latéral ;, n : nombre d'acide aminés de la chaîne peptidique ; Analyse LC-MS: Chromatographie Liquide-Spectrométrie de Masse).

Chaque cycle de synthèse consiste donc en quatre étapes principales : 1) activation et couplage d'un acide aminé protégé, 2) déprotection à la pipéridine, 3) lavages, 4) activation et couplage de l'acide aminé suivant. Après le clivage du peptide, le peptide synthétisé est purifié par HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance) et caractérisé par spectrométrie de masse (MS).

Donc, la synthèse d'une chaîne peptidique à n résidus demande, au moins, $2n$ étapes réactionnelles, une pour le couplage et une pour la déprotection de chaque résidu. Pour synthétiser un polypeptide avec un rendement final suffisant, il faut que chaque réaction soit pratiquement quantitative, car le rendement du produit final décroît exponentiellement après chaque étape. Même si le rendement de chaque réaction est de $\sim 99,5\%$, la longueur des chaînes peptidiques synthétisées est limitée à environ 60 résidus, pour un rendement final de synthèse de $(0,995^{120} \times 100) = 54\%$ [21].

II.3.1.2. Synthèse en SPOT sur membrane

Cette méthode a été développée par Frank en 1992 [46, 50]. Elle est basée sur le même principe de la technique de synthèse peptidique sur résine. Elle est effectuée selon la stratégie Fmoc [47].

Cette technique a été développée pour synthétiser en parallèle plusieurs séquences peptidiques différentes sur un même support solide plan. Après la synthèse peptidique, différentes applications peuvent être effectuées soit en phase solide, directement sur le support, soit en solution après le clivage du peptide synthétisé [51].

La technique en SPOT consiste à synthétiser des peptides sur des spots distincts et arrangés sur une membrane poreuse plane de cellulose ou de polypropylène. Chaque spot constitue une gouttelette considérée comme un microréacteur. Des solvants non volatiles doivent être utilisés pour maintenir les spots dans un environnement hydraté. La synthèse s'effectue par dépôt séquentiel, manuel ou automatisé, d'acides aminés activés et de réactifs sur chaque spot de la membrane. La taille des spots (diamètre compris entre 1 et 1,5 mm) est déterminée par le volume des solutions déposées, du solvant ainsi que par les propriétés physiques de la surface de la membrane (19 x 28 cm, 15 – 128 spot/cm²) [51] (*fig.I.30*).

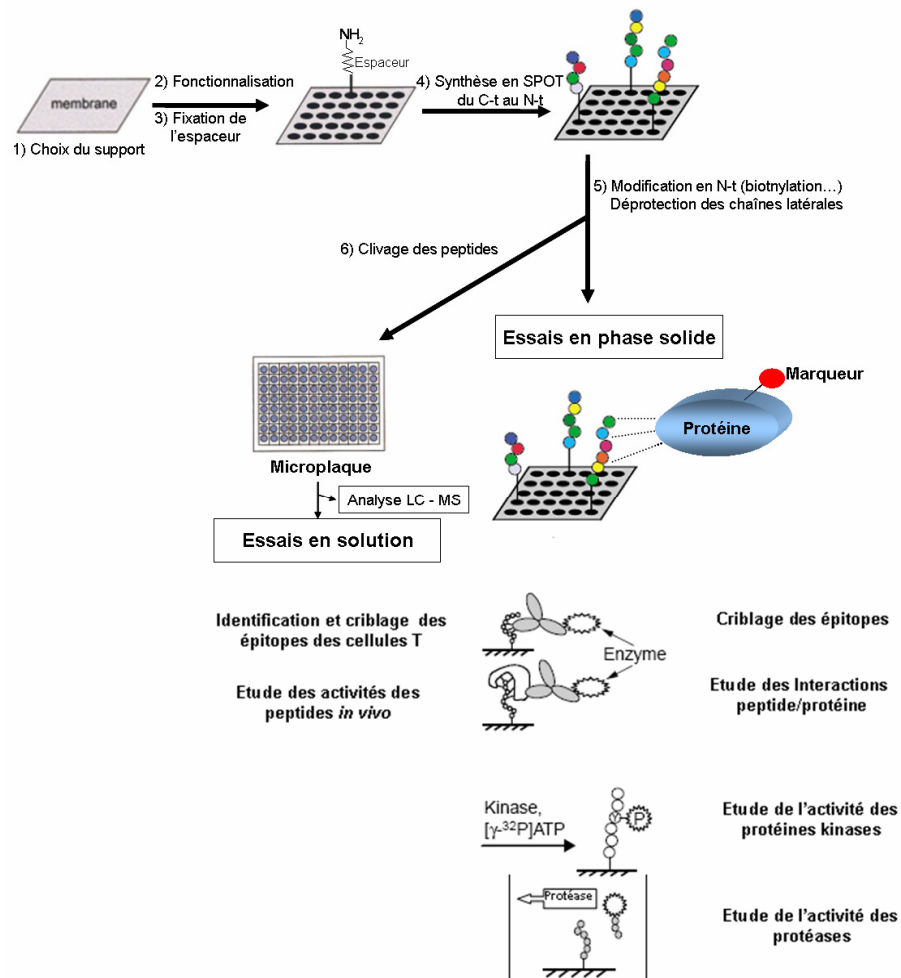


Fig.I.22. Schéma général de la technique de synthèse en SPOT et ses applications [51, 52].

La surface plane utilisée pour la synthèse en SPOT doit répondre à certains critères comme: 1) la stabilité mécanique à travers les différentes étapes de la synthèse, (dépôt des solutions, lavages, clivages), 2) l'accessibilité aux groupements fonctionnels réactifs sur la surface, 3) le caractère hydrophile, propriété nécessaire pour éviter les interactions non spécifiques au cours des tests effectués en phase solide et 4) la disponibilité commerciale [51].

Les membranes de cellulose [46, 53-56] ou de polypropylène [57, 58] peuvent être substituées par des fonctions amines réactives, permettant de fixer le premier acide aminé par son extrémité C-terminale par une liaison amide covalente. Par comparaison à la stratégie Fmoc effectuée sur résine, la réaction de couplage de chaque acide aminé sur membrane s'effectue sur 15 min. Les membranes de cellulose sont stables pendant 3 hrs dans une solution à 50% TFA/DCM ou 1 h dans une solution à 90% TFA pour la déprotection des chaînes latérale du peptide.

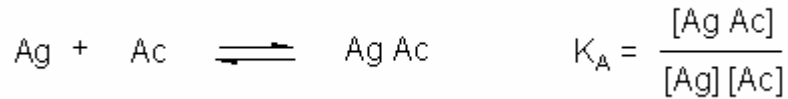
Toutefois, les liaisons glycosidiques de la cellulose sont sensibles aux solutions acides. Les membranes de polypropylène fonctionnalisées sont plus stables pour le traitement au TFA [51].

Si le peptide synthétisé doit être ultérieurement clivé de la membrane, il peut être immobilisé *via* un bras espaceur photolabile (« photolinker »). Ce bras espaceur possède d'un côté une fonction acide carboxylique qui permet de le fixer au support aminé par une liaison amide, et de l'autre côté une fonction amine permettant de lier le peptide à la surface. La liaison amide du photolinker avec le support est stable au traitement TFA de déprotection des chaînes latérales du peptide. Le photolinker peut être clivé par des irradiations UV à une longueur d'onde de 365 nm [56, 59].

La synthèse sur membrane permet d'obtenir des chaînes peptidiques de ~ 15 mers. Les peptides clivés du support sont purifiés par HPLC et caractérisés par spectrométrie de masse (MS). Les peptides clivés et récupérés en solution peuvent être utilisés pour la détermination et le criblage d'épitopes [60]. Les peptides non clivés permettent d'effectuer plusieurs analyses biologiques en parallèle sur le support, comme : le test d'interaction entre des peptides et des anticorps pour le criblage d'épitopes [61], l'identification de substrats enzymatiques par modification des peptides sur le support (phosphorylation par les kinases [62-65] ou clivage par les protéases [66]) (*fig. I.22*). Des interactions entre les peptides et les acides nucléiques, ou les peptides et les ions métalliques peuvent également être testées [51].

III. Les tests immunologiques classiques

La détection des interactions moléculaires entre un antigène (Ag) et un anticorps (Ac) peut être effectuée par différentes techniques immunologiques d'application courante en recherche fondamentale et en analyse médicale. La réaction entre l'épitope de l'antigène et le paratope de l'anticorps fait intervenir différents types de liaisons non covalentes : des liaisons hydrogènes, électrostatiques, les forces de Van der Waals et des liaisons hydrophobes. Ces interactions sont réversibles et la constante d'association à l'équilibre (K_A en $L \text{ mol}^{-1}$) permet de définir l'affinité d'un Ac pour un Ag :



Une constante d'affinité de l'ordre de $10^6 - 10^{10} \text{ L.mol}^{-1}$ correspond à une faible affinité, alors qu'une constante d'affinité de l'ordre de $10^{10} - 10^{13} \text{ L.mol}^{-1}$ correspond à une forte affinité antigène-anticorps. L'interaction Ag-Ac est évaluée soit par la détection ou dosage des antigènes, soit par la détection et le titrage des anticorps dans un milieu biologique.

Différents types de tests immunologiques peuvent être effectués pour détecter des anticorps anti-histones (AAH) dans le sérum : les techniques ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), Western blot ou immunotransfert, dot blot et l'immunofluorescence.

Deux paramètres principaux doivent être considérés dans les tests immunologiques de diagnostic : la sensibilité et la spécificité. Pour établir la valeur diagnostique d'un test par rapport à une pathologie, il est nécessaire de comparer une population malade à une population de sujets sains témoins.

La sensibilité est le nombre de sujets malades (vrais positifs) par rapport au nombre total de sujets dans la population malade (vrais positifs + faux négatifs).

La spécificité est le nombre de sujets sains (vrais négatifs) par rapport au nombre total de sujets dans le groupe témoin (vrais négatifs + faux positifs) [33].

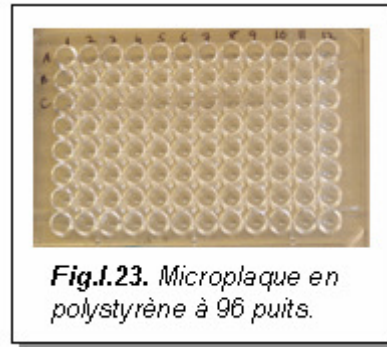
Les techniques classiques qui ont été appliquées au cours de cette thèse sont l'ELISA et le Western blot.

III.1. Technique ELISA

Cette technique est basée sur la détection et le dosage d'anticorps ou d'antigènes sur support solide. L'interaction biologique entre l'antigène et l'anticorps est détectée suite à une réaction colorimétrique catalysée par une enzyme. Différents types de tests ELISA peuvent être appliqués ; la détection et le titrage des anticorps s'effectuent par la technique ELISA indirecte et la détection et le dosage des antigènes selon la méthode ELISA sandwich.

L'ELISA s'effectue dans des microplaques en polystyrène (128 x 86 mm), réparties en 96 ou 384 puits.

Les plaques à 96 puits (\varnothing fond du puits $\sim 6,5$ mm; 400 μ L/puits) sont couramment utilisées (fig.1.23).



La technique ELISA indirecte consiste en plusieurs étapes (fig.1.24).

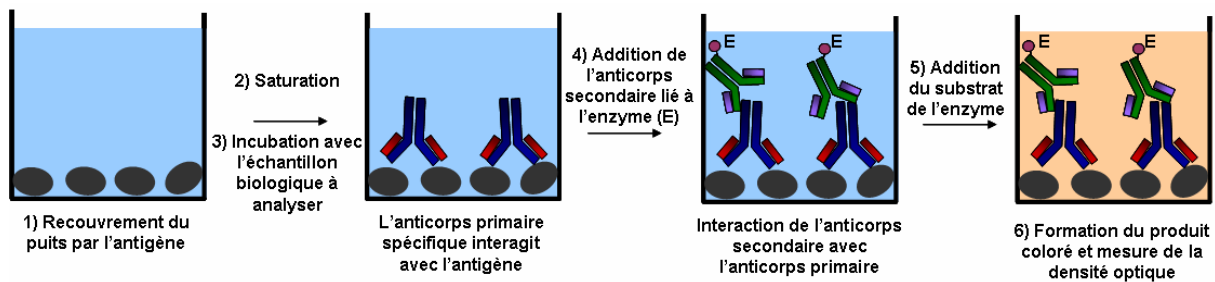


Fig.1.24. Technique ELISA indirecte pour la détection d'anticorps dans un échantillon biologique [27].

- 1) Immobilisation de l'antigène (ex : protéine connue) par adsorption physique au fond des puits de la microplaque (100 μ L de solution d'antigène/puits).
- 2) Lavages des puits, et saturation des sites libres, avec des protéines comme l'albumine bovine (BSA : Bovine Serum Albumin) ou les protéines du lait (caséine). En général, un volume de 200 μ L de solution de saturation est déposé par puits.
- 3) Lavages de la plaque et incubation de l'antigène immobilisé avec 100 μ L de l'échantillon biologique à analyser (ex : sérum). L'anticorps à détecter dans l'échantillon est désigné par anticorps primaire.
- 4) Lavages de la plaque et addition de 100 μ L d'une solution d'anticorps secondaire lié à une enzyme et dirigé contre l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire se lie alors au complexe Ag-Ac primaire
- 5) Lavages pour éliminer les adsorptions non spécifiques des anticorps non liés et addition du substrat de l'enzyme (100 μ L/puits).

Après l'addition du substrat, l'enzyme catalyse la réaction qui produit un chromophore (produit coloré) détecté dans le domaine du visible.

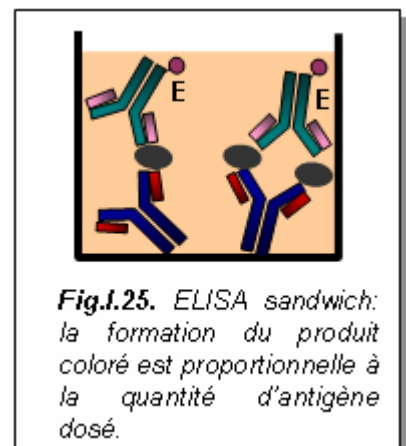
6) Mesure de l'absorbance sur un lecteur de microplaque ou un spectrophotomètre. Les valeurs de DO sont proportionnelles à la quantité d'anticorps spécifique présent dans l'échantillon. Ces valeurs sont réparties sur une échelle entre 0 et 3.

En général, l'étape de recouvrement de la plaque avec l'antigène peut s'effectuer sur une nuit, la saturation sur 2 h et l'incubation des anticorps sur 1 h.

La détection d'anticorps dans le sérum de patients peut être qualitative : en utilisant une même dilution pour tous les sérums étudiés, un seuil de positivité est déterminé à partir des valeurs de l'absorbance mesurées dans une population de sujets sains.

Pour une mesure quantitative d'anticorps, l'analyse peut être effectuée par la détermination du titre en anticorps : pour chaque sérum étudié, une gamme de dilutions est préparée (généralement à base 2 à partir d'une dilution initiale au 1:10 ou 1:100) et la réaction obtenue avec chaque dilution est mesurée. Le titre correspond à l'inverse de la plus grande dilution permettant d'observer une réaction positive. Il dépend de la concentration des anticorps et de leur affinité.

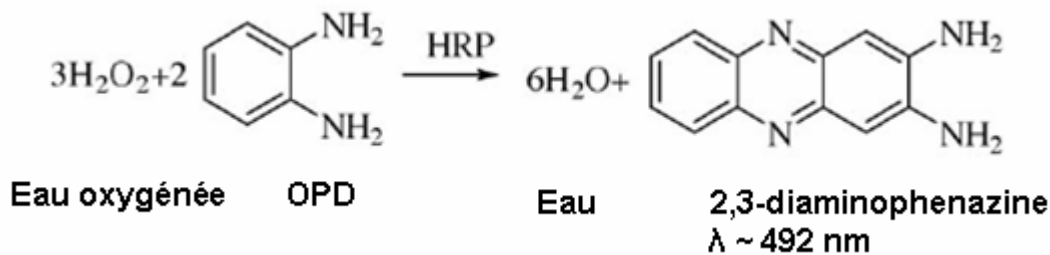
Le principe de la technique ELISA sandwich appliquée pour la détection et le dosage d'antigènes, consiste à recouvrir le fond des puits avec une solution d'anticorps monoclonal spécifique de l'antigène à détecter (*fig.1.25*). L'anticorps adsorbé est incubé avec l'échantillon biologique à analyser. Un second anticorps, lié à une enzyme (E) et dirigé contre un épitope de l'antigène distinct de celui reconnu par l'anticorps de capture, est ensuite ajouté. Le second anticorps est souvent un anticorps polyclonal. La révélation de la présence de l'antigène s'effectue par une réaction colorimétrique selon le même principe que la technique ELISA indirecte.



La formation du produit coloré est dans ce cas proportionnelle à la quantité d'antigènes présents dans l'échantillon analysé. Le signal obtenu augmente en fonction de la concentration en antigène ajouté jusqu'à atteindre un plateau correspondant à la saturation de la réaction. La concentration de l'antigène dans le

milieu biologique peut être déterminée par référence à une courbe étalon obtenue avec des concentrations d'antigènes connues [33].

L'enzyme le plus souvent utilisée pour le marquage des anticorps est la peroxydase du raifort (HRP : Horse Radish Peroxidase). Cette enzyme réagit avec son substrat l'OPD ou o-phénylènediamine, en présence de l'eau oxygénée et catalyse une réaction qui produit un chromophore, le 2,3 diaminophénazine détectable à une longueur d'onde de 492 nm :



La technique ELISA est pratique et simple à mettre en oeuvre, cependant les protéines sont des molécules très sensibles aux changements de conditions du milieu environnant (température, pH...). Leur immobilisation par physisorption s'effectue de manière aléatoire sur le support en polystyrène, entraînant une altération de leur conformation tridimensionnelle et une diminution de l'accessibilité des biomolécules analysées à leurs sites actifs. Ceci peut limiter l'efficacité (sensibilité et spécificité) des tests effectués par cette technique.

III.2. Technique Western blot ou immunotransfert

La technique Western blot appelée aussi immunotransfert est utilisée pour détecter spécifiquement une protéine présente dans un milieu complexe. Cette technique est appliquée pour l'identification des différentes classes d'histones (H1, H2A, H2B, H3 et H4) cibles des anticorps anti-histones dans le sérum.

Cette technique est semblable à l'ELISA. Elle se réalise selon les étapes suivantes (fig.1.26).

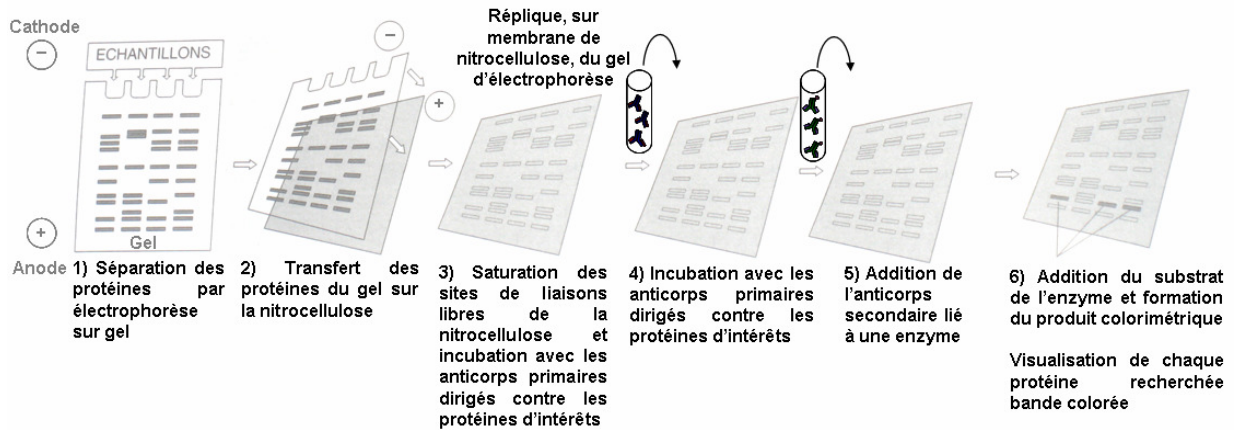


Fig.I.26. Technique Western blot ou immunotransfert pour la détection des protéines [33].

1) Les protéines sont séparées, selon leur masse moléculaire, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE).

Le gel est coulé sous forme d'une fine plaque rectangulaire, dans laquelle plusieurs échantillons peuvent être analysés simultanément. Les protéines sont dissoutes dans une solution tampon, généralement à pH ~ 9, contenant du SDS (agent dénaturant), elles ont une charge nette négative. Les solutions protéiques sont déposées dans des puits préformés au sommet du gel (2,5 – 10µg / puits), un courant continu est appliqué à travers le gel pendant 30 – 90 min et les protéines vont migrer de la cathode vers l'anode.

2) Après l'électrophorèse, le gel est appliqué sur une membrane de nitrocellulose sur laquelle les protéines vont se fixer par adsorption physique. C'est l'étape de transfert.

3) Les sites libres de la membrane de nitrocellulose sont ensuite saturés avec une protéine, comme la caséine du lait, pour éviter les adsorptions non spécifiques des anticorps incubés dans les étapes suivantes. Cette étape peut s'effectuer sur 30 min.

4) Après lavages, les anticorps primaires contenus dans l'échantillon biologique sont incubés avec la membrane pendant 90 min.

5) La membrane est lavée et incubée avec l'anticorps secondaire lié à une enzyme, (comme dans le cas de l'ELISA), pendant 90 min.

6) Après lavages, le substrat de l'enzyme est ajouté, et une réaction colorimétrique qui produit un chromophore permet de visualiser, sous forme de bandes colorées, les différentes protéines reconnues par les anticorps contenus dans l'échantillon biologique [21].

Un anticorps secondaire lié à un élément radioactif peut aussi être utilisé, dans ce cas la révélation des bandes sur la membrane s'effectue par autoradiographie.

Notons que les anticorps contenus dans le sérum analysé interagissent avec des protéines dénaturées sur la membrane de nitrocellulose. Ces protéines présentent donc des épitopes linéaires.

La technique d'immunotransfert est souvent plus sensible que la technique ELISA dans la recherche des anticorps anti-histones chez des patients atteints de LES. Toutefois, le sérum de ces patients peut contenir des anticorps qui reconnaissent des épitopes linéaires et conformationnels. Ainsi, des sérums peuvent être positifs en ELISA et négatifs en immunotransfert. En effet, si ces sérums contiennent des anticorps dirigés contre des épitopes conformationnels, ceux-ci seront dénaturés au cours de l'électrophorèse sur gel, et ne seront donc plus reconnus par les anticorps en immunotransfert. Par contre, certains sérums peuvent être positifs uniquement en immunotransfert. Cette réactivité peut être due à la présence d'anticorps dirigés seulement contre des épitopes linéaires qui sont alors inaccessibles aux anticorps en ELISA.

Les anticorps dirigés contre les histones de classe H1 (AAH-H1) sont souvent prédominants (55 – 60%) [67, 68]. Les fréquences des AAH de classe H2A et H2B sont moins élevées (50- 55%) mais plus importantes que celles des AAH de classe H3 (~ 35%) et H4 (~30%) [68-71].

La prédominance des AAH-H1 peut être due à la localisation de H1 sur la face externe du nucléosome, ce qui la rend plus accessible à la réponse immunitaire que les autres classes d'histones. Par rapport aux histones du cœur du nucléosome, les histones H2A et H2B sont orientées vers l'extérieur de l'octamère d'histones ce qui les rend également plus accessibles que les histones H3 et H4 orientées vers l'intérieur de l'octamère [68, 71].

IV. Les biopuces à protéines et à peptides

IV.1. Introduction

La technologie des biopuces permet d'effectuer simultanément des tests miniaturisés, de haute sensibilité, sur plusieurs molécules d'intérêt présentes dans un échantillon biologique de faible volume [72-74]. Une biopuce est constituée d'un

support solide (silice, verre, métal ou polymère) sur lequel sont immobilisées des biomolécules appelées « sondes ». La surface du support est traitée chimiquement pour permettre le greffage de ces sondes (fragments d'acides nucléiques, protéines, peptides, sucres, cellules ou tissus). Les sondes sont immobilisées et organisées en matrices (d'où le terme de « microarrays ») sur le substrat solide. Chaque sonde est localisée en des endroits définis appelés « plots » ou « spots ». Un spot contient un grand nombre de copie d'une même molécule sonde. Chaque sonde a été choisie pour reconnaître spécifiquement, par affinité, une molécule cible (ex : protéines, acides nucléiques...) éventuellement présente dans un milieu biologique à analyser. La surface de la puce est mise en contact avec l'échantillon biologique à analyser (sérum, extrait cellulaire ou autre échantillon biologique d'intérêt). Après élimination des molécules en excès, la biopuce est analysée spot par spot pour détecter et déterminer quelle sonde a capturé une cible. Les systèmes de détection de biomolécules cibles sur biopuces peuvent être basés sur différentes techniques. La plus classique est désormais certainement la fluorescence. On peut recenser également la chimiluminescence, la spectrométrie de masse, la radioactivité, les mesures électrochimiques, optiques, massiques, électriques.

La figure 1.27 montre quelques exemples de puces à protéines: les sondes protéiques sont immobilisées sur des surfaces solides planes et incubées avec des biomolécules cibles marquées, dans ce cas par des fluorophores. Les interactions moléculaires spécifiques sont détectées après analyse de la fluorescence [75].

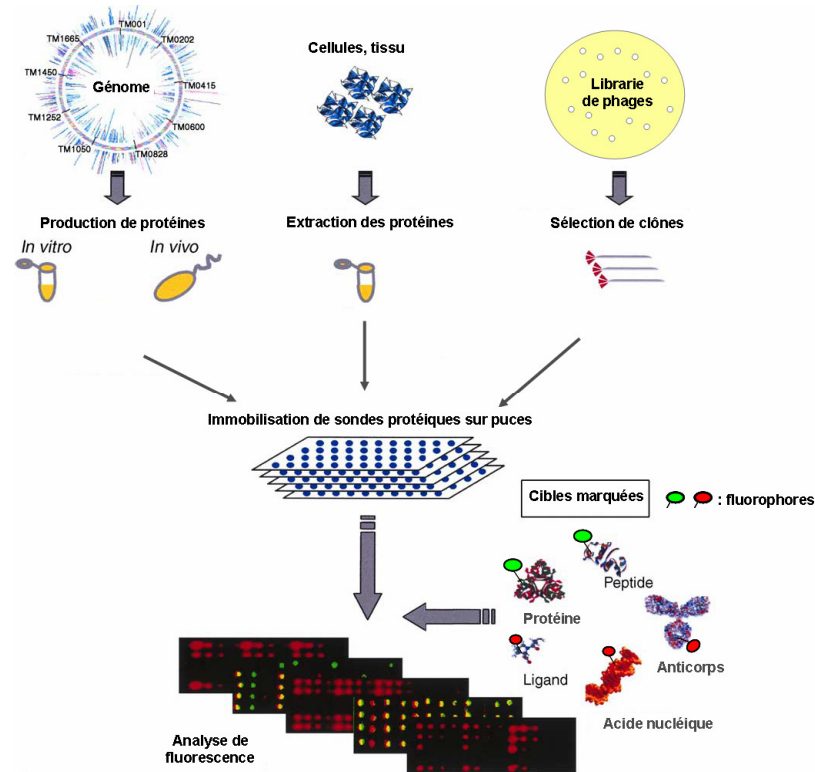


Fig.I.27. Exemple de puces à protéines effectuées sur support solide plan. Détection de différentes interactions moléculaires par analyse de fluorescence [75].

Le développement des puces à protéines bénéficie de l'expertise liée à l'évolution de la technologie des puces à ADN, qui a connu un grand essor dans le domaine de la recherche fondamentale et biomédicale. Les puces à ADN peuvent être élaborées selon deux stratégies différentes : i) les sondes peuvent être préparées individuellement, puis immobilisées sur la surface de la puce (méthode *ex situ*) [76], ou ii) les sondes sont synthétisées directement sur la surface de la puce par synthèse chimique d'oligonucléotides sur la surface (méthode *in situ*) [77-80]. Le développement de ces biopuces a permis de mettre au point des essais miniaturisés, à très haute densité, fabriqués sur des substrats en verre (lames de microscope). Ces puces permettent d'analyser l'expression de la totalité du génome d'un organisme au sein d'une seule expérience [81, 82]. L'évolution des technologies a permis de faire émerger des méthodes industrielles de fabrication et de production de puces à ADN de grande qualité (Affymetrix, Agilent).

Pourtant, les efforts engagés dans le domaine de la génomique pour analyser les différents processus biologiques, physiologiques et pathologiques n'ont pas permis d'aboutir à une compréhension suffisamment vaste et profonde des phénomènes du

vivant. Il apparaît que la compréhension de ces phénomènes nécessite, en plus de l'approche génomique, des analyses au niveau de l'expression des protéines elles-mêmes. Une faible corrélation existe en effet entre l'activité des gènes et l'expression des protéines [19, 20]. Ceci est dû notamment aux modifications post-traductionnelles des protéines, comme le clivage (élimination de la méthionine initiale), l'addition de groupements chimiques (phosphorylation, acétylation) ou d'autres molécules plus complexes (lipides, sucres). L'étude du comportement des protéines nécessite le développement d'outils toujours plus pointus et puissants : électrophorèse sur gel à deux dimensions, chromatographie, spectrométrie de masse, ELISA, Western blot. Les puces à protéines constituent un outil additionnel, permettant d'étudier les interactions protéine/ligand avec un débit encore inatteignable par les méthodes classiques.

Les puces à protéines peuvent être divisées en deux grandes catégories :

1) les puces fonctionnelles, développées généralement en recherche fondamentale pour étudier les fonctions des protéines [83]. Un grand nombre de protéines, de peptides ou même la totalité d'un protéome peuvent être immobilisés sur supports. Ces puces sont utilisées pour analyser des interactions biochimiques entre les protéines et leurs ligands. Elles permettent d'étudier les effets des substrats sur les activités enzymatiques [84], les interactions entre les protéines et les acides nucléiques [85], les cibles pharmaceutiques [86, 87], ou d'autres petites molécules, ainsi que d'étudier les activités des hormones [88] ou de déterminer des sites antigéniques ou épitopes [89, 90].

2) les puces de diagnostic, qui permettent de déterminer la présence et/ou l'abondance de protéines d'intérêt présentes dans un milieu biologique complexe comme le sérum [91-93]. Des antigènes ou des anticorps sont immobilisés sur le support, pour pouvoir détecter des interactions spécifiques avec les molécules cibles présentes dans un échantillon biologique. Ces puces sont utilisées pour le diagnostic des maladies auto-immunes [94-97], génétiques, les infections virales ou bactériennes [98, 99], tumorales [93], ou allergiques [100, 101].

La conception et la fabrication de puces à protéines et à peptides fonctionnelles nécessite de dépasser plusieurs verrous technologiques.

IV.2. Les verrous technologiques

Comme nous l'avons dit plus haut, le développement des puces à protéines et à peptides a tiré profit de la technologie mise au point pour les puces à ADN. Cependant, la structure de la molécule d'ADN et les interactions mises en jeu entre deux brins d'ADN complémentaires sont beaucoup plus simples et plus stables que ce que l'on peut obtenir dans le cas des protéines. En effet, les protéines sont des molécules beaucoup plus complexes et souvent moins stables que l'ADN de part la diversité des éléments qui les composent (20 acides aminés) et les possibilités de structure. Elles sont également très sensibles aux changements des conditions environnantes comme la température, la nature du solvant, le pH... Les peptides, quant à eux, sont des molécules de faibles masses moléculaires, stables, faciles à manipuler et peuvent être synthétisés sur support solide [77]. Cependant, la structure du peptide correspondant au site actif d'une protéine est souvent différente de la structure de la même séquence d'acides aminés dans la protéine native. Ainsi l'affinité de ce peptide vis-à-vis du ligand de la protéine est souvent plus faible que l'affinité de la protéine complète.

Ainsi, pour concevoir des puces à protéines et à peptides, fonctionnelles et sensibles [102, 103], plusieurs points doivent être abordés tels que:

i) choisir un support solide et une chimie de surface permettant d'immobiliser et d'orienter les protéines, afin de conserver leur structure tridimensionnelle (état natif), leurs propriétés, et leur activité biologique, et en évitant leur détachement au cours des différentes étapes expérimentales.

ii) contrôler la densité de greffage des sondes sur la surface,

iii) minimiser l'adsorption non spécifique des biomolécules sur la surface. Les molécules cibles d'intérêts sont contenues dans des solutions biologiques complexes, contenant plusieurs types de molécules différentes qui peuvent s'adsorber sur la surface et augmenter le bruit de fond des essais,

iv) définir une méthode de détection permettant d'analyser l'interaction entre sonde et cible étudiée avec les meilleures performances analytiques (sensibilité, seuil inférieur de détection, gamme dynamique).

Plusieurs modèles de biopuces à protéines et à peptides ont été fabriqués sur différents types de supports solides. Les sondes ont été immobilisées sur les surfaces selon différentes stratégies. Le choix du support et de la chimie de surface dépend de la technique de détection des interactions moléculaires mises en jeu. Quelques exemples de ces différentes approches sont détaillés dans les paragraphes suivants.

IV.3. Supports solides et chimie de surface

Plusieurs types de supports solides ont été employés pour développer des puces à protéines et à peptides. Ces supports solides peuvent être des surfaces planes de verre, de polystyrène, ou de métal, ou des supports structurés comme les microcuvettes en verre ou en polymère.

Les supports solides plans tels que des lames de microscope (76 x 26 mm), sont utilisés pour la fabrication de biopuces. Le verre est un matériau rigide et de faible coût. Il peut être fonctionnalisé avec divers groupements chimiques permettant le couplage des sondes sur la surface, tels que des aldéhydes [73] ; des esters activés [104], des aminosilanes [4, 105], des groupements époxy [106] , des poly-L-lysines [107, 108]. Les lames de verre peuvent aussi être modifiées avec du nickel, pour immobiliser des protéines possédant des séquences (tag) d'histidine [109].

Les supports en verre peuvent également être structurés afin d'isoler différentes conditions de test d'un échantillon [106, 110]. Ainsi, des microcuvettes de 4 mm de diamètre et 100 µm de profondeur sont fabriquées par gravure du verre par voie humide. La lame de verre (76 x 26 mm) est recouverte d'un masque formé d'une bicouche constituée de chrome (Cr) et d'un film photosensible. Le chrome assure une surface d'adhésion entre le substrat de verre et le film photorésistant au cours de la photolithographie. Après la gravure, les couches protectrices sont enlevées et la surface de verre est silanisée. Ces microréacteurs, peuvent contenir un volume de l'ordre du microlitre [110].

D'autres types de microcuvettes (1,4 mm de diamètre, et de 300 µm de profondeur ; 300 nl/cuvette) sont fabriquées avec du PDMS (polydiméthylsiloxane) coulé dans des moules. Les couches de polymère (18 x 28 mm) sont séchées, détachées du moule

et déposées sur des lames de verre. Le PDMS peut être fonctionnalisé avec du GPTS (glycidoxypropyltriéthoxysilane).

Les lames de verre peuvent aussi être recouvertes d'une couche mince de métal comme l'or ou l'argent. L'or a une forte affinité pour les fonctions thiol. Des chaînes d'alkyl-thiols portant des groupements chimiques fonctionnels, peuvent être greffées sur un film d'or et formées, dans certaines conditions, des couches auto-assemblées ou SAMs (self assembled monolayers) [111, 112] sur la surface. Les substrats en or sont des supports essentiels pour les biopuces utilisant la technique de détection par résonance des plasmons de surface (SPR) [97].

D'autres types de modifications ont été effectués sur les lames de verre, telles que le recouvrement des surfaces par une couche de polymère comme le polyacrylamide, le PDMS, l'agarose ou la gélatine, qui confèrent au support une structure poreuse. Les protéines sont piégées à l'intérieur d'une matrice de gel hydraté, permettant de conserver leur structure native et l'accessibilité à leurs sites actifs [113-115]. Des gels hydratés supramoléculaires récemment développés, semblent être très efficaces pour l'analyse des activités biologiques des protéines. Des poches aqueuses sont créées dans la matrice du gel où peuvent se dérouler les réactions biochimiques, et des espaces hydrophobes permettent de piéger les produits marqués des réactions (ex : produits fluorescents) [116].

Enfin, des supports comme les surfaces en plastique (ex : le polystyrène), ont été utilisés pour l'immobilisation de protéines et de peptide par adsorption [117].

Ces différents types de supports peuvent être alors modifiés selon différentes chimies de surface de façon à contrôler l'état des sondes immobilisées (orientation, densité de greffage...).

IV.4. Les puces à protéines

IV.4.1. Stratégies d'immobilisation des protéines sur supports

Les différentes stratégies d'immobilisation des protéines sur des supports dépendent du type d'interactions possibles entre la protéine et la surface de la puce.

Des interactions directes ou indirectes peuvent s'établir entre la protéine et le support. Les liaisons directes s'effectuent par adsorption physique, ou greffage covalent sur la surface, ou par piégeage de la protéine à l'intérieur d'une structure poreuse. Les liaisons indirectes s'établissent par affinité entre une molécule couplée à la protéine et une autre molécule immobilisée sur le support.

L'adsorption physique est le type d'immobilisation le plus simple, les sondes étant fixées sur la surface par des liaisons hydrophobes ou électrostatiques. Les supports solides utilisés sont les supports en plastique hydrophobe, comme le polystyrène [117], les lames de verre recouvertes d'une couche de poly-L-lysine donc chargée positivement (*fig.1.28*) [107, 118].

L'orientation des protéines par adsorption physique à la surface de la puce est aléatoire et les adsorptions non spécifiques sont élevées, ceci peut limiter la sensibilité des tests effectués sur ces puces.

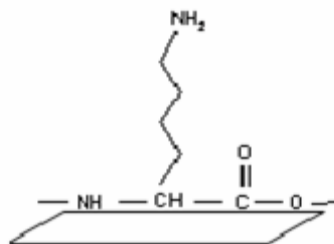


Fig.1. 28. Lame de verre recouverte d'une couche de poly-L-lysine pour permettre l'adsorption physique des protéines [118].

Le greffage covalent des protéines sur support met en jeu des liaisons de forte énergie, et permet de fixer les sondes d'une manière plus stable. Différentes stratégies d'immobilisation ont été décrites pour immobiliser les protéines par leurs groupements amines (fonction amine terminale ou fonction amine des chaînes latérales des résidus lysines), ou par les groupements thiols de leurs résidus cystéines.

Les fonctions amines des protéines peuvent établir des liaisons covalentes avec des groupements fonctionnels substitués sur des lames de verre silanisées, tels que les aldéhydes [73], les esters activés [119, 120], les groupements époxy [106], (*fig.1.29.a*).

Les fonctions thiols des protéines peuvent réagir avec des surfaces fonctionnalisées par des groupements chimiques comme le maléimide [105] (*fig.1.29.b*).

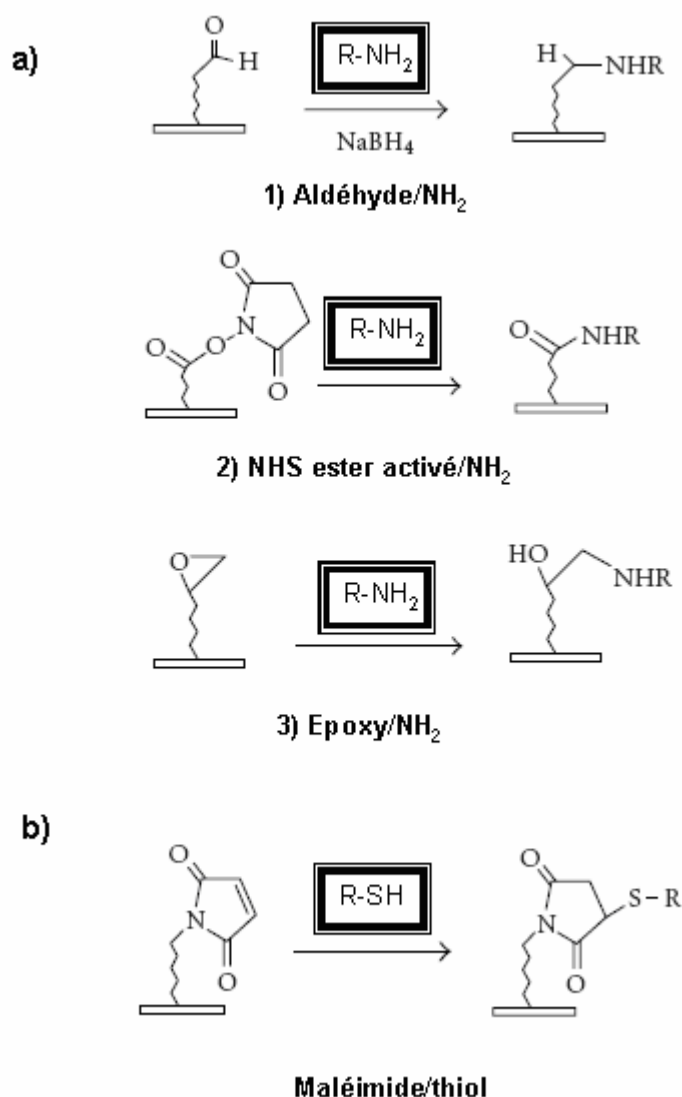


Fig.1.29. Stratégies d'immobilisation covalente de protéines sur verre selon différentes chimies de surfaces. Les protéines sont immobilisées par (a) leurs fonctions amines [73, 106, 119, 120] ou (b) thiols [105]. (R : protéine, NHS : N-hydroxysuccinimide).

L'immobilisation orientée de protéines sur un support est une stratégie plus délicate à mettre en œuvre, mais aussi plus efficace. Elle permet d'augmenter la densité surfacique de sondes présentant des sites actifs accessibles sur la biopuce. Pour faciliter l'accessibilité des molécules cibles aux sites actifs des protéines immobilisées, les groupements réactifs de la surface sont portés par des bras $(-\text{CH}_2)_n$ espaceurs bifonctionnels afin d'éloigner les protéines de la surface [121].

La stratégie d'immobilisation par affinité permet d'assurer une fixation sélective indirecte des sondes *via* des interactions biologiques spécifiques, comme celles qui s'établissent entre la biotine et la streptavidine. La streptavidine est une

protéine comportant quatre sites spécifiques disponibles pour se lier à une molécule de biotine, par une liaison de forte affinité ($K_d \sim 4 \times 10^{-4} \text{ M}$) [122]. La protéine peut être couplée à la biotine et immobilisée sur une surface fonctionnalisée avec de la streptavidine (*fig.1.30*) [108, 123]. Ce mode de fixation indirecte des sondes permet de diminuer l'adsorption non spécifique des protéines sur le support.

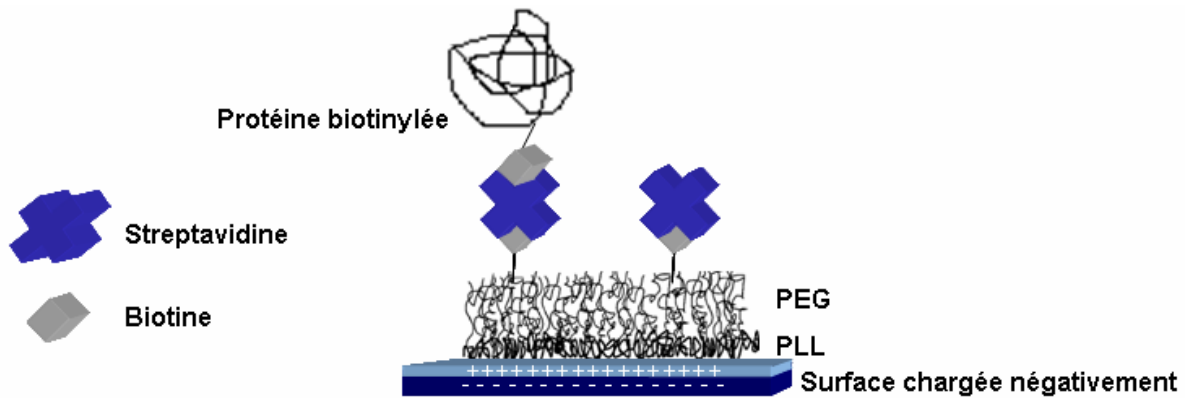


Fig.1.30. Représentation schématique de l'organisation de l'interface (PLL : poly(L-lysine), PEG : poly(éthylène glycol) [108].

Toutefois, il ne permet pas d'orienter les protéines sur la surface car la fixation de la biotine sur la protéine s'effectue de façon aléatoire au niveau des groupements amine.

D'autres techniques d'immobilisation par affinité ont été développés, comme celle utilisant des protéines recombinantes contenant une séquence poly-histidine qui permet d'immobiliser les protéines sur un support de Ni/NTA (nickel (II) / *N*-nitrilotriacétate). Ce complexe présente une forte affinité pour les noyaux imidazoles de l'histidine. De même, la production de protéines de fusion contenant une séquence GST (glutathion S-transférase), permet de les immobiliser sur des lames de verre fonctionnalisées avec le glutathion [109].

Le piégeage consiste à recouvrir la surface des lames de verre d'une couche de polymère comme le polyacrylamide, l'agarose ou la gélatine, ce qui confère au support une structure poreuse. Les protéines peuvent être mélangées avec le polyacrylamide puis déposées à la surface du support, ou déposées directement sur le gel adsorbé à la surface. Le film de gel, hydraté, maintient la conformation tridimensionnelle et l'activité biologique de la protéine qui est piégée à l'intérieur de cette structure [113, 114, 116].

La figure I.31 montre les différentes stratégies d'immobilisation des protéines sur supports.

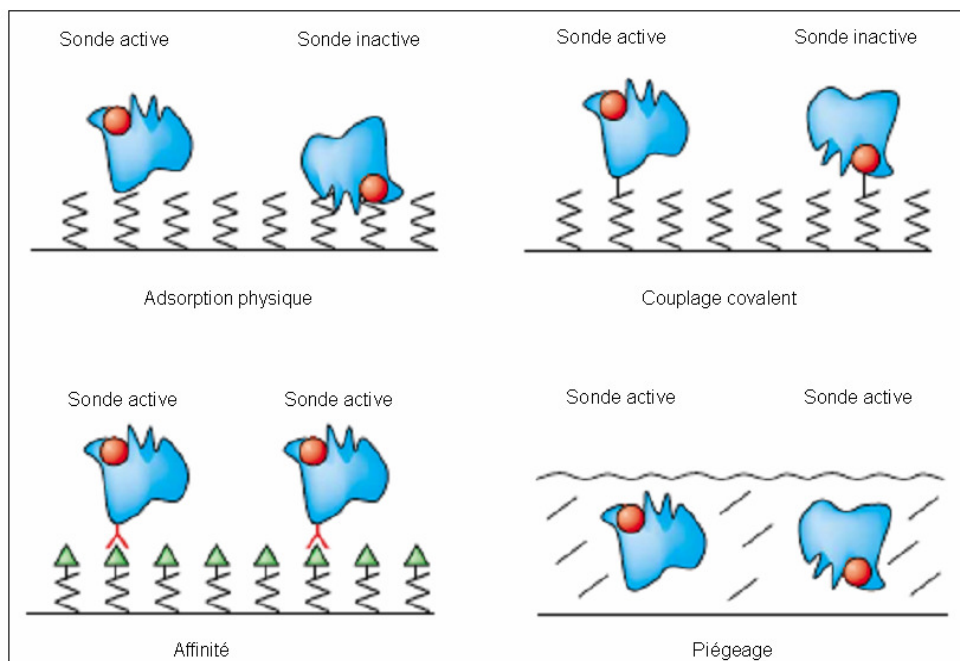


Fig.I.31. Différentes méthodes d'immobilisation des protéines. L'immobilisation non orientée des sondes à la surface peut altérer la conformation native des protéines, diminuer leur activité biologique ou les rendre inaccessibles à leurs cibles ou analytes (en rouge). Les sondes sont alors dans un état inactif [84].

Ainsi plusieurs modes de fixation des protéines sur une surface et plusieurs types de supports sont disponibles pour assurer une interaction efficace entre les sondes immobilisées et les molécules cibles présentes dans un milieu biologique. Ces différentes combinaisons contribuent à l'élaboration de puces à protéines.

IV.4.2. Les domaines d'applications des puces à protéines

Les puces à protéines trouvent leurs applications en recherche fondamentale et dans le domaine biomédical. Les sondes immobilisées peuvent interagir avec différents ligands, comme les protéines [124, 125], les peptides [126-129], les acides nucléiques [130, 131], les lipides [87] ou les cellules [132, 133].

Les puces dites fonctionnelles, permettent d'analyser les interactions protéines/ligands impliquées dans des activités enzymatiques ou hormonales, de détecter de nouvelles cibles pharmaceutiques, de déterminer les sites antigéniques des protéines ou de mettre en évidence de nouveaux partenaires à des facteurs de transcription [84-90, 125]. Par exemple, des puces à protéines histones ont été

développées pour analyser les interactions entre la chromatine et des protéines responsables de la réplication, de la transcription ou de la réparation de l'ADN. Ce type de puce a notamment permis de révéler une interaction entre les histones et une protéine de réparation de l'ADN double brin, la RAD51B. Cette interaction n'avait pu être détectée par la technique classique de Western blot [134].

Les puces dites de diagnostic, permettent de caractériser les interactions protéines/ligands impliquées dans différentes pathologies, comme les maladies auto-immunes [94-97], génétiques, les infections virales (VIH : virus de l'immunodéficience humaine) ou bactériennes [98, 99], les maladies tumorales [93], ou allergiques (détection des immunoglobulines IgE) [100, 101].

Dans le cas du diagnostic des maladies auto-immunes, des protéines nucléaires, comme les protéines histones et les ribonucléoprotéines ont été immobilisées sur des lames de verre fonctionnalisées avec des groupements aldéhydes ou recouvertes avec la poly-L-Lysine [94, 97]. Ces puces ont permis de détecter plusieurs auto-anticorps spécifiques présents dans le sérum de patients atteints de maladies auto-immunes, comme le lupus érythémateux systémique et la polyarthrite rhumatoïde.

Les puces à auto-antigènes permettent d'identifier simultanément plusieurs auto-anticorps et d'étudier leur spécificité et leurs réactions croisées avec d'autres protéines. Ces puces permettent : i) d'effectuer le criblage d'épitopes avec le sérum de patients, ii) d'identifier de nouveaux auto-anticorps cibles, iv) d'effectuer le diagnostic précoce des maladies auto-immunes, v) et de développer de nouvelles thérapies contre ces maladies (ex : vaccins).

Des auto-anticorps peuvent aussi être détectés dans le sérum de patients atteints de maladies tumorales (ex : cancer du poumon, de sein, de la prostate...). Ces anticorps sont dirigés contre des antigènes dits TAAs (tumor-associated antigens) [135]. La conception et la fabrication de puces à antigènes, de haute sensibilité et spécificité peut donc amener au développement d'outils très puissants pour le diagnostic précoce du cancer et la mise au point de nouvelles thérapies anti-cancéreuses [136].

La technologie des puces à protéines utilisant des auto-antigènes comme sondes, est encore en phase de développement. Cependant, ces biopuces sont des outils très prometteurs dans le domaine de la recherche en immunologie.

IV.5. Les puces à peptides

Les activités biochimiques et enzymatiques des protéines, au niveau du métabolisme cellulaire et de la transduction du signal, sont gouvernées par des séquences peptidiques particulières de leur structure primaire. Le développement de puces à peptides a donc tout son intérêt pour identifier des motifs biologiques actifs et étudier différentes activités cellulaires, au sein d'une même expérience. De plus, compte tenu de la simplicité de leur structure, l'immobilisation orientée des peptides à la surface de la puce est réalisable plus facilement que pour les protéines. Elle permet d'assurer leur accessibilité et leur interaction avec les cibles [137, 138].

Les propriétés du support constituent un point critique pour la performance des puces à peptides. Les supports doivent être inertes vis-à-vis de l'adsorption non spécifique des protéines, et assurer une immobilisation orientée pour favoriser ainsi les interactions spécifiques entre les sondes peptidiques et leurs cibles. Les supports solides utilisés pour la fabrication des puces à peptides sont le plus souvent, les lames de verre fonctionnalisées chimiquement ou des substrats en or.

IV.5.1. Stratégies d'élaboration des puces à peptides

La fabrication des puces à peptides peut être effectuée par deux méthodes différentes, selon le mode d'assemblage des sondes peptidiques à la surface. Ces puces peuvent être conçues, soit par immobilisation de peptides présynthétisés chimiquement ou de peptides recombinants, soit par synthèse *in situ* de peptides directement sur le support.

IV.5.1.1. Immobilisation de peptides présynthétisés

Cette méthode consiste à immobiliser, par couplage covalent ou par des liaisons de forte affinité, des peptides présynthétisés chimiquement en phase solide ou des peptides recombinants, sur un support.

L'immobilisation covalente des peptides sur des supports fonctionnalisés chimiquement peut s'effectuer par : 1) la fonction amine terminale ou la fonction amine de la chaîne latérale des résidus lysine, 2) la fonction acide carboxylique terminale, ou 3) par l'intermédiaire de résidus cystéines.

L'immobilisation des peptides par les fonctions amines s'effectue sur des lames de verre silanées, portant des groupements chimiques comme les aldéhydes [73], les esters activés [110, 119, 120], les groupements époxy [106] (*fig.1.32.a*).

L'immobilisation des peptides par leur groupement C-terminal s'effectue après activation de la fonction acide carboxylique par les carbodiimides et la N-hydroxysuccinimide (NHS) [4] (*fig.1.32.b*).

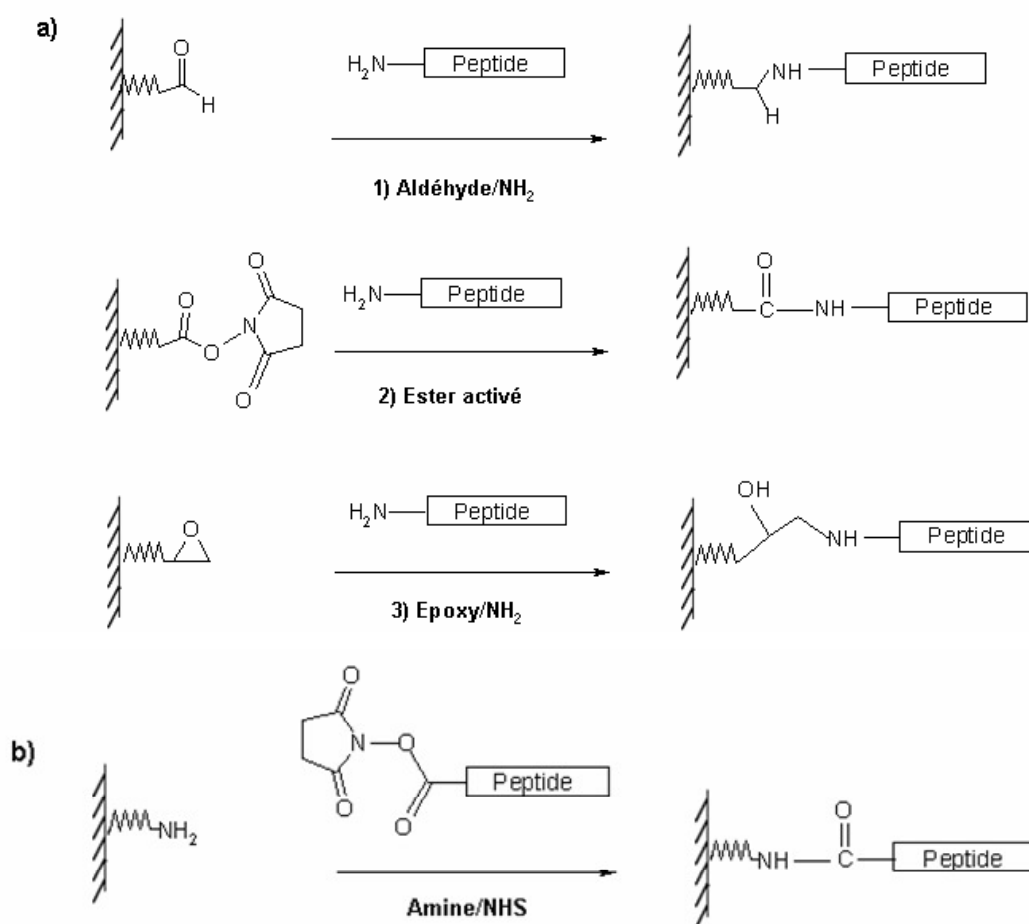


Fig.1.32. Stratégies d'immobilisation covalente de peptides sur supports fonctionnalisés selon différentes chimies de surfaces. Les peptides sont immobilisés par leurs fonctions amines (a) [73, 106, 110, 119, 120] ou acide activé avec et des carbodiimides et du NHS (b) [4, 105, 139] (NHS : N-hydroxysuccinimide).

La modification des peptides par l'addition d'un résidu cystéine au niveau N-terminal, a largement été utilisée pour les immobiliser selon une approche dite de liaison covalente chimiosélective. Ainsi, le résidu cystéine peut réagir avec un groupement maléimide [140-142], une fonction thioester [140], ou un groupement acide glyoxylique [143, 144] (*fig.1.33.a*). Une autre stratégie d'immobilisation covalente chimiosélective consiste à modifier les peptides synthétisés par des groupements réactifs capables de se lier aux groupements fonctionnels portés par la surface. Par

exemple, la substitution du cyclopentadiène sur un peptide permet son immobilisation sur une surface fonctionnalisée avec la benzoquinone. La formation de cette liaison covalente sélective est basée sur la réaction Diels-Alder entre le diène et la quinone (*fig.1.33.b*) [112].

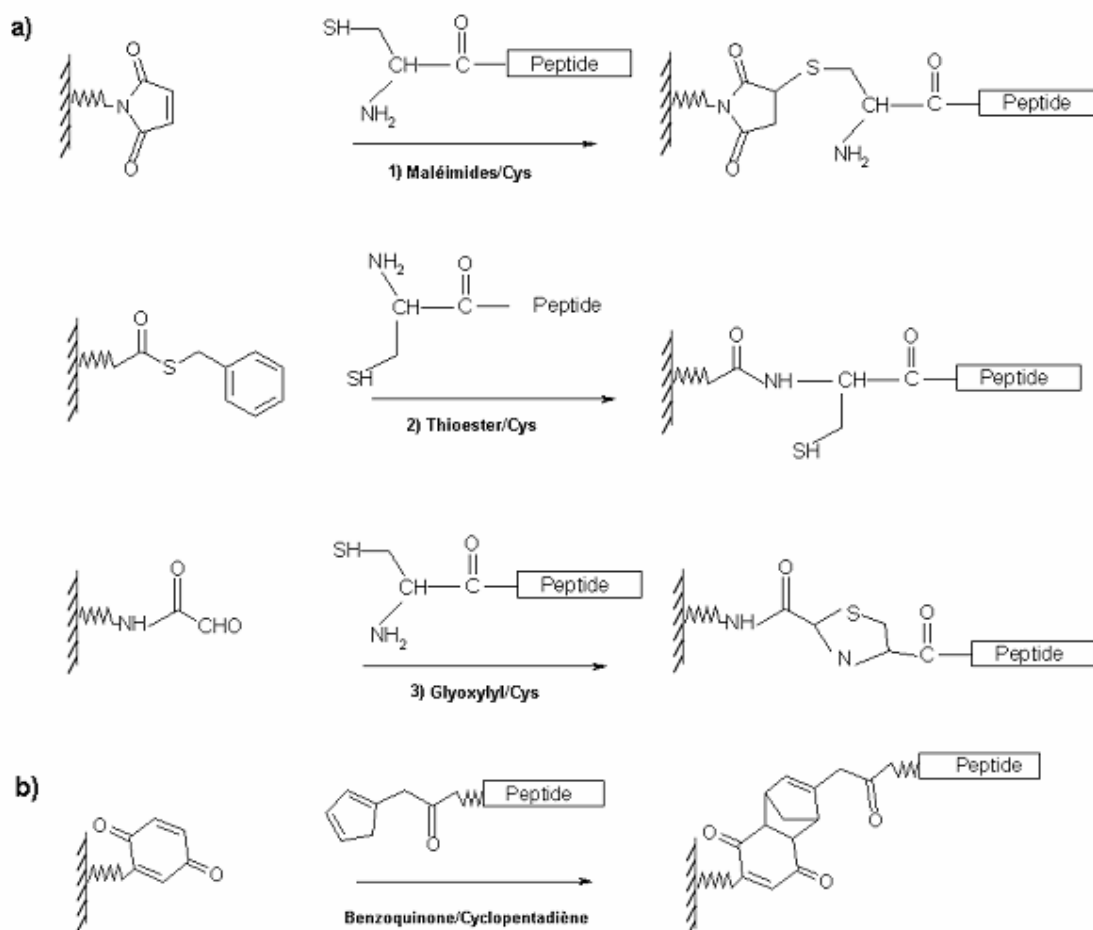


Fig.1.33. Différentes stratégies d'immobilisation covalente chimiosélective de peptides sur supports fonctionnalisés. a) Les peptides sont immobilisés par des résidus cystéines [140-144]; b) Le peptide est lié à un groupement cyclopentadiène. Une réaction Diels-Alder est effectuée entre le diène et un groupement benzoquinone porté par la surface [112].

Les peptides immobilisés sur support étant des séquences courtes de faible masse moléculaire (< 10 000 g/mol), des bras espaceurs (ex : polyéthylène glycol ou PEG) sont insérés entre le support et les sondes immobilisées afin d'assurer une meilleure accessibilité aux molécules cibles en solution [143].

IV.5.1.2. Synthèse par photolithographie

Cette approche de synthèse peptidique *in situ*, à haute densité a d'abord été décrite par Fodor *et al.* [78]. Les monomères d'acides aminés utilisés sont protégés

au niveau de l'extrémité N-ter par un groupement photo-labile, tel que le nitrovératryloxy-carbonyl (NVOC) ou l' α -méthyl-2-nitropipéronyloxy-carbonyl (MeNPOC) (fig.1.34.a). Le principe général de cette méthode consiste en plusieurs étapes : les monomères d'acides aminés protégés en N-ter sont immobilisés sur un support en verre fonctionnalisé chimiquement (ex : surface aminée). Les groupements photo-labiles sont clivés par irradiations UV ($\sim 365\text{nm}$), dirigées vers des sites spécifiques de la surface. Ces sites sont sélectionnés grâce à un photo-masque appliqué sur le support. Un nouveau cycle de synthèse se poursuit par couplage d'un deuxième monomère d'acide aminé, protégé du côté N-ter, qui vient se fixer au niveau des groupements N-terminaux déprotégés. Chaque cycle de synthèse consiste alors en deux étapes principales : 1) la photo-déprotection sélective des groupements en N-ter, et 2) le couplage sur un d'un nouveau monomère protégé sur le côté N-ter de la séquence en cours de synthèse (fig.1.34.b).

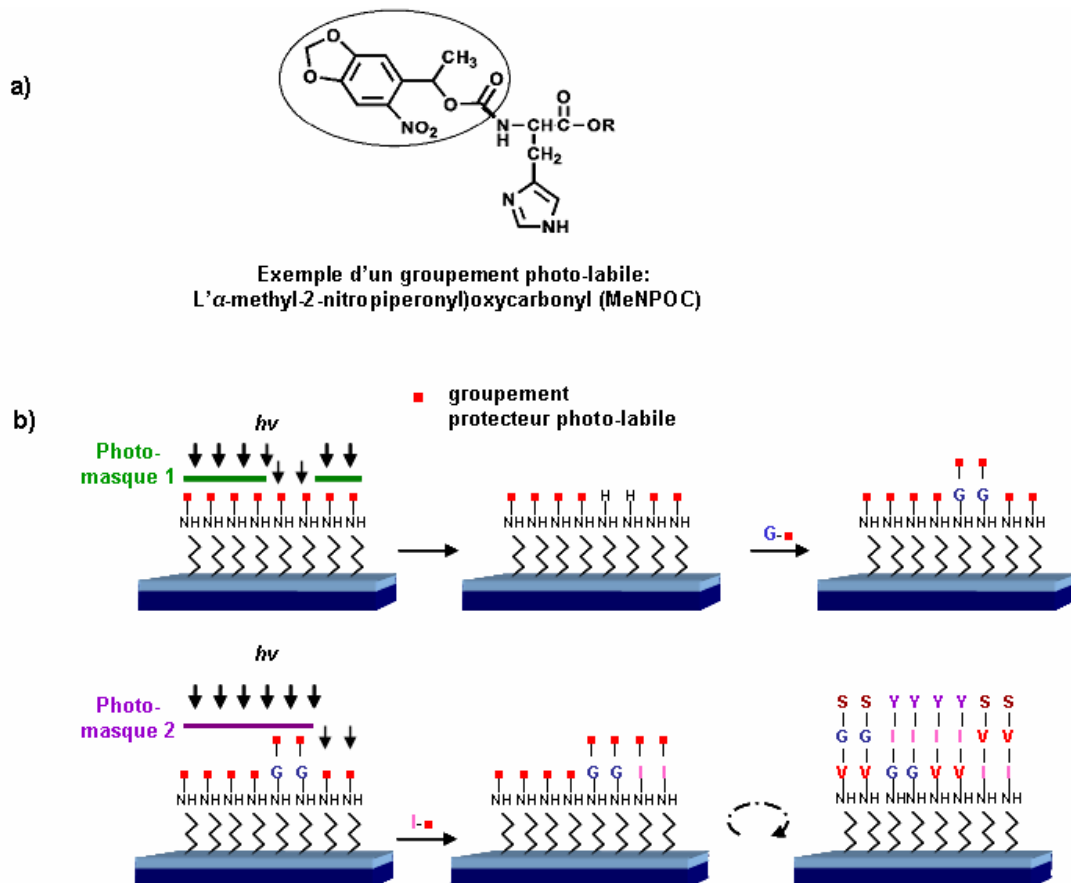


Fig.1.34. a) Exemple de groupement photo-labile ; b) Principe de la synthèse peptidique *in situ* par photolithographie sur support de verre fonctionnalisé, en utilisant des groupements photo-labiles pour la protection des groupements amines en N-ter [78].

Cette méthode de synthèse peptidique en parallèle et à haute densité, permet donc de contrôler les différents sites réactifs sur la puce. Des milliers de séquences peptidiques différentes peuvent ainsi être synthétisées pour des applications biologiques très variées. Notamment, une puce de 1024 pentapeptides synthétisés selon cette méthode a permis d'étudier leur reconnaissance spécifique vis-à-vis d'anticorps monoclonaux [78].

Cependant, cette approche présente certaines limitations comme la nécessité de production d'un grand nombre de photo-masques rendant ce processus long. De plus, cela implique d'utiliser des monomères d'acides aminés liés à des groupements photo-labiles. Cette méthode est alors chère et difficile à mettre en œuvre [145].

De ce fait, une nouvelle stratégie de synthèse peptidique par photolithographie a été développée. Les principales modifications apportées sont les suivantes : 1) l'utilisation d'acides aminés liés à des groupements protecteurs acido-labiles conventionnels (*t*-Boc), 2) l'utilisation de précurseurs d'acide photo-généré (PGA-P : photo-generated acid –precursor) (*fig.1.36.a*), 3) l'irradiation lumineuse des sites réactifs grâce à des micro-miroirs numériques, 4) la fabrication de microréacteurs sur une puce microfluidique pour isoler les différents spots et éviter la diffusion du PGA sur des sites indésirables de la surface [146, 147].

Les différentes étapes de synthèse peptidique effectuée sur ces puces sont : 1) la fonctionnalisation de la surface avec un espaceur d'aminopropyltriéthoxysilane protégé ; 2) le remplissage des microréacteurs par la solution de précurseur d'acide photo-généré (PGA-P) dans du dichlorométhane (DCM) (*fig.1.35.a*) ; 3) l'irradiation UV (405nm), dirigée sur les chambres de microréacteurs désirées ce qui permet de générer l'acide qui va permettre de déprotéger le groupement espaceur (7 min). L'acide photo-généré remplace ici l'acide trifluoroacétique (TFA) utilisé en synthèse classique ; 4) la neutralisation de l'acide généré ; et 5) le couplage du premier monomère d'acide aminé (10 min). Les cycles successifs de synthèse (~20 min/cycle) sont ensuite poursuivis selon la méthode conventionnelle de synthèse peptidique, y compris l'étape de « capping » (2 min) des groupements amines déprotégés qui n'ont pas réagis et l'étape de déprotection au TFA des chaînes latérales des peptides synthétisés (*fig.1.35.b*).

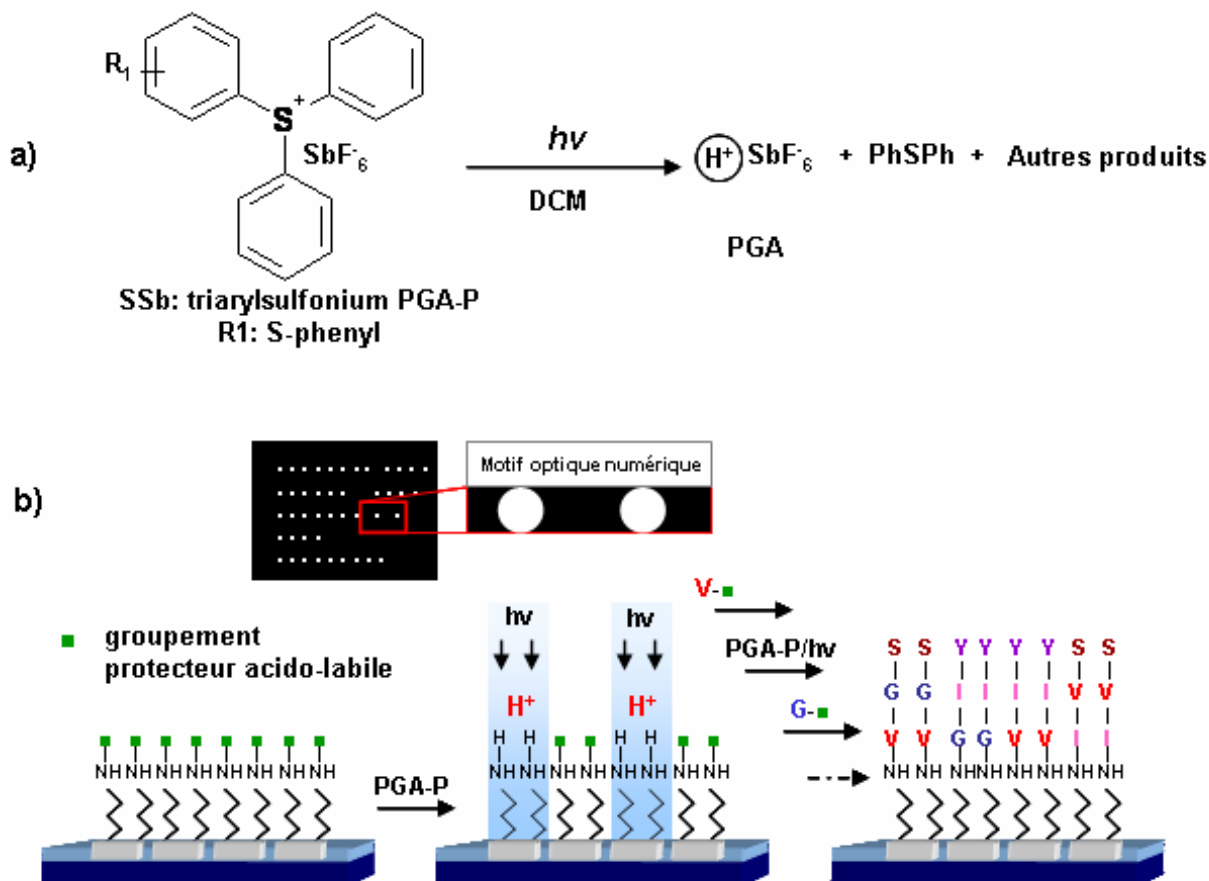


Fig.1.35. a) Acide photo-généré en solution à partir du précurseur SSb (sel de triarylsulfonium hexafluoroantimonate) après irradiation lumineuse ; (DCM : dichlorométhane) ; b) Principe de la synthèse peptidique *in situ* sur puce microfluidique, par photolithographie digitale, en utilisant des acides photo-générés pour la déprotection des groupements amines en N-t [146, 147].

Cette technologie a ainsi été appliquée à la découverte de nouvelles interactions entre différentes séquences de peptides p53, suppresseur de tumeur, et les anticorps spécifiques (PAb240). Les puces à peptides permettent donc de mieux comprendre la spécificité et la sélectivité des paratopes au niveau des anticorps. Par ailleurs, ce type de biopuce a permis d'étudier les interactions entre différents térapeptides des ions métalliques [Pb(II)] pour détecter leur présence dans l'eau potable. D'autres essais réalisés sur ces puces ont également permis de détecter la présence de métaux lourds en solution [145, 146].

Ces deux approches photolithographiques sont très prometteuses pour la synthèse *in situ* de bibliothèques peptides et elles sont encore en phase de développement. Cependant, l'accessibilité aux sources lumineuses et aux outils optiques nécessaires présente toujours certaines limitations. Le tableau I.2 présente les caractéristiques principales de la méthode de synthèse peptidique *in situ* par photolithographie.

 Synthèse peptidique *in situ* par photolithographie

Support	Supports de verre silanisés
Dimensions du support	1,4 x 1,7 cm
Taille des spots	60 – 800 μm
Densité des spots	144 – 30000 microréacteurs/cm ²
Longueur de la chaîne peptidique synthétisée	~ 10 mers
Limitations	Coûts élevés et accessibilité limitée aux outils utilisés (ex : matériel optique)

Tableau I.3. Caractéristiques principales de la synthèse *in situ* par photolithographie.

Les systèmes de détection des interactions entre les sondes et leurs cibles sur les biopuces sont basés sur deux approches : la détection avec ou sans marquage.

IV.6. Techniques de détection

Les méthodes de détection et d'analyse des interactions entre les biomolécules sur puces doivent avoir certaines caractéristiques, comme une bonne résolution, une haute sensibilité, et une bonne reproductibilité dans les mesures effectuées. Ces méthodes peuvent être classées en deux groupes : i) les méthodes avec marquage, comme la fluorescence, la chimiluminescence, la radioactivité, et ii) les méthodes sans marquage, comme la spectrométrie de masse, la résonance de plasmons de surface (SPR). La technique utilisée au cours de notre travail est la détection de fluorescence.

IV.6.1. Techniques de détection avec marquage

La méthode de détection de fluorescence est couramment utilisée sur puces car elle est simple à mettre en oeuvre, sensible, et permet d'effectuer des analyses à haute résolution [84]. Son principe est basé sur le marquage par un fluorophore soit directement des biomolécules cibles, soit de biomolécules permettant de détecter indirectement l'interaction sonde-cible. Dans ce dernier cas, il s'agit le plus souvent d'un anticorps secondaire marqué et dirigé contre l'anticorps primaire correspondant à la cible recherchée. La détection peut aussi s'effectuer

selon la méthode sandwich, un anticorps primaire est immobilisé sur la surface et incubé avec la molécule d'intérêt qui est révélée après son interaction avec un anticorps secondaire marqué.

Les fluorophores sont des molécules qui absorbent l'énergie des photons issus d'une source de lumière (ex : laser), dans une gamme de longueur d'onde donnée ($\lambda_{\text{excitation}}$). Ce phénomène provoque l'excitation des électrons des molécules et la restitution de l'énergie sous forme d'une lumière fluorescente, à une longueur d'onde différente ($\lambda_{\text{émission}}$).

Certains facteurs peuvent influencer sur la fluorescence, comme le phénomène de « quenching » dû à l'interaction du fluorophore avec d'autres molécules fluorescentes présentes dans le milieu, et le phénomène de « photoblanchiment » ou photodécomposition dû à la destruction des molécules fluorescentes sous l'effet d'une forte intensité lumineuse. La vitesse du photoblanchiment varie en fonction de plusieurs paramètres, comme la température, le pH de la solution, la puissance de la source d'excitation...

Plusieurs fluorophores sont actuellement utilisés pour le marquage et la détection des biomolécules sur puces, comme les cyanines (Cy3 et Cy5), la rhodamine, la fluoresceine. Le fluorophore Cy3 a été utilisé au cours de nos applications. Ses longueurs d'onde maximales d'absorption et d'émission sont situées respectivement à 548 nm et 562 nm (*fig.1.36*).

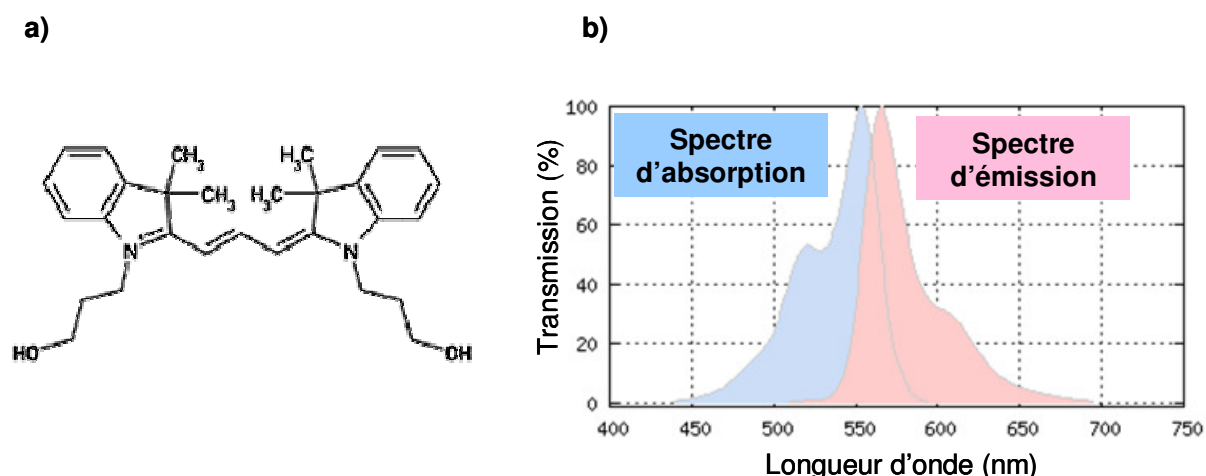


Fig.1.36. Structure chimique (a) et spectres d'absorption et d'émission (b) de la cyanine 3.

Le Cy3 est une molécule fluorescente peu sensible aux processus de photoblanchiment et aux variations du pH [148, 149].

Le système de mesure de la fluorescence, tel que celui du scanner utilisé au cours de ce travail de thèse, comprend un laser couplé à un photomultiplicateur (PMT) connecté à un ordinateur permettant de récupérer et formater les signaux de fluorescence en image (fig.1.37).

Le faisceau issu du laser vient éclairer la puce à travers :

- i) un filtre d'excitation, permettant de sélectionner la bonne longueur d'onde d'excitation du marqueur,
- ii) un miroir dichroïque réfléchissant le faisceau sur la surface de la puce,
- iii) un système optique permettant de faire converger le faisceau.

Ainsi, lorsque le faisceau rencontre une cible marquée, celle-ci va émettre de la fluorescence. Cette fluorescence va être filtrée, d'abord, par l'intermédiaire du miroir dichroïque, puis à travers le filtre d'émission, centré sur la longueur d'onde d'émission du fluorophore [150].

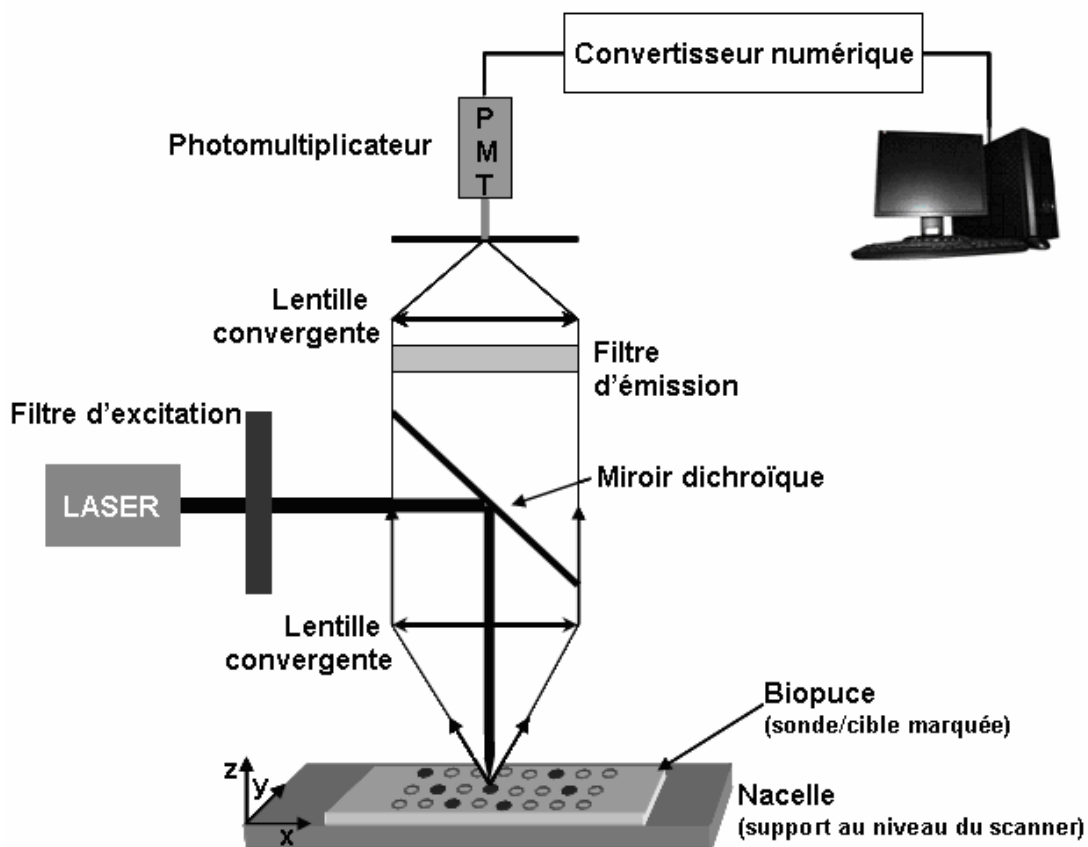


Fig.1.37. Représentation schématique du scanner [150].

La technique de détection de fluorescence est simple à mettre en oeuvre, et les puces sont facilement analysées sur le scanner. Cependant, elle comporte certaines limitations qui peuvent être liées : i) aux fluorophores (phénomènes de quenching et

de photoblanchiment, et ii) à la nécessité de marquer les molécules cibles, ce qui risque de modifier leurs propriétés et leurs interactions avec les molécules sondes [149, 151].

Des immunoessais ont été effectués selon la méthode sandwich pour la détection de facteurs rhumatoïdes dans le sérum humain, la limite de détection atteinte était de 900 amol/spot [152].

La détection par chimiluminescence sur puces est issue des techniques de détection utilisées en ELISA et Western blot. Dans le cas de la détection des interactions antigène/anticorps primaire, un anticorps secondaire lié à une enzyme comme la peroxydase du raifort (HRP) ou la phosphatase alcaline est utilisé. Une réaction chimique catalysée par l'enzyme en présence de son substrat, produit une lumière détectée par une caméra CCD (Charge-coupled device) [153].

La radioactivité a été utilisée pour le marquage des biomolécules par des isotopes tels que le ^{32}P , le ^3H , ou le ^{125}I . La détection du signal est effectuée par autoradiographie et quantifiée par un densitomètre [143, 154, 155]. L'avantage de cette technique est la quantification directe des biomolécules immobilisées sur la surface des puces. Cependant, les limitations de cette méthode sont liées surtout à des problèmes de sécurité (risque de contamination par les isotopes radioactifs) et le temps de détection (> 10 h) [151]

IV.6.2. Techniques de détection sans marquage

La spectrométrie de masse SELDI-TOF (Surface Enhancement Laser Desorption/Ionization-Time of Flight) est une technique de caractérisation qui peut être appliquée à l'analyse des biomolécules immobilisées sur puces. Ces molécules d'intérêt sont ionisées, et les ions sont libérés de la surface vers un détecteur où ils seront caractérisés selon leur rapport masse/charge (m/z) [151, 156].

La technique SPR ou résonance de plasmons de surface permet d'étudier en temps réel, les cinétiques d'interaction entre les biomolécules [157, 158]. C'est la méthode la plus utilisée pour la détection des interactions moléculaires sans marquage (ex : interaction antigène/anticorps, protéine/ADN...) [158]. Les supports sont composés d'une couche mince de métal, le plus souvent l'or ou l'argent. Le

principe est le suivant : lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique atteint une interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents, une partie de la lumière incidente est réfléchiée et l'autre partie est réfractée à travers la surface. Quand la lumière passe d'un milieu d'indice de réfraction élevé vers un milieu d'indice plus bas, la réflexion peut être totale, et un composant de la lumière, l'onde évanescente se propage perpendiculairement à la surface. Si une fine couche de métal, riche en électrons libres, généralement de l'or ou de l'argent, est déposée à l'interface, ces électrons entre en résonance avec les photons de cette onde évanescente, ce phénomène est appelé résonance plasmonique de surface. Cette résonance se traduit au niveau du faisceau réfléchi par une chute de l'intensité à un angle de réflexion minimum. Cet angle est l'angle de résonance. Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent [159, 160] (*fig.1.37*). Ainsi, lorsqu'une interaction se produit entre des biomolécules sondes immobilisées sur le support et des cibles, il y a une perturbation locale de l'indice du milieu diélectrique donc un changement de l'angle de réflexion du faisceau incident. La méthode de mesure consiste à suivre, pour un angle d'incidence et une longueur d'onde fixés, les variations de la réflectivité dues au déplacement du pic d'absorption de la SPR.

La résonance de plasmons de surface est une technique permettant l'étude des interactions entre protéines dans une gamme étendue de masses moléculaires [161], allant jusqu'aux cellules entières [162].

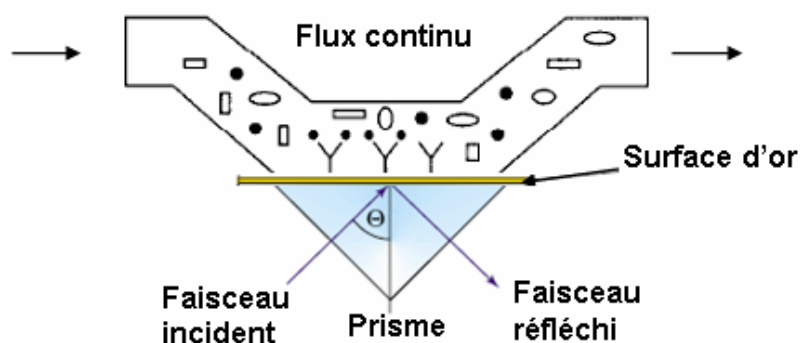


Fig.1.37. Phénomène de réflexion interne totale du faisceau incident à l'interface prisme-métal-solution pour l'observation de la résonance des plasmons de surface [160].

CHAPITRE II
MATERIELS
ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

I. Introduction

Ce chapitre est divisé en trois sections :

1) la première section présente les matériels utilisés au cours des différentes expériences,

2) la deuxième décrit les protocoles expérimentaux, elle est composée de deux parties :

i) la première partie concerne les protocoles effectués pour le développement de puces à peptides (synthèse peptidique sur résine, technique ELISA, immobilisation de peptides par voie *ex situ* sur lames de verre aminées, immunoessais sur lames et synthèse peptidique *in situ* sur supports Si/SiO₂ aminés),

ii) la deuxième partie décrit les protocoles utilisés pour le développement de puces à protéines (mise au point d'immunoessais sur du sérum commercial : technique ELISA et tests immunologiques sur lames de verre NHS esters et lames AMMVE; détection d'anticorps anti-histones dans le sérum humain par les techniques Western blot, ELISA et par immunoessais sur lames AMMVE),

3) la troisième section de ce chapitre concerne les méthodes d'analyse de fluorescence et de calculs statistiques effectués, et définit les termes utilisés pour les performances analytiques des tests réalisés.

II. Matériels

II.I. Réactifs biochimiques et produits chimiques

Les acides aminés utilisés pour la synthèse peptidique sont protégés au niveau de leur fonction α -amine par un groupement Fmoc. Ils sont sous formes d'esters de pentafluorophényle (OPfp), activés au niveau leur fonction α -carboxyle. Certains acides aminés sont protégés au niveau des fonctions de leurs chaînes latérales. Le tableau suivant présente les masses moléculaires des différents acides aminés protégés et activés. Leur structure chimique est présentée dans la figure II.1.

Acide aminé protégé et activé	Masse moléculaire (g/mol)
1) Fmoc-Ala-OPfp	477,4
2) Fmoc-Arg(Pmc)-OH*	662,8
3) Fmoc-Gln(Trt)-OPfp	776,8
4) Fmoc-Glu(OtBu)-OPfp	591,6
5) Fmoc-Gly-OPfp	463,4
6) Fmoc-Ile-OPfp	519,5
7) Fmoc-Leu-OPfp	519,5

Tableau II.1. Liste des acides aminés utilisés au cours de la synthèse peptidique sur supports solides. (Trt : trityl-; Pmc: pentaméthylchroman-, OtBu: O-tertiobutyl-). * L'arginine utilisée a été activée selon un protocole qui sera décrit ultérieurement.

Les acides aminés ont été fournis par Bachem[®]. La biotiny-*N*-hydroxysuccinimide (biotine-OSu ; MM 341,4 g/mol) (*fig.II.1*), et le *N*-Hydroxybenzotriazole (HOBt ; MM 153,1 g/mol ; pureté : $\geq 98\%$) ont été fournis par Novabiochem[®] de la société VWR.

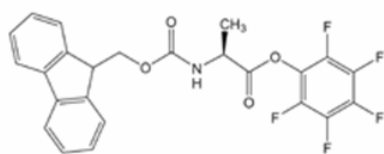
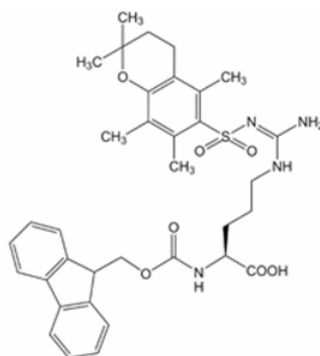
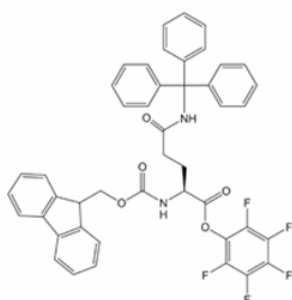
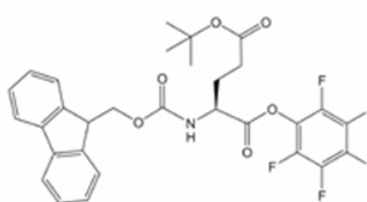
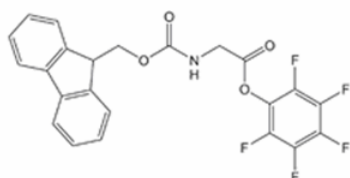
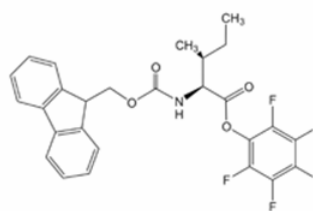
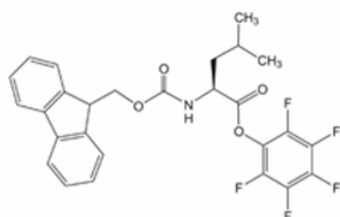
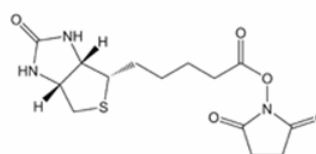
1) *N*-α-Fmoc-Ala-pentafluorophenyl ester2) *N*-α-Fmoc-N²-2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl-Arg3) *N*-α-Fmoc-γ-trityl-Gln-pentafluorophenyl ester4) *N*-α-Fmoc-Glu-γ-*t*-butyl ester-pentafluorophenyl ester5) *N*-α-Fmoc-Gly-pentafluorophenyl ester6) *N*-α-Fmoc-Ile-pentafluorophenyl ester7) *N*-α-Fmoc-Leu-pentafluorophenyl ester8) Biotinyl-*N*-hydroxysuccinimide

Fig.II.1. Structure chimique des acides aminés et de la biotine-OSu utilisés au cours de la synthèse peptidique sur résine.

Les réactifs suivant : *N*-éthyl-*N'*-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide chlorhydrate (EDC ; MM 191,7 g/mol), *N*, *N'*-Diisopropylcarbodiimide (DIC ; MM 126,2 g/mol ; d : 0,815 à 20°C ; pureté : ≥ 98%), *N*-Hydroxysuccinimide (NHS ; MM 115,09 g/mol;

pureté $\geq 97\%$), ainsi que le triisopropylsilane (TIS ; pureté $\geq 98\%$), l'anhydride acétique (pureté $\geq 98\%$), le bicarbonate de sodium (NaHCO_3 ; MM 84,01 g/mol) et le carbonate de sodium (Na_2CO_3 ; MM 105,99 g/mol) ont été fournis par Fluka (société Sigma-Aldrich).

La pipéridine (pureté $\geq 98\%$) et l'acide trifluoroacétique (TFA) (pureté $\geq 99,5\%$) proviennent de la société Roth-Sochiel[®].

Le dichlorométhane anhydre (CH_2Cl_2 , DCM ; pureté $\geq 99,8\%$) a été commandé chez SdS[®].

Le méthanol, le diéthyl éther (pureté $\geq 99,9\%$), le diméthylformamide (DMF ; pureté $\geq 99,8\%$), le diméthylsulfoxyde (DMSO ; pureté $\geq 99,8\%$) et la *N*-Méthyl-2-pyrrolidone (NMP ; pureté $\geq 99,5\%$) anhydres, ainsi que le sodium dodécyl sulfate (SDS ; MM 288,38 g/mol) et le 4-chloro-1-naphtol sous forme de tablettes de 30 mg ont été fournis par la société Sigma-Aldrich.

Le copolymère alterné d'anhydride maléique et de méthyl vinyl éther P(AMMVE) (MM 67000 g/mol) provient de la société Polysciences, Inc.

L'eau ultrapure (18,2 M Ω) est préparée au laboratoire par un système Elga : Elgstat Option 4 (réf. 04AM146558), et PURELAB Ultra (réf. UAC213867).

L'*ortho*-phénylènediamine (OPD) a été fourni sous forme de tablettes de 2 mg par DakoCytomation Denmark A/S.

La solution d'eau oxygénée H_2O_2 30 volumes a été fournie par la société Gilbert.

La solution d'acide sulfurique H_2SO_4 (0,5 M) a été préparée à l'Etablissement Français du Sang (EFS) et stockée à 4 °C.

La solution à 40% d'acrylamide/Bis-acrylamide (37,5 :1) a été fournie par la société Bio-Rad.

II.2. Solutions tampons et autres solutions

Le tampon phosphate de sodium ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$) à 0,01M (NaCl 0,138 M; KCl – 0,0027 M) pH 7,4, à 25 °C, a été fourni par Sigma-Aldrich. Ce tampon est désigné dans la suite du mémoire sous le nom PBS.

Le tampon PBS 0,01M -Tween 20 à 0,05% a été fourni sous forme de tablettes par Calbiochem[®] de la société VWR.

La solution de lavage PBS-Tween 20 à 0,05% (PBS-T) est préparée selon les instructions du fournisseur en dissolvant une tablette de PBS-Tween dans 1 L d'eau ultrapure.

Les solutions tampons carbonate de sodium ($\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$) à 0,05 M, pH 9,6 à 25 °C et 0,02 M, pH 10,7 à 25°C ont été préparées au laboratoire et stockées à 4°C.

La solution de saturation BSA à 2%/ PBS est préparée par dissolution de 2g de BSA dans 100 mL de PBS 0,01 M, pH 7,4.

II.3. Solutions biologiques et biomolécules

La solution de streptavidine couplée à la peroxydase du raifort (SAv-HRP) à 1mg/mL, a été fournie par Sigma-Aldrich, et la solution de streptavidine couplée à la cyanine-3 (SAv-Cy3) à 1mg/mL par Fluka. Ces deux solutions de streptavidine ont été aliquotées en tubes Eppendorf (10 μ L/tube) et conservées à -20°C.

La solution d'anticorps polyclonal de lapin anti-histone H3 (fraction IgG d'antisérum dans une solution de PBS à 0.01 M, pH 7,4, contenant 0,015 M d'azide de sodium), les protéines histones de thymus de veau H1 (type III-S), H3 (type VIII-S), ainsi que les différentes classes d'histones non fractionnées (type II-A), et l'albumine de sérum bovin (BSA ; MM ~ 66 kDa ; pureté \geq 98%) ont été fournies en poudre lyophilisée par Sigma-Aldrich et conservées à 4°C.

Les anticorps polyclonaux de chèvre anti-IgG [H & L] de lapin et anti-IgG [H & L] humain couplés à la Cy3 (anticorps primaires), ainsi que les anticorps polyclonaux de chèvre anti-IgG [H & L] de lapin et anti-IgG [H & L] humain couplés à la HRP (anticorps secondaires) ont été fournis sous forme de poudre lyophilisée, par les laboratoires Jackson ImmunoResearch, Inc, société Interchim[®]. Ils ont été solubilisés dans 2 mL d'eau ultrapure. Les solutions d'anticorps liés au Cy3 (1 mg/mL) et les solutions d'anticorps liés à la HRP (0,8 mg/mL) ont été aliquotées (10 μ L/tube) et conservées à -20°C.

Pour une même série d'expériences, les tests ont été effectués en utilisant le même lot de solution de streptavidine ou d'anticorps polyclonaux.

II.4. Sérums humains

Huit sérums contenant en anticorps anti-histones (AAH), prélevés chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique (sept sujets de sexe féminin et un de sexe masculin) ont été fournis par le Service d'Immunologie du Centre Hospitalier, Lyon-Sud - Unité Fonctionnelle d'Auto-Immunité (Dr Nicole Fabien) - Hospices Civils de Lyon. L'âge moyen des patients est de 35 ans 6 mois.

Six sérums prélevés chez des sujets sains ont servis de témoins négatifs.

Les sérums ont été conservés à - 40°C au laboratoire d'Immunologie de l'Etablissement Français du Sang.

II.5. Supports solides

Les supports solides utilisés au cours de ce travail sont les résines en polystyrène, les microplaques à puits en polystyrène, les lames de verre, les substrats de dioxyde de silicium et les membranes de nitrocellulose.

Les résines utilisées pour la synthèse peptidique sont la résine Fmoc-Gly-Sasrin[®] (0,63 mmol Fmoc-Gly / g de résine), et la résine Fmoc-Gly-Wang (4 mmol/g), (200-400 mesh), (*fig.II.3*), fournies par Bachem[®].

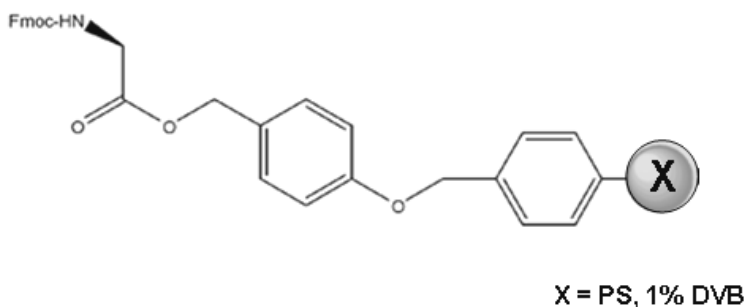


Fig.II.3. Structure chimique des résines: N- α -Fmoc-Gly ester de 4-oxyméthyl-phénoxyméthyl-polystyrène, 1% divinylbenzène ; (PS : polystyrène, DVB : divinylbenzène).

Les microplaques 96 puits MaxiSorp[™] fond plat ont été commandées chez Nunc[®], société VWR. Les lames de verre borosilicaté (76 x 26 x 1 mm) ont été fournies par Schott Nexterion[®]. Les substrats de dioxyde de silicium (22 x 22 mm, épaisseur 500-550 μ m, épaisseur de la couche de SiO₂ : 90nm \pm 10%) ont été fournis par SILTRONIX.

Les membranes de nitrocellulose (0,2 μ m) ont été fournies par la société Bio-Rad.

III. Protocole expérimental - 1^{ère} partie - Puces à peptides : Déprotection de sondes peptidiques sur supports aminés

III.1. Synthèse peptidique sur résine

La synthèse peptidique sur résine a été effectuée par M^{me} Marie-Christine Duclos sur un synthétiseur automatique (Labortec, modèle SP4000), au Laboratoire de Biochimie Analytique et Synthèse Bioorganique - LBASB (Professeur Jean Wallach) - Université Claude Bernard Lyon 1.

Le peptide 16-mers GGIQLARRIRGERAGG lié à une biotine du côté N-terminal, a été synthétisé sur résine selon la technique Fmoc. Ce peptide contient une séquence d'acides aminés correspondant aux résidus I125-A136 situés du côté C-terminal de la protéine histone H3 humaine.

La séquence peptidique protégée sur les chaînes latérales a été synthétisée sur une résine Fmoc-Gly-Sasrin[®] (256 mg ; 0,1625 mmol), alors que la séquence peptidique non protégée au niveau de ses chaînes latérales, a été synthétisée sur une résine Fmoc-Gly-Wang (100 mg ; 0,4 mmol).

Pour la synthèse de chacun des deux peptides, la résine Fmoc-Gly est rincée trois fois avec 5 mL de DMF, puis déprotégée avec 5 mL d'une solution de 20% pipéridine / DMF pendant 10 min, sous agitation à température ambiante, puis pendant 5 min après renouvellement de la solution de déprotection, La résine est ensuite rincée trois fois avec 5 mL de DMF.

Une solution de Fmoc-Gly-OPfp à 0,16 M est préparée en dissolvant 300 mg d'acide aminé (4 équivalents, par rapport au nombre de moles de Fmoc-Gly / résine) dans 4 mL de DMF en présence de 100 mg de HOBt (4 équivalents). Cette solution est incubée avec la résine pendant 90 min, à température ambiante. La résine est ensuite lavée trois fois dans 5 mL de DMF ; puis l'acide aminé couplé est déprotégé avec 5 mL de pipéridine 20%/DMF pendant 10 min, puis pendant 5 min sous agitation. La résine est ensuite lavée trois fois dans 5 mL de DMF. Le même cycle de synthèse est répété pour le couplage et la déprotection de chacun des résidus d'acides aminés du peptide synthétisé GGIQLARRIRGERAGG.

Pour le couplage des résidus arginine, une étape préliminaire d'activation a été effectuée car cet acide aminé a été commandé sous forme non activée: 1 g de Fmoc-Arg(Pmc)-OH (10 équivalents) est dissous dans 5 mL de DCM en présence de

83 μ L de DIC (5 équivalents), pendant 20 min, sous agitation à 0°C. Le DCM est ensuite évaporé dans un rotavapor à température ambiante et l'acide aminé est récupéré avec 4 mL de DMF.

Après le dernier cycle de synthèse peptidique et la dernière réaction de déprotection du groupement α -amine à la pipéridine, la biotine est couplée à l'extrémité N-terminale du peptide synthétisé. Ainsi, une solution à 0,12 M de biotine-OSu (167 mg de biotine-OSu (3 équivalents) dans 4 mL de DMF en présence de 75 mg de HOBt (3 équivalents) est laissée à réagir pendant 3 h sur la résine, sous agitation à température ambiante. Puis la résine est lavée successivement trois fois avec 5 mL de chacun des solvants suivants : DMF, méthanol, DCM, et éther. Elle est ensuite séchée sous vide.

Chacun des deux peptides est clivé de la résine après un traitement au TFA.

Le peptide synthétisé sur la résine Fmoc-Gly-Sasrin[®] est clivé après incubation dans 3 mL d'un mélange TFA/DCM (1:99 ; v/v) pendant 30 min, puis pendant deux fois 5 min, sous agitation. Le peptide clivé est appelé dans la suite du mémoire « **peptide protégé biotinylé** ».

Le peptide synthétisé sur la résine Fmoc-Gly-Wang est clivé après incubation dans 5 mL d'un mélange TFA/TIS/DCM (95 :2,5 :2,5 ; v/v) pendant 1 h puis pendant deux fois 10 min, sous agitation. Ce peptide clivé est appelé dans la suite du mémoire « **peptide déprotégé biotinylé** ».

Chacun des deux peptides est ensuite précipité avec le diéthyl éther.

Après la synthèse sur résine, les peptides sont caractérisés par spectrométrie de masse par bombardement par des atomes rapides (FAB-MS: Fast Atom Bombardment-Mass Spectrometry) et purifiés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) au LBASB. Les masses moléculaires du peptide protégé et du peptide déprotégé biotinylés sont de 3010 Da et de 1896 Da, respectivement, et leur degré de pureté est ≥ 95 % (cf. *Annexe 1*).

Les peptides sont ensuite conservés à - 20°C.

III.2. Evaluation de la reconnaissance biologique des peptides synthétisés par l'anticorps polyclonal anti-histone H3 en test ELISA

Les tests ELISA ont été effectués au laboratoire d'Immunologie de l'Etablissement Français du Sang (EFS) – Lyon, Gerland.

Les deux peptides ayant une faible masse moléculaire (peptide protégé MM 3010 Da ; peptide déprotégé MM 1896 Da), le test ELISA a été réalisé par immobilisation de l'anticorps polyclonal anti-histone H3 (IgG, MM 150 kDa) en fond de puits de la microplaque et non des peptides (*cf, chapitre III, paragraphe I.2*).

III.2.1. Solutions utilisées

Le peptide déprotégé, soluble dans le tampon PBS 0,01 M, est préparé à une concentration de 5µg/mL à partir d'une solution mère à 0,1 mg/mL.

Le peptide protégé, insoluble dans le PBS mais soluble dans divers solvants organiques (ex : DMSO, NMP, DMF), est préparé à une concentration de 5 µg/mL dans un mélange 5% DMSO/PBS à partir d'une solution à 0,2 mg/mL en DMSO.

La solution de SA_v-HRP (10^{-2} mg/mL) est préparée par dilution de la solution mère (1mg/mL).

La solution d'OPD est constituée de : 6mL d'H₂O + 2 pastilles d'OPD + 2,5 µL H₂O₂

III.2.2. Test ELISA

Deux dilutions différentes (10^{-4} et 10^{-3}) de la solution d'anticorps polyclonal anti-histone H3, sont préparées dans une solution tampon carbonate de sodium (0,05 M) à pH 9,6. 100µL de chaque dilution d'anticorps sont déposés dans les puits de la microplaque et incubées une nuit à 4°C. 100µL de tampon de dilution sont déposés dans des puits contrôles (blancs). Les dépôts sont effectués en triplicata.

La microplaque est ensuite lavée trois fois avec le PBS-T (200µL/puits), et les puits sont incubés avec la solution de saturation (200µL/puits), pendant 2 h à 37°C. Puis la microplaque est lavée trois fois avec le PBS-T, et les puits sont incubés avec 100 µL de chacune des solutions peptidiques à 5 µg/mL, pendant 1 h à 37°C. Après une étape de lavages avec le PBS-T, 100 µL de la solution de SA_v-HRP (10^{-2} mg/mL) sont déposés dans chaque puits, et incubés pendant 1 h à 37°C. La microplaque est alors lavée six fois avec le PBS-T et la solution d'OPD est ajoutée (100µL/puits) et

incubée pendant 20 min, à température ambiante, à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée par addition d'une solution d'acide sulfurique à 0,5 M (100µL/puits). L'absorbance est mesurée à 492 nm dans le lecteur de plaque Metertech Σ 960 (réf. 7713616).

III.3. Fonctionnalisation chimique des supports plans

Les lames de verre borosilicate et les substrats de dioxyde de silicium ont été fonctionnalisés au laboratoire par Dr Yann Chevolut selon un protocole publié précédemment [4, 163].

Pour une même série d'expériences, les tests sont effectués sur un même lot de supports fonctionnalisés.

Les étapes principales de cette procédure de fonctionnalisation sont décrites dans ce paragraphe.

Les supports ont été silanisés avec du *t*-butyl-11-(diméthylamino)silylundecanoate. Les groupements *t*-butyl esters ont été hydrolysés et clivés par un traitement à l'acide formique pendant une nuit, à température ambiante. L'acide carboxylique généré a été activé avec un mélange NHS/DIC (rapport molaire 1 :1) dans du tétrahydrofurane (THF), sur une nuit, à température ambiante, pour produire des fonctions NHS esters activées. Un bras espaceur portant une fonction amine a été ensuite greffé sur les surfaces activées après l'incubation d'une solution de Jeffamine[®] D-230[®] (polyoxypropylènediamine) à 0,1 M dans du THF, pendant une nuit, à température ambiante. Les supports ont été ensuite lavés dans une solution à 0,1% de dodécyl sulfate de sodium, pendant 30 min, à 70°C, puis rincés avec de l'eau ultrapure et séchés par centrifugation pendant 3 mins à 1300 tours/min.

Les surfaces aminées ainsi préparées permettent d'immobiliser par couplage covalent des peptides protégés activés au niveau de leur fonction α-carboxyle terminale.

Les surfaces de verre silanisées portant un groupement de surface ester activé sont appelées dans la suite du mémoire « **lames NHS esters** ». Les surfaces de verre et les substrats de dioxyde de silicium silanisés puis traités à la jeffamine sont appelés, respectivement, « **lames aminées** » et « **substrats aminés** » (*fig.II.4*).

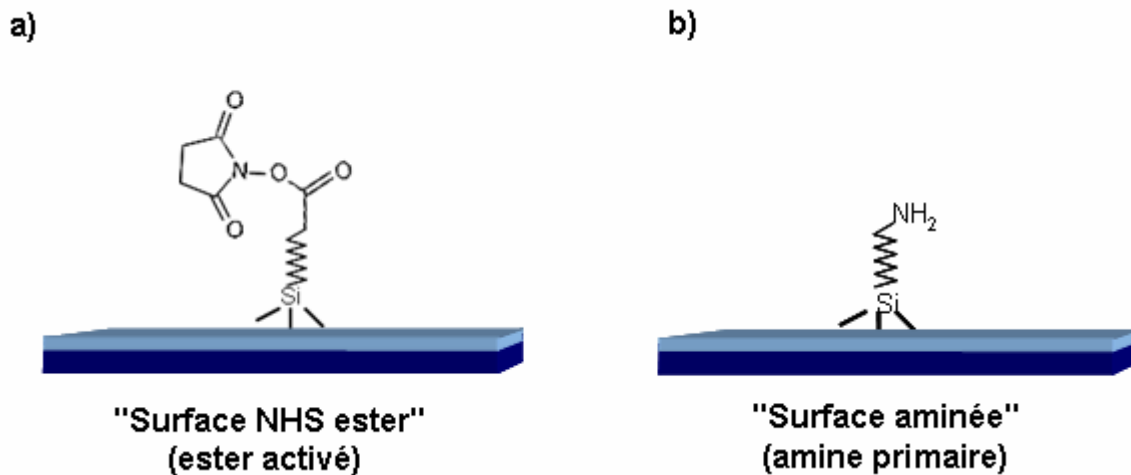


Fig.II.4. Surfaces silanisées portant un groupement ester activé (a) ou amine primaire (b).

N.B. Dans tous les protocoles développés par la suite, le dépôt des solutions (1 $\mu\text{L}/\text{plot}$) sur les lames a été effectué manuellement à la micropipette. La même micropipette a été utilisée pour tous les dépôts.

III.4. Immobilisation de peptide protégé par voie *ex situ* sur surfaces aminées

III.4.1. Influence de la concentration du peptide immobilisé sur le rendement de greffage

Des solutions de peptide protégé sont préparées à trois concentrations différentes (10^{-4} , $2 \cdot 10^{-3}$ et 10^{-2} M) par solubilisation du peptide protégé biotinylé (biotine-GGIQLARRIRGERAGG) dans la NMP. Le groupement C-terminal du peptide est activé avec un mélange NHS/EDC (peptide: NHS: EDC ; rapport molaire 1:2:2), pendant une nuit, à température ambiante.

1 μL de chaque solution de peptide activé est déposé sur les lames aminées. 1 μL de solvant (NMP) est déposé sur le support en tant que plot témoin. Chaque condition est effectuée en triplicata. Les lames sont incubées pendant 3 h sous une atmosphère humide à 21 °C. Elles sont ensuite lavées trois fois avec la NMP, puis une fois avec le PBS-T et une fois avec l'eau ultrapure, pendant 3 min, sous ultrasons. Puis elles sont séchées par centrifugation pendant 3 min à 1300 tours/min. Après cette étape d'immobilisation du peptide protégé, les lames sont incubées avec la solution de saturation (2% BSA / PBS) pendant 2 h à 37 °C. Les lames sont

ensuite lavées avec le PBS-T, puis avec l'eau ultrapure, et séchées par centrifugation.

La densité de greffage du peptide est évaluée par marquage indirect du peptide biotinylé avec la SAv-Cy3. 1 μ L de la solution de SAv-Cy3 (1 mg/mL) diluée au 1 :100 dans du PBS-T, est déposé sur les plots de peptide et de solvant. Les lames sont alors incubées sous une atmosphère humide, pendant 1h, à 37°C. Elles sont ensuite lavées avec le PBS-T, puis à l'eau ultrapure et séchées par centrifugation.

Les lames sont analysées par mesure de la fluorescence à 532 nm.

III.4.3. Evaluation de la stabilité des surfaces de verre vis-à-vis du traitement acide

Après l'immobilisation du peptide protégé et l'étape de saturation, la déprotection acide est effectuée par incubation des lames dans un mélange TFA/TIS/DCM (95:2,5:2,5; v/v), pendant différents temps de réaction (de 30 min à 3 h), à température ambiante.

Après le traitement au TFA, les lames sont rincées et lavées deux fois avec du DCM, pendant 3 min, sous ultrasons, et le solvant est évaporé.

Puis la stabilité des surfaces après le traitement de déprotection a été étudiée par évaluation de la densité de greffage du peptide immobilisé.. Chaque plot traité au TFA est incubé avec 1 μ L de la solution de SAv-Cy3 à 10^{-2} mg/mL, sous une atmosphère humide, pendant 1h, à 37°C. Les lames sont lavées avec du PBS-T, puis à l'eau ultrapure et séchées par centrifugation.

Les lames sont analysées par mesure de la fluorescence à 532 nm.

III.4.4. Test de l'activité biologique du peptide immobilisé, avant et après le traitement acide

L'activité biologique du peptide immobilisé a été testée à travers son interaction avec l'anticorps polyclonal anti-histone H3, avant et après la déprotection au TFA.

L'anticorps anti-histone H3 est diluée au 1:10⁴ dans une solution BSA 1%/ PBS-T. Avant et après le traitement au TFA, les plots sont incubés avec 1 μ L de la solution d'anticorps diluée, pendant 1 h à 37°C, sous une atmosphère humide. 1 μ L du

tampon de dilution de l'anticorps est également déposé sur des plots « peptide » et « solvant » comme témoin de l'adsorption non spécifique de l'anticorps secondaire. Les lames sont lavées avec du PBS-T, puis à l'eau ultrapure et séchées par centrifugation.

Les plots sont ensuite incubés avec 1 μL d'une solution d'anticorps secondaire lié au Cy3, à 10^{-2} mg/mL, pendant 1 h à 37°C, sous une atmosphère humide. Les lames sont lavées avec du PBS-T, puis à l'eau ultrapure et séchées.

Les lames sont analysées par mesure de la fluorescence à 532 nm.

Afin d'étudier l'influence de la concentration en anticorps primaire sur l'évaluation du rendement de déprotection du peptide, nous avons testé l'interaction du peptide immobilisé à 10^{-2} M, et déprotégé pendant 1h, avec l'anticorps primaire anti-histone H3 incubé à différentes concentrations (gamme de dilution de 10^{-6} à 10^{-3}).

Pour les expériences effectuées sur le peptide immobilisé par voie *ex situ*, les résultats présentés correspondent à la moyenne des intensités de fluorescence de 9 réplicats, obtenus à partir de trois expériences (chaque condition est effectuée en triplicata au cours d'une même expérience).

III.5. Synthèse peptidique *in situ* sur supports plans aminés

III.5.1. Synthèse peptidique selon la stratégie Fmoc

Le peptide biotinylé 16-mers GGIQLARRIRGERAGG protégé sur ses chaînes latérales a été synthétisé sur des substrats de dioxyde de silicium (22 x 22 mm) aminés (*fig.II.5. substrat A*), selon la stratégie Fmoc. La synthèse a été effectuée de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale du peptide.

La densité des fonctions amines sur la surface a été évaluée à 3,5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ [163]. La surface du substrat utilisé est de 4,84 cm^2 . Le nombre de moles de groupements NH_2 sur la surface est alors estimé à 1,7 nmoles. Les quantités d'acide aminé et d'activateur (HOBt) déposés sont 10 fois en excès par rapport à la densité des fonctions amines sur le support.

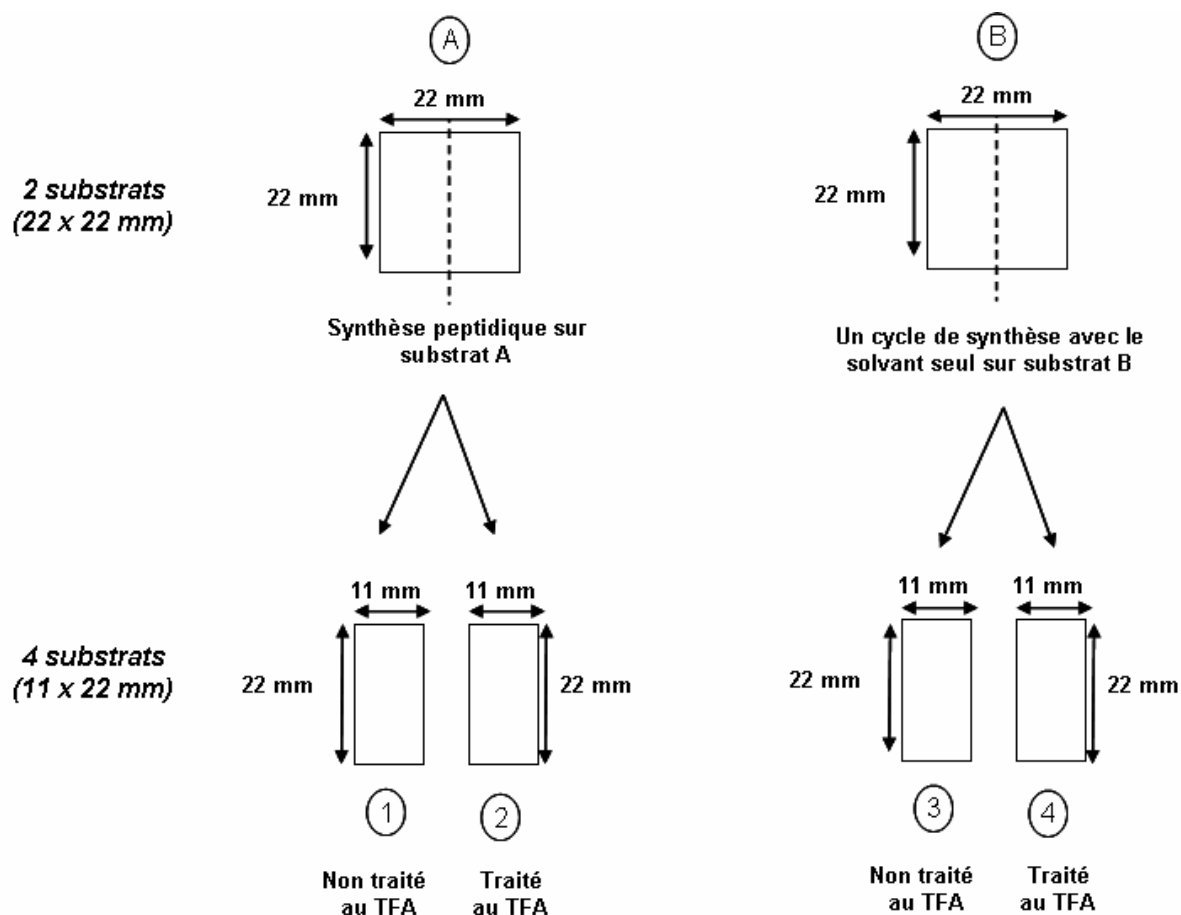


Fig.II.5. Les différents substrats de dioxyde de silicium utilisés pour la synthèse peptidique *in situ* et ses applications.

La synthèse a été effectuée sur un substrat déposé dans un réacteur, à température ambiante, sous agitation et barbotage d'azote. Les différents réactifs et solvants ont été injectés en utilisant des seringues. Après les étapes de lavages, les solvants sont éliminés par filtration sous vide (cf. Annexe 3).

Le support est rincé avec 5 mL de DMF pendant 10 min.

Une solution de Fmoc-Gly-OPfp à $2 \cdot 10^{-4}$ M (premier acide aminé fixé sur le support) est préparée en dissolvant 1 mg d'acide aminé dans 10 mL de DMF en présence de 0,3 mg de HOBt. Cette solution est diluée pour obtenir une concentration finale de $3,4 \cdot 10^{-6}$ M, et un volume de 5 mL est injecté dans le réacteur. La réaction de couplage est effectuée pendant 90 min. Le substrat est ensuite lavé trois fois avec 5 mL de DMF, pendant 3 min. Puis l'étape de blocage (« capping ») est effectuée avec une solution de 5% d'acide acétique/DMF, pendant 30 min. Le support est ensuite lavé trois fois avec 5 mL de DMF, pendant 3 min. L'acide aminé fixé est alors déprotégé avec 5 mL d'une solution de 20% pipéridine/DMF, pendant 15 min. Enfin, le support est lavé au DMF, pendant 3 min. Le même cycle de couplage, blocage et

déprotection est réalisé pour ajouter les résidus d'acides aminés successifs du peptide **GGIQLARRIRGERAGG**.

Pour la fixation de chaque résidu arginine, le protocole d'activation est le suivant : 2 mg de Fmoc-Arg(Pmc)-OH sont dissous dans 20 mL de DCM. Cette solution ($1,5 \cdot 10^{-4}$ M) est ensuite diluée pour obtenir une concentration de $2,5 \cdot 10^{-6}$ M dans 10 mL de DCM. 1 μ L de DIC est ajouté à la solution diluée, et l'arginine est activée pendant 20 min, sous agitation à 0°C. Le DCM est ensuite évaporé dans un rotavapor et l'acide aminé est récupéré avec 6 mL de DMF.

Après le dernier cycle de synthèse peptidique et la dernière réaction de déprotection du groupement α -amine à la pipéridine, une solution de biotine-OSu à $3 \cdot 10^{-4}$ M est préparée par solubilisation de 1 mg de biotin-OSu dans 10 mL de DMF en présence de 0,4 mg de HOBt. Cette solution est diluée pour obtenir une concentration finale de $3,4 \cdot 10^{-6}$ M. 5 mL de cette solution sont injectés dans le réacteur, et la réaction de couplage de la biotine-OSu est réalisée pendant 3 h. Puis, le support est lavé trois fois avec 5 mL de DMF, et avec du méthanol.

Pour tester les adsorptions non spécifiques sur le support, un cycle de synthèse a été effectué en injectant 5 mL de solvant (DMF), sur un autre substrat de dioxyde de silicium (22 x 22 mm), (*fig.II.5. substrat B*). Ce substrat sert de témoin des adsorptions non spécifiques de la streptavidine et des anticorps utilisés dans les différents tests effectués sur le support après la synthèse peptidique.

Chacun des deux substrats est coupé en deux morceaux de 11 x 22 mm (*fig.II.5. substrats 1 et 2 ; et substrats 3 et 4*). .

Les supports qui ne sont pas utilisés immédiatement, sont conservés sous azote à -20°C.

III.5.2. Evaluation du rendement du couplage covalent du peptide synthétisé *in situ*

Les deux substrats précédemment préparés de 11 x 22 mm (*fig.II.5. substrats 1 et 3*) sont incubés dans la solution de saturation (2% BSA / PBS) pendant 2 h à 37°C. Les supports sont ensuite lavés trois fois avec du PBS-T, puis une fois à l'eau ultrapure, pendant 3 min, sous ultrasons. Ils sont ensuite séchés sous azote.

La densité de peptide biotinylé synthétisé sur le substrat est évaluée par marquage indirect avec la SAv-Cy3. L'expérience est réalisée en triplicata.

1 μL d'une solution de SAv-Cy3 à 10^{-2} mg/mL est déposé sur les plots des deux supports, et incubé sous une atmosphère humide, pendant 1h, à 37°C. Les substrats sont ensuite lavés avec du PBS-T, puis à l'eau ultrapure et séchés sous azote.

Les substrats sont analysés par mesure de la fluorescence à 532 nm.

III.5.3. Evaluation de la stabilité de la surface vis-à-vis de la synthèse peptidique et du traitement acide

La stabilité des surfaces a été testée après les différentes étapes de synthèse peptidique et le traitement acide de déprotection au TFA. Pour ce faire, la densité de peptide synthétisé sur la surface a été évaluée avant et après le traitement acide, en triplicata.

Deux substrats de 11 x 22 mm (*fig.II.5. substrats 2 et 4*) comme préparés au paragraphe III.8.1, sont incubés dans un mélange TFA/TIS/DCM (95:2,5:2,5; v/v), pendant 1h, à température ambiante.

Après le traitement au TFA, les substrats sont rincés et lavés deux fois avec du DCM, pendant 3 min, sous ultrasons, et le solvant est évaporé. Ils sont ensuite incubés avec la solution de saturation (2% BSA / PBS) pendant 2 h à 37°C. Puis les substrats sont lavés avec du PBS-T, à l'eau ultrapure et séchés sous azote.

1 μL d'une solution de SAv-Cy3 à 10^{-2} mg/mL est déposé sur les plots des deux substrats, et incubé sous une atmosphère humide, pendant 1h, à 37°C. Les substrats sont ensuite lavés avec du PBS-T, puis à l'eau ultrapure et séchés sous azote.

Les substrats sont analysés par mesure de la fluorescence à 532 nm.

III.5.4. Caractérisation de l'activité biologique des sondes peptidiques synthétisées *in situ*

L'activité biologique du peptide synthétisé *in situ* a été testée vis-à-vis de son interaction avec l'anticorps polyclonal anti-Histone H3, avant et après le traitement au TFA. Les tests ont été effectués, en triplicata, sur les substrats découpés (11 x 22 mm), dont deux ont subi le traitement au TFA (*fig.II.5*).

1 μL d'une solution d'anticorps polyclonal diluée au 1:10⁴ dans une solution BSA 1%/ PBS-T est déposé sur les plots des substrats, et incubé pendant 1 h à 37°C,

sous une atmosphère humide. Après une étape de lavages avec du PBS-T et à l'eau, les substrats sont séchés sous azote. Des plots témoins sont également préparés en déposant 1 μ L de tampon de dilution de l'anticorps primaire.

Puis, 1 μ L d'une solution d'anticorps secondaire lié au Cy3 à 10^{-2} mg/mL, est déposé sur les plots, et incubé pendant 1 h à 37°C, sous une atmosphère humide. Les substrats sont ensuite lavés avec du PBS-T et à l'eau, puis séchés sous azote.

Les substrats sont analysés par mesure de la fluorescence à 532 nm.

Les résultats de la synthèse peptidique *in situ* présentés correspondent à la moyenne des intensités de fluorescence de triplicata de plots d'une même expérience.

IV. Protocole expérimental - 2^{ème} partie - Puces à protéines : Détection d'anticorps anti-histones dans le sérum

IV.1. Immunoessais sur anticorps commercial

IV.1.1. Technique ELISA

Pour évaluer la spécificité de l'anticorps anti-histone H3 pour la protéine histone H3, son interaction biologique a été testé avec chacune des deux protéines H1 et H3. Une solution à 5 µg/mL de chacune des protéines est préparée à partir d'une solution mère à 1mg/mL, dans une solution tampon de carbonate de sodium (0,05 M) à pH 9,6. 100µL de chaque solution protéique sont déposés dans les puits de la microplaque et incubées une nuit à 4°C. 100µL de tampon de dilution sont déposés dans des puits contrôles (blancs). Les dépôts sont effectués en triplicata. La microplaque est ensuite lavée trois fois avec le PBS-T (200µL/puits), et les puits sont incubés avec la solution de saturation (200µL/puits), pendant 2 h à 37°C. Puis la microplaque est lavée trois fois avec le PBS-T. Une gamme de dilution de l'anticorps polyclonal anti-histone H3 comprise entre 10^{-5} et 10^{-2} , est préparée dans une solution BSA 1%/ PBS-T et les puits sont incubés avec 100 µL de chacune des solutions d'anticorps, pendant 1 h à 37°C. Après une étape de lavages avec le PBS-T, 100 µL de la solution d'anticorps secondaire anti-IgG de lapin lié à la HRP (solution mère diluée à 10^{-4}) sont déposés dans chaque puits, et incubés pendant 1 h à 37°C. La microplaque est alors lavée six fois avec le PBS-T et la solution d'OPD est ajoutée (100µL/puits) et incubée pendant 20 min, à température ambiante, à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée par addition d'une solution d'acide sulfurique à 0,5 M (100µL/puits). L'absorbance est mesurée à 492 nm dans le lecteur de plaque.

Pour déterminer la limite inférieure de détection de l'anticorps anti-histone H3, le même protocole est effectué en testant une gamme de dilution de l'anticorps anti-histone H3 entre 10^{-8} et 10^{-4} .

IV.1.2. Immunoessais sur lames de verre fonctionnalisées

Deux types de chimie de surface sont testés pour la mise au point des immunoessais sur lames de verre fonctionnalisés : i) les lames NHS-ester activé et ii) les lames aminées fonctionnalisées avec le copolymère AMMVE.

IV.1.2.1. Lames NHS esters

L'interaction spécifique de l'anticorps anti-histone H3 avec la protéine histone H3 a été testée sur lames de verre par incubation de l'anticorps avec chacune des deux protéines histones H1 et H3.

Des solutions protéiques sont préparées à différentes concentrations (5, 50 et 500 µg/mL) dans du PBS (0,01 M, pH 7,4). Des plots de 1 µL de chaque solution d'histone sont déposés en duplicata sur les lames. Des plots du tampon de dilution sont également déposés comme témoins des adsorptions non spécifiques de l'anticorps primaire. Les lames sont incubées sous une atmosphère humide pendant une nuit à température ambiante. Elles sont ensuite lavées avec du PBS-T, puis à l'eau ultrapure et séchées. Les plots sont incubés avec la solution de saturation (1µL/plot), pendant 2 h à 37°C, sous une atmosphère humide. Une gamme de dilution de l'anticorps polyclonal anti-histone H3 comprise entre 10^{-5} et 10^{-2} , est préparée dans une solution BSA 1%/ PBS-T, et 1 µL de chacune des solutions d'anticorps diluées est déposé sur les plots de protéines et de tampon, pendant 1 h à 37°C, sous une atmosphère humide.

Des dépôts de 1 µL du tampon de dilution de l'anticorps sont également effectués sur des plots avec peptide et solvant comme témoins de l'adsorption non spécifique des anticorps.

Les lames sont lavées avec le PBS-T, puis à l'eau ultrapure et séchées. Les plots sont incubés avec 1 µL d'une solution d'anticorps secondaire lié au Cy3, à 10^{-2} mg/mL, pendant 1 h à 37°C, sous une atmosphère humide. Les lames sont ensuite lavées et séchées, puis analysées par mesure de la fluorescence à 532 nm.

Pour déterminer la limite inférieure de détection de l'anticorps anti-histone H3, le même protocole est effectué en testant deux concentrations d'immobilisation de l'histone H3 (0,5 et 1 mg/mL) et une gamme de dilution de l'anticorps primaire comprise entre 10^{-8} et 10^{-4} .

L'adsorption non spécifique des protéines sur la surface non activée a été étudiée en immobilisant la protéine histone H3 sur des lames de verre silanisées, portant des groupements acides carboxyliques non activés. Puis le même protocole est appliqué en incubant la protéine avec l'anticorps primaire dilué dans une gamme comprise

entre 10^{-8} et 10^{-4} . La révélation des complexes protéine-anticorps formés est effectuée après l'addition de l'anticorps secondaire lié au Cy3.

Les lames sont analysées par mesure de la fluorescence à 532 nm.

IV.1.2.2. Lames AMMVE

Des lames de verre aminées ont été fonctionnalisées avec le copolymère AMMVE. Pour ce faire, les lames de verre aminé sont incubées dans une solution de carbonate de sodium (0,02 M ; pH 10,7), pendant 1 h, à température ambiante, afin de déprotoner les fonctions amines ($\text{NH}_3^+ \rightarrow \text{NH}_2$). Les lames sont ensuite séchées par centrifugation, puis lavées dans du DMSO pendant 10 min. Elles sont incubées, pendant une nuit, à température ambiante, dans des solutions d'AMMVE préparées dans du DMSO à trois concentrations différentes (1 ; 3 et 5 mg/mL). Les lames sont rincées au PBS et séchées par centrifugation.

Afin de diminuer le nombre de groupements réactifs disponibles pour l'immobilisation des protéines sur les lames, le couplage des protéines sur les lames fonctionnalisées a été réalisé avec l'AMMVE préhydrolysé avant son greffage sur le silane. Ainsi, le copolymère est hydrolysé dans un mélange DMSO /PBS 5%, pendant 48 h à 37°C. Les lames aminées sont incubées dans une solution de carbonate de sodium (0,02 M ; pH 10,7), pendant 1 h, à température ambiante. Elles sont ensuite séchées par centrifugation, puis lavées dans du DMSO pendant 10 min. Elles sont incubées, pendant une nuit, à température ambiante, dans la solution d'AMMVE préhydrolysé. Les lames sont rincées au PBS et séchées par centrifugation.

Deux solutions de protéine histone H3 (0,5 et 1 mg/mL) sont préparées dans du PBS, pH 7,4. 1 μL de chaque solution est déposé sur les différentes lames fonctionnalisées avec le copolymère à différentes concentrations (1 ; 3 et 5 mg/mL). Des tests sont également effectués sur les lames fonctionnalisées avec le copolymère à 3 mg/mL préhydrolysé. 1 μL de tampon de dilution est également déposés sur des plots témoins. Les lames sont incubées pendant 3 h à 37°C sous une atmosphère humide. Elles sont ensuite lavées avec le PBS-T puis à l'eau ultrapure et séchées, et saturées avec la solution de BSA 2% / PBS, pendant 2h à 37°C. Les lames sont lavées et séchées. Les différents plots sont ensuite incubés avec 1 μL des différentes solutions diluées d'anticorps polyclonal anti-histone H3,

pendant 1 h à 37°C, sous une atmosphère humide. La gamme de dilution de l'anticorps testée est comprise entre 10^{-8} et 10^{-4} . Les lames sont lavées et séchées. Les plots sont incubés avec 1 μ L d'une solution d'anticorps secondaire lié au Cy3, à 10^{-2} mg/mL, pendant 1 h à 37°C, sous une atmosphère humide. Les lames sont ensuite lavées, séchées, et analysées par mesure de la fluorescence à 532 nm.

IV.2. Détection d'anticorps anti-histones dans le sérum humain

IV.2.1. Technique Western blot

Cette technique a été effectuée par M^{me} Agnès Desbos au laboratoire de l'Unité Fonctionnelle d'Auto-Immunité - Service d'Immunologie du Centre Hospitalier, Lyon-Sud.

Une solution protéique contenant les différentes classes d'histones est déposée dans les puits d'un gel de polyacrylamide à 15% contenant 0,1% de SDS (20 μ g/puits). Les protéines sont séparées par électrophorèse, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose.

Les bandelettes de nitrocellulose sont ensuite incubées dans une solution PBS-T contenant 1% de lait écrémé, pendant 30 min à température ambiante, pour saturer les sites libres des membranes.

Les bandelettes sont lavées au PBS-T, et incubées avec les sérums des patients et les sérums contrôles dilués au 100^{ème} dans une solution 1% lait écrémé / PBS-T, pendant 90 min à température ambiante. Après une étape de lavages au PBS-T, les bandelettes sont incubées pendant 90 min à température ambiante avec l'anticorps anti-IgG humaine lié à la HRP, dilué au 1/400 dans une solution 1% lait écrémé / PBS-T. Après les lavages, la révélation est effectuée par incubation de la solution du chromogène (4-chloro-1-naphtol 0,06% (p/v) ; H₂O₂ 0,033% (v /v)) pendant 20 min, à température ambiante, à l'abri de la lumière.

IV.2.2. Technique ELISA

Les anticorps IgG dirigés contre les protéines histones H1 et H3 sont recherchés dans les sérums des patients. Le protocole ELISA est le même que celui effectué sur le sérum commercial. 100 μ L de chacune des solutions d'histones H1 ou H3 (5 μ g/mL), ou du tampon de dilution (blancs) sont déposés dans les puits. Ces puits sont lavés, saturés et incubés avec 100 μ L de sérum de patients ou de sérum

de sujets sains dilués au $100^{\text{ème}}$ dans une solution BSA 1%/ PBS-T. Après les lavages, les puits sont incubés avec 100 μL de la solution d'anticorps anti-IgG humaine lié à la HRP, dilué au $1/10^4$. La révélation est effectuée avec la solution d'OPD. L'absorbance est mesurée à 492 nm dans le lecteur de plaque.

IV.2.3. Immunoessais sur lames AMMVE

Les lames de verre aminées sont fonctionnalisées avec le copolymère AMMVE immobilisé à 3 g/L dans du DMSO, selon le protocole décrit ci-dessus (*cf. paragraphe IV.1.2.2*).

Des plots de 1 μL de chacune des solutions d'histones H1 ou H 3 (1 mg/mL) ainsi que du tampon de dilution (PBS, pH 7,4) sont déposés sur les lames. Les solutions sont incubées pendant 3 h à 37°C sous une atmosphère humide. Les lames sont ensuite lavées avec le PBS-T puis à l'eau ultrapure et séchées. Les différents plots sont incubés avec 1 μL de sérum de patients ou de sérum de sujets sains dilués au $100^{\text{ème}}$ dans une solution BSA 1%/ PBS-T, pendant 1 h à 37°C, sous une atmosphère humide. Après lavages au PBS-T et à l'eau ultrapure, les lames sont séchées et les plots sont incubés avec 1 μL d'une solution d'anticorps anti-IgG humaine lié au Cy3, à 10^{-2} mg/mL, pendant 1 h à 37°C, sous une atmosphère humide. Les lames sont lavées, séchées, et analysées par mesure de la fluorescence à 532 nm.

Les résultats présentés obtenus par la technique ELISA ainsi que par les immunoessais sur lames de verre fonctionnalisées, correspondent à la moyenne des intensités de fluorescence de 8 réplicats, obtenus à partir de quatre expériences (chaque condition est effectuée en duplicata au cours d'une même expérience).

V. Détection de la fluorescence et analyse des images

Les intensités de fluorescence des plots issus des lames de verre et des substrats de dioxyde de silicium ont été mesurées avec le scanner GenePix[®] Personal 4100 A (Axon Instruments / Molecular Devices) à une longueur d'onde d'excitation du laser de 532 nm. Le gain du photomultiplicateur PMT était de 500, et la résolution spatiale était de 20 μm /pixel.

Les images et les données de fluorescence ont été analysées avec le logiciel GenePix[®] pro 6.0.

V.1. Analyse des images de fluorescence

L'analyse de toutes les images de fluorescence avec le logiciel GenePix[®] pro 6.0 a été effectuée en trois étapes, selon le processus suivant :

- La première étape consiste à localiser chaque plot sur l'image de la lame de verre. Elle est réalisée à l'aide d'une grille de cellules ajustables selon le nombre de lignes et de colonnes. Le positionnement de la grille peut être manuel, semi-automatique ou automatique.

La grille permet de définir les zones de fluorescence qui permettront de quantifier le signal utile et le bruit de fond.

- La deuxième étape est la segmentation (*fig.II.6*). Elle consiste à localiser les contours de chaque plot et à étiqueter chaque pixel de l'image : signal utile de fluorescence, bruit de fond, faux signal dû à un artefact de l'analyse ou à des problèmes dû au dépôt des solutions. Les plots sur les lames étaient dans la grande majorité des cas sphériques et de diamètre similaire. Dans chaque grille tracée, nous avons utilisé un masque circulaire d'un diamètre fixe de 2 mm comme cellule de calcul. Ceci a permis d'ajuster au mieux les cellules à la majorité des plots. Chaque cellule a été centrée sur un plot.

- Nous avons utilisé dans nos calculs la valeur de fluorescence totale contenue à l'intérieur de chaque cellule ; cette valeur correspond à la somme des intensités de chacun des pixels pris dans la zone d'intérêt. Toutes les cellules étant de même taille, cela revenait à comparer la fluorescence par unité de surface.

Dans de rares cas, un spot pouvait présenter une traînée (effet comète) ou une hétérogénéité. Ceci a pu entraîner occasionnellement un abaissement de la fluorescence par unité de surface pour le spot considéré, et augmenter la dispersion des résultats. Ce cas de figure s'est révélé suffisamment peu fréquent. La grande majorité des mesures a pu être obtenue avec des spots homogènes entièrement inclus dans leur cellule.

Les intensités de fluorescence présentées dans les résultats correspondent à la moyenne de la fluorescence de réplicats des plots.

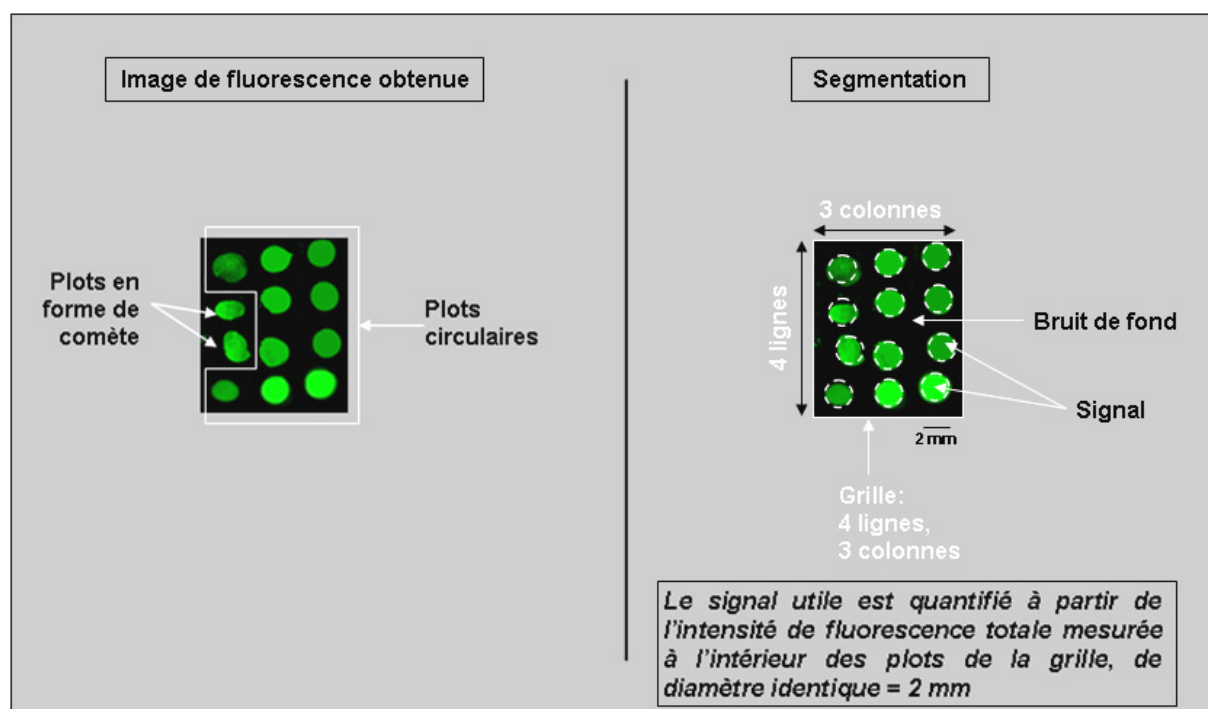


Fig.II.6. Exemples sur la segmentation des images de fluorescence analysées sur le scanner avec le logiciel GenePix®.

VI. Calculs statistiques

Nous présentons ci-dessous les calculs statistiques utilisés pour analyser nos résultats.

VI.1. Coefficient de variation

Le CV correspond au rapport de l'écart-type σ (ou déviation standard SD) sur la moyenne du signal mesuré (ex : absorbance, intensité de fluorescence), il est exprimé en pourcentage :

$$\% \text{ CV} = (\sigma / \text{Moyenne}) \times 100$$

VI.2. Valeurs seuil

Les valeurs seuil (S) calculées au cours de ce travail sont :

- i) le seuil correspondant à la limite inférieure de détection des immunoessais (tests ELISA et immunoessais sur lames de verre fonctionnalisées), effectués sur le sérum commercial, et
- ii) le seuil de positivité des tests (ELISA et immunoessais sur lames AMMVE), effectués pour la détection d'anticorps anti-histones dans le sérum des patients.

Dans les deux cas, le seuil calculé correspond à la valeur supérieure de l'intervalle de confiance pour $\alpha = 0,01$ (certitude de 99 %), calculé à partir d'une distribution t autour de la moyenne du signal (absorbance ou intensité de fluorescence) des témoins négatifs.

« Pour le calcul du seuil inférieur de détection, les témoins négatifs correspondent aux signaux des différents points de mesure obtenus avec le (« tampon de dilution »).

Quand il s'agit de la détermination du seuil de positivité des tests effectués sur les sérums des patients, les témoins négatifs sont les sérums des sujets sains ».

Le calcul du seuil est effectué à partir de la formule suivante [164] :

$$S = \text{Moy} + t_{0,01} \times \sigma \sqrt{(n+1) / n}$$

Moy est la moyenne des absorbances (en ELISA) ou des intensités de fluorescence (tests sur lames de verre fonctionnalisées) des témoins négatifs ;

t est la valeur donnée dans la table de Student pour $\alpha = 0,01$ et un degré de liberté v correspondant à $(n-1)$ (cf. *Annexe 2*);

σ est l'écart-type par rapport à la moyenne des témoins négatifs ;

n est le nombre de témoins négatifs.

VI.3. Rapport

Pour la détection d'anticorps anti-histones dans le sérum des patients, afin de pouvoir comparer les résultats obtenus par la technique ELISA (mesure des absorbances) et par les immunoessais sur lames AMMVE (mesure des intensités de fluorescence), pour chaque échantillon de sérum, un rapport est ensuite calculé [164]:

$$\text{Rapport} = \text{Moy} / S$$

Moy est la moyenne des valeurs des absorbances ou des intensités de fluorescence de chaque échantillon de sérum de patients.

S est le seuil de positivité calculé

Un rapport supérieur à 1 indique qu'un échantillon est positif avec une certitude de 99% ($\alpha = 0,01$).

VII. Définitions utilisées pour les performances de nos techniques d'analyse

Les différents immunoessais effectués au cours de ce travail (ELISA et immunoessais sur lames de verre fonctionnalisées) sont évalués et comparés à partir de leurs performances analytiques, notamment la reproductibilité, la répétabilité, les limites inférieure et supérieure de détection, la gamme dynamique et la sensibilité. Nous définissons ces notions ci-dessous.

- **La reproductibilité** : Le terme « reproductibilité » désigne l'étroitesse d'accord entre les résultats de mesurages individuels effectués entre différents supports de même nature. On parlera de « reproductibilité inter-essais ». On considère dans notre cas que la reproductibilité est acceptable si le coefficient de variation moyen inter-essai est inférieur à 8%, en nous basant sur l'article de Moncharmont et Monneron, qui traite de la qualification biologique du don de sang dans les Etablissements Français du Sang [165].

- **La répétabilité** : Le terme « répétabilité » désigne l'étroitesse d'accord entre les résultats de mesurages individuels effectués pour plusieurs points (réplicats, spots) d'un même support. On parlera de « répétabilité intra-essai ». On considère dans notre cas que la répétabilité est acceptable si le coefficient de variation moyen intra-essai est inférieur à 15%, en nous basant sur l'article de Moncharmont et Monneron [165].

Généralement, les limites inférieure et supérieure de détection, la gamme dynamique et la sensibilité d'un immunoessai sont déterminés à partir de la courbe de saturation, obtenue, après l'incubation d'une concentration déterminée d'antigène immobilisé sur support solide (ex : microplaque ELISA) avec des concentrations croissantes d'anticorps spécifique (*fig.II.7*).

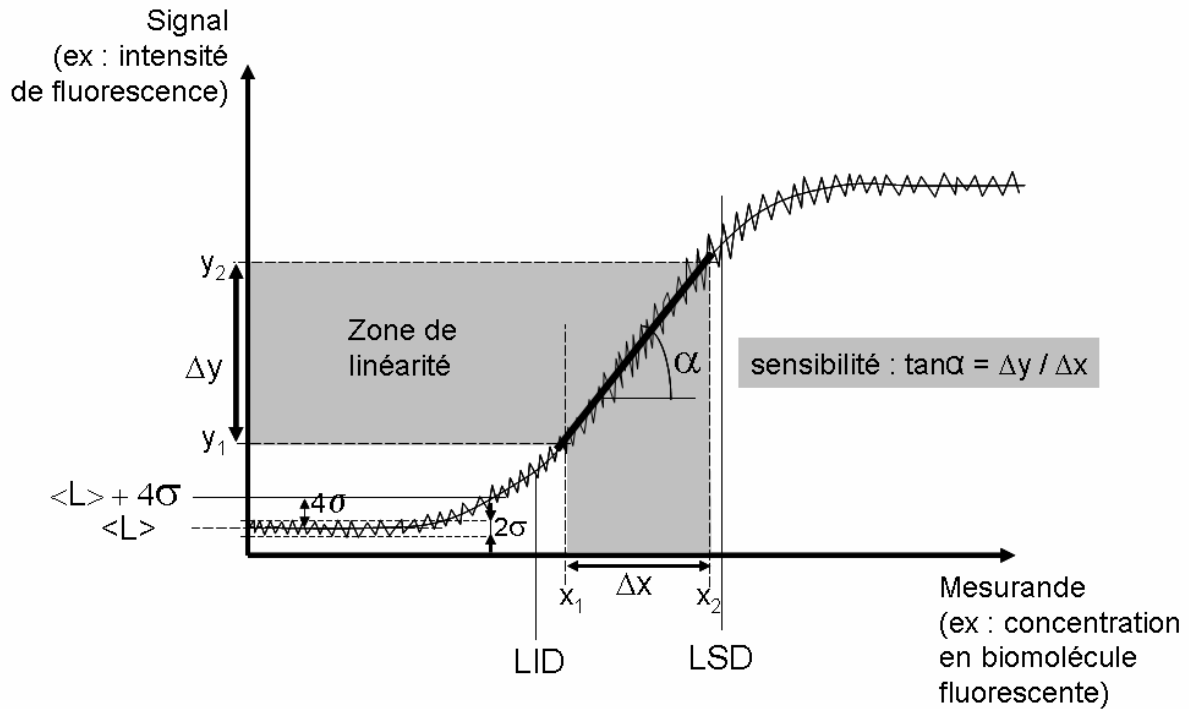


Fig.II.7. Courbe standard de saturation obtenue après l'incubation d'une concentration déterminée d'antigène immobilisé sur support solide (ex : microplaque ELISA) avec des concentrations croissantes d'anticorps spécifique ; sat : saturation, L : Ligne de base. LID : limite inférieure de détection, LSD : limite supérieure de détection. Dans cet exemple le seuil de la LID est estimé à la moyenne du signal du bruit de fond + 4σ .

Sur cette courbe, nous pouvons définir:

- **La Mesurande** : Grandeur particulière soumise à mesurage (exemple : concentration en analyte).
- **La Limite inférieure de détection LID** : Plus petite valeur de mesurande significativement détectable au-dessus du bruit de fond.
- **La Limite supérieure de détection LSD** : Plus grande valeur de mesurande significativement détectable en-dessous du seuil de saturation.
- **La gamme dynamique** : Rapport entre la limite supérieure de détection et la limite inférieure de détection du mesurande.
- **La zone de linéarité** : Zone des valeurs de mesurande dans laquelle la fonction Signal = f (mesurande) est linéaire.

- **La sensibilité** : La sensibilité est le rapport entre une variation du signal et la variation de mesurande correspondante ($\tan\alpha = \Delta y/\Delta x$).

CHAPITRE III
PUCES A PEPTIDES

DEPROTECTION DE
SONDES PEPTIDIQUES
SUR SUPPORTS AMINES

CHAPITRE III : PUCES A PEPTIDES

I. Introduction

Une première partie de ce travail de thèse a consisté à développer des puces à peptides par synthèse *in situ*, destinées au criblage et à l'identification de séquences impliquées dans des interactions biologiques. Une des applications potentielles de ce type de puces est le criblage d'épitopes.

Avant d'entreprendre la synthèse peptidique *in situ* sur les surfaces aminées, un certain nombre de paramètres ont dû être vérifiés comme la stabilité des surfaces vis-à-vis de la déprotection acide des amino-acides et la conservation de l'activité biologique des séquences déprotégées. Nous avons donc, dans un premier temps, réalisé ces études sur des séquences peptidiques présynthétisées et immobilisées de façon covalente sur les lames aminées. Une étude précédente avait permis d'établir les conditions d'immobilisation covalente de peptides protégés sur lames aminées [4]. Ces conditions ont alors été validées avec notre modèle biologique. Puis, nous nous sommes attachés à optimiser l'étape de déprotection finale du peptide protégé immobilisé sur puce *ex situ*, afin de lui conserver son activité biologique de reconnaissance par des anticorps anti-peptide.

Nous avons ensuite appliqué les conditions définies avec les sondes peptidiques *ex situ*, aux sondes peptidiques synthétisées *in situ* et nous avons étudié leur comportement.

L'ensemble des résultats obtenus est présenté et discuté ci-après.

II. Résultats et discussion

II.1. Choix du système biologique peptide / anticorps anti-peptide

Dans le cadre du développement de puces à peptides pour le criblage d'épitopes et/ou la recherche d'anticorps dans le sérum, nous avons choisi de réaliser notre étude sur un modèle biologique pertinent impliqué dans le lupus érythémateux systémique. Ce choix a également été conditionné par la disponibilité de sérums de patients lupiques, fournis par le service d'Immunologie du Centre

Hospitalier Lyon-Sud. C'est donc le système histone/anticorps anti-histone qui a été retenu. Les tests ont alors été effectués avec un modèle de peptide épitope de protéine histone et un anticorps spécifique anti-histone.

Dans un premier temps, l'étude a été réalisée avec un anticorps polyclonal de lapin anti-histone H3 humaine, disponible commercialement. Cet anticorps est dirigé contre un fragment peptidique de 12 mers, correspondant aux résidus I125-A136 : **IQLARRIGERA**, situés du côté C-terminale de la protéine histone humaine H3 (fig. III.1) :

Histone H3	
1	ARTKQTARKS TGGKAPRKQL ATKAARKSAP ATGGVKKPHR YRPGTVALRE IRRYQKSTEL
61	LIRKLPFQRL VREIAQDFKT DLRFOSSAVM ALQEACEAYL VGLFEDTNLC AIHAKRVTIM
121	PKDI IQLARRI RGERA

Fig.III.1. Séquence en acides aminés de la protéine histone humaine H3. Les résidus en gras correspondent à l'épitope reconnu par l'anticorps polyclonal anti-histone H3 commercial.

La séquence du peptide sonde a été définie de façon à contenir les 12 résidus d'acides aminés de l'épitope de l'histone humaine H3 décrits ci-dessus. Il s'agit d'une séquence de 16 mers : **GGIQLARRIGERAGG**, possédant deux résidus glycine à chaque extrémité. L'extrémité C-terminale est libre alors que l'extrémité N-terminale, est couplée à une biotine. La biotine a été ajoutée pour le marquage indirect du peptide immobilisé par voie *ex situ* ou synthétisé directement sur support solide.

Les deux glycines ajoutées du côté C-terminal du peptide H3 permettent d'éloigner la séquence épitope du site d'immobilisation sur le support solide, et les deux glycines du côté N-terminal permettent d'espacer l'épitope de la biotine couplée. La glycine ajoutée aux deux extrémités du peptide a été choisie car il s'agit d'un acide aminé neutre et simple, ne possédant qu'un atome d'hydrogène sur sa chaîne latérale. Il peut donc être rajouté à une séquence peptidique sans provoquer de modifications importantes des propriétés physico-chimiques et biologiques

Deux formes du peptide 16 mers biotinylé ont alors été synthétisées sur résine : le peptide protégé au niveau des groupements fonctionnels de ses chaînes latérales : biotine-GGIQ(Trt)LAR(Pmc)R(Pmc)IR(Pmc)GE(Otbu)R(Pmc)AGG, et le peptide déprotégé : biotine-GGIQLARRIGERAGG.

La présence de groupements protecteurs sur les chaînes latérales des résidus glutamine (Q), arginine (R) et glutamate (E) permet d'éviter la polymérisation des peptides après activation de la fonction carboxylique terminale lors de la réaction d'immobilisation sur support aminé.

Le peptide déprotégé est un témoin positif de la reconnaissance biologique peptide H3/anticorps polyclonal anti-peptide H3, lors de la mise au point du protocole de déprotection du peptide protégé.

II.2. Validation du système biologique par la technique ELISA

La spécificité de l'anticorps polyclonal anti-peptide H3 vis à vis de la reconnaissance biologique du peptide épitope H3 non protégé par rapport au peptide épitope H3 protégé, a été testée par la technique ELISA classique. En effet, la présence des groupements protecteurs sur le peptide épitope H3 doit diminuer sa reconnaissance par l'anticorps anti-peptide H3, par rapport à celle du peptide non protégé.

Le schéma du test ELISA réalisé est présenté sur la figure III.2. L'anticorps polyclonal anti-peptide H3 est immobilisé en fond de puits à deux dilutions (10^{-4} et 10^{-3}), puis incubé avec le peptide épitope H3 biotinylé

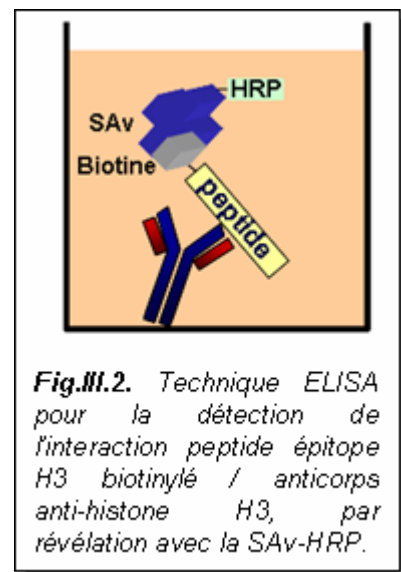


Fig.III.2. Technique ELISA pour la détection de l'interaction peptide épitope H3 biotinylé / anticorps anti-histone H3, par révélation avec la SAv-HRP.

soit sous forme protégée, soit sous forme non protégée. L'évènement de reconnaissance biologique entre le peptide et l'anticorps est détecté *via* la SAv-HRP et quantifié par mesure de l'absorbance à 492 nm.

Les résultats, présentés sur la figure III.3, mettent en évidence une nette différence de reconnaissance entre le peptide protégé et le peptide non protégé.

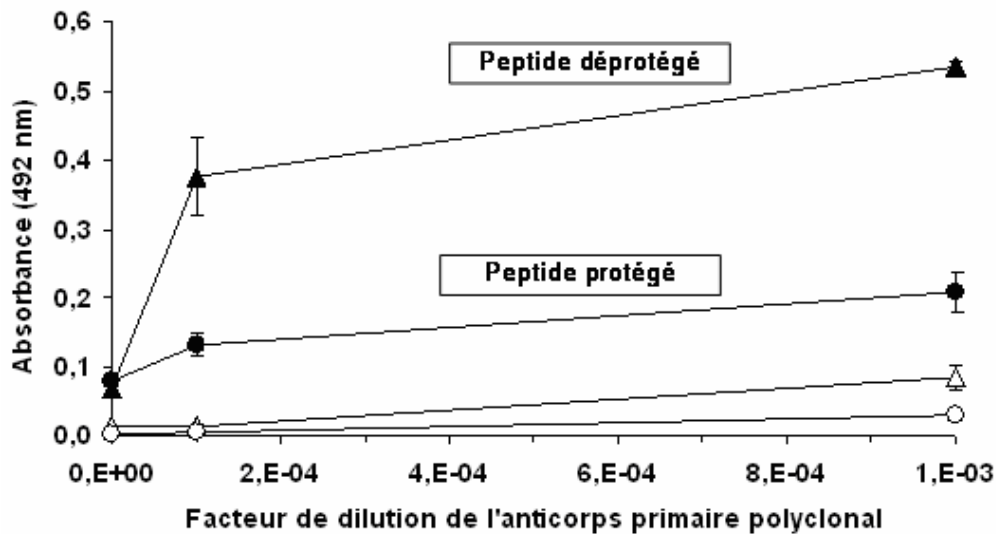


Fig.III.3. Test de l'interaction biologique entre l'anticorps anti-histone H3 et le peptide biotinylé protégé ou déprotégé par la technique ELISA. Révélation avec la SAv-HRP.
(○ Tampon de dilution du peptide déprotégé, △ tampon de dilution du peptide protégé, ● solution de peptide protégé, ▲ solution de peptide déprotégé).

L'absorbance à 492 nm mesurée avec le peptide épitope H3 non protégé est environ 4 fois supérieure à celle mesurée avec le peptide épitope H3 protégé, et ce quelque soit la concentration d'anticorps anti-peptide H3 testée. Toutefois, l'absorbance mesurée avec le peptide protégé est supérieure à celle mesurée en absence de peptide et ou en absence d'anticorps anti-peptide. Ceci indique que le peptide protégé est partiellement reconnu par l'anticorps anti-peptide. Le peptide non protégé est, quant à lui, très bien reconnu par l'anticorps anti-peptide. Cette différence de reconnaissance par l'anticorps anti-peptide permet donc de discriminer les formes protégées et non protégées du peptide ce qui est un élément essentiel pour la suite de l'étude. En effet, la mesure de cette activité de reconnaissance du peptide par l'anticorps anti-peptide doit permettre d'évaluer le rendement de déprotection après traitement du peptide protégé.

Le système biologique choisi est donc validé pour la suite de l'étude. Il s'agit maintenant d'établir les conditions d'immobilisation des peptides épitope H3 protégés sur les lames de verre fonctionnalisées ainsi que les conditions de déprotection de ces peptides.

II.3. Validation de la déprotection des peptides protégés immobilisés par voie *ex situ*

II.3.1. Influence de la concentration du peptide immobilisé par voie *ex situ* sur le rendement de greffage

Le peptide épitope H3 protégé a été immobilisé sur des lames de verre fonctionnalisées par des groupements amine. Cette immobilisation est réalisée par couplage covalent entre l'extrémité C-terminale du peptide protégé et la fonction amine primaire portée par le support. Le groupement acide carboxylique du peptide protégé est donc, dans un premier temps, activé en présence du carbodiimide (EDC) et de la NHS. Puis, le peptide protégé-NHS ester réagit avec les fonctions amines portées par les lames de verre fonctionnalisées, selon le schéma décrit sur la figure III.4 :

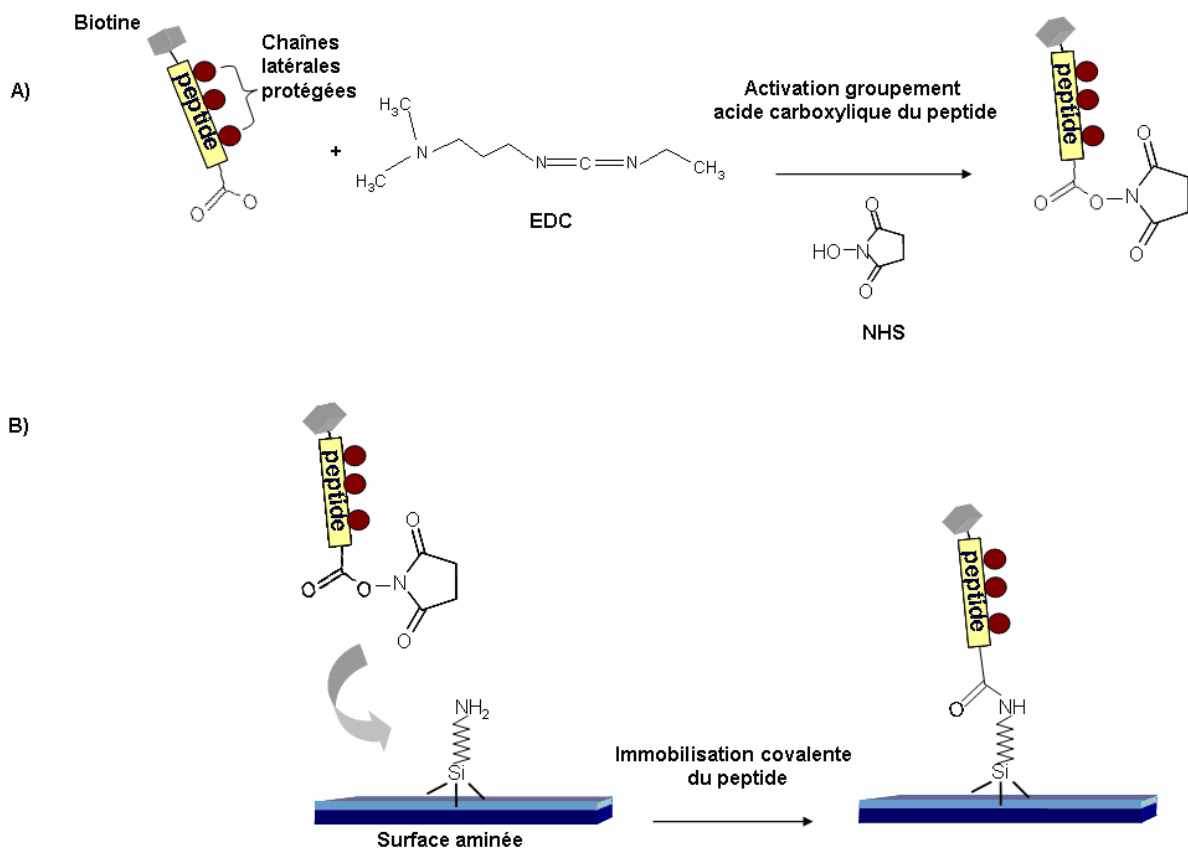


Fig.III.4. A) Activation du groupement acide carboxylique du peptide et B) immobilisation sur lame de verre aminé.

Une étude antérieure réalisée au laboratoire, a établi que la densité de greffage de peptides NHS ester activé sur lames de verre aminées est optimale pour une concentration en peptide de $2 \cdot 10^{-3}$ M solubilisé dans la NMP [4]. Se basant sur ces résultats, nous avons testés trois concentrations d'immobilisation du peptide épitope H3 protégé (10^{-4} M, $2 \cdot 10^{-3}$ M et 10^{-2} M), dissous dans la NMP. L'étude a été réalisée avec le peptide protégé sous forme NHS ester et sous forme non activée.

La détection des peptides immobilisés a été effectuée par marquage indirect à la streptavidine liée au Cy3 (*fig.III.5*). La densité de greffage du peptide a été considérée comme directement proportionnelle à l'intensité du signal de fluorescence mesuré.

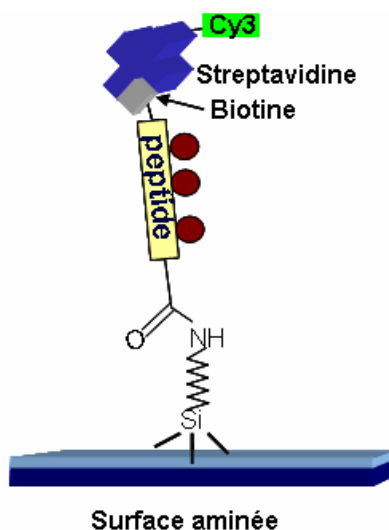


Fig.III.5. Marquage indirect avec la streptavidine liée au Cy3 du peptide immobilisé sur support aminé.

La figure III.6.A présente le plan de dépôt des solutions sur le support et les images de fluorescence obtenues après le marquage indirect avec la SAv-Cy3. Il apparaît que seuls les plots ayant reçu le peptide activé présentent un signal de fluorescence significatif. Le peptide non activé ainsi que la streptavidine-Cy3 (plots « solvant ») donne lieu à un très faible signal de fluorescence indiquant leur très faible adsorption non spécifique sur la surface.

Les intensités de fluorescence moyenne obtenues en fonction de la concentration en peptide, activé ou non, déposée sur la lame sont reportées dans la figure III.6.B. L'intensité de fluorescence obtenue avec le peptide activé augmente avec sa concentration de dépôt alors que celle obtenue avec le peptide non activé reste constante à un niveau très faible. Ce résultat met en évidence l'immobilisation

covalente dose-dépendante du peptide activé et confirme la très faible adsorption non spécifique du peptide non activé et de la strptavidine-Cy3. De plus, le rapport signal sur bruit, correspondant au rapport des intensités de fluorescence peptide activé / peptide non activé, calculé pour les différentes concentrations de solution peptidique est supérieur à 3 pour les concentrations $2 \cdot 10^{-3}$ M (rapport = 10,3) et 10^{-2} M (rapport = 16,5).

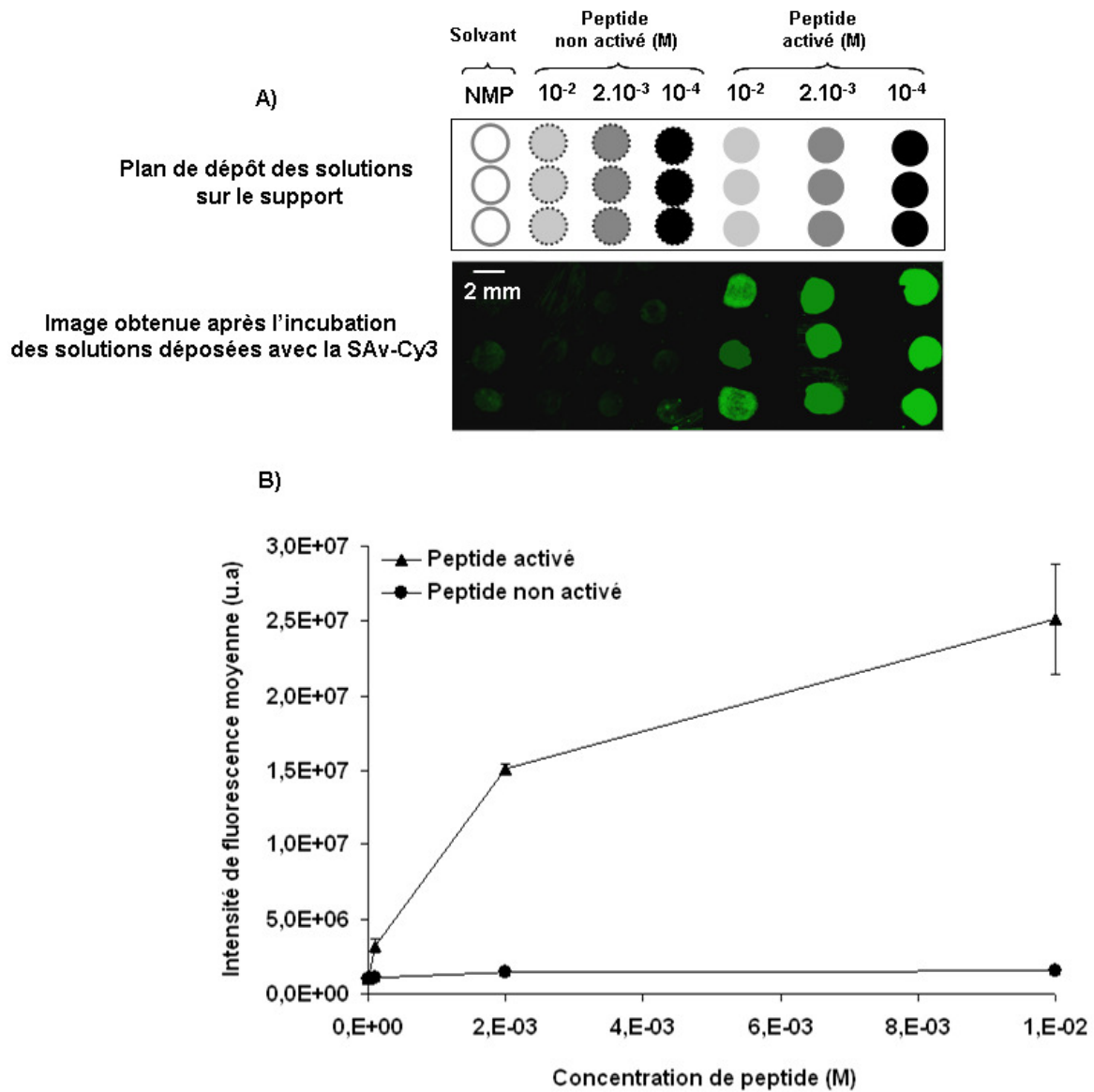


Fig.III.6. A) Plan de dépôt des solutions sur les lames aminées et image de fluorescence obtenue après l'incubation des plots de peptide protégé biotinylé et du solvant avec la SAV-Cy3. B) Influence de la concentration d'immobilisation du peptide protégé biotinylé sur la densité de greffage. Révélation avec la SAV-Cy3.

Nous pouvons donc conclure que l'immobilisation covalente du peptide activé sur le support aminé est efficace pour une concentration de dépôt de $2 \cdot 10^{-3}$ M.

II.3.2. Validation de la stabilité des surfaces de verre fonctionnalisées vis-à-vis du traitement de déprotection

Il était nécessaire de vérifier que la déprotection des peptides n'endommage pas les surfaces de verre fonctionnalisées par une couche de silane. Pour ce faire, des peptides présynthétisés, protégés sur leurs chaînes latérales et porteurs d'une biotine terminale sont greffés sur la surface. La surface ainsi biofonctionnalisée est exposée à un traitement de déprotection à l'acide trifluoroacétique (TFA). Puis, la densité de peptides biotinylés immobilisés est caractérisée par révélation à la streptavidine fluorescente avant et après déprotection. De plus, la capacité de reconnaissance de l'anticorps anti-peptide vis à vis des peptides immobilisés est testée avant et après déprotection. Plusieurs paramètres de déprotection ont été testés et comparés, comme la durée de la déprotection et l'influence de la densité de peptides greffés sur la surface.

II.3.2.1. Influence du temps de déprotection sur la stabilité des surfaces

Les groupements protecteurs acido-labiles Trt, Pmc et Otbu des chaînes latérales des résidus glutamine, arginine et glutamate sont classiquement clivés dans une solution de TFA 95% / triisopropyl silane 2,5 % / DCM 2,5 %. La durée de déprotection sur résine classique est de 1 à 3 h [166-168]. Le peptide modèle que nous avons utilisé est déprotégé sur résine, dans du TFA 95% en 1h 20 minutes (analyses par HPLC-MS, *cf. Annexe 1*).

Notre peptide modèle est greffé sur lame aminée à 3 concentrations de dépôt (10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} M dans la NMP). Après lavage, les lames sont traitées au TFA 95% / triisopropyl silane 2,5 % / DCM 2,5 % pour des durées de 1, 2 et 3h. Les densités relatives de peptides sont évaluées par révélation avec une solution de streptavidine marquée au Cy3 (*figs. III.7 et III.8.A*), avant et après déprotection. Pour l'analyse des données obtenues, nous faisons l'hypothèse que l'intensité de fluorescence est directement reliée à la densité de peptides biotinylés présents sur la surface.

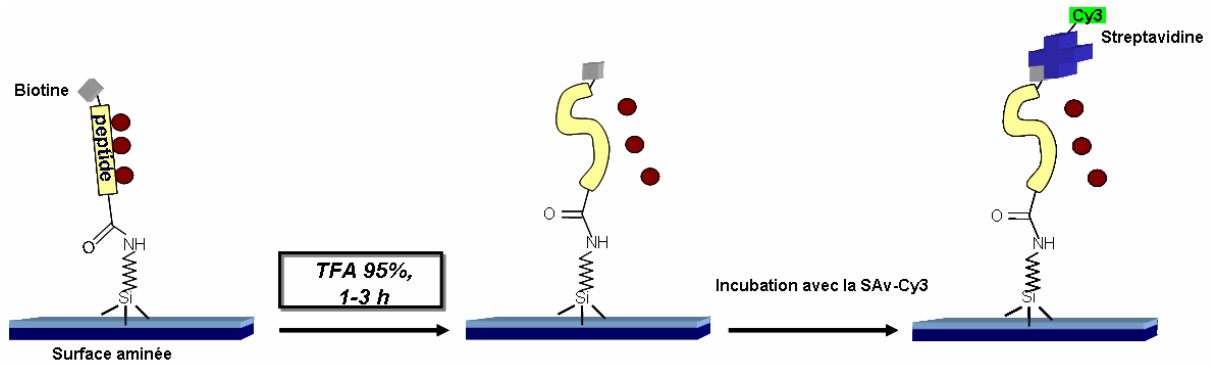


Fig.III.7. **Traitement au TFA et marquage indirect du peptide avec la streptavidine liée au Cy3.**

L'image de fluorescence obtenue avant et après le traitement au TFA est présentée dans la figure III.8.A.

Les valeurs des intensités de fluorescence moyenne en fonction du temps de déprotection sont présentées dans la figure III.8.B. Chaque point du graphe correspond à plus de 9 répétitions (les expériences sont effectuées sur 3 puces avec un triplicata de plots/par puce). La répétabilité et la reproductibilité des tests est étudiée en calculant les coefficients de variation (CV) intra- et inter-essais, pour quantifier, respectivement, la variabilité entre les réplicats au cours d'une même série d'analyse, ou au cours des différentes séries d'expériences. Les CV moyen intra et inter-essais obtenus sont de $7,4 \pm 2,1\%$ et $11\% \pm 10\%$, ce qui nous permet de conclure que les différents tests effectués sont répétables et ont une bonne reproductibilité.

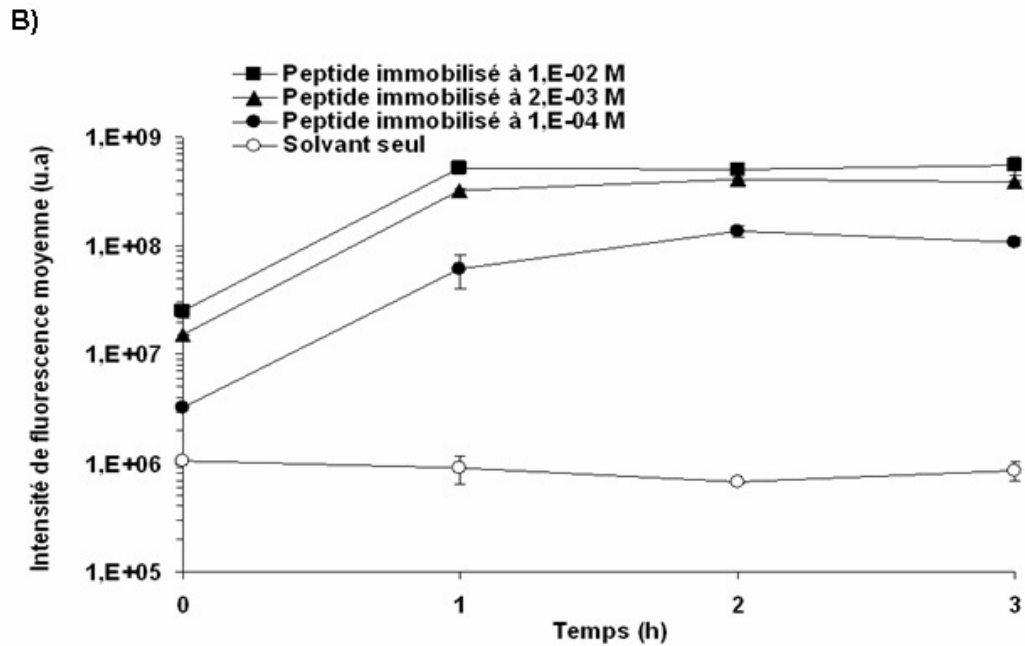
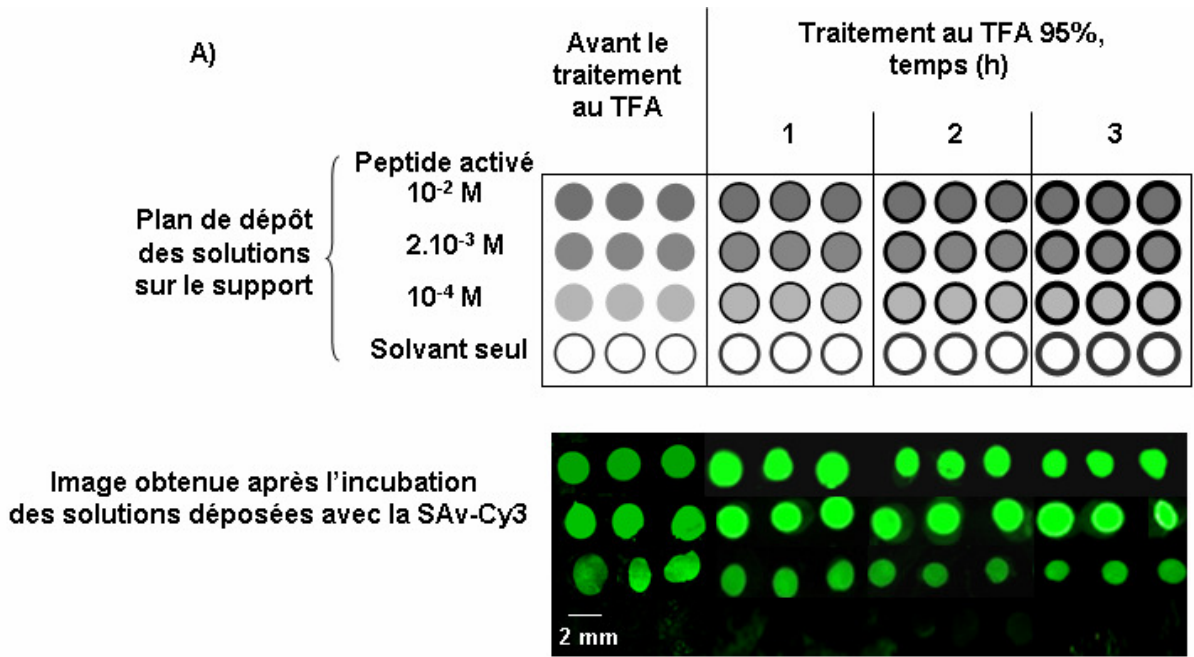


Fig.III.8. A) Plan de dépôt des solutions sur les lames aminées et image de fluorescence obtenue après l'incubation des plots de peptide biotinylé et du solvant avec la SAv-Cy3.
 B) Test de la stabilité de la surface avant et après le traitement du peptide au TFA. Révélation avec la SAv-Cy3.

L'adsorption non spécifique de streptavidine-Cy3 (courbe « solvant seul ») sur le support bloqué à la BSA entraîne l'apparition d'une fluorescence résiduelle (bruit de fond) de l'ordre de 10⁶ unités arbitraires de fluorescence. De plus, cette valeur est constante et indépendante de la durée de déprotection.

Par ailleurs, l'intensité de fluorescence des plots de peptides immobilisés augmente avec la concentration du peptide dans la solution déposée. Après 1h de déprotection

les intensités de fluorescences obtenues sont supérieures en moyenne d'un facteur 25 à celles observées avant déprotection. Notons que le même lot de streptavidine-Cy3 a été utilisé pour l'ensemble des points de mesure et que la décongélation des aliquots de streptavidine-Cy3 a été totale avant préparation des solutions de travail, ce qui exclut des différences de concentration liées à une décongélation incomplète des solutions. Quatre hypothèses peuvent alors expliquer ce résultat :

1) La Cy3, comme tout fluorophore, est susceptible de voir son rendement quantique modifié par son environnement physicochimique (et notamment par l'interaction avec la surface du support solide). Toutefois les streptavidines sont marquées de manière aléatoire, et les Cy3 sont donc réparties aussi bien vers la surface que vers la solution.

2) L'intensité de fluorescence est reliée directement à la densité surfacique de streptavidine-Cy3.

3) L'augmentation de fluorescence suite à la déprotection pourrait être expliquée par la nature hydrophobe des peptides avant déprotection. En effet, les peptides protégés sont fortement hydrophobes, leur coefficient de partage octanol/eau théorique (LogP) est d'environ 8 (calcul effectué avec le logiciel Hyperchem 7.5). En présence d'une solution aqueuse et saline de streptavidine, les peptides sont sans doute plaqués à la surface de la couche de silane, dont le caractère est également hydrophobe (angle de contact avec l'eau de $80^{\circ} \pm 10$ juste après fabrication). Dans ces conditions, la biotine est moins accessible aux molécules de streptavidine qu'en milieu liquide et l'interaction streptavidine/biotine est sans doute défavorisée, sachant que les sites de reconnaissance de la streptavidine pour la biotine sont peu exposés à la surface de la protéine (*fig.III.9*) [169].

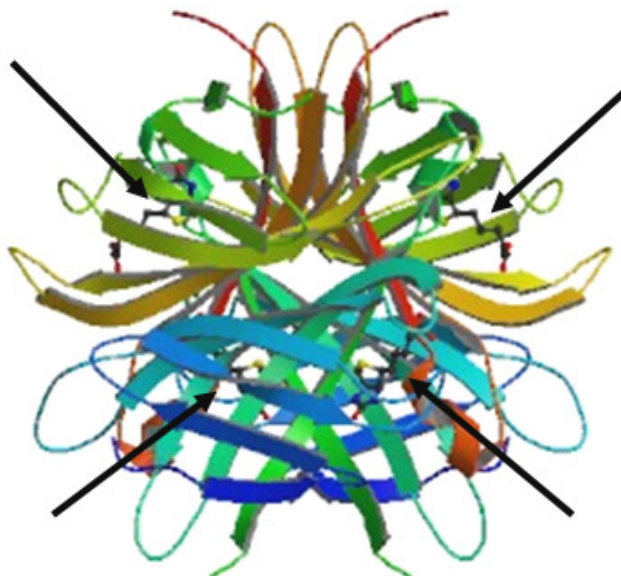


Fig.III.9. Représentation schématique de la streptavidine occupée par 4 molécules de biotine au niveau de ses sites de reconnaissance (indiqués par les 4 flèches) [170].

4) La BSA, protéine utilisée pour le blocage des lames avant révélation à la streptavidine, est connue pour présenter une forte affinité pour des structures hydrophobes. Le dépôt de BSA sur la surface en milieu aqueux pourrait amener la formation d'interactions hydrophobes entre les zones hydrophobes de la BSA, d'une part, la surface de silane et/ou les peptides d'autre part. La BSA serait ensuite difficile à déplacer par les molécules de streptavidine en milieu aqueux, ce qui diminuerait l'accessibilité de la biotine terminale à chaque streptavidine.

Après déprotection, les peptides deviennent fortement hydrophiles ($\log P$ théorique calculé = -6,6). En milieu aqueux, le peptide interagit préférentiellement avec l'eau plutôt qu'avec la surface hydrophobe, ce qui le rend plus accessible aux molécules de streptavidine, favorise la formation de complexe streptavidine/biotine et augmenterait ainsi le signal de fluorescence par rapport aux peptides protégés immobilisés.

Pour les 3 concentrations de solution de peptide testées, le signal de fluorescence mesuré sur les plots de peptide reste stable après 1 à 3 h de réaction. Le signal de fluorescence des spots de peptides est de 60 à 500 fois plus fort que le témoin « solvant seul » pour une même durée de déprotection. Ces résultats semblent indiquer d'une part que la surface reste stable vis-à-vis du traitement de déprotection dans une solution de TFA 95%, et ce jusqu'à 3h de traitement à température ambiante, et d'autre part que les peptides ne sont pas clivés de la surface.

II.3.3. Conservation de l'activité biologique du peptide après la déprotection

Afin de déterminer le temps optimal de déprotection du peptide, nous avons étudié son interaction biologique avec l'anticorps polyclonal anti-histone H3, avant et après le traitement acide.

L'activité biologique du peptide déprotégé et clivé au TFA sur résine a déjà été vérifiée en ELISA, en testant son interaction avec l'anticorps polyclonal anti-histone H3 (*cf. paragraphe II.2*). Il s'agit maintenant de vérifier que le peptide, immobilisé sur support de verre fonctionnalisé et déprotégé au TFA, conserve son activité biologique. Pour cela, la reconnaissance biologique de l'anticorps anti-histone H3 (dilué au 1:10⁴) vis-à-vis du peptide immobilisé est étudiée avant et après le traitement au TFA 95%, pendant 1 à 3 h de réaction. L'interaction peptide/anticorps anti-peptide est révélée avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin marqué au Cy3 (*fig.III.10*). Les résultats sont présentés dans la figure III.11.

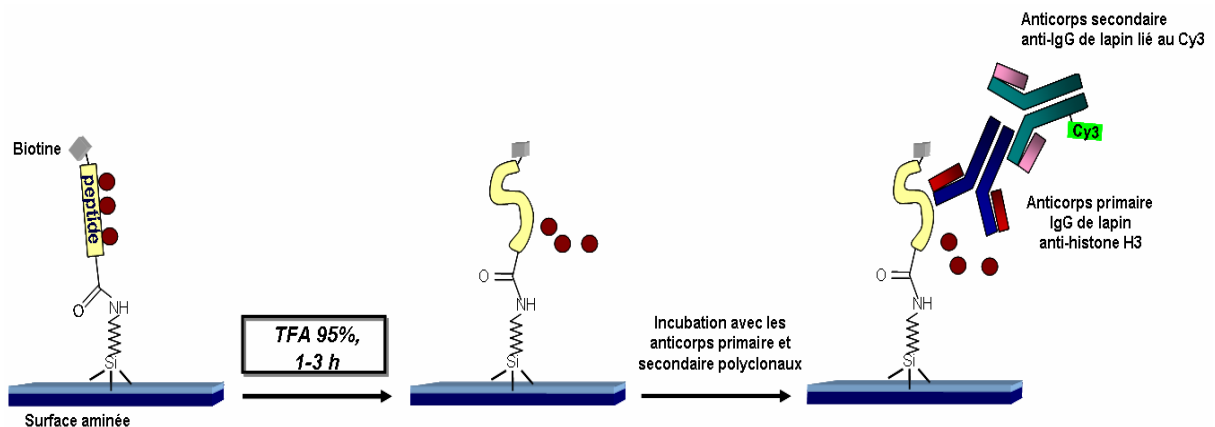


Fig.III.10. Test de l'interaction biologique entre l'anticorps polyclonal anti-histone H3 et le peptide immobilisé sur support aminé. Révélation avec l'anticorps secondaire lié au Cy3.

Les coefficients de variation moyen intra- et inter-essai sont respectivement de $10 \pm 2\%$ et de $16 \pm 10\%$, ce qui est légèrement supérieur à ceux obtenus pour la stabilité des surfaces. En fait, le nombre d'étapes, pour les tests de reconnaissance biologique, est plus important (dépôts de peptide/anticorps primaire/anticorps secondaire) ce qui peut augmenter la variabilité des résultats.

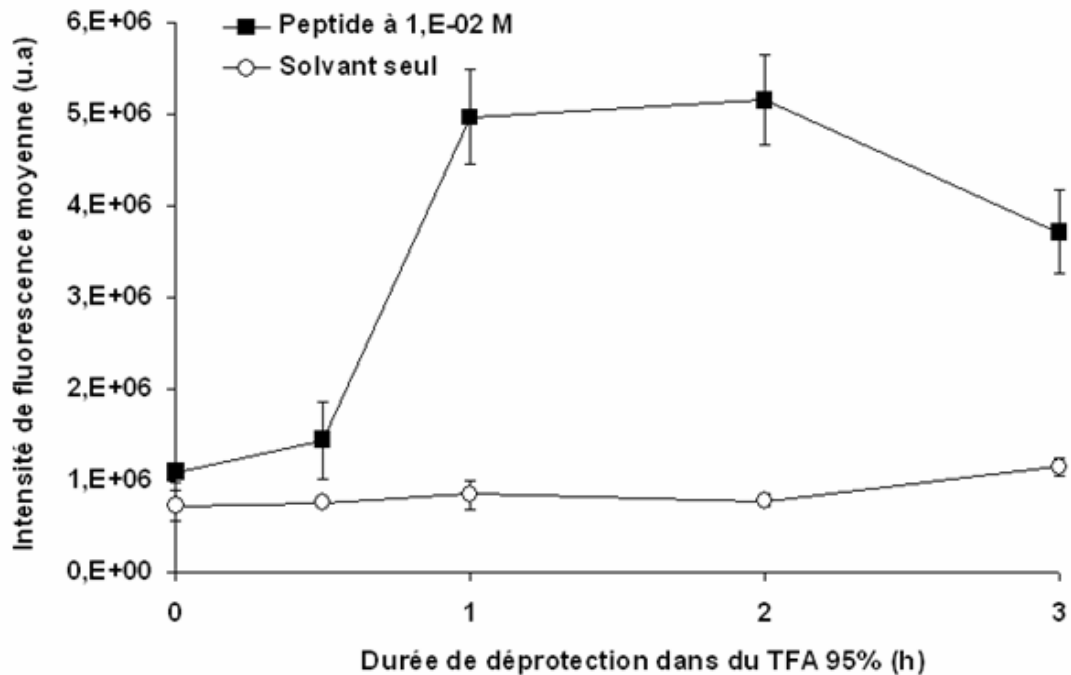


Fig.III.11. Test de l'interaction biologique entre l'anticorps primaire anti-histone H3 et le peptide sur support avant et après le traitement au TFA. Le peptide a été immobilisé à une concentration de 10^{-2} M. Révélation avec l'anticorps secondaire marqué au Cy3.

Avant le traitement au TFA, un bruit de fond d'environ 10^6 unités arbitraires de fluorescence est observé sur les plots du peptide et les plots témoins (dépôt de solvant seul) incubés avec les anticorps.

Après une heure de déprotection, l'intensité de fluorescence mesurée sur les plots de peptide immobilisé est de 4 à 5 fois plus forte que celle du bruit de fond. Sur les spots de solvant seul signal reste à hauteur de 10^6 u.a, ce qui indique une faible adsorption non spécifique des anticorps secondaires fluorescents et des autres espèces impliquées dans la réaction de révélation. Une diminution de la moyenne de fluorescence est observée pour une déprotection de 3 h. Toutefois, considérant l'écart-type des résultats obtenus, il est difficile d'affirmer que cette baisse est significative par rapport aux déprotections de 1 et 2 h. Par ailleurs, le graphe III.8 indique qu'une déprotection de 3h ne paraît pas diminuer significativement la densité de peptides biotinylés. Cette possible diminution de la reconnaissance peptide/anticorps pourrait cependant être attribuée à une dégradation partielle des amino-acides du peptide, suite au traitement de déprotection.

Afin d'étudier l'influence de la densité du peptide greffé et déprotégé pendant 1 h au TFA 95% sur l'évaluation de son activité biologique avec l'anticorps primaire, l'interaction du peptide immobilisé à différentes concentrations 10^{-4} , $2 \cdot 10^{-3}$ et 10^{-2} M a

été testée avec l'anticorps primaire dilué au $1:10^4$, et révélée avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin marqué au Cy3. Les résultats présentés dans la figure III.12 indiquent que l'intensité de fluorescence est plus forte pour le peptide immobilisé à $2 \cdot 10^{-3}$ et 10^{-2} M qu'à 10^{-4} M. Les densités de greffage obtenues pour des concentrations d'immobilisation du peptide à $2 \cdot 10^{-3}$ et 10^{-2} M permettent de mieux évaluer son activité biologique et son interaction avec l'anticorps primaire après le traitement de déprotection.

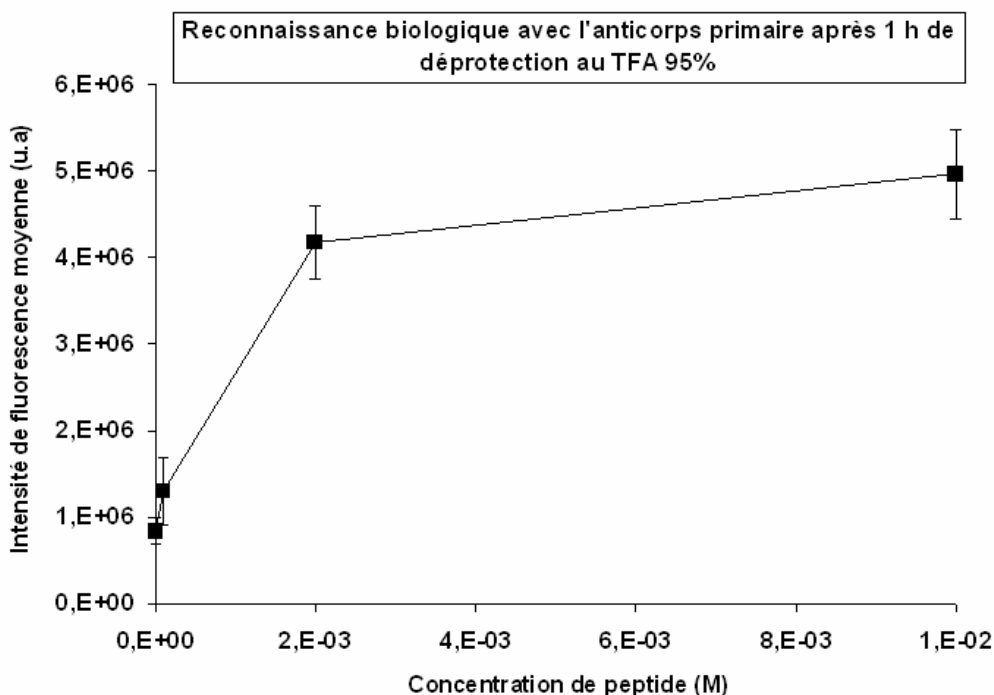


Fig.III.12. Influence de la concentration d'immobilisation du peptide déprotégé (TFA 95%, 1h) sur son activité biologique avec l'anticorps primaire (dilué au $1:10^4$). Révélation avec l'anticorps secondaire lié au Cy3.

Ces résultats indiquent d'abord que les peptides sont présents sur la surface après déprotection, ce qui confirme les résultats du paragraphe précédent. De plus, une heure de traitement au TFA semble être suffisante pour déprotéger les peptides immobilisés et permettre leur interaction de façon significative avec l'anticorps anti-histone H3, notamment pour des concentrations d'immobilisation du peptide supérieure à 10^{-2} M.

Comme observé en ELISA (cf. paragraphe II.2), le peptide déprotégé présente une affinité pour l'anticorps anti-histone H3 significativement plus forte que le peptide protégé (signal de 3 à 4 fois plus important que pour le peptide protégé). Par ailleurs, la structure primaire du peptide semble être conservée car aucune dégradation

significative n'est observée après déprotection sur puce. Une analyse par HPLC-MS après clivage des peptides du support permettrait de vérifier leur structure primaire, ce qui n'a pu être entrepris dans ce travail de thèse.

Afin d'étudier l'influence de la concentration en anticorps primaire sur l'évaluation du rendement de déprotection du peptide, nous avons testé l'interaction du peptide immobilisé à 10^{-2} M, et déprotégé pendant 1h, avec l'anticorps primaire anti-histone H3 incubé à différentes concentrations (gamme de dilution de 10^{-8} à 10^{-3}).

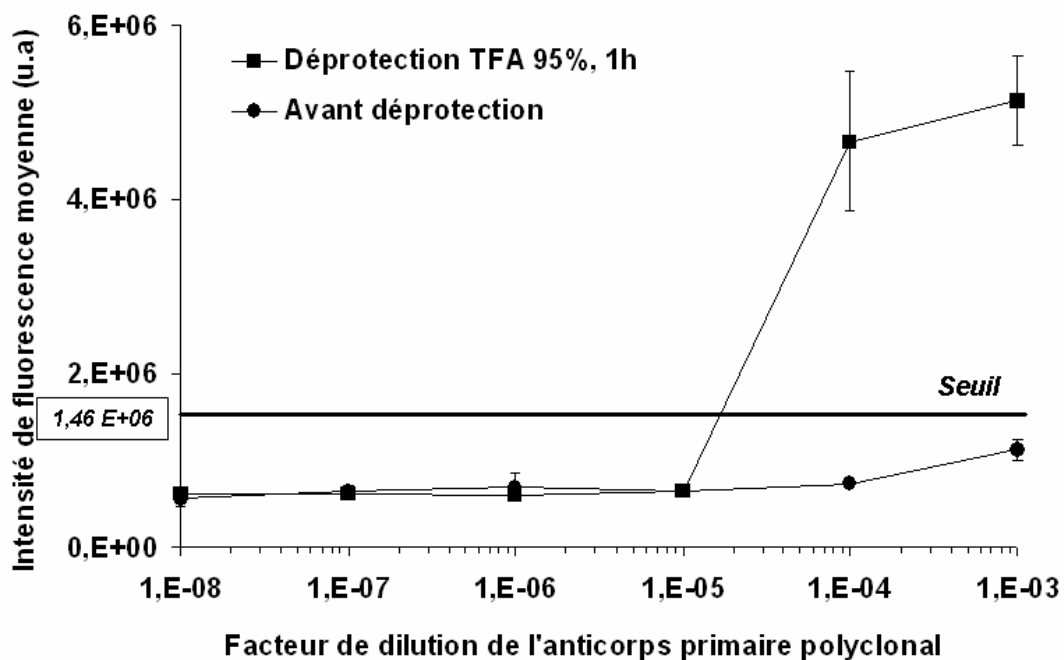


Fig.III.13. Influence de la concentration de l'anticorps primaire sur l'évaluation de la déprotection du peptide. Révélation de l'interaction entre le peptide et l'anticorps avec l'anticorps secondaire lié au Cy3.

D'après le graphe de la figure III.13, après la déprotection du peptide, l'intensité du signal de fluorescence augmente avec la concentration de l'anticorps primaire incubé. La limite de détection de l'anticorps anti-histone H3 est estimée à $2 \cdot 10^{-5}$. Une dilution de l'anticorps à 10^{-4} est donc suffisante pour tester l'activité biologique du peptide déprotégé.

II.3.4. Conclusion

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus met en évidence qu'il est possible de déprotéger de manière efficace, dans du TFA 95% pendant une heure,

des peptides protégés immobilisés sur verre silanisé. Ce traitement de déprotection ne dégrade pas les surfaces et ne semble pas diminuer la densité surfacique de peptides immobilisés, même pour des temps de déprotection de 3h. Une déprotection de 1h confère aux peptides une reconnaissance significative par les anticorps anti-histone H3, ce qui est cohérent avec les analyses ELISA réalisées. Ce protocole de déprotection étant validé avec un peptide immobilisé par voie *ex situ*, il nous a été possible de tester la même méthode de déprotection sur des peptides synthétisés directement sur support de verre silanisé.

II.4. Synthèse peptidique *in situ* sur substrat de dioxyde de silicium aminé

Le peptide biotinylé 16-mers GGIQLARRIRGERAGG protégé sur ses chaînes latérales a été synthétisé par la chimie des Fmoc sur des substrats de dioxyde de silicium (22 x 22 mm) aminés. La synthèse est effectuée de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale du peptide. Le premier monomère d'acide aminé Fmoc-Gly-Opfp est fixé sur le support aminé par son groupement α -carboxyle, en présence de l'activateur HOBt (*fig.III.14*). La quantité d'acides aminés activés déposée sur le support est 10 fois en excès par rapport à la densité estimée des fonctions amines portées par la surface. Le nombre de moles de chaque monomère injecté sur le support de 4,84 cm² est estimé à 17 nmol. Après la déprotection de la fonction α -amine du résidu fixé, chaque monomère est couplé successivement à la chaîne peptidique en cours de synthèse. Les monomères sont ajoutés 10 fois en excès, en prenant en considération les pertes et le faible rendement des différentes étapes de déprotection des groupements Fmoc et de couplage, au cours de la synthèse.

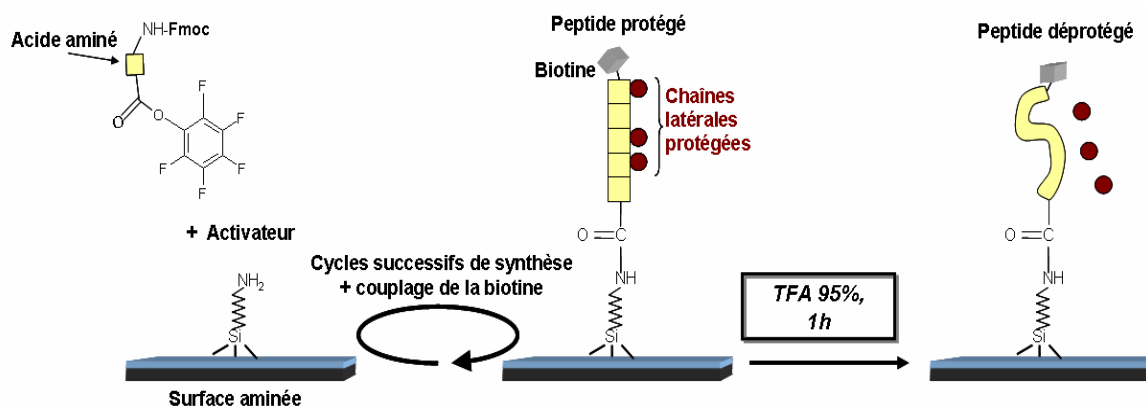


Fig.III.14. Principe de la synthèse peptidique effectuée sur le substrat de silicium aminé et déprotection finale du peptide.

Plusieurs étapes clés doivent être aussi prises en considération au cours de la synthèse peptidique *in situ* sur le support aminé : i) le couplage covalent du premier monomère fixé sur le support, ii) la déprotection de la fonction α -amine et le couplage de chaque monomère, iii) les réactions secondaires qui peuvent se produire au cours des différentes étapes de couplage et altérer la structure primaire du peptide en cours de synthèse, et iv) la déprotection finale de la sonde peptidique synthétisée.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à plusieurs points clés: i) le couplage covalent du peptide protégé synthétisé sur la surface aminée, ii) l'étape finale de sa déprotection au TFA, en nous appuyant sur les résultats de la partie II.3, iii) la stabilité de la surface fonctionnalisée après les différentes étapes de synthèse et de déprotection acide, et iv) l'activité biologique du peptide synthétisé *in situ*, avant et après le traitement de déprotection.

II.4.1. Caractérisation des analyses de fluorescence

Le scanner Axon utilisé dans l'équipe pour les analyses de fluorescence présente un certain nombre de limitations dont il a fallu tenir compte pour caractériser correctement le comportement des peptides synthétisés sur support plan. Ces limitations sont les suivantes : la nacelle de support des échantillons est conçue pour contenir une lame de microscope standard (76 x 26 mm) ; le scanner analyse la face inférieure de la lame dans la nacelle ; la tête de lecture passe à environ 1 mm de la surface de la lame ; le faisceau laser d'excitation de la fluorescence est focalisé sur un plan focal fixe et défini par 3 pointes en saphir, sur lesquelles est posée la lame de verre ; le scanner ne peut pas ajuster sa focale ; la nacelle ne peut pas contenir de manière stable un fragment de lame de microscope inférieur à 1/3 de lame.

La synthèse de peptide a été effectuée sur un support de Si/SiO₂ carré de 22 mm de côté. Ce type de support, couramment mis en oeuvre dans notre équipe, a été utilisé pour plusieurs raisons : i) sa dimension est adaptée à la taille du réacteur mis en place pour la synthèse peptidique (volume faible pour minimiser la consommation de réactifs) (*cf. Annexe 2*) ; ii) le support est facilement clivable pour former des fragments analysables selon différentes modalités ; iii) l'épaisseur de la silice thermique est de 90 nm, ce qui permet une exaltation de l'intensité du signal de fluorescence du Cy3. En effet, il a été démontré que le bruit de fond mesuré sur un substrat de Si/SiO₂ est deux fois plus faible que celui obtenu sur un support de verre [171]. En plus, contrairement au verre, l'autofluorescence des substrats de dioxyde

de silicium est négligeable et le signal du bruit de fond n'est dû qu'aux adsorptions non spécifiques des cibles sur le support. La diminution du bruit de fond résulte permet donc une amélioration significative (\sim facteur 10) de l'intensité du signal biologique mesuré par rapport au bruit; iv) le support peut être fixé de manière simple par capillarité sur une lame de verre, son épaisseur est inférieure à 1 mm et il peut donc être analysé par le scanner Axon.

Le fait que le scanner ne soit pas auto-focus entraîne une limitation importante : un spot fluorescent éloigné du plan focal présente un signal de fluorescence plus faible qu'un spot similaire de même densité surfacique de fluorophores, situé dans le plan focal. En effet, la densité de photons du faisceau d'excitation est maximale dans le plan focal, et décroît avec la distance au plan focal. Le substrat Si/SiO₂ est posé sur la lame de verre et maintenu par capillarité. Sa surface se trouve donc déportée hors du plan focal. Le signal de fluorescence mesuré est donc plus faible qu'un spot similaire sur une lame de verre (*fig.III.15*).

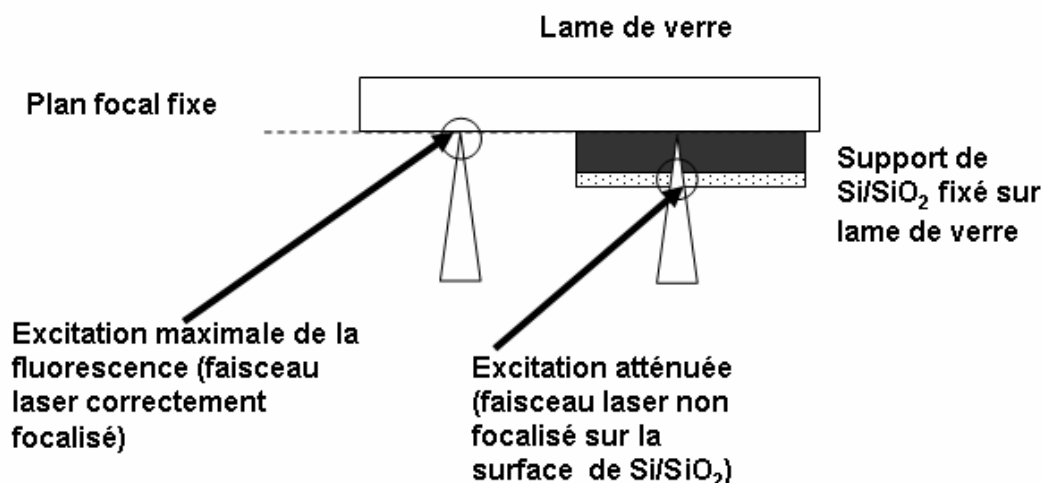


Fig.III.15. Description de la focalisation du faisceau laser sur la surface des supports (lame de verre et Si/SiO₂) analysés avec le scanner Axon.

Plusieurs possibilités ont été envisagées pour permettre d'améliorer les analyses de fluorescence des supports Si/SiO₂ avec le scanner Axon :

- i) fabriquer une lame de verre gravée chimiquement permettant de fixer la surface des supports Si/SiO₂ sur le plan focal ; faute de masque de lithographie adapté aux dimensions adéquates, cette solution n'a pas pu être mise oeuvre pour nos analyses. Elle sera utilisée dans la suite de nos travaux.
- ii) employer un autre type de lecteur de fluorescence, moins sensible à la profondeur de champ. En l'occurrence l'équipe dispose maintenant d'un imageur de fluorescence par caméra CCD (Charge-Coupled Device) adapté; dans la suite de

nos travaux nous pourrions analyser nos supports sur ce dispositif et comparer les résultats obtenus par synthèse peptidique *in situ* à ceux obtenus sur des peptides immobilisés par voie *ex situ* sur des supports analysés avec le même dispositif.

iii) comparer expérimentalement les fluorescences de plots déposés sur lame de verre et sur Si/SiO₂ fixé sur verre ; cette troisième solution a été mise en place pour pouvoir comparer les lames de verre *ex situ* (immobilisation de peptide) et les supports Si/SiO₂ en tenant compte de leurs différences de comportement optique.

Pour comparer les intensités de fluorescence de plots sur les deux supports, différentes dilutions (10⁻⁶ à 10⁻³) d'une solution de streptavidine-Cy3 (1mg/mL) sont préparées et des plots de 1 µL de chaque solution sont déposés à la surface des supports de verre et de Si/SiO₂ (fig.III.16). L'analyse de fluorescence est ensuite effectuée sur le scanner Axon (PMT 500). Le support Si/SiO₂ est fixé par capillarité sur la lame de verre et analysé sur le scanner.

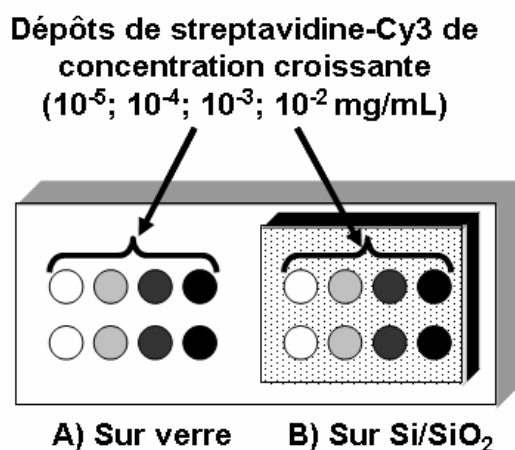


Fig.III.16. Plan de dépôt des solutions de streptavidine-Cy3 sur la lame de verre et sur le support Si/SiO₂ fixé sur la lame.

Pour chaque concentration testée, l'intensité de fluorescence des plots déposés sur lame de verre et sur support Si/SiO₂ est mesurée. La figure III.16 présente cette intensité de fluorescence sur support Si/SiO₂ en fonction de celle obtenue sur lame de verre. Une bonne corrélation ($r = 0,9902$) est observée entre les résultats obtenus sur les deux types de supports. De plus, l'intensité de fluorescence augmente avec la concentration de dépôt de la SAv-Cy3 sur les surfaces. Une fonction de transfert expérimentale moyenne ($y = 8,9357x + 5.10^6$) est obtenue à partir de la droite de corrélation des résultats sur support Si/SiO₂ et sur verre (fig.III.17). Afin de comparer les résultats de la synthèse peptidique *in situ* sur supports Si/SiO₂ aminés et ceux de

l'immobilisation de peptide par voie *ex situ* sur lames de verre aminées, nous devons donc prendre en considération la différence de comportement optique entre ces supports.

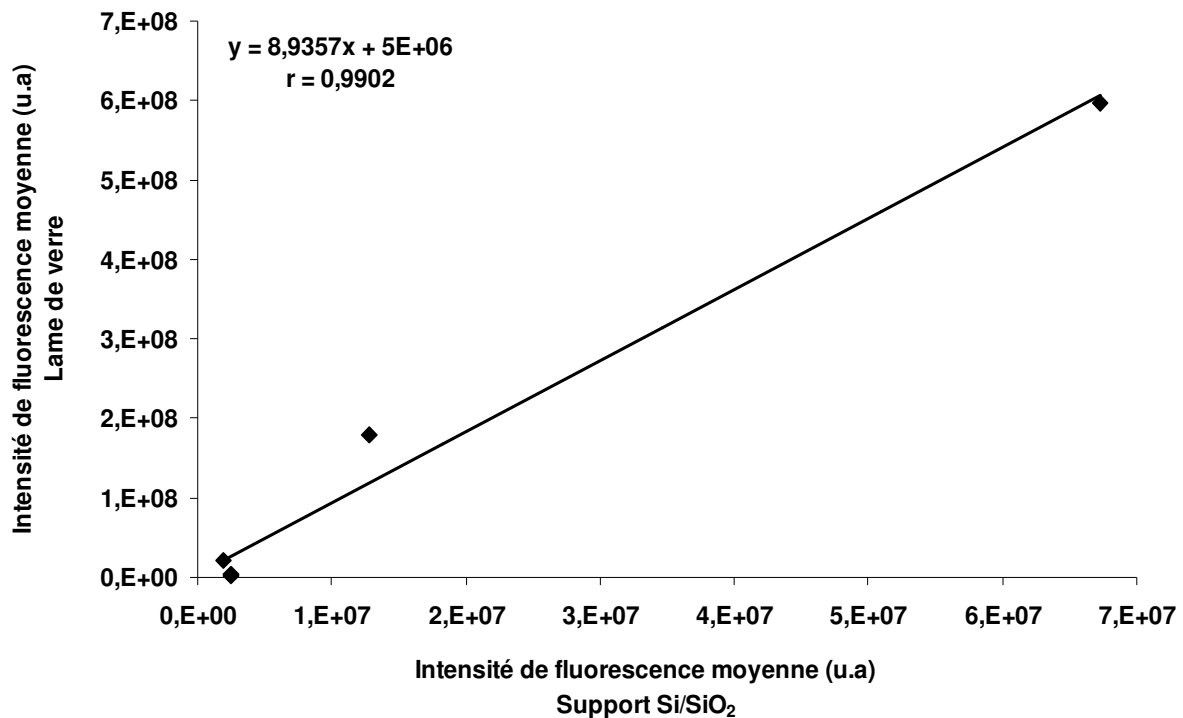


Fig.III.17. Droite de corrélation entre les intensités de fluorescence obtenue sur le support Si/SiO₂ et la lame de verre pour les plots de SAv-Cy3 déposés à concentration croissante (10⁻⁵ à 10⁻² mg/mL) sur les surfaces.

II.4.2. Validation du couplage covalent du peptide synthétisé

Les chaînes latérales des monomères d'acides aminés couplés, ainsi que leur fonction α-amine étant protégées, le couplage covalent s'effectue entre la fonction α-carboxyle des esters d'acides aminés activés et le groupement amine primaire porté par la surface fonctionnalisée du substrat de dioxyde de silicium. A la fin de la synthèse peptidique, la densité de peptides biotinylés greffés est évaluée par marquage indirect du peptide avec la SAv-Cy3 (*fig.III.18.A ; substrat A1*), comme dans le cas peptide immobilisé par voie *ex situ*.

Les adsorptions non spécifiques de la SAv-Cy3 sont testées après incubation de la SAv-Cy3 sur le support aminé (*fig.III.18.A ; substrat B3*), ayant subi un cycle de synthèse peptidique en présence du solvant organique seul, sans acides aminés en solution.

Les résultats obtenus après le dépôt de la SAv-Cy3 sont présentés dans la figure III.18.B.

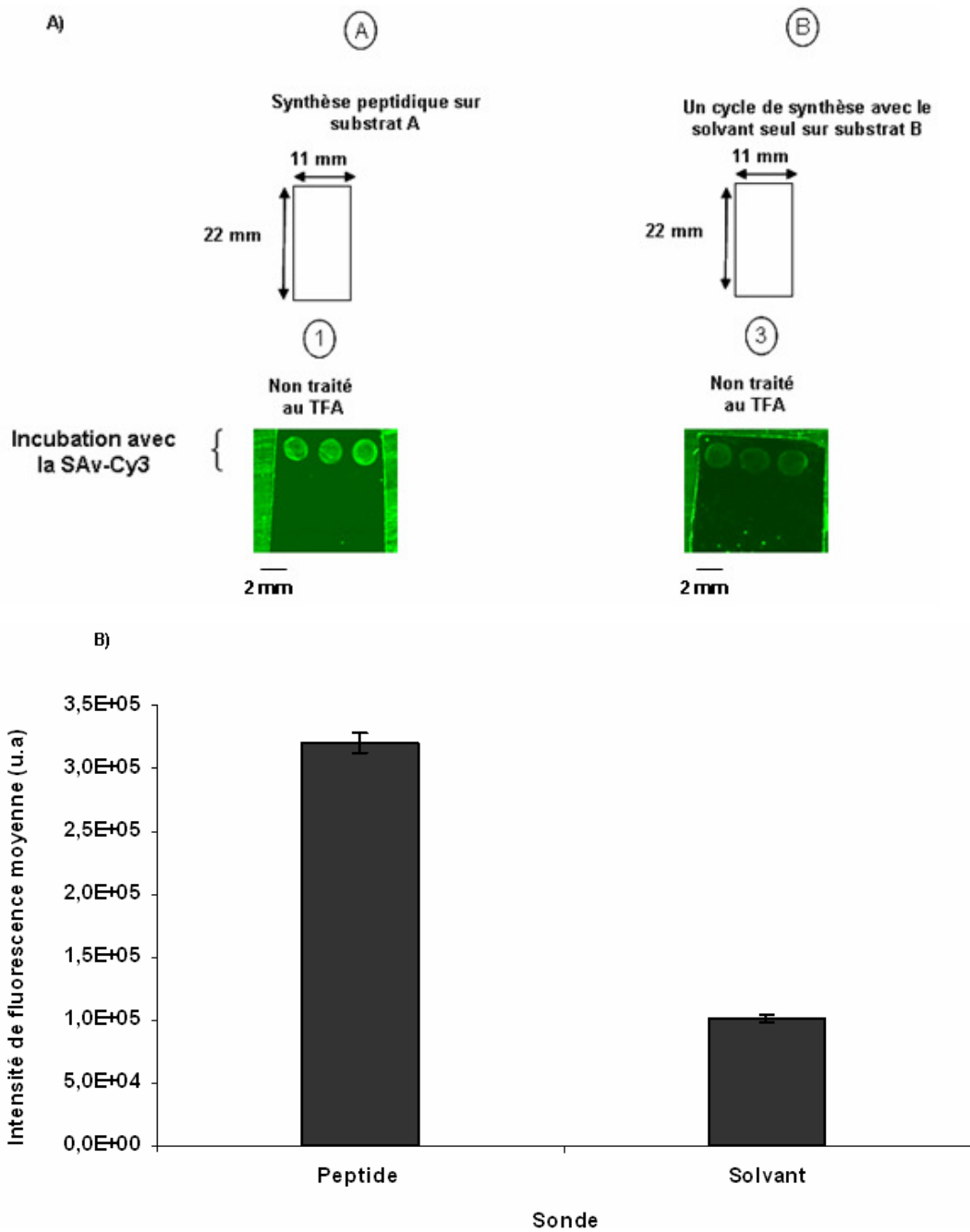


Fig.III.18. Evaluation de la synthèse *in situ* du peptide biotinylé.
 A) Substrats de dioxyde de silicium aminés. A1 : substrat sur lequel est effectuée la synthèse *in situ* du peptide biotinylé ; B3 : substrat témoin de l'adsorption non spécifique de la SAV-Cy3 sur la surface. Les images de fluorescence sont obtenues après incubation avec la SAV-Cy3.
 B) Marquage indirect à la SAV-Cy3 du peptide biotinylé synthétisé sur le support aminé.

L'intensité moyenne du signal mesurée sur les plots du substrat A1 est trois fois plus élevée que celle des plots du substrat B3 (solvant seul). Ce résultat met en évidence une faible adsorption non spécifique de la SAV-Cy3 sur la surface. Par ailleurs, les signaux de fluorescence observés sur les plots du substrat A1 incubés avec la SAV-Cy3, plots sur lequel a été effectuée la synthèse *in situ*, indiquent que le peptide est présent sur la surface, mais ne nous renseignent pas sur la structure primaire et

l'activité biologique du peptide synthétisé. Pour vérifier si le peptide protégé synthétisé *in situ* est biologiquement actif après sa déprotection, comme c'était le cas pour le peptide immobilisé par voie *ex situ*, nous avons testé son interaction biologique avec l'anticorps polyclonal anti-histone H3. Le protocole de déprotection acide au TFA 95%, pendant 1h, a donc été appliqué au peptide synthétisé directement sur le support.

La stabilité de la surface des substrats aminés, a également été testée après le traitement de déprotection au TFA. Cette surface a également subi les différents traitements effectués au cours des 17 cycles de synthèse peptidique (16 mers + biotine), et les cycles de déprotection sous conditions basiques (20% pipéridine/DMF) des groupements Fmoc de chaque acide aminé couplé.

II.4.3. Déprotection du peptide synthétisé *in situ*

II.4.3.1. Evaluation de la stabilité de la surface aminée après le traitement de déprotection et la synthèse peptidique

Les substrats A2 et B4 (11 x 22 mm) de la figure III.18.A, ont été traités au TFA et incubés avec la solution de SAV-Cy3. Les spots ont un diamètre d'environ 2 mm, et l'expérience a été réalisée en triplicata.

Les images de fluorescence sont présentées dans la figure III.19.A. Après traitement au TFA, le signal de fluorescence observé sur les plots du substrat A2 (plots « peptide *in situ* ») est supérieur d'environ 3 fois à ceux observés sur le substrat B4 (plots « solvant seul »). Ce résultat indique qu'après le traitement de déprotection, l'adsorption non spécifique de la SAV-Cy3 reste faible et du même ordre de grandeur qu'avant traitement. Les intensités de fluorescence mesurées sont présentées dans la figure III.19.B. Il apparaît que les intensités de fluorescence obtenues sur les plots des substrats (peptide ou solvant seul) traités au TFA (A2, B4), sont comparables à celles obtenues sur les substrats non traités (A1, B3), respectivement. Nous pouvons donc en conclure que le traitement de déprotection au TFA 95%, pendant 1h, n'altère pas la densité surfacique de peptide synthétisé *in situ*.

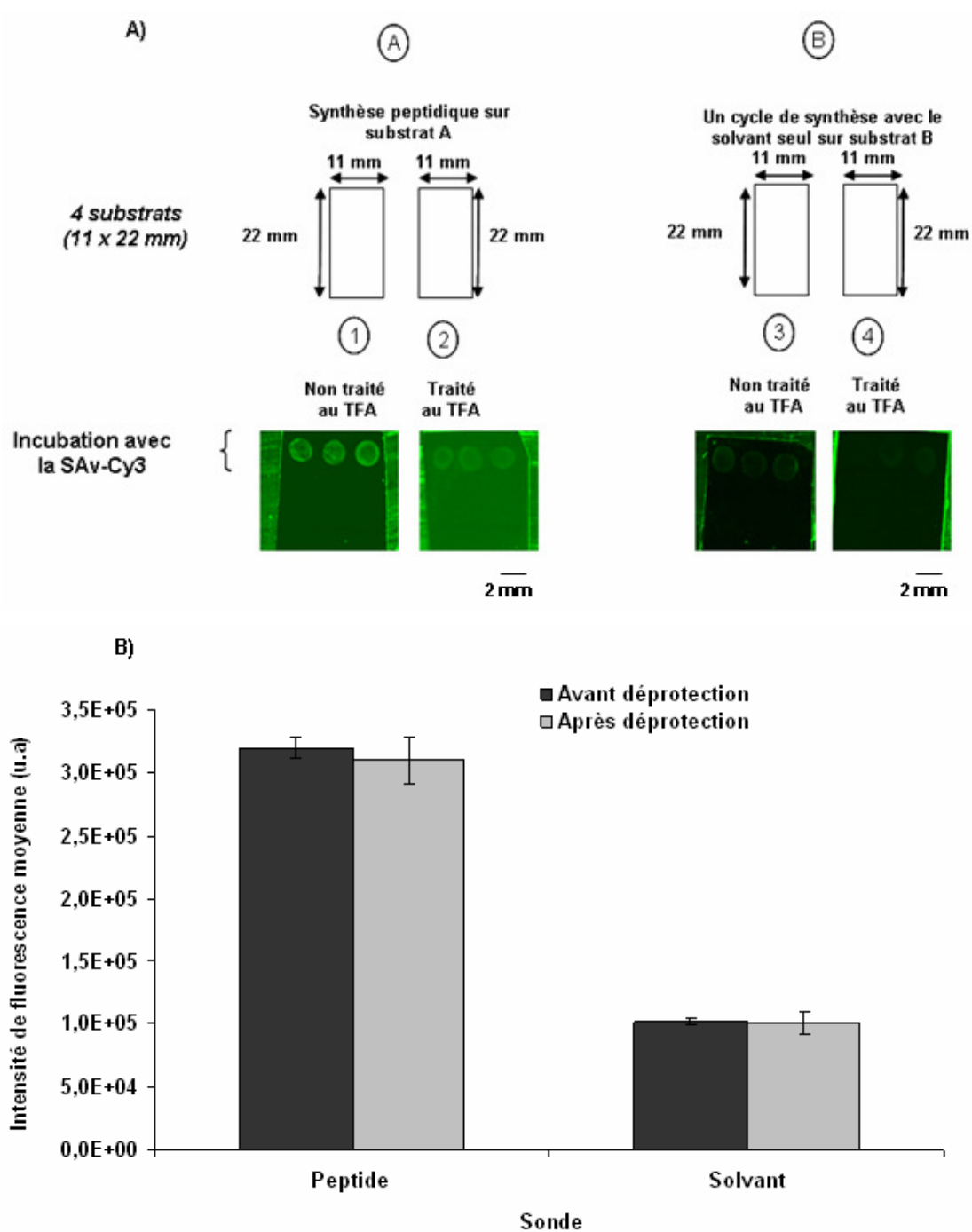


Fig.III.19. A) Substrats de dioxyde de silicium aminés. Les images de fluorescence sont obtenues après l'incubation avec la SAV-Cy3, avant et après le traitement au TFA 95%, pendant 1h.

B) Test de la stabilité de la surface avant et après le traitement au TFA du peptide synthétisé. Révélation avec la SAV-Cy3.

II.4.3.2. Caractérisation de l'activité biologique du peptide synthétisé

Pour vérifier si la sonde peptidique synthétisée *in situ* présente une activité biologique comparable à la même sonde immobilisée par voie *ex situ*, nous avons

testé l'interaction biologique du peptide synthétisée *in situ* avec l'anticorps polyclonal anti-histone H3, avant et après le traitement au TFA 95%, pendant 1h.

L'anticorps anti-histone H3, dilué à 10^{-4} et à 10^{-3} , est déposé en triplicata sur les 4 substrats. Des plots témoins de l'adsorption non spécifique de l'anticorps secondaire (tampon de dilution de l'anticorps primaire) sont également réalisés (fig.III.20). L'interaction peptide/anticorps anti-peptide est révélée avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin marqué au Cy3. Les images obtenues après l'analyse de fluorescence sont présentées sur la figure III.20. Aucune fluorescence n'a pu être détectée et mesurée sur ces plots, avant comme après déprotection. Différentes hypothèses peuvent être émises pour expliquer ce résultat :

- i) soit le peptide a correctement été synthétisé sur la surface mais sa densité surfacique n'est pas suffisante pour être détectée par l'anticorps primaire dans les conditions testées ;
- ii) soit le peptide n'a pas été correctement synthétisé, et il ne peut donc pas être reconnu par l'anticorps primaire spécifique anti-histone H3.

Ceci pourrait être vérifié par des analyses HPLC-MS des peptides. Pour cela il faudrait utiliser par exemple un photolinker en début de synthèse peptidique, afin de pouvoir cliver les peptides du support, par simple illumination, et permettre leur caractérisation.

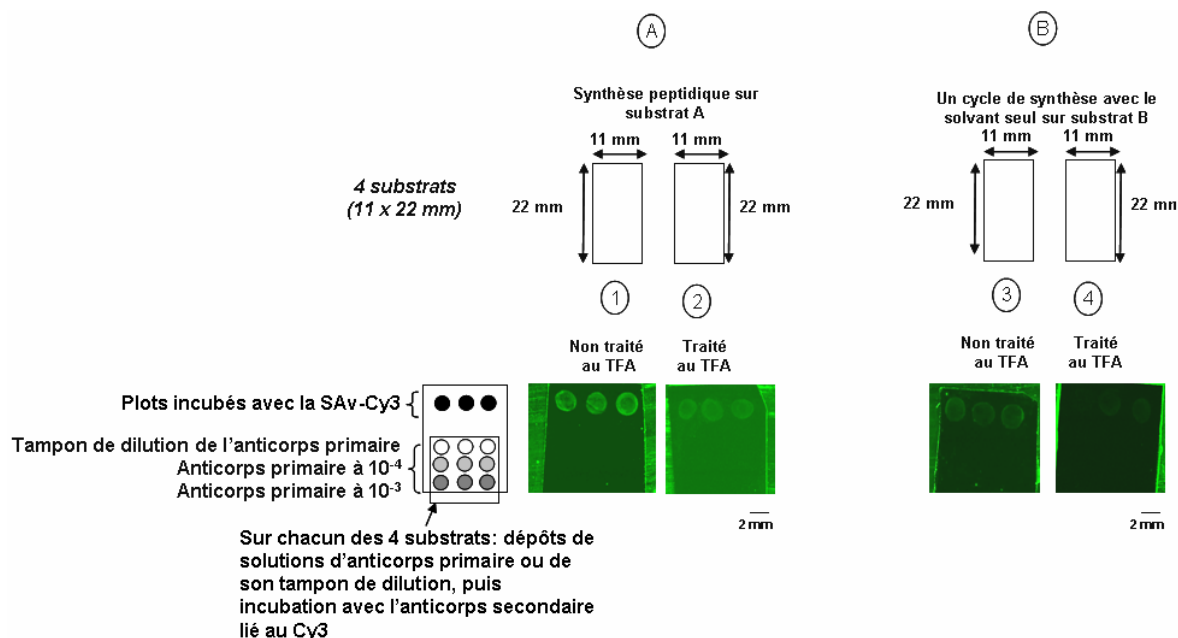


Fig.III.20. Substrats Si/SiO₂ aminés : plan de dépôts des anticorps polyclonaux et image de fluorescence (gain du PMT 500) obtenues avant et après le traitement au TFA 95%, pendant 1h.

III. Conclusion et perspectives

L'ensemble des travaux présenté ci-dessus constitue un étude préliminaire au développement de puces à peptide haute densité, élaborer par synthèse *in situ*, pour le criblage. Les résultats obtenus avec les sondes peptidiques immobilisées par voie *ex situ* sur lames de verre aminées ont, d'une part permis d'établir les conditions de déprotection des peptides garantissant le maintien de leur activité biologique, et d'autre part mis en évidence la stabilité des surfaces vis-à-vis du traitement acide de déprotection. Cependant, les résultats obtenus avec les sondes synthétisées *in situ* sur le support Si/SiO₂ aminé, ne sont pas ceux qui étaient attendus. En effet, aucune activité biologique du peptide synthétisé *in situ* n'a pu être révélée.

Nous avons donc comparé le comportement des sondes peptidiques obtenues par ces deux types de technique, avant et après déprotection. La figure III.21 présente les résultats obtenus sur les supports Si/SiO₂ (synthèse *in situ*) et sur les lames de verre (immobilisation de peptide *ex situ*) en tenant compte de la différence optique entre les deux supports (*cf. paragraphe II.4.1*). Nous remarquons que, avant déprotection, le signal de fluorescence obtenu avec le peptide synthétisé *in situ* correspond à une concentration comprise entre 10⁻⁴ et 2.10⁻³ M pour le peptide immobilisé par voie *ex situ*. Toutefois, après déprotection, le signal de fluorescence du peptide synthétisé *in situ* reste stable, alors que celui des peptides immobilisés par voie *ex situ* augmente. Ce comportement peut être expliqué par une modification du caractère hydrophobe/hydrophile du peptide suite au traitement de déprotection (*cf. paragraphe II.3.2.1*). Ainsi, si l'on considère que la densité surfacique « réelle » du peptide immobilisé par voie *ex situ* est obtenue après déprotection, la densité surfacique du peptide synthétisé *in situ* correspondante est alors inférieure à 10⁻⁴ M. Dans ce cas, l'activité biologique de reconnaissance du peptide déprotégé par les anticorps anti-H3, ne peut être révélée dans les conditions expérimentales utilisées (*cf. fig.III.12*).

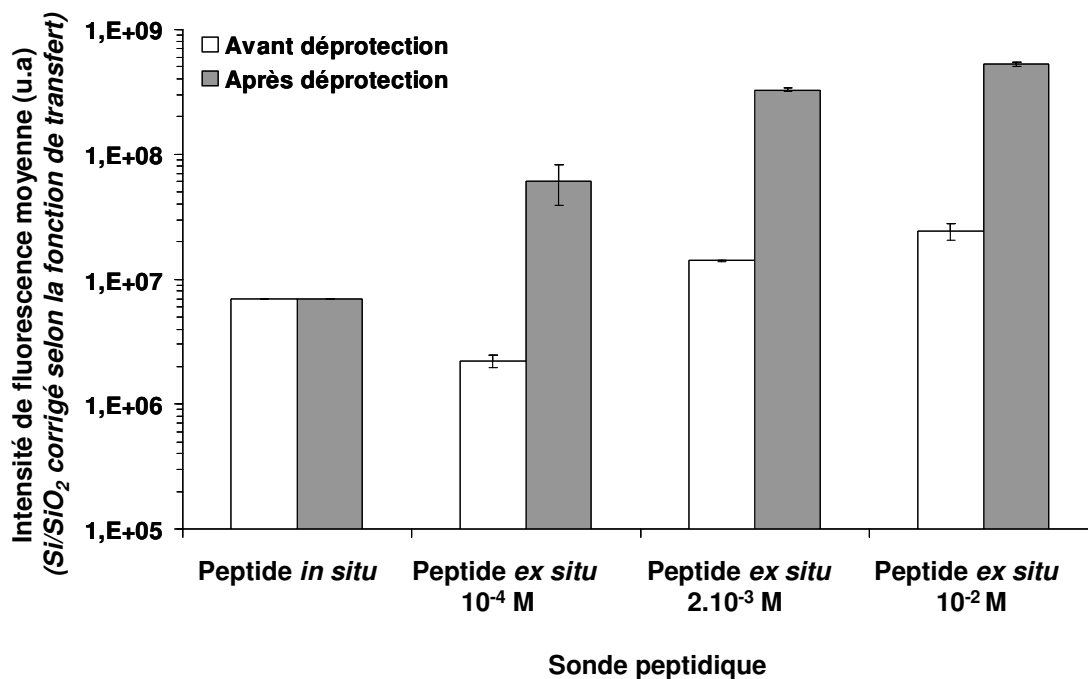


Fig.III.20. Comparaison entre le peptide biotinylé synthétisé *in situ* sur supports Si/SiO₂ aminé et le peptide immobilisé par voie *ex situ* sur lames de verre aminées. Révélation avec la SA-Cy3 avant et après la déprotection. (L'intensité de fluorescence obtenue sur les supports Si/SiO₂ est calculée avec la fonction de transfert expérimentale moyenne : $y = 8,9357x + 5E+06$). Les valeurs présentées sont calculées après la soustraction de l'intensité de fluorescence des plots du solvant seul).

De plus, au cours de la synthèse *in situ*, chaque monomère d'acide aminé ainsi que la biotine sont ajoutés, sur la surface aminée, dans un rapport 10 :1 (17 nmol / 4,84 cm² ou 3,5 nmol/cm²) par rapport à la densité de groupements fonctionnels portés par la surface. Il est donc possible que ce rapport soit insuffisant compte tenu des faibles rendements de couplage obtenu à chaque étape de la synthèse *in situ*. Une étude permettant d'établir les conditions optimales de synthèse sur puce d'un peptide de 16 mers est donc indispensable.

Il apparaît aussi nécessaire de pouvoir caractériser le peptide synthétisé *in situ*, d'un point de vue quantitatif mais aussi qualitatif pour ce qui est de sa séquence en acides aminés. Ceci pourrait être réalisé par HPLC-MS, en utilisant un bras espaceur tel qu'un photolinker entre le peptide et la surface, ce qui permettrait de cliver le peptide de la surface après sa déprotection (peptide immobilisé par voie « *ex situ* ») ou après sa synthèse et sa déprotection finale (peptide synthétisé « *in situ* »).

Enfin, nous pouvons conclure que les surfaces Si/SiO₂ et les surfaces de verre aminées sont stables vis-à-vis des différents traitements effectués au cours de la synthèse peptidique (supports Si/SiO₂ aminés) et après la déprotection finale du peptide sur les deux supports.

CHAPITRE IV
PUCES A PROTEINES

DETECTION D'ANTICORPS
ANTI-HISTONES
DANS LE SERUM

CHAPITRE IV : PUCES A PROTEINES

I. Introduction

Après avoir étudié le comportement de nos supports fonctionnalisés avec le peptide épitope H3 vis-à-vis de la reconnaissance par un anticorps spécifique anti-histone H3, donc en milieu biologique simple, nous nous sommes intéressés aux performances de nos lames de verre fonctionnalisées avec les protéines histones pour la détection d'anticorps anti-histones dans le sérum, donc en milieu biologique complexe. Les deux chimies de surface différentes ont été testées : i) les surfaces fonctionnalisées avec des esters activés et ii) les surfaces fonctionnalisées avec un copolymère, l'anhydride maléique méthyl vinyl éther : P (AMMVE).

II. Résultats et discussion

II.1. Immunoessais sur anticorps commercial

II.1.2. Technique ELISA

II.1.2.1. Spécificité de l'anticorps primaire pour l'histone H3

La spécificité de l'anticorps polyclonal anti-histone H3 commercial pour l'histone H3 a été testée en comparant la reconnaissance biologique de l'anticorps vis-à-vis de chacune des deux protéines histones H1 et H3.

Chacune des protéines a été immobilisée au fond des puits de la microplaque par adsorption physique. Une gamme de dilution (entre 10^{-5} et 10^{-2}) de l'anticorps polyclonal IgG de lapin anti-histone a été ajoutée. Les complexes protéine-anticorps formés ont été révélés après l'addition de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin lié à la HRP et du substrat de la peroxydase (*fig.IV.1*).

Les valeurs de l'absorbance en fonction de la dilution de l'anticorps primaire sont représentées dans la figure IV.2. Les résultats correspondent à la moyenne de trois expériences ou chaque condition est testée en triplicata.

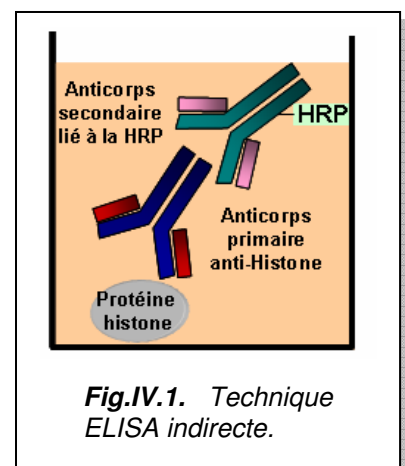


Fig.IV.1. Technique ELISA indirecte.

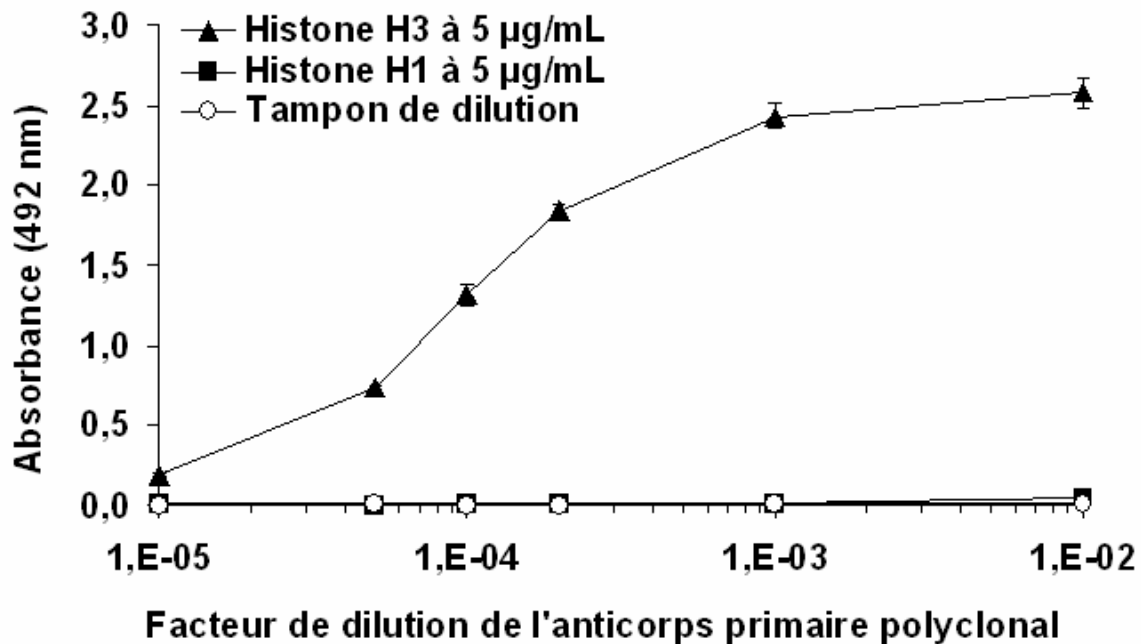


Fig.IV.2. Technique ELISA indirecte : test de la spécificité de l'anticorps anti-histone H3 pour l'histone H3, comparaison avec l'histone H1. Révélation avec l'anticorps secondaire lié à la HRP.

Le taux de reconnaissance de l'histone H3 par l'anticorps anti-histone H3 augmente avec la concentration en anticorps jusqu'à atteindre un plateau de saturation à partir d'une dilution en anticorps de 10^{-3} . Au contraire, l'histone H1 n'est pas reconnue par l'anticorps anti-histone H3 ce qui confirme la spécificité de la reconnaissance biologique de l'anticorps anti-histone H3. De plus, les très faibles absorbances mesurées (de l'ordre de 0,01) dans les puits témoins (tampon de dilution) indiquent des adsorptions non spécifiques des anticorps sur la surface des puits négligeables. Le CV moyen intra-essai calculé pour les différents tests est de $7,3 \pm 0,6 \%$ et le CV moyen inter-essai est de $11 \pm 2 \%$. Ces valeurs de CV correspondent à des valeurs acceptables selon nos critères déjà définis. La répétabilité des résultats étant jugée acceptable, nous avons estimé le seuil inférieur de détection, la sensibilité et la gamme dynamique de cette technique.

II.1.2.1. Limite inférieure de détection

Pour déterminer la limite de détection de l'anticorps anti-histone H3, une gamme de dilution de l'anticorps inférieure comprise entre 10^{-8} et 10^{-4} a été testée avec la protéine histone H3. La protéine a été immobilisée à 5 et 10 µg/mL afin d'évaluer l'effet de la concentration d'immobilisation de l'histone sur la détermination

de la limite inférieure de détection. La valeur seuil à partir de laquelle nous avons considéré que l'anticorps primaire est encore détecté, a été calculée à partir de la moyenne des absorbances mesurées dans les puits témoins (« tampon de dilution »). Cette valeur est de 0,020. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure IV.3.

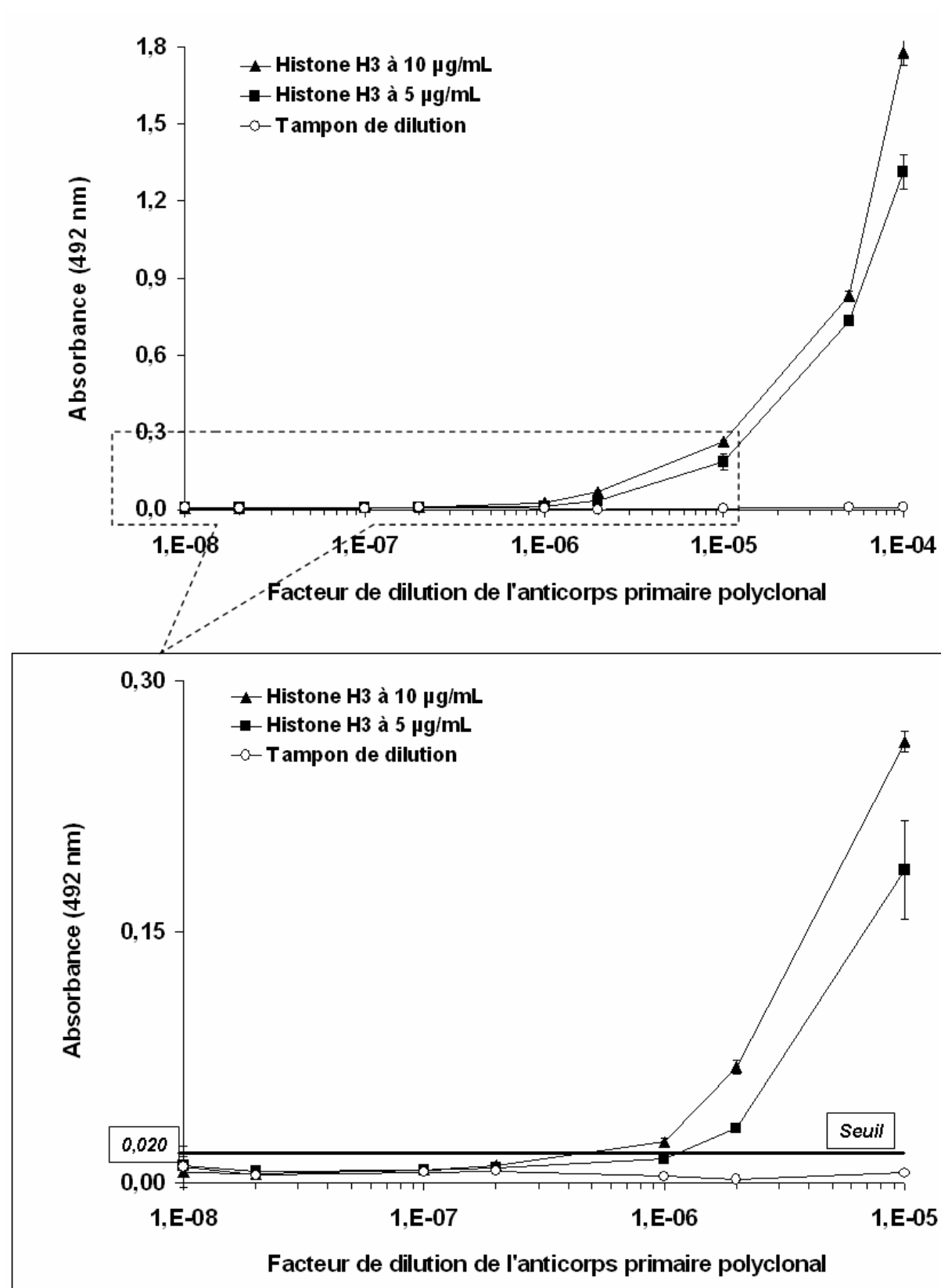


Fig.IV.3. Détermination du seuil inférieur de détection par ELISA de l'anticorps anti-histone H3 incubé avec la protéine histone H3. Révélation avec l'anticorps secondaire lié à la HRP.

D'après le graphe, nous constatons que pour des dilutions en anticorps inférieures à 10^{-6} , les valeurs des absorbances mesurées dans les puits recouverts avec la protéine histone H3 sont proches de celles des puits témoins (de l'ordre de 0,01), quelle que soit la concentration de la protéine. A partir d'une dilution de 10^{-6} en anticorps anti-histone H3, les valeurs des absorbances obtenues avec la protéine immobilisée à 10 $\mu\text{g/mL}$ sont légèrement supérieures à celles obtenues avec 5 $\mu\text{g/mL}$.

Pour une concentration de 5 $\mu\text{g/mL}$, la limite inférieure de détection est atteinte pour des dilutions en anticorps comprises entre 10^{-6} et $2 \cdot 10^{-6}$. Pour une concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$, la limite de détection correspond à une dilution de 10^{-6} . Ce seuil est légèrement inférieur à celui atteint avec une concentration de 5 $\mu\text{g/mL}$.

La gamme dynamique correspondante, pour les deux concentrations de protéine (5 et 10 $\mu\text{g/mL}$) testées, est de 50, et les sensibilités des tests effectués sont respectivement de 0,40 et 0,36.

La technique ELISA permet donc d'atteindre un seuil inférieur de détection d'anticorps correspondant à une dilution de 10^{-6} , pour une concentration d'immobilisation de la protéine à 10 $\mu\text{g/mL}$ et pour une gamme dynamique de 50.

Cependant, cette technique présente certaines limitations liées :

i) au mode d'adsorption des protéines immobilisées. En effet, les protéines histones sont fixées de façon aléatoire par adsorption physique sur le support en polystyrène. L'épitope de l'histone H3 reconnu par l'anticorps anti-histone H3 se situe du côté C-terminal de la protéine. Ainsi, les protéines histone H3 adsorbées sur la surface par leur côté C-ter, auront l'épitope masqué et donc inaccessible à l'anticorps. Une fraction des sondes immobilisées se trouve dans cette configuration et sont donc incapables de reconnaître les cibles. Ce phénomène peut alors avoir une influence sur la sensibilité de détection de la technique ELISA, ainsi que sur le seuil inférieur de détection.

ii) à la consommation de quantités importantes d'échantillon biologique à analyser (100 μL d'une solution d'anticorps /puits).

Afin de dépasser les limitations des tests ELISA classiques, nous avons développé des immunoessais miniaturisés sur des lames de verre fonctionnalisées

chimiquement, en utilisant le même système biologique que précédemment, soit protéine histone H3/anticorps anti-histone H3.

Les deux chimies de surface testées sur les lames de verre silanisées (surfaces NHS esters et surfaces P(AMMVE)) ont été choisies de façon à permettre d'immobiliser les protéines par liaison covalente stable *via* leurs fonctions amines primaires (côté N-terminal, et fonctions amines des chaînes latérales des résidus lysines).

II.1.3. Immunoessais sur lames de verre silanisées

II.1.3.1. Lames NHS ester

D'après la séquence en acides aminés de l'histone H3 (*fig.IV.9*), la protéine contient 11 résidus lysine et 15 résidus arginine [21].

Histone H3	
1	<u>ARTKQTARKS</u> TGGKAPRKQL ATKAARKSAP ATGGVKKPHR YRPGTVALRE IRRYQKSTEL
61	LIRKLPFQRL VREIAQDFKT DLRFOSSAVM ALQEACEAYL VGLFEDTNLC AIHAKRVTIM
121	PKDI <u>QLARRI</u> <u>RGERA</u>

Fig.IV.4. Séquence en acides aminés de la protéine histone du thymus de veau H3. Les résidus en gras correspondent à l'épitope de l'anticorps polyclonal anti-histone H3 de lapin. Les résidus lysine et arginine sont soulignés.

L'épitope de l'histone H3 (IQLARRI RGERA) reconnu par l'anticorps anti-histone H3 et situé du côté C-terminal de la protéine, contient quatre résidus arginine, mais la fonction amine primaire de la lysine est plus réactive que celle de l'arginine. Parmi les 11 résidus lysines de la protéine, deux sont proches de l'épitope, et les 9 autres sont situés plutôt du côté N-terminal. Sur cette partie de la protéine, deux résidus lysines successifs sont présents. Tous ces résidus sont autant de points d'immobilisation covalente possible de la protéine à la surface.

Les lames de verre silanisées porteuses de terminaisons COOH ont été activées en esters réactifs par l'action du NHS. Dans ces conditions les protéines peuvent être immobilisées par la formation d'une liaison amide covalente stable entre les groupements nucléophiles amines primaires et les fonctions NHS esters activés portées par la surface [163] (*fig.IV.5*).

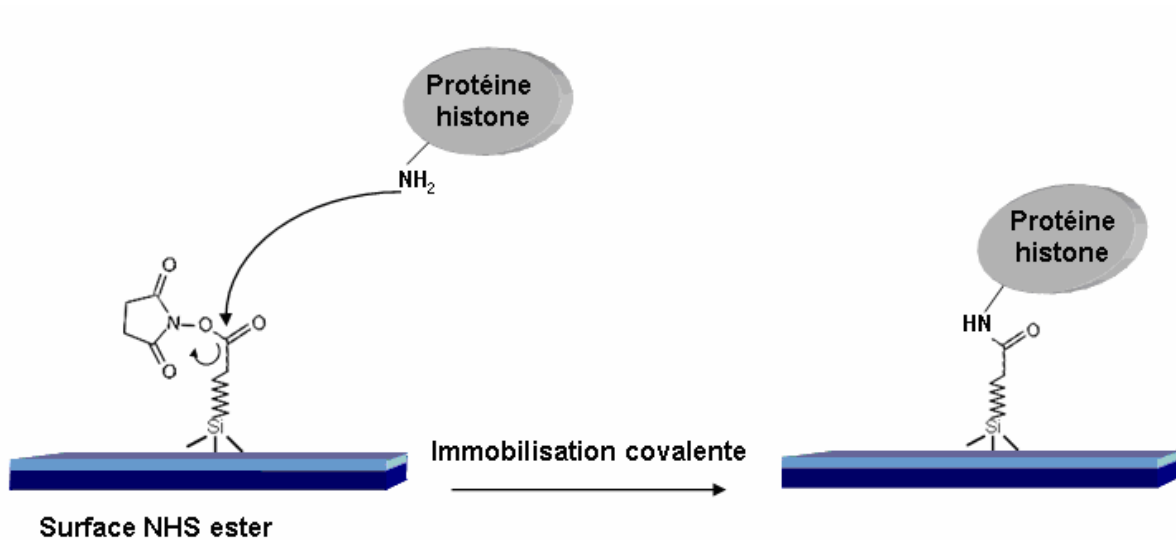


Fig. IV.5. Immobilisation covalente de protéines sur lames de verre NHS ester.

Dans nos conditions réactionnelles l'immobilisation covalente de la protéine sur la surface est effectuée en milieu aqueux. L'eau peut donc également réagir avec les groupements esters et provoquer leur hydrolyse, en formant des groupements acide carboxyliques ou des ions carboxylates non réactifs (*fig.IV.6*).

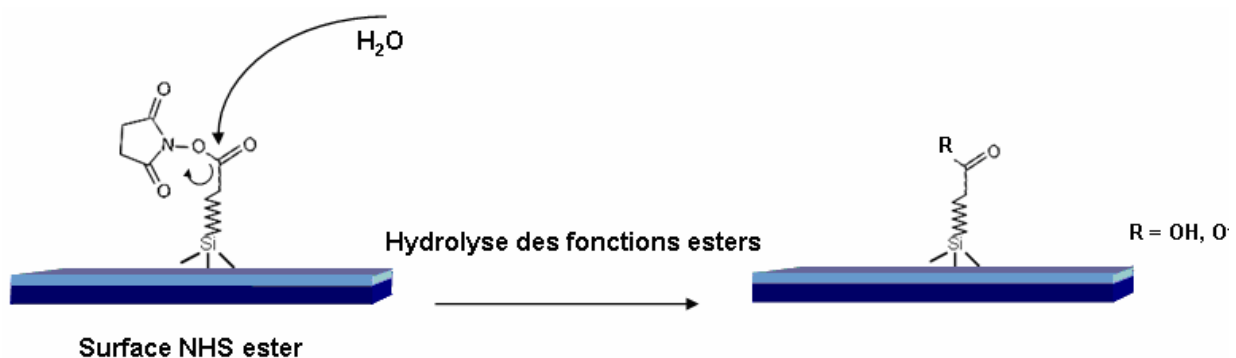


Fig.IV.6. Réaction d'hydrolyse des fonctions esters.

L'immobilisation covalente des protéines est donc le résultat de la compétition entre la réaction des fonctions amines des protéines et celle des molécules d'eau avec la surface ester activé. La concentration d'immobilisation de la protéine est alors un paramètre très important. Ainsi la densité de greffage des protéines sur la surface doit être suffisante pour favoriser leur immobilisation par couplage covalente.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'efficacité du couplage covalent de la protéine histone H3 par rapport à l'adsorption non spécifique. Pour ce faire, deux concentrations d'immobilisation de la protéine (500 $\mu\text{g/mL}$ et 1 mg/mL) ont été

testées sur des lames de verre fonctionnalisées avec des groupements acides non activés et sur des lames NHS esters activés. Puis une gamme de dilution en anticorps polyclonal anti-histone H3 (10^{-6} à 10^{-4}) a été utilisée pour valider la reconnaissance biologique.

L'étude de la répétabilité intra- et inter-essais sur les lames NHS esters indique des CV moyens de $9,7 \pm 0,9\%$ et $12 \pm 1\%$, respectivement. Les intensités de fluorescence mesurées sur les lames NHS esters et sur les lames acides non activées (courbes en pointillé) sont présentées en fonction des dilutions de l'anticorps primaire sur la figure IV.7.

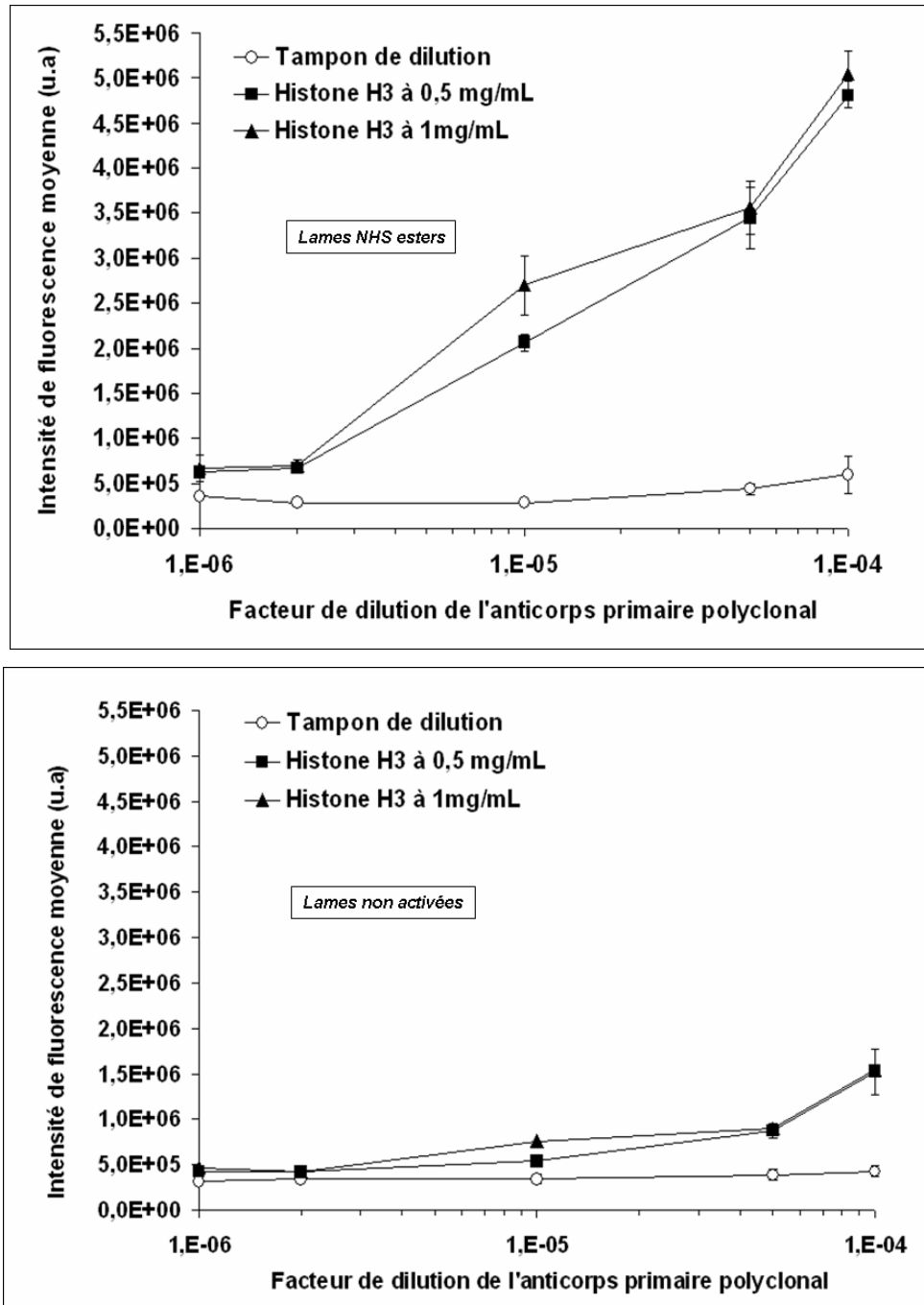


Fig.IV.7. Evaluation du couplage covalent sur les lames activées par rapport à l'adsorption non spécifique sur les lames non activées : Immobilisation de la protéine histone H3 à 0,5 et 1 mg/mL et incubation avec l'anticorps primaire anti-histone H3. Révélation avec l'anticorps secondaire lié au Cy3.

Il apparaît que les intensités de fluorescence obtenues sur les lames esters activés sont significativement supérieures à celles obtenues sur lames non activées, à partir d'une dilution en anticorps anti-histone H3 de $2 \cdot 10^{-6}$. De plus, l'adsorption non spécifique d'anticorps (points « tampon de dilution ») sur les 2 types de lames testées est identique quelle que soit la dilution de l'anticorps. Ces résultats mettent

en évidence d'une part l'efficacité de l'immobilisation covalente de la protéine histone H3 par rapport à une immobilisation par physisorption, et ce vis-à-vis de la reconnaissance antigène / anticorps. D'autre part, l'adsorption non spécifique de protéines histone H3 sur lame ester activé est négligeable par rapport à leur immobilisation par liaison covalente.

Par ailleurs, les intensités de fluorescence obtenues pour les concentrations d'immobilisation de 0,5 ou 1 mg/mL sont comparables, que ce soit sur lame ester activé ou sur lame non activée. Ceci indique que la saturation des sites réactifs disponibles à la surface des lames de verre fonctionnalisées est atteinte pour une concentration d'immobilisation en protéine histone H3 de 0,5 mg/mL.

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus nous permet de conclure que les protéines histones s'immobilisent majoritairement de façon covalente *via* leurs groupements amine primaire, sur lames NHS esters.

- ***Spécificité de l'anticorps primaire pour l'histone H3***

L'interaction entre l'anticorps anti-histone H3 commercial et la protéine H3 immobilisée sur lame ester activée a ensuite été comparée à celle avec la protéine H1 immobilisée sur la même surface. Trois concentrations d'immobilisation différentes (5, 50 et 500 µg/mL) ont été testées pour chacune des protéines histones H1 et H3. 1 µL de chaque solution est déposé sur la surface sous forme de plots de 2 mm de diamètre. Comme dans le cas de la technique ELISA classique, une gamme de dilution de l'anticorps anti-histone H3 comprise entre 10^{-5} à 10^{-2} , a été testée. Les complexes histone-anticorps anti-histone H3 formés sont révélés après l'addition d'un anticorps secondaire anti-IgG de lapin lié au Cy3 (*fig.IV.8*). Les intensités de fluorescence moyenne en fonction de la dilution de l'anticorps anti-histone H3 sont présentées dans la figure IV.9.

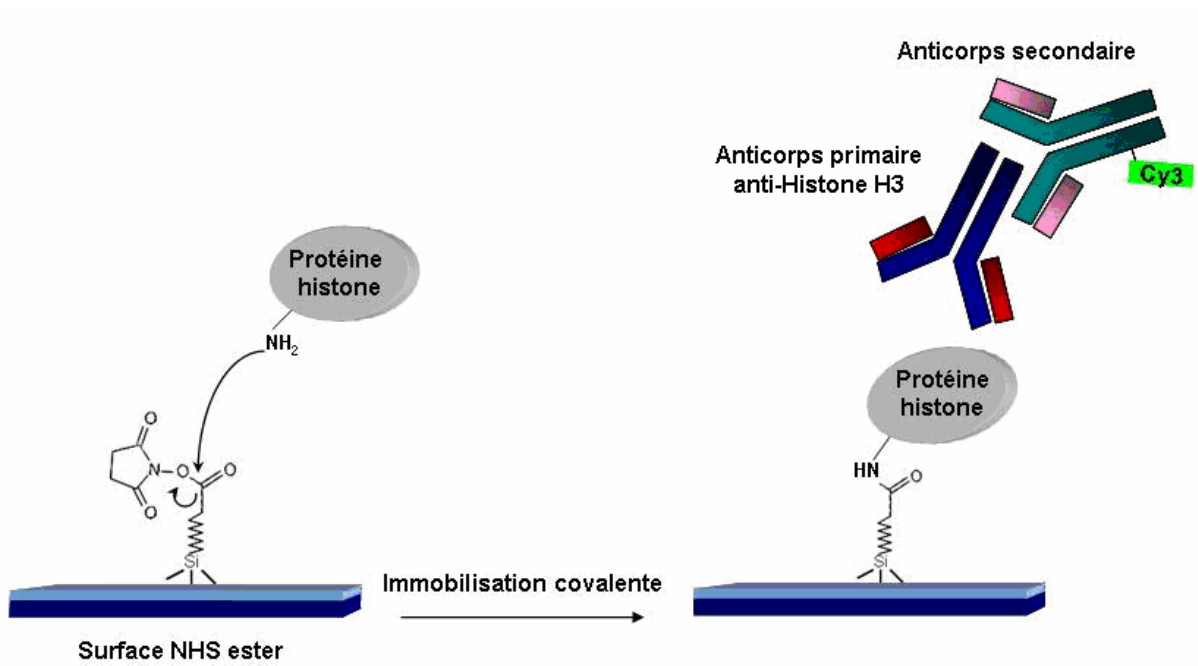


Fig. IV.8. Protéine histone (H1 ou H3) immobilisée sur lame de verre et incubée avec l'anticorps polyclonal anti-histone H3 et l'anticorps secondaire lié au Cy3.

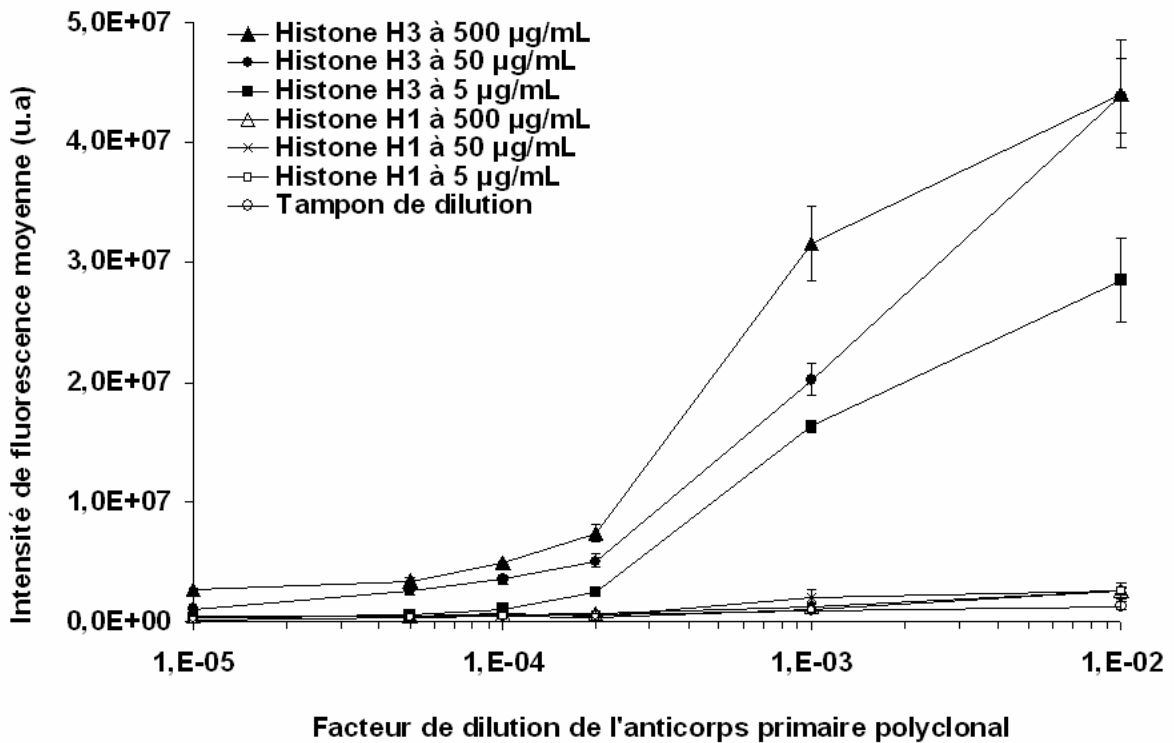


Fig. IV.9. Test de la spécificité de l'anticorps primaire polyclonal pour la protéine histone H3. Immobilisation covalente des protéines histones H1 et H3 sur lames NHS esters et test de leur interaction avec l'anticorps polyclonal anti-histone H3. Révélation avec l'anticorps secondaire lié au Cy3.

Ces résultats représentent la moyenne de quatre expériences dont chaque plot a été testé en duplicata. Il apparaît que les intensités de fluorescence augmentent avec la concentration d'immobilisation en histone H3 et avec la concentration en anticorps anti-histone H3. Au contraire, les intensités de fluorescence obtenues avec l'histone H1 sont très faibles (en moyenne de l'ordre de $9 \cdot 10^5$ u.a), quelle que soit sa concentration d'immobilisation, et proches du bruit de fond (plots « tampon de dilution ») où la moyenne des intensités de fluorescence est de l'ordre de $6 \cdot 10^5$ u.a. L'ensemble de ces résultats indique que la reconnaissance de la protéine histone H3 par l'anticorps anti-histone H3 est effective dans les conditions d'immobilisation de la protéine H3 sur verre testées. La protéine H1 n'est, quant à elle, pas reconnue de manière significative. De plus, l'adsorption non spécifique des anticorps sur la surface est très faible, ce qui confirme les résultats précédents.

- **Limite inférieure de détection**

La valeur seuil à partir de laquelle l'anticorps primaire anti-histone H3 a été détecté sur les lames NHS esters, correspond à une intensité de fluorescence de $1,5 \cdot 10^6$. D'après la figure IV.9, pour les concentrations d'immobilisation de l'histone H3 de 5 et 50 $\mu\text{g/mL}$, les dilutions les plus fortes pour lesquelles l'anticorps primaire est détecté correspondent respectivement à $2 \cdot 10^{-4}$ et $5 \cdot 10^{-5}$. Pour une concentration de 500 $\mu\text{g/mL}$ en histone H3, l'anticorps primaire dilué à 10^{-5} peut encore être détecté, l'intensité de fluorescence étant presque cinq fois plus importante que celle du plot témoin (« tampon de dilution »).

Afin de déterminer la limite inférieure de détection, une gamme de dilution de l'anticorps plus large, et comprise entre 10^{-8} et 10^{-4} a été testée avec l'histone H3. La protéine a été immobilisée à deux concentrations différentes 0,5 et 1 mg/mL .

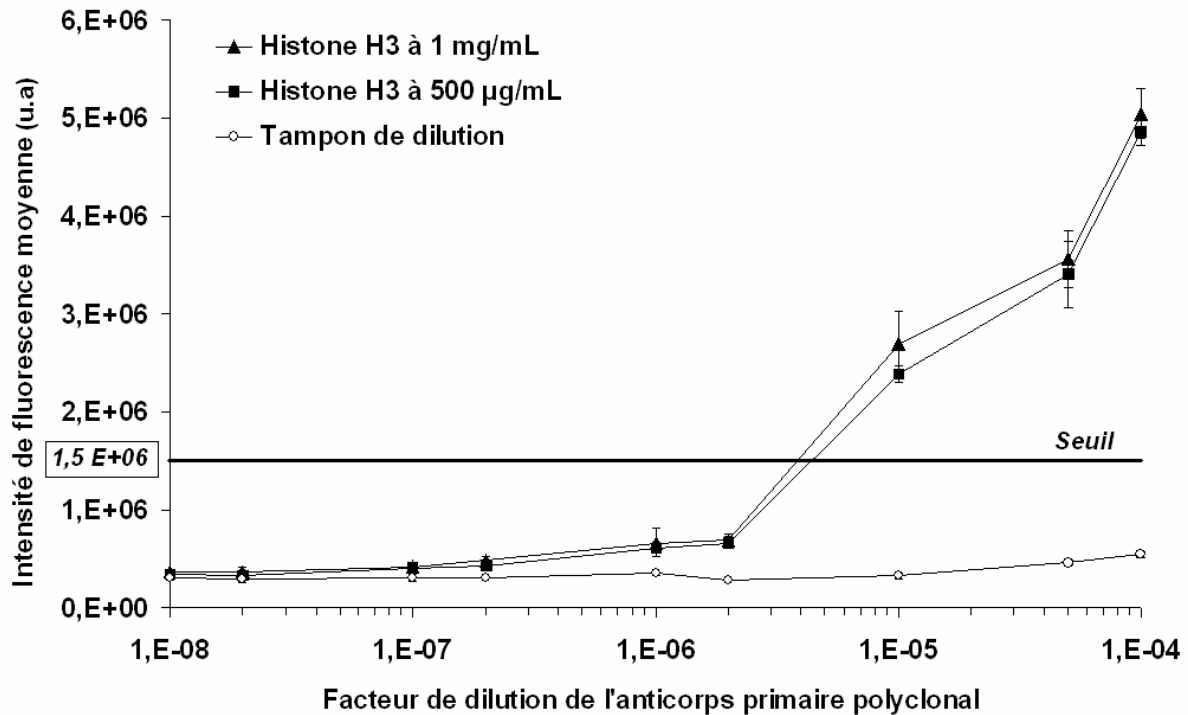


Fig.IV.10. Détermination du seuil inférieur de détection sur lames NHS esters. Immobilisation de la protéine histone H3 à 0,5 et 1 mg/mL et incubation avec l'anticorps primaire anti-histone H3. Révélation avec l'anticorps secondaire lié au Cy3.

D'après la figure IV.10 pour les deux concentrations de protéine testées, les intensités de fluorescence obtenues sont comparables quelle que soit la dilution de l'anticorps primaire. La limite inférieure de détection est atteinte pour des dilutions comprises entre $2 \cdot 10^{-6}$ et 10^{-5} , elle est estimée d'après le graphe à $3 \cdot 10^{-6}$. La gamme dynamique de mesure est de 20, et la pente est de 0,40

Les lames NHS esters présentent l'avantage de consommer 100 fois moins d'analyte qu'un test ELISA classique en plaque 96 puits. Toutefois l'ELISA présente une meilleure sensibilité dans la zone de linéarité, et un seuil inférieur de détection plus bas.

Afin d'améliorer les performances analytiques de nos immunoessais miniaturisés sur puce, nous avons testé une autre stratégie de chimie de surface. Cette stratégie consiste à fonctionnaliser des lames de verre aminées avec un copolymère, l'anhydride maléique-*alt*-méthyl vinyl éther (AMMVE).

II.1.3.2. Lames AMMVE

Le P(AMMVE) (67 000 g/mol), un copolymère alterné d'anhydride maléique et de méthyl vinyl éther, possède des groupements anhydrides très réactifs vis-à-vis des fonctions amines primaires conduisant à la formation d'une liaison amide stable. Ce copolymère a déjà été utilisé pour l'immobilisation covalente de biomolécules (ex : peptides, protéines), car il est soluble sous forme hydrolysée, en milieux aqueux [172, 173]. Toutefois, les bioconjugués obtenus avaient été physisorbés au fond des puits de microplaque de titration et utilisées dans des tests ELISA.

Notre approche a été différente car nous avons utilisé l'AMMVE pour fonctionnaliser chimiquement les lames de verre aminées. Le copolymère a donc été couplé aux fonctions amines des lames par liaison covalente avec ses fonctions anhydrides maléiques.

L'anhydride réagit avec le groupement nucléophile NH_2 pour former une liaison amide covalente ainsi qu'une fonction carboxyle ou ion carboxylate (*fig.IV.11*).

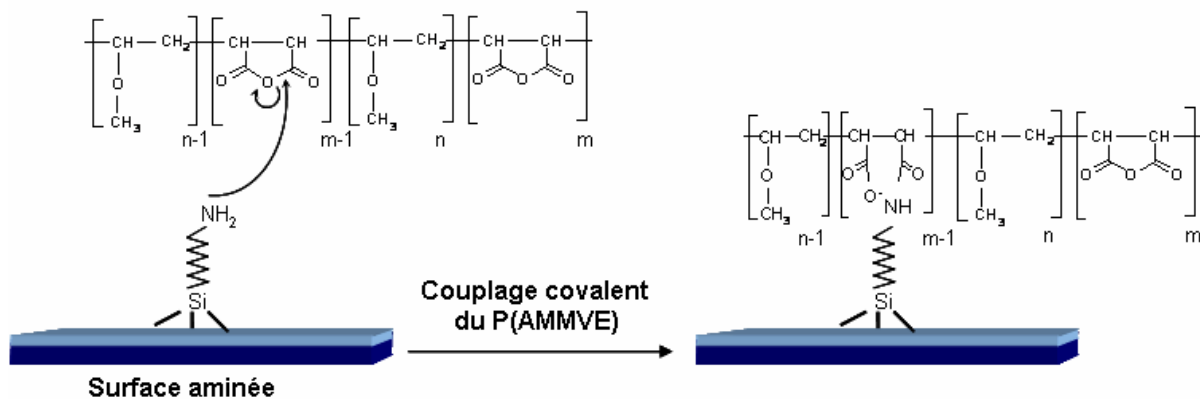


Fig.IV.11. Fonctionnalisation chimique des lames aminées avec le copolymère AMMVE.

Les protéines peuvent ensuite être immobilisées par leurs fonctions amines primaires sur la surface des lames ainsi fonctionnalisées, par réaction avec les fonctions anhydrides n'ayant pas réagi avec la surface (*fig.IV.12*).

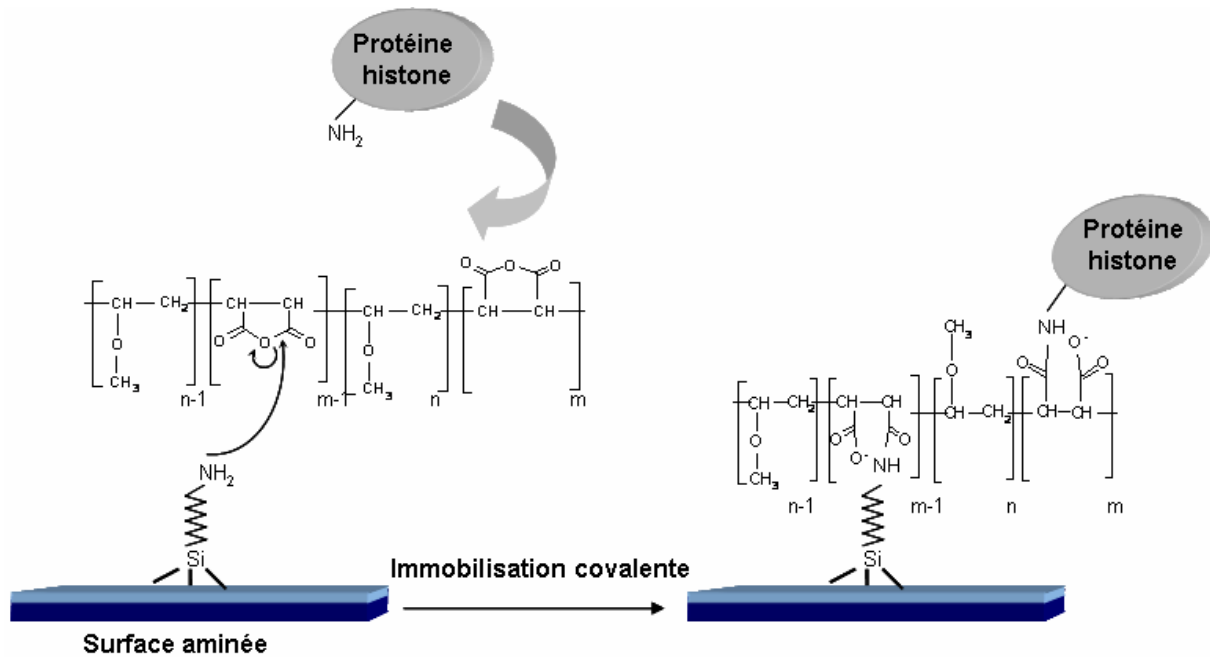


Fig.IV.12. Immobilisation covalente de la protéine histone sur les lames de verre AMMVE.

Afin de mettre au point des tests immunologiques pour la détection d'anticorps anti-histones sur les lames AMMVE, deux paramètres principaux ont été optimisés: i) la concentration d'immobilisation du copolymère sur les lames aminées, et ii) la concentration d'immobilisation de la protéine histone sur les lames AMMVE. Trois concentrations différentes d'AMMVE (1, 3 et 5 mg/mL) solubilisé dans du DMSO anhydre, ont été testées. La protéine histone H3 a ensuite été immobilisée sur les lames AMMVE, à deux concentrations différentes (0,5 et 1 mg/mL) dans du PBS, puis incubée avec différentes dilutions de l'anticorps anti-histone H3 (10^{-8} et 10^{-4}). Les complexes protéine-anticorps formés ont été révélés avec l'anticorps secondaire lié au Cy3 (fig.IV.13).

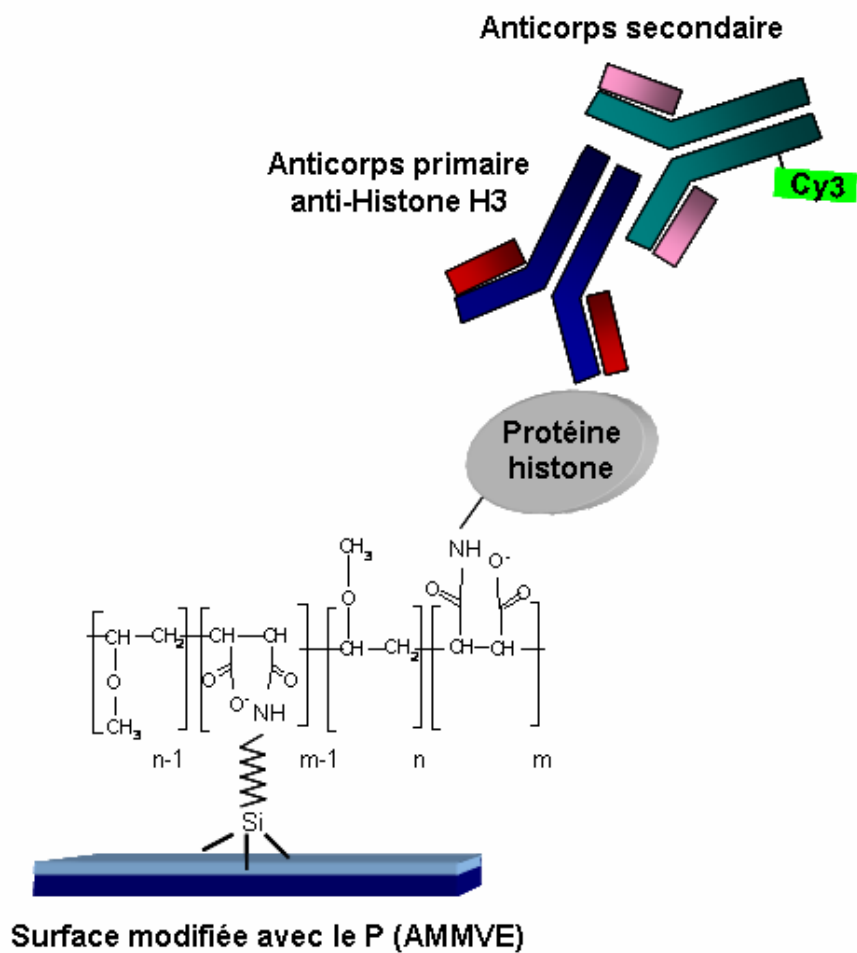


Fig.IV.13. Incubation de la protéine histone immobilisée sur lames AMMVE avec les anticorps primaire et secondaire lié au Cy3.

Les intensités de fluorescence moyenne obtenues en fonction de la dilution de l'anticorps primaire polyclonal sont présentés sur la figure IV.14.

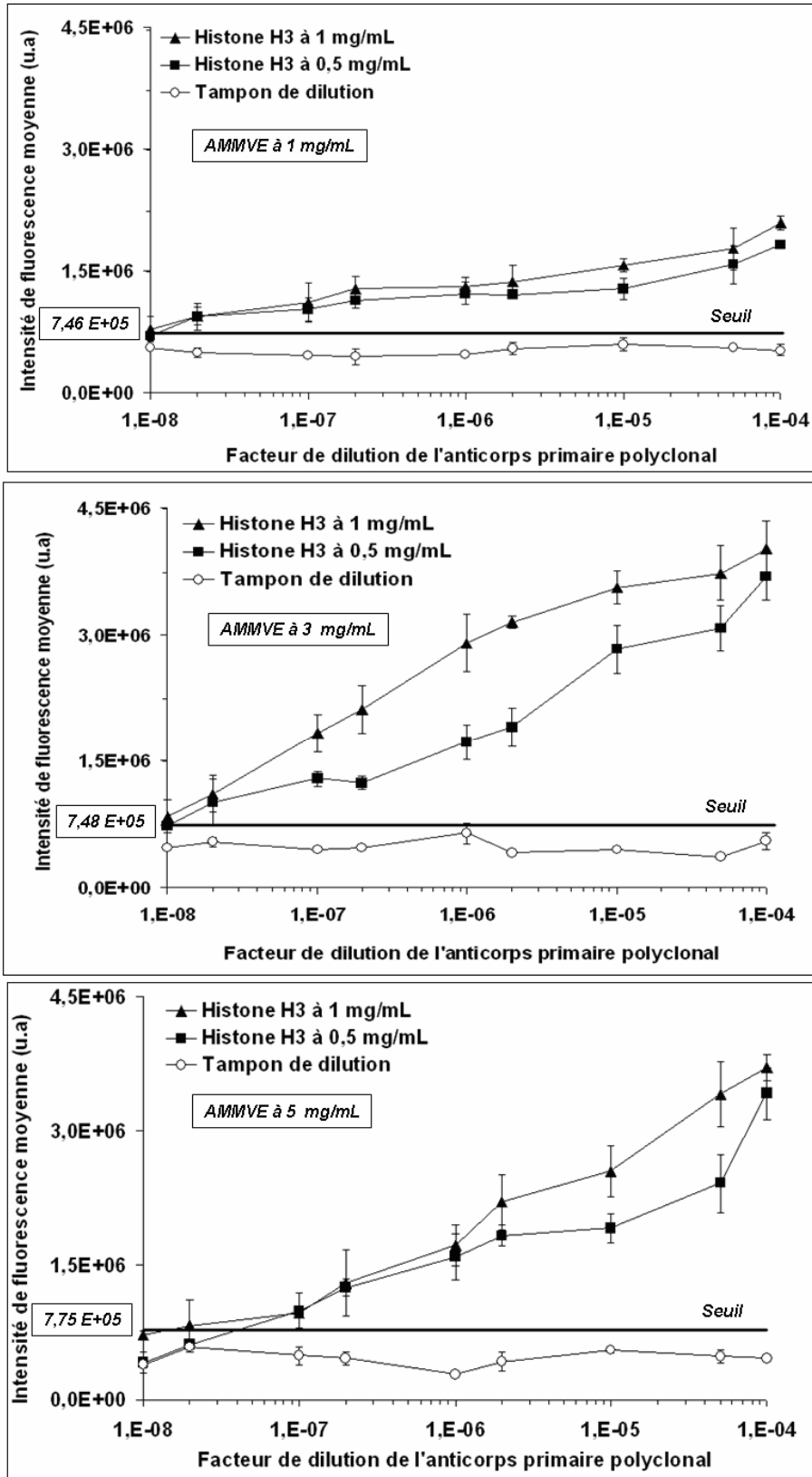


Fig.IV.14. Détermination du seuil inférieur de détection sur lames AMMVE. Immobilisation covalente de la protéine histone H3 à 0,5 et 1 mg/mL sur lames AMMVE. Incubation avec différentes dilutions de l'anticorps primaire polyclonal. Révélation avec l'anticorps secondaire lié au Cy3.

Pour les trois concentrations de copolymère testées, les intensités de fluorescence mesurées augmentent avec la concentration d'immobilisation de l'histone H3 et avec la concentration de l'anticorps polyclonal anti-histone H3.

Par contre, les intensités de fluorescence mesurées sur les plots témoins (« tampon de dilution ») sont très faibles (de l'ordre de $5 \cdot 10^5$ u.a) et ne varient pas quelque soit la concentration de l'anticorps. Ce résultat indique que l'adsorption non spécifique d'anticorps sur les lames fonctionnalisées avec l'AMMVE est très faible.

Par ailleurs, la comparaison des graphes de la figure IV.13 met en évidence une réponse différente de l'anticorps anti-histone H3 selon la concentration d'histone H3 immobilisée et selon la concentration d'AMMVE utilisée. Ainsi, pour une concentration en AMMVE de 1 mg/mL, la réponse de l'anticorps anti-histone H3 est similaire quelle que soit sa concentration, pour les deux concentrations d'histone H3 testées. En effet, même si pour les deux concentrations de protéine de 0,5 et 1 mg/mL, la gamme dynamique est de 100, la sensibilité est très faible ($< 0,1$).

Pour les concentrations en AMMVE de 3 et 5 mg/mL, la réponse de l'anticorps anti-histone H3 dépend de sa concentration et de celle de la protéine histone H3. En effet, sur les lames fonctionnalisées avec 3 mg/mL d'AMMVE, la réponse de l'anticorps est significativement différente pour des dilutions comprises entre $2 \cdot 10^{-8}$ et 10^{-5} , alors que sur les lames fonctionnalisées avec 5 mg/mL d'AMMVE, la réponse de l'anticorps est significativement différente pour des dilutions comprises entre $2 \cdot 10^{-6}$ et 10^{-4} . Dans les deux cas, le meilleur signal de fluorescence est obtenu avec 1 mg/mL d'histone. De plus, pour cette concentration en histone H3 la gamme dynamique est 100, avec une sensibilité de 0,29 pour 3 mg/mL d'AMMVE, alors que pour 5 mg/mL d'AMMVE la gamme dynamique est la même et, la sensibilité étant de 0,25. Enfin, les seuils inférieurs de détection sont également dépendant de la concentration en AMMVE utilisée puisqu'ils atteignent une dilution de $2 \cdot 10^{-8}$ en anticorps anti-histone H3 pour les concentrations de 1 et 3 mg/mL en AMMVE, et une dilution de 10^{-7} en anticorps pour 5 mg/mL en AMMVE. Par comparaison à la limite atteinte sur lames NHS esters (10^{-6}), ces valeurs seuils sont 20 à 100 fois plus élevées. De plus, le seuil inférieur de détection atteint avec 3 mg/ml d'AMMVE est 50 fois plus élevé que celui obtenu en ELISA (10^{-6}).

L'ensemble de ces résultats met clairement en évidence l'amélioration, en terme de seuil inférieur de détection apporté par la fonctionnalisation avec le copolymère AMMVE, en accord avec les données de la littérature. Il ressort également que la

concentration en AMMVE utilisée pour cette fonctionnalisation est un paramètre important pour le niveau de sensibilité du test. Les meilleures conditions ont été obtenues avec 3 mg/mL d'AMMVE.

En effet, pour une concentration en AMMVE de 1 mg/ml, bien que le seuil inférieur de détection soit très bas (dilution de $2 \cdot 10^{-8}$ en anticorps), la sensibilité est très faible, elle est inférieure à 0,1. De plus, la concentration d'immobilisation de la protéine ne semble pas avoir d'influence sur l'intensité du signal obtenu, dans les conditions testées. Ceci suggère que le nombre de groupements réactifs anhydrides disponibles sur le copolymère après fonctionnalisation de la lame, est faible (la saturation est atteinte pour une concentration de 0,5 mg/mL de protéine) et ne permet pas d'immobiliser la protéine histone dans une conformation favorisant la reconnaissance biologique avec l'anticorps.

Au contraire, pour une concentration en AMMVE supérieure (5 mg/mL), le seuil inférieur de détection en anticorps est amélioré (dilution de 10^{-7}). La gamme dynamique est meilleure qu'avec 1 mg/mL d'AMMVE, et varie avec la concentration d'immobilisation de la protéine histone. Il est probable qu'à cette concentration d'AMMVE, le nombre de groupements anhydrides réactifs disponible est significativement plus important que pour 1mg/mL d'AMMVE. Ceci permet d'augmenter le niveau de saturation des sites du copolymère, donc le nombre de molécules d'histones immobilisées. Le rendement de capture des anticorps cibles étant relié directement à la densité surfacique de sondes histones fonctionnelles, la détection des anticorps s'en trouve améliorée.

A contrario, dans un polymère comme l'AMMVE, on peut imaginer qu'une trop forte concentration en AMMVE puisse conduire à une immobilisation des protéines par des points d'attachement multiples. Ceci entraînerait alors une diminution de la densité en histones fonctionnelles, et abaisserait la reconnaissance des anticorps dans des solutions de faibles concentrations.

Les meilleurs résultats en terme de seuil inférieur de détection et de gamme dynamique ont été obtenus avec une concentration en AMMVE intermédiaire, soit 3 mg/mL. Selon notre interprétation, cette concentration en copolymère permet sans doute de conserver un nombre de groupements réactifs anhydrides suffisant, après

fonctionnalisation de la lame, pour immobiliser les protéines histones sans entraîner une perte de leur activité de reconnaissance vis-à-vis des anticorps.

Au regard de ces résultats, il apparaît clairement que le nombre de groupements réactifs anhydrides du copolymère AMMVE est un paramètre important pour l'immobilisation des protéines et la conservation de leur activité biologique. Les données de la littérature [172] indiquent qu'il est possible de moduler le nombre des groupements réactifs en réalisant une préhydrolyse du copolymère avant la fonctionnalisation biologique. La réaction d'immobilisation de la protéine s'effectuant en milieu aqueux, les groupements réactifs du copolymère peuvent s'hydrolyser (*fig.IV.15*).

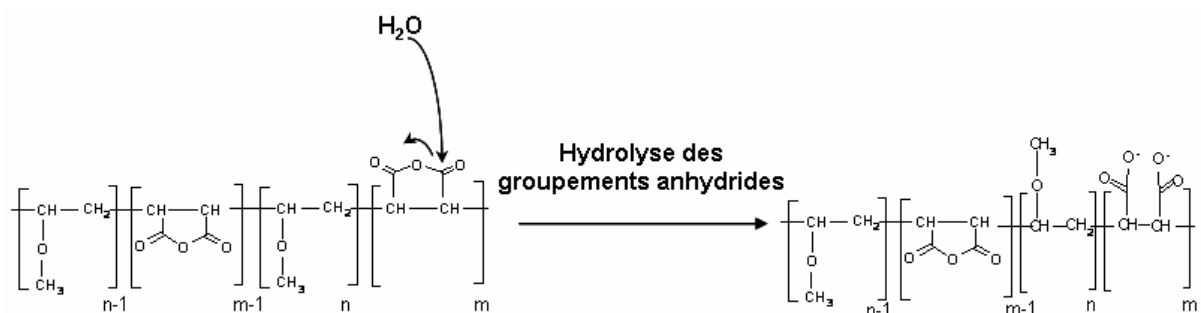


Fig.IV.15. Réaction d'hydrolyse de l'AMMVE.

Nous avons alors testé l'influence de l'hydrolyse du copolymère sur la reconnaissance biologique entre les histones immobilisées et les anticorps. Les tests ont été effectués sur les lames fonctionnalisées avec le copolymère à 3 mg/mL et préhydrolysé avant son greffage sur le silane. Les résultats sont présentés dans la figure IV.16.

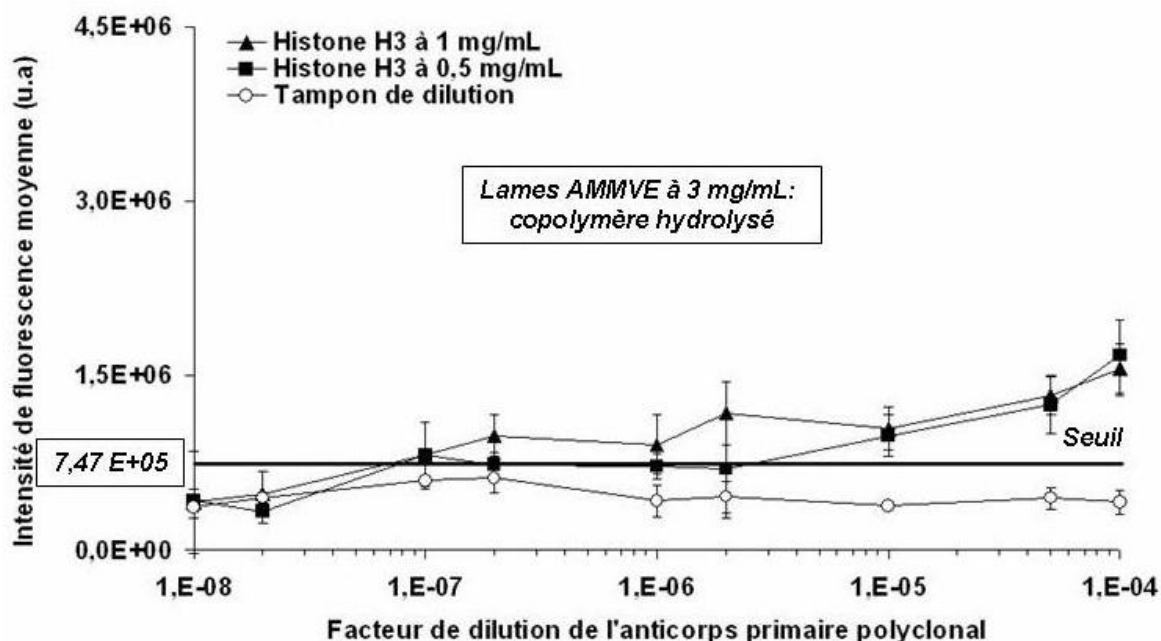


Fig.IV.16. Test du couplage covalent de la protéine histone H3 avec le copolymère préhydrolysé. Immobilisation covalente de la protéine à 0,5 et 1 mg/mL sur lames fonctionnalisées avec le 'AMMVE 3 mg/mL. Reconnaissance biologique avec l'anticorps anti-histone H3 et révélation avec l'anticorps secondaire lié au Cy3.

Les intensités de fluorescence obtenues sont presque trois fois inférieures à celles obtenues sur les lames fonctionnalisées avec le copolymère non hydrolysé. L'adsorption non spécifique d'anticorps (courbe « tampon de dilution ») reste très faible (de l'ordre de $5 \cdot 10^5$ u.a.). Le seuil inférieur de détection passe de $2 \cdot 10^{-8}$ en dilution d'anticorps pour le copolymère non hydrolysé, à 10^{-7} pour le copolymère pré-hydrolysé. De plus, la concentration d'immobilisation de la protéine histone n'a plus d'influence sur l'intensité du signal de fluorescence. Pour une concentration en protéine de 0,5 mg/mL, la gamme dynamique est de 10, et elle est plus faible que celle obtenue avec 1 mg/mL d'AMMVE non hydrolysé. Pour une concentration d'immobilisation en protéine de 1 mg/mL, la gamme dynamique (100) et la sensibilité (0,1) sont les mêmes que celles obtenues avec 1 mg/mL d'AMMVE non hydrolysé. Ces résultats confirment l'importance de la densité de groupements anhydrides dans l'AMMVE. Une forte diminution d'anhydrides par hydrolyse avant greffage de l'AMMVE peut d'une part limiter la densité surfacique d'AMMVE greffé sur le silane. Elle peut d'autre part limiter la capacité d'immobilisation covalente des histones. Ceci se traduirait alors par un rendement de reconnaissance histone/anticorps moindre. Une élucidation plus poussée de l'influence de la densité en anhydride dans l'AMMVE nécessiterait d'analyser la cinétique d'hydrolyse, par exemple à l'aide d'une

technique spectroscopique, et de tester une hydrolyse de l'AMMVE après son greffage sur le silane.

Le tableau IV.1 montre une comparaison entre les résultats obtenus avec les différentes concentrations d'AMMVE et de protéine histone testées.

[AMMVE] (mg/mL)	[Histone H3] (mg/mL)	Limite inférieure de détection (Dilution de l'anticorps)	Gamme dynamique	Sensibilité dans la zone de linéarité
1	0,5	$2 \cdot 10^{-8}$	100	0,09
	1			0,07
3 (avec préhydrolyse)	0,5	10^{-7}	10	0,18
	1			100
3	0,5	$2 \cdot 10^{-8}$	50	0,19
	1			0,29
5	0,5	10^{-7}	100	0,23
	1			0,25

Tableau IV.1. Comparaison des performances analytiques des tests effectués sur les lames AMMVE. La ligne grisée indique les conditions testées permettant d'obtenir les meilleures performances analytiques.

En conclusion, pour la réalisation d'immunoessais sur les lames fonctionnalisées avec le copolymère, la concentration optimale en AMMVE et en protéine sont respectivement de 3 mg/mL et 1 mg/mL. Les tests de reconnaissance biologique avec l'anticorps effectués dans ces conditions sont sensibles (zone de linéarité comprise entre $2 \cdot 10^{-8}$ et 10^{-6} , pente = 0,29) et la limite inférieure de détection correspond à une dilution de l'anticorps d'un facteur $2 \cdot 10^{-8}$.

II.1.4. Comparaison générale des performances des tests

Les performances analytiques des immunoessais effectués en ELISA et sur les deux types de chimie de surface (NHS esters et AMMVE) sont comparées et présentées dans le tableau IV.2.

		Consommation d'analyte par point de mesure	Reproductibilité (Inter-essais)	Répétabilité (Intra-essais)	Limite inférieure de détection (dilution de l'anticorps)	Limite supérieure de détection (dilution de l'anticorps)	Gamme dynamique	Sensibilité dans la zone de linéarité
Chimie de surface testées en immunoessai	Polystyrène (Microplaque à puits - ELISA) + histone	100µL/puit	7,3 ± 0,6 %	10 ± 2 %	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	100	0,45
	Amines (Lame de verre plane) + peptide	1µL/plot	10,5 ± 3,9 %	9 ± 5 %	estimée à 2.10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	5	0,49
	NHS esters (Lame de verre plane) + histone	1µL/plot	9,7 ± 0,9 %	12 ± 1 %	estimée à 3.10 ⁻⁶	2.10 ⁻⁴	~ 67	0,40
	AMMVE (Lame de verre plane)	1µL/plot	9,4 ± 2,6 %	11 ± 2 %	2.10 ⁻⁸	> 10 ⁻⁶	50	0,29

Tableau IV.2. Comparaison des performances analytiques des immunoessais effectués sur les différentes surfaces. La définition exacte des titres du tableau est indiquée dans le chapitre II paragraphe VII.

La technique présentant la sensibilité la plus forte reste l'ELISA (sensibilité de 0,45 DO/facteur de dilution d'anticorps). Les lames NHS ester sont moins sensibles (0,40 unités de fluorescence / facteur de dilution d'anticorps) que l'ELISA, possèdent une gamme dynamique presque 2 fois plus faible, et un seuil inférieur de détection environ 3 fois plus élevé que l'ELISA. Les lames AMMVE présentent une sensibilité environ 1,5 fois moins sensibles que l'ELISA. Par contre les lames AMMVE possèdent un seuil inférieur de détection 50 fois plus bas que l'ELISA, et une gamme dynamique comparable. Le volume d'analyte nécessaire pour un point de mesure est également 100 fois plus faible pour les lames AMMVE que pour l'ELISA.

Les lames AMMVE optimisées semblant présenter des avantages par rapport à un ELISA classique, nous avons testé leur comportement pour l'analyse de sérums humains dans des conditions réelles.

Après l'optimisation du test immunologique sur les lames AMMVE avec la protéine histone H3 et l'anticorps polyclonal anti-histone H3 commercial, nous avons appliqué ce test sur huit sérums humains de patients lupiques positifs en anticorps anti-histones (AAH) H1 et H3, déjà validés par la technique western blot. Le sérum humain est un milieu biologique complexe qui contient des protéines plasmatiques et des anticorps autres que les anticorps anti-histones recherchés (ex : anticorps anti-ADN natif, antinucléosomes...). Nous avons comparé les performances de trois

techniques différentes (ELISA, Western blot, et immunoessais sur lames) pour la détection des anticorps d'isotype IgG dirigés contre les deux classes d'histones H1 et H3.

Pour les immunoessais sur lames AMMVE, les calculs ont été effectués à partir des moyennes des intensités de fluorescence obtenues avec les différents échantillons de sérums.

Le calcul des rapports de la moyenne des intensités de fluorescence sur le seuil de positivité permet ainsi de comparer les résultats obtenus par la technique ELISA et par les immunoessais sur lames de verre (*cf. chapitre II, paragraphe VI*).

Les termes sensibilité et spécificité utilisés dans la discussion concernent les paramètres étudiés au cours des tests immunologiques de diagnostic, ils permettent d'évaluer la valeur diagnostique de la technique immunologique utilisée. Ces termes ont déjà été définis au cours de l'étude bibliographique (*cf. chapitre I, paragraphe III*).

II.2. Détection d'anticorps anti-histones dans le sérum humain

II.2.1. Technique Western blot

La figure IV.17 présente les résultats du Western blot obtenus après la révélation par l'anticorps secondaire lié à la HRP des complexes formés par les deux classes d'histones H1 et H3 et les anticorps anti-histones détectés dans les sérums des patients lupiques. Les différentes bandes obtenues avec l'histone H1 correspondent à la détection d'anticorps dirigés contre différentes sous-classes de la protéine.

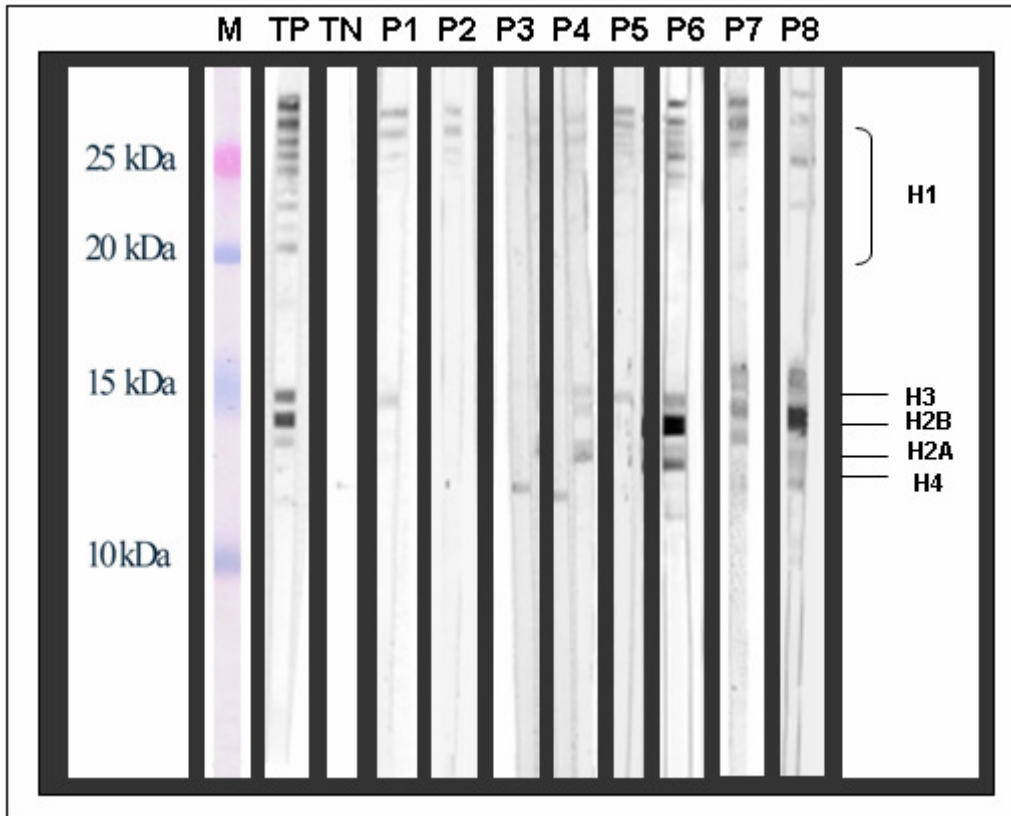


Fig.IV.17. Détection des anticorps anti-histone H1 et anti-histone H3 par la technique Western blot. M : marqueur de masse moléculaire ; TP : Témoin positif ; TN : témoin négatif ; P1 – P8 : sérums de patients lupiques.

Parmi les huit sérums testés, sept sont positifs en anticorps anti-histone H1 (AAH1) et six sont positifs en anticorps anti-histone H3 (AAH3). Le sérum du patient P3 est négatif en AAH1 et en AAH3, mais est positif uniquement en AAH4 (fig.IV.17). La sensibilité de la technique western blot pour la recherche des AAH1 et des AAH3 est de 87,5 % et 75 %, respectivement. Ces sérums positifs en AAH1 et/ou AAH3 par la technique Western blot (sauf pour le patient P3), ont également été testés avec la technique ELISA et en immunoessais sur lames AMMVE, pour la détection des AAH1 et AAH3 (la détection des anticorps dirigés contre les autres classes d'histones n'a pas été effectuée par ces deux dernières techniques, en raison de la disponibilité commerciale des protéines H1 et H3). Les sérums testés en ELISA et sur lames de verre sont comparés à six sérums témoins négatifs prélevés chez des sujets sains, donneurs de sang.

II.2.2. Technique ELISA

Chacune des deux protéines histones H1 et H3 est immobilisée à 5 µg/mL au fond des puits de la microplaque en polystyrène par adsorption physique. Les huit

sérums des patients ainsi que six sérums de donneurs sains sont dilués au 100^{ème} (même dilution testée par la technique Western blot), et incubés avec les protéines pour la détection des AAH1 et AAH3. La révélation est effectuée après l'addition de l'anticorps secondaire anti-IgG humaine lié à la HRP. Les valeurs des absorbances obtenues en fonction des différents sérums testés sont présentées dans la figure IV.18. Les résultats correspondent à la moyenne des absorbances obtenues à partir de deux expériences. Au cours de chacune, chaque échantillon a été testé en duplicata.

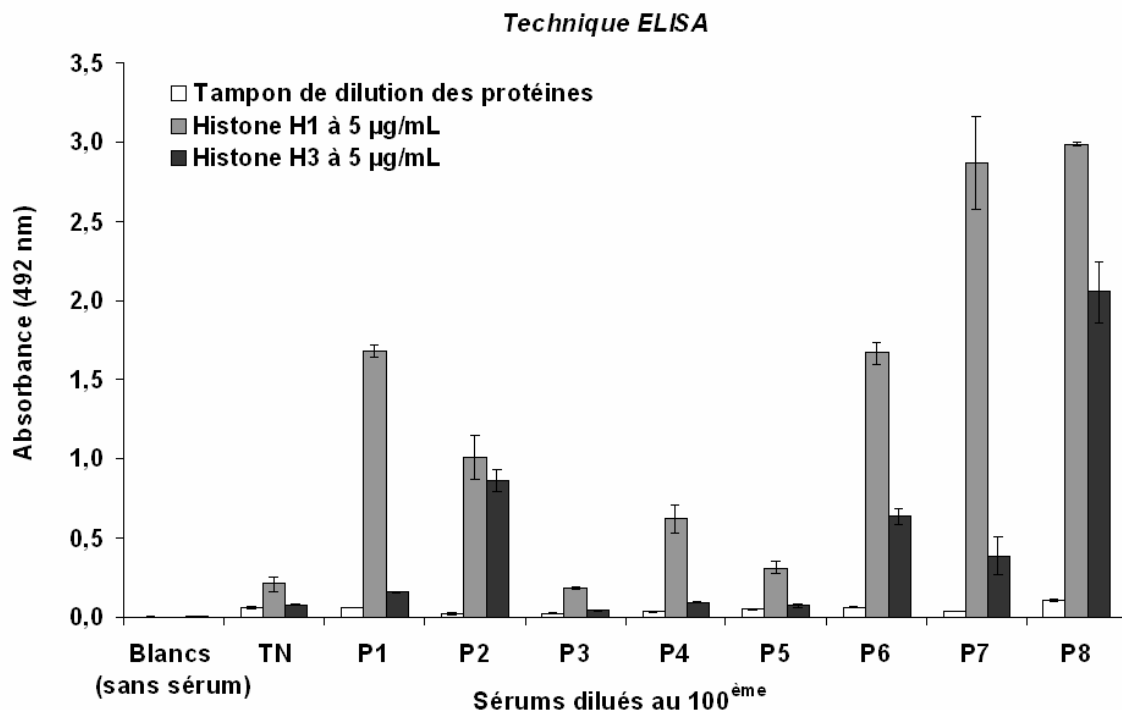


Fig.IV.18. Détection des anticorps anti-histone H1 et anti-histone H3 par la technique ELISA indirecte. Blancs : puits avec tampon de dilution des protéines ou avec les histones H1 ou H3 ; TN : sérums témoins négatifs ; P1 – P8 : sérums de patients lupiques.

La catégorie « blancs » correspond aux puits témoins de l'adsorption non spécifique de l'anticorps secondaire. Ces puits sont recouverts de protéines H1 ou H3 ou de leur tampon de dilution. Ils sont incubés avec le tampon de dilution des sérums puis avec l'anticorps secondaire lié à la HRP.

Le témoin négatif (TN) correspond à la moyenne des absorbances obtenues avec six sérums prélevés chez des sujets sains, donneurs de sang.

Les sérums P1 à P8 correspondent aux huit sérums des patients lupiques.

D'après le graphe de la figure IV.18, les absorbances des puits « blancs » indiquent une faible adsorption non spécifique de l'anticorps secondaire et des protéines

plasmatiques sur la surface. Un sérum de patient lupique est considéré comme positif à partir d'une valeur seuil calculée d'après le test de Student sur la moyenne des absorbances obtenues avec les six sérums témoins négatifs (*cf. chapitre II, paragraphe VI*).

Les valeurs de CV moyen intra et inter-essai sont respectivement de $8,5 \pm 0,7 \%$ et $9 \pm 7 \%$, La répétabilité et la reproductibilité de ces tests sont jugées acceptables, comme cela était le cas avec le sérum commercial.

Les rapports calculés pour les huit échantillons de sérums de patients lupiques sont présentés dans la figure IV.19, en fonction des anticorps IgG dirigés contre les deux classes d'histones H1 et H3. Les résultats sont comparés à ceux obtenus par la technique Western blot, en terme de présence ou d'absence d'AAH1 et/ou AAH3 dans les échantillons (P1-P8).

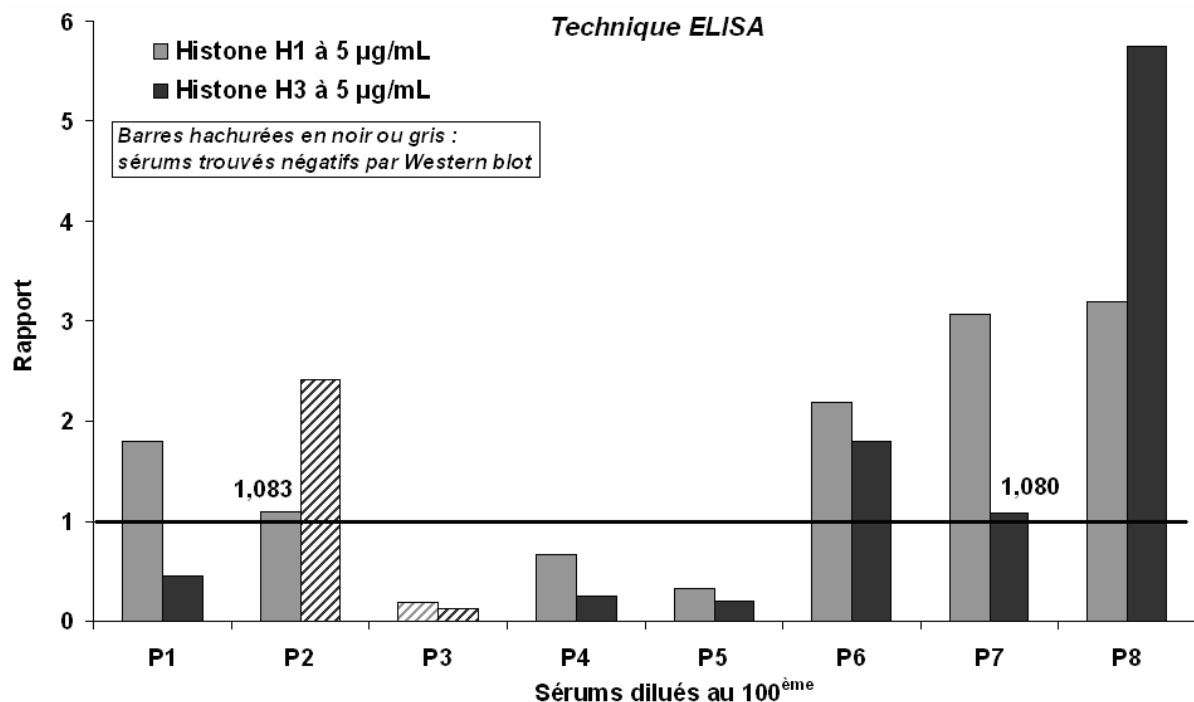


Fig.IV.19. Comparaison des résultats obtenus par les techniques ELISA et Western blot pour la détection des AAH1 et AAH3 dans le sérums des patients lupiques (P1 – P8). En ELISA, les rapports > 1 sont considérés comme positifs. En Western blot, les trois sérums négatifs en AAH1 et/ou AAH3 sont identifiés par des barres hachurées en gris ou en noir, respectivement.

D'après la figure IV.19, sur les huit sérums testés par la technique ELISA, cinq sont positifs en AAH1 (P1, 2, 6, 7 et 8) et quatre sont positifs en AAH3 (P2, 6, 7 et 8). La sensibilité de la technique ELISA pour la recherche des AAH1 et des AAH3 est de 62,5 % et 50 %, respectivement. Pour le patient P3, le sérum est négatif en AAH1 et

en AAH3 par la technique Western blot, il est aussi négatif par ELISA pour les deux anticorps recherchés.

Le taux de concordance entre la technique ELISA et la technique Western blot pour la détection des AAH1 est de 62,5 % (5/8) pour les sérums positifs et de 12,5 % (1/8) pour les valeurs négatives. Le taux de concordance entre les deux techniques pour la détection des AAH3 est de 37,5 % (3/8) pour les valeurs positives et de 12,5 % (1/8) pour les valeurs négatives. Sur les huit sérums testés, deux (P4, P5) sont positifs uniquement par Western blot en AAH1 et trois en AAH3 (P1, P4 et P5). En effet, les anticorps AAH détectés dans le sérum, peuvent être dirigés contre des épitopes conformationnels ou linéaires. Dans la technique Western blot, au cours de l'étape d'électrophorèse sur gel SDS-PAGE, les protéines histones sont dénaturées et les épitopes conformationnels sont alors linéarisés. Les anticorps détectés uniquement par la technique Western blot peuvent donc être dirigés contre des épitopes linéaires des histones, inaccessibles par la technique ELISA. Cependant, un seul sérum (patient P2) est trouvé positif uniquement par ELISA. Dans ce sérum, les anticorps sont peut être dirigés contre des épitopes conformationnels, qui n'ont pas pu être détectés par la technique Western blot, ceci peut être dû à leur linéarisation au cours de l'électrophorèse. Les taux de discordance entre les deux techniques pour la recherche des AAH1 et les AAH3, sont de 25 et 50%, respectivement.

Ces sérums ont ensuite été testés sur les lames de verre AMMVE pour la détection des AAH1 et AAH3.

II.2.3. Immunoessais sur lames AMMVE

Les lames de verre aminées sont modifiées avec le copolymère AMMVE, immobilisé à 3 mg/mL. Chacune des deux protéines histones H1 et H3 est immobilisée à 1 mg/mL sur la surface fonctionnalisée. Les huit sérums des patients lupiques sont dilués au 100^{ème} et incubés avec les lames biofonctionnalisées pour la détection des AAH1 et AAH3. La révélation est effectuée après l'addition de l'anticorps secondaire anti-IgG humaine lié au Cy3. Les intensités de fluorescence moyenne obtenues en fonction des différents sérums testés, sont présentées dans la figure IV.20. Les résultats correspondent à la moyenne des intensités de

fluorescence obtenues à partir de deux expériences. Au cours de chacune, chaque échantillon est testé en duplicata.

Les blancs et le témoin négatif (TN) correspondent aux mêmes conditions que celles testées en ELISA (blancs : témoins des adsorptions non spécifiques de l'anticorps secondaire, et TN : moyenne des intensités de fluorescence des sérums négatifs des sujets sains). D'après le graphe, les intensités de fluorescence de ces plots sont faibles, indiquant de faibles adsorptions non spécifiques de l'anticorps secondaire et des protéines plasmatiques sur la surface des lames fonctionnalisées.

Les CV moyen intra- et inter-essai sont de $8,7 \pm 0,1$ % et $9,7 \pm 6$ %, respectivement. Ces valeurs sont jugées acceptables. Les immunoessais sur lames AMMVE, appliqués pour la détection d'AAH dans le sérum humain, sont aussi répétables et reproductibles que ceux réalisés sur une fraction purifiée du sérum commercial contenant des anticorps anti-histones.

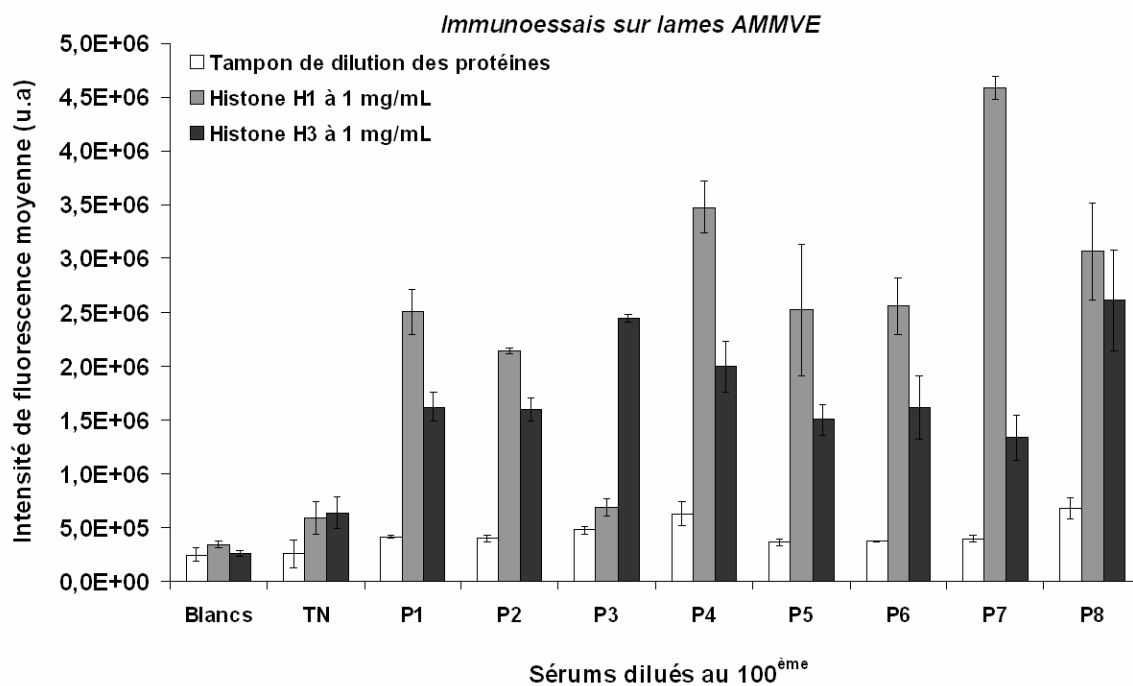


Fig.IV.20. Détection des anticorps anti-histone H1 et anti-histone H3 par immunoessais sur lames de verre AMMVE. TN : sérums témoins négatifs ; P1 – P8 : sérums de patients lupiques.

Les valeurs des intensités de fluorescence des échantillons de sérums ont ensuite été rapportées au seuil de positivité calculé à partir des valeurs obtenues avec les six sérums des sujets sains. Ces rapports sont présentés la figure IV.21. Les résultats

sont d'abord comparés à ceux obtenus avec la technique Western blot, en terme de présence ou d'absence d'AAH1 et/ou AAH3 dans les sérums (P1-P8).

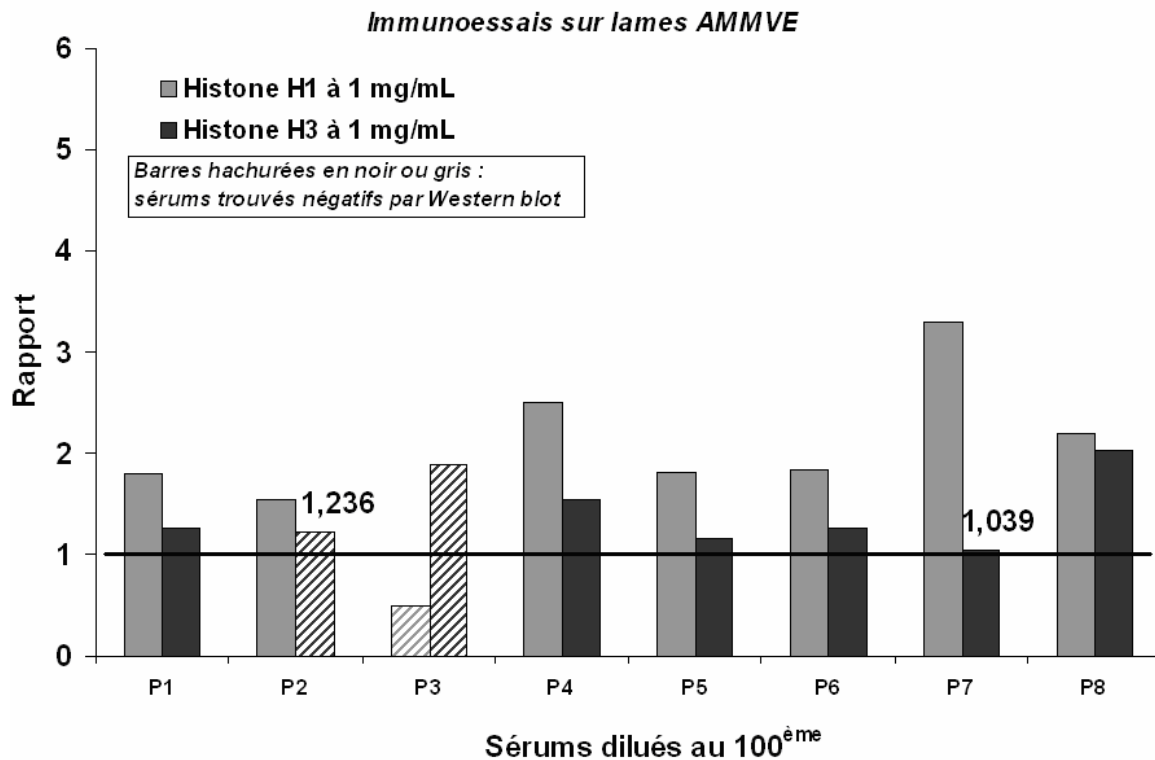


Fig.IV.21. Comparaison des résultats obtenus avec les immunoessais sur lames AMMVE et ceux du Western blot pour la détection des AAH1 et AAH3 dans le sérums des patients (P1 – P8). Pour les immunoessais sur lames, les rapports > 1 sont considérés comme positifs. En Western blot, les trois sérums négatifs en AAH1 et/ou AAH3 sont identifiés par des barres hachurées en gris ou en noir, respectivement.

D'après la figure IV.21, sur les huit sérums testés sur lames, sept sont positifs en AAH1 (P3 : négatif) et tous les sérums sont positifs en AAH3. La sensibilité de cette technique pour la recherche des AAH1 et des AAH3 est de 87,5% et 100 %, respectivement.

Par comparaison à la technique Western blot, le taux de concordance pour la détection des AAH1 est de 87,5 % (6/8) pour les sérums positifs et de 12,5 % (1/8) pour les valeurs négatives. Le taux de concordance entre les deux techniques pour la détection des AAH3 est de 75 % (6/8) pour les valeurs positives et, comme tous les sérums sont positifs en AAH3 par les tests sur lames, il n'y a donc pas de concordance entre cette technique et le Western blot pour les valeurs négatives.

En comparant les immunoessais sur lames et l'ELISA, nous constatons que le taux de concordance pour la détection des AAH1 est de 62,5 % (5/8) pour les sérums positifs et de 12,5 % (1/8) pour les valeurs négatives. Le taux de concordance entre les deux techniques pour la détection des AAH3 est de 50 % (4/8) pour les valeurs

positives lames, mais il n'y a aucune concordance pour les valeurs négatives. Les taux de discordance entre les tests sur lames et la technique ELISA pour la recherche des AAH1 et des AAH3 sont de 25 et 50 %, respectivement.

Une comparaison des résultats obtenus avec les trois techniques est présentée dans la figure IV. 22.

Pour la technique Western blot, les sérums sont jugés comme positifs ou négatifs à partir de la coloration des bandes de nitrocellulose, par comparaison aux sérums témoins, nous n'avons pas donc pu calculer les rapports = Moy (signal)/Seuil, les résultats obtenus par cette technique sont représentés sous forme de rapports de $6 > 1$, pour les sérums positifs et de rapport $0,5 < 1$, pour les sérums négatifs.

Parmi les trois techniques testées (immunoessais sur lames AMMVE, ELISA et Western blot), un seul sérum, (patient P3) est positif en AHH3 uniquement avec les tests effectués sur lames AMMVE. Les anticorps détectés peuvent être dirigés contre des épitopes conformationnels qui n'ont pas pu être détectés par la technique classique ELISA, comme ça pourrait être le cas des autres sérums trouvés positifs par les immunoessais sur lames AMMVE mais négatifs en ELISA.

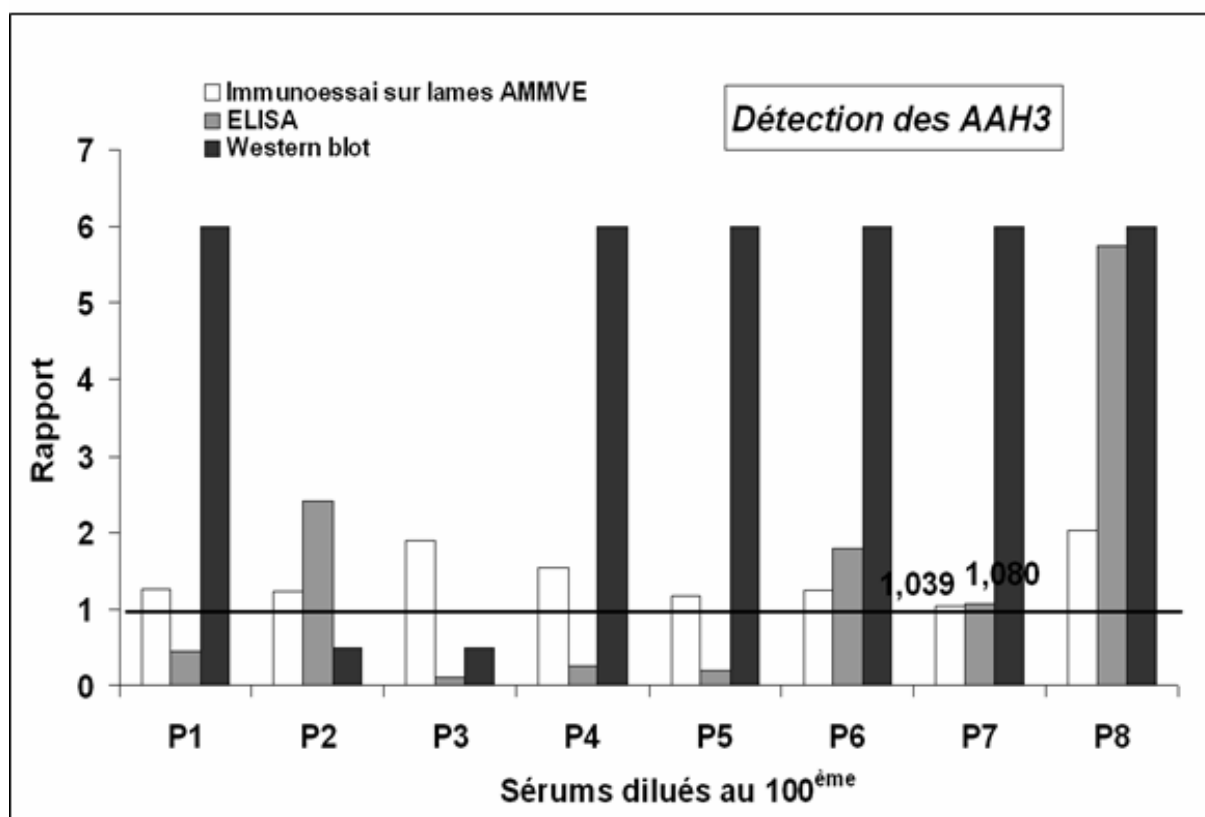
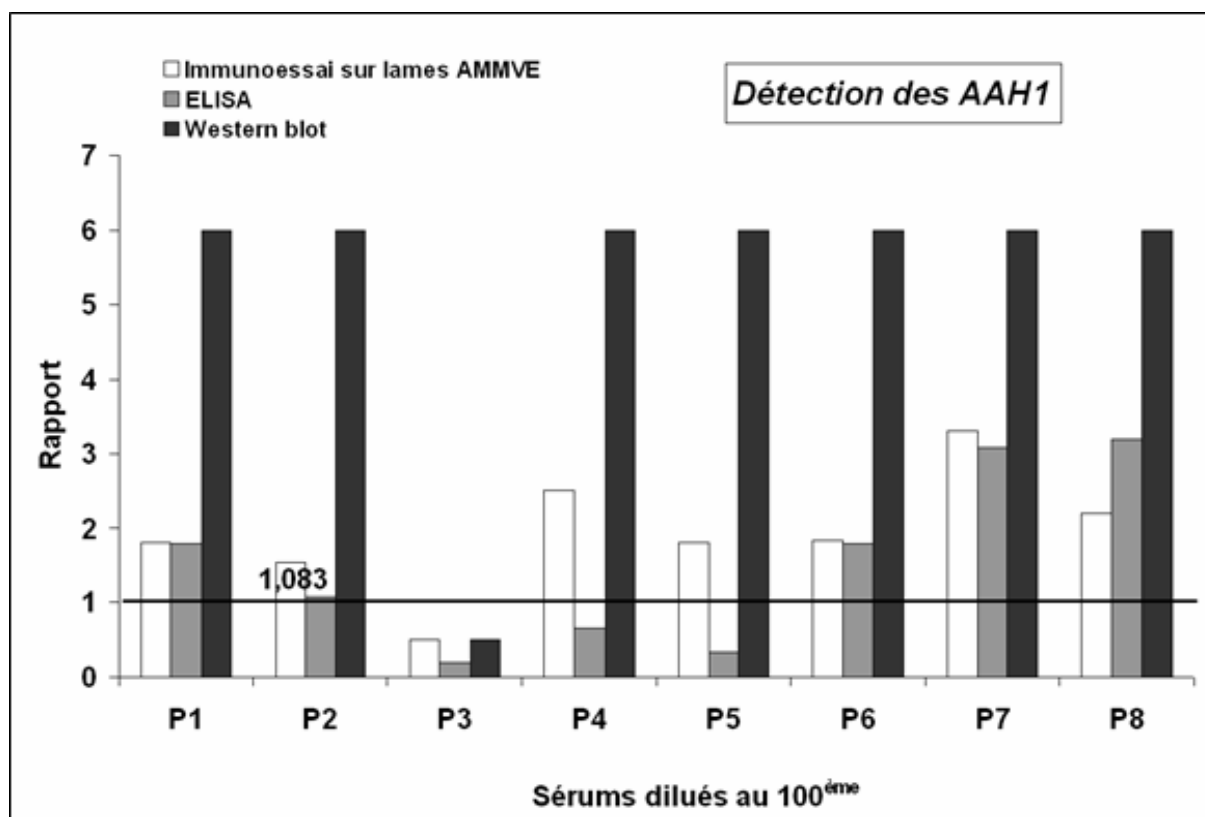


Fig.IV.22. Comparaison des tests effectués par les trois techniques : immunoessais sur lames AMMVE, technique ELISA et Western blot pour la détection des AAH1 et AAH3 dans le sérums des patients (P1 – P8). Les rapports > 1 sont considérés comme positifs.

Les tableaux IV.3.A et B montrent une comparaison des performances des trois techniques. Nous pouvons observer que tous les tests ont une bonne spécificité mais la sensibilité des immunoessais sur lames AMMVE est supérieure à celle des techniques ELISA et Western Blot. Ces résultats paraissent très encourageants, mais vu le nombre limité des échantillons de sérums testés ($n = 8$), il serait nécessaire d'effectuer des tests diagnostiques sur un nombre plus important d'échantillons biologiques, ce qui permettra de mieux caractériser les performances des ISA miniaturisés effectués sur nos lames par rapport aux autres techniques.

A)

AAH1					
Technique	Résultat	Sujets malades (n = 8) S+	Sujets sains (n = 6) S-	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
WB	Test +	7	0	87,5	100
	Test -	1	6		
ELISA	Test +	5	0	62,5	100
	Test -	3	6		
ISA (lames AMMVE)	Test +	7	0	87,5	100
	Test -	1	6		

B)

AAH3					
Technique	Résultat	Sujets malades (n = 8) S+	Sujets sains (n = 6) S-	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
WB	Test +	6	0	75	100
	Test -	2	6		
ELISA	Test +	4	0	50	100
	Test -	4	6		
ISA (lames AMMVE)	Test +	8	0	100	100
	Test -	0	6		

Tableaux IV.3. Comparaison des résultats obtenus avec les trois techniques (WB : Western blot, ELISA et ISA : ImmunoSorbent Assay ou immunoessai sur lames AMMVE), pour la détection des AAH1 (A) et des AAH3 (B) dans le sérum de patients lupiques ($n = 8$).

III. Conclusions et perspectives

Nous avons testé, dans un premier temps, trois types de chimies de surface (microplaque en polystyrène et lames de verre NHS esters et AMMVE) en immunoessais, sur du sérum commercial. La comparaison des différents tests a montré que la technique ELISA classique présente une forte sensibilité, et que les tests effectués sur lames AMMVE possèdent un seuil inférieur de détection 50 fois plus bas que l'ELISA et présentent une bonne sensibilité, en plus le volume d'analyte nécessaire pour un point de mesure est également 100 fois plus faible pour ces lames que pour l'ELISA classique. Cependant, les essais effectués sur les lames NHS esters étaient moins performants que ceux réalisés sur les deux autres surfaces.

Dans un deuxième temps, nous avons effectué des immunoessais sur lames AMMVE pour la détection d'anticorps anti-histones dans le sérum de huit patients lupiques, Ces tests ont été comparés aux techniques classiques ELISA et Western blot. Les ISA miniaturisés ont montré une bonne concordance avec les résultats obtenus en Western blot, mais une meilleure sensibilité de détection que les deux autres techniques.

Toutefois, il sera nécessaire d'effectuer des tests de diagnostic sur un nombre plus important d'échantillons de sérums, et de tester d'autres modèles biologiques antigènes (protéines ou peptides) / anticorps sur les lames AMMVE.

Des ISA pourront aussi être effectués sur ces lames par immobilisation d'auto-antigènes pour la détection dans le sérum de patients cancéreux d'auto-anticorps associés à des tumeurs, ce qui pourra servir pour le diagnostic précoce du cancer [136].

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'objectif principal de cette thèse était d'identifier de nouvelles voies de fabrication pour les puces protéomiques, en s'appuyant sur les savoir-faire de notre équipe sur les puces à ADN et en les faisant évoluer. Nous avons tiré profit des compétences préalables en matière de silanisation de surfaces hydroxylées (verre, silice thermique), d'immobilisation et de synthèse de biomolécules sur puce. Les méthodes de fabrication explorées ont été testées en se concentrant sur les modifications chimiques et biologiques de surface, les phénomènes de reconnaissance biomoléculaire, la maîtrise des adsorptions non spécifiques, et l'amélioration des performances analytiques de nos prototypes (spécificité, sensibilité, limites de détection). Nos procédés ont été testés à l'échelle macroscopique, sans aborder des aspects technologiques liés à la miniaturisation des spots. L'ensemble des prototypes mis en oeuvre a été validé en s'appuyant sur un même modèle biologique, le système histone / anticorps anti-histones, lié à des maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux systémique. Différents types de sondes biomoléculaires ont été testés dans le cadre de ce travail : peptides correspondant à un fragment de la protéine histone H3, protéines histones complètes H1 et H3. Les interactions entre ces sondes et un anticorps anti-histone H3 commercial ont été validées par ELISA, avant d'employer ce même système pour caractériser nos prototypes.

Plusieurs stratégies de fabrication de puces s'appuyant sur ce modèle biologique ont été explorées :

- i) immobilisation covalente de peptide H3 sur verre modifié avec des groupements amines primaires,
- ii) synthèse directe de peptide H3 sur verre modifié avec des groupements amines primaires,
- iii) immobilisation covalente d'histones H1 et H3 sur verre modifié avec des groupements esters activés, et
- iv) immobilisation covalente d'histones H1 et H3 sur verre modifié avec le copolymère AMMVE.

L'étude de la synthèse peptidique sur verre aminé entre dans le cadre de la mise au point de puces à peptides, en vue de fabriquer à terme de manière souple des bibliothèques de peptides synthétiques sur support. Une étude préalable à la thèse avait permis d'identifier des conditions de couplage d'acides aminés sur verre aminé. Nous avons immobilisé sur verre aminé des peptides présynthétisés protégés au niveau de leurs chaînes latérales. Nous avons étudié les conditions de déprotection de ces peptides, puis leur comportement après déprotection. Nous avons pu montrer qu'une déprotection dans une solution de TFA concentré ne dégrade pas nos couches de fonctionnalisation, et permet de conférer aux peptides déprotégés une capacité d'interaction avec un anticorps anti-peptide. Nous avons ensuite procédé à une synthèse du même peptide sur support de silice. Après déprotection, nous n'avons pas été en mesure de montrer que le peptide synthétisé présente une affinité pour un anticorps anti-peptide. Ceci peut être dû à une trop faible densité de peptide synthétisé sur la surface, soit à cause d'un trop faible rendement de synthèse, ou à des défauts dans la structure du peptide synthétisé. Il sera nécessaire de poursuivre des essais de synthèse, en caractérisant la structure des peptides obtenus avec des outils plus puissants que les mesures de fluorescence (techniques de purification et spectrométrie de masse).

Dans une deuxième partie, nous avons testé différentes chimies de surface sur verre pour l'immobilisation de protéines histones complètes. L'interaction des sondes histones sur verre avec un anticorps commercial a été comparée avec le même système en plaque ELISA. Deux chimies de surface ont été testées: NHS ester et AMMVE. Après optimisation, les lames AMMVE ont permis d'améliorer de deux ordres de grandeur le seuil inférieur de détection de l'anticorps commercial. Par ailleurs le volume d'analyte utilisé avec nos immunoessais sur verre sont 100 fois plus faibles que pour un ELISA classique. Les lames AMMVE ont été utilisées pour analyser huit sérums humains issus de patients atteints de lupus érythémateux systémique. Les tests montrent que les performances de notre immunoessai sur verre AMMVE sont supérieures à des analyses ELISA et Western Blot. Il sera toutefois nécessaire de tester un nombre de sérums plus important pour caractériser correctement ce type de test en terme de sensibilité et de spécificité.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bouchie A. (2002). Shift Anticipated in the DNA microarray market. *Nat. Biotechnol.* 20: 8.
2. MacBeath G. (2002). Protein microarrays and proteomics. *Nat. Genet.* 32: 526-32.
3. Mitchell P. (2002). A perspective on protein microarrays. *Nat. Biotechnol.* 20: 225-9.
4. Soultani-Vignerou S, Dugas V, Rouillat MH, Fédollière J, Duclos MC, Vnuk E, Phaner-Goutorbe M, Bulone V, Martin JR, Wallach J, and Cloarec JP. (2005). Immobilisation of oligo-peptidic probes for microarray implementation: Characterisation by FTIR, Atomic Force Microscopy and 2D fluorescence. *J. Chrom. B* 822: 304-10.
5. Houseman GT. (1996). *Bioconjugate Techniques*: Academic Press, San Diego, California. ISBN 978-0-12-342336-8
6. Kozak M. (1992). Regulation of Translation in Eukaryotic Systems. *Annual Review of Cell Biology* 8: 197-225.
7. Krishna RG, Wold F. (2006). Post-Translational Modification of Proteins. In *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, ed. M Alton, pp. 265-98
8. Vidali G, Gershey EL, Allfrey VG. (1968). Chemical Studies of Histone Acetylation. The distribution of egr-N-acetyllysine in calf thymus histones. *J. Biol. Chem.* 243: 6361-6.
9. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *PNAS* 51: 786-94.
10. Pogo BGT, Allfrey VG, Mirsky AE. (1966). RNA Synthesis and Histone Acetylation during the Course of Gene Activation in Lymphocytes. *PNAS* 55: 805-12.
11. Xiao C-Y, Hübner S, Elliot RM, Caon A, Jans DA. (1996). A Consensus cAMP-dependent Protein Kinase (PK-A) Site in Place of the CcN Motif Casein Kinase II Site of Simian Virus 40 Large T-antigen Confers PK-A-mediated Regulation of Nuclear Import. *J. Biol. Chem.* 271: 6451-7.
12. Trager JB, Steven Martin G. (1997). The role of the Src homology-2 domain in the lethal effect of Src expression in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29: 635-48.
13. Francesconi SC, Eisenberg S. (1991). The Multifunctional Protein OBF1 is Phosphorylated at Serine and Threonine Residues in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 88: 4089-93.
14. Hershko A, Fry M. (1975). Post-Translational Cleavage of Polypeptide Chains: Role in Assembly. *Annual Review of Biochemistry* 44: 775-95.
15. Kornfeld R, Kornfeld S. (1985). Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry* 54: 631-64.
16. Elbein AD. (1987). Inhibitors of the Biosynthesis and Processing of N-Linked Oligosaccharide Chains. *Annual Review of Biochemistry* 56: 497-534.
17. Steen PVd, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. (1998). Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 33: 151 - 208.

18. Wright A, Morrison SL. (1997). Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Trends in Biotechnology* 15: 26-32.
19. Anderson L, Seilhamer J. (1997). A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* 18: 533-7.
20. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. (1999). Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol Cell Biol* 19: 1720-30.
21. Voet D, Voet JG. (2005). *Biochimie*. Bruxelles: De Boeck Université. ISBN 2-8041-4795-9
22. Johns EW. (1964). Studies on histones. *Biochemical Journal* 93: 161-3.
23. Hnilica L, Johns EW, Butler J. (1962). Observations on the Species and Tissue Specificity of Histones. *Biochemical Journal* 82: 123-9.
24. Kornberg R, Lorch Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98: 285-94.
25. MacGillivray AJ. (1968). The histones of some human tissues. *Biochem. J.* 110: 181-5.
26. <http://www.expasy.ch/>. Server of the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) dedicated to the analysis of protein sequences and structures as well as 2-D PAGE.
27. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. (2007). *Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and company. ISBN 0-7167-8724-5
28. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature* 389: 251-60.
29. Kusnezow W, and Hoheisel JD. (2003). Solid supports for microarray immunoassays. *J. Mol. Recognit.* 16: 165-76.
30. De Vlam K, De Keyser F, Verbruggen G, Vandebossche M, Vanneuville B, D'Haese D, Veys EM. (1993). Detection and identification of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Clin. Exp. Rheumatol.* 11: 393-7.
31. Villagra Fernandez SA, Zoghbi Coelho Lobo AZ, Najjar Prado de Oliveira Z, Ichimura Fukumori LM, Marques Périgo A, and Rivitti EA. (2003). Prevalence of antinuclear antibodies in the serum of normal blood donors. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo* 58: 315-9.
32. Shoenfeld Y, and Segol, O. (1989). Anti-histone antibodies in SLE and other autoimmune diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* 7: 265-71.
33. Revillard JP. (2001). *Immunologie*. Bruxelles: De Boeck & Larcier s.a. De Boeck Université. ISBN 2-8041-3805-4
34. Gupta R, and Lim K. (2001). The diagnosis of systemic lupus erythematosus: How the laboratory can help you. *CPD Rheumatology* 2(47-52).
35. Kubo M, Ihn H, Yazawa N, Sato S, Kikuchi K, and Tamaki K. (1999). Prevalence and antigen specificity of anti-histones antibodies in patients with polyomyositis/dermatomyositis. *Journal Investigative Dermatology* 112: 712-5.
36. Shinichi Sato HIYSAITTKKYIKT. (1993). Antihistone antibodies in patients with localized scleroderma. *Arthritis & Rheumatism* 36: 1137-41.
37. Quismorio FP, Beardmore T, Kaufman RL, and Mongan ES. (1983). IgG rheumatoid factors and anti-nuclear antibodies in rheumatoid vasculitis. *Clin. exp. Immunol.* 52: 333-40.
38. Penner E, Muller S, Zimmermann D, and Van Regenmortel MHV. (1987). High prevalence of antibodies to histones among patients with primary biliary cirrhosis. *Clin. exp. Immunol.* 70: 47-52.

39. Manson JJ, and Rahman A. (2006). Systemic lupus erythematosus. *Orphanet Journal of Rare Diseases* doi:10.1186/1750-1172-1-6: 1-6.
40. Portanova JP, Arndt RE, Tan EM, and Kotzin BL. (1987). Anti-histone antibodies in idiopathic and drug-induced lupus recognize distinct intrahistone regions. *J. Immunol.* 138: 446-51.
41. Salmon M, and Gordon C. (1999). The role of apoptosis in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* 38: 1177-83.
42. Zahir Amoura J-CPJ-FBSK. (1999). The key role of nucleosomes in lupus. *Arthritis & Rheumatism* 42: 833-43.
43. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J. Exp. Med.* 179: 1317-30.
44. Weil JH. (2001). *Biochimie générale*. Paris: Dunod. ISBN 2 10 005573 9
45. Merrifield RB. (1962). Peptide synthesis on a solid polymer. *Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol.* 21: 412
46. Frank R. (1992). Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48: 9217-32.
47. Merrifield RB. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide'. *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-54.
48. Carpino L, Han G. (1973). Correction. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group. *J. Org. Chem.* 38: 4218-.
49. Wang S-S. (1973). p-Alkoxybenzyl Alcohol Resin and p-Alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide Resin for Solid Phase Synthesis of Protected Peptide Fragments. *J. Am. Chem. Soc.* 95: 1328-33.
50. Frank R, Doring R. (1988). Simultaneous multiple peptide synthesis under continuous flow conditions on cellulose paper discs as segmental solid supports. *Tetrahedron* 44: 6031-40.
51. Wenschuh H, Volkmer-Engert R, Schmidt M, Schulz M, Schneider-Mergener J, Reineke U. (2000). Coherent Membrane Supports for Parallel Microsynthesis and Screening of Bioactive Peptides. *Biopoly.* 55: 188-206.
52. Reineke U, Volkmer-Engert R, Schneider-Mergener J. (2001). Applications of peptide arrays prepared by the SPOT-technology. *Curr Opin Biotechnol* 12: 59-64.
53. Ast T, Heine N, Germeroth L, Schneider-Mergener J, Wenschuh H. (1999). Efficient assembly of peptomers on continuous surfaces. *Tetrahedron Lett.* 40: 4317-8.
54. Licha K, Bhargava S, Rheinländer C, Becker A, Schneider-Mergener J, and Volkmer-Engert R. (2000). Highly parallel nano-synthesis of cleavable peptide-dye conjugates on cellulose membranes. *Tetrahedron Letts.* 41 1711-5.
55. Volkmer-Engert R, Hoffmann B, Schneider-Mergener J. (1997). Stable attachment of the HMB-linker to continuous cellulose membranes for parallel solid phase spot synthesis. *Tetrahedron Lett* 38: 1029-32.
56. Ast T, Heine Niklas G, Lothar,, Schneider-Mergener J, and Wenschuh H. (1999). Efficient Assembly of Peptomers on Continuous Surfaces. *Tetrahedron Letts.* 40 4317-8.
57. Daniels SB, Bernatowicz MS, Coull JM, and Köster H. (1989). Membranes as solid supports for peptide synthesis *Tetrahedron Letts.* 30: 4345-8
58. Wang Z, Laursen RA. (1992). Multiple peptide synthesis on polypropylene membranes for rapid screening of bioactive peptides. *Pept. Res.* 5: 275-80.

59. Holmes CP, Jones DG. (1995). Reagents for Combinatorial Organic Synthesis: Development of a New o-Nitrobenzyl Photolabile Linker for Solid Phase Synthesis. *J Org Chem* 60: 2318-9.
60. Adler S, Frank R, Lanzavecchia A, Weiss S. (1994). T cell epitope analysis with peptides simultaneously synthesized on cellulose membranes: Fine mapping of two DQ dependent epitopes. *FEBS Letters* 352: 167-70.
61. Kramer A, Keitel T, Winkler K, Stocklein W, Hohne W, and Schneider-Mergener J. (1997). Molecular Basis for the Binding Promiscuity of an Anti-p24 (HIV-1) Monoclonal Antibody. *Cell* 91: 799-809.
62. Dostmann WRG, Nickl C, Thiel S, Tsigelny I, Frank R, Tegge WJ. (1999). Delineation of selective cyclic GMP-dependent protein kinase I α substrate and inhibitor peptides based on combinatorial peptide libraries on paper. *Pharmacol Ther* 82: 373-87.
63. Himpel S, Tegge W, Frank R, Leder S, Joost HG, and Becker W. (2000). Specificity determinants of substrate recognition by the protein kinase DYRK1A. *J. Biol. Chem.* 275: 2431-8.
64. Tegge W, Frank R, Hofmann F, RG: aD. (1995). Determination of cyclic nucleotide-dependent protein kinase substrate specificity by the use of peptide libraries on cellulose paper. *Biochemistry* 34: 10569-77.
65. Espanel X, Huguenin-Reggiani M, van Huijsduijnen RH. (2002). The SPOT technique as a tool for studying protein tyrosine phosphatase substrate specificities. *Protein Sci* 11: 2326-34.
66. Duan Y, and Laursen RA. (1994). Protease substrate specificity mapping using membrane-bound peptides. *Anal. Biochem.* 216: 431-8.
67. Costa O, Tchouatcha-Tchouassom JC, Roux B, Monier aJC. (1986). Anti-H1 histone antibodies in systemic lupus erythematosus: epitope localization after immunoblotting of chymotrypsin-digested H1. *Clin. Exp. Immunol.* 63: 608-13.
68. Ghedira I, Landolsi H, Mankai A, Fabien N, Jeddi M. (2006). Anticorps antihistones au cours du lupus erythemateux systemique, comparaison entre trois techniques : Elisa, dot blot et immunotransfert. *Pathologie Biologie* 54: 148-54.
69. Burlingame RW, Boey ML, Starkebaum G, and Rubin RL. (1994). The Central Role of Chromatin in Autoimmune Responses to Histones and DNA in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Clin. Invest.* 94 184-92.
70. Cohen MG, Pollard KM, and Webb J. (1992). Antibodies to histones in systemic lupus erythematosus: prevalence, specificity, and relationship to clinical and laboratory features. *Annals of the Rheumatic Diseases* 51: 61-6.
71. Gohill J, Cary PD, Couppez M, and Fritzler MJ. (1985). Antibodies from patients with drug-induced and idiopathic lupus erythematosus react with epitopes restricted to the amino and carboxyl termini of histone. *J. Immunol.* 135: 3116-21.
72. Ekins R, Chu FW. (1999). Microarrays: their origins and applications. *Trends Biotechnol* 17: 217-8.
73. MacBeath G, Schreiber SL. (2000). Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 289: 1760-3.
74. Pandey A, Mann M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405: 837-46.
75. Sakanyan V. (2005). High-throughput and multiplexed protein array technology: protein-DNA and protein-protein interactions. *Journal of Chromatography B* 815: 77-95.

76. Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW. (1998). Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends in Biotechnology* 16: 301-6.
77. Gao X, Gulari Erdogan, and Zhou X. (2004). In situ synthesis of oligonucleotide microarrays. *Biopolymers* 73: 579-96.
78. Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, Solas D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* 251: 767-73.
79. Nuwaysir EF, Huang W, Albert TJ, Singh J, Nuwaysir K, Pitas A, Richmond T, Gorski T, Berg JP, Ballin J, McCormick M, Norton J, Pollock T, Sumwalt T, Butcher L, Porter D, Molla M, Hall C, Blattner F, Sussman MR, Wallace RL, Cerrina F, Green RD. (2002). Gene Expression Analysis Using Oligonucleotide Arrays Produced by Maskless Photolithography. *Genome Res.* 12: 1749-55.
80. Zhang M, Ma O, and , Diao X. (2006). Dynamics modeling and analysis of inkjet technology-based oligo DNA microarray spotting. *IEEE Trans. Aut. Sci. Eng.* 3: 159-68.
81. DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. (1997). Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science* 278: 680-6.
82. Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho M, and Lockhart D, . (1997). Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. . *Nat. Biotechnol.* 15: 1359-67.
83. Blackburn JM, Hart DJ. (2005). Fabrication of protein function microarrays for systems-oriented proteomic analysis. *Methods Mol. Biol.* 310: 197-216.
84. Zhu H, Snyder M. (2003). Protein chip technology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7: 55-63.
85. Bae KH, Kwon YD, Shin HC, Hwang MS, Ryu EH, Park KS, Yang HY, Lee DK, Lee Y, Park J, Kwon HS, Kim HW, Yeh BI, Lee HW, Sohn SH, Yoon J, Seol W, and Kim JS. (2003). Human zinc fingers as building blocks in the construction of artificial transcription factors. *Nat. Biotechnol.* 21: 275-80.
86. Kim SH, Tamrazi A, Carlson KE, Katzenellenbogen JA. (2005). A proteomic microarray approach for exploring ligand-initiated nuclear hormone receptor pharmacology, receptor selectivity, and heterodimer functionality. *Mol. Cell. Proteomics* 4 267-77.
87. 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 RA, Gerstein M, Snyder M. (2001). Global Analysis of Protein Activities Using Proteome Chips. *Science* 293: 2101-5.
88. Lee Y, Kang DK, Chang SI, Han MH, Kang IC. (2004). High-throughput screening of novel peptide inhibitors of an integrin receptor from the hexapeptide library by using a protein microarray chip. . *J. Biomol. Screen.* 9: 687-94.
89. Poetz O, Ostendorp R, Brocks B, Schwenk JM, Stoll D, Joos TO, Templin MF. (2005). Protein microarrays for antibody profiling: specificity and affinity determination on a chip. *Proteomics* 5 2402-11.
90. Chiari M, Cretich M, Corti A, Damin F, Pirri G, Longhi R. (2005). Peptide microarrays for the characterization of antigenic regions of human chromogranin A. *Proteomics* 5. : 3600-3.

91. Combaret V, Bergeron C, Brejon S, Iacono I, Perol D, Negrier S, Puisieux A. (2005). Protein chip array profiling analysis of sera from neuroblastoma patients. *Canc. Letts.* 228: 91-6.
92. Hamelinck D, Zhou H, Li L, Verweij C, Dillon D, Feng Z, Costa J, Haab BB. (2005). Optimized Normalization for Antibody Microarrays and Application to Serum-Protein Profiling. *Mol. Cell. Proteomics* 4: 773-84.
93. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Haab BB, Cordon-Cardo C. (2006). Profiling Bladder Cancer Using Targeted Antibody Arrays. *Am. J. Pathol.* 168: 93-103.
94. Robinson WH, DiGennaro C, Hueber W, Haab BB, Kamachi M, Dean EJ, Fournel S, Fong D, Genovese MC, de Vegvar HE, Skriver K, Hirschberg DL, Morris RI, Muller S, Pruijn GJ, van Venrooij WJ, Smolen JS, Brown PO, Steinman L, Utz PJ. (2002a.). Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. . *Nat. Med.* 8 295-301.
95. Robinson WH, Steinman L, Utz PJ. (2002b.). Protein and peptide array analysis of autoimmune disease. *Biotechniques (Suppl.):* 66-9.
96. Cahill DJ. (2001). Protein and antibody arrays and their medical applications. *J. Immunol. Methods* 250: 81-91.
97. Joos TO, Schrenk M, Höpfl P, Kröger K, Chowdhury U, Stoll D, Schörner D, Dürr M, Herick K, Rupp S, Sohn K, Hämmerle H. (2000). A microarray enzyme-linked immunosorbent assay for autoimmune diagnostics. *Electrophoresis* 21: 2641-50.
98. Mezzasoma L, Bacarese-Hamilton T, Di Cristina M, Rossi R, Bistoni F, and Crisanti A. (2002). Antigen microarrays for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin. Chem* 48: 121-30.
99. Neuman de Vegvar HE, Amara RR, Steinman L, Utz PJ, Robinson HL, and Robinson WH. (2003). Microarray Profiling of Antibody Responses against Simian-Human Immunodeficiency virus: postchallenge convergence of reactivities independent of host histocompatibility type and vaccine regimen. *J. Virol.* 77: 11125-38.
100. Bacarese-Hamilton T, Gray J, Ardizzoni A, Frisanti A. (2005). Allergen microarrays. *Methods Mol. Med.* 114: 195-207.
101. Hueber W, Kidd BA, Tomooka BH, Lee BJ, Bruce B, Fries JF, Sonderstrup G, Monach P, Drijfhout JW, van Venrooij WJ, Utz PJ, Genovese MC, Robinson, W H. . (2005.). Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. . *Arthritis Rheum.* 52 2645-55.
102. Predki PF. (2004). Functional protein microarrays: ripe for discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8: 8-13.
103. Wilson DS, and Nock S. (2001). Functional protein microarrays. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6: 81-5.
104. Grubor NM, Shinar R, Jankowiak R, Porter MD, and Small GJ. (2004). Novel biosensor chip for simultaneous detection of DNA-carcinogen adducts with low-temperature fluorescence. *Biosens. Bioelectron.* 19 547-56.
105. MacBeath G, Koehler AN, Schreiber SL. (1999). Printing small molecules as microarrays and detecting protein-ligand interactions en masse. *J. Am. Chem. Soc.* 121: 7967-8.
106. Zhu H, Klemic J F, Chang S, Bertone P, Casamayor A, Klemic K G, Smith D, Gerstein M, Reed M A, M S. (2000). Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat. Genet.* 26: 283-9.

107. Angenendt P, Glokler J, Murphy D, Lehrach H, Cahill DJ. (2002). Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials. *Anal Biochem* 309: 253-60.
108. Ruiz-Taylor L, Martin T L, Zaugg F G, Witte K, Indermuhle P, Nock S, P W. (2001). Monolayers of derivatized poly(L-lysine)-grafted poly(ethylene glycol) on metal oxides as a class of biomolecular interfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 852-7.
109. Guschin D, Yershov G, Zaslavsky A, Gemmell A, Shick V, Proudnikov D, Arenkov P, Mirzabekov A. (1997). Manual Manufacturing of Oligonucleotide, DNA, and Protein Microchips. *Anal Biochem* 250: 203-11.
110. Mazurczyk R, El Khoury G, Dugas V, Hannes B, Laurenceau E, Cabrera M, Krawczyka S, Souteyrand E, Cloarec JP, and Chevolut Y. (2007). Low-cost, fast prototyping method of fabrication of the microreactor devices in soda-lime glass. *Sens. Act. B*: Article in press.
111. Bain CD, Troughton EB, Tao Y-T, Evall J, Whitsides GM, and Nuzzo RG. (1989). Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 321-35.
112. Houseman BT, Huh JH, Kron SJ, and Mrksich M. (2002). Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity. *Nat. Biotechnol.* 20: 270-4.
113. Arenkov P, Kukhtin A, Gemmell A, Voloshchuk S, Chupeeva V, Mirzabekov A. (2000). Protein Microchips: Use for Immunoassay and Enzymatic Reactions. *Anal Biochem* 278: 123-31.
114. Rubina AY, Dementieva EI, Stomakhin AA, Darii EL, Pan'kov SV, Barsky VE, Ivanov SM, Konovalova EV, Mirzabekov AD. (2003). Hydrogel-Based Protein Microchips: Manufacturing, Properties, and Applications. *Biotechniques* 34: 1008-19.
115. Afanassiev V, Hanemann V, Wolf S. (2000). Preparation of DNA and protein micro arrays on glass slides coated with an agarose film. *Nucl Acids Res* 28: e66-.
116. Kiyonoka S, Sada K, Yoshimura I, Shinlai S, Kato N, Hamachi I. (2004). Semi-wet peptide/protein array using supramolecular hydrogel. *Nat. Mater.* 3: 58-64.
117. Aina OH, Sroka TC, Chen ML, and Lam KS. (2002). Therapeutic cancer targeting peptides. *Biopolymers* 66: 184-99.
118. Haab BB, Dunham MJ, Brown P. (2001). Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Gen. Biol.* 2: research0004.1-13.
119. Lin SC, Tseng FG, Huang HM, Huang CY, and Chieng CCF. (2001). Microsized 2D protein arrays immobilized by micro-stamps and micro-wells for disease diagnosis and drug screening. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 371: 202-8.
120. Mendoza LG, McQuary P, Mongan A, Gangadharan R, Brignac S, and Eggers M. (1999). High-Throughput Microarray-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *BioTechniques* 27: 778-88.
121. Kusnezow W, Jacob A, Walijew A, Diehl F, and Hoheisel JD. (2003). Antibody microarrays: An evaluation of production parameters. *Proteomics* 3: 254-64.
122. Michael Green N, Meir Wilchek and Edward AB. (1990). Avidin and streptavidin. In *Methods in Enzymology*, pp. 51-67: Academic Press
123. Peluso P, Wilson DS, Do D, Tran H, Venkatasubbaiah M, Quincy D, Heidecker B, Poindexter K, Tolani N, Phelan M, Witte K, Jung LS, Wagner P, and Nock S. (2003). Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays. *Anal. Biochem.* 312: 113-24.

124. Fang Y, Frutos AG, and Lahiri J. (2002). Membrane protein microarrays. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 2394-5.
125. Snapyan M, Lecoq M, Guével L, Arnaud MC, Ghochikyan A, and Sakanyan V. (2003). Dissecting DNA-protein and protein-protein interactions involved in bacterial transcriptional regulation by a sensitive protein array method combining a near-infrared fluorescence detection. *Proteomics* 3: 647-57.
126. Espejo A, Côté J, Bednarck A, Richard S, and Bedford MT. (2002). A protein-domain microarray identifies novel protein-protein interactions. *Biochem. J* 367: 697-702.
127. Hu H, Columbus J, Zhang Y, Wu D, Lian L, Yang S, Goodwin J, Luczak C, Carter M, Chen L, James M, Davis R, Sudol M, Rodwell J, and Herrero JJ. (2004). A map of WW domain family interactions. *Proteomics* 4: 643-55.
128. Pawson T, Nash P. (2003). Assembly of Cell Regulatory Systems Through Protein Interaction Domains. *Science* 300: 445-52.
129. Pawson T, Scott JD. (1997). Signaling Through Scaffold, Anchoring, and Adaptor Proteins. *Science* 278: 2075-80.
130. Blancafort P, Magnenat L, and Barbas III CF. (2003). Scanning the human genome with combinatorial transcription factor libraries. *Nat. Biotechnol.* 21 269-74.
131. Liu B, Han Y, Corey DR, and Kodadek T. (2002). Toward synthetic transcription activators: recruitment of transcription factors to DNA by a PNA-peptide chimera. *J. Am. Chem. Soc* 124: 1838-9.
132. Belov L, De la Vega O, Dos Remedios CG, Mulligan SP, and Christopherson RICR. (2001). Immunophenotyping of leukemias using a Cluster of Differentiation antibody microarray. 61: 4483-9.
133. Soen Y, Chen DS, Kraft DL, Davis MM, and Brown PO. (2003). Detection and characterization of cellular immune responses using peptide-MHC microarrays. *PLoS Biol* 1: e65.
134. Coleman M, Miller KA, Beernink PT, Yoshikawa DM, and Albala JS. (2003). Identification of chromatin-related protein interactions using protein microarrays. *Proteomics* 3: 2101-7.
135. Zhang J-Y, Casiano CA, Peng X-X, Koziol JA, Chan EKL, and Tan EM. (2003). Enhancement of Antibody Detection in Cancer Using Panel of Recombinant Tumor-associated Antigens. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 12: 136-43.
136. Casiano CA, Mediavilla-Varela M, Tan EM. (2006). Tumor-associated Antigen Arrays for the Serological Diagnosis of Cancer. *Mol Cell Proteomics* 5: 1745-59.
137. Lesaicherre ML, Uttamchandani M, Chena GY, and Yao SQ. (2002). Antibody-based fluorescence detection of kinase activity on a peptide array. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 2085-8.
138. Seong SY, and Choi CY. (2003). Current status of protein chip development in terms of fabrication and application. *Proteomics* 3: 2176-89.
139. Beyer M, Felgenhauer T, Bischoff RF, Breitling F, and Stadler V. (2006). A novel glass slide-based peptide array support with high functionality resisting non-specific protein adsorption. *Biomaterials* 27: 3505-14.
140. Lesaicherre ML, Uttamchandani M, Chena GY, and Yao SQ. (2002). Developing site-specific immobilization strategies of peptides in a microarray. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 2079-83.

141. Uttamchandani M, Chena GY, Lesaicherre ML, and Yao SQ. (2004). Site-specific peptide immobilization strategies for the rapid detection of kinase activity on microarrays. *Methods Mol. Biol.* 264: 191-204.
142. Uttamchandani M, Wang J, and Yao SQ. (2006). Protein and small molecule microarrays: powerful tools for high-throughput proteomics. *Mol. BioSyst.* 2: 58-68.
143. Falsey JR, Renil M, Park S, Li S, and Lam KS. (2000). Peptide and small molecule microarray for high throughput cell adhesion and functional assays. *Bioconjug. Chem.* 12: 346-53.
144. Xu Q, and Lam KS. (2002). An efficient approach to prepare glyoxylyl functionality on solid-support. *Tetrahedron Letts.* 43: 4435-7.
145. Gao X, Pellois JP, Na Y, Kim Y, Gulari E, Zhou X. (2004). High density peptide microarrays. In situ synthesis and applications. *Mol. Div.* 8: 177-87.
146. Gao X, Zhou X, Gulari E. (2003). Light directed massively parallel on-chip synthesis of peptide arrays with t-Boc chemistry. *Proteomics* 3: 2135-41.
147. Pellois JP, Zhou X, Srivannavit O, Zhou T, Gulari E, Gao X. (2002). Individually addressable parallel peptide synthesis on microchips. *Nat. Biotechnol.* 20: 922 - 6.
148. Mujumdar RB, Ernst LA, Mujumdar RB, Lewis CJ, and Waggoner AS. (1993). Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. *Bioconjug. Chem.* 4: 105-11.
149. Cretich M, Damin F, Pirri G, Chiari M. (2006). Protein and peptide arrays: Recent trends and new directions. *Biomol. Eng.* 23: 77-88.
150. Vnuk E. (2005). Développement d'outils d'analyse de fluorescence appliqués au génotypage sur puce à ADN: - De l'acquisition à l'analyse d'images, - Mesures de cinétique d'hybridation en temps réel basées sur le transfert d'énergie. *Thèse effectuée à l'Ecole Centrale de Lyon N° d'ordre: 2005-19*
151. Espina V, Woodhouse EC, Wulkuhle J, Qsmussen HD, Petricoin III EF, Liotta LA. (2004). Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies. *J. Immunol.Methods* 290: 121-33.
152. Cretich M, Pirri G, Damin F, Solinas I, Chiari M. (2004). A new polymeric coating for protein microarrays. *Analytical Biochemistry* 332: 67-74.
153. Schweitzer B, Predki P, and Snyder M. (2003). Microarrays to characterize protein interactions on a whole-proteome scale. *Proteomics* 3: 2190-9.
154. Ge H. (2000). UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein-DNA, protein-RNA and protein-ligand interactions. *Nucl Acids Res* 28: e3.
155. Weng S, GU K, Hammond PW, Lohse P, Rise C, Wagner RW, Wright MC, and Kuimelis RG. (2002). Generating addressable protein microarrays with PRO-fusion covalent mRNA-protein fusion technology. *Proteomics* 2: 48-57.
156. Bischoff R, and Luiders TM. (2004). Methodological advances in the discovery of protein and peptide disease markers. *J. Chrom. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci* 803: 27-40.
157. Johnsson B, Lofas S, Lindquist G. (1991). Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Analytical Biochemistry* 198: 268-77.
158. Ramachandran N, Larson DN, Stark P, R., Hainsworth E, and LaBaer J. (2005). Emerging tools for real-time label-free detection of interactions on functional protein microarrays. *FEBS J* 272: 5412-25.

159. Homola J, Yee SS, and Gauglitz G. (1999). Surface plasmon resonance sensors: review. *Sens. Act. B* 54: 3-15.
160. Malmqvist M, Karlsson R. (1997). Biomolecular interaction analysis: affinity biosensor technologies for functional analysis of proteins. *Current Opinion in Chemical Biology* 1: 378-83.
161. Davis TM, and Wilson WD. (2000). Determination of the refractive index increments of small molecules for correction of surface plasmon resonance data. *Anal. Biochem.* 284: 348-53.
162. Quinn JG, O'Neill S, Doyle A, McAtamney C, Diamond D, MacCraith BD, and O'Kennedy R. (2000). Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. *Anal. Biochem.* 281: 135-43.
163. Dugas V, Depret G, Chevalier Y, Nesmeb X, Souteyrand E. (2004). Immobilization of single-stranded DNA fragments to solid surfaces and their repeatable specific hybridization: covalent binding or adsorption? *Sens. Actuat. B* 101: 112-21.
164. Sokal RR, and Rohlf JF. (1981). Biometry: the principals and practice of statistics in biological research. . *W.H. Freeman, New York*
165. Moncharmont P, Monneron P. (1998). Essai d'un temoin multiparametrique au laboratoire de qualification biologique du don. *Revue Francaise des Laboratoires* 1998: 45-7.
166. Green J, Ogunjobi OM, Ramage R, Stewart ASJ, McCurdy S, R. aN. (1988). Application of the NG-(2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulphonyl) derivative of Fmoc-arginine to peptide synthesis. *Tetrahedron Lett* 29: 4341-4.
167. Ramage R aGJ. (1987). NG-2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulphonyl-L-arginine: A new acid labile derivative for peptide synthesis. *Tetrahedron Lett* 28: 2287-90.
168. Sieber P, B aR. (1991). Protection of carboxamide functions by the trityl residue. Application to peptide synthesis. *Tetrahedron Lett* 32: 739-42.
169. Gitlin GK, I. Bayer, E.A. Wilchek, M. and Muszkat, K.A. (1989). Studies on the biotin-binding sites of avidin and streptavidin. A chemically induced dynamic nuclear polarization investigation of the status of tyrosine residues. *Biochem. J* 259: 493-8.
170. <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1mk5>.
171. Bras M, Dugas V, Bessueille F, Cloarec JP, Martin JR, Cabrera M, Chauvet JP, Souteyrand E, Garrigues aM. (2004). Optimisation of a silicon/silicon dioxide substrate for a fluorescence DNA microarray. *Biosensors and Bioelectronics* 20: 797-806.
172. Allard L, Cheynet V, Oriol G, Mandrand B, Delair T, and Mallet F. (2002). Versatile method for production and controlled polymer-immobilization of biologically active recombinant proteins. *Biotechnol. Bioeng* 80: 341-8.
173. Isosaki K, Seno N, and Matsumoto I. (1992). Immobilization of protein ligands with methyl vinyl ether-maleic anhydride copolymer. *J. Chromatogr* 597: 123-8.

ANNEXES

ANNEXE 1

Spectres HPLC des peptides synthétisés sur résine

La phase stationnaire de la colonne HPLC est une phase inverse composée de billes de silice, sur lesquelles sont greffées des chaînes linéaires monomériques de 18 atomes de carbones (C18). La phase mobile est constituée d'un éluant polaire, l'acétonitrile.

1. Spectre du peptide protégé biotinylé

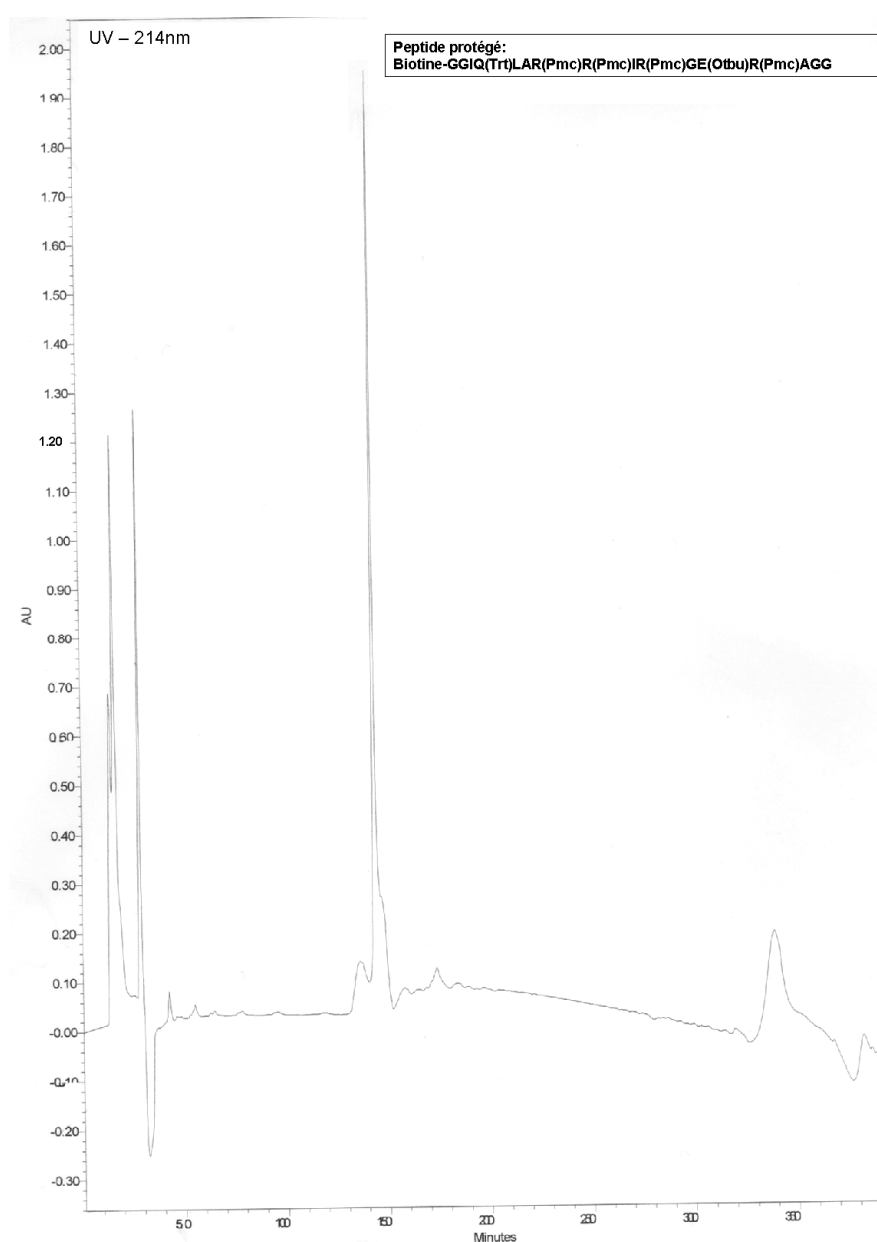


Fig.A1.1. Temps de rétention du peptide protégé biotinylé.

2. Spectre du peptide déprotégé biotinylé

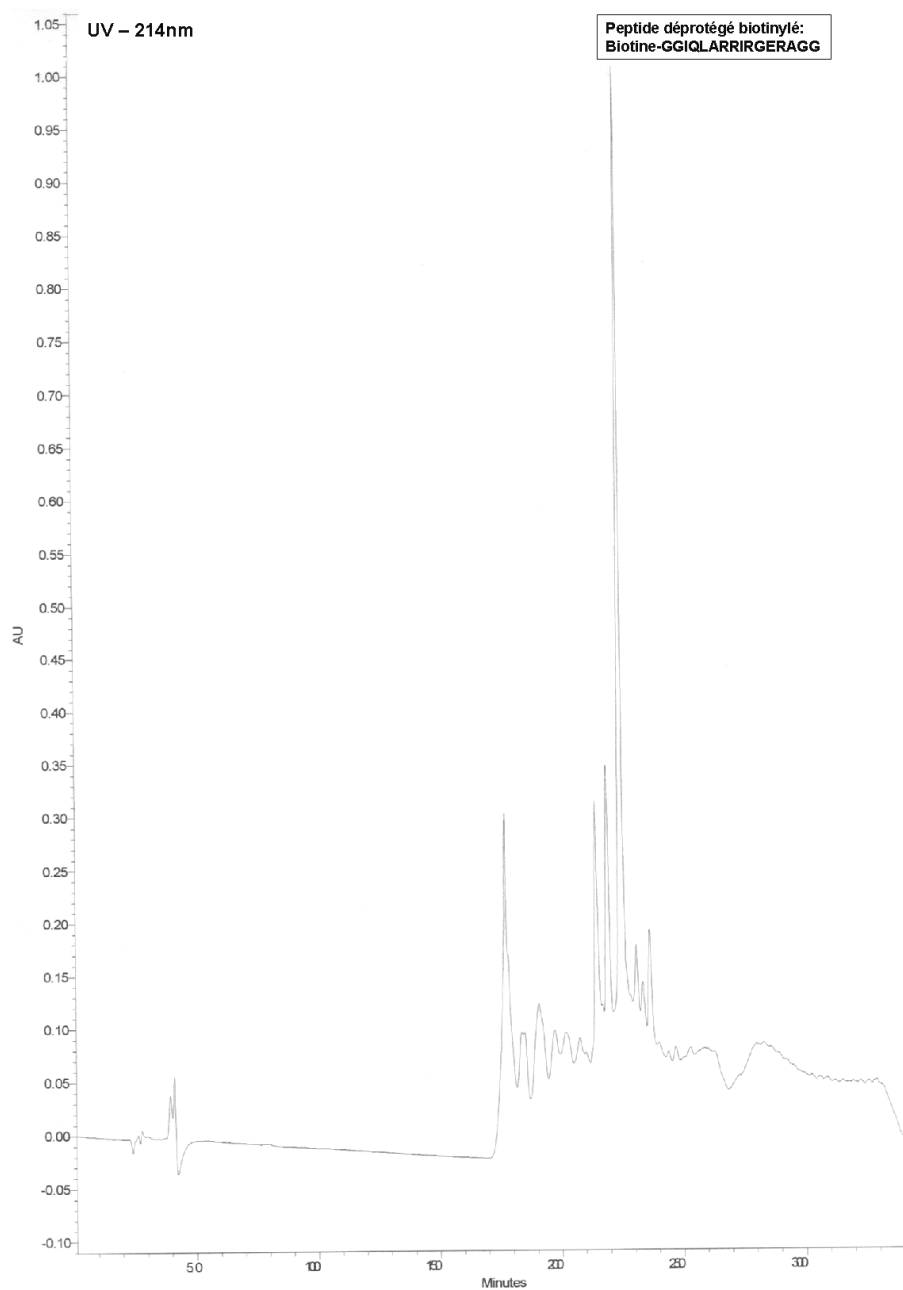
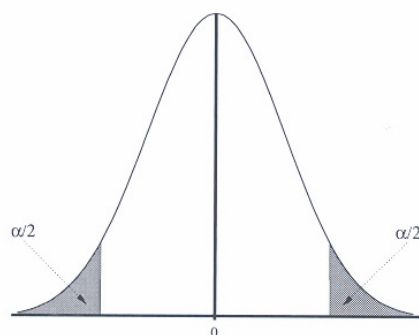


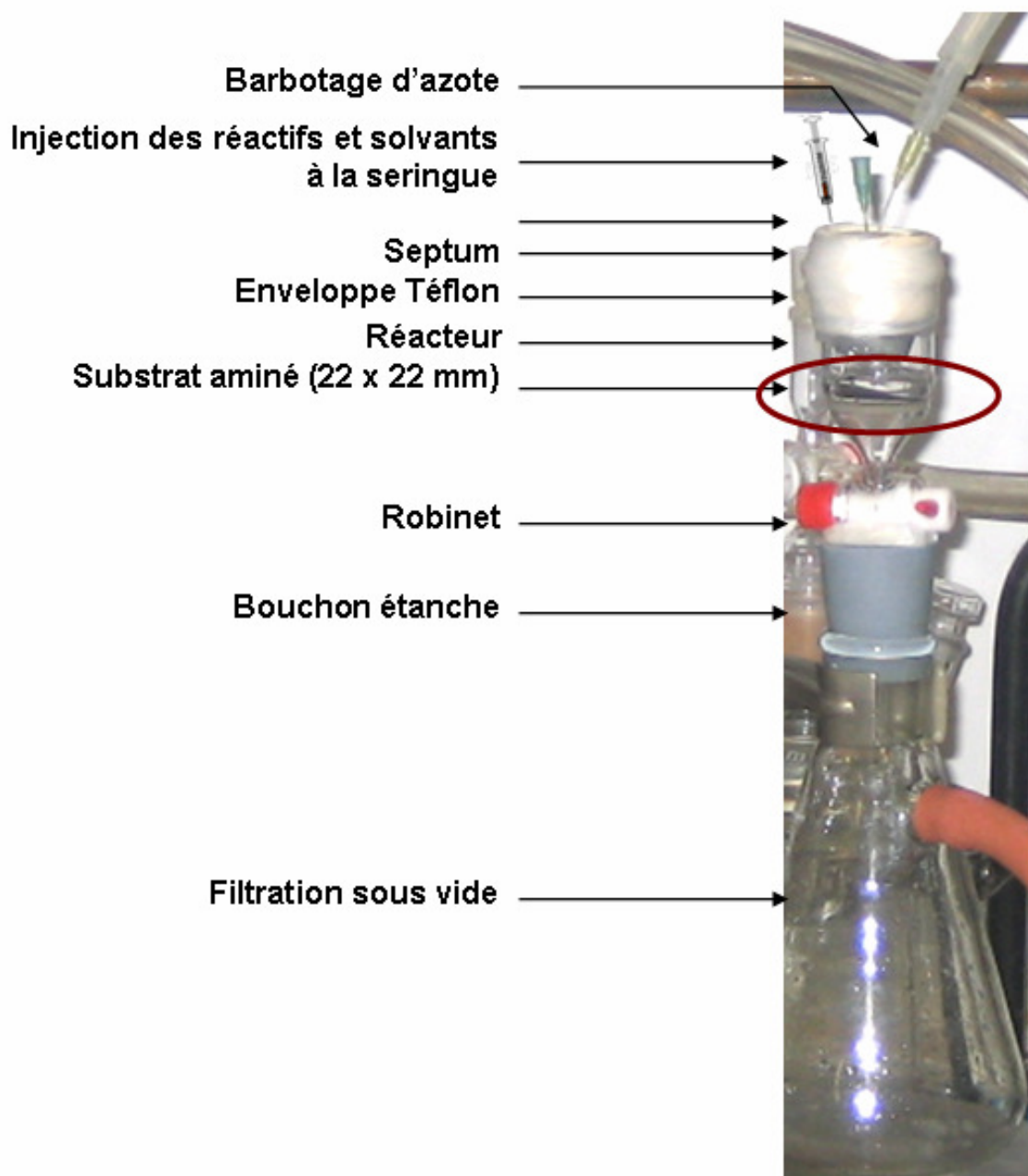
Fig.A1.2. Temps de rétention du peptide déprotégé biotinylé.

ANNEXE 2

Valeurs critiques de la distribution du t de Student

ν	α	0.80	0.50	0.20	0.10	0.050	0.02	0.01	0.002	0.001
	$\alpha/2$	0.40	0.25	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001	0.0005
1		0.325	1.000	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	318.3	636.6
2		0.289	0.816	1.886	2.920	4.303	6.695	9.925	22.33	31.60
3		0.277	0.765	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.21	12.92
4		0.271	0.741	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5		0.267	0.727	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893	6.869
6		0.265	0.718	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7		0.263	0.711	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8		0.262	0.706	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9		0.261	0.703	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10		0.260	0.700	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587
11		0.260	0.697	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.025	4.437
12		0.259	0.695	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	3.930	4.318
13		0.259	0.694	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012	3.852	4.221
14		0.258	0.692	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	3.787	4.140
15		0.258	0.691	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	3.733	4.073
16		0.258	0.690	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	3.686	4.015
17		0.257	0.689	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.646	3.965
18		0.257	0.688	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.610	3.922
19		0.257	0.688	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.579	3.883
20		0.257	0.687	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845	3.552	3.850
21		0.257	0.686	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.527	3.819
22		0.256	0.686	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.505	3.792
23		0.256	0.685	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.485	3.767
24		0.256	0.685	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.467	3.745
25		0.256	0.684	1.316	1.708	2.060	2.405	2.787	3.450	3.725
26		0.256	0.684	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.435	3.707
27		0.256	0.684	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.057	3.421
28		0.256	0.683	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.408	3.674
29		0.256	0.683	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756	3.396	3.659
30		0.256	0.683	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.385	3.646
40		0.255	0.681	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.307	3.551
60		0.254	0.679	1.296	1.671	2.000	2.390	2.660	3.232	3.460
120		0.254	0.677	1.289	1.658	1.980	2.358	2.617	3.160	3.373
∞		0.253	0.674	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.090	3.291



ANNEXE 3**Montage utilisé pour la synthèse peptidique *in situ* sur support de dioxyde de silicium**

*PUBLICATIONS
ET COMMUNICATIONS*

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

- **EL KHOURY G., LAURENCEAU E., DUGAS V., CHEVOLOT Y., MERIEUX Y., DUCLOS M.C., SOUTEYRAND E., RIGAL D., WALLACH J., AND CLOAREC J.P.** Acid deprotection of covalently immobilized peptide probes for peptide microarrays. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol.*, 2007; 1: 2242-2246.

- **MAZURCZYK R., EL KHOURY G., DUGAS V., HANNES B., LAURENCEAU E., CABRERA M., KRAWCZYK S., SOUTEYRAND E., CLOAREC J.P. AND CHEVOLOT Y.** Low-cost, fast prototyping method of fabrication of the microreactor devices in soda-lime glass. *Sens. Actuators, B, Chem.*, 2008; 128: 552-559.

- **EL KHOURY G., LAURENCEAU E., DUGAS V., CHEVOLOT Y., MERIEUX Y., DESBOS A., FABIEN N., RIGAL D., SOUTEYRAND E., AND CLOAREC J.P.** Protein microarrays versus ELISA and Western blot: Improvement of performances on MAMVE surface chemistry. *En cours de préparation.*

COMMUNICATIONS

➤ Communications orales

- **EL KHOURY G., LAURENCEAU E., CHEVOLOT Y., MERIEUX Y., DUCLOS M.C., SOUTEYRAND E., RIGAL D., WALLACH J., CLOAREC J.P.** Acid deprotection of covalently immobilized peptide probes for peptide microarrays.

10th International Symposium on Biochromatography – Société de BioChromatographie et Nanoséparations – SBCN – Ecole Normale Supérieure de Chimie - Lille, France ; 26 – 28 Avril 2006.

- **EL KHOURY G., LAURENCEAU E., CHEVOLOT Y., MERIEUX Y., DUCLOS M.C., SOUTEYRAND E., RIGAL D., WALLACH J., CLOAREC J.P.** Covalent immobilisation of oligopeptides on soda lime glass for protein microarrays.

20th European Conference on Biomaterials - Cité des congrès – Nantes, France ; 27 Septembre – 1^{er} Octobre 2006.

➤ Posters

- **EL KHOURY G., LAURENCEAU E., DUGAS V., CHEVOLOT Y., MERIEUX Y., DUCLOS M.C., SOUTEYRAND E., RIGAL D., WALLACH J., AND CLOAREC J.P.** Covalent coupling of (Maleic Anhydride-alt-Methyl Vinyl Ether) copolymers onto aminated glass slides for protein immobilization and detection of protein-ligand interactions on microarrays.

21st Annual Symposium of The Protein Society – Boston Marriott Copley Place - Boston, MA, Etats-Unis ; 21 – 25 Juillet, 2007.

- **EL KHOURY G., LAURENCEAU E., DUGAS V., CHEVOLOT Y., MERIEUX Y., DUCLOS M.C., SOUTEYRAND E., RIGAL D., WALLACH J., AND CLOAREC J.P.** Acid deprotection of covalently immobilized peptide probes for peptide microarrays.
29th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society – Cité Internationale – Lyon, France; 23 – 25 Août 2007.

- **EL KHOURY G., LAURENCEAU E., DUGAS V., CHEVOLOT Y., MERIEUX Y., DUCLOS M.C., SOUTEYRAND E., RIGAL D., WALLACH J., AND CLOAREC J.P.** Outils de conception et de fabrication de biopuces pour la protéomique.
Colloque de la Recherche et de l'Intergroupe de l'Ecole Centrale de Lyon – Ecole Centrale de Lille – Lille, France ; 11 – 13 Mai 2005.

- **EL KHOURY G., LAURENCEAU E., DUGAS V., CHEVOLOT Y., MERIEUX Y., DUCLOS M.C., SOUTEYRAND E., RIGAL D., WALLACH J., AND CLOAREC J.P.** Biopuces pour la protéomique: mise au point d'un prototype de test de l'interaction biologique entre antigène et anticorps sur verre.
Journées Nanosciences et Nanotechnologies en Rhône – Alpes – JNNRA - Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique de Lyon, CPE – Villeurbanne, France ; 24 – 25 Novembre 2005.

➤ **Conférence invité**

- **EL KHOURY G., HAZOT P., BOU CHAKRA E., DUCLOS M.C., CHEVOLOT Y., CABRERA M., SOUTEYRAND E., LAURENCEAU E., WALLACH J., CLOAREC J.P.** From DNA microarrays to chips for proteomics: surface chemistry, implementation methods, characterization.
First Symposium of Analytical Chemistry and Biology: “from molecule to proteome” - Montpellier, France; 26 – 29 Septembre 2005.

AUTORISATION DE SOUTENANCE

Vu les dispositions de l'arrêté du 25 avril 2002,

Vu la demande du Directeur de Thèse

Monsieur J-P. CLOAREC

et les rapports de

Madame C-M. PRADIER

Directeur de Recherche CNRS - Laboratoire des Réactivités de Surface (LRS) - 4, place Jussieu - tour
54-55 - 75252 PARIS cedex 05

Et de

Monsieur O. MELNYK

Directeur de Recherche CNRS - Institut de Biologie de Lille (IBL) - 1, rue Professeur Calmette - 59021
LILLE

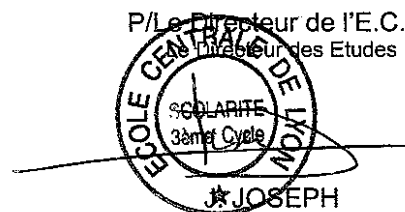
Mademoiselle EL KHOURY Graziella

est autorisé à soutenir une thèse pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**

Ecole doctorale ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE (EEA)

Fait à Ecully, le 18 janvier 2008

P/Le Directeur de l'E.C.L.
Le Directeur des Etudes



RESUME

La technologie des puces à peptides et à protéines a connu un grand essor dans le domaine de la recherche biomédicale et le diagnostic. Elle permet l'identification et l'analyse en parallèle de centaines, voire de milliers d'interactions intermoléculaires entre des biomolécules sondes (ex : antigène : peptides, protéines) et leurs cibles (ex : anticorps), présentes dans un milieu biologique complexe, comme le sérum.

Ce travail de thèse consiste à explorer de nouvelles voies de fabrication de puces à peptides et à protéines, en utilisant une méthode de détection par fluorescence. Différentes chimies de surface ont été testées pour la fonctionnalisation des lames de verre. Des immunoessais miniaturisés ont été effectués sur puces pour la détection d'anticorps anti-histones dans le sérum de patients atteints d'une maladie auto-immune, le lupus érythémateux systémique (LES). Les performances analytiques de ces tests ont été comparées à celles des techniques immunologiques classiques, comme l'ELISA et le Western blot.

Les puces à peptides ont été développées en vue de fabriquer à terme des bibliothèques de peptides synthétiques sur support solide (synthèse *in situ*). L'optimisation des conditions de déprotection de peptides sur puce (étape clé de la synthèse *in situ*) a d'abord été effectuée sur un peptide, fragment de protéine histone H3, présynthétisé sur résine et protégé au niveau de sa chaîne latérale. Ce peptide a été immobilisé (par voie *ex situ*) et déprotégé à l'acide trifluoroacétique (TFA) sur support de verre aminé. La déprotection dans une solution d'acide concentré a permis de conserver la stabilité des surfaces fonctionnalisées, et de conférer au peptide déprotégé son interaction biologique avec un anticorps anti-histone H3 peptide. Ces résultats corrélaient avec ceux obtenus en ELISA entre le peptide présynthétisé protégé ou déprotégé sur résine et l'anticorps spécifique. Le même peptide a été ensuite synthétisé sur supports Si/SiO₂ aminés. Les surfaces ont conservé une bonne stabilité vis-à-vis des différents traitements effectués au cours de la synthèse et après la déprotection finale du peptide sur le support. Cependant, l'activité biologique du peptide synthétisé *in situ* doit être davantage étudiée, et le peptide doit être clivé et caractérisé par des techniques analytiques, comme la spectrométrie de masse.

Les puces à protéines ont été élaborées en testant deux chimies de surface pour l'immobilisation de protéines histones: surface NHS (N-hydroxysuccinimide) ester et surface aminée modifiée avec le copolymère AMMVE (Anhydride Maléique-*alt*-Méthyl Vinyl Ether). Les immunoessais effectués sur les lames AMMVE ont permis d'atteindre un seuil inférieur de détection de l'anticorps commercial 50 fois plus bas que celui atteint en ELISA. Par ailleurs le volume d'analyte utilisé avec les immunoessais sur verre ont été réduits d'un facteur 100 par rapport à un ELISA classique. Les lames AMMVE ont été utilisées pour analyser des sérums humains issus de patients atteints de LES. Les tests effectués sur verre AMMVE étaient plus sensibles que les immunoessais classiques ELISA et Western blot.

MOTS CLES AMMVE, déprotection, ELISA, fluorescence, immunoessais, puces à peptides, puces à protéines, synthèse peptidique, Western Blot.

ABSTRACT

Peptide and protein microarrays technology has shown great advancements in the field of biomedical research and diagnosis. It allows parallel analysis of multiple biomolecular interactions between probes (e.g. antigen: peptide, protein) and their targets, present in a complex biological sample, such as serum.

This work consists to explore new methods for peptide and protein microarrays implementation, using fluorescent detection.

Different surface chemistries have been developed to functionalize glass slides for the immobilization of peptide or proteins. Miniaturized immunoassays have been realized on microarrays for the detection of anti-histones antibodies in the sera of patients with auto-immune disease, the systemic lupus erythematosus (SLE). Analytical performances of these tests were compared with those of classical immunoassays, such as ELISA and Western blot.

The aim of peptide microarrays development is to elaborate peptide libraries on solid support by *in situ* peptide synthesis. One of the key points of *in situ* synthesis is the final deprotection of the peptide on the support. This step was first optimized using a presynthesized side chain protected peptide, a fragment of histone H3 protein, presynthesized on resin. The peptide was immobilized onto amino functionalized glass surface by activation of its C-terminus (*ex situ* immobilization). The deprotection was carried out by using concentrated trifluoroacetic acid solution (TFA). This protocol allowed to conserve the stability of functionalized surfaces, and the biological interaction of the deprotected peptide with anti-histone H3 antibody. These results correlated with those obtained in classical ELISA between the specific antibody and the presynthesized protected peptide, versus non protected peptide. The same peptide epitope was then synthesized *in situ* on Si/SiO₂ aminated support. The surface showed good stability after different synthesis cycles and acid deprotection on the substrate. However, the biological activity of the peptide synthesized *in situ* should be further studied, and the peptide should be cleaved and characterized with analytical tools, such as mass spectrometry.

We also evaluated the performances of our protein microarrays for the detection of anti-histone antibodies in human serum of patients with SLE. We tested two surface chemistries for the immobilization of histone proteins: NHS ester surface and aminated surface modified with Maleic Anhydride-*alt*-Methyl Vinyl Ether (MAMVE) copolymer. The performances of our miniaturized immunoassays were compared to those of classical ELISA and Western blot. Results indicated that low detection limit obtained on MAMVE surfaces with commercial anti-histone antibody was 50 fold better than that of classical ELISA. Furthermore, 100 times less volume of biological materials are required. Our miniaturized immunoassays were more sensitive than ELISA and Western blot for the detection of anti-histone antibodies in human serum.

KEYWORDS Deprotection, ELISA, fluorescence, immunoassays, MAMVE, peptide microarrays, protein microarrays, peptide synthesis, Western blot.

