



HAL
open science

Surfaces fonctionnalisées et interactions avec des systèmes biologiques - Puces à protéines pour le diagnostic

Emmanuelle Laurenceau

► **To cite this version:**

Emmanuelle Laurenceau. Surfaces fonctionnalisées et interactions avec des systèmes biologiques - Puces à protéines pour le diagnostic. Matériaux. Université de Lyon - École Centrale de Lyon, 2015. tel-01729152

HAL Id: tel-01729152

<https://hal.science/tel-01729152v1>

Submitted on 17 Jan 2024

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

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



ÉCOLE
CENTRALE LYON



Habilitation à Diriger la Recherche

Surfaces fonctionnalisées et interactions avec des systèmes biologiques

- Puces à protéines pour le diagnostic -

Présentée par

Emmanuelle Laurenceau

Soutenue le 23 janvier 2015

Devant le jury composé de :

Prof Valérie Langlois, ICMPE, Rapporteur

Prof Christophe Vieu, LAAS, Rapporteur

Dr Christine Dupont-Gillain, UCL (Belgique), Rapporteur

Dr Jérôme Solassol, CHU Montpellier, Examineur

Prof Thierry Delair, IMP, Examineur

Prof François Buret, ECL, Examineur

Dr Yann Chevotot, Examineur

Dr Eliane Souteyrand, Invitée

SOMMAIRE

I.	Curriculum Vitae	3
II.	Activités d'enseignement et d'encadrement	5
	II.1. Activités d'enseignement	5
	II.2. Activités d'encadrement	7
III.	Gestion et administration de l'enseignement et de la recherche	10
IV.	Production scientifique	15
V.	Activités de Recherche	23
 1^{ère} Partie : Matériaux polymères biospécifiques et biomimétiques		 26
I-	Matériaux polymères à activité biospécifique: Elaboration de prothèses vasculaires	27
II-	Microparticules biomimétiques pour la capture de virus et d'anticorps antiviraux	30
	II-1. Fonctionnalisation chimique et caractérisation des microparticules de latex	31
	II-2. Capture de virus	32
	II-3. Purification d'anticorps antiviraux	33
 2^{ème} Partie : fonctionnalisation de surfaces pour l'immobilisation de protéines: Applications au diagnostic médical		 35
I-	Conjugués polymère-protéine pour l'ELISA: Application au diagnostic du VIH-1	36
	I-1. Evaluation des conjugués RK24H-polymère en test ELISA	38
	I-2. Elaboration et caractérisation des conjugués anticorps-polymère	39
II-	Vers la miniaturisation des tests biologiques: développement de biopuces à peptides et à protéines	42
	II-1. Puces à peptides: Application au criblage d'épitopes	43
	II-2. Puces à protéines pour des applications diagnostiques	46
	II-2.a Chimies de surface et protéines : Mise en œuvre, caractérisation et interactions	46
	II-2.b Adressage électrochimique de protéines	

<i>recombinantes : Application au diagnostic du VIH-1</i>	50
<i>II-2.c Puces à antigènes pour la détection d'auto-anticorps</i>	52
II-2.c1 Puces à protéines histone : Application au diagnostic du LES	52
II-2.c2 Puces à antigènes tumoraux : Application au diagnostic du cancer du sein	55
<i>II-2.d Puces à anticorps pour le criblage de biomarqueurs</i>	57
3^{ème} Partie : Projets et collaborations	60
I- Vers des biopuces mixtes pour le diagnostic et le pronostic du cancer	61
II- Microsystèmes analytiques pour la lipidomique	63
III- Corrélation entre chimie de surface et immobilisation de biomolécules	64
Références	66
Annexe 1	
Annexe 2	
Annexe 3	
Annexe 4	
Annexe 5	
Annexe 6	
Annexe 7	
Annexe 8	

CURRICULUM VITAE

Emmanuelle LAURENCEAU, née IMBERT
42 route du Lemps – 38080 Four
Tel : 04 74 92 64 37
e-mail : emmanuelle.laurenceau@ec-lyon.fr

07/03/1969 (45 ans)
mariée, 3 enfants
nationalité française

Titres universitaires

- 1995** **Doctorat de 3^{ème} cycle** de l'Université Paris-13
Spécialité : Chimie
- 1991** **Diplôme d'Etude Approfondies**, Université Paris-13
Spécialité : Génie Biologique et Médical
- 1989-90** **Licence et Maîtrise**, Université Paris-7
Spécialité : Biologie et Génétique Appliquée
- 1988** **Diplôme d'Etudes Universitaires Générales**, Université Paris-7
Spécialité : Science de la Nature et de la Vie

Recherche

- 1991-95** **Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle** soutenue le 10 février 1995
Laboratoire de Recherche sur les **Macromolécules** (UMR CNRS 7540), sous la direction scientifique du Pr. Marcel JOZEFOWICZ et du Dr. Didier LETOURNEUR
Sujet : *Interactions de dérivés phosphorylés du polystyrène avec les facteurs de transcription de l'ARN polymérase II*
Mention : Très honorable avec les félicitations du jury
- 1995-96** **Post-doctorat** à l'Université de Twente (Pays-Bas)
Département de **Chimie des Biomatériaux**, sous la direction scientifique du Pr. Jan FEIJEN
Sujet : *Etude de l'expression des molécules d'adhésion de cellules endothéliales en culture sur différents matériaux destinés à la fabrication de prothèses vasculaires*
- 1996-97** **ATER** à l'Institut Galilée (Université Paris-13)
- 1997-2002** **Maître de Conférences** à l'Institut Galilée (Université Paris-13)
Laboratoire de Recherche sur les **Macromolécules** (UMR CNRS 7540)
Thématique de recherche : *Etude des interactions polymère – virus / anticorps anti-viraux*
- 2000** Attribution de la **Prime d'Encadrement Doctoral** et de **Recherche**

- 2002-04** **Délégation CNRS** à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon
Laboratoire des **Systèmes Macromoléculaires** et
Immunovirologie **Humaine** (UMR CNRS 2714 – bioMérieux)
Thématique de recherche: *Etude et mise en œuvre du
couplage orienté d'anticorps sur support polymère*
- 2004-** **Maître de Conférences** à l'Ecole Centrale de Lyon
Institut des **Nanotechnologies de Lyon** (UMR CNRS 5270),
Equipe Chimie et Nanobiotechnologie
Thématique de recherche : *Puces à protéines pour le
diagnostic*

Responsabilités collectives et administratives

- Membre du Conseil de Filière du 1^{er} cycle de l'Institut Galilée (1997-2002)
- Membre du Jury de 3^{ème} année de l'Ecole Centrale de Lyon (2005-2007)
- Membre titulaire élu de la Commission de Spécialistes de l'Ecole Centrale de Lyon en charge des sections CNU 28-31-32-33 (2008)
- Membre nommé de la Commission Paritaire d'Etablissement de l'Ecole Centrale de Lyon (depuis 2006)
- Membre nommé du Comité Technique Paritaire de l'Ecole Centrale de Lyon (2008-2011)
- Responsable d'option 3^{ème} année de l'Ecole Centrale de Lyon :
- Biotechnologie et Environnement (2004-2006),
 - Micro-Nano-Bio-Technologies (2006-2010),
 - Bio-Ingénierie et Nanotechnologies (depuis 2010),
- Correspondante ECL du Master « Ingénierie pour la santé et le médicament »
- Responsable de l'équipe d'enseignement Chimie (UE PCM) de l'Ecole Centrale de Lyon (depuis janvier 2012).

Encadrement

- Co-direction (à 50%) de 5 thèses et d'1 ATER
- Encadrement de 9 Masters (M2), 1 Travail de Fin D'Etude, 4 Projets d'Elève, 2 Projets d'Application Industriels, 3 Projets d'Application Recherche, 2 Stages d'Application (2A).

Publications, communications

- 25 publications dans des revues avec comité de lecture internationale
50 communications lors de congrès (39 internationales, 11 nationales)
2 chapitres de livre
1 brevet

Facteur H = 9

ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT ET D'ENCADREMENT

Activités d'enseignement

Avant mon arrivée à l'Ecole Centrale de Lyon, j'ai assuré des enseignements dans diverses formations de l'Institut Galilée – Université Paris 13 (1996-2002) : DEUG Science de la Matière, Formation Supérieure d'Ingénieurs Matériaux, Licence pluridisciplinaire, DEA Génie Biologique et Médical.

Seules les activités d'enseignement auxquelles je participe depuis mon arrivée à l'Ecole Centrale de Lyon sont explicitées brièvement ci-après.

✱ Enseignement en tronc commun (S6 et S7) au Département STMS

Travaux Dirigés de Chimie
Bureau d'Etude de Synthèse Matière-Matériaux
Travaux Pratiques de Chimie
Encadrement de Projet d'Elève

~ 75 h ETD

✱ Enseignement en parcours électif (S8) au Département STMS

Cours : *Ecologie et environnement* (de 2006 à 2009)
Cours : *Ingénierie pour la santé*
Encadrement de Projets Application Industriel et Recherche

~ 15 h ETD

✱ Enseignement en 3^{ème} année (S9)

Dans l'option Energie, interventions dans les cours *Energie et environnement* (de 2006 à 2009), et *Energie, stockage, conversion*

~ 5 h ETD

Dans l'option Bio-Ingénierie et Nanotechnologies

Cours : *Physiologie humaine et biotechnologies*
Cours : *Microcapteurs, microsystèmes, microfluidique*
Cours : *Ingénierie tissulaire et biomatériaux*
Bureau d'Etude en *Biotechnologies*
Travaux Pratiques de *Biologie cellulaire*
Atelier de *Techniques classiques en génie génétique*
Atelier de *Purification de protéines recombinantes*
Encadrement de Projet
Encadrement de Travail de Fin d'Etude (TFE)

~ 65 h ETD

Depuis mon arrivée à l'Ecole Centrale de Lyon, j'ai développé les enseignements dans le domaine des Sciences du Vivant. Notamment, j'ai mis en place les cours « *Ingénierie pour la santé* » (28 h), « *Physiologie humaine et biotechnologies* » (28 h), « *Ingénierie tissulaire et biomatériaux* » (30 h), « *Microcapteurs, microsystèmes, microfluidique* » (30 h), ainsi que les travaux pratiques « *Biologie cellulaire* » (4 h) « *Techniques classiques en génie génétique* » (16h), et

« *Purification de protéines recombinantes* » (8 h). J'interviens également dans l'ensemble de ces cours dans des proportions variables.

En 2008, j'ai initié une convention de coopération entre l'Ecole Centrale de Lyon et l'Université Lyon-1, pour le Master Recherche « Ingénierie pour la santé et le médicament ». Depuis septembre 2011, ce master est cohabilité, et j'en suis la responsable sur l'Ecole Centrale de Lyon.

Outre l'enseignement prodigué aux élèves-ingénieurs de l'Ecole Centrale de Lyon, mes compétences acquises au cours de mon expérience à l'Université Paris-13 ainsi qu'à l'UMR CNRS-bioMérieux, me permettent d'intervenir dans d'autres formations.

- * Master Ingénierie pour la Santé et le Médicament (Université de Lyon-1)
 - Cours M1 : *Immobilisation covalente et orientée de protéines sur support polymère : application au diagnostic médical*
 - Cours M2 : *Micro et nanosystèmes analytiques : Lab-On -Chip*
- * Master « Health and drugs engineering » (Université Joseph Fourier, Grenoble)
 - Cours M2 : *Protein microarrays*
- * Master international Nanoscale Engineering (Ecole Centrale de Lyon)
 - Cours M1: *Biomolecules, cells and biomimetic systems*
 - Travaux pratiques M1: *Observation of cells with optical microscope*
 - Cours M2 : *Protein chip*

Ces enseignements sont dispensés en anglais
- * Master Recherche Biomédicale (Université de Lyon-1)
 - Cours M1 : *Des biocapteurs aux biopuces*

~ 40 h ETD

Activités d'encadrement

Dans le tableau ci-dessous sont reportés les doctorats que j'ai co-encadrés. Puis sont listés les stages de fin d'étude d'ingénieur (TFE ou PFE) ainsi que les stages de Master 2 que j'ai encadrés. Ne sont pas présentés ici les stages de recherche d'une durée inférieure à 6 mois.

Année	TFE Master	Doctorat
1996		J. Crépinior - <i>Etude des interactions entre des copolymères statistiques dérivés du polystyrène et des particules virales</i> – LRM (Université Paris 13) / CRESSA (Grenoble)
1997	1	M.-C. Berger - <i>Etude des interactions entre des copolymères statistiques dérivés du polystyrène et des immunoglobulines antivirales</i> - LRM (Université Paris 13) / CRSSA (Grenoble)
1998		
1999	1	
2000		
2001		
2002		<i>Délégation CNRS – UMR bioMérieux (ENS Lyon)</i>
2003	1	
2004		G. El Khoury - <i>Tests immunologiques miniaturisés pour le développement de puces à peptides et à protéines</i> - LEOM (Ecole Centrale de Lyon) / LBASB (Université Lyon 1) / LC2O (Bordeaux) / EFS Lyon
2005		
2006	1	
2007	1	
2008	1	
2009	1	Z. Yang - <i>Elaboration de puces à protéines pour le diagnostic précoce du cancer</i> - INL (Ecole Centrale de Lyon) / Hopital Val d'Aurelle (Montpellier) / bioMérieux
2010		
2011		
2012		L. Shi - <i>Développement d'un nano-ELISA multiparamétrique pour le diagnostic et le pronostic du cancer du sein</i> - INL (Ecole Centrale de Lyon) / Centre Unicancer (Montpellier)
2013		
2014	1	

Liste des stages TFE (PFE) / Master encadrés / ATER

Nom du diplômé : **Marie-Claire BERGER** - janvier 1997 – juillet 1997

Diplôme : D.E.A. de Génie Biologique et Médical (Université Paris 13)

Titre du sujet : *Interactions entre des copolymères statistiques dérivés du polystyrène et des immunoglobulines antivirales.*

Nom du diplômé : **Hayette MERAD** - janvier 1999 – juillet 1999

Diplôme : D.E.A. de Génie Biologique et Médical (Université Paris 13)

Titre du sujet : *Activité antivirale de nouveaux copolymères.*

Nom du diplômé : **Lamia Feddal** - janvier 2003 – juillet 2003

Diplôme : Spécialisation en Biotechnologie (Université Catholique de Lyon)

Titre du sujet: *Construction et expression d'un anticorps recombinant scFv anti-p24 du VIH.*

Nom du diplômé : **Hicham BICHRAOUI** - janvier 2006- juin 2006

Diplôme : Master 2 « Sciences, Technologies et Organisation de la Santé » (Université Joseph Fourier)

Titre du sujet : *Etude de l'orientation et de la réactivité biologique de protéines recombinantes du VIH-1 immobilisée sur support de verre fonctionnalisé.*

Nom du diplômé : **Abdoula DIALLO** - janvier 2007- juin 2007

Diplôme : Master 2 « Industries du Diagnostic *in vitro*» (Université Joseph Fourier)

Titre du sujet : *Etude de l'immobilisation covalente et orientée de protéines recombinantes sur lame de verre. Elaboration de biopuces à protéines.*

Nom du diplômé : **Mathieu BRUN** - janvier 2008- juin 2008

Diplôme : Master 2 « Biochimie structurale et fonctionnelle» (Université Lyon-I)

Titre du sujet : *Influence de la chimie de surface de biopuces sur la réactivité biologique des protéines immobilisées.*

Nom du diplômé : **Arnaud VERNIER** - avril 2009- septembre 2009

Diplôme : TFE Ecole Centrale de Lyon / Master 2 « Matériaux» (Université Lyon-I)

Titre du sujet : *Elaboration de biopuces à protéines pour le diagnostic du cancer*

Nom du diplômé : **Huu Tuan NGUYEN** - février 2013- juillet 2013

Diplôme : PFE INSA de Lyon

Titre du sujet : *Utilisation de la méthode d'analyse en composante principale pour traiter des données de puces à protéine*

Nom du diplômé : **Chahrazed ZEBENTOUT** - janvier 2014- juillet 2014

Diplôme : Master 2 « Analyse et contrôle » (Université Lyon-I)

Titre du sujet : *Développement d'un microsystème d'analyse pour l'étude des profils de sécrétions hormonales des adipocytes*

Anais GARNIER - octobre 2013- août 2014

ATER affectée au département STMS (équipe Chimie)

Sujet de recherche: *Fonctionnalisation orthogonale de surfaces or/silice nanostructurées et caractérisations.*

GESTION ET ADMINISTRATION DE L'ENSEIGNEMENT ET DE LA RECHERCHE

1- Activités d'expertise et de référé

- Expertise d'une demande de bourse CIFRE en 2010
- Référée d'articles scientifiques dans des revues internationales :
 - Biomolécules (2012)
 - Biosensors and Bioelectronics (2009, 2010, 2012, 2013, 2014)
 - Colloids and Surface B (2014)
 - Journal of Immunological Methods (2013)
 - Langmuir (2011)
 - Macromolecular Rapid Communication (2010)
 - Sensors and Actuators B (2012, 2013)
 - Tumor Biology (2012)

2- Organisation de congrès

- Membre du comité d'organisation du congrès international SBCN 2010, qui s'est tenu à Lyon du 19 au 22 octobre 2010 : 100 participants de 15 nationalités différentes
- Membre du comité d'organisation du colloque La Bio-Ingénierie à l'Ecole Centrale de Lyon, qui s'est tenu le 4 octobre 2012 avec la participation de Alain Mérieux (environ 80 participants)

3- Participation à des projets de recherche nationaux et internationaux

Depuis septembre 2004, j'ai participé à 9 projets de recherche nationaux et 1 projet de recherche international, dont les titres et collaborations sont reportés dans le tableau 1.

J'ai également, depuis 2008, participé à la rédaction de 21 projets de recherche soit en tant que porteur scientifique, soit en tant que collaboratrice (tableau 2).

4- Collaborations

Collaborations nationales

- Etablissement Français du Sang (Lyon)
- Hôpital Lyon-Sud
- CHU de Saint-Etienne
- Ecole des Mines de Saint-Etienne
- CHU Val d'Aurelle de Montpellier
- Centre Unicancer de Montpellier

- Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique Graduate School (Université Paris Sud)
- Laboratoire Chimie, Structures Propriétés de Biomatériaux et d'Agent Thérapeutiques de Université Paris Nord
- Institut d'Électronique Fondamentale de l'Université Paris Sud
- Centre de Recherche du Service de Santé des Armées de Grenoble
- Laboratoire de Biochimie Analytique et de Synthèse Bio-organique de l'Université de Lyon I
- Laboratoire de Chimie Organique et Organométallique de l'Université de Bordeaux I
- Laboratoire Environnement et Chimie Analytique de l'ESPCI
- bioMérieux
- Horiba Jobin et Yvon
-

Collaborations internationales

- Université de Cambridge (Grande-Bretagne)
- Université de Twente (Pays-Bas)
- Institut contre le cancer néerlandais (NKI)
- Université de Tohoku (Japon)
- Université d'Anvers (Belgique)

Tableau 1 : Participation à des projets de recherche nationaux et internationaux

Type Projet	Années	Sujet	Collaboration
Région Rhône-Alpes Thématiques prioritaires	2003 - 2008	<i>Outils de conception et de fabrication de biopuces pour la protéomique</i>	Laboratoire de Biochimie Analytique et de Synthèse Bio-organique de l'Université de Lyon I ; Etablissement Français du Sang (Lyon) ; Rosatech ; Protein'eXpert.
CNRS – Programme Protéomique et génie des protéines	2004 - 2007	<i>Puces à Oligopeptides</i>	Laboratoire de Biochimie Analytique et de Synthèse Bio-organique de l'Université de Lyon; Laboratoire de Chimie Organique et Organométallique de l'Université de Bordeaux I ; Laboratoire Environnement et Chimie Analytique de l'ESPCI
BQR Ecole Centrale de Lyon	2008 - 2010	<i>La technologie des biopuces pour la détection précoce du cancer</i>	Etablissement Français du Sang (EFS-Lyon) ; CHU de Saint-Etienne (CHU-SE) ; bioMérieux
ANR Programme Blanc	2008 - 2011	<i>FluDNAGlycoChip</i>	
Carnot	2009 - 2011	<i>Réamix</i>	Laboratoire de Mécanique des Fluides et Acoustique
ANR Programme Blanc	2011 - 2014	<i>GlycoMIM : Gycomimétiques anti-adhésifs de Pseudomonas aeruginosa : Conception, synthèse, criblage par une technologie de micropuce à ADN et évaluation sur bactéries</i>	Institut des Biomolécules Max Mouseron de l'Université Montpellier 2 (IBMM) ; Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de l'Université de Lille 1 ; Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire de l'Université Lyon 1
ANR RPIB	2012 - 2015	<i>PAcontrol : Etude de preuve de concept pour de nouveaux glycomimétiques multivalents actifs contre l'adhésion et la formation du biofilm de Pseudomonas aeruginosa.</i>	Elicityl ; Laboratoire de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de l'Université de Lille 1 ; IBMM
ANR P2N	2012 - 2014	<i>PIRANEX : Instrumentation bimodale pour la détection et l'identification par imagerie plasmonique et analyse Raman amplifiée par nano-structuration.</i>	Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique Graduate School (Université Paris Sud) ; Laboratoire Chimie, Structures Propriétés de Biomatériaux et d'Agent Thérapeutiques de Université Paris Nord ; Institut d'Électronique Fondamentale de l'Université Paris Sud ; AgroParisTech ; Horiba Jobin Yvon
Carnot	2014 - 2017	<i>Lithogreen : Nanotechnologie Verte : Vers des procédés de lithographie éco-responsables : Usage de la lithographie douce et de polymères de la biomasse.</i>	Laboratoire d'Ingénierie des Matériaux Polymères de l'Université Lyon 1 (IMP)
Projet Européen Photonics 4 Life	2011	<i>Co-development of multifunctional nanoparticles and companion in-vitro assay for tumor margin detection and ablation</i>	Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique Graduate School (Université Paris Sud) ; Université de Twente (Pays-Bas) ; Institut contre le cancer néerlandais (NKI)

Tableau 2 : Projets de recherche non financés

Type de projet	Année demande	Sujet	Collaborations
ANR PCV	2008	USTAM : Pucés à auto-antigènes pour le diagnostic précoce du cancer	EFS-Lyon ; Hospices Civils de Lyon ; Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC, Strasbourg)
ARC	2008	Analyse de la signature auto-immune pour la détection précoce de cancers à l'aide de pucés à protéine	EFS-Lyon
CLARA Programme ProCan	2008	USTAM : Ultra sensitive tumor associated autoantigen microarrays for virus-induced cancer detection	EFS-Lyon; IBMC
InNaBioSanté Fondation	2008	AISCAMP: Autoimmune signature for early cancer detection based on protein chip technology	EFS-Lyon; IBMC ; CHU-Saint-Etienne (SE); Ecole des Mines de Saint-Etienne (EMSE)
INCa Projets libres	2008	SENTINEL : Analyse de la signature autoimmune pour la détection précoce de cancers à l'aide de pucés à protéine	EFS-Lyon ; IBMC ; CHU-SE; EMSE
CLARA Dispositif Preuve de Concept	2009	SENTINEL : Développement d'un microsystème d'analyse multiparamétrique pour le diagnostic précoce du cancer – Analyse des signatures autoimmunes de tumeurs	EFS-Lyon ;CHU-SE ; EMSE ; Institut des Neurosciences de Grenoble
Projet Innovant LST	2009	PRE-SENTINEL	EFS-Lyon ; CHU-SE
Région Rhône-Alpes CIBLE	2009	Les pucés à protéines pour la détection précoce de cancers : analyse de la signature autoimmune de différentes tumeurs	EFS-Lyon ;CHU-SE ; EMSE ; Institut des Neurosciences de Grenoble
Programme interdisciplinaire PCB CNRS	2009	SENTINEL : Développement d'un microsystème d'analyse multiparamétrique pour la détection précoce du cancer colorectal	EFS-Lyon ; IBMC ; CHU-SE
La Ligue	2010	SignIAAT : Signature immune des antigènes associés aux tumeurs. Recherche et identification des signatures associées au développement et à l'évolution du cancer colorectal, au moyen de biopucés à protéine de technologie innovante	CHU-SE
INCa Recherche Biomédicale	2010	Recherche de signatures autoimmunes associées aux tumeurs à l'aide de biopucés 3D-composite à protéine	EFS-Lyon ;
Réseau Français de Recherche Roche-Oncologie	2010	3D-protein/carbohydre hybrid biochip in monitoring the immune signature of tumoral response	CHU-SE ; EMSE ; IBMM
Région Rhône-Alpes CIBLE	2011	Evaluation de la réponse immunitaire humorale aux tumeurs par la technologie des pucés à protéine : Nouvelle approche du diagnostic du cancer	EFS-Lyon ;CHU-SE ; EMSE
CLARA – Programme OncoStater	2011	Evaluation de la valeur prédictive et pronostique de la réponse immunitaire humorale aux tumeurs par la technologie des pucés à protéine	EFS-Lyon ;CHU-SE ; EMSE ; CHU Montpellier

Labex iMust	2012	Metal-enhanced fluorescence by Au nanoparticles in MOF for attomolar DNA sensing	Laboratoire de Chimie, Catalyse, Polymère et Procédés (Université Lyon 1)
Région Rhône-Alpes CIBLE	2012	Evaluation de la réponse immunitaire humorale aux tumeurs par la technologie des puces à protéine : Nouvelle approche du diagnostic du cancer	EFS-Lyon ;CHU-SE ; EMSE
Fondation pour la Recherche Médicale	2013	Nouvelle approche pour la détection précoce de métastases dans le cancer du sein : Détection multiplexe de biomarqueurs circulants sur puces 3D mixtes	CHU Montpellier ; LIRIS
INCa/ARC/La Ligue – Programme PAIR	2014	Evaluation et valorisation du biomarqueur uPA/PAI-1 dans la désescalade thérapeutique coordonnée et encadrée dans les cancers du sein localisés sans atteinte ganglionnaire	Unicancer Montpellier ; CHU Limoges ; CHU Strasbourg ; CHU Grenoble ; Institut de Cancérologie de l'Ouest (Nantes) ; Centre Antoine Lacassagne (Nice) ; Centre Henri Becquerel (Rouen) ; CHU Marseille Nord ; Institut Gustave Roussy (Villejuif)
INCa/ARC/La Ligue – Programme PAIR	2014	Création d'un score clinico-biologique de prédiction du risque de cancer du sein	CHU Montpellier ; CHU Nimes ; Laboratoire de Biostatistique (Université Montpellier 1) ; Collège National des Gynécologues Obstétriciens ; Fédération Nationale des Collèges de Gynécologie Médicale
ANR Santé et Bien-être – Projet Collaboratif	2014	Etude en temps réel des profils d'expression des adipokines sur microsystème multiplexé dédié	Institut des Sciences Analytiques (Université Lyon 1) ; Laboratoire de Régulation Métabolique, Nutrition et Diabète (INSA-Lyon)
ANR Stimuler le renouveau industriel	2014	Nanotechnologie verte : des polymères de la biomasse comme résine éco-efficente pour la lithographie	IMP ; entreprise KLOE
ANR PRC, Vie, santé et bien-être	2015	Peau reconstruite avec hypoderme pour l'étude des interactions cellulaires par la sécrétion en temps réel des adipokines	Institut des Sciences Analytiques (Université Lyon 1) ; Laboratoire de Régulation Métabolique, Nutrition et Diabète (INSA-Lyon) ; Labskin Creation (Lyon)
ANR PRC, Stimuler le renouveau industriel	2015	Nanotechnologie verte : produits de la biomasse comme résine éco-efficente pour la lithographie en nanotechnologie	Ingénierie des Matériaux Polymères (Université Lyon 1), Institut des Sciences Analytiques (Université Lyon 1)

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Publications dans des revues scientifiques à comité de lecture

- 1- DNA-like and phospholipid-like phosphorylated polystyrene: Characterization, distribution of functional groups, and calcium complexation properties. E. IMBERT, A. SOUIRTI, V. MENARD, F. PFLUGER, M. JOZEFOWICZ and V. MIGONNEY. *Journal of Applied Polymer Science*, **52**, 91-97 (1994).
- 2- Expression of leukocyte adhesion molecules by seeded endothelial cells: Effect of endothelial cell origin and artificial surface. A.A. POOT, E. IMBERT, G.W. BOSS, C.G. FIDGOR and J. FEIJEN, *Journal of Vascular Research*, **33** (supplement 1), 78 (1996).
- 3- Randomly phosphorylated polystyrene derivatives interact with RNA polymerase II transcription factors : Part I. E. IMBERT, D. LETOURNEUR and M. JOZEFOWICZ. *Journal of Biomedical Materials Research*, **33**, 417-425 (1997).
- 4- Fractionation of RNA polymerase II transcription factors from Hela cell nuclear extracts by affinity chromatography on « DNA-like » phosphorylated polystyrene. E. IMBERT, D. LETOURNEUR and M. JOZEFOWICZ. *Journal of Chromatography Biomedical Applications*, **698**, 59-68 (1997).
- 5- Different growth behaviour of human umbilical vein endothelial cells and endothelial cell line seeded on various polymeric surfaces. E. IMBERT, A.A. POOT, C.G. FIDGOR and J. FEIJEN. *Biomaterials*, **19**, 2285-2290 (1998).
- 6- Expression of leukocyte adhesion molecules by endothelial cells seeded on various polymer surfaces. E. IMBERT, A.A. POOT, C.G. FIDGOR and J. FEIJEN, *Journal of Biomedical Materials Research*, **56**, 376-381 (2001).
- 7- Polystyrene derivatives substituted with arginine interact with Babanki (*Togaviridae*) and Kedougou (*Flaviviridae*) viruses. E. IMBERT-LAURENCEAU, J. CREPINIOR, J.-M. CRANCE, A. JOUAN and V. MIGONNEY. *Journal of Medical Virology*, **59**, 503-509 (2003).
- 8- Antigenicity of recombinant proteins after regioselective immobilization onto polyanhydride-based copolymers. L. ALLARD, V. CHEYNET, G. ORIOL, G. GERVASI, E. IMBERT-LAURENCEAU, B. MANDRAND, T. DELAIR and F. MALLET. *Bioconjugate Chemistry*, **15**, 458-466 (2004).
- 9- Latex bead immobilisation in PDMS matrix for the detection of p53 gene point mutation and anti-HIV-1 capsid protein antibodies. C.A. MARQUETTE, A. DEGIULI, E. IMBERT-LAURENCEAU, F. MALLET, C. CHAIX, B. MANDRAND and L.J. BLUM. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **381 (5)**, 1019-1024 (2005).
- 10- Surface modification of polystyrene particles for specific antibody adsorption. E. IMBERT-LAURENCEAU, M.-C. BERGER, G. PAVON-DJAVID, A. JOUAN and V. MIGONNEY. *Polymer*, **46**, 1277-1285 (2005).
- 11- Electroaddressed immobilization of recombinant HIV-1 p24 capsid protein onto screen-printed arrays for serological testing. C.A. MARQUETTE, E. IMBERT-LAURENCEAU, F. MALLET, C. CHAIX, B. MANDRAND and L.J. BLUM. *Analytical Biochemistry*, **340 (1)**, 14-23 (2005).

- 12- Acid deprotection of covalently immobilized peptide probes on glass slides for peptide microarrays. G. EL KHOURY, E. LAURENCEAU, V. DUGAS, Y. CHEVOLOT, Y. MERIEUX, M.C. DUCLOS, E. SOUTEYRAND, D. RIGAL, J. WALLACH, J.P. CLOAREC. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, **2007**, 2242-2246 (2007).
- 13- Oligosaccharide biochips. Y. CHEVOLOT, E. LAURENCEAU, E. SOUTEYRAND. *ITBM-RBM*, **vol 28**, 194-209 (2007).
- 14- Low-cost, fast prototyping method of fabrication of the microreactor devices in soda-lime glass. R. MAZURCZYK, G. EL KHOURY, V. DUGAS, B. HANNES, E. LAURENCEAU, M. CABRERA, S. KRAWCZYK, E. SOUTEYRAND, J.-P. CLOAREC and Y. CHEVOLOT. *Sensor and Actuator B*, **128**, 552-559 (2008).
- 15- A multidisciplinary approach for molecular diagnostics based on biosensors and microarrays. J.P. CLOAREC, Y. CHEVOLOT, E. LAURENCEAU, M. PHANER-GOUTORBE, E. SOUTEYRAND: *ITBM-RBM*, **vol 29/2-3**, pp 105-127 (2008).
- 16- Development of miniaturized immunoassays: Influence of surface chemistry and comparison with enzyme-linked immunosorbent assay and western-blot. EI KHOURY G., LAURENCEAU E., CHEVOLOT Y., MERIEUX Y., DESBOS A., FABIEN N., RIGAL D., SOUTEYRAND E., CLOAREC J.P. *Analytical Biochemistry*, **400**, 10-18 (2010).
- 17- A generic surface chemistry for peptide microarray implementation: Application to the detection of anti-H3 antibody. EI KHOURY G., LAURENCEAU E., CHEVOLOT Y., SOUTEYRAND E., CLOAREC J.P. *Biosensors and Bioelectronics*, **26**, 1320-1325 (2010).
- 18- Tumor antigens titration on novel miniaturized immunoassay: 3D-Protein chip performance evaluation. LAURENCEAU E., YANG Z., CHEVOLOT Y., ATAMAN-ÖNAL Y., CHOQUET-KASTYLEVSKY G., SOUTEYRAND E. *Bulletin du cancer*, **98** (sup. 1), S70-S70 (2011).
- 19- Cancer Biomarkers Detection Using Microstructured Protein Chip: Implementation of Customized Multiplex Immunoassay. YANG Z., LAURENCEAU E., CHEVOLOT Y., ATAMAN-ÖNAL Y., CHOQUET-KASTYLEVSKY G., SOUTEYRAND E. *Procedia Engineering*, **25**, 952 – 955 (2011).
- 20- Cancer Biomarkers Detection Using 3D Microstructured Protein Chip: Implementation of Customized Multiplex Immunoassay. YANG Z., CHEVOLOT Y, ATAMAN-ÖNAL Y., CHOQUET-KASTYLEVSKY G., SOUTEYRAND E, LAURENCEAU E. *Sensors & Actuators B: Chem*, **175**, 22-28 (2012).
- 21- Preparation of core-shell silver/silica nanoparticles and their application for enhancement of Cy3 fluorescence. SUI N, MONNIER V, YANG Z., DUGAS V, CHEVOLOT Y, LAURENCEAU E. SOUTEYRAND E. *International Journal of Nanoscience*, **11 (4)**, 1240020 (2012).
- 22- Customized tumor-associated antigen microarrays for the sensitive and specific detection of tumor markers from breast cancer sera. YANG Z, CHEVOLOT Y, GEHIN T, SOLASSOL J, MANGE A., SOUTEYRAND E, LAURENCEAU E. *Biosensors and Bioelectronics*, **40**, 385-392 (2013).
- 23- Characterization of three amino-functionalized surfaces and evaluation of antibody immobilization for the multiplex detection of tumor markers involved in colorectal cancer. YANG Z, CHEVOLOT Y, GEHIN T, DUGAS V, XANTHOPOULOS N, LAPORTE V, DELAIR T, ATAMAN-ÖNAL Y., CHOQUET-KASTYLEVSKY G., SOUTEYRAND E, LAURENCEAU E. *Langmuir*, **29**, 1498-1509 (2013).

- 24- DNA directed immobilization glycocluster array: applications and perspectives. CHEVOLOT Y., LAURENCEAU E., PHANER-GOUTORBE M., MONNIER V., SOUTEYRAND E., MEYER A., GEHIN T., VASSEUR J-J., MORVAN F. *Current Opinion in Chemical Biology*, **18**, 46-54 (2014).
- 25- Friction of 316L stainless steel on soft-tissue-like poly(vinyl) alcohol hydrogel in physiological liquid. KOSUKEGAWA H., FRIDRICI V., LAURENCEAU E., KAPSA P., OHTA M. *Tribology International*, In press (<http://dx.doi.org/10.1016/j.triboint.2014.05.029>)

Contribution à la rédaction d'ouvrages scientifiques

- 1- Polymer particles and viruses: Biospecific interactions and biomedical applications. E. IMBERT-LAURENCEAU and V. MIGONNEY. In *Colloidal biomolecules, biomaterials, and biomedical applications*. A. Elaissari (Ed), Marcel Dekker INC (New-York), **116**, pp 131-160 (2003).
- 2- Carbohydrates as recognition receptors in biosensing applications Y. CHEVOLOT, S. VIDAL, E. LAURENCEAU, F. MORVAN, J.-J. VASSEUR and E. SOUTEYRAND, *Recognition Receptors in Biosensors*, (M. Zourob, ed.), pp. Springer, 2009

Communications lors de congrès scientifiques

- 1- **4th European Meeting of GFBC ; Biochromatography and Molecular Biology**. La Grande Motte (France), 12-14 mai 1992. **Oral**
Phosphorylated polystyrene as candidates for the purification of DNA transcription factors by affinity chromatography. E. IMBERT, D. LETOURNEUR, H. SERNE, M. JOZEFOWICZ.
- 2- **Future Perspective of Biomedical Polymers Symposium**. Hawaï (USA), 4-6 septembre 1992. **Oral**
Phosphorylated polystyrene as candidates for the purification of DNA transcription factors by affinity chromatography. E. IMBERT, D. LETOURNEUR, H. SERNE, M. JOZEFOWICZ.
- 3- **7th International Conference on Polymers in Medicine and Surgery**. Leeuwenherst (Pays-Bas), 1-3 septembre 1993. **Poster**
Phosphorylated polystyrene as candidates for the purification of DNA transcription factors by affinity chromatography. E. IMBERT, F. PFLUGER, M. JOZEFOWICZ.
- 4- **10th European Conference on Biomaterials**. Davos (Suisse), 8-11 septembre 1993. **Oral**
Phosphorylated polystyrene as candidates for the purification of DNA transcription factors by affinity chromatography. E. IMBERT, F. PFLUGER, M. JOZEFOWICZ.
- 5- **XXI^{ème} Journées d'Etudes des Polymères**. St-Léonard-des-Bois (France), 20-24 septembre 1993. **Oral**
Interactions of phosphorylated polystyrene derivatives with RNA polymerase II transcription factors. E. IMBERT, F. PFLUGER, M. JOZEFOWICZ.

- 6- **Fifth World Biomaterials Congress**, Toronto (Canada), 29 mai-2 juin 1996. **Oral**
Determination of DNA-like active site on randomly phosphorylated polystyrene derivatives. F. PFLUGER, V. MIGONNEY, O. RAVION, E. IMBERT, A. SOUIRTI, M. JOZEFOWICZ.
- 7- **IX International Vascular Biology Meeting**, Seattle (USA), 4-8 septembre 1996. **Oral**
Expression of leukocyte adhesion molecules by seeded endothelial cells : Effect of endothelial cell origin and artificial surface. A.A. POOT, E. IMBERT, G.W. BOSS, C.G. FIDGOR, J. FEIJEN.
- 8- **International Symposium on Polymers in Dispersed Media**. Lyon, 4-8 avril 2004. **Oral**
Surface modification of polystyrene particles for specific antibody adsorption. E. IMBERT-LAURENCEAU, M.-C. BERGER, G. PAVON-DJAVID, A. JOUAN and V. MIGONNEY.
- 9- **Journées « Nanosciences-Nanotechnologies en Rhône-Alpes »** (JNNRA), Lyon (France), 24-25 novembre 2005. **Poster**
Outils de conception et de fabrication de biopuces pour la protéomique. G. EL KHOURY, Y. MERIEUX, M.C DUCLOS, V. DUGAS, E. LAURENCEAU, D. RIGAL, J. WALLACH, Y. CHEVOLOT, J.P. CLOAREC.
- 10- **10th International Symposium on Biochromatography**. Lille (France), 26-28 avril 2006. **Oral**
Ex Situ acidolytic deprotection of covalent immobilised protected oligopeptide probes for protein microarrays. G. EL KHOURY, E. LAURENCEAU, Y. CHEVOLOT, Y. MERIEUX, M.C. DUCLOS, V. DUGAS, D. RIGAL, J. WALLACH, JP. CLOAREC.
- 11- **20th European Conference on Biomaterials** . Nantes (France), 27 septembre-1er octobre 2006. **Oral**
Covalent immobilisation of oligopeptides onto soda lime glass for protein microarrays. G. EL KHOURY, E. LAURENCEAU, Y. CHEVOLOT, J. WALLACH, JP. CLOAREC.
- 12- **3^{ème} Rencontre du CLARA**. La Tronche (38), 27 juin 2006. **Poster**
Puces à peptides pour la protéomique. G. EL KHOURY, E. LAURENCEAU, Y. CHEVOLOT, M.C. DUCLOS, J. WALLACH, JP. CLOAREC.
- 13- **Keio-ECL NanoWorkshop franco-japonais**. Lyon, 24 novembre 2006. **Oral**
AFM for biochip characterization at the molecular scale. M. PHANER-GOUTORBE, D. LALLEMAND, V. DUGAS, Y. CHEVOLOT, E. LAURENCEAU, J. P. CLOAREC, E. SOUTEYRAND.
- 14- **21st Annual Symposium of The Protein Society**, Boston (USA), 21-25 juillet 2007. **Oral**
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. G. EL KHOURY, E. LAURENCEAU, V. DUGAS, Y. CHEVOLOT, Y. MERIEUX, A. DESBOS, N. FABIEN, E. SOUTEYRAND, D. RIGAL, J.P. CLOAREC.

- 15- **RCS meeting-Carbohydrate Group, Carbohydrate arrays, Synthesis and Applications** Manchester (Grande-Bretagne), 16-17 octobre 2007. **Oral**
Screening lectins affinities using DNA-based carbohydrate microarrays. A. THIAM, C. BOUILLON, S. VIDAL, F. MORVAN, A. MEYER, J.-P. CLOAREC, A. JOCHUM, J.-P. PRALY, J.-J. VASSEUR, M. PHANER-GOUTORBE, E. LAURENCEAU, A. IMBERTY, E. SOUTEYRAND, Y. CHEVOLOT.
- 16- **6^{ème} Forum de la Société Japonaise pour la Promotion de la Science (JSPS), Chemical and Physical Nanobiotechnology for Medecine**, Strasbourg (France), 23 Novembre 2007. **Oral**
DNA-based carbohydrate microarrays, a molecular scaffolding for Glycoarray. Y. CHEVOLOT, C. BOUILLON, S. VIDAL, F. MORVAN, A. MEYER, J.-P. CLOAREC, A. JOCHUM, J.-P. PRALY, M. PHANER-GOUTORBE, E. LAURENCEAU, J.-J. VASSEUR, E. SOUTEYRAND.
- 17- **3rd Keio-ECL NanoWorkshop**. Lyon, 27-29 février 2008
Detection of anti-histones antibodies in the serum on protein microarrays. G. EL KHOURY, E. LAURENCEAU, V. DUGAS, Y. CHEVOLOT, Y. MERIEUX, A. DESBOS, N. FABIEN, D. RIGAL, E. SOUTEYRAND, J.P. CLOAREC.
- 18- **1st Annual Protein and Peptide Conference**. Shenzhen (Chine), 22-24 avril 2008. **Oral**
Protein Chip development: Application to the detection of autoantibodies in human serum. G. EL KHOURY, E. LAURENCEAU, V. DUGAS, Y. CHEVOLOT, Y. MERIEUX, A. DESBOS, N. FABIEN, D. RIGAL, E. SOUTEYRAND, J.P. CLOAREC.
- 19- **SBCN 2008**. Montpellier, 14-16 octobre 2008. **Poster**
MAMVE : a novel surface chemistry for improved detection of antibodies with protein arrays. G. EL KHOURY, E. LAURENCEAU, V. DUGAS, Y. CHEVOLOT, Y. MERIEUX, A. DESBOS, N. FABIEN, D. RIGAL, E. SOUTEYRAND, J.P. CLOAREC.
- 20- **Transalp'Nano 2008 Conference**. Lyon, 27-29 octobre 2008. **Poster**
Surface chemistry improvement for protein microarray. G. EL KHOURY, E. LAURENCEAU, V. DUGAS, Y. CHEVOLOT, Y. MERIEUX, A. DESBOS, N. FABIEN, D. RIGAL, E. SOUTEYRAND, J.P. CLOAREC.
- 21- **Joint meeting CLARA-DKFZ-CGE on Infections & Cancer**. Lyon, 23-24 janvier 2009. **Oral**
Development of new protein microarrays: application to cancer diagnosis. E. LAURENCEAU, Y. CHEVOLOT, E. SOUTEYRAND.
- 22- **Clinical applications of nanotechnologies in the field of cancer**. Montpellier, 28-29 janvier 2010. **Poster**
Development of 3-D protein chip for cancer diagnosis. E. LAURENCEAU, A. VERNIER, Y. CHEVOLOT, E. SOUTEYRAND.
- 23- **The 4th Centrale-Beihang workshop**. Ecully, 26-28 mai 2010. **Poster**
Implementation of Protein Chips: Application to the Diagnosis of Cancer. Z. YANG, Y. CHEVOLOT, E. SOUTEYRAND, E. LAURENCEAU.

24- **Biosensors 2010**. Glasgow (UK), 26-28 mai 2010. **Poster**

Peptide microarray for the diagnosis of autoimmune diseases: on-chip synthesis of human histone H3 epitope and detection of anti-H3 antibody. G. EL KHOURY, E. LAURENCEAU, Y. CHEVOLOT, E. SOUTEYRAND, J.P. CLOAREC.

25- **Biosensors 2010**. Glasgow (UK), 26-28 mai 2010. **Poster**

A generic surface chemistry for peptide microarrays implementation: Application to the detection of anti-H3 antibody. G. EL KHOURY, E. LAURENCEAU, Y. CHEVOLOT, E. SOUTEYRAND, J.P. CLOAREC.

26- **Journée Rhône-Alpes des Biomolécules**. Grenoble, 3 juin 2010. **Oral**

Evaluation de diverses chimies de surface pour l'immobilisation de protéines: Application au développement de puces à protéines 3D. Z. YANG, A. VERNIER, Y. CHEVOLOT, E. SOUTEYRAND, E. LAURENCEAU.

27- **16° Colloque de Recherche Inter Ecoles Centrales**. Lille, 14-17 juin 2010. **Oral**

Implementation of protein chips for cancer diagnosis. Z. YANG, E. SOUTEYRAND, E. LAURENCEAU.

28- **3^{ème} colloque du Laboratoire International Associé « Nanotechnologies & Nanosystèmes »**, Sherbrooke (Canada), 12-16 juillet 2010. **Poster**

Functionalization of 3D-biochip for cancer diagnosis. Z. YANG, Y. CHEVOLOT, E. SOUTEYRAND, E. LAURENCEAU. Troisième colloque du LIA-LN2 -Saint-Alexis-des-Monts Canada- July 12th to July 16th 2010

29- **SBCN 2010**. Lyon, 19-22 octobre 2010. **Poster**

Characterization of Various Surface Chemistries for Antibody Microarrays: Detection of Carcino Embryonic Antigen (CEA). Z. YANG, Y. CHEVOLOT, E. SOUTEYRAND, E. LAURENCEAU.

30- **CLARA 6th Scientific Forum**. Lyon, 28-29 mars 2011. **Poster**

Tumor antigens titration on novel miniaturized immunoassay: 3D-Protein chip performance evaluation. Z. YANG, Y. CHEVOLOT, Y. ATAMAN-ONAL, G. CHOQUET-KASTYLEVSKY, E. SOUTEYRAND, E. LAURENCEAU.

31- **Journée Rhône-Alpes des Biomolécules**. Lyon, 27 mai 2011. **Poster**

Novel miniaturized immunoassay for cancer diagnosis: Implementation of 3D-protein chip with different surface chemistries for tumor antigens detection. Z. YANG, Y. CHEVOLOT, Y. ATAMAN-ONAL, G. CHOQUET-KASTYLEVSKY, E. SOUTEYRAND, E. LAURENCEAU.

32- **17° Colloque de Recherche Inter Ecoles Centrales**. Lyon, 14-17 juin 2011. **Oral**

A novel 3D-protein chip for cancer diagnosis: Detection of tumor antigens. Z. YANG, E. LAURENCEAU, Y. CHEVOLOT, Y. ATAMAN-ONAL, G. CHOQUET-KASTYLEVSKY, E. SOUTEYRAND.

33- **Eurosenors XXV**. Athènes (Grèce), 4-7 septembre 2011. **Poster**

Cancer biomarkers detection using microstructured protein chip: Implementation of customized multiplex immunoassay. Z. YANG, E. LAURENCEAU, Y. CHEVOLOT, Y. ATAMAN-ONAL, G. CHOQUET-KASTYLEVSKY, E. SOUTEYRAND.

- 34- **2^d International Conference on Bio-Sensing Technology 2011**. Amsterdam (Pays-Bas), 10-12 octobre 2011. **Poster**
Cancer biomarkers detection using microstructured protein chip: Implementation of customized multiplex immunoassay. Z. YANG, E. LAURENCEAU, Y. CHEVOLOT, Y. ATAMAN-ONAL, G. CHOQUET-KASTYLEVSKY, E. SOUTEYRAND.
- 35- **Ecole thématique Biomécanique et Bio-Ingénierie du Vieillissement des Tissus**. Marrakech (Maroc), 26 novembre-3 décembre 2011. **Poster**
Chimie des matériaux et nanobiotechnologies: Des outils pour l'étude des interactions biologique. E. LAURENCEAU, V. MONNIER, M. PHANER-GOUTORBE Y. CHEVOLOT, J.-P. CLOAREC, T. GEHIN, E. SOUTEYRAND.
- 36- **22nd World Congress on Biosensors 2012**. Cancun (Mexique), 14-18 mai 2012. **Oral**
Customized tumor-associated antigen microarrays for the sensitive and specific detection of tumor markers from breast cancer sera. Z. YANG, Y. CHEVOLOT, J. SOLASSOL, E. SOUTEYRAND, E. LAURENCEAU.
- 37- **1st workshop Cancer cell on-chip**. Lyon, 11 juin 2012. **Poster**
Multiplex and sensitive cancer biomarkers detection based on 3D-microstructured protein chip. Z. YANG, E. LAURENCEAU, Y. CHEVOLOT, Y. ATAMAN-ONAL, G. CHOQUET-KASTYLEVSKY, E. SOUTEYRAND.
- 38- **ELyT Lab Workshop 2013**. Zoa To-o-gatta (Japon), 17-20 février 2013. **Oral**
Friction of medical materials in contact with PVA hydrogel in physiological condition. H. KOSUKEGAWA, V. FRIDRICI, E. LAURENCEAU, M. OHTA, P. KAPSA.
- 39- **CLARA 8^{ème} Journées Scientifiques**. Lyon, 21-22 mars 2013. **Oral**
How to improve the sensitivity of the multiplex detection of cancer biomarkers? Z. YANG, Y. CHEVOLOT, Y. ATAMAN-ONAL, G. CHOQUET-KASTYLEVSKY, C. LAMBERT, E. SOUTEYRAND, E. LAURENCEAU.
- 40- **19^o Colloque de Recherche Inter Ecoles Centrales**. Nantes, 24-27 juin 2013. **Oral**
Protein microarray for the diagnosis and therapy of breast cancer. L. SHI, E. SOUTEYRAND, E. LAURENCEAU.
- 41- **40th Leeds-Lyon Symposium on Tribology**. Lyon, 4-6 septembre 2013. **Oral**
Friction of 316L stainless steel on soft-tissue-like poly (vinyl alcohol) hydrogel in physiological liquid. H. KOSUKEGAWA, V. FRIDRICI, E. LAURENCEAU, M. OHTA, P. KAPSA.
- 42- **World Tribology Congress 2013**. Turin (Italie), 8-13 septembre 2013. **Oral**
Friction of medical materials on PVA hydrogel in physiological lubrication. H. KOSUKEGAWA, V. FRIDRICI, E. LAURENCEAU, M. OHTA, P. KAPSA.
- 43- **26^{ème} Entretiens Jacques Cartier**. Lyon (France), 25-26 novembre 2013. **Poster**
Biomarker screening using customized multiplex immunoassay on 3D-Protein microarray. L. SHI, Z. YANG, Y. CHEVOLOT, Y. ATAMAN-ONAL, G. CHOQUET-KASTYLEVSKY, J. SOLASSOL, A. MANGE, E. SOUTEYRAND, E. LAURENCEAU

- 44- **26ème Entretiens Jacques Cartier**. Lyon (France), 25-26 novembre 2013. **Poster**
DNA-directed Immobilisation of glycoclusters on microarray: A tool to characterize Lectin/Glycoclusters interactions. L. DUPIN, E. SOUTEYRAND, J-J. VASSEUR, A. GOUDOT, S. VIDAL, F. CASONI, C. LIGEOUR, O. VIDAL, E. LAURENCEAU, T. GEHIN, F. MORVAN, Y. CHEVOLOT
- 45- **17^{ème} Journées scientifiques du GLGS**. Lyon (France), 5 décembre 2013. **Oral**
Utilisation de biopuces à glycoclusters pour la découverte de nouveaux agents anti-infectieux. L. DUPIN, C. LIGEOUR, A. GOUDOT, E. SOUTEYRAND, E. LAURENCEAU, S. VIDAL, F. MORVAN, J-J. VASSEUR, A. MEYER, T. GEHIN, O. VIDAL, Y. CHEVOLOT
- 46- **ELyT Lab Annual Workshop**. Fréjus (France), 20 février 2014. **Oral**
Effect of Plasma Proteins in Friction of Medical Materials on PVA Hydrogel. H. KOSUKEGAWA, V. FRIDRICI, E. LAURENCEAU, K. YU, M. OHTA, P. KAPSA.
- 47- **15^{ème} Rencontre de Chimie Organique Biologique**. Aussois (France), 23-27 mars 2014. **Oral**
Criblage d'une banque de glycoclusters sur DDI-glycoarray: Application à Pseudomonas aeruginosa. L. DUPIN, A. GOUDOT, E. SOUTEYRAND, O. VIDAL, F. MORVAN, E. LAURENCEAU, S. VIDAL, J-J. VASSEUR, F. CASONI, C. LIGEOUR, A. MEYER, T. GEHIN, , Y. CHEVOLOT
- 48- **2nd International Conference on BioTribology**. Toronto (Canada), 11-14 mai 2014. **Oral**
Effect of counter body material and lubricant on the frictional properties of biomimetic PVA hydrogel. V. FRIDRICI, H. KOSUKEGAWA, E. LAURENCEAU, M. OHTA, P. KAPSA.
- 49- **7th Annual World Cancer Congress 2014**. Nanjing (Chine), 16-18 mai 2014. **Oral (invité)**
Customized multiplex immunoassay on 3D-protein chip for cancer biomarkers screening. L. SHI, Z. YANG, Y. CHEVOLOT, Y. ATAMAN-ONAL, J. SOLASSOL, A. MANGE, E. SOUTEYRAND, E. LAURENCEAU.
- 50- **CMOS Emerging Technology Research 2014**. Grenoble (France), 6-8 juillet 2014. **Oral**
3D-Protein chip for the multiplex detection of cancer biomarkers. L. Shi, T. Gehin, Y. Ataman-Onal, A. Mangé, J. Sollassol, Y. Chevolot, E. Souteyrand and E. Laurenceau

Brevet

-
- 1- Mise en œuvre de biopolymères en tant que résine de transfert dans des procédés lithographiques. Y. CHEVOLOT, J.-L. LECLERC, E. LAURENCEAU, T. DELAIR, E. SOUTEYRAND. Brevet déposé le 21 octobre 2013 (N° 1360227).

ACTIVITES DE RECHERCHE

Surfaces fonctionnalisées et interactions avec des systèmes biologiques Puces à protéines pour le diagnostic

Mots-clés : ingénierie de surface, interface matériau-système biologique, interactions biomoléculaires, biopuces, nanotechnologies, applications biomédicales, diagnostic

Ma formation pluridisciplinaire, aussi bien en biologie et génétique qu'en chimie des matériaux et biomatériaux, m'a naturellement conduite à développer mes activités de recherche à l'interface de ces différents domaines scientifiques. Ainsi, que ce soit au Laboratoire de Recherche sur les Macromolécules, au Laboratoire des Systèmes Macromoléculaire et Immunovirologie Humaine, ou à l'Institut des Nanotechnologies de Lyon, je me suis intéressée aux relations existant entre les propriétés physico-chimiques d'une surface et l'activité biologique d'un système donné (protéines, virus, cellules). Mes travaux concernent donc la fonctionnalisation de surface de différents matériaux afin d'induire une réponse biologique spécifique, que ce soit en terme d'interaction ou d'activité, directes ou indirectes, vis-à-vis de divers systèmes biologiques, tels que des protéines (antigènes, anticorps), des cellules, des virus, des peptides.

Au cours de mes activités de recherche, j'ai pu mettre en œuvre, assembler et caractériser différents types de matériaux sous diverses formes:

- des matériaux organiques tels que le polystyrène, le Dacron, le Téflon, le poly(anhydride maléique-*alt*-méthylvinyl éther), le polypyrrole, le carboxyméthyl dextran, le chitosan
- des matériaux inorganiques tels que la silice, le silicium
- des supports plans de matériaux divers tels que des films rigides (polystyrène, Dacron, Téflon), des lames de verre, des wafers
- des supports particuliers tels que des billes de polystyrène micrométriques
- des supports en 3D tels que des supports de verre microstructurés dont le fond des puits est fonctionnalisé avec des polymères solubles en milieu aqueux (carboxyméthyl dextran, chitosan, poly(anhydride maléique-*alt*-méthylvinyl éther)).

Les caractéristiques de surface de ces matériaux conditionnent la nature des interactions mises en jeu avec leur environnement. La modification de ces caractéristiques, par la fonctionnalisation biologique et/ou chimique de la surface, permet d'adapter la réponse de la surface à une activité biologique déterminée. Il existe plusieurs façons de fonctionnaliser une surface selon le but recherché :

- La fonctionnalisation biologique consiste à immobiliser à la surface du matériau un composant biologique de façon à lui conférer une activité biologique particulière (on parle alors de surface « biospécifique »). J'ai mis en œuvre ce principe lors de l'étude de la croissance de cellules endothéliales sur des matériaux polymères tels que le Dacron et le Téflon, fonctionnalisés par la fibronectine, une protéine d'adhésion cellulaire.

- La fonctionnalisation chimique consiste à modifier la surface du matériau par des groupements chimiques dont la répartition et l'arrangement spatial permettent de mimer un site actif biologique (on parle alors de surface « biomimétique »). Cette approche a été validée lors de l'étude des interactions de virus ou d'anticorps anti-viraux avec des particules de polystyrène fonctionnalisées par différents acides aminés.
- La fonctionnalisation chimique puis biologique consiste à modifier chimiquement la surface du matériau dans un premier temps, afin de permettre dans un second temps, sa fonctionnalisation biologique. C'est cette stratégie que j'ai suivie pour immobiliser des protéines ou des peptides sur support plan (lames de verre, wafer) ou 3D (lames microstructurées, polymères) afin d'élaborer des tests diagnostiques.

Selon les cas, l'immobilisation de la « couche chimique » et/ ou de la « couche biologique » sur le support solide peut s'effectuer soit par adsorption physique (physisorption), soit par l'intermédiaire de liaisons covalentes (chimisorption), soit par affinité, ou bien par piégeage (Fig. 1). L'adsorption, ou physisorption, est le type d'immobilisation le plus simple mettant en jeu des interactions faibles (Van der Waals) entre la couche « biologique », ou « chimique », et la surface du support ^{1 2}. Mais l'orientation des molécules étant aléatoire, cela peut conduire à la perte partielle ou totale de l'activité biologique (Fig. 1a). Le couplage covalent, ou chimisorption, met en jeu des liaisons fortes et permet de fixer la couche « biologique », ou « chimique », de façon durable et stable à la surface du support ^{3 4 5}. L'orientation peut être aléatoire ou bien dirigée en un site particulier de la molécule, ce qui est plus difficile à mettre en œuvre (Fig. 1b). Le couplage par affinité permet d'assurer une immobilisation sélective indirecte de la couche « biologique » *via* des interactions spécifiques, comme la biotine avec la streptavidine, la protéine A avec le fragment Fc des anticorps, ou encore des séquences particulières, les « tags », (histidine, GST, etc.) avec leurs ligands spécifiques (métal, glutathione, etc.) ^{6 7 8} (Fig. 1c). Enfin, le piégeage consiste à inclure la couche « biologique » dans un gel de polymère (agarose, polyacrylamide, dextran, etc.) conférant à la surface une structure 3D. Le gel étant hydraté, il permet de maintenir la conformation tridimensionnelle, et donc l'activité biologique ^{9 10 11} (Fig. 1d).

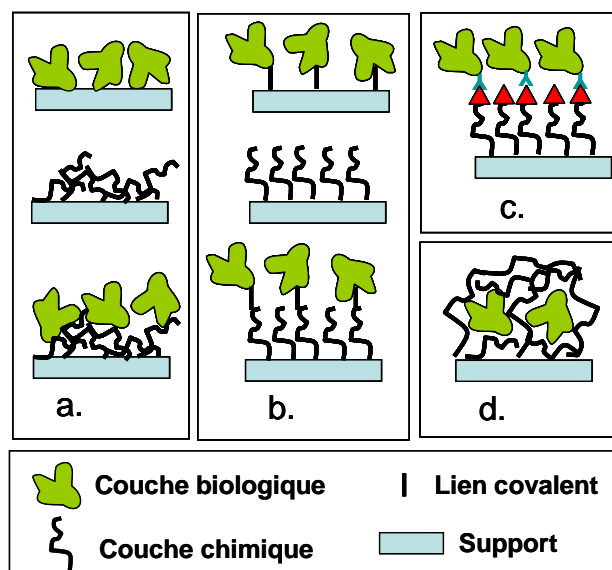


Figure 1 : Stratégies d'immobilisation de couches chimiques et/ou biologiques sur un support solide, par adsorption physique (a), par liaison covalente (b), par affinité (c), par piégeage (d).

Selon le type d'immobilisation, la qualité et la reproductibilité de la couche de fonctionnalisation est plus ou moins facile à contrôler. Ainsi, un des problèmes majeurs rencontré lors de l'immobilisation d'entités biologiques sur une surface est la diminution de l'activité biologique par rapport à l'espèce en solution. Cette perte d'activité biologique, qui peut être partielle ou totale, est souvent le résultat de la fixation aléatoire entraînant une diminution de l'accessibilité des sites réactifs. Une bonne présentation de ces sites réactifs est donc indispensable afin de conserver l'activité biologique de la surface fonctionnalisée.

Il existe différentes voies pour maîtriser ou pour contrôler l'immobilisation d'entités biologiques sur une surface :

- Diriger l'immobilisation en un site particulier afin de l'orienter sur la surface. J'ai utilisé cette stratégie lors de l'immobilisation d'anticorps anti-p24 ou de protéines recombinantes p24 sur le poly(anhydride maléique-*alt*-méthyl vinyl éther) pour l'amélioration de test de diagnostic du VIH.
- Adapter la chimie de surface afin d'optimiser l'immobilisation et de limiter les interactions non spécifiques. C'est l'approche que j'ai suivie dans la conception et l'élaboration des puces à protéines pour le diagnostic.
- Introduire un « lien » entre l'entité biologique et la surface afin de minimiser les contraintes dues à la proximité de la surface et augmenter la surface spécifique pour l'immobilisation. Différentes solutions ont été envisagées et testées dans ce cadre, et notamment l'utilisation de différents polymères (chitosan, dextran, etc.) afin d'augmenter la sensibilité des tests de diagnostic.

Mais la stratégie d'immobilisation (chimie de surface et méthode de dépôt des protéines) est fortement dépendante du type de support solide (verre, métal, plastique) et des caractéristiques des entités biologiques à immobiliser. En effet, la diversité des systèmes biologiques auxquels je me suis intéressée, a mis en lumière la nécessité d'adapter pour chacun d'eux la stratégie d'immobilisation. Une partie de mes activités de recherche a donc consisté à étudier l'influence de ces paramètres afin d'optimiser et de standardiser les protocoles dans le but de fiabiliser les études. De plus, la méthode de détection (directe, indirecte, sans ou avec marquage) des interactions moléculaires va également conditionner le choix du support solide et le développement d'outils plus ou moins sensibles. Ainsi, le fil conducteur de mes recherches est sans aucun doute la compréhension des phénomènes aux interfaces matériaux/système biologique pour le développement d'outils applicatifs efficaces. Pour cela, je suis partie de systèmes modèles que l'on peut qualifier de « simples », tels que les peptides ou protéines purifiées, pour aller vers des systèmes biologiques de plus en plus complexes et « réels », tels que des sérums de patients.

1^{ère} Partie

Matériaux polymères biospécifiques et biomimétiques

Cette partie présente mes travaux de recherche relatifs à la fonctionnalisation chimique de matériaux polymères afin d'induire une réponse biologique spécifique. Deux approches différentes sont abordées. La première approche consiste à modifier les caractéristiques physico-chimiques de la surface (nature du substrat, composition et fonction chimiques, mouillabilité) dans le but de lui conférer l'activité biologique recherchée. On parle alors de surface à activité biospécifique. Cette approche a été étudiée dans le cadre de la mise en œuvre de prothèses vasculaires. La seconde approche consiste à modifier la surface du matériau avec des groupements chimiques (acides aminés) choisis de telle sorte que leur répartition et leur arrangement spatial permettent de mimer un site actif biologique. On parle alors de surface biomimétique. Ce principe a été étudié vis à vis de deux modèles biologiques complémentaires, des virus et des anticorps anti-viraux.

I- Matériaux polymères à activité biospécifique: Elaboration de prothèses vasculaires

Ce travail a été réalisé lors d'un séjour post-doctoral dans le laboratoire du Pr. Jan Feijen à l'Université de Twente (Pays-Bas).

En chirurgie vasculaire réparatrice, il y a un besoin croissant de disposer de prothèses vasculaires de faible diamètre (< 5 mm). Un moyen d'augmenter la durée de vie de ces prothèses (Dacron, Téflon) est de recouvrir leur surface interne avec des cellules endothéliales autologues^{12 13}. Or la source de cellules endothéliales autologues, l'efficacité de l'ensemencement cellulaire, et le détachement de ces cellules de la surface du matériau après restauration de la circulation sanguine sont des obstacles majeurs au succès de l'implantation de ces prothèses vasculaires¹⁴. Les cellules endothéliales de la veine du cordon ombilical humain (HUVEC) sont couramment utilisées pour évaluer l'effet de nouveaux supports sur la prolifération cellulaire. Cependant, ces cellules présentent une grande variabilité car elles sont issues de différents donneurs.

Par ailleurs, des études histologiques réalisées chez des chiens ont montré que le détachement des cellules endothéliales était associé à une importante infiltration de leucocytes dans les 6 h suivants l'implantation de prothèses vasculaires entièrement recouvertes de cellules endothéliales¹⁵. Une des hypothèses pour expliquer ce phénomène est que l'interaction des cellules endothéliales avec le matériau prosthétique entraîne leur activation, avec production de cytokines et sur-expression de molécules d'adhésion pour les leucocytes. Ceci conduit à l'adhésion, l'infiltration et l'activation des leucocytes comme dans le cas de processus inflammatoires (Fig. 2).

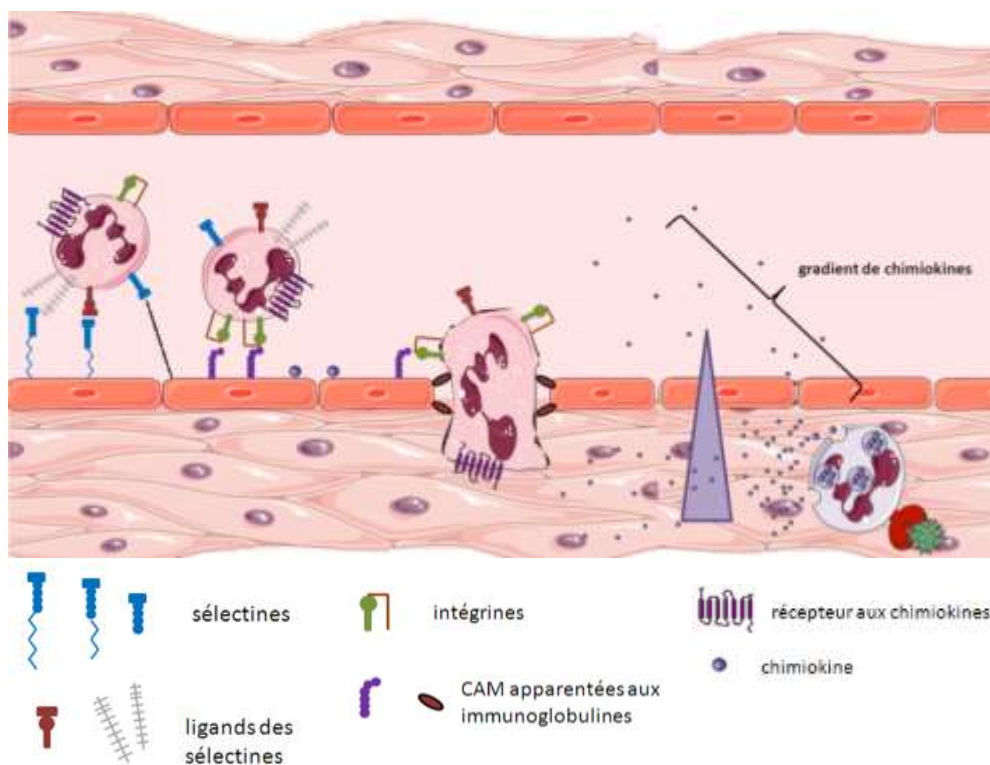


Figure 2 : Étapes de la migration du leucocyte (en rose) sur les cellules endothéliales (en rouge) des vaisseaux sanguins vers le site inflammatoire.

Les cellules endothéliales activées sur-expriment les molécules d'adhésion E- et P-sélectine ce qui provoque le roulement des leucocytes non activés exprimant de façon constitutive la molécule d'adhésion L-sélectine. Sous l'effet des chimiokines, les leucocytes sur-expriment des molécules d'adhésion telles que les intégrines- β 1 et - β 2. Or, VCAM-1 et ICAM-1, les récepteurs de ces intégrines sur les cellules endothéliales^{16 17} sont fortement sur-exprimés sur l'endothélium inflammé¹⁸. Enfin, des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'interaction entre les molécules d'adhésion PECAM-1 endothéliales et leucocytaires joue un rôle dans la migration des leucocytes à travers l'endothélium^{19 20}. En effet, PECAM-1 est une molécule d'adhésion située sur les membranes latérales des cellules endothéliales ainsi que sur les membranes des leucocytes.

Nous nous sommes donc intéressés d'une part, à évaluer l'impact du matériau support («tissu de culture polystyrène», Dacron, Teflon) sur l'expression des molécules d'adhésion leucocytaires (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, E-selectine) par des cellules endothéliales. D'autre part, nous avons comparé la prolifération de différents types de cellules endothéliales (de la veine du cordon ombilical humain (HUVEC), de micro-vaisseaux du tissu adipeux humain (HAMVEC), de la lignée transformée EC-RF24), sur ces mêmes matériaux supports recouverts de différentes concentrations de fibronectine (une protéine de la matrice extracellulaire impliquée dans l'adhésion des cellules à la lame basale).

L'activation des cellules endothéliales a été évaluée par immunofluorescence en cytométrie de flux et en microscopie confocale après marquage des molécules d'adhésion. Le contrôle positif du phénomène inflammatoire est obtenu par l'action de l'interleukine-1 β (Il-1 β) sur les cellules endothéliales en culture.

De façon générale, les résultats indiquent que l'expression des molécules d'adhésion leucocytaires par les cellules endothéliales dépend à la fois des propriétés de surfaces des polymères et de l'origine des cellules (veine ombilicale ou tissu adipeux). L'expression de ICAM-1 et de E-sélectine par les HUVECs et les HAMVECs est notamment caractérisée par la présence de 2 populations de cellules présentant des niveaux d'expression différents. De plus, l'augmentation de l'expression de la E-sélectine par les HAMVECs ne permet pas d'envisager leur utilisation pour l'ensemencement des prothèses vasculaires²¹.

En ce qui concerne les cellules EC-RF24, elles sont capables de proliférer sur les matériaux supports testés avec des propriétés adhésives accrues, mais ne sont pas représentatives du comportement de cellules primaires comme les cellules HUVEC. En effet, les différences morphologiques et de prolifération des deux types cellulaires testés suggèrent des différences notamment au niveau du dépôt des protéines de la matrice extracellulaire et/ou de la synthèse de facteurs de croissance (Fig. 3). La lignée cellulaire EC-RF24 n'est donc pas fiable pour évaluer la prolifération de cellules endothéliales sur des surfaces polymères²².

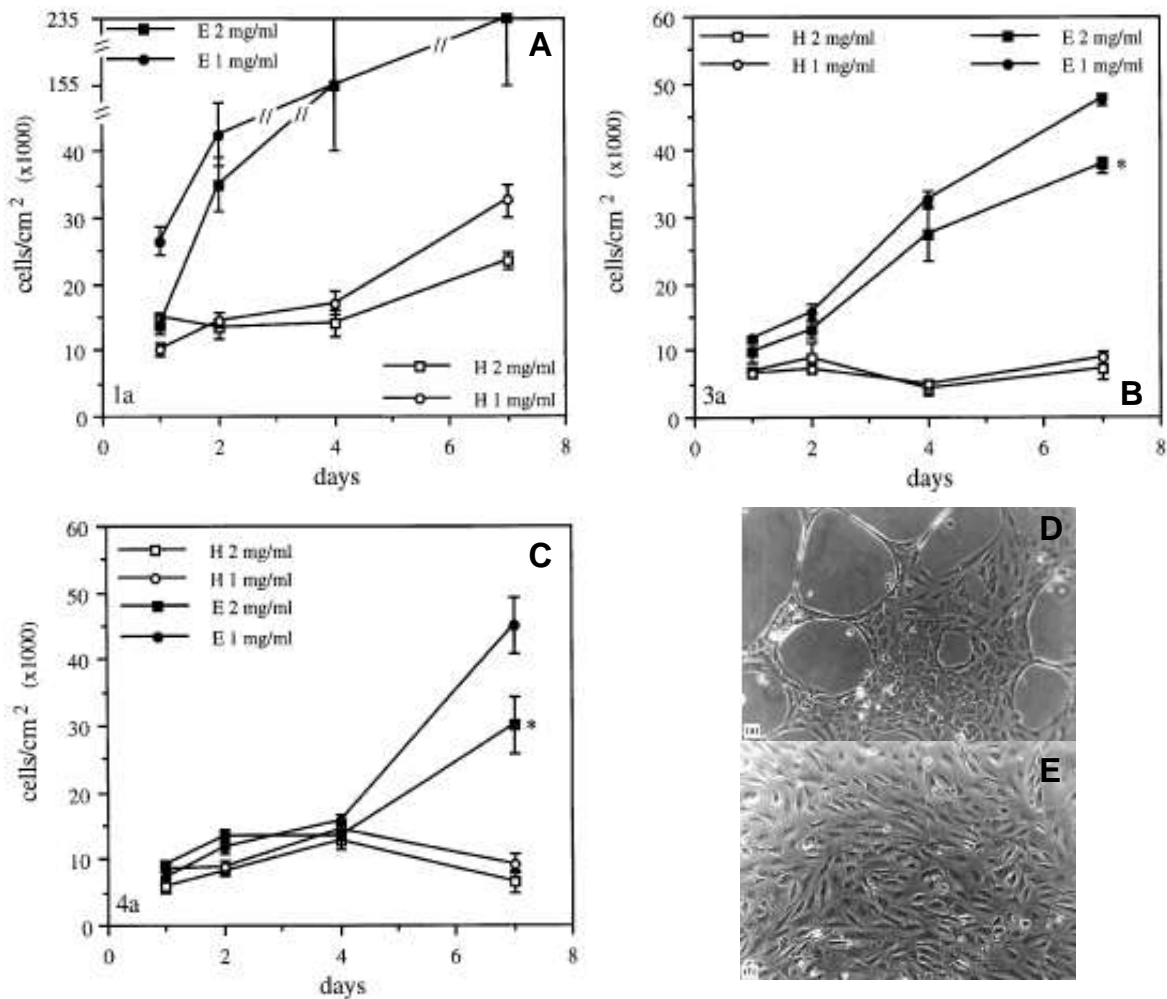


Figure 3 : Prolifération des cellules HUVEC (H) et EC-RF24 (E) sur Tissu de Culture Polystyrène (graphe A), Dacron (graphe B) et Teflon (graphe C) recouverts avec 1 ou 2 mg/ml de fibronectine. Morphologies des cellules HUVEC (graphe D) et EC-RF24 (graphe E) sur Dacron (grossissement x133).

Il faut cependant noter que cette étude a été réalisée dans des conditions statiques afin de se limiter à l'influence du matériau de culture. De plus, seul le caractère plus ou moins hydrophobe du matériau a été pris en compte, alors que la topographie de surface du matériau est un paramètre important dans les processus d'activation cellulaire²³. Afin d'être au plus proche des conditions d'implantation de prothèses vasculaires, il est nécessaire de reproduire l'étude en soumettant les cellules à un flux correspondant à celui de la circulation sanguine. Il serait également intéressant d'étudier la conformation et l'activité de la fibronectine adsorbée sur les matériaux polymères car c'est elle qui permet aux cellules endothéliales d'adhérer au support de culture.

Ce travail a donné lieu à la publication de 2 articles (Annexe 1) et à une communication orale lors d'un congrès international.

II- Microparticules biomimétiques pour la capture de virus et d'anticorps antiviraux

Ce travail a été réalisé lors des thèses de 3^{ème} cycle de José Crépinior (allocation DGA) et de Marie-Claire Berger que j'ai co-encadrés à l'Université Paris 13 (collaboration avec le Centre de Recherche du Service de Santé des Armées Emile Pardé, La Tronche).

La détection et l'identification des maladies émergentes sont une des priorités des programmes de prévention. Parmi elles, les fièvres hémorragiques causées par les arbovirus sont de grands fléaux épidémiologiques des régions tropicales qui s'étendent vers les régions occidentales. Les virus de la fièvre jaune et de la dengue appartenant à la famille des *flaviviridae*, et les virus Sindbis et Semliki Forest appartenant à la famille des *togaviridae*, sont les plus connus. A l'heure actuelle, l'identification et la détection de ces virus sont réalisées soit par culture cellulaire, qui nécessite de grande quantité d'échantillon et requiert beaucoup de temps (plusieurs jours), soit par ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) qui nécessite l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre le virus, soit par PCR (polymerase chain reaction) qui requiert du matériel spécifique et cher. La prophylaxie quant à elle, s'appuie sur la vaccination et l'éradication des moustiques vecteurs. Cependant, seuls quelques vaccins sont disponibles, comme celui pour la Fièvre Jaune, mais ils ne sont pas toujours utilisés. De plus, la destruction des moustiques vecteurs de ces maladies n'est jamais permanente ni totalement efficace.

Le développement de nouvelles techniques de détection sensibles et rapides comme les biocapteurs pourraient permettre de diminuer la propagation de ces maladies dans les régions endémiques.

Un autre moyen de lutte contre les épidémies de fièvres hémorragiques est la sérothérapie, c'est-à-dire l'injection d'anticorps antiviraux aux personnes infectées. Cette alternative nécessite de disposer de serum contenant une forte concentration en anticorps antiviraux afin d'être efficace. Cela nécessite donc d'enrichir les sera de patients en anticorps antiviraux grâce à des techniques de purification de ces anticorps.

Ainsi, dans le cadre d'une collaboration avec l'unité de virologie du Centre de Recherche du Service de Santé des Armées Emile Pardé (La Tronche), je me suis intéressée à 2 aspects de cette problématique :

- concevoir et identifier des microparticules de latex fonctionnalisés pouvant entrer dans l'élaboration d'un biocapteur spécifique des arbovirus
- identifier les latex fonctionnalisés permettant de purifier spécifiquement des anticorps anti-arbovirus

Deux modèles viraux ont été étudiés: le virus Kedougou (50 à 70 nm de diamètre) appartenant à la famille des *flaviviridae*, et le virus Babanki (45 à 50 nm de diamètre) appartenant à la famille des *togaviridae*.

Les latex fonctionnalisés ont donc été étudiés pour leurs interactions d'une part vis-à-vis des virus Babanki et Kedougou (Fig 4A), et d'autre part vis-à-vis d'anticorps anti-Babanki et anti-Zika (Fig 4B).

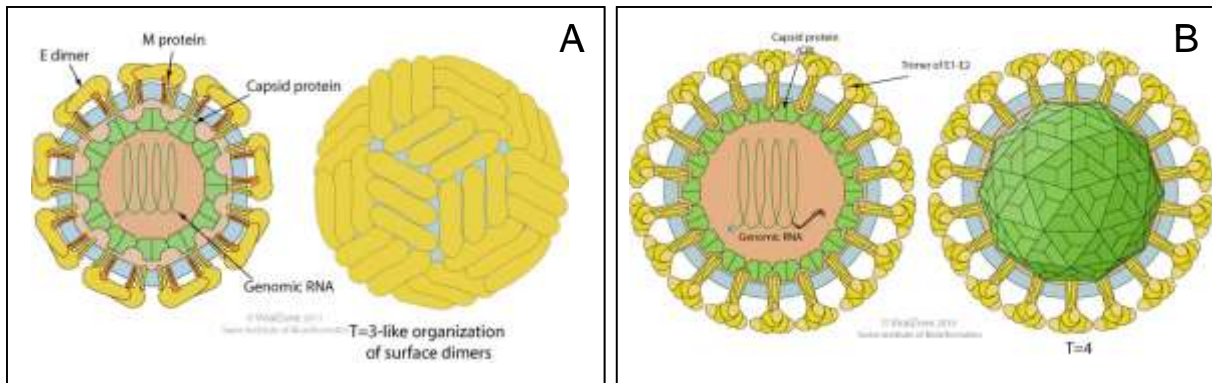


Figure 4 : Structure des flavivirus (A) et togavirus (B). (source: Swiss institute of bioinformatics)

II-1. Fonctionnalisation chimique et caractérisation des microparticules de latex

Les microparticules de latex ont été fonctionnalisées par différents acides aminés, un lot de latex fonctionnalisé correspondant à un type d'acide aminé substitué. Le choix de ces acides aminés (acide aspartique, phénylalanine, sérine, arginine, asparagine, leucine, tyrosine) a été gouverné par leur importance fonctionnelle au niveau des glycoprotéines d'enveloppe virale. L'antigène dominant des flavivirus est la glycoprotéine d'enveloppe E qui se lie à des récepteurs cellulaires, contribue à la fusion de la membrane cellulaire, et présente un ensemble d'épitopes conduisant à la production d'anticorps neutralisant ou non. Chez certains flavivirus, cette glycoprotéine d'enveloppe contient la séquence RGD (arginine-glycine-acide aspartique) impliquée dans l'adsorption du virus sur la cellule hôte^{24 25}. Des études de mutagenèses réalisées sur la glycoprotéine d'enveloppe du virus de l'encéphalite japonaise ont également montré l'importance de certains résidus d'acides aminés: l'arginine/la lysine en position 52, l'acide glutamique en position 138, la phénylalanine et la sérine en position 364 et 365, l'asparagine et la leucine en position 367 et 368^{26 27}.

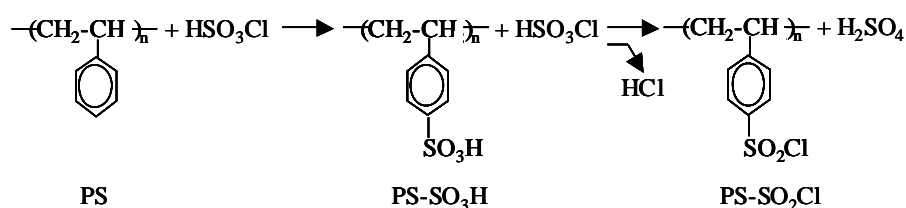
L'infection des cellules par les alphavirus (famille des *togaviridae*) s'effectue par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique et les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2 associées en trimère (Fig. 4B)²⁸. Des études menées sur la virulence du virus Sindbis ont montré l'importance des résidus arginine en position 114, valine en position 75 et 237, et glycine en position 313, de la glycoprotéine E2^{29 30}.

Les microparticules de polystyrène (35 à 75 μm de diamètre) sont substituées par un acide aminé en trois étapes (Fig. 5) : la chlorosulfonation du polystyrène, suivie de la condensation de l'acide aminé sous sa forme méthyl ester avec les groupements chlorosulfonyle. Une hydrolyse basique permet ensuite d'obtenir les microparticules de polystyrène sulfamide d'acide aminé. Selon la quantité d'acide aminé introduite dans le milieu réactionnel, différents taux de substitution des microparticules sont obtenus.

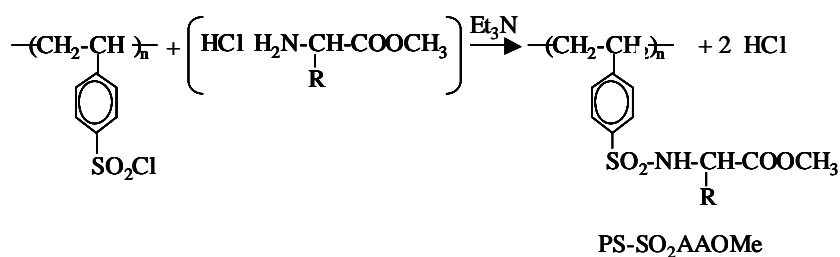
La caractérisation chimique de ces latex fonctionnalisés a été réalisée par analyse élémentaire. Sept acides aminés différents (aspartique, phénylalanine, sérine, arginine, asparagine, leucine, tyrosine) ont été substitués à des taux variant de 4% à 73%. Ces microparticules ont également été caractérisées par rapport aux groupements fonctionnels substitués, c'est à dire les groupements sulfonate (SO_3^-) et/ou carboxylate (COO^-) apportés par les acides aminés. La fraction molaire COO^-

$/(COO^-+SO_3^-)$ a été définie afin de pouvoir comparer les différentes familles de latex fonctionnalisés.

Etape 1: chlorosulfonation des groupements phényl



Etape 2: condensation de l'acide amine sous forme chloridrate methyl ester



Etape 3: hydrolyse basique

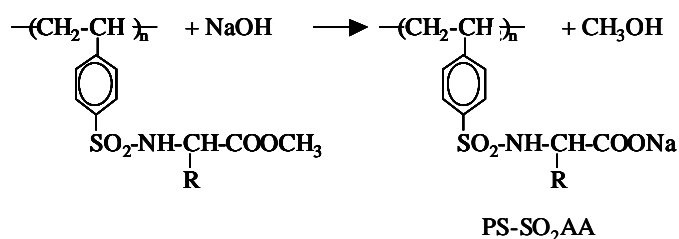


Figure 5: Fonctionnalisation des microparticules de polystyrène par des acides aminés.

II-2. Capture de virus

L'étude de la cinétique d'adsorption montrent que les 2 modèles viraux choisis s'adsorbent très rapidement (<10 mn) sur les latex fonctionnalisés.

La spécificité de l'interaction latex/virus dépend de la nature et de la répartition des acides aminés sur la chaîne macromoléculaire, avec un maximum pour une composition donnée (Fig. 6). Il s'agit notamment des latex substitués par l'arginine, avec un maximum à 20% de substitution ($COO^-/(COO^-+SO_3^-) = 0,29$), et par l'acide aspartique, avec un maximum à 42% de substitution ($COO^-/(COO^-+SO_3^-) = 0,75$). Toutefois, l'intensité de l'interaction latex/virus, c'est-à-dire le taux d'adsorption dépend du virus considéré. En effet, les taux d'adsorption obtenus pour le virus Kedougou sont systématiquement supérieurs à ceux obtenus pour le virus Babanki, quelle que soit la composition des latex³¹.

Les deux virus étudiés semblent donc interagir spécifiquement avec les mêmes sites bioactifs à la surface des particules de latex fonctionnalisés, mais avec une affinité différente, ce qui suggère la présence de séquences similaires dans leurs glycoprotéines d'enveloppe. Cette étude indique que les latex fonctionnalisés présentent une spécificité de groupe viral, e.g. du groupe des arbovirus, plutôt qu'une spécificité de famille (*Togaviridae* ou *Flaviviridae*). Toutefois, cette hypothèse

reste à vérifier, notamment en étudiant les interactions développées entre ces latex fonctionnalisés et d'autres virus appartenant aux groupes des arbovirus.

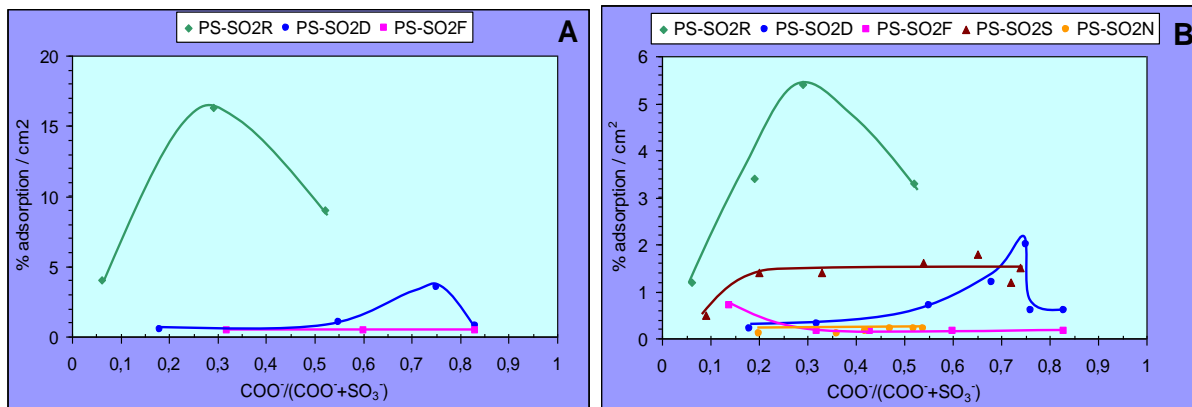


Figure 6 : Isotherme d'adsorption des virus Kedougou (graphe A) et Babanki (graphe B) en fonction de la composition des particules fonctionnalisées par différents acides aminés. Les virus ont été marqués à l'uridine tritiée puis purifiés afin de pouvoir réaliser les isothermes.

PS-SO₂R : polystyrène sulfamide d'arginine

PS-SO₂D : polystyrène sulfamide d'acide aspartique

PS-SO₂F : polystyrène sulfamide de phénylalanine

PS-SO₂S : polystyrène sulfamide de sérine

PS-SO₂N : polystyrène sulfamide d'asparagine

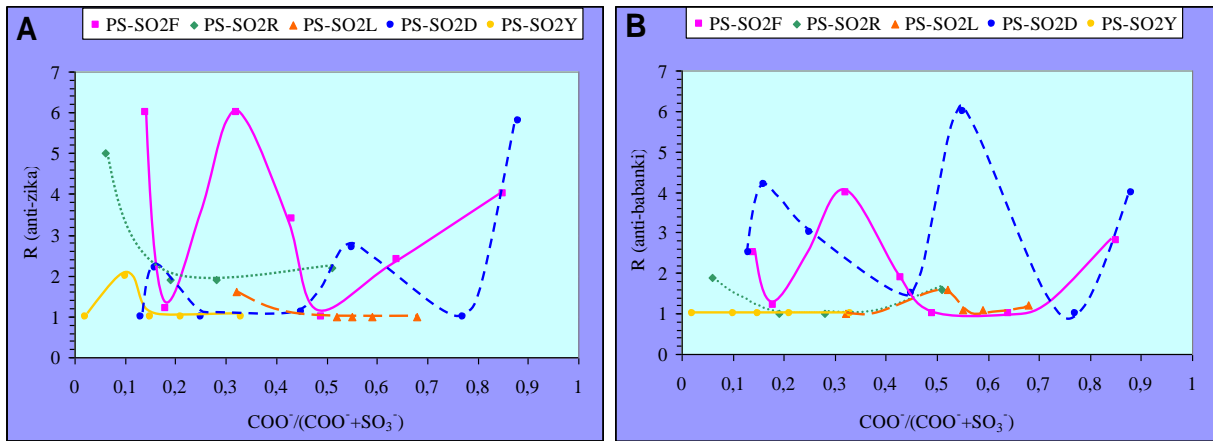
II-3. Purification d'anticorps antiviraux

Les mêmes latex fonctionnalisés ont été étudiés pour leurs interactions avec des anticorps (immunoglobulines, IgG) antiviraux contenus dans des ascites de souris obtenus après immunisation par les virus Babanki (*togaviridae*) et Zika (*flaviviridae*). Les isothermes d'adsorption des IgG antivirales établies, ont été comparées à celles obtenues avec des IgG non dirigées contre des antigènes viraux.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence que l'adsorption des immunoglobulines antivirales dépend de l'acide aminé substitué et de la composition chimique des microparticules. De plus, les immunoglobulines anti-Babanki et anti-Zika présentent des spécificités différentes vis à vis des microparticules étudiées (Fig.7). L'ensemble de ces données confirme que la substitution statistique de groupements fonctionnels appropriés à la surface de microparticules de latex permet de créer des sites reconnus spécifiquement par des immunoglobulines antivirales. Ces particules présentent donc un caractère antigénique analogue à celui des virus étudiés. On parle alors de microparticules « virus-like »³².

Cette étude a également montré que les microparticules interagissant spécifiquement avec les anticorps antiviraux, présentent une composition chimique différente de celles interagissant avec les virus correspondants.

Une voie d'application de telles particules biomimétiques est leur utilisation en tant que phase stationnaire pour la purification d'immunoglobulines antivirales, par chromatographie d'affinité. Des chromatographies basse pression réalisées à partir d'ascite anti-Babanki sur les microparticules de latex les plus spécifiques ont permis de purifier les IgG anti-Babanki, et de conserver leur activité biologique.



**Figure 7 : Variation de l'affinité des IgG antivirales selon la composition chimique des particules de polystyrène fonctionnalisées par des acides aminés.
 PS-SO₂L : polystyrène sulfamide de leucine
 PS-SO₂Y : polystyrène sulfamide de tyrosine**

L'ensemble de ces travaux a donné lieu à la publication de 2 articles (Annexe 2), 1 chapitre de livre et 1 communication orale lors d'un congrès international.

2^{ème} Partie

Surfaces fonctionnalisées pour l'immobilisation de protéines : Applications au diagnostic médical

Cette partie retrace l'évolution de mes travaux de recherche en prenant comme fil rouge "l'ingénierie de surface". L'objectif commun est de comprendre et de prévoir le comportement de biomolécules complexes telles que les protéines, à l'interface support solide / milieu biologique. Le pendant applicatif à ces études est l'élaboration de nouveaux outils pour le diagnostic médical. Le premier chapitre concerne le contrôle de l'immobilisation de protéines recombinantes sur support polymère, et leur utilisation pour le diagnostic du VIH-1. Les chapitres suivants traitent de l'intégration de ces recherches aux nanotechnologies pour développer des outils miniaturisés d'analyse multiparamétrique telles que les puces à protéines. Ces travaux sont illustrés par différents exemples d'application en diagnostic.

I- Conjugués polymère-protéine pour l'ELISA: Application au diagnostic du VIH-1

Ce travail a été réalisé lors d'un séjour en délégation CNRS dans l'unité mixte CNRS-bioMérieux (ENS-Lyon).

Dans l'histoire de l'infection par le VIH-1, un des principaux objectifs des études menées est la recherche de marqueurs pronostics pouvant également être utilisés pour évaluer l'efficacité d'un traitement antiviral. Plusieurs paramètres viraux ont été décrits comme marqueurs pronostics, mais l'antigène p24 est généralement accepté comme un index de la réplication virale. En effet, après l'infection par le VIH-1, un pic d'antigène p24 est détecté dans les sérums, deux semaines après la contamination du patient (phase aiguë) ainsi que dans le stade tardif de l'infection. Cette antigénémie est suivie par le développement des premiers anticorps spécifiques dirigés contre les produits du gène *env* (gp160, gp120, gp41) et contre un des produits du gène *gag* (p24) (Fig. 8).

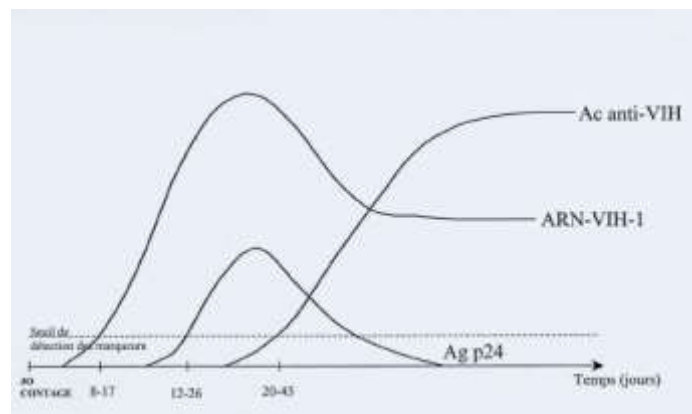


Figure 8 : Cinétique schématique des marqueurs virologiques au cours de la phase précoce de l'infection due au VIH-1 (extrait de ANAES, Service des recommandations et références professionnelles, Janvier 2000).

Le gène *gag* du VIH-1 code une polyprotéine précurseur, p55, qui est clivée en 3 protéines majeures : p24 (protéine de la capsid), p17 (protéine de la matrice) et p7 (protéine de la nucléocapside) (Fig. 9).

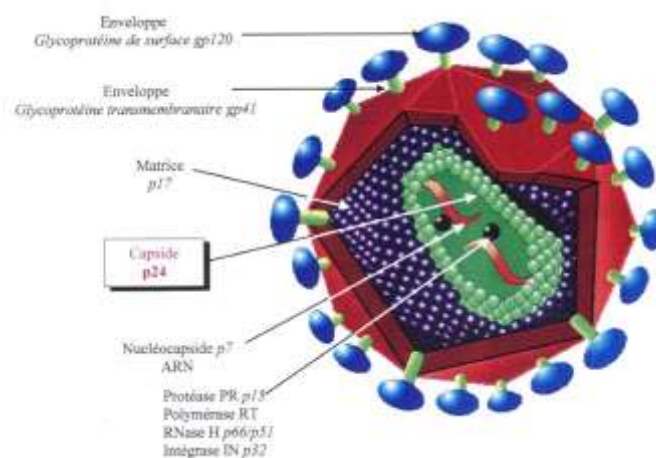


Figure 8 : Structure du VIH-1

Pendant la phase asymptomatique de l'infection, la réplication virale est faible. Les taux d'antigène p24 ne sont donc plus détectables par les tests standards ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay), contrairement à l'ARN viral détectable par amplification enzymatique (technique PCR) tout au long de la maladie. De plus, les taux élevés d'anticorps anti-p24 dans les sérums de patients peuvent masquer les antigènes p24 par formation de complexe immun p24-anti-p24. Des études ont montré que le taux d'antigène p24 déterminé par ELISA (après dénaturation par la chaleur) était, d'un point de vue pronostic, équivalent au comptage du nombre de lymphocytes CD4⁺ et au taux d'ARN VIH-1³³.

Dans un contexte de diagnostic clinique lié à une infection par le VIH-1, deux paramètres sont donc en particulier examinés :

- la réponse immunitaire (détection d'anticorps antiviraux) du patient évaluée à l'aide d'antigènes viraux
- la charge virale (détection d'antigènes viraux) évaluée grâce à l'utilisation d'anticorps antiviraux spécifiques, généralement monoclonaux.

Ces évaluations sont le plus souvent réalisées par la technique ELISA nécessitant l'immobilisation de biomolécules sur un support solide (Fig. 10). Or, un des problèmes majeurs de cette technique est une mauvaise sensibilité due à une perte d'activité biologique, qui peut être partielle ou totale, de la biomolécule immobilisée par rapport à la biomolécule en solution.

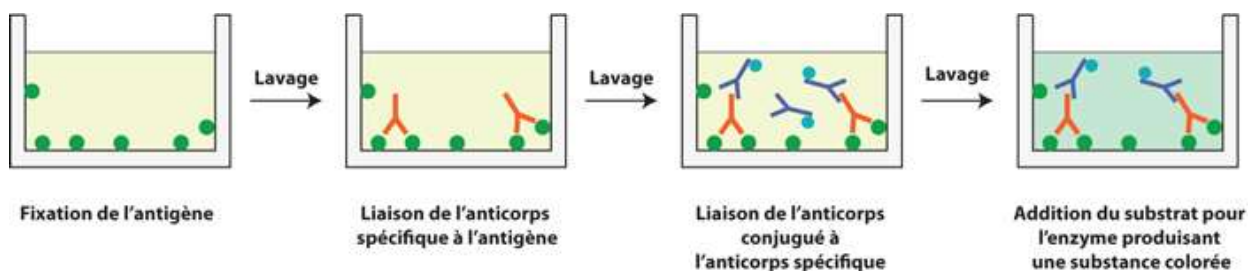


Figure 10 : Principe de la technique ELISA

Une des stratégies développée au **Laboratoire des Systèmes Macromoléculaire et Immunovirologie Humaine (UMR CNRS 2142)** pour résoudre ce problème a été d'orienter l'immobilisation de la protéine sur un support de type polymère. Pour cela, le génie génétique permet d'introduire ou de substituer, en un endroit précis de la protéine, des acides aminés portant un groupement fonctionnel utilisé dans la réaction de couplage. Par exemple, l'introduction d'une unique cystéine dans une séquence protéique permet le couplage spécifique et orienté sur un polymère portant des fonctions maléimides^{34 35}. De même, l'introduction de petites séquences d'acides aminés, les "tags", telles que des séquences de poly-histidine³⁶, de poly-arginine^{37 38} ou de poly-lysine^{39 40}, conduit à l'immobilisation de ces protéines recombinantes sur des phases solides *via* des interactions de coordination avec des ions métalliques, des interactions de type électrostatique avec une surface chargée négativement, des liaisons covalentes avec un support comportant des groupements acides réactifs, respectivement.

Ainsi, dans le cadre du diagnostic de l'infection au VIH-1 par évaluation de la réponse immunitaire, des protéines recombinantes p24 (RH24) de capsid du VIH-1 ont été immobilisées de façon covalente et orientée sur des copolymères d'anhydride maléique (p(AMMVE))³⁹. L'addition d'un tag 6 lysines (K₆) en position C-terminale (RH24K) ou N-terminale (RK24H) de la protéine a permis d'améliorer

considérablement l'efficacité de la réaction de couplage avec le polymère (rendement de couplage > 95%). L'immobilisation des protéines recombinantes portant le tag se produit suivant un processus régio-sélectif, en tirant profit d'interactions électro-attractives entre la protéine et le polymère⁴¹. Toutefois, le gain en terme de sensibilité du test ELISA apporté par ces conjugués protéine-polymère n'a pu être évalué lors de cette étude.

Mon premier projet au sein de ce laboratoire a donc consisté à évaluer les conjugués RK24H-polymère en test ELISA sur des sera de patients VIH+.

Puis, dans le cadre du diagnostic de l'infection au VIH-1 par évaluation de la charge virale, je me suis intéressée au couplage orienté d'anticorps anti-p24 sur le poly(anhydride maléique-*alt*-méthyl vinyl éther) ou p(AMMVE). L'utilisation de ce polymère permet de comparer l'immobilisation des anticorps et celle des antigènes recombinants. Dans le cas des anticorps, il est beaucoup moins courant de disposer facilement de recombinants, ou scFv (single chain Fragment variable). Des modifications chimiques réalisées en un site particulier de l'anticorps (Fig. 11) permettent alors de disposer de groupements réactifs potentiellement utilisables pour un couplage covalent. Les modifications les plus couramment pratiquées sur les anticorps sont:

- l'oxydation de la partie saccharidique située sur le fragment Fc pour obtenir des fonctions aldéhyde
- la digestion enzymatique suivie de la réduction des ponts disulfure pour obtenir un groupement thiol du côté opposé au site de reconnaissance de l'antigène.

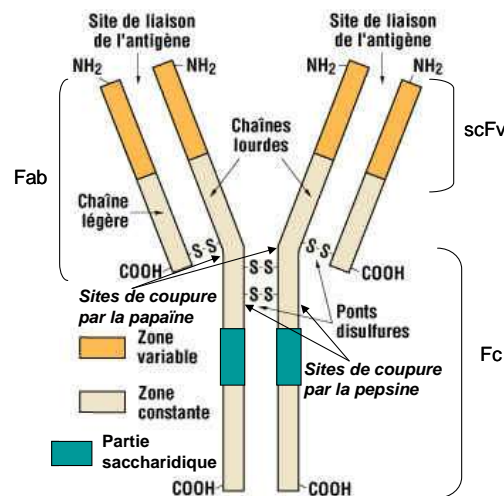


Figure 11 : Représentation d'un anticorps de type Immunoglobuline G ; Fc : Fragment cristallisable ; Fab : Fragment de liaison à l'antigène ; ScFv : chaîne simple du fragment variable.

I-1. Evaluation des conjugués RK24H-polymère en test ELISA

Afin d'évaluer le gain de sensibilité dans un test ELISA utilisant en phase de capture les bioconjugués, nous avons réalisé, en première approche, des tests utilisant le conjugué RK24H-p(AMMVE). Ce conjugué est obtenu par couplage covalent de la protéine recombinante p24 comportant un tag 6-lysines en position N-terminale (RK24H) sur le p(AMMVE), selon les conditions décrites par Allard et al.⁴¹. Pour cette étude, 6 sérums de patients infectés par le virus du sida (VIH positifs)

et 5 sérums de patients non infectés par le virus du sida (VIH négatifs) ont été testés. Nous avons montré qu'après immobilisation sur phase solide, le conjugué RK24H-p(AMMVE) présente, vis à vis de sérums HIV positifs, une réactivité très supérieure à celle de la protéine recombinante classiquement utilisée dans les tests ELISA^{42 43}. Sur les 6 sérums VIH positifs testés, le gain de sensibilité obtenu est en moyenne d'un facteur 7 (Fig. 12). Toutefois, de grandes variations sont observées entre les sera. Ces différences peuvent s'expliquer par des niveaux de réponses immunes anti-p24 différents relatifs à des stades différents de la maladie, et/ou à des patients de différentes origines³³.

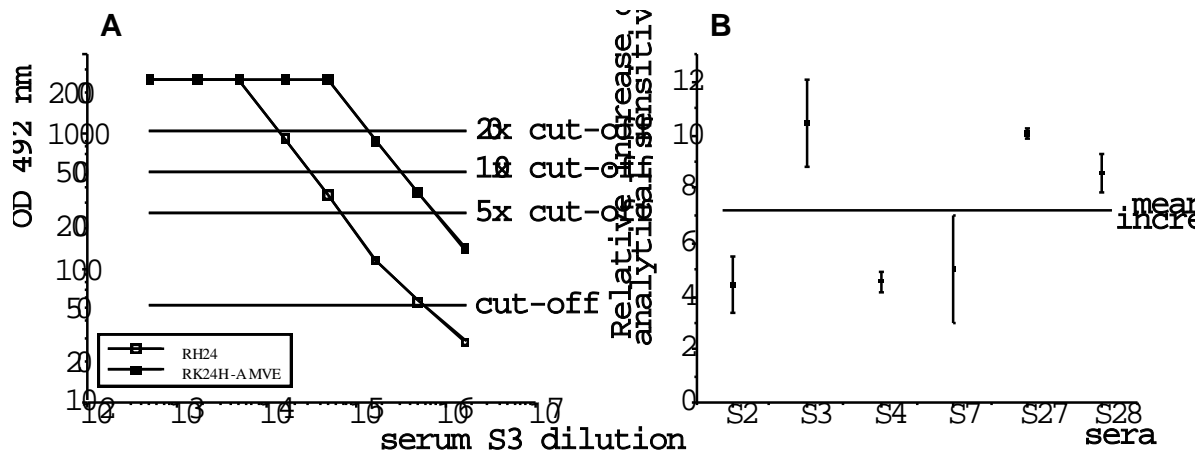


Figure 12 : A- Comparaison de la sensibilité du test ELISA pour le sérum HIV positif S3 en coating de conjugué RK24H-p(AMMVE) et en coating de protéine RH24. B- Evaluation du gain moyen de sensibilité du test ELISA obtenu pour les 5 sera HIV positifs testés, en coating de conjugué RK24H-p(AMMVE).

Ce travail a fait l'objet d'un article (Annexe 3).

I-2. Elaboration et caractérisation des conjugués anticorps-polymère

Dans cette étude, je me suis intéressée à 3 anticorps monoclonaux (13B5, 3D8 et 23A5) dirigés contre différents épitopes de la protéine p24 du VIH-1. Deux stratégies d'immobilisation covalente des anticorps anti-p24 sur le p(AMMVE) ont été mises en œuvre:

- Le greffage de l'anticorps *via* ses fonctions amines primaires (N-terminal et ϵ -NH₂ des résidus lysine) sur les unités réactives anhydride maléique (AM) du polymère.
- Le greffage de l'anticorps *via* sa partie saccharidique après oxydation des sucres, sur le p(AMMVE) substitué par des fonctions hydrazide (Hz) (Fig.13).

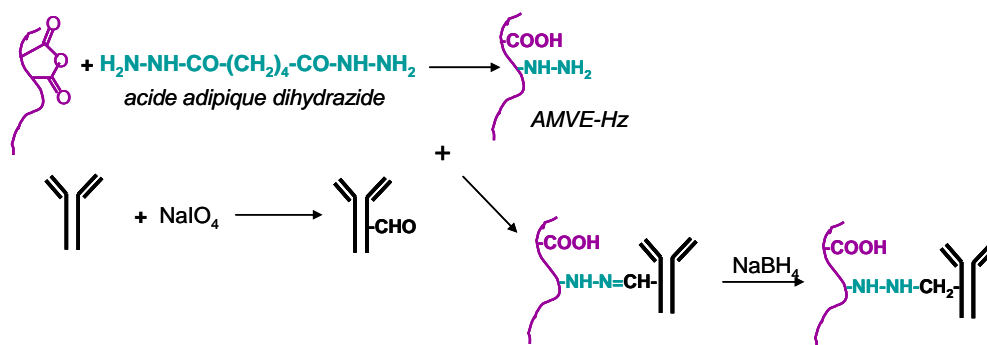


Figure 13 : Schéma du couplage de l'anticorps via ses groupements sacchridiques avec le p(AMMVE) fonctionnalisé par des groupements hydrazide.

La caractérisation des conjugués polymère-anticorps, et notamment la détermination du rendement de couplage, ont été effectuées par chromatographie d'exclusion stérique. Dans les 2 cas, le rendement de couplage est fonction :

- de l'anticorps considéré et de sa modification (Fig. 14A)
- de la réactivité du polymère qui peut être modulée par une hydrolyse contrôlée des fonctions anhydride maléique, AM (Fig. 14B)
- du rapport molaire unité AM/anticorps introduit dans le milieu réactionnel.

Les rendements de couplage obtenus varient de 26% à 98%, soit de 1 à 14 anticorps liés par chaîne de polymère, le greffage de l'anticorps par sa partie saccharidique étant moins efficace que par ses fonctions $-NH_2$. L'analyse des diagrammes de Scatchard issus des isothermes d'adsorption met en évidence un processus de couplage à coopérativité négative comme dans le cas de l'immobilisation de la protéine p24 (Fig. 14B).

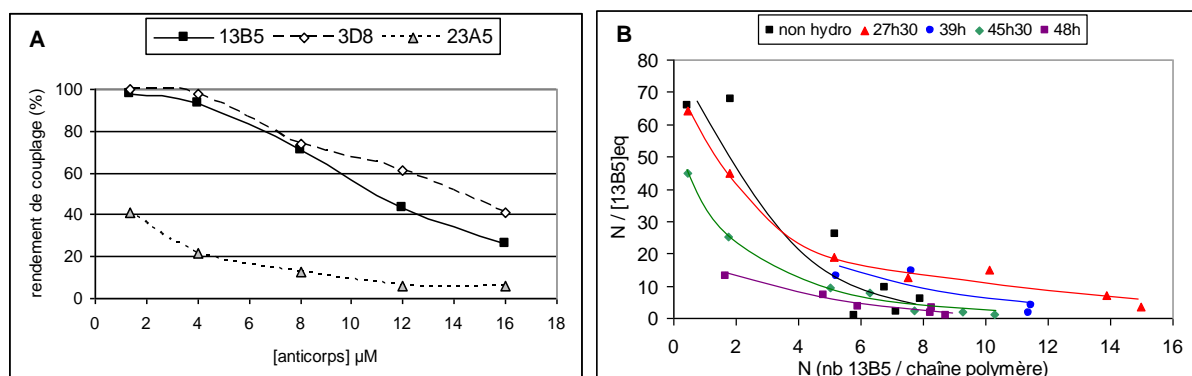


Figure 14 : Couplage des anticorps anti-p24 sur le p(AMMVE) (graphe A) ; Diagrammes de Scatchard issus des isothermes d'adsorption des anticorps 13B5 sur le p(AMMVE) pré-hydrolysé à différents temps (graphe B).

La reconnaissance biologique, en solution, de ces conjugués anticorps-polymère vis-à-vis de l'antigène RH24 est toujours inférieure à celle de l'anticorps non couplé. Toutefois, l'activité biologique de reconnaissance du bioconjugué est liée à la réactivité du polymère et au nombre d'anticorps liés par chaîne de polymère. Lorsque le nombre d'unité AM réactive du polymère est faible, la densité de sites de couplage est faible. Les anticorps s'immobilisent alors selon une orientation de type « end-on » (debout) car il y a moins de points d'ancrage disponibles sur le polymère. Les anticorps immobilisés occupent donc moins de

place et le nombre moyen d'anticorps liés par chaîne de polymère augmente. La bioréactivité du bioconjugué est alors meilleure (Fig 15A).

Enfin les bioconjugués anticorps-polymère ont été évalués dans un test ELISA direct. Un gain de la sensibilité de détection de la protéine RH24 par rapport au test classique, est obtenu uniquement avec les bioconjugués dont les anticorps sont immobilisés par leur partie saccharidique (Fig. 15B). Ces résultats montrent clairement que l'immobilisation orientée d'anticorps, notamment *via* leur partie saccharidique, sur un polymère soluble, tel que le p(AMMVE), permet de conserver leur activité biologique. De plus, les bioconjugués protéine-polymère sont très stables dans le temps, puisqu'aucune dégradation n'a été observée après 7 mois de stockage à 4°C.

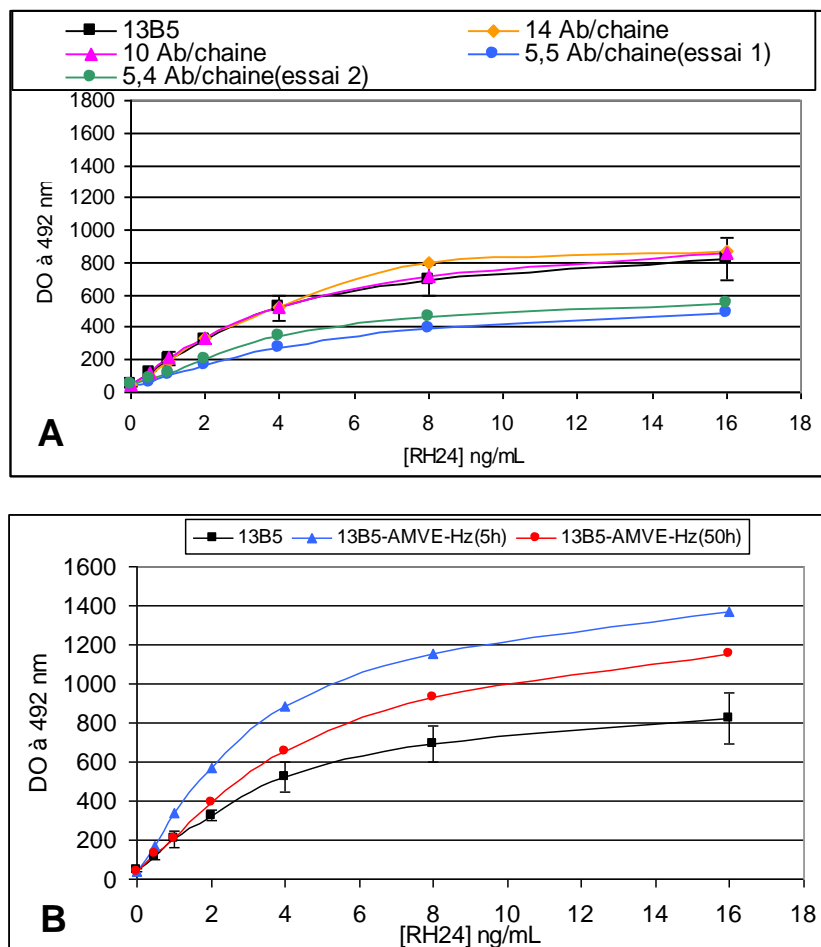


Figure 15 : ELISA direct de détection de la RH24 en coating d'anticorps 13B5 ou de bioconjugué. A : bioconjugué 13B5-p(AMMVE) ; B : bioconjugué 13B5(CHO)-p(AMMVE)Hz .

L'ensemble de ces travaux confirme l'importance d'orienter et de contrôler l'immobilisation de biomolécules sur un support afin de préserver leur activité biologique. En effet, l'immobilisation de protéines (antigène RH24, ou anticorps anti-p24) par leurs fonctions $-NH_2$ s'effectue de façon aléatoire et variable selon la protéine, entraînant une diminution de leur activité biologique. Toutefois, l'effet de l'immobilisation aléatoire peut être modulé en jouant sur la réactivité du support. Plus le nombre de points d'attachement de la protéine au support sera faible, mieux sera conserver la structure de la protéine. Outre la réactivité du support, l'immobilisation peut être orientée grâce à la présence de fonctions réactives particulières sur la protéine (tag, groupements chimiques).

II- Vers la miniaturisation des tests biologiques: développement des biopuces à peptides et à protéines.

Les progrès de la biologie moléculaire et le besoin croissant de tests biologiques à haut débit ont conduit au développement, à la fin des années 1980, des biopuces ou « microarrays ». Une biopuce est constituée d'un support solide (lame de verre, silicium, etc.) chimiquement fonctionnalisé afin de permettre l'immobilisation d'ensemble (« array ») de biomolécules (appelées « sondes ») en des endroits précis de la surface solide (appelés « spot »). Ces sondes immobilisées doivent reconnaître spécifiquement leur cible et donc permettre leur détection dans un échantillon biologique. Selon le format choisi, une biopuce permet d'analyser plusieurs dizaines à plusieurs milliers d'interactions biologiques de façon simultanée (Fig. 16). Ce nouvel outil de criblage combine à la fois des principes et procédés issus de la biologie moléculaire, de la chimie et de la microtechnologie.

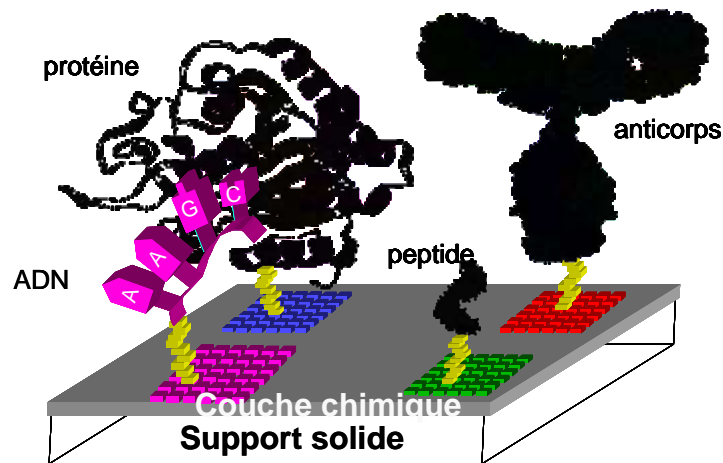


Figure 16 : Représentation schématique d'une biopuce. Un support solide est fonctionnalisé par une couche chimique permettant l'immobilisation en des endroits précis de biomolécules (ADN, peptides, protéines, etc.).

Initialement développées pour le séquençage du génome humain, les premières biopuces ont été les puces à ADN. Elles ont bénéficié d'un essor fulgurant entre les années 1996 (première puce commercialisée par Affymétrie) et 2000. Leur fabrication et mise en œuvre est maintenant bien maîtrisées, d'autant plus que l'ADN immobilisé (oligonucléotide simple brin) possède une structure simple et homogène, facilement modifiable à façon, et peut être amplifié par PCR (« Polymerase Chain Reaction »). Le même principe a donc été appliqué à l'étude des interactions protéine-protéine avec le développement des puces à protéines. Bien que l'intérêt pour les puces à protéines croisse considérablement depuis plus de 10 ans, leur développement reste encore limité principalement à cause de la complexité des structures des protéines et de la difficulté à les amplifier⁴⁴. Les applications des puces à protéines concernent à la fois la recherche fondamentale, avec le criblage de molécules ou d'activités biologiques (hormones, principes actifs, substrats, inhibiteurs, activités enzymatiques, biomarqueurs), et la recherche appliquée, avec le développement d'outils pour le diagnostic ou le suivi thérapeutique^{45 46 47 48 49 50}.

La mise au point de puces à protéines efficaces nécessite de dépasser plusieurs verrous technologiques. Notamment, l'activité biologique des protéines est fortement

dépendante du procédé d'immobilisation à la surface de la puce. La chimie de surface joue donc un rôle primordial dans le maintien de la conformation et de l'orientation des protéines immobilisées. L'étude et l'optimisation de cette interface chimique, qui fait le lien entre le support solide et la biomolécule, représentent donc une part importante de mon travail de recherche. Un autre point clé est de disposer de méthodes de détection très sensibles permettant d'analyser des événements de reconnaissance biologique entre sonde immobilisée et cible à des concentrations extrêmement faibles ($< \text{nM}$). Dans mes travaux de recherche, j'ai principalement utilisé la détection par fluorescence, mais d'autres méthodes, avec ou sans marquage, sont en projet. Enfin, le choix du support solide n'est pas sans incidence sur les procédés d'immobilisation et de détection. De nombreux formats (plans, particuliers, micro-structurés) et types de support (silice, silicium, or, plastique, etc.) sont mis en œuvre et étudiés au laboratoire. Jusqu'à présent, je me suis principalement intéressée au support type lame de verre de microscope pour des raisons pratiques, mais je ne m'interdis pas de travailler sur d'autres supports à l'avenir.

II-1. Puces à peptides: Application au criblage d'épitopes

Les travaux présentés dans cette partie sont issus de la thèse de 3^{ème} cycle de Graziella El Khoury, financée par la région Rhône-Alpes (Thématiques prioritaires 2003-2005) que j'ai co-encadré. Ce projet a été soutenu par le CNRS (Programme protéomique et génie des protéines 2005-2007), et a été effectué en collaboration avec le Laboratoire de Biochimie Analytique et de Synthèse Bio-organique de l'Université Claude Bernard de Lyon, le Laboratoire de Chimie Organique et Organométallique de l'Université de Bordeaux I, le Laboratoire Environnement et Chimie Analytique de l'ESPCI, l'Etablissement Français du Sang de Lyon, et le Service d'Immunologie du Centre Hospitalier Lyon-Sud.

Dans la course à la compréhension des différents processus biologiques, physiologiques et pathologiques du vivant, l'approche génomique n'est pas suffisante. Aussi, l'analyse du protéome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines coexistant et interagissant chez un être vivant, est un enjeu majeur avec des retombées aussi bien dans le domaine de la santé (diagnostic, pharmaceutique), que pour la recherche en biologie. Cependant, le développement des puces à protéines est plus problématique que celui des puces à ADN, du fait de l'hétérogénéité et de la complexité des structures des protéines. Une alternative à l'étude des interactions entre protéines, ou entre protéines et d'autres biomolécules est d'utiliser des peptides. En effet, les activités de reconnaissance biologique, les activités biochimique et enzymatique des protéines sont gouvernées par des séquences peptidiques au sein de la structure des protéines. Les peptides étant constitués d'un nombre limité d'acides aminés (une dizaine), ils ne forment, en général, pas de structure tertiaire et ne sont donc pas sujet à la dénaturation. De plus, il est possible de les synthétiser chimiquement, de protéger certains groupements réactifs et donc de privilégier un site d'immobilisation. Les puces à peptides trouvent donc tout leur intérêt pour identifier rapidement des motifs biologiques actifs et pour étudier les activités cellulaires.

Notre objectif était donc d'explorer et de valider des méthodes de fabrication de puces à peptides, en s'appuyant sur les savoir-faire de l'équipe Chimie et Nanobiotechnologie de l'INL dans le domaine des puces à ADN. Il s'agissait d'établir un procédé de synthèse combinatoire et efficace de peptides fonctionnels directement sur la surface de la puce (synthèse *in situ*) en vue de sélectionner rapidement et à moindre coût, les peptides présentant des interactions avec le ligand

étudié. Le modèle biologique choisi pour cette étude était un peptide-épitope reconnu par des anticorps anti-histone H3 présents chez les malades atteints de lupus érythémateux systémique, une maladie auto-immune^{51 52}.

La synthèse chimique des peptides est basée sur des cycles de protection-déprotection bien connus et décrits, mais dont le rendement peut être assez faible. Le procédé de synthèse *in situ* d'oligonucléotides par microprojection développé pour l'élaboration de puces à ADN a été adapté au cas de la synthèse de peptides *in situ*^{53 54}. Afin d'éviter les réactions sur les chaînes latérales des acides aminés, celles-ci sont modifiées avec des groupements protecteurs (tBoc, Fmoc) qui doivent être spécifiquement éliminés avant les tests biologiques. L'élaboration de puces à peptides fonctionnelles a donc nécessité de contrôler:

- la robustesse de la chimie de surface du support solide face aux conditions extrêmement agressives de la synthèse peptidique
- la densité de peptides immobilisés ou synthétisés sur la puce

Dans un premier temps, nous avons utilisé un peptide de 16 mers, correspondant à la séquence peptidique épitope de l'histone H3 (GGIQLARRIRGERAGG), biotinylé et protégé sur ses chaînes latérales (au niveau des résidus glutamine Q, arginine R, glutamate E). Ce peptide a été immobilisé de façon covalente sur des lames de verre fonctionnalisées par des groupements $-NH_2$ (Fig. 17), selon des conditions établies dans une étude précédente⁵⁵.

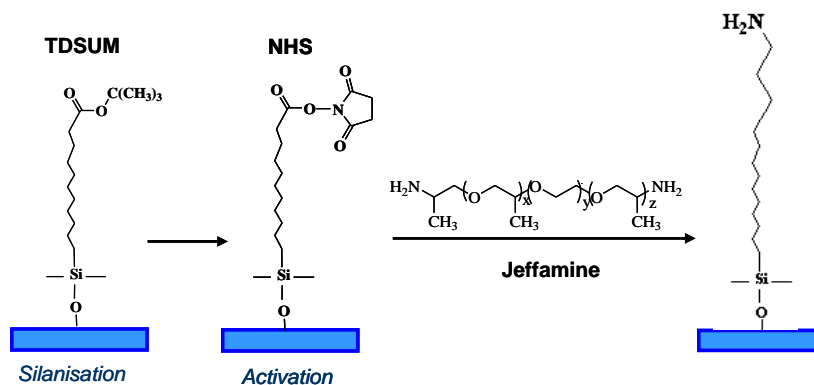


Figure 17 : Les étapes de la fonctionnalisation chimique des puces à peptides ; silanisation des lames de verre avec le TDSUM (Tert-butyl-11-(diméthylamino) silylundecanoate) ; après déprotection, activation avec le NHS (N-hydroxysuccinimide) ; substitution par la jeffamine D-230.

Nous avons alors montré que les procédures de déprotection acide des peptides n'altéraient pas la stabilité de la chimie de surface et n'entraînaient pas le clivage des peptides immobilisés sur la surface. Nous avons également vérifié la qualité de la déprotection vis-à-vis de la restauration de l'activité biologique du peptide⁵⁶. En effet, le peptide protégé n'est pas reconnu par les anticorps anti-histone H3 contrairement au peptide déprotégé (Fig. 18).

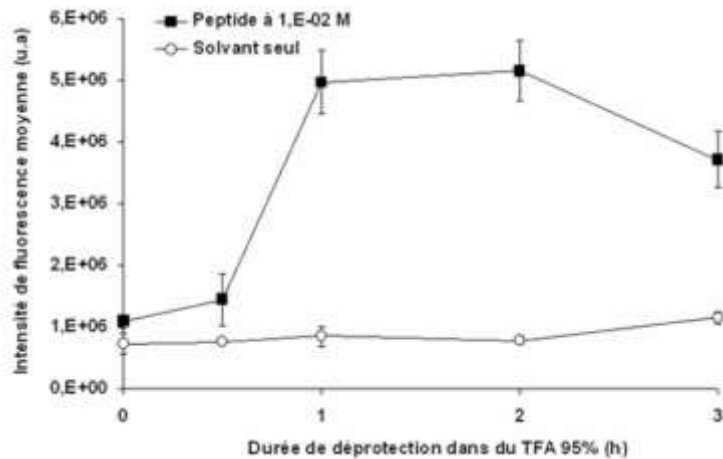


Figure 18 : Reconnaissance biologique entre les anticorps anti-histone H3 et le peptide immobilisé sur la surface aminée, avant et après déprotection acide (révélation par un anticorps secondaire IgG-Cy3).

Le même peptide de 16 mers biotinylé et protégé a ensuite été synthétisé par la chimie des Fmoc, directement sur la surface aminée. 17 cycles d'activation-déprotection ont été réalisés sur la puce. A l'issue de cette synthèse, le peptide a été déprotégé et évalué pour son activité biologique. Bien que la densité de peptides obtenue par synthèse *in situ* soit faible, les peptides sont fonctionnels avec une activité biologique similaire à celle des peptides immobilisés par voie *ex situ*⁵⁷ (Fig. 19). Le rendement de synthèse *in situ* reste donc à optimiser.

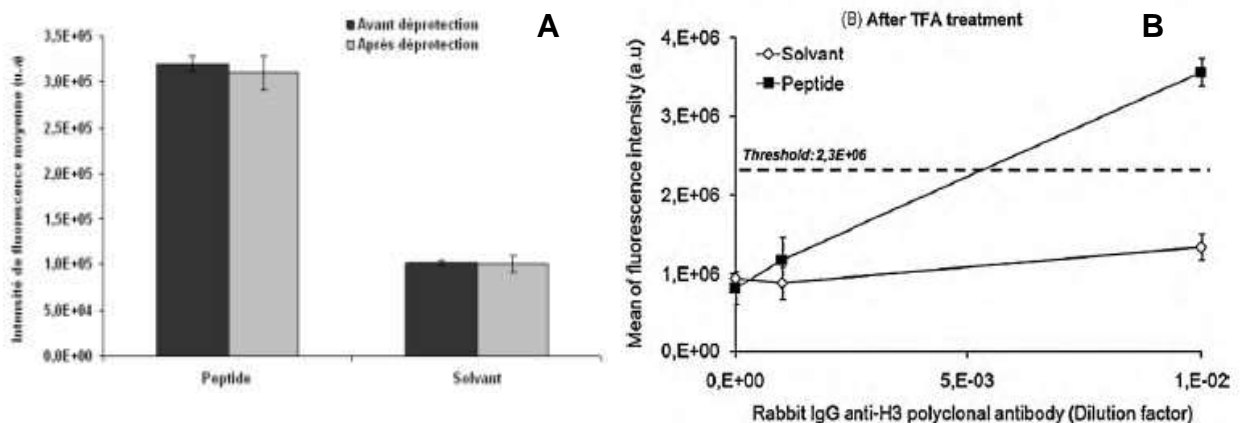


Figure 19 : Caractérisation du peptide synthétisé *in situ*. A : densité de peptide avant et après déprotection acide finale détectée par Sav-Cy3 ; B : Activité biologique du peptide déprotégé (reconnaissance des anticorps anti-histone H3 et révélation par anticorps secondaire IgG-Cy3).

L'approche « puces à peptides » constitue donc une alternative simple et efficace aux puces à protéines pour l'étude des interactions protéine-protéine. Cependant, pour des applications en diagnostic, pronostic, ou suivi thérapeutique, l'analyse des protéines dans leur globalité est indispensable.

L'ensemble de ces travaux a donné lieu à la publication de 2 articles et 2 communications orales lors de congrès internationaux.

II-2. Puces à protéines pour des applications diagnostiques

L'efficacité de l'immobilisation des protéines sur des supports, et donc leur activité biologique dépendent de nombreux paramètres qui influencent la qualité du dépôt et la qualité des résultats obtenus. Parmi eux, on peut citer :

- la chimie de surface
- la composition de la solution tampon de dépôt (pH, ions)
- le séchage
- la température
- la procédure de blocage des sites non spécifiques
- la nature et la concentration de la protéine

Parmi les chimies de surfaces développées pour l'élaboration de puces à protéines, on trouve des surfaces époxyde, isothiocyanate, N-hydroxysuccinimide (NHS) ester, aminées, semicarbazide, ou encore aldéhyde^{58 59 60 61}. Ces fonctions chimiques sont souvent introduites par silanisation d'un support solide en verre, type lame de microscope. Certaines d'entre-elles sont disponibles commercialement, mais des études ont montré qu'il y a une grande variabilité dans les résultats selon la chimie de surface utilisée. Les propriétés de surface influencent non seulement l'activité biologique des molécules immobilisées et la qualité des données produites, mais également la taille et la morphologie des spots, le bruit de fond, la limite de détection et la reproductibilité⁶².

Dans ce contexte, j'ai abordé deux aspects principaux pour la mise en œuvre de puces à protéines :

- un aspect fondamental avec l'étude de l'influence de la chimie de surface sur l'activité biologique de la protéine immobilisée
- un aspect appliqué à une question d'intérêt biologique avec le développement de tests de diagnostic.

Je me suis donc attachée à développer des chimies de surface contrôlées, stables et bien caractérisées qui permettent l'immobilisation des protéines sur support de verre. J'ai alors étudié l'effet des différents paramètres cités plus haut et leurs relations avec l'activité biologique des protéines immobilisées. Un des principaux objectifs est de pouvoir choisir *a priori*, la chimie de surface en fonction des propriétés physico-chimiques de la protéine pour conserver un maximum de son activité biologique. Dans la suite de ce rapport, je présenterai donc les différentes chimies de surface que j'ai développées ainsi que leurs utilisations pour l'immobilisation de protéines. Les résultats seront illustrés par des exemples d'applications dans le domaine du diagnostic.

II-2.a Chimies de surface et protéines : Mise en œuvre, caractérisation et interactions

Les travaux présentés dans cette partie sont issus de la thèse de doctorat de 3^{ème} cycle de Zhugen Yang (financement China Scholarship Council) que j'ai co-encadré.

Le support solide choisi pour l'élaboration des puces est une lame de verre de microscope standard permettant ensuite la détection des interactions biologiques de manière la plus « classique » à l'aide de marqueurs fluorescents et d'un scanner de fluorescence. La chimie des silanes, bien maîtrisée au laboratoire, permet d'obtenir une monocouche homogène (environ 10^{14} molécules/cm²) sur ce type de support.

Deux types de silane monofonctionnel ayant des longueurs de chaînes et des groupements chimiques différents ont été substitués sur les lames de verre :

- tert-butyl-11-(diméthylamino) silylundecanoate (TDSUM), qui une fois déprotégé, est porteur d'un groupement terminal –COOH qui peut ensuite être activé par une fonction NHS (Fig. 20A)
- (3-aminopropyl) diméthyléthoxysilane (APDMES) est porteur d'un groupement terminal –NH₂ (Fig. 20B)

De nombreuses études ont montré que l'activité biologique des protéines immobilisées était préservée lorsque celles-ci étaient suffisamment éloignées de la surface solide et disposaient d'un espace stérique suffisant permettant un bon degré de liberté^{63 64 65}. J'ai donc greffé sur les lames de verre silanisées, des polymères de nature et de tailles différentes permettant de moduler le nombre de groupements fonctionnels et la surface spécifique accessible aux protéines.

- Un polymère AMMVE (M_w = 216 000 g/mol) est substitué sur les surfaces APDMES (Fig. 20B) ou TDSUM-Jeffamine (Fig. 20A), par liaison covalente.
- Un polymère carboxyméthyl dextran (CMD, M_w = 40 000 g/mol) - synthétisé au laboratoire à partir de dextran, un biopolymère – est substitué sur les surfaces APDMES, par liaison covalente après activation des groupements –COOH du CMD par le NHS (Fig. 20B).
- Un polymère de chitosan (M_w = 470 000 g/mol) - un biopolymère fourni par le Pr. Thierry Delair – est substitué sur les surfaces NHS (Fig. 20A) par liaison covalente.

Différentes techniques telles que XPS, ATR-FTIR, Tof-SIMS, mesure d'angle de contact, dosage colorimétrique des fonctions amine^{66 67}, ont permis de caractériser les chimies de surfaces élaborées. Les principaux résultats montrent que la silanisation des lames de verre par le TDSUM ou l'APDMES est comparable, et reproductible. Le greffage de la Jeffamine sur les lames NHS s'effectue par liaison covalente alors que le chitosan est principalement physisorbé. Enfin, le greffage du MAMVE et du CMD sur les lames APDMES s'effectue par liaison covalente, mais la couche de MAMVE est plus épaisse que celle de CMD.

Puis l'immobilisation de trois protéines modèles ayant des caractéristiques physico-chimiques différentes (Tableau 1), a été étudiée sur ces différentes chimies de surface.

Protéine	M _w (g/mol)	Degré de marquage	Point Isoélectrique (pI)
IgG-Cy3	150000	2.6	n.d.
Streptavidine-Cy3	52800	3-9	6.1
Myoglobine-Cy3	17083	2.2	7.29

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des protéines marquées à la Cyanine 3 (Cy3) ou à l'Alexa Fluor 647 (F647). IgG : immunoglobuline G.

L'influence de paramètres tels que la concentration en protéine, la composition et le pH de la solution tampon de dépôt, la température, a été étudiée sur l'efficacité de l'immobilisation des protéines. En effet, la charge de la protéine et celle de la surface vont influencer et conditionner les interactions à l'interface liquide-solide. Les surfaces multicouches fonctionnalisées avec des polymères permettent d'obtenir des densités de protéines plus importantes que les surfaces monocouches,

fonctionnalisées avec les silanes seuls. Il semble donc que le caractère plus hydrophile des polymères associé à une grande surface spécifique favorise l'immobilisation des protéines.

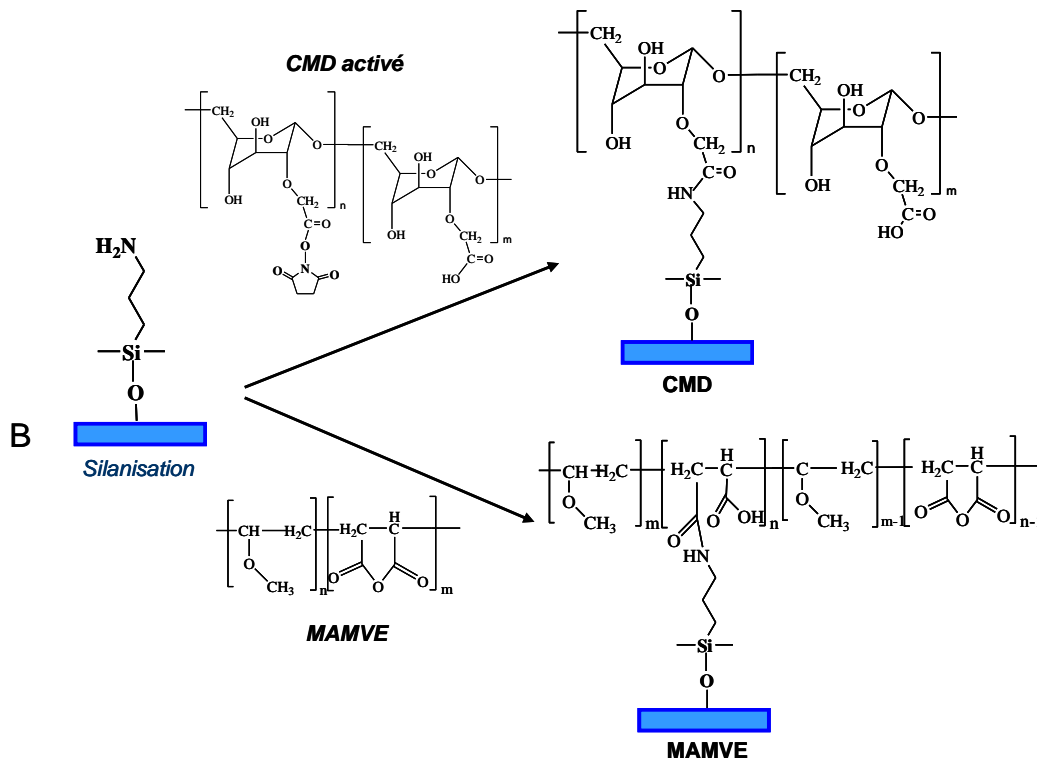
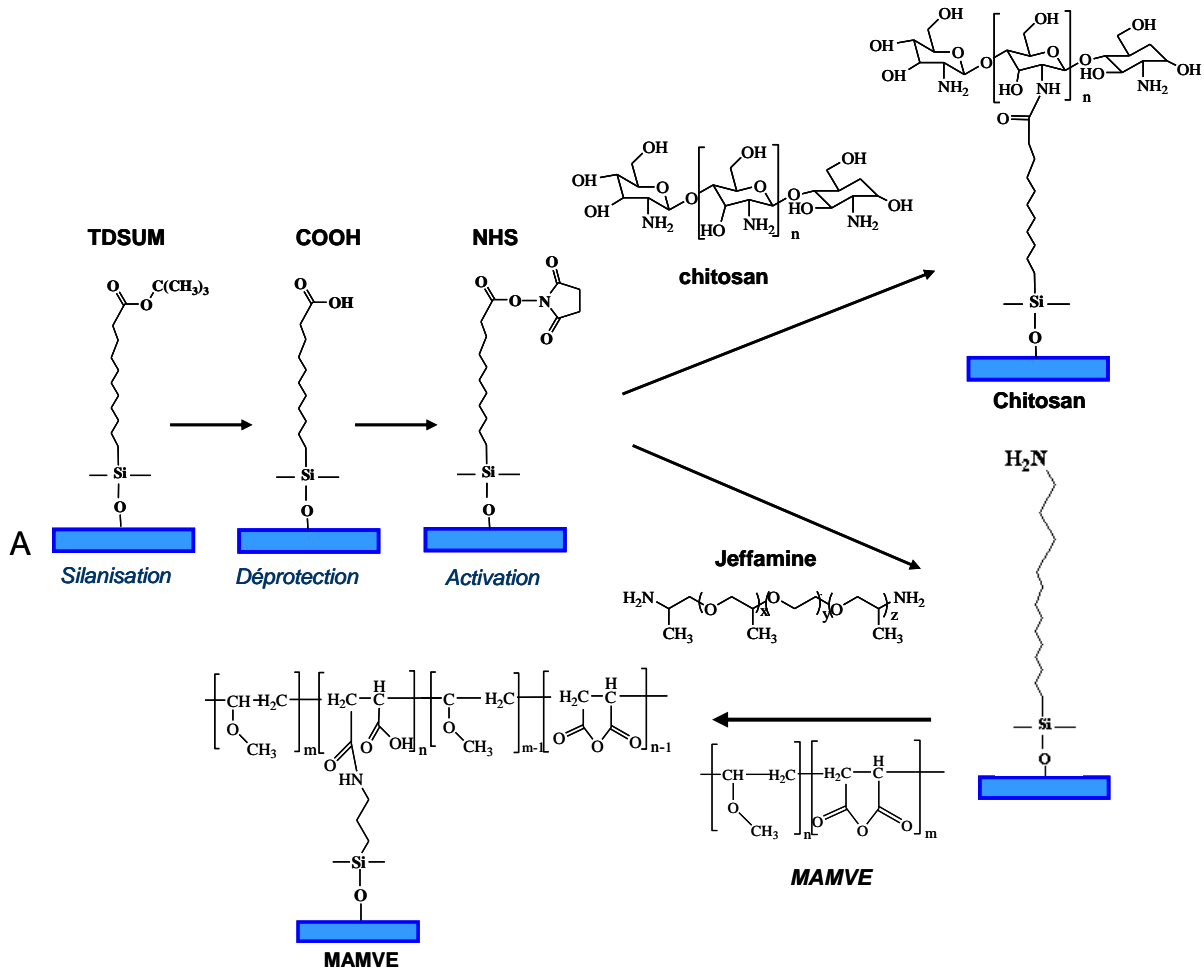


Figure 20 : Les étapes de la fonctionnalisation chimique des puces à protéines ; A : à partir des lames de verre silanisées avec le TDSUM ; B : à partir des lames de verre silanisées avec l'APDMES.

Il apparait clairement que le profil d'immobilisation d'une protéine donnée dépend de la chimie de surface et de la solution tampon de dépôt utilisée (Fig. 21). De plus, ces profils varient d'une protéine à une autre^{68 69}.

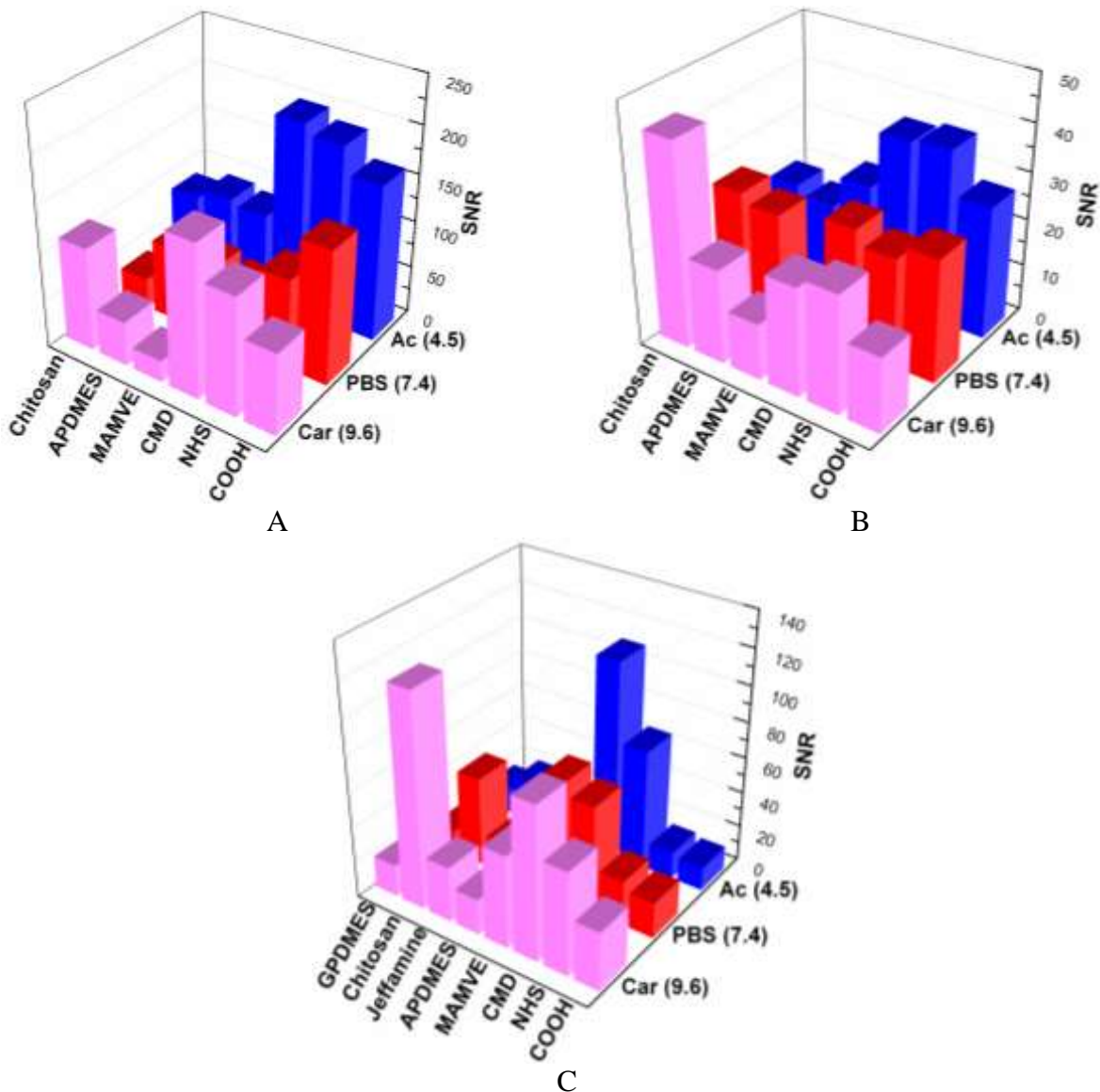


Figure 21 : Immobilisation de la myoglobine-Cy3 (A), la streptavidine-Cy3 (B) et de l'IgG-Cy3 (C) sur les différentes chimies de surface en fonction de la solution tampon de dépôt utilisées : Acétate de sodium pH 4.5 (Ac 4.5), PBS 1X pH 7.4 (PBS 7.4), carbonate de sodium pH 9.6 (Car 9.6).

L'immobilisation de la myoglobine et de la streptavidine est optimale :

- sur les surfaces COOH, NHS, CMD et MAMVE à pH acide
- sur la surface chitosan à pH basique
- sur la surface APDMES à pH physiologique.

En revanche, l'IgG s'immobilise de façon préférentielle à pH basique sur toutes les surfaces sauf sur la surface MAMVE pour laquelle un pH acide semble nécessaire. Différents types d'interactions sont donc mis en jeu au cours de l'immobilisation des

protéines sur ces surfaces fonctionnalisées. Les interactions électrostatiques jouent un rôle important aussi bien pour le greffage covalent que pour l'adsorption des protéines. Dans ce dernier cas, les forces de Van der Waals semblent être majoritaires pour les surfaces avec une énergie dispersive élevée (APDMES, COOH), et les liaisons hydrogènes pour les surfaces avec une énergie polaire élevée (chitosan).

Il nous est alors possible de prévoir les conditions permettant d'obtenir les meilleurs taux de greffage covalent ou d'adsorption selon les caractéristiques physico-chimiques des protéines et des surfaces. Toutefois, cela n'implique pas que l'activité biologique soit conservée ou optimale dans ces conditions. Il est donc nécessaire de coupler ces résultats à ceux des tests biologiques pour pouvoir conclure.

Cette étude a donné lieu à la publication de 2 articles (Annexe 4) et 1 communication orale lors d'un congrès international.

II-2.b Adressage électrochimique de protéines recombinantes : Application au diagnostic du VIH-1

Ce travail a été réalisé lors de mon séjour en délégation CNRS dans l'unité mixte CNRS-bioMérieux (ENS-Lyon) en collaboration avec le Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire (UMR 5013 CNRS-Université Lyon 1).

Initialement développées pour les biocapteurs, les techniques d'immobilisation basées sur l'adressage électrochimique constituent un champ exploratoire important pour les biopuces^{70 71}. Dans ce projet, les électrodes ont été produites par sérigraphie. L'objectif était de proposer un procédé de fabrication simple pour le développement de tests sérologiques pour le diagnostic du VIH-1.

La protéine p24 de capsid du VIH-1 a été électro-déposée (1mC/cm²) à la surface des électrodes au moyen d'un film de polypyrrole (environ 4 nm d'épaisseur), un polymère électroactif, selon différentes constructions (Fig. 22) :

- un conjugué RH24K-pyrrole, comportant en moyenne 4 pyrroles substitués par molécule RH24K (protéine recombinante p24 portant un tag 6-lysines à l'extrémité C-terminale) (Fig. 22A)
- un conjugué RH24K-copolymère (AMMVE-pyrrole), comportant 17 molécules RH24K immobilisées par chaîne de copolymère (Fig. 22B)
- un conjugué RH24K-AMMVE piégé dans un film de polypyrrole (Fig. 22C).

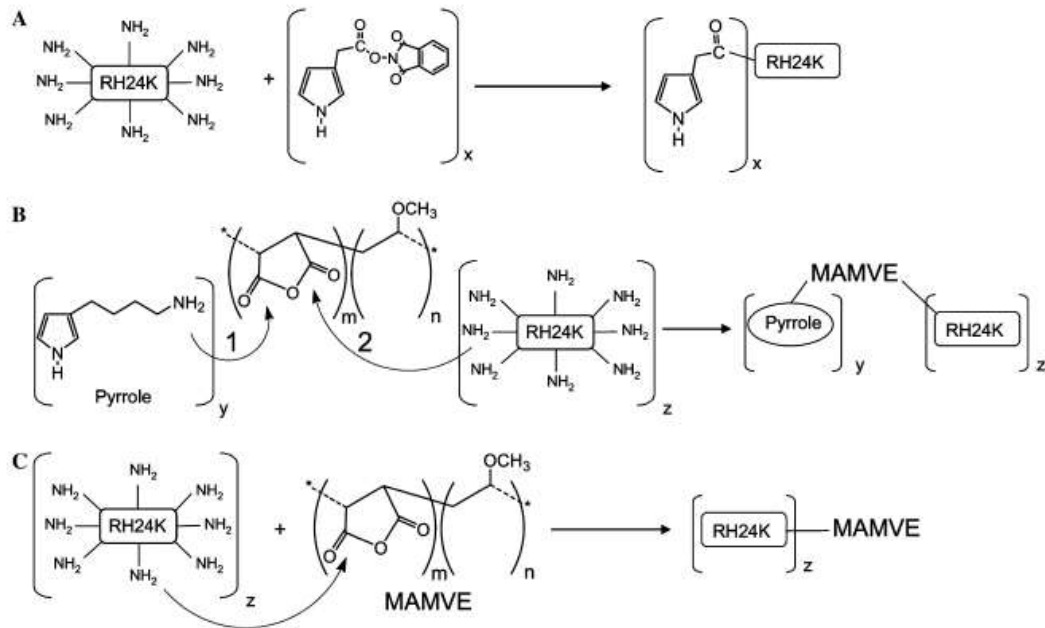


Figure 22 : Représentation des différentes constructions de conjugués pour l'électrodéposition de la protéine p24 de capsid du VIH-1 à la surface d'électrodes sérigraphiées. A : conjugué RH24K-pyrrole ; B : conjugué RH24K-AMMVE-pyrrole ; C : conjugué RH24K-AMMVE (extrait de ⁷²).

Les biopuces obtenues avec ces différentes constructions ont été caractérisées pour leur capacité à reconnaître des anticorps anti-p24 (monoclonaux, polyclonaux, serum VIH+). Les résultats indiquent que les biopuces réalisées avec les bioconjugués contenant le polymère AMMVE (RH24K-AMMVE-pyrrole et RH24K-AMMVE) présentent une meilleure limite de détection (d'un facteur 2 à 10) que celles réalisées sans polymère (RH24K et RH24K-pyrrole) (Tableau 2). La présence du polymère améliore l'activité biologique des protéines immobilisées, probablement en jouant le rôle de bras espaceur et en permettant ainsi de conserver l'accessibilité de l'antigène p24 aux anticorps anti-p24 ⁷². Toutefois, la présence du pyrrole dans les bioconjugués entraîne une diminution de la sensibilité de détection d'un facteur 2 à 5 par rapport aux conjugués sans pyrrole (RH24K et RH24K-AMMVE). La couche bioactive des biopuces étant obtenue par électropolymérisation dans un film de polypyrrole, la présence du pyrrole dans les bioconjugués provoque sans doute des contraintes moléculaires au niveau de la protéine immobilisée, conduisant à différentes orientations de la protéine dans la couche bioactive.

Bioconjugate concentration	RH24K (10 µg/ml)	RH24K-pyrrole (R' = 8, 10 µg/ml)	RH24K-MAMVE-pyrrole (10 µg/ml)	RH24K-MAMVE (10 µg/ml)	RH24K-MAMVE (1.3 µg/ml)	RH24K-MAMVE (2.6 µg/ml)	RH24K-MAMVE (20 µg/ml)
Titration detection	1/500	1/200	1/1000	1/5000	1/500	1/1000	1/5000

Tableau 2 : sensibilité de détection des bioconjugués après dépôt par électropolymérisation (extrait de ⁷²).

Ce travail a donné lieu à la publication d'un article (Annexe 5).

Au travers de cette étude, il ressort que l'amélioration des performances des puces à protéines passe par le contrôle de l'orientation des protéines immobilisées afin de permettre une bonne présentation des sites biologiquement actifs. Le plus simple est de disposer de protéines recombinantes et donc de pouvoir diriger l'immobilisation en un point précis de la protéine (le plus loin possible du site actif).

Mais, il n'est pas toujours possible de produire n'importe quelle protéine recombinante, ou parfois la production de masse pour des applications diagnostiques peut s'avérer compliquée et coûteuse. De plus, selon l'organisme utilisé pour produire les protéines recombinantes, leur réactivité biologique peut être différente de la protéine native. Dans le cas de l'étude d'interactions antigènes-anticorps, cette différence de réactivité peut avoir des conséquences dramatiques pour le diagnostic de maladies. Il faut donc avoir recours à des protéines natives, extraites et purifiées de tissus ou de fluides biologiques.

Considérant la grande variabilité des protéines, autant dans leur constitution (nombre et séquence en acides aminés) que dans leurs structures (secondaire, tertiaire, quaternaire), je me suis intéressée à deux grandes classes de puces à protéines :

- les puces à antigènes dont la vocation est de détecter des anticorps
- les puces à anticorps dont la vocation est de détecter des antigènes

L'avantage des anticorps est qu'ils possèdent tous une structure comparable avec des domaines très conservés, la partie variable étant le site de l'interaction avec l'antigène (Fig. 12).

Un des challenges des recherches présentées ci-après a donc été de déterminer les meilleures conditions d'immobilisation des antigènes ou des anticorps sur les lames de verre fonctionnalisées, afin de conserver un maximum d'activité biologique pour élaborer des outils de diagnostic miniaturisés plus performants que les outils classiques comme l'ELISA.

II-2.c Puces à antigènes pour la détection d'auto-anticorps

Les travaux présentés dans cette partie sont issus des thèses de doctorat de 3^{ème} cycle de Graziella El Khoury et de Zhugen Yang.

De façon assez simplifiée et schématique, le corps humain produit des anticorps lorsqu'il est agressé par un corps étranger (virus, bactérie, parasite, etc.), ce qui lui permet de se défendre et de neutraliser « l'agresseur ». Dans certains cas, le corps humain produit des anticorps contre ses propres constituants en réponse à des dérèglements cellulaires et physiologiques. On parle alors d'auto-anticorps. Ainsi, le taux d'auto-anticorps dirigés contre des constituants nucléaires (ADN, protéines histones, ribonucléoprotéines) est particulièrement important chez des patients atteints de maladies auto-immunes comme le Lupus Erythémateux Systémique (LES) ⁵² ou la polyarthrite rhumatoïde ⁷³. Chez les patients atteints de cancers on retrouve également des auto-anticorps dirigés contre des protéines cellulaires mutées, tronquées, mal conformées ou surexprimées par le processus carcinologique ou le stress qu'il induit ⁷⁴. Les puces à antigènes sont donc un outil performant pour le criblage et la validation des biomarqueurs associés à ces pathologies.

II-2.c1 Puces à protéines histone : Application au diagnostic du LES

Dans cette étude, nous avons choisi 2 protéines histone, H1 et H3, comme modèles pour l'élaboration des puces. En effet, des auto-anticorps anti-histone sont fréquemment détectés dans le sérum de patients atteints de Lupus Erythémateux Systémique (LES).

Ces protéines histone ont été immobilisées sur 2 types de surfaces, les lames NHS et les lames AMMVE, permettant une immobilisation covalente des protéines. Les

performances de ces puces pour la détection d'anticorps anti-histone commerciaux (Fig. 23) ont été comparées à celles d'un test ELISA classique. En effet, l'ELISA est le format le plus utilisé en test diagnostique car il bénéficie d'une très bonne reproductibilité (CV = 5-20%), sensibilité (3 log) et limite de détection (~ 1 pg/ml). Les résultats sont reportés dans le tableau 3.

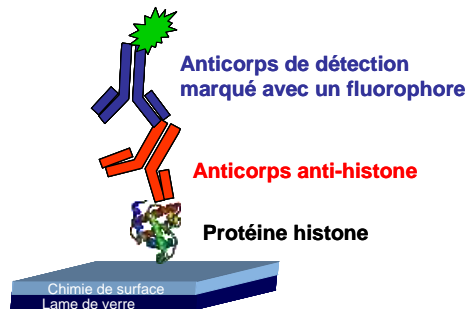


Figure 23 : Représentation schématique de la détection d'anticorps anti-histone sur puce à protéines histone.

	Analyte consumption/ test point	Mole of probe deposited/ test point	Repeatability (% CV intraassay)	Reproducibility (% CV interassay)	LOD (antibody dilution factor)	Dynamic range	Sensitivity
Polystyrene (ELISA microplate wells)	100 µl/well	7×10^{-11}	7.3 ± 0.6	10 ± 2	10^{-6}	2.0-2.5 log	0.5
NHS esters (glass slides)	1 µl/spot	7×10^{-11}	9.7 ± 0.9	12 ± 1	3×10^{-6}	2.5 log	0.4
MAMVE (glass slides)	1 µl/spot	7×10^{-11}	9.4 ± 2.6	11 ± 2	2×10^{-8}	2.0 log	0.3

Tableau 3 : Performances analytiques de l'ELISA et de 2 types de puces à protéines histone pour la détection d'anticorps anti-histone H3 (extrait de ⁵⁷).

Bien que l'ELISA présente une meilleure répétabilité, nos puces à protéines histones ont des valeurs comparables à celles décrites dans la littérature pour les puces à antigènes ⁷⁵. En termes de limite de détection (LOD), les puces fonctionnalisées avec l'AMMVE sont 50 fois meilleures que l'ELISA et 150 fois meilleures que les puces fonctionnalisées avec le NHS. Enfin, la sensibilité est du même ordre de grandeur pour les 3 tests. La fonctionnalisation des lames de verre avec le polymère AMMVE permet donc d'augmenter significativement les performances du test, surtout en termes de limite de détection. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment avec la protéine p24 immobilisée sur AMMVE ⁴². Le polymère AMMVE peut donc être appliqué à des systèmes miniaturisés.

La puce à protéines histone H1 et H3 immobilisées sur AMMVE a alors été évaluée pour la détection des auto-anticorps anti-histone H1 et anti-histone H3 présents dans le sérum de patients atteints de LES. Pour cette première preuve de concept en milieu biologique complexe, 8 sera de patients atteints de LES (notés P1 à P8) et 6 sera de donneurs sains (permettant de calculer le seuil de positivité : ratio=1) ont été analysés sur la puce à protéines histone ainsi qu'en ELISA et western-blot (WB), comme tests de référence. Les résultats sont présentés sur la Fig. 24. Ils montrent que, même en milieu complexe, la puce à protéines histone permet d'améliorer la limite de détection des auto-anticorps anti-histone H1 (sera P4 et P5) et anti-histone H3 (sera P1, P4 et P5) par rapport au test ELISA. La présence de ces auto-anticorps dans les sera est confirmée par le western-blot, connu pour être plus sensible que l'ELISA ^{76 77}. Toutefois, certains sera présentent une valeur de positivité plus élevée en ELISA que sur puce: P2 et P6 pour les anticorps anti-histone H3, et P8 pour les anticorps anti-histone H1 et H3. Il est probable que ces sera contiennent des taux d'auto-anticorps élevés. L'ELISA ayant une gamme dynamique plus importante que la puce (cf Tableau 3), cette technique permet une

meilleure discrimination des sera ayant des taux élevés en auto-anticorps. Enfin, seul le sérum P3 est positif pour les auto-anticorps anti-histone H3 sur puce, alors qu'il est négatif avec les 2 autres méthodes de référence. Ce résultat met en avant la complexité des échantillons biologiques, les limites des techniques de dosage, et la nécessité de cribler un grand nombre d'échantillons pour obtenir un résultat fiable.

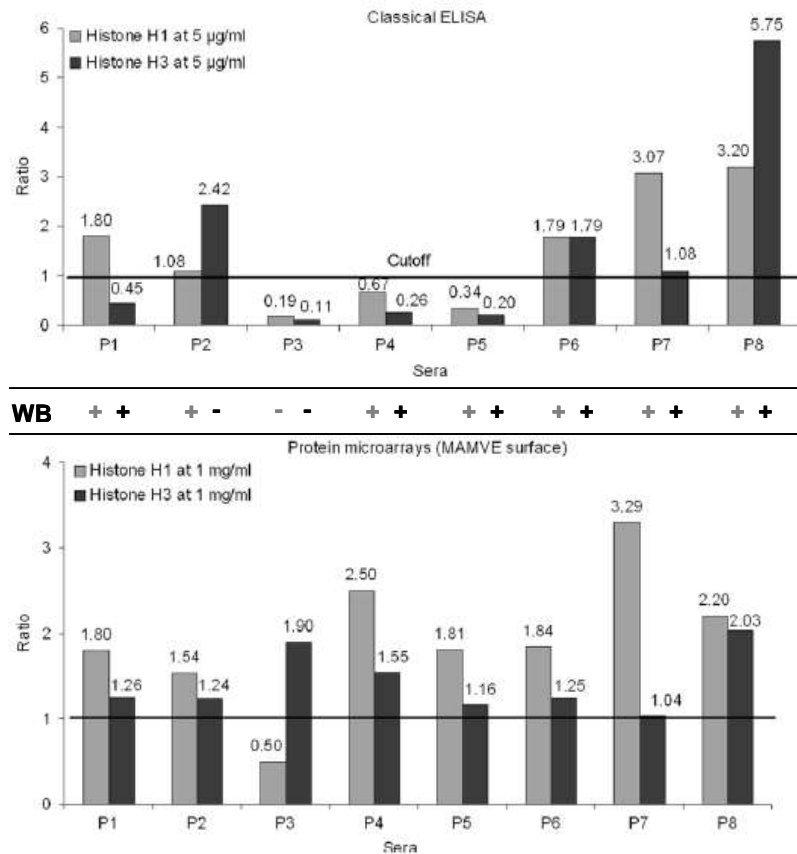


Figure 24 : Détection des auto-anticorps anti-histone H1 et H3 présents dans le serum de 8 patients atteints de LES (P1 à P8). Comparaison entre la technique ELISA, le western-blot (WB) et la puce à protéines histone (surface AMMVE). La valeur Ratio représente le ratio entre la valeur du serum et la valeur de référence (ratio=1) obtenue avec les sera de donneurs sains (extrait de ⁵⁷).

Cette étude a permis de démontrer l'intérêt des puces à antigènes pour la détection d'auto-anticorps. Il ressort clairement que la chimie de surface permettant l'immobilisation des protéines est un point clé dans la mise en œuvre d'outils de diagnostic fiable et sensible. Un des intérêts majeurs des biopuces étant la possibilité de cribler en parallèle en grand nombre de biomarqueurs avec un minimum d'échantillon biologique, l'étape suivante a donc consisté à augmenter le nombre d'antigènes immobilisés ainsi que le nombre d'échantillons biologiques testés.

Ce travail a donné lieu à la publication d'un article (Annexe 6) et 3 communications orales lors de congrès internationaux.

II-2.c2 Puces à antigènes tumoraux : Application au diagnostic du cancer du sein

Les travaux présentés dans cette partie ont été réalisés en collaboration avec le Laboratoire de Biologie Cellulaire du CHU de Montpellier.

De nombreuses études montrent que le sérum de patients atteints de certains cancers contient des auto-anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux, ou « *tumor-associated antigen* » (TAA)^{78 74 79 80}. Leur délivrance, persistance et stabilité dans le sérum des patients cancéreux sont un avantage par rapport aux autres marqueurs potentiels qui sont sécrétés par les tumeurs mais qui sont rapidement dégradés ou éliminés. Les développements récents des outils de protéomique comme le SEREX (*serological identification of antigens by recombinant expression cloning*) et le SERPA (*serological proteome analysis*) ont permis d'identifier un grand nombre de TAA et d'auto-anticorps correspondants^{81 82 83 84 85} dont l'intérêt clinique reste à évaluer. La détection d'auto-anticorps dirigés contre un seul TAA a peu de valeur diagnostique du fait de leur faible fréquence (10% à 20-30%) et de l'hétérogénéité des tumeurs. Par contre une détection multiplexe permet d'augmenter significativement la sensibilité et la spécificité de la détection^{86 87 88}. Des outils de criblage comme les puces à protéines répondent parfaitement à ce besoin.

L'objectif de cette étude était double : d'une part identifier des combinaisons de TAA pertinentes pour le diagnostic du cancer du sein, et d'autre part évaluer le gain obtenu par la détection multiplexe. Nous avons sélectionné 10 antigènes dont :

- 4 antigènes associés aux tumeurs bien connus : p53, CEA, HER2, NY-ESO-1
- 2 protéines de stress cellulaire : Hsp60, Hsp70
- 4 nouveaux biomarqueurs potentiels: MYCL1, CHEK2, HNRNPK, NME1

Grâce à l'utilisation de supports microstructurés (Fig. 25) nous avons pu définir rapidement les conditions optimales d'immobilisation de chacun de ces antigènes (chimie de surface, concentration, tampon de dépôt) pour conserver leur activité de reconnaissance vis-à-vis de leurs anticorps spécifiques.

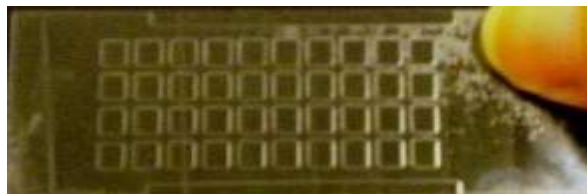


Figure 25 : Lame de verre microstructurée (40 micro-puits de 250 nl chacun) permettant le dépôt d'environ 100 sondes (protéines) dans chaque micro-puits.

La présence d'auto-anticorps dirigés contre les 10 antigènes immobilisés a été évaluée dans 29 sera de patientes atteintes du cancer du sein et dans 28 sera de donneurs sains (permettant d'établir la limite de positivité, ou *cut-off* = moyenne des donneurs sains + 3*SD). Ces sera ont été sélectionnés par le CHU de Montpellier de façon à être représentatifs d'un panel de patientes et d'individus sains. Parmi les 10 antigènes testés, 5 ont donné des résultats exploitables : p53, HER2, NY-ESO-1, Hsp60, Hsp70. Des problèmes de conservation et/ou de production non conforme ont été soupçonnés pour les autres antigènes. Un exemple de réponse obtenue pour l'antigène Hsp60 immobilisé sur la surface NHS est présenté sur la Fig. 26. Aussi bien pour les sera de donneurs sains que pour les sera de patientes atteintes du cancer du sein, le taux d'auto-anticorps anti-Hsp60 est très variable d'un échantillon

à l'autre, et d'une chimie de surface à une autre. Parmi les séras de cancer du sein, certains sont très positifs pour les anti-Hsp60 et d'autres négatifs. La détection d'auto-anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux dans chaque sérum de cancer du sein est donc fortement dépendante de l'auto-anticorps recherché et de la chimie de surface d'immobilisation de l'antigène ⁸⁹.

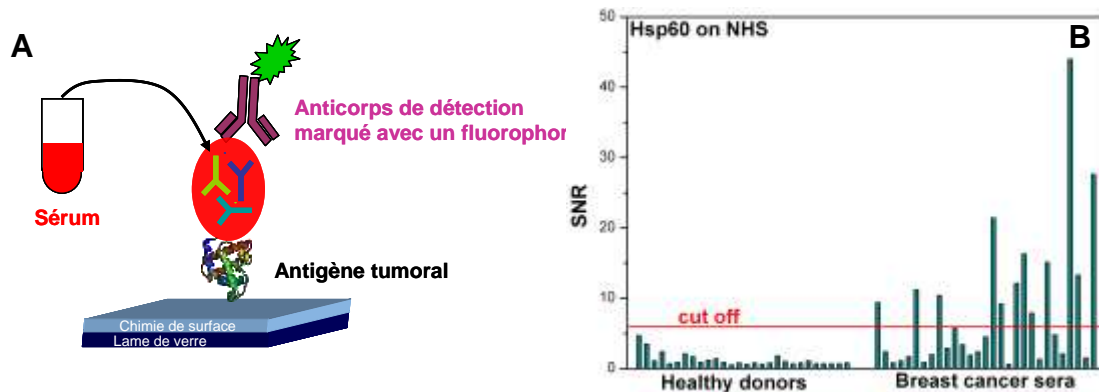


Figure 26 : Représentation schématique du test des séras sur les puces à antigènes tumoraux (A), et réponse des séras de patientes atteintes du cancer du sein et des séras de donneurs sains vis-à-vis de la présence d'auto-anticorps anti-Hsp60 (B) détectés sur lames fonctionnalisées NHS.

Ainsi, en sélectionnant la meilleure chimie de surface pour chacun des antigènes tumoraux étudiés et en réalisant une détection multiplexée des 5 auto-anticorps, nous passons de 41% des séras de cancer du sein identifiés avec 1 seul marqueur (Hsp60), à plus de 82% avec 5 marqueurs détectés simultanément (Tableau 4).

Antigènes tumoraux (chimie de surface)	% de séras de cancer du sein détectés
Hsp60 (NHS)	41.4
Hsp60 (NHS) + p53 (APDMES)	62
Hsp60 (NHS) + p53 (APDMES) + He2-Fc (NHS)	68.9
Hsp60 (NHS) + p53 (APDMES) + He2-Fc (NHS) + NY-ESO-1 (NHS)	75.8
Hsp60 (NHS) + p53 (APDMES) + He2-Fc (NHS) + NY-ESO-1 (NHS) + Hsp 70 (NHS)	82.7

Tableau 4 : Identification des séras de cancer du sein selon le nombre de marqueurs tumoraux détectés dans des conditions optimales (extrait de ⁸⁹).

Ce travail sur puces microstructurées montre l'intérêt du multiplexage et la pertinence de rechercher un ensemble de biomarqueurs pour fiabiliser le diagnostic. De plus, le format de puces par micropuits permet d'optimiser rapidement les conditions d'immobilisation et de reconnaissance.

L'ensemble de ces résultats a donné lieu à la publication d'un article (Annexe 7), à 2 communications orales lors de congrès internationaux, et 1 communication orale lors d'un congrès national.

II-2.d Puces à anticorps pour le criblage de biomarqueurs

Les travaux présentés dans cette partie sont issus de la thèse de doctorat de 3^{ème} cycle de Zhugen Yang que j'ai co-encadrée, et en collaboration avec bioMérieux et le Laboratoire d'immunologie du CHU de Saint-Etienne.

Les puces à anticorps jouent un rôle important dans l'analyse de solutions biologiques complexes et la détection d'analytes en faible concentration. En effet, la forte spécificité des interactions entre l'anticorps et la molécule cible en font un outil de choix pour le criblage et la détection sensible de biomarqueurs du cancer colorectal (CRC). En effet, malgré le nombre important de biomarqueurs tumoraux découverts, aucun n'est suffisamment sensible et spécifique pour permettre un diagnostic précis et précoce de la maladie. La combinaison de plusieurs marqueurs tumoraux est indispensable pour augmenter la sensibilité et la spécificité du diagnostic⁹⁰.

5 marqueurs tumoraux ont été choisis pour leur implication dans le CRC en particulier, ou le cancer en général:

- CEA (Carcino Embryonic Antigen) dont des taux élevés sont corrélés à la progression du CRC⁹¹
- CA 19-9 (Carbohydate Antigen) est le second marqueur de tumeur gastro-intestinale le plus recherché⁹²
- Hsp60 (Heat Shock Protein) est un marqueur du stress cellulaire
- PDI et DEFA6 sont 2 marqueurs tumoraux impliqués dans le CRC et récemment découverts par bioMérieux, avec qui nous collaborons sur ce sujet.

Dans un premier temps, l'objectif était, pour chaque biomarqueur:

- d'établir les conditions optimales d'immobilisation de l'anticorps de capture (concentration, chimie de surface, tampon de dépôt)
- de définir la limite de détection (LOD) et la gamme dynamique permettant un dosage sensible du biomarqueur dans les conditions optimales

Le principe de l'analyse et un exemple des résultats obtenus pour le CEA sont présentés sur la Fig. 27.

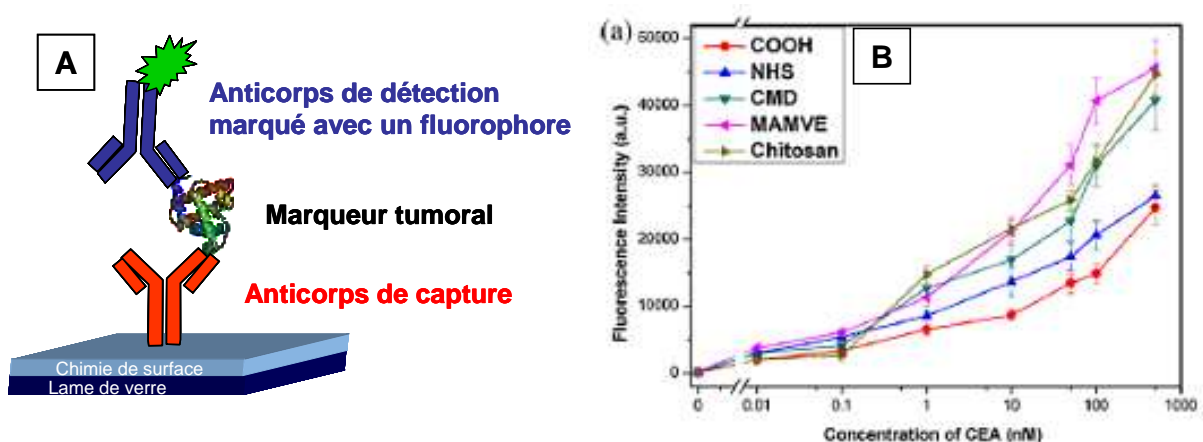


Figure 27 : Représentation schématique de l'immunoessai sur les puces à anticorps (A), et dosage du CEA sur puce anti-CEA fonctionnalisée par différentes chimies de surface (B).

Comme attendu, la réponse de chaque couple anticorps-antigène dépend de la chimie de surface utilisée pour l'immobilisation de l'anticorps de capture. Les surfaces présentant une grande surface spécifique comme les surfaces polymériques (MAMVE, CMD, chitosan), ou bien celles permettant la liaison covalente des anticorps (NHS, CMD, MAMVE) conduisent à une meilleure sensibilité de la détection des antigènes⁶⁹.

Les performances analytiques de nos biopuces pour la détection des 5 biomarqueurs du CRC, sont présentées dans le Tableau 5. Pour le CEA et le CA19-9, les performances obtenues sont meilleures que celles décrites dans la littérature (55 pM pour le CEA⁹³) ou obtenues avec des kits commerciaux (2 log en gamme dynamique, 5.5 nM pour le CEA et 25 U/ml pour le CA19-9 pour la LOD, Kit ELISA de chez Signosis Inc. CA, USA). Pour les autres marqueurs nous n'avons pas de données de comparaison.

Tumor antigens	Optimal surfaces	LOD	Dynamic range
CEA	MAMVE/CMD	10 pM	4.7 log/4.0 log
HSP60	NHS/Chitosan/MAMVE	10 pM	4.7 log/4.0 log
PDI	NHS	10 pM	4.7 log
DEFA6	Chitosan	10 pM	4.7 log
CA19-9	NHS/CMD	10 U/ml	3.0 log

Tableau 5 : Performances analytiques optimales des puces à anticorps pour la détection des biomarqueurs du CRC (extrait de⁶⁹). LOD : limite de détection.

Dans un second temps, l'objectif était d'évaluer et de valider ces performances dans des conditions réelles, c'est-à-dire avec des échantillons de patients atteints de CRC. Les surfaces NHS, MAMVE et chitosan, ont été sélectionnées pour élaborer les biopuces. 2 sera de donneurs sains et 4 sera de patients CRC ont été testés afin d'obtenir la première preuve de concept (Fig. 28). Selon le biomarqueur considéré et la chimie de surface utilisée, un sérum est diagnostiqué positif ou négatif pour la présence de ce biomarqueur. De plus, il faut noter que les concentrations en biomarqueurs détectées dans le sérum sont très faibles puisqu'inférieures à 10 nM (contrôle positif = barre noire).

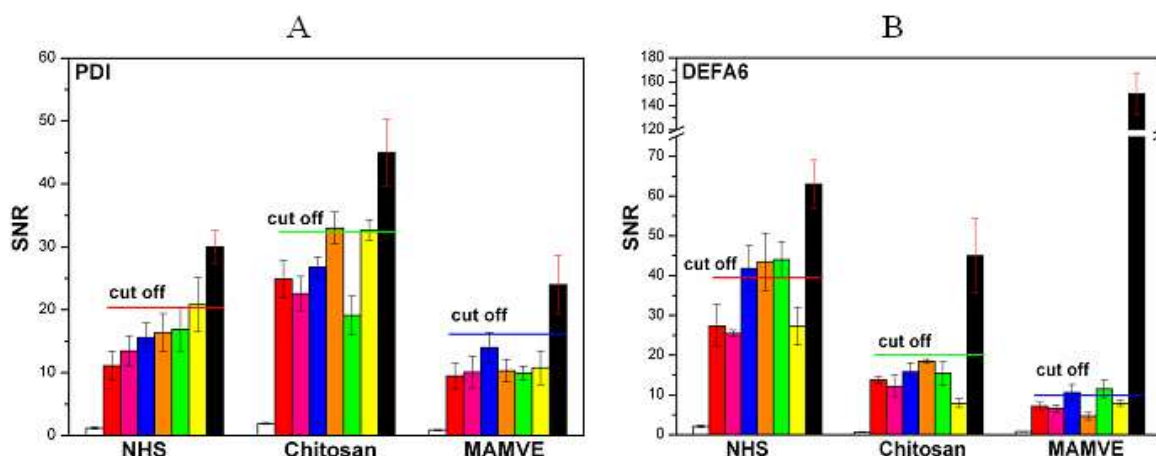


Figure 28 : Détection de marqueurs tumoraux (A : PDI ; B : DEFA6) sur puces à anticorps fonctionnalisées avec NHS, chitosan et MAMVE. 4 sera de patients atteints de CRC (barres bleue, orange, verte, jaune) et 2 sera de donneurs sains (barres rouge, rose) ont été testés. Barre blanche : solution tampon ; Barre noire : biomarqueur purifié à 10 nM. Cut-off = moyenne (donneurs sains) + 3 écart-type.

Bien que le nombre d'échantillons testés ne soit pas suffisant et donc représentatif de la population, les résultats obtenus sont très prometteurs. Il apparaît évident et nécessaire de multiplexer à la fois la détection de plusieurs marqueurs tumoraux afin d'obtenir un maximum de sensibilité et de spécificité du diagnostic, mais également de multiplexer les conditions dans lesquelles s'effectuent la détection. L'étape suivante est de confirmer ces résultats en analysant des cohortes (> 100 échantillons) de sera de patients atteints de CRC à différents stades de la maladie.

L'ensemble de ces résultats a donné lieu à la publication de 4 articles (Annexe 8), à 3 communications orales lors de congrès internationaux, et 2 communications orales lors de congrès nationaux.

3^{ème} Partie

Projets et collaborations

Cette dernière partie présente les directions futures, à moyen et long termes, de mes travaux de recherche. L'axe de recherche sur le diagnostic et le pronostic du cancer sera poursuivi en collaboration avec le CHU et le centre Unicancer de Montpellier. De plus, sur la base de notre filière technologique bien maîtrisée d'élaboration à façon de biopuces à protéines, nous démarrons un partenariat fort avec une PME Rhône Alpine qui vise le développement d'outil diagnostique de maladies infectieuses. Un autre axe de recherche concernant les microsystèmes pour la lipidomique est en émergence. Enfin, de manière plus fondamentale, je compte également m'investir sur l'étude des relations surface/molécule.

I- Vers des biopuces mixtes pour le diagnostic et le pronostic du cancer

Les travaux et résultats obtenus sur les puces à protéines pour l'identification et la détection de biomarqueurs sont fondamentaux car ils ont permis de poser des bases solides pour l'élaboration de biopuces à protéines. Les perspectives d'évolution sont donc nombreuses dans divers domaines de la biologie. Elles sont mêmes particulièrement intéressantes pour le diagnostic et le pronostic du cancer, domaine qui est en plein essor, notamment avec le Plan Cancer / Horizon 2020. De plus, il s'agit d'un sujet que j'affectionne tout particulièrement pour des raisons à la fois personnelles et intellectuelles. Une des mes priorités est donc de développer ce projet qui a débuté et se poursuit en collaboration avec l'équipe de Jérôme Solassol (Laboratoire de Biologie Cellulaire du CHU de Montpellier). D'autres collaborations ont été récemment initiées (Dr. Pierre-Jean Lamy, Centre Unicancer de Montpellier) permettant d'ouvrir l'applicatif de nos puces à protéines pour le diagnostic du cancer.

Ainsi, la collaboration avec l'équipe de Jérôme Solassol s'est renforcée, notamment en élargissant la recherche et l'identification de signatures spécifiques dans le développement du cancer. Deux grands projets ont été élaborés. Le premier projet concerne l'analyse de l'évolution de la réponse immune lors du développement d'un cancer. Différents types de protéines anormalement exprimées lors de la tumorigénèse sont visées, telles que les « heat shock proteins » (hsp) et des antigènes tumoraux (TAA) plus classiques (p53, MY-ESO1, c-myc, cyclin B1, survivin, p62, Koc, ccnb1, FKBP52, galectin3, PAK2, peroxiredoxine 2, PPIA). Les hsp sont des molécules chaperones qui aident les autres protéines à conserver leur conformation, notamment en éliminant les mauvais repliements. Des études ont montrées que certaines hsp étaient sur-exprimées dans de nombreux cancers et faciliteraient la prolifération des cellules tumorales et l'agressivité des tumeurs, notamment leur potentiel métastatique^{94 95}. Nous avons déjà montré que des auto-anticorps anti-hsp60, anti-hsp70 et anti-hsp90 étaient retrouvés dans le sérum de patientes atteintes de cancer du sein. D'autres hsp/anti-hsp ont fait l'objet d'études sporadiques, mais sans détection multiplexe^{96 97 98 99}. Nous menons donc une étude d'identification des profils d'auto-anticorps anti-hsp (hsp27, hsp60, hsp70, hsp90, hsp110, grp78, grp94) et anti-TAA dans deux cancers principaux : sein et poumon. L'expression de ces auto-anticorps sera également analysée en fonction du stade de la maladie afin de pouvoir corrélérer ces profils à l'évolution de la maladie. Ce projet a été initié avec la thèse de Liu SHI (financée par le CSC) qui a débutée en septembre 2012.

Le second projet, plus innovant d'un point de vue technologique, concerne le développement d'une biopuce mixte, ou hybride, permettant une prise en charge plus rapide et plus efficace des patients atteints de cancer. En effet, malgré les progrès réalisés dans la prise en charge initiale des cancers, les cancers du sein et du poumon restent très difficiles à traiter à un stade métastatique. Les chances de rémission/guérison augmentent significativement si les patients présentant une dissémination tumorale sont traités le plus tôt possible. Or les techniques d'imagerie et de biologie ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter précocement le processus métastatique. Toutefois, plusieurs types de marqueurs sériques ont démontré leur intérêt pour l'identification précoce des métastases : les cellules tumorales circulantes (CTC), les protéines tumorales circulantes, et les anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux (TAA). Comme précisé ci-dessus, la présence

d'auto-anticorps dirigés contre les hsp constitue une image de l'état de développement d'une tumeur et de son agressivité, donc une valeur prédictive. De plus, les hsp font l'objet de recherche comme cible thérapeutique pour le traitement du cancer^{100 101}. L'évolution du taux d'auto-anticorps anti-hsp pourrait donc être relié à l'efficacité du traitement et permettre ainsi de l'adapter en fonction de la réponse du patient. Dans ce contexte, une perspective d'évolution très ambitieuse de nos biopuces est d'élaborer des biopuces mixtes, c'est-à-dire composées de sondes de nature différentes (antigènes, anticorps, ADN) et permettant une détection multiplexe de cibles de nature différentes (protéines, cellules, ADN/ARN) (Fig. 29).

Une nouvelle collaboration avec le Centre Unicancer de Montpellier (Dr. Pierre-Jean Lamy) a débuté en mars 2012, concernant le dosage de marqueurs pronostiques du cancer du sein pour l'aide à la décision thérapeutique. En effet, une diminution des traitements de chimiothérapie dans la population des patientes de bon pronostic et peu chimio-sensible est l'un des défis majeurs du traitement adjuvant des cancers du sein. Ce projet, dans la continuité de nos savoir-faire, intègre une nouvelle dimension aux puces à protéine : la détection quantitative de biomarqueurs à partir d'extraits de tissus tumoraux fixés.

Le dosage des taux d'uPA et de PAI-1 dans le tissu tumoral est un des facteurs décisionnels le plus pertinent (validé à un niveau de preuve I) dans le cancer du sein¹⁰². De multiples études ont démontré que les patientes atteintes d'un cancer du sein opéré, sans atteinte ganglionnaire axillaire, et présentant des taux faibles de uPA et de PAI-1 ont un risque de récurrence bas. Ces patientes peuvent alors bénéficier d'une désescalade thérapeutique¹⁰³. Un test est utilisé comme prédictif de réponse à la chimiothérapie et aux thérapies ciblées anti-uPA (WX-UK1, Mesupron®)[4] afin d'éviter des chimiothérapies agressives et souvent inutiles (jusqu'à 50% de la population¹⁰⁴). Toutefois, la principale limitation à la généralisation de ce test vient de la méthode de dosage ELISA. Elle utilise la trousse dosage ELISA Femtelle (ref 899, American Diagnostica, Stamford, USA) marquée CE IVD et donc validée pour un usage diagnostique. Le prélèvement analysé est un échantillon tumoral frais ou cryopréservé de 100 mg environ obtenu par biopsie ou sur la pièce d'exérèse. Cette technique présente donc l'inconvénient de ne pouvoir être utilisé que sur des tumeurs de taille suffisante pour pouvoir à la fois bénéficier d'une analyse anatomopathologique conventionnelle et d'une conservation de tissus frais congelés (technique peu répandue et coûteuse), situation difficile en pratique pour des tumeurs de taille inférieure au centimètre.

L'extraction protéique sur tissus fixés en paraffine suivie d'un dosage protéique par une technique multiplexe miniaturisée comme les puces à protéines, serait donc une alternative particulièrement intéressante pour les échantillons fixés de faible taille. Une approche innovante serait de combiner dans un seul test, grâce à l'utilisation des supports microstructurés :

- le dosage quantitatif de uPA et de PAI-1 à partir de prélèvements de tumeur mammaire de toutes tailles
- le dosage d'autres marqueurs protéiques (Cathepsine D, tPA, uPAR, HER1-2-3-4) afin de qualifier la biopathologie des tumeurs.
- Le dosage des protéines totales des échantillons permettant de normaliser les résultats de dosage des marqueurs tumoraux.

La corrélation entre les taux mesurés sur biopuces et ceux obtenus avec le kit Femtelle™, considéré comme examen de référence, sera évaluée afin de valider le test.

Ce projet a démarré notamment avec la thèse de Liu SHI. Par ailleurs, la compagnie Sekisui Diagnostics (propriétaire de American Diagnostica) a été contactée pour la fourniture des anticorps utilisés dans le kit Femtelle. Elle nous a signifié son intérêt de participer au développement de ce nouvel outil pronostic.

II- Microsystèmes analytiques pour la lipidomique

L'expérience et l'expertise acquises sur les puces à anticorps sont un atout pour toutes les études de biologie utilisant ces biomolécules comme systèmes de capture et de détection. Toutefois, l'utilisation du format « biopuce » peut devenir restrictif. Afin d'élargir le champ possible des applications, il est donc nécessaire de faire évoluer notre système selon 2 axes : l'un technologique, l'autre biochimique.

- Les développements technologiques concernent le développement complet d'un microsystème intégrant des systèmes microfluidiques permettant de faire des analyses dynamiques, et des techniques de détection sans marquage de façon à avoir une lecture directe et plus rapide.
- Les développements biochimiques permettant par exemple l'analyse du comportement de micro-tissu (groupe de cellules) dans un micro environnement donné et contrôlé.

Dans cette optique, Yann Chevolot et moi-même avons initié un nouveau projet en 2012, associant Alain Geloën (INSA Lyon) et Vincent Dugas (ISA, UCBL). Il s'agit de développer un microsystème analytique permettant de doser les adipokines, hormones secrétées par le tissu adipeux. En effet, longtemps considéré comme une simple réserve de graisse, des études récentes ont démontré que le tissu adipeux est un tissu endocrine et sécrétoire, acteur essentiel de nombreuses réponses physiologiques de l'organisme^{105 106 107}. C'est donc une glande qui produit plusieurs dizaines d'hormones (Leptine, Adiponectine, TNF α , Apeline, Adipsine...) qui agissent aussi bien localement qu'à distance sur d'autres tissus, et participent à des processus vitaux. Leurs rôles dans les phénomènes pathologiques comme le diabète de type II, les maladies cardiovasculaires, l'inflammation (artériosclérose...), certains cancers, l'obésité sont très étudiés. Cependant, la compréhension globale de ce réseau d'interactions reste limitée du fait de méthodes expérimentales longues, non-multiplexées et en point final d'analyse.

Ce projet s'articule en plusieurs phases :

1/ Mettre au point le dosage multiplexe de 10 adipokines présentes dans le milieu de culture et issues de la sécrétion d'adipocytes (de souris) en culture. Ce dosage fait appel aux puces à anticorps. Cette partie a été initiée en janvier 2014 avec un stage de M2 (Melle Chahrazed Zebentout) sur le dosage de 2 adipokines : la leptine et le TNF α .

2/ Concevoir et élaborer un microsystème comportant 1 ou plusieurs micro-bioréacteurs de 10 à 25 μ L permettant de cultiver les adipocytes dans un environnement contrôlé. Ce système doit permettre la circulation du milieu de culture notamment l'arrivée de milieu frais, et la sortie du milieu contenant les sécrétions hormonales des cellules

3/ Raccorder chaque micro-bioréacteur à la partie « dosage multiplexe » via un système microfluidique

4/ Faire évoluer la partie « dosage multiplexe » par fluorescence « classique » vers un système sans marquage du type imagerie de plasmons de surface (SPRi) ou électrophorèse capillaire.

Ce projet est très motivant car il nécessite d'associer des compétences diverses lui conférant ainsi un aspect pluridisciplinaire très marqué. Il est notamment prévu d'associer l'équipe microfluidique de l'INL.

III- Corrélation entre chimies de surface et immobilisation de biomolécules

Au vue de la littérature et de mes recherches, il est clair que l'immobilisation de biomolécules, telles que les protéines, sur des surfaces fonctionnalisées est gouvernée par plusieurs facteurs :

- les caractéristiques physico-chimiques des biomolécules : masse molaire, structure, charge, caractère hydrophile/hydrophobe
- les caractéristiques de la surface : nature et densité des groupements chimiques réactifs, charge, caractère hydrophile/hydrophobe
- les caractéristiques de la solution aqueuse contenant les biomolécules : composition et concentration en ion, pH, température.

Dans des systèmes de plus en plus complexes associant multiplexage et détection sans marquage, il est absolument nécessaire de pouvoir prédire les conditions permettant d'immobiliser de façon efficace chaque biomolécule, de conserver au maximum leur activité biologique et d'optimiser les conditions de reconnaissance des cibles visées. Compte tenu du très grand nombre de paramètres à prendre en compte et de leur interdépendance plus ou moins importante, il est nécessaire de hiérarchiser le poids de ces paramètres. C'est un challenge important auquel je réfléchis depuis quelques années et que je souhaite initier rapidement. En effet, nous possédons déjà beaucoup de données et de résultats reliant chimie de surface et immobilisation de protéines. Une première étude réalisée en 2013 grâce à un Projet de Fin d'Etude de l'INSA de Lyon (Mr Huu-Tuan Nguyen), a permis de démontrer la faisabilité d'un tel projet. Toutefois, des données supplémentaires sont nécessaires, ainsi que des compétences dans le domaine de l'analyse statistique multivariée. Dans ce projet, plusieurs volets seront abordés en parallèle afin de pouvoir implémenter régulièrement les modèles statistiques avec des données expérimentales.

Le premier volet concerne l'acquisition de données expérimentales supplémentaires sur les caractéristiques de différentes chimies de surface. Un des premiers points est de pouvoir diminuer l'adsorption non spécifique des protéines sur les surfaces fonctionnalisées qui est une limitation importante pour la sensibilité de la détection. Aussi, j'envisage de développer de nouvelles fonctionnalisations de surface avec des phospholipides, ou des monocouches mixtes comportant 2 types de molécules, hydrophile non réactive et hydrophile réactive. Ces nouvelles fonctionnalisations seront caractérisées par des techniques telles que la mesure de l'angle de contact, XPS, Tof-SIMS.

Un second volet concerne l'immobilisation de protéines aux caractéristiques physico-chimiques différentes sur nos surfaces fonctionnalisées. Les conditions d'immobilisation devront varier en concentration de protéines, composition et

concentration en ions de la solution tampon d'immobilisation, ainsi que son pH. Aussi bien le taux d'immobilisation des protéines que leur structure à l'interface solide/liquide sera évalué et étudié. Pour ce dernier point, une collaboration avec Christian Grillet (équipe nanophotonique de l'INL) est envisagée.

L'ensemble de ces études viendra compléter la banque de données fournissant les informations nécessaires à l'analyse statistique multivariée permettant à terme de prédire le comportement d'une protéine sur une surface en fonction de leurs paramètres respectifs. Pour cela, une collaboration avec Alexandre Saidi du LIRIS (Ecole Centrale de Lyon) a été initiée en 2013.

Ce projet s'inscrit dans une étude plus fondamentale des mécanismes d'interaction aux interfaces matériau- biomolécule. La collaboration avec des disciplines très différentes de celles établies jusqu'à présent constitue un challenge et une motivation supplémentaire.

Références

1. Angenendt, P., Glokler, J., Murphy, D., Lehrach, H. & Cahill, D. J. Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials. *Anal Biochem* **309**, 253–260 (2002).
2. Haab, B. B., Dunham, M. J. & Brown, P. Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Gen. Biol.* **2**, 4.1–.13 (2001).
3. MacBeath, G. & Schreiber, S. L. Printing proteins as microarrays for highthroughput function determination. *Science (80-.)*. **289**, 1760–1763 (2000).
4. Zhu, H. *et al.* Analysis of yeast protein kinases using protein chips. *Nat. Genet.* **26**, 283–289 (2000).
5. Lin, S. C., Tseng, F. G., Huang, H. M., Huang, C. Y. & Chieng, C. C. F. Microsized 2D protein arrays immobilized by micro-stamps and micro-wells for disease diagnosis and drug screening. *J. Anal. Chem.* **371**, 202–208 (2001).
6. Ruiz-Taylor, L. *et al.* 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**, 852–857 (2001).
7. Guschin, D. *et al.* Manual Manufacturing of Oligonucleotide, DNA, and Protein Microchips. *Anal Biochem* **250**, 203–211 (1997).
8. Peluso, P. *et al.* Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays. *Anal. Biochem.* **312**, 113–124 (2003).
9. Arenkov, P. *et al.* Protein Microchips: Use for Immunoassay and Enzymatic Reactions. *Anal Biochem* **278**, 123–131 (2000).
10. Rubina, A. *et al.* Hydrogel-Based Protein Microchips: Manufacturing, Properties, and Applications. *Biotechniques* **34**, 1008–1019 (2003).
11. Kiyonoka, S. *et al.* Semiwet peptide/protein array using supramolecular hydrogel. *Nat. Mater.* **3**, 58–64 (2004).
12. Ortenwall, P., Wadenvik, H., Kutti, J. & Risberg, B. Endothelial cell seeding reduces thrombogenicity of Dacron grafts in humans. *J Vasc Surg* **11**, 403–410 (1990).
13. Meinhart, J., Deutsch, M. & Zilla, P. Eight years of clinical endothelial cell transplantation. Closing the gap between prosthetic grafts and vein grafts. *ASAIO J* **43**, M515–M521 (1997).
14. Williams, S. K. Endothelial cell transplantation. *Cell Transpl* **4**, 401–410 (1995).

15. Herring, M. B., Compton, R., Legrand, D. R. & Gardner, A. L. Endothelial cell seeding in the management of vascular thrombosis. *Semin Thromb Haemost* **15**, 200–205 (1989).
16. Osborn, L., Vassallo, C. & Benjamin, C. D. Activated endothelium binds lymphocytes through a novel binding site in the alternately spliced domain of vascular cell adhesion molecule-1. *J Exp Med* **176**, 99–107 (1992).
17. Furie, M. B., Tancinco, M. C. A. & Smith, C. W. Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a and CD11b or ICAM-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro. *Blood* **78**, 2089–2097 (1991).
18. Hakkert, B. C., Kuijpers, T. W., Leeuwenberg, J. F. M., Van Mourik, J. A. & Roos, D. Neutrophil and monocyte adherence to and migration across monolayers of cytokine-activated endothelial cells: the contribution of CD18, ELAM-1 and VLA-4. *Blood* **78**, 2721–2726 (1991).
19. Vaporciyan, A. A. *et al.* Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* (80-). **262**, 1580–1582 (1993).
20. Muller, W. A., Weigl, S. A., Deng, X. & Phillips, D. M. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* **178**, 449–460 (1993).
21. Imbert, E., Poot, A. A., Fidgor, C. G. & Feijen, J. Expression of leukocyte adhesion molecules by endothelial cells seeded on various polymer surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **56**, 376–381 (2001).
22. Imbert, E., Poot, a a, Fidgor, C. G. & Feijen, J. Different growth behaviour of human umbilical vein endothelial cells and an endothelial cell line seeded on various polymer surfaces. *Biomaterials* **19**, 2285–90 (1998).
23. Schmierer, A. E., Pohlman, T. H. & Ratner, B. D. Endothelial cell activation on biomaterials: expression of the inflammatory marker E-selectin. *Proc. Fifth World Biomater. Congr.* 732 (1996).
24. Fox, G. *et al.* The Cell Attachment Site on Foot-and-Mouth Disease Virus Includes the Amino Acid Sequence RGD (Arginine-Glycine-Aspartic Acid) . *J Gen Virol* **70**, 625–637 (1989).
25. Lobigs, M. *et al.* Host cell selection of murray valley encephalitis virus variants altered at an RGD sequence in the envelope protein and in mouse virulence. *Virology* **176**, 587–595 (1990).
26. Hasegawa, H., Yoshida, M., Shiosaka, T., Fujita, S. & Kobayashi, Y. Mutations in the envelope protein of Japanese encephalitis virus affect entry into cultured cells and virulence in mice. *Virology* **191**, 158–165 (1992).
27. Strauss, J. H., Ruˆmenapf, R. C., Weir, R. J., Kuhn, K. W. & Strauss, E. G. in 141–163 (Cold Spring Harbor Press, 1994).

28. Strauss, J. H. & Strauss, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* **58**, 491–562 (1994).
29. Davis, N. L., Fuller, F. J., Dougherty, W. G., Olmsted, R. A. & Johnston, R. E. A single nucleotide change in the E2 glycoprotein gene of Sindbis virus affects penetration rate in cell culture and virulence in neonatal mice. *Proc Natl Acad Sci* **83**, 6771–6775 (1986).
30. Polo, J. M., Davis, N. L., Rice, C. M., Huang, H. V & Johnston, R. E. Molecular analysis of Sindbis virus pathogenesis in neonatal mice by using virus recombinants constructed in vitro. *J Virol* **62**, 2124–2133 (1988).
31. Imbert-Laurenceau, E., Crepinior, J., Crance, J.-M., Jouan, A. & Migonney, V. Polystyrene derivatives substituted with arginine interact with Babanki (Togaviridae) and Kedougou (Flaviviridae) viruses. *J. Med. Virol.* **59**, 503–509 (2003).
32. Imbert-Laurenceau, E., Berger, M.-C., Pavon-Djavid, G., Jouan, A. & Migonney, V. Surface modification of polystyrene particles for specific antibody adsorption. *Polymer (Guildf)*. **46**, 1277–1285 (2005).
33. Sterling, T. R. *et al.* Heat-denatured human immunodeficiency virus type 1 protein 24 antigen: Prognostic value in adults with early-stage disease. *J. Infect. Dis.* **186**, 1181–1185 (2002).
34. Reznik, G. O., Vajda, S., Cantor, C. R. & Sano, T. A streptavidin mutant useful for directed immobilization on solid surfaces. *Bioconjugate Chem* **12**, 1000–1004 (2001).
35. Huang, W., Wang, J., Bhattacharyya, D. & Bachas, L. G. Improving the activity of immobilized subtilisin by site specific attachment to surfaces. *Anal Chem* **69**, 4601–4607 (1997).
36. Paborsky, L. R., Dunn, K. E., Gibbs, G. S. & Dougherty, J. P. A nickel chelate microtiter plate assay for six histidine-containing proteins. *Anal Biochem* **234**, 60–65 (1996).
37. Nock, S., Spudich, J. A. & Wagner, P. Reversible, site specific immobilization of polyarginine-tagged fusion proteins on mica surfaces. *FEBS Lett.* **414**, 233–238 (1997).
38. Stempfer, G., Höll-Neugebauer, B., Kopetzki, E. & Rudolph, R. A fusion protein designed for noncovalent immobilization: stability, enzymatic activity, and use in an enzyme reactor. *Nat Biotechnol* **14**, 481–484 (1996).
39. Ladavière, C. *et al.* Covalent immobilization of proteins onto (maleic anhydride-alt-methyl vinyl ether) copolymers: enhanced immobilization of recombinant protein. *Bioconjugate Chem* **9**, 655–661 (1998).
40. Ladavière, C., Lorenzo, C., Elaïssari, A., Mandrand, B. & Delair, T. Electrostatically driven immobilization of peptides onto (maleic anhydride-alt-

- methyl vinyl ether) copolymers in aqueous media. *Bioconjugate Chem* **11**, 146–152 (2000).
41. Allard, L. *et al.* Mechanisms Leading to an Oriented Immobilization of Recombinant Proteins Derived from the p24 Capsid of HIV-1 onto Copolymers. *Bioconjug Chem* **12**, 972–979 (2001).
 42. Allard, L. *et al.* Antigenicity of recombinant proteins after regioselective immobilization onto polyanhydride-based copolymers. *Bioconjug. Chem.* **15**, 458–466 (2004).
 43. Allard, L. *et al.* Versatile expression vectors for production of lysine-tagged recombinant proteins for oriented covalent immobilization: application to improvement of ELISA. *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 341–348 (2002).
 44. Gordus, A. & MacBeath, G. Circumventing the problems caused by protein diversity in microarrays: implications for protein interaction networks. *J. Am. Chem. Soc* **128**, 13668–13669 (2006).
 45. Zhu, Q., Uttamchandani, M., Li, D. B., Lesaichere, M. L. & Yao, S. Q. Enzymatic profiling system in a small-molecule microarray. *Org. Lett.* **5**, 1257–1260 (2003).
 46. Dietrich, H. R. C. *et al.* Nanoarrays: A method for performing enzymatic assays. *Anal. Chem.* **76**, 4112–4117 (2004).
 47. Lee, Y., Kang, D. K., Chang, S. I., Han, M. H. & Kang, I. C. High-throughput screening of novel peptide inhibitors of an integrin receptor from the hexapeptide library by using a protein microarray chip. *J. Biomol. Screen.* **9**, 687–694 (2004).
 48. Kim, S. H., Tamrazi, A., Carlson, K. E. & Katzenellenbogen, J. A. A proteomic microarray approach for exploring ligand-initiated nuclear hormone receptor pharmacology, receptor selectivity, and heterodimer functionality. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 267–277 (2005).
 49. Combaret, V. *et al.* Protein chip array profiling analysis of sera from neuroblastoma patients. *Cancer Lett.* **228**, 91–96 (2005).
 50. Hueber, W. *et al.* Antigen microarray profiling of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **52**, 2645–2655 (2005).
 51. Shoenfeld, Y. & Segol, O. Anti-histone antibodies in SLE and other autoimmune diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.* **7**, 265–271 (1989).
 52. Gupta, R. & Lim, K. The diagnosis of systemic lupus erythematosus: How the laboratory can help you. *CPD Rheumatol.* **2**, 47–52 (2001).
 53. Espanel, X. & Van Huijsduijen, R. Applying the Spot peptide synthesis procedure to the study of protein tyrosine phosphate substrate specificity: probing for the heavenly match in vitro. *Methods* **35**, 64–72 (2005).

54. Frank, R. The SPOT-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *J. Immunol. Methods* **267**, 13–26 (2002).
55. Sultani-Vigneron, S. *et al.* Immobilisation of oligo-peptidic probes for microarray implementation: Characterisation by FTIR, Atomic Force Microscopy and 2D fluorescence. *J Chrom. B* **822**, 304–310 (2005).
56. El Khoury, G. *et al.* Acid deprotection of covalently immobilized peptide probes on glass slides for peptide microarrays. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2242–2246 (2007). doi:10.1109/IEMBS.2007.4352771
57. El Khoury, G., Laurenceau, E., Chevolut, Y., Souteyrand, E. & Cloarec, J. P. A generic surface chemistry for peptide microarray implementation: Application to the detection of anti-H3 antibody. *Biosens. Bioelectron.* **26**, 1320–1325 (2010).
58. Zhu, H. *et al.* Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science (80-.)*. **293**, 2101–2105 (2001).
59. Zhu, H. & Snyder, M. Protein chip technology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 55–63 (2003).
60. Noel, S., Liberelle, B., Robitaille, L. & De Crescenzo, G. Quantification of primary amine groups available for subsequent biofunctionalization of polymer surfaces. *Bioconjug. Chem.* **22**, 1690–1699 (2011).
61. Kusnezow, W. & Hoheisel, J. D. Antibody microarrays: promises and problems. *Biotechniques* 14–23 (2002).
62. Seuryneck-Servoss, S. L., White, A. M., Baird, C. L., Rodland, K. D. & Zangar, R. C. Evaluation of surface chemistries for antibody microarrays. *Anal. Biochem.* **371**, 105–115 (2007).
63. Kusnezow, W., Jacob, A., Walijew, A., Diehl, F. & Hoheisel, J. D. Antibody microarrays: an evaluation of production parameters. *Proteomics* **3**, 254–264 (2003).
64. Kim, J. K. *et al.* Effects of polymer grafting on a glass surface for protein chip applications. *Colloids Surf. B* **33**, 67–75 (2004).
65. Prabhulkar, S., Alwarappan, S., Liu, G. & Li, C. Z. Amperometric micro-immunosensor for the detection of tumor biomarker. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 3524–3530 (2009).
66. Coussot, G. *et al.* Aminated dendritic surfaces characterization: a rapid and versatile colorimetric assay for estimating the amine density and coating stability. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 2295–2302 (2011).
67. Coussot, G. *et al.* A rapid and reversible colorimetric assay for the characterization of aminated solid surfaces. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**, 1061–1069 (2011).

68. Yang, Z. *et al.* Characterization of three amino-functionalized surfaces and evaluation of antibody immobilization for the multiplex detection of tumor markers involved in colorectal cancer. . *Langmuir* **29**, 1498–1509 (2013).
69. Yang, Z. *et al.* Cancer biomarkers detection using 3D microstructured protein chip: Implementation of customized multiplex immunoassay. *Sensors Actuators B Chem.* **175**, 22–28 (2012).
70. Liljegren, G. & Nyholm, L. Electrochemically controlled solid-phase microextraction and preconcentration using polypyrrole coated microarray electrodes in a flow system. *Analyst* **128**, 232–236 (2003).
71. Guadarrama, A., Rodríguez-Mendez, M. L., Sanz, C., Rios, J. L. & De Saja, J. A. Electronic nose based on conducting polymers for the quality control of the olive oil aroma discrimination of quality, variety of olive, and geographic origin. *Anal. Chim. Acta* **432**, 283–292 (2001).
72. Marquette, C. A. *et al.* Electroaddressed immobilization of recombinant HIV-1 p24 capsid protein onto screen-printed arrays for serological testing. *Anal. Biochem.* **340**, 14–23 (2005).
73. Quismorio, F. P., Beardmore, T., Kaufman, R. L. & Mongan, E. S. IgG rheumatoid factors and anti-nuclear antibodies in rheumatoid vasculitis. *Clin. exp. Immunol.* **52**, 333–340 (1983).
74. Tan, E. M. & Zhang, J. Autoantibodies to tumor-associated antigens: reporters from the immune system. *Immunol. Rev.* **222**, 328–340 (2008).
75. Balboni, I., Lim, C., Tenenbaum, J. D. & Utz, P. J. Evaluation of microarray surfaces and arraying parameters for autoantibody profiling. *Proteomics* **8**, 3443–3449 (2008).
76. Egner, W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J. Clin. Pathol.* **53**, 424–432 (2000).
77. Ghedira, I., Landolsi, H., Mankai, A., Fabien, N. & Jeddi, M. Antihistone antibodies in systemic lupus erythematosus: comparison of three assays-ELISA, dot blot, and immunoblot. *Pathol. Biol.* **54**, 148–154 (2006).
78. Cho-Chung, Y. S. Autoantibody biomarkers in the detection of cancer. *Biochim Biophys Acta* **1762**, 587–591 (2006).
79. Desmetz, C., Cortijob, C., Mangé, A. & Solassol, J. Humoral response to cancer as a tool for biomarker discovery. *J. Proteomics* **72**, 982–988 (2009).
80. Liu, W. *et al.* Autoantibodies to tumor-associated antigens as biomarkers in cancer immunodiagnosis. *Autoimmun. Rev.* **10**, 331–335 (2011).
81. Scanlan, M. J. *et al.* Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *Int J. Cancer* **76**, 652–658 (1998).

82. Scanlan, M. J. *et al.* Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression. *Cancer Immun.* **1**, 4 (2001).
83. Caron, M., Choquet-Kastylevsky, G. & Joubert-Caron, R. Cancer immunomics using autoantibody signature for biomarker discovery. *Mol Cell Proteom* **6**, 1115–1122 (2007).
84. Gnjatic, S. *et al.* Seromic analysis of antibody responses in non-small cell lung cancer patients and healthy donors using conformational protein arrays. *J. Immunol. Methods* **341**, 50–58 (2009).
85. Tsunemi, S. *et al.* Proteomics-based identification of a tumor-associated antigen and its corresponding autoantibody in gastric cancer. *Oncol. Rep.* **23**, 949–956 (2010).
86. Robinson, W. H. *et al.* Autoantigen microarrays for multiplex characterization of autoantibody responses. *Nat. Med.* **8**, 295–301 (2002).
87. Madoz-Gurpide, J., Kuick, R., Wang, H., Misek, D. E. & Hanash, S. M. Integral protein microarrays for the identification of lung cancer antigens in sera that induce a humoral immune response. *Mol Cell Proteom* **7**, 268–281 (2008).
88. Wu, L. *et al.* Development of Autoantibody Signatures as Novel Diagnostic Biomarkers of Non -Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **16**, 3760–3768 (2010).
89. Yang, Z. *et al.* Customized tumor-associated antigen microarrays for the sensitive and specific detection of tumor markers from breast cancer sera. *Biosens. Bioelectron.* **40**, 385–392 (2013).
90. Sun, Z. *et al.* A protein chip system for parallel analysis of multi-tumor markers and its application in cancer detection. *Anticancer Res.* **24**, 1159–1165 (2004).
91. Duffy, M. J. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: Is it clinically useful? *Clin. Chem.* **47**, 624–630 (2001).
92. Koprowski, H., Herlyn, M., Steplewski, Z. & Sears, H. F. Specific antigen in serum of patients with colon carcinoma. *Science (80-)*. **212**, 53–55 (1981).
93. Zhong, Z. *et al.* Nanogold-enwrapped graphene nanocomposites as trace labels for sensitivity enhancement of electrochemical immunosensors in clinical immunoassays: carcinoembryonic antigen as a model. *Biosens. Bioelectron.* **25**, 2379–2383 (2010).
94. Khalila, A. A., Kabapya, N. F., Deraza, S. F. & Smith, C. Heat shock proteins in oncology: diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim Biophys Acta* **1816**, 89–104 (2011).
95. Ciocca, D. R. & Calderwood, S. K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* **10**, 86–103 (2005).

96. Conroy, S. E. *et al.* Antibodies to heat-shock protein 27 are associated with improved survival in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer* **77**, 1875–1879 (1998).
97. He, Y. *et al.* Proteomics-based identification of HSP60 as a tumor-associated antigen in colorectal cancer. *Proteomics Clin Appl* **1**, (2007).
98. Luo, L., Herrera, I., Soosaipillai, A. & Diamandis, E. Identification of heat shock protein 90 and other proteins as tumour antigens by serological screening of an ovarian carcinoma expression library. *Br. J. Cancer* **87**, (2002).
99. Korneeva, I., Bongiovanni, A., Girotra, M., Caputo, T. & Witkin, S. IgA antibodies to the 27-kDa heat-shock protein in the genital tracts of women with gynecologic cancers. *Int J Cancer* **87**, 824–828 (2000).
100. Guttman, D. M. & Koumenis, C. The heat shock proteins as target for radiosensitization and chemosensitization in cancer. *Cancer Biol Ther* **12**, 1023–1031 (2011).
101. Mjahed, H., Girodon, F., Fontenay, M. & Garrido, C. Heat shock proteins in hematopoietic malignancies. *Exp Cell Res* **318**, 1946–1958 (2012).
102. Harris, L. *et al.* American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* **25**, 5287–5312 (2007).
103. Look, M. *et al.* Pooled analysis of prognostic impact of uPA and PAI-1 in breast cancer patients. *Thromb Haemost* **90**, 538–548 (2003).
104. Mengele, K. *et al.* Characteristics of the level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1. *Expert Rev Mol Diagn* **10**, 947–962 (2010).
105. Kwon, H. & Pessin, J. E. Adipokines Mediate Inflammation and Insulin Resistance. *Front Endocrinol* **4**, 71 (2013).
106. Van de Voorde, J., Pauwels, B., Boydens, C. & Decaluwé, K. Adipocytokines in relation to cardiovascular disease. *Metabolism* **62**, 1513–1521 (2013).
107. Ligibel, J. & Strickler, H. Obesity and its impact on breast cancer: tumor incidence, recurrence, survival, and possible interventions. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. **52**, 9 (2013).