



HAL
open science

Design of fluorescence immunoassays. Perspectives for continuous monitoring of biological warfare agents.

Laure-Marie Neuburger

► **To cite this version:**

Laure-Marie Neuburger. Design of fluorescence immunoassays. Perspectives for continuous monitoring of biological warfare agents.. Chemical Sciences. AgroParisTech, 2006. English. NNT : 2006INAP0042 . pastel-00004770

HAL Id: pastel-00004770

<https://pastel.hal.science/pastel-00004770>

Submitted on 20 Feb 2009

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.



THÈSE
présentée
pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon



Ecole Doctorale ABIES (Agronomie, alimentation, biologie, environnements et santé)
Spécialité : Biochimie

par
Laure-Marie NEUBURGER

**DÉVELOPPEMENT DE DOSAGES
IMMUNOLOGIQUES PAR FLUORESCENCE**
**Perspectives pour l'élaboration d'un capteur
en flux des agents de la menace**

soutenue publiquement le 20 Octobre 2006

JURY

Monsieur le Docteur Christophe CRÉMINON
Monsieur le Professeur Loïc BLUM
Monsieur le Professeur Pierre-Yves RENARD
Monsieur le Professeur Daniel HARTMANN
Monsieur François PERRAUT
Monsieur le Professeur Jean-Claude MEUNIER

Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Président du jury

A mes parents,

A Christophe,

Remerciements

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse (LERI), au sein du Service de Pharmacologie et d'Immunologie (SPI) au Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) de Saclay.

Je remercie la Délégation Générale pour l'Armement (DGA) qui a financé ces travaux de recherche, ainsi que Pierre Mericam-Bourdet du comité de suivi de la thèse.

J'adresse tous mes remerciements à Messieurs les membres du jury : Monsieur le Professeur Jean-Claude Meunier, responsable de la Chaire de Biochimie à l'INA-PG, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury, Messieurs les Professeurs Loïc Blum (CNRS-Université Lyon 1) et Pierre-Yves Renard (CNRS-Université de Rouen), rapporteurs, Monsieur le Professeur Daniel Hartmann (Université Lyon 1) et Monsieur François Perraut (CEA Grenoble), et Monsieur le Docteur Christophe Créminon, directeur de ma thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Jacques Grassi, Chef du Service de Pharmacologie et d'Immunologie, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie chaleureusement Christophe Créminon, Chef du LERI, pour avoir accepté de diriger ma thèse après mon stage d'ingénieur, et pour m'avoir formée à la recherche scientifique. J'adresse également mes remerciements à Hervé Volland, qui m'a encadrée et initiée aux techniques d'immunoanalyse à mon arrivée en stage. Je remercie vivement François Perraut (CEA Grenoble), co-tuteur de ma thèse, qui m'a fait découvrir le charme de la fluorescence et de la microscopie, me fournissant une aide précieuse. Je les remercie tous trois pour la confiance qu'il m'ont accordée dès le début de ce travail, leur soutien et leur patience, et particulièrement Christophe Créminon pour la relecture de la thèse et la préparation de la soutenance.

Je remercie Philippe Rizo, Chef du Laboratoire d'Imagerie des Systèmes d'Acquisition (LISA) du CEA Grenoble pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire lorsque j'en ai eu besoin. Je remercie chaleureusement Emmanuelle Schultz, Jean Berthier, et François Perraut, pour notre collaboration et l'excellent accueil qu'ils m'ont toujours réservé.

Au CEA Saclay, je remercie Céline Boutin que j'ai eu le plaisir d'encadrer durant les 6 mois de son stage de DEA ainsi que Gilles Clément pour son appui et ses conseils notamment concernant la BLG. Je tiens aussi à remercier Marie-Claire Nevers et Hervé Boutal, ainsi que Yveline Frobert, Patricia Lamourette, Karine Moreau et Marc Plaisance. Merci également à Frédéric Taran (CEA/SMMCB) et Hervé Bernard pour la synthèse de certains composés, ainsi qu'à l'équipe de l'animalerie.

Au CEA Grenoble, je remercie Françoise Vynet, Antoine Hoang et Alain Troussier qui m'ont formée à des techniques de chimie de greffage sur verre, Guillaume Delapierre, Guillaume Paumier et Isabelle Mingam (Laboratoire de Fonctionnalisation et de Chimie pour les Microsystèmes), avec lesquels j'ai eu le plaisir de collaborer, ainsi qu'Henri Gâteau.

D'une manière générale, je remercie tous les scientifiques du SPI qui ont enrichi mon univers et élargi mon champ de connaissances, et l'ensemble du personnel pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Je pense notamment à Jean-Yves Couraud et l'équipe « Paris VII », à Didier Boquet, à Nathalie Morel, Stéphanie Simon et tout le LERI, à Stéphane Hazebrouck, Jean-Marc Chatel, Karine Adel-Patient et toute l'équipe INRA dirigée par Jean-Michel Wal, à Eric Ezan et avec lui le Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicaments, ainsi qu'à Sophie, David, Karine et l'équipe SPI-BIO et au « staff » administratif : je ne citerai pas tout le monde mais le cœur y est.

J'ai une pensée pour mes compagnons de thèse, qui m'ont fait partager leurs joies et peines de manip, de rédaction, et bien d'autres choses : Nathalie, Lucie, Céline, Alex et Séverine, Sosthène, Dimitri, Lucie, Cécile, Coralie, et pour tous les thésards du SPI et de l'association Maiot.

Je tiens aussi à remercier dans leur ensemble mes professeurs de classes préparatoires, de l'ENSAIA et de l'INA-PG qui m'ont donné le goût de la recherche.

Enfin, je pense bien fort à toutes les personnes qui m'ont entourée en dehors du laboratoire. A mes amis, à ma famille et à Christophe, je dis merci, merci d'être là, tout simplement.

Sommaire

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE	15
I.1. Détection des agents de la menace biologique	19
I.1.1. Description des agents de la menace biologique.....	19
I.1.1.1. Définition	19
I.1.1.2. Les principaux agents.....	20
I.1.1.3. Voies de contamination.....	20
I.1.1.4. Exemples : toxine botulinique A et ricine	21
I.1.1.4.1. La toxine botulinique (type A)	21
I.1.1.4.2. La ricine	23
I.1.2. Importance de la détection précoce des agents de la menace	24
I.1.3. Systèmes de détection des agents de la menace.....	26
I.1.3.1. Contraintes spécifiques	26
I.1.3.2. Niveaux de surveillance et niveaux d'autonomie des systèmes de détection	27
I.1.3.3. Une diversité de techniques.....	27
I.2. Dosages immunologiques	29
I.2.1. L'interaction antigène-anticorps	29
I.2.1.1. Définition des anticorps et antigènes.....	29
I.2.1.2. Origines de l'immunoanalyse.....	31
I.2.1.3. Structure des anticorps	32
I.2.1.4. Notions d'affinité et de spécificité	33
I.2.2. Dosages immunologiques	34
I.2.2.1. Principe général.....	34
I.2.2.2. Dosages dits « en format homogène» et « en format hétérogène »	35
I.2.2.3. Formats compétitif et immunométrique	35
I.2.2.4. Méthodes de détection.....	37
I.3. Fluorescence et phénomène de FRET	38
I.3.1. Description de la fluorescence	39
I.3.1.1. Notions physiques	39
I.3.1.2. Propriétés générales des fluorophores	41
I.3.1.3. Les phénomènes d'extinction de fluorescence et définition du FRET	43
I.3.2. Exemples de méthodes de détection par fluorescence	44
I.3.2.1. Dosages immunologiques par fluorescence	44
I.3.2.2. Exemples de méthodes de détection par quenching de fluorescence	48
I.4. Immunocapteurs en flux continu	49
I.4.1. Immunocapteurs : généralités	49
I.4.1.1. Définition	49
I.4.1.2. Des méthodes de détection variées.....	51
I.4.2. Immunocapteurs en flux continu.....	53

I.4.2.1. Définition	53
I.4.2.2. Avantages attendus.....	53
I.4.2.3. Méthodes employées.....	53
I.4.2.3.1. Immobilisation de l'anticorps.....	55
I.4.2.3.2. Immobilisation de l'analyte ou d'un analogue.....	55
I.5. Approche proposée	56
I.5.1. Principe du SPIT-FRI.....	57
I.5.2. Molécules « modèles ».....	57
I.5.2.1.1. La Substance P.....	59
I.5.2.1.2. La β -Lactoglobuline.....	59
I.5.2.1.3. L'Atrazine.....	61
I.5.2.1.4. L'aflatoxine B1.....	61
I.5.3. Objectifs de la thèse	63
II. MATÉRIEL & MÉTHODES	65
II.1. Matériel	67
II.1.1. Matériel pour les expériences en plaques de microtitration.....	67
II.1.1.1. Plaques de microtitration	67
II.1.1.2. Instruments de mesure de fluorescence pour plaques de microtitration.....	67
II.1.1.2.1. Fonctionnement des appareils : généralités.....	67
II.1.1.2.2. Lecteurs utilisés.....	71
II.1.1.3. Autre matériel pour plaques de microtitration	73
II.1.2. Matériel pour les expériences en format capillaire et lame	73
II.1.2.1. Capillaires et lames.....	73
II.1.2.2. Robot de dépôt.....	73
II.1.2.3. Matériel pour le système fluide.....	75
II.1.2.3.1. Pompe et tubulures.....	75
II.1.2.3.2. Microcellule pour lame.....	75
II.1.2.4. Microscope à fluorescence et matériel associé	75
II.1.3. Autres instruments.....	77
II.2. Réactifs	78
II.2.1. Réactifs chimiques.....	78
II.2.2. Tampons courants.....	78
II.2.3. Fluorophores et <i>quencher</i> s.....	79
II.2.4. Anticorps, standards et échantillons	83
II.2.4.1. Réactifs Substance P.....	83
II.2.4.2. Réactifs β -lactoglobuline	83
II.2.4.3. Réactifs Atrazine.....	87
II.2.4.4. Réactifs Aflatoxine B1.....	87
II.2.4.5. Réactifs Toxine Botulinique A	89
II.2.4.6. Réactifs Ricine.....	89
II.3. Méthodes et protocoles	89
II.3.1. Dosages EIA	89
II.3.1.1. Principe général des dosages EIA.....	90
II.3.1.2. Préparation des traceurs	91

II.3.1.2.1. Traceurs enzymatiques.....	91
II.3.1.2.2. Traceurs biotinylés.....	91
II.3.1.3. Protocoles de coating, de lavage et de révélation des plaques.....	92
II.3.1.4. Dosages par compétition.....	92
II.3.1.4.1. Test de dilution de l'anticorps.....	93
II.3.1.4.2. Etablissement de la courbe d'étalonnage et analyse des données.....	93
II.3.1.4.3. Calcul du pourcentage de réaction croisée entre un analyte et des analogues.....	94
II.3.1.5. Dosages immunométriques.....	94
II.3.2. Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux anti-toxines.....	95
II.3.2.1. Couplage des peptides à la BSA.....	95
II.3.2.2. Immunisations.....	95
II.3.2.3. Titration des sérums en anticorps.....	96
II.3.2.4. Production d'anticorps monoclonaux.....	96
II.3.2.5. Protocole de purification des anticorps par acide caprylique.....	96
II.3.2.6. Etudes de complémentarité des anticorps.....	97
II.3.3. SPIT-FRI.....	97
II.3.3.1. Principe général.....	97
II.3.3.2. Méthode de couplage des anticorps avec les fluorophores et quenchers.....	97
II.3.3.2.1. Principe du couplage.....	97
II.3.3.2.2. Mode opératoire.....	99
II.3.3.2.3. Calcul de la concentration en anticorps et du ratio TMR/Ac après marquage (Rf).....	99
II.3.3.2.4. Vérification des capacités de liaison des anticorps marqués.....	100
II.3.3.2.5. Calcul de l'aire de recouvrement des spectres anticorps et tripode et de Ro.....	100
II.3.3.3. Préparation de fragments d'anticorps Fab, F(ab') ₂ , Ac-red et Fab'.....	101
II.3.3.3.1. Principe de préparation des fragments d'anticorps.....	101
II.3.3.3.2. Mode opératoire.....	101
II.3.3.3.3. Electrophorèses.....	102
II.3.3.4. Préparation des tripodes.....	103
II.3.3.4.1. Tripodes SP.....	103
II.3.3.4.2. Tripodes Atrazine.....	104
II.3.3.4.3. Tripode AFB1.....	105
II.3.3.4.4. Tripodes BLg.....	106
II.3.3.4.5. Tripode Ricine.....	106
II.3.3.5. Protocole général du SPIT-FRI en microplaque.....	107
II.3.3.5.1. Protocole du dosage en microplaque.....	107
II.3.3.5.2. Analyse des données.....	108
II.3.3.6. Protocoles du SPIT-FRI en flux.....	109
II.3.3.6.1. Protocole de silanisation des supports en verre.....	109
II.3.3.6.2. Immobilisation de la neutravidine.....	109
II.3.3.6.3. Protocole de dosage en flux.....	111
II.3.3.6.4. Incubations en conditions statiques.....	112
II.3.3.6.5. Acquisition des images.....	112
II.3.3.6.6. Méthode d'analyse des images.....	113
II.3.4. SPI-FIA.....	113
II.3.4.1. Principe général.....	113
II.3.4.2. Protocoles des dosages immunométriques.....	113
II.3.4.2.1. Protocole « long ».....	113
II.3.4.2.2. Protocole « court ».....	115
II.3.4.3. Protocoles des dosages par compétition.....	115

II.3.4.3.1. Avec immobilisation de l'anticorps	115
II.3.4.3.2. Avec immobilisation de l'analyte (ou analogue de l'analyte)	116
III. RÉSULTATS & DISCUSSION	117
III.1. Mise au point du dosage SPIT-FRI de la Substance P en microplaque	119
III.1.1. Préparation des réactifs (tripode et anticorps marqué)	120
III.1.1.1. Mise au point du tripode Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine	120
III.1.1.2. Marquage de l'anticorps SP31 à la TMR	123
III.1.1.3. Evaluation des propriétés d'immunoréactivité des réactifs	125
III.1.1.4. Evaluation du quenching en conditions homogènes	128
III.1.2. Mesure de fluorescence sur phase solide	130
III.1.2.1. Comparaison de plusieurs lecteurs	130
III.1.2.2. Comparaison de plusieurs plaques de microtitration	132
III.1.2.3. Tampon de lecture	132
III.1.3. Mise au point du dosage	134
III.1.3.1. Description de la méthode	134
III.1.3.2. Optimisation des conditions d'incubation	139
III.1.3.2.1. Tampon, pH, température et durée d'incubation	139
III.1.3.2.2. Influence de la concentration en tripode	141
III.1.3.2.3. Déplacements successifs par la SP	143
III.1.3.3. Validation du dosage	145
III.1.3.3.1. Répétabilité et reproductibilité	145
III.1.3.3.2. Mesures dans des échantillons biologiques	145
III.1.4. Evaluation de différents paramètres en vue d'optimiser le dosage	147
III.1.4.1. Durée des étapes d'incubation	147
III.1.4.2. Modification du rapport accepteur/donneur	151
III.1.4.3. Comparaison de différents anticorps anti-SP	153
III.1.4.4. Utilisation de fragments de l'anticorps SP31	158
III.1.4.5. Comparaison de plusieurs couples (donneur, accepteur)	162
III.1.5. Discussion – conclusion	168
III.2. Evaluation du SPIT-FRI sur des modèles de petites molécules chimiques et protéiques	171
III.2.1. Essais d'adaptation du SPIT-FRI à l'Aflatoxine B1 et à l'Atrazine	171
III.2.1.1. Modèle Atrazine	173
III.2.1.1.1. Choix des anticorps et spécificité	173
III.2.1.1.2. Préparation des tripodes Atz	175
III.2.1.1.3. Tests de quenching par les anticorps marqués à l'A647	177
III.2.1.1.4. Déplacement par l'atrazine	179
III.2.1.2. Aflatoxine	181
III.2.1.2.1. Choix des anticorps et spécificité	181
III.2.1.2.2. Préparation du tripode AFB1 et marquage des anticorps	183
III.2.1.2.3. Tests de quenching et dosage SPIT-FRI	183
III.2.1.3. Conclusions	183
III.2.2. Evaluation du SPIT-FRI sur des modèles protéiques	185
III.2.2.1. β -lactoglobuline	186
III.2.2.1.1. Préparation du tripode	186
III.2.2.1.2. Préparation des anticorps couplés à la TMR	194

III.2.2.1.3. Tests de quenching et de déplacement	196
III.2.2.1.4. Couple (A532, A647)	197
III.2.2.1.5. Conclusions.....	200
III.2.2.2. Toxine Botulinique	201
III.2.2.2.1. Stratégie d'immunisation	201
III.2.2.2.2. Immunisations avec le fragment protéique Hc/TBA	201
III.2.2.2.3. Immunisations peptidiques.....	211
III.2.2.2.4. Conclusions.....	212
III.2.2.3. Ricine.....	213
III.2.2.3.1. Obtention d'anticorps monoclonaux anti-Ricine	213
III.2.2.3.2. Evaluation du SPIT-FRI appliqué à la Ricine	215
III.2.3. Discussion-conclusion.....	217
III.3. Transposition du SPIT-FRI à un dosage en flux	221
III.3.1. Expériences en capillaire.....	223
III.3.1.1. Expériences en conditions statiques	223
III.3.1.1.1. Mesure de la fluorescence d'une gamme de tripode en solution	223
III.3.1.1.2. Vérification de l'immobilisation du tripode sur phase solide	223
III.3.1.1.3. Comparaison du quenching en statique avec différents couples (Donneur, Accepteur).....	226
III.3.1.1.4. Expériences de déplacement/régénération en conditions statiques	229
III.3.1.1.5. Essais de sensibilisation et mise en évidence du photoblanchiment	232
III.3.1.2. Expériences avec circulation de fluide	233
III.3.1.2.1. Distribution de la fluorescence le long d'un capillaire	233
III.3.1.2.2. Mesure du quenching/déplacement en flux et en continu.....	235
III.3.1.2.3. Mesure de la dissociation et du déplacement avec circulation de fluide	238
III.3.2. Expériences en lame.....	240
III.3.2.1. Greffage du tripode sur les lames	240
III.3.2.1.1. Mise au point du protocole	240
III.3.2.1.2. Morphologie des plots.....	242
III.3.2.2. Modèle Substance P.....	243
III.3.2.2.1. Conditions d'incubation statique.....	243
III.3.2.2.2. Conditions d'incubation dynamique	244
III.3.2.3. Modèle Atrazine	247
III.3.2.3.1. Gammes de tripode et d'anticorps en conditions statiques.....	247
III.3.2.3.2. Conditions d'incubation dynamique	247
III.3.3. Essai de détection simultanée de 2 molécules.....	248
III.3.4. Discussion-conclusion.....	249
III.4. Etude d'une nouvelle méthode de dosage immunofluorescent (SPI-FIA)	251
III.4.1. Mise en évidence du phénomène de diminution de fluorescence sur phase solide	253
III.4.1.1. Expériences d'adsorption de protéines et peptides fluorescents sur phase solide.....	253
III.4.1.2. Expériences de capture de molécules fluorescentes biotinylées par la neutravidine immobilisée... 255	
III.4.1.3. Expériences de capture de molécules fluorescentes par des anticorps immobilisés	257
III.4.1.4. Comparaison de plaques et lecteurs de plaques.....	257
III.4.1.5. Discussion.....	257
III.4.2. Mise au point d'un dosage par compétition avec immobilisation de l'anticorps (modèle BLg)	259
III.4.2.1. Comparaison de différents fluorophores.....	259
III.4.2.2. Mise au point du dosage. Comparaison de la mesure en point final et en cinétique.....	259

III.4.3. Mise au point d'un dosage par compétition avec immobilisation d'un analogue de l'analyte (modèle Aflatoxine B1).....	263
III.4.3.1. Mesure du « quenching apparent » sur phase solide pour les anticorps ATB-A647 et AFA-A647	263
III.4.3.2. Dosage par compétition des aflatoxines AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2	265
III.4.4. Mise au point d'un dosage en format immunométrique (modèle Ricine)	268
III.4.4.1. Choix des anticorps	268
III.4.4.1.1. Présélection des anticorps	268
III.4.4.1.2. Choix du fluorophore et marquage des anticorps.....	271
III.4.4.1.3. Choix du couple avec le traceur fluorescent.....	271
III.4.4.2. Validation du dosage	273
III.4.4.2.1. Mesure en point final	273
III.4.4.2.2. Comparaison de la mesure de l'atténuation de fluorescence et de la mesure de la fluorescence sur phase solide	273
III.4.4.2.3. Analyse cinétique	276
III.4.4.2.4. Evaluation de la reconnaissance des chaînes A et B de la Ricine par le dosage.....	277
III.4.5. Mise au point d'un dosage simultané de deux molécules en format immunométrique (modèle BLg sous forme native et Rcm-BLg)	280
III.4.5.1. Dosages séparés.....	280
III.4.5.1.1. Modèle BLg.....	280
III.4.5.1.2. Modèle Rcm-BLg	284
III.4.5.2. Dosage simultané de la BLg native et de la Rcm-BLg	284
III.4.6. Discussion-conclusion.....	287
IV. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	293
Communications	307
Liste des figures	317
Liste des tableaux	322
Abréviations	323
Références bibliographiques	325
Résumé / Abstract	336

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

La découverte du système immunitaire représente une étape majeure de l'histoire des Sciences de la Vie. Ses répercussions ont été extrêmement importantes et ont permis des applications prophylactiques, diagnostiques et thérapeutiques. L'interaction antigène-anticorps, support de la spécificité immunologique, est aujourd'hui utilisée à la fois comme modèle d'étude des interactions moléculaires et comme outil de détection et de quantification, notamment dans le cadre des dosages immunologiques.

Apparus dans les années 1960, les dosages immunologiques ont été développés en tant qu'outils de recherche et de diagnostic dans tous les domaines de la biologie et de la médecine. Ces méthodes d'analyse se sont imposées dans le domaine clinique comme un outil essentiel (ex : SIDA, hépatites, endocrinologie), ainsi que dans le secteur de la pharmacologie, notamment pour le suivi thérapeutique de médicaments. Par ailleurs, depuis les années 1990, de nouveaux domaines d'application des dosages immunologiques ont émergé : l'agro-alimentaire (pour le contrôle qualité des aliments) et l'environnement (pour la détection de produits contaminants). Comme ces applications requièrent une détection fréquemment répétée, l'idée d'un « immunocapteur » qui réaliserait un dosage immunologique en continu a vu le jour. Dans ce cadre, l'immunoanalyse a vu son domaine d'application s'élargir pour rejoindre celui des biocapteurs.

Fort de la compétence du Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse (LERI), et bénéficiant d'une collaboration avec le Laboratoire d'Electronique et des Technologies de l'Information (LETI) dans les domaines de l'instrumentation et la détection optique, un nouveau projet a démarré au laboratoire, visant à développer un immunocapteur en flux continu utilisant une détection par fluorescence pour la surveillance des agents de la menace biologique. Dans ce contexte, cette thèse avait pour but d'étudier une nouvelle méthode de dosage immunofluorescent adaptable en flux.

Dans ce chapitre introductif, nous nous attacherons d'abord à montrer l'importance de la mise au point de systèmes de détection précoce dans le cadre du bioterrorisme et les contraintes spécifiques requises dans cette perspective d'application. Nous présenterons les principes de base des dosages immunologiques ainsi que les méthodes de détection par fluorescence, et

Tableau 1 : Principaux agents du bioterrorisme

Classe	Caractéristiques	Agent
Classe A	Faciles à produire Faciles à disséminer ou transmissibles de personne à personne Létalité importante Panique et désordre social assurés	<i>Bacillus anthracis</i> (anthrax)
		<i>Variola major</i> (variole)
		Toxines de <i>Clostridium botulinum</i> (botulisme)
		<i>Yersinia pestis</i> (peste)
		Virus <i>Marburg</i> , <i>Ebola</i> , <i>Lassa</i> (fièvres hémorragiques virales)
		<i>Francisella tularensis</i> (tularémie)
Classe B	Faciles à disséminer Morbidité modérée Létalité faible	<i>Coxiella burnetii</i> (fièvre Q)
		<i>Brucella</i> (brucellose)
		<i>Burkholderia mallei</i>
		<i>Chlamydia psittacii</i>
		Toxine de <i>Clostridium perfringens</i>
		<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Escherichia Coli</i>
		Ricine
		Entérotoxine B de <i>Staphylococcus aureus</i>
		<i>Rickettsia prowazekii</i> (typhus) et <i>R. rickettsii</i>
		Encéphalites virales
<i>Vibrio cholerae</i> (choléra)		
Classe C	Agents devant être modifiés en laboratoire pour favoriser une dissémination de masse Disponibilité Facilité de production et de dissémination Possibilité de morbidité et de mortalité élevées	Maladies infectieuses émergentes (ex : Virus de Nipah, hantavirus)

(Source: site internet du Center for Disease Control and Prevention, 2006)

notamment *via* un transfert d'énergie par résonance, phénomène sur lequel repose le procédé de détection étudié. Nous décrirons par la suite le principe des dosages immunologiques en flux. Nous présenterons alors le format de dosage proposé, les molécules-modèles employées pour la mise au point de ce procédé et définirons les objectifs de la thèse.

I.1. Détection des agents de la menace biologique

Si l'emploi d'agents biologiques comme arme existe depuis l'Antiquité, la menace est grandissante depuis une vingtaine d'années¹. D'après le Pr. P. Binder, « le terrorisme, et notamment le bioterrorisme, ne peut plus être exclu des scénarios de conflits auxquels nos pays sont confrontés » (Binder *et al.*, 2003). Face à cette menace, une posture de défense réaliste doit être adoptée, et comme nous allons le voir, celle-ci passe, en premier lieu, par la recherche et le développement de systèmes de détection précoce des agents incriminés.

I.1.1. Description des agents de la menace biologique

Il ne s'agit pas ici de faire une description exhaustive des différents agents de la menace biologique. L'objectif est ici d'exposer la diversité des substances et des voies de contamination pouvant être employées, afin de cerner les contraintes spécifiques concernant les méthodes de détection à mettre en place. A titre d'exemple, deux toxines, la toxine botulinique et la ricine, qui ont été employées dans cette thèse, seront rapidement présentées.

I.1.1.1. Définition

Les agents de la menace biologique sont des organismes vivants ou des molécules issues d'organismes vivants qui ont été ou peuvent être utilisés dans le cadre d'actions terroristes pour empoisonner une partie plus ou moins importante de la population civile.

Il est à noter que nous distinguons les agents de la menace des agents de la guerre biologique. Ces derniers sont utilisés comme armes lors d'opérations militaires, sur le champ d'opération. Ils doivent être à action rapide et à dissémination contrôlée ; les vecteurs sont des obus ou des missiles pour une attaque ciblée. Dans le cadre d'une attaque terroriste, les agents sont disséminés plutôt par la voie de l'eau, de l'air ou de l'alimentation, pour atteindre une partie plus ou moins importante de la population civile (Binder *et al.*, 2003).

¹ Pour une revue concernant l'emploi des armes biologiques dans l'Histoire, le lecteur peut se référer à Eitzen *et al.* (1997).

1.1.1.2. Les principaux agents

Les agents de la menace peuvent être aussi bien des bactéries, des virus ou des toxines. Selon leurs caractéristiques en terme de contagiosité, facilité de dissémination, et gravité des symptômes, ces agents ont été classés en 3 catégories (A, B, C) par le *Center for Disease Control and Prevention* aux Etats-Unis, comme montré dans le Tableau 1 (p.18).

La catégorie A rassemble les micro-organismes ou toxines dont le risque est le plus élevé, à dissémination aisée ou à fort pouvoir contagieux, induisant une mortalité élevée (ex: 30 % pour la variole). L'utilisation de tels agents risque très probablement de déclencher une réaction de panique au sein de la population. Entrent dans cette catégorie aussi bien des virus (virus de la variole, fièvres hémorragiques virales Ebola, Marburg, Lassa) ; des bactéries : *Bacillus anthracis* (bactérie du charbon), *Yersinia pestis* (peste) et *Francisella tularensis* (tuléramie) ; et les toxines de *Clostridium botulinum* (botulisme) (Darling *et al.*, 2002).

La catégorie B correspond aux micro-organismes ou toxines plus difficiles à disséminer ou à produire, ou entraînant des maladies moins graves. Cette liste étant très longue, nous ne citerons que quelques agents : les bactéries *Brucella* (brucelloses), *Coxiella burnetii* (fièvre Q) et *Rickettsia prowazckii* (typhus), les virus de la typhoïde (*Salmonella typhi*), du choléra (*Vibrio cholerae*), et deux toxines, la ricine et l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* ou SEB (Moran, 2002).

Enfin, les maladies émergentes telles que celles transmises par le virus de Crimée Congo, le virus de Nipah ou la grippe, ou encore les micro-organismes génétiquement modifiés (comme les mycobactéries multirésistantes de la tuberculose) entrent dans la catégorie C (cf. Moran, 2002).

1.1.1.3. Voies de contamination

Selon les caractéristiques propres de chaque agent et les cibles visées, différentes voies de contamination pourraient être utilisées pour empoisonner les populations dans le cadre d'actions terroristes.

Tout d'abord, certains agents infectieux par voie respiratoire (comme les agents du charbon, de la tularémie, de la fièvre Q, du typhus, de la variole et de la peste) et, vraisemblablement, un certain nombre de toxines, telles que les toxines botuliniques, pourraient être diffusés sous forme d'aérosols par voie aérienne (ex : à travers les climatiseurs, par épandage par avion ou hélicoptère, ou par une dispersion à l'aide d'une bombe). De plus, les agents de toxi-infections alimentaires (ex: *Escherichia coli*) et les toxines, en particulier la ricine et la toxine

botulinique, pourraient être diffusés par la voie de l'eau et des aliments, en étant par exemple introduits dans des containers de boissons (ex : réservoir d'eau potable). Enfin, comme ceci a été vu aux Etats-Unis lors des attentats de 2001, la voie cutanée peut être la source de l'infection pour la bactérie du charbon, mais aussi de la tularémie ainsi que le virus de la variole, ce dernier représentant un danger particulier en raison de son extrême contagiosité.

1.1.1.4. Exemples : toxine botulinique A et ricine

1.1.1.4.1. La toxine botulinique (type A)

Les toxines botuliniques sont produites par différentes espèces de *Clostridium* neurotoxino-gènes, bactéries anaérobies strictes et sporulées présentes dans l'environnement (sol, eau, sédiments aquatiques). Il existe 7 types de toxines botuliniques (A-G)², qui diffèrent par leurs propriétés antigéniques. Le botulisme humain est essentiellement associé aux sérotypes A, B et E, et exceptionnellement C et F, le sérotype A étant le plus dangereux.

La structure de la toxine botulinique de type A (TBA) est présentée sur la Figure 1 (p.22). Elle est en fait synthétisée sous la forme d'un précurseur, une chaîne protéique de 1296 résidus constituée de trois domaines fonctionnels d'environ 50 kDa chacun : le domaine catalytique (résidus 1-437), correspondant à la future chaîne légère de la protéine, le domaine de translocation (résidus 448-872) et le domaine de liaison (résidus 873-1295), correspondant respectivement aux parties N- et C-terminales de la future chaîne lourde (Lacy *et al.*, 1998). Ce précurseur est activé par clivage protéolytique grâce à des protéases d'origine digestive comme la trypsine (DasGupta & Dekleva, 1990), ou bien produites par la bactérie elle-même. De cette coupure protéolytique, il résulte une protéine de 1285 résidus, constituée de deux chaînes polypeptidiques : une chaîne lourde de 100 kDa, et une chaîne légère de 50 kDa, réunies par un pont disulfure.

La partie C-terminale de la chaîne lourde de la TBA reconnaît un récepteur (non identifié à l'heure actuelle) à la surface des extrémités nerveuses démyélinisées. La toxine toute entière fixée sur son récepteur est internalisée dans une vésicule d'endocytose. L'acidification des vésicules d'endocytose stimule le phénomène de translocation qui consiste dans le passage de la chaîne légère à travers la membrane vésiculaire. La chaîne légère est le domaine de la toxine botulinique qui est actif intracellulairement et qui conduit au blocage de la libération des neurotransmetteurs.

² Concernant la structure et le mode d'action des toxines botuliniques, le lecteur peut se référer à la revue de Middlebrook et Franz (1997).

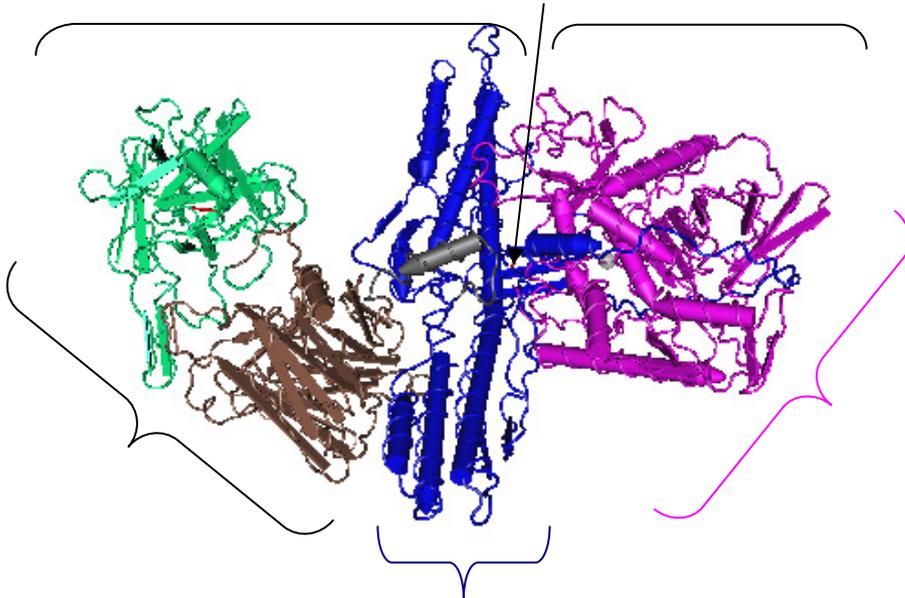


Figure 1 : Structure de la neurotoxine botulinique de *Clostridium botulinum* (sérotypage A)

La TBA (1285 acides aminés, 150 kDa) est constituée de deux chaînes protéiques reliées par un pont disulfure, et contient trois domaines fonctionnels. La chaîne légère, de 50 kDa, correspond au domaine catalytique (résidus 1-437). La chaîne lourde comporte le domaine de translocation (résidus 448-872), et le domaine de liaison (résidus 873-1295), de 50 kDa chacun. (Source : Molecular Modeling Database)

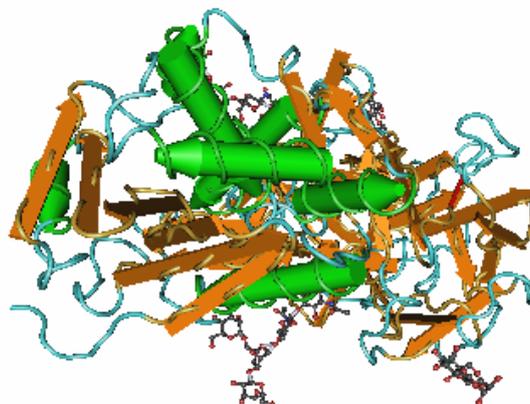


Figure 2 : Structure tridimensionnelle de la Ricine

Structure de la Ricine (*Ricinus communis*), 62 kDa. (Source : Molecular Modeling Database).

Les symptômes d'une intoxication à la TBA sont des nausées et vomissements (associés à des crampes abdominales dans le cas de l'ingestion), puis une paralysie générale partant de la tête jusqu'aux poumons, avec insuffisance respiratoire, pouvant conduire à la mort. Ces symptômes apparaissent dans les 8 à 36 heures après l'intoxication. La dose létale exacte n'est pas connue mais a été estimée par des études de toxicité sur les primates. Par extrapolation, les doses létales de la TBA sont, pour un homme de 70 kg, approximativement 0,09-0,15 µg par injection intraveineuse ou intramusculaire (Scott & Suzuki, 1988), 0,7-0,9 µg par inhalation, et 70 µg par voie orale (Arnon *et al.*, 2001).

Une immunothérapie trivalente (sérotypes ABE) est disponible aux USA ; une thérapie heptavalente est détenue par l'armée américaine (Hibbs *et al.*, 1996). De plus, les résultats sont positifs aussi bien avant ou après l'exposition. Cependant, en raison de l'immunogénicité des anticorps animaux (risques d'allergies et chocs anaphylactiques), de nombreuses études sont encore nécessaires pour « humaniser » les anticorps et produire de véritables médicaments. De nombreuses études sont en cours pour trouver d'autres traitements. Nous pouvons citer notamment les traitements par inhibition de la fixation de la toxine sur les récepteurs cellulaires à la surface des cellules nerveuses démyélinisées ou par inhibition de la protéolyse empêchant le clivage des protéines (VAMP, SNAP-25, Syntaxine) spécifiques du mécanisme d'exocytose des neuromédiateurs (acétylcholine) par utilisation de substrats analogues de la protéase (chaîne légère) (Rainey & Young, 2004). Enfin, des travaux récents de l'équipe du Dr Janda du Scripps Institute, qui mettent en évidence une diminution de la toxicité de la toxine après irradiation en présence de riboflavine, ouvrent de nouvelles perspectives concernant le traitement du botulisme par photothérapie (Eubanks *et al.*, 2005).

I.1.1.4.2. La ricine

La ricine, glycoprotéine de 62 kDa, est présente à une concentration variant de 1 à 10 % dans la graine de ricin (*Ricinus communis*, *Ricinus sanguineus*), plante spontanée des régions tropicales et tempérées, également cultivée comme plante d'ornement ou à des fins commerciales pour l'extraction de l'huile. Cette protéine est constituée de 2 chaînes de taille similaire reliées par un pont disulfure, la chaîne A et la chaîne B (voir Figure 2, p.22). La chaîne B est une lectine qui se lie spécifiquement aux résidus galactose à la surface cellulaire et permet l'endocytose de la molécule (Nicolson, 1974). Dans le cytoplasme de la cellule, la chaîne A se sépare de la chaîne B et inactive la sous-unité ribosomale 60S, entraînant l'arrêt de la synthèse protéique, et donc la mort cellulaire (Olsnes & Pihl, 1973). La coupure du pont disulfure entraîne l'inactivation de la ricine.

Depuis sa découverte dans les années 1880, cette toxine a été très étudiée aussi bien en recherche fondamentale que médicale. La ricine est un des composés les plus toxiques connus, avec une DL50 de 2,7 µg/kg chez la souris par injection intraveineuse (Foxwell *et al.*, 1985). Chez l'homme, suite à une ingestion, les symptômes sont des douleurs abdominales, vomissements et diarrhées, les organes atteints étant le foie, les reins et la rate. Par inhalation, la toxine cause fièvre, nausées et difficultés respiratoires, qui peuvent aller jusqu'à un œdème pulmonaire. La dose létale est de 1 mg/kg (1 mg de toxine représentant environ 2 à 6 graines de ricin). Il n'existe pas de traitement spécifique : le traitement est essentiellement symptomatique. La recherche d'anticorps monoclonaux à visée thérapeutique est en cours. (pour une revue générale, cf. Doan, 2004)

Elle est donc plus de 1000 fois moins toxique que la toxine botulinique mais présente d'autres caractéristiques qui en font un agent redoutable dans le cadre d'une attaque bioterroriste. En effet, la purification de ricine est assez facile et peu onéreuse dans un laboratoire. De plus, le ricin est une plante très répandue. Pour la production d'huile de ricin (applications industrielles), on traite chaque année un million de tonne de graines de ricin (les tourteaux contiennent environ 5 % de ricine). Enfin, le caractère hydrosoluble de la ricine en fait un agent potentiellement utilisable pour contaminer l'eau de boisson. Elle pourrait être dissoute dans l'eau de distribution, introduite dans un aliment ou encore dispersée par aérosol (Doan, 2004 ; Slater & Greenfield, 2003).

I.1.2. Importance de la détection précoce des agents de la menace

Pour faire face à la menace bioterroriste, il est nécessaire d'avoir une approche globale pour la mise en place de moyens de défense complémentaires pouvant être employés à différents stades d'une éventuelle attaque. Le plan Biotox, mis en place en 1999 en France, présente 3 volets : la prévention des risques (sécurisation des lieux sensibles), la surveillance (surveillance épidémiologique, détection et diagnostic) et de gestion de crise (dispositif d'intervention, prévention des risques de transmission, traitements). Parmi ces actions, la détection précoce des agents de la menace est particulièrement importante notamment du fait de :

- *l'inadéquation de la stratégie vaccinale*

Il est à noter qu'un certain nombre de vaccins sont disponibles contre plusieurs agents, notamment la variole, l'anthrax (BioThrax™, voir Pittman *et al.*, 2005) et la toxine botulinique (pour revue, cf. Cohen & Marshall, 2001 ; Hassani *et al.*, 2004). Cependant, leur

utilisation ne paraît pas adéquate pour répondre à la menace terroriste (Binder *et al.*, 2003). Il ne paraît en effet pas raisonnable de vacciner toute une population de façon systématique contre un éventail d'agents peu susceptibles d'engendrer des épidémies naturelles, sous prétexte d'une potentielle attaque à très faible probabilité. Par ailleurs, cette stratégie engendrerait des coûts extrêmement importants (développement du vaccin, autorisation de mise sur le marché, vaccinations), serait lourde à mettre en place, et est susceptible de présenter des effets secondaires. L'utilité éventuelle des vaccins concerne la protection ciblée des militaires et des équipes médicales de première intervention.

- *la difficulté de diagnostic et de traitement*

Le diagnostic clinique peut présenter plusieurs difficultés, les symptômes étant variés selon les agents (ex : pneumonies, difficultés respiratoires, gastroentérites, fièvres). De plus, il s'agit de maladies rares, auxquelles les équipes médicales n'ont peut-être jamais été confrontées, et certaines confusions sont possibles (ex : variole/varicelle). Les antibiotiques peuvent être utilisés contre les affections d'origine bactérienne telles que l'anthrax (fluoroquinolones), la tularémie ou la peste (gentamicine), mais à condition qu'ils soient administrés de manière suffisamment précoce (avant 6 jours). De même, des traitements par immunothérapie ³, conférant une protection rapide, ont été mis au point récemment pour un certain nombre d'agents, mais l'injection doit se faire rapidement après la contamination (notamment pour les toxines dont l'action est très rapide) (Franz *et al.*, 1997).

- *la difficulté de la surveillance épidémiologique*

La surveillance épidémiologique, si elle est nécessaire, ne peut cependant pas être à elle seule garante d'une surveillance suffisante en l'absence de système de détection préalable. En effet, dans ce cas, la première indication d'une attaque biologique serait l'émergence d'une maladie rare ou inattendue et/ou l'observation d'une augmentation dramatique du nombre de cas. Le défi serait d'identifier le premier cas de la maladie, et de détecter les cas survenant en même temps ou consécutivement pour éviter la crise. Différents critères peuvent aider à conclure à l'acte terroriste, comme l'évolution de l'épidémie dans le temps (par exemple le nombre de personnes contaminées en même temps), et dans l'espace (la distribution géographique). Par exemple, l'épidémie de fièvre hémorragique de Crimée-Congo dans les Balkans (qui a eu lieu durant la période printemps-été 2001) était une résurgence de cette maladie endémique, tandis

³ L'immunothérapie consiste en l'apport exogène d'anticorps spécifiques qui peuvent neutraliser la molécule (par inhibition de la fixation sur le récepteur cible) et/ou provoquer sa destruction par d'autres effecteurs du système immunitaire.

qu'en France, l'émergence d'une telle maladie serait suspecte. De plus, certaines épidémies ont une distribution saisonnière (par exemple, dans l'hémisphère nord, une épidémie de grippe en été serait suspecte). Cependant, différencier une attaque bioterroriste d'une épidémie naturelle pourrait s'avérer délicat dans certains cas et retarder la mise en place des moyens de protection de la population civile.

Ces différents éléments montrent l'importance de l'enjeu de développer un panel de méthodes de détection précoce des agents de la menace. On peut raisonnablement penser que disposer de telles méthodes permettrait d'avoir un effet dissuasif (pas de tentative d'attentat) et/ou défensif (détection suffisamment précoce à la source de la contamination pour pouvoir mettre en place des plans d'actions). Cependant, elles sont difficiles à mettre au point en raison d'un certain nombre de contraintes spécifiques.

I.1.3. Systèmes de détection des agents de la menace

I.1.3.1. Contraintes spécifiques

Un certain nombre d'éléments rendent difficile la mise au point de systèmes de détection performants et efficaces des agents de la menace. D'après le Lawrence Livermore National Laboratory aux USA (cf. Dye, 2002), les systèmes de détection pour les agents de la menace devraient, dans l'idéal :

- posséder une extrême sensibilité, du fait de la toxicité extrême des agents incriminés ;
- fournir une réponse dans un délai extrêmement court (les délais d'incubation des agents étant généralement brefs, certains présentant de surcroît un risque d'épidémie) ;
- être d'une grande fiabilité et d'une grande spécificité, un faux positif (fausse alerte) étant susceptible d'engendrer une panique générale et un faux négatif pouvant avoir des conséquences désastreuses ;
- être robustes pour une mesure dans l'eau de rivière ou les matrices alimentaires par exemple ;
- être transportables, pour pouvoir être utilisés sur le terrain ;
- être faciles d'utilisation voire autonomes, pour pouvoir être employés par des non-spécialistes sur le terrain, ou réaliser une mesure en continu dans des lieux sensibles ;
- permettre la détection simultanée d'un grand nombre d'agents de nature et taille variées, ceux-ci étant potentiellement extrêmement nombreux et diversifiés (bactéries, virus, protéines) ;
- présenter une certaine flexibilité (possibilité d'ajout d'une molécule à détecter dans le panel des molécules cibles par exemple).

Il est à noter que la quantification (impliquant le dosage des molécules et non uniquement la détection) n'arrive qu'en second plan, la simple présence d'un agent suspect pouvant être généralement suffisante pour donner l'alerte.

1.1.3.2. Niveaux de surveillance et niveaux d'autonomie des systèmes de détection

L'objectif est donc de s'approcher au maximum de ces spécificités. Cependant, au vu de ce cahier des charges impressionnant, il paraît difficile, à l'heure actuelle, de mettre au point un appareil unique qui pourrait répondre à toutes ces contraintes simultanément. Plusieurs axes de recherche ont été développés dans le but d'assurer une surveillance à différents niveaux :

- la surveillance « active de niveau 1 » : La surveillance active implique une intervention humaine pour le prélèvement d'échantillons, qui sont acheminés au laboratoire pour réaliser le test. On attend avant tout de ces tests une extrême précision et sensibilité.
- la surveillance « active de niveau 2 » : Elle implique également une intervention humaine pour le prélèvement, mais la mesure se fait sur le terrain. Le test doit être surtout rapide, facile à mettre en œuvre et robuste.
- la surveillance « passive » : dans ce cadre, on envisage la mise au point de systèmes de détection complètement autonomes et automatisés, qui ne nécessitent pas d'intervention humaine pour prélever des échantillons et/ou faire la mesure destinés plutôt à la mesure en continu dans des lieux sensibles (réservoirs d'eau potable par exemple) ou peu accessibles.

Ces niveaux de surveillance correspondent à différents niveaux d'intégration et d'autonomie des systèmes de détection qui peuvent être faibles (appareil de laboratoire), moyenne (mesure sur le terrain nécessitant l'intervention humaine), ou élevée (mesure autonome).

1.1.3.3. Une diversité de techniques

De nombreuses équipes travaillent à la mise au point de détection des agents de la menace depuis les attentats de 2001. La plupart des travaux antérieurs à cette date concernant le développement de systèmes de détection plus ou moins similaires en terme de contraintes (dosage dans l'air, l'eau, les aliments) sont relatifs au domaine environnemental ou de l'agro-alimentaire.

En 2002, on pouvait compter 55 systèmes de détection portables dédiés aux agents de la menace pour lesquels les informations étaient disponibles (Bravata *et al.*, 2004). Seuls 8 d'entre eux avaient publié des données relativement précises en terme de performances qui restaient généralement insuffisantes.

Les techniques utilisées pour la mise au point des systèmes de détection sont diverses. Il s'agit principalement de méthodes d'analyse par spectrométrie de masse, de méthodes impliquant la mesure du taux de particules dans l'air, de systèmes d'analyse par PCR (Polymerase Chain Reaction) et de systèmes immunoanalytiques (pour revue, cf. Walt & Franz, 2000).

Les méthodes par spectrométrie de masse ont pu être utilisées aussi bien pour la détection de petits composés chimiques et de toxines (pour revue, cf. Kientz, 1998 ; Lebedev, 2005).

Les systèmes réalisant une mesure du taux de particules dans l'air sont généralement basés sur l'absorbance des substances biologiques dans l'UV (absorbance spécifique du tryptophane). On peut citer le système JBPDS (*Joint Biological Remote Early Warning*) par exemple (voir Walt & Franz, 2000).

Les systèmes PCR permettent la détection de bactéries ou virus. Les systèmes les plus connus sont le Light Cycler (Roche), le système RAPID (*Ruggedized Advanced Pathogen Identification Device*, Idaho Technology) et le Smart Cycler (Cepheid) qui présentent des caractéristiques relativement équivalentes. Ils ont été par exemple appliqués à la détection de *Bacillus anthracis*, *Brucella species*, *Clostridium botulinum*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Staphylococcus aureus* et *Yersinia pestis* (Christensen *et al.*, 2006). Idaho Technology a développé également un système portable fonctionnant sur batterie (RAZOR) de 4,1 kg analysant 12 échantillons de 100 µL en 30 minutes (voir référence Idaho Technology).

Les systèmes immunoanalytiques peuvent permettre la détection de substances variées (bactéries, virus, toxines, petites molécules). Parmi les systèmes immunoanalytiques, des tests immunochromatographiques sur membrane ou « bandelettes » permettant une détection sur le terrain ont pu être développés. Ces tests sont utilisés depuis plusieurs années pour le diagnostic (Birnbaum *et al.*, 1992). Ces méthodes présentent l'avantage d'être rapides (10-15 min) et pratiques pour une détection sur le terrain, nécessitent peu de manipulation (trempage ou dépôt) et sont peu coûteux. La lecture est le plus souvent qualitative ou semi-quantitative et se fait à l'œil. Les systèmes ALERT pour « *Antibody-based Lateral Flow Economical Recognition Ticket* » et SMART pour « *Sensitive Membrane Antigen Rapid Test* » sont utilisés pour la détection de *B. anthracis* (New Horizons Diagnostics Corp.). On peut citer aussi par exemple pour la ricine le travail de Shyu *et al.* (Shyu *et al.*, 2002) permettant la détection de 50 ng/mL de ricine en moins de 10 minutes sur « bandelette ».

Parmi les systèmes de détection, le RaptorTM (*Rapid Automatic and Portable Fluorometer Assay System*) permet une détection simultanée de 4 analytes sur un même échantillon

(Anderson *et al.*, 2000). La mesure est réalisée en séquentiel et le délai de réponse est d'environ 8 minutes. Il contient un support permettant la reconnaissance des molécules qui peut être utilisé jusqu'à 30 fois de suite ou jusqu'à l'apparition d'un signal positif. Dans ce cas, il est nécessaire de renouveler ce support. L'appareil fait au total 6,8 kg, donc peut être porté par un seul homme. Il a pu être appliqué à la détection de plusieurs agents (entérotoxine B, ricine, *Francisella tularensis*, et *Bacillus globigii*).

Parmi les systèmes les plus récents et les plus aboutis, on peut citer le système APDS (*Autonomous Pathogen Detection System*) développé par le Lawrence Livermore National Laboratory (Hindson *et al.*, 2005) combinant une détection PCR et immunoanalytique, destiné à la détection des agents de la menace sous forme d'aérosol. Ce système est complètement automatisé et peut fonctionner durant 7 jours consécutifs de façon autonome. L'ensemble du dispositif pèse 170 kg. Le collecteur prélève 3300 L d'air par minute, les molécules sont piégées dans 4 mL d'eau et l'analyse est répétée toutes les heures. Il est à noter que ce système est extrêmement récent puisqu'il a été publié en 2005.

Les systèmes immunoanalytiques sont particulièrement intéressants car ils sont potentiellement applicables au spectre très large des agents de la menace - virus, bactéries et toxines, ces dernières ne pouvant pas être détectées par les appareils PCR. Ils sont basés sur les propriétés remarquables de spécificité et d'affinité des anticorps qui ont permis le développement de nombreux dosages immunologiques depuis presque 50 ans et dont le principe est détaillé dans la partie suivante.

I.2. Dosages immunologiques

I.2.1. L'interaction antigène-anticorps

I.2.1.1. Définition des anticorps et antigènes

Les anticorps (Ac) ou immunoglobulines (Ig) constituent un des principaux composants du système immunitaire permettant d'assurer la défense de l'organisme contre l'intrusion de pathogènes. La majorité des anticorps circulants (véhiculés par le sang) sont produits par les plasmocytes correspondant aux lymphocytes B différenciés en réponse à la pénétration dans l'organisme d'une substance exogène. Cette production d'anticorps contre un « agresseur » n'est en fait qu'une partie de la réponse immunitaire (réponse humorale). L'introduction d'une substance immunogène dans l'organisme stimule un grand nombre de lymphocytes, qui

Tableau 2 : Origines de l'immunoanalyse

Année	Auteur	Découverte ou développement de méthode
1890	Von Behring	Les antitoxines
1896	Gruber et Durham	L'agglutination
1892	Fisher	Le modèle "serrure-clé" (<i>lock and key</i>)
1897	Ehrlich	Les bases chimiques de la spécificité antitoxique
		Théorie de la chaîne latérale (<i>side-chain theory</i>)
1897	Kraus	La précipitation
1917	Landsteiner	Les haptènes synthétiques
1929	Heidelberger	La sérologie chimique quantitative
1937	Langmuir et Schaefer	L'immunodosage à phase solide (première description)
1938	Kabat	Les anticorps sont des gammaglobulines
1942	Coons	L'immunofluorescence
1946	Oudin et Ouchterlöny	L'immunodiffusion
1953	Grabar	L'immunoélectrophorèse
1958	Porter	La structure des immunoglobulines
1959	Edelman	La séquence d'une immunoglobuline
1959	Yalow & Berson	Les dosages radioimmunologiques
1966,1967	Wide et Porath, Catt et Tregear	L'utilisation d'anticorps liés de façon covalente à une phase solide
1967,1968	Wide <i>et al.</i> , Miles et Hales	Le dosage immunoradiométrique
1971	Engvall et Perlman	Le dosage enzymo-immunologique
1972	Ling et Overby	Le dosage immunoradiométrique à deux sites (dosage sandwich)
1973	Poljak <i>et al.</i>	La structure tridimensionnelle d'un anticorps par cristallographie
1975	Köhler et Milstein	La production d'anticorps monoclonaux

D'après la thèse d'E. Zuber (Zuber, 1997).

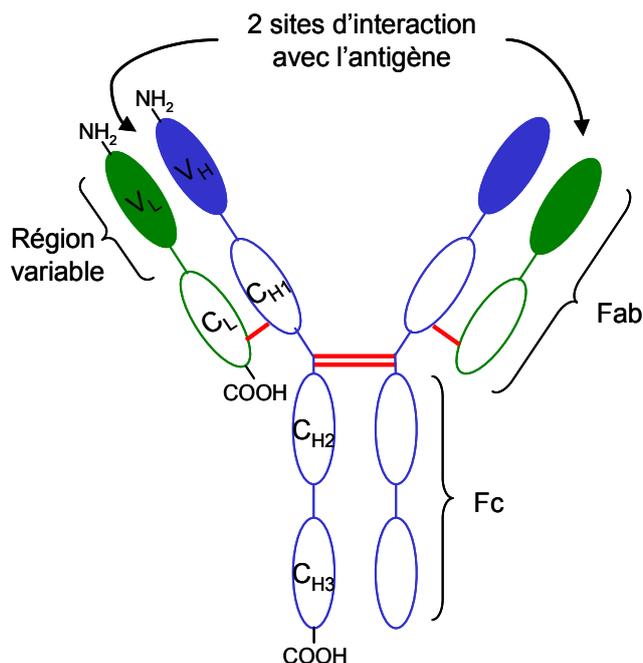


Figure 3 : Structure simplifiée d'une unité de base des immunoglobulines

Chaîne lourde (indice H, pour *Heavy*) en bleu, chaîne légère (indice L, pour *Light*) en vert.

V : partie Variable, C : partie constante.

Les traits rouges symbolisent des ponts disulfures.

Fab : « fragment antigen binding » ; Fc : « fragment crystalline ».

produisent un grand nombre d'anticorps reconnaissant différentes zones de cette substance appelées épitopes ou déterminants antigéniques (réponse polyclonale).

On définit les antigènes comme toute structure capable d'être reconnus par les anticorps (pouvoir antigénique). Ils peuvent être de nature et de caractéristiques extrêmement diverses (protéines, polysides, acides nucléiques, lipides, molécules synthétiques), de masses moléculaires et conformations variées. Certains d'entre eux sont capables de provoquer une réponse immunitaire sous la forme d'une synthèse d'anticorps (pouvoir immunogène), dépendant bien entendu des potentialités immunologiques de l'hôte (Van Regenmortel, 1994). D'autres antigènes, les haptènes, sont de petites molécules naturelles ou synthétiques (<5000 Da), possédant une réactivité antigénique, mais sans pouvoir immunogène, sauf après couplage à une molécule porteuse (*carrier*).

1.2.1.2. Origines de l'immunoanalyse

Les grandes étapes ayant conduit au développement de l'immunanalyse sont résumées dans le Tableau 2 (p.30). La découverte du support humoral de l'immunité remonte à la fin du XIX^{ème} siècle, avec les travaux de Emil Von Behring en 1890 sur l'antitoxine de la diphtérie (Prix Nobel 1901) qui furent suivis de ceux de Paul Ehrlich (Prix Nobel 1908) posant les fondations de l'immunochimie. La découverte des principaux phénomènes et l'invention des techniques de précipitation (par Kraus) et des haptènes synthétiques (par Landsteiner) permirent l'énonciation des théories fondamentales concernant la réaction anticorps-antigène. Arrhénius introduisit l'idée de réversibilité, donc d'équilibre ; Heidelberger montra que la valence des anticorps était de deux (confirmé par Karush, 1958) ; Landsteiner et Pauling initièrent la caractérisation thermodynamique des réactions antigène-anticorps et mirent en évidence le phénomène de « réactivité croisée ». L'utilisation du caractère antigénique des immunoglobulines par l'emploi d'anticorps antiglobulines permit leur classification (isotypie, allotypie, idiotypie). La dissection des anticorps fut entreprise grâce aux travaux complémentaires de Porter et Edelman (Edelman *et al.*, 1969 ; Porter, 1967). La structure tridimensionnelle des anticorps et de leurs sites de fixation fut précisée par des études cristallographiques par rayons X (Poljak *et al.*, 1973).

La nature des anticorps et de leur liaison avec les antigènes se précisant, cette réaction est devenue un outil performant d'exploration et de quantification. La mise au point du radioimmunos dosage est classiquement attribuée à Yalow et Berson qui mirent au point en 1959 le premier dosage immunologique de l'insuline humaine dans le plasma (cf. Yalow & Berson, 1960). La découverte de nouveaux principes de dosages, par compétition et

immunométriques (Ling & Overby, 1972 ; Miles & Hales, 1968 ; Wide *et al.*, 1967), l'évolution des techniques de séparation des espèces libres ou liées dans le complexe immunitaire (Catt *et al.*, 1967), et la recherche de moyens originaux de révélation, comme le marquage enzymatique (Engvall & Perlman, 1971), donna à ces méthodes un essor hors du commun. En 1975, les travaux de Köhler et Milstein ont permis d'obtenir des anticorps monoclonaux (AcM), produits par un seul clone de lymphocyte (Köhler & Milstein, 1975). Outre son intérêt scientifique, cette découverte eut de très grandes répercussions technologiques dans l'utilisation industrielle de la spécificité immunologique grâce à la possibilité d'obtention en grande quantité d'anticorps monoclonaux, parfaitement homogène et de spécificité donnée, pouvant être produits à loisir.

1.2.1.3. Structure des anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines ayant une structure de base commune généralement constituée de deux chaînes polypeptidiques légères (ou L pour *Light*) d'un poids moléculaire de 25 kDa et de deux chaînes lourdes (ou H pour *Heavy*) d'un poids moléculaire compris entre 50 et 72 kDa. Il est à noter que certaines Ig peuvent s'associer en structure multimeriques. Les IgG, monomériques, sont les principaux anticorps utilisés en immunoanalyse.

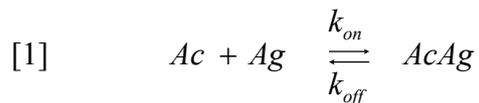
Pour un anticorps donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même pour les deux chaînes légères. Chaque chaîne lourde est étroitement associée avec une des chaînes légères ; la stabilité est assurée par des ponts disulfures intra et intercaténaux et par des interactions de type tertiaire et quaternaire. On distingue classiquement une partie constante (C) et une partie variable (V), constituée par la région amino-terminale des chaînes lourdes et légères.

Cette structure symétrique comporte deux sites de liaison pour l'antigène (paratopes), au niveau de la partie variable (divalence), comme montré sur la Figure 3 (p.30). La digestion par la papaïne permet l'obtention de trois fragments protéolytiques distincts : un fragment Fc (*fragment crystalline*) et deux fragments monovalents, possèdent toujours la capacité à lier l'antigène, appelés Fab (*fragment antigen-binding*). Les paratopes sont partagés entre les modules VH et VL dont l'association forme une structure en tonneau. Une analyse de séquence des parties variables permet de définir 3 régions par module où la variabilité de séquence primaire est élevée, appelées boucles hypervariables, ou CDRs (« *complementarity determining region* ») qui permettent la reconnaissance de l'antigène. Cette interaction est de mieux en mieux caractérisée d'un point de vue structural et fonctionnel (Van Regenmortel, 1998). Les deux caractéristiques essentielles du phénomène de reconnaissance moléculaire sont l'affinité et la spécificité.

I.2.1.4. Notions d'affinité et de spécificité

L'affinité de l'interaction définit la stabilité du complexe AgAc et peut être caractérisée quantitativement par la constante d'affinité K_a (constante à l'équilibre, en M^{-1}) dont l'écriture découle de l'équilibre réactionnel.

De façon simplifiée⁴, la réaction de cinétique entre un site de liaison (paratope) et un déterminant antigénique (épitope) peut s'écrire :



avec Ac : paratope, Ag : épitope, AcAg : complexe épitope-paratope, k_{on} : constante de vitesse d'association, k_{off} : constante de vitesse de dissociation.

La concentration en complexe [AcAg] évolue donc au cours du temps selon l'équation différentielle suivante :

$$[2] \quad \frac{d[AcAg]}{dt} = k_{on} [Ac][Ag] - k_{off} [AcAg]$$

avec, entre crochets, les concentrations (M), fonctions du temps t (s) ; k_{on} ($M^{-1}.s^{-1}$) ; k_{off} (s^{-1}).

La constante d'affinité K_a d'un site de liaison pour un site antigénique est définie par la relation :

$$[3] \quad K_a = \frac{k_{on}}{k_{off}}$$

À l'équilibre, la concentration en complexe [AcAg] est stable, d'où :

$$[4] \quad K_a = \frac{[AcAg]}{[Ac][Ag]}$$

Classiquement, le K_a est évalué par la mesure à l'équilibre en utilisant la représentation de Scatchard (Yalow & Berson, 1960). Il peut aussi être déterminé à l'aide du biocapteur Biacore permettant de calculer les constantes cinétiques k_{on} et k_{off} (cf. Fivash *et al.*, 1998).

Plus l'affinité de l'interaction Ag-Ac est grande, plus K_a est élevé et plus le complexe est stable. On considère généralement que l'anticorps possède une bonne affinité pour l'antigène lorsque K_a est supérieur ou égal à $10^9 M^{-1}$.

⁴ En faisant les hypothèses suivantes (Zuber, 1997): (i) la cinétique de la réaction est réversible, de premier ordre vis-à-vis de chacun des réactifs ; (ii) l'antigène est monovalent vis-à-vis de l'anticorps, lui-même pseudo-monovalent (raisonnement en site de fixation plutôt qu'en molécule d'anticorps) ; (iii) l'antigène et l'anticorps sont purs et homogènes relativement à leur capacité de fixation ; (iv) il n'existe pas d'effet coopératif entre les réactions possibles (chaque réaction site-à-site étant indépendante).

Dans le cas d'une molécule multivalente, il a été observé un effet de coopérativité entre sites qui a donné lieu à la notion d'« avidité ». Les auteurs ont en effet observé que l'affinité d'une molécule multivalente était nettement supérieure à la somme arithmétique des affinités de chacun de ses sites (Dmitriev *et al.*, 2003).

La spécificité d'un anticorps est une notion beaucoup plus abstraite que l'affinité. Elle correspond à la capacité des anticorps à sélectionner entre des espèces chimiques proches (Janin, 1995). Idéalement, un anticorps « spécifique » ne formerait des complexes stables qu'avec le seul antigène contre lequel il a été produit. Toutefois, il existe toujours des « réactions croisées », l'anticorps reconnaissant avec des affinités plus ou moins fortes des antigènes analogues, de structure plus ou moins semblable à celle de l'antigène de référence. Les caractéristiques de spécificité d'un anticorps ne peuvent donc être que relatives au vu de l'ensemble des antigènes possible. Dans un milieu biologique donné, on considérera que l'anticorps présente une bonne spécificité lorsqu'il permet de mesurer sélectivement l'antigène parmi les molécules présentes dans l'échantillon (Volland, 1999).

L'affinité et la spécificité de l'interaction Ac-Ag conditionnent fortement les performances des dosages immunologiques.

I.2.2. Dosages immunologiques

I.2.2.1. Principe général

De très nombreuses méthodes d'analyse basées sur l'utilisation des anticorps ont été décrites. Nous n'envisagerons dans cette partie que le cas des dosages quantitatifs qui représentent la grande majorité des dosages réalisés à des fins de recherche ou de diagnostic.

Les dosages immunologiques sont des méthodes d'analyse relatives faisant appel à des courbes d'étalonnage, établies en réalisant plusieurs équilibres avec des concentrations connues et variables de molécule à doser (analyte). Nous nous limiterons ici au cas où l'on veut mesurer la concentration de l'antigène. En mesurant pour chaque équilibre la quantité de complexes formés, on établit une relation expérimentale entre la concentration de l'antigène et celle du complexe AgAc. Le plus souvent, la mesure de la concentration du complexe AgAc est facilitée par l'utilisation de molécules marquées ou traceurs.

Les dosages immunologiques peuvent être classés selon différentes clés. Il est possible de distinguer les méthodologies permettant le suivi d'une réaction réalisée à une interface solide-liquide de celles impliquant une réaction en milieu homogène liquide. On distingue également les dosages employant un seul anticorps, ou deux anticorps reconnaissant des épitopes

différents (dosage « sandwich »). Ils peuvent être aussi classés en fonction du type de marqueur ou de la méthode de détection employée.

1.2.2.2. Dosages dits « en format homogène » et « en format hétérogène »

Classiquement, on distingue deux types de dosages suivant l'intervention éventuelle d'une étape de séparation des complexes immunologiques (dosages dits en format hétérogène *versus* homogène).

Les dosages dits « en format homogène » sont réalisés dans un seul et même milieu. Ils sont utilisés lorsque la formation du complexe AgAc modifie le signal porté par le traceur : la formation du complexe AgAc peut alors être suivie directement en mesurant le signal « global » de la solution. Ainsi, la mesure est effectuée sur l'ensemble des constituants de l'équilibre immunologique, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer une séparation préalable.

A l'inverse, les dosages dits « en format hétérogène » font intervenir, après réaction immunologique, une étape de séparation du traceur non complexé de celui engagé dans les complexes AgAc. Pratiquement, cette séparation, qui doit être effectuée avant la mesure finale, est souvent réalisée en employant deux milieux ou phases : une phase liquide et une phase solide. L'Ac ou l'Ag est fixé sur une phase solide (ex : paroi du tube, de la microplaque, billes magnétiques) par simple adsorption ou par différents types de liaisons plus spécifiques. Les dosages hétérogènes, impliquant en général pour la mesure du signal l'interruption de la réaction, ne permettent pas aisément le suivi de cinétiques rapides et se prêtent moins à l'automatisation. En revanche, ils présentent l'avantage de pouvoir s'affranchir en partie de l'effet matrice grâce à la séparation de la fraction non complexée avant la mesure.

1.2.2.3. Formats compétitif et immunométrique

Ces dosages peuvent être réalisés suivant deux formats : compétitif et immunométrique (voir Figure 4, p.36).

Les dosages par compétition sont basés sur une compétition entre un antigène marqué (ou Ag*) et un antigène non marqué (l'analyte) pour la fixation sur les sites de liaison de l'Ac (paratope). Ce type de dosage peut être schématisé par les deux équilibres suivants :



L'Ac et le traceur Ag* sont utilisés à des concentrations prédéterminées et constantes. Pour autoriser cette compétition et atteindre une bonne sensibilité, ces réactifs doivent être utilisés en quantité limitée. La concentration en antigène non marqué est soit connue pour établir la

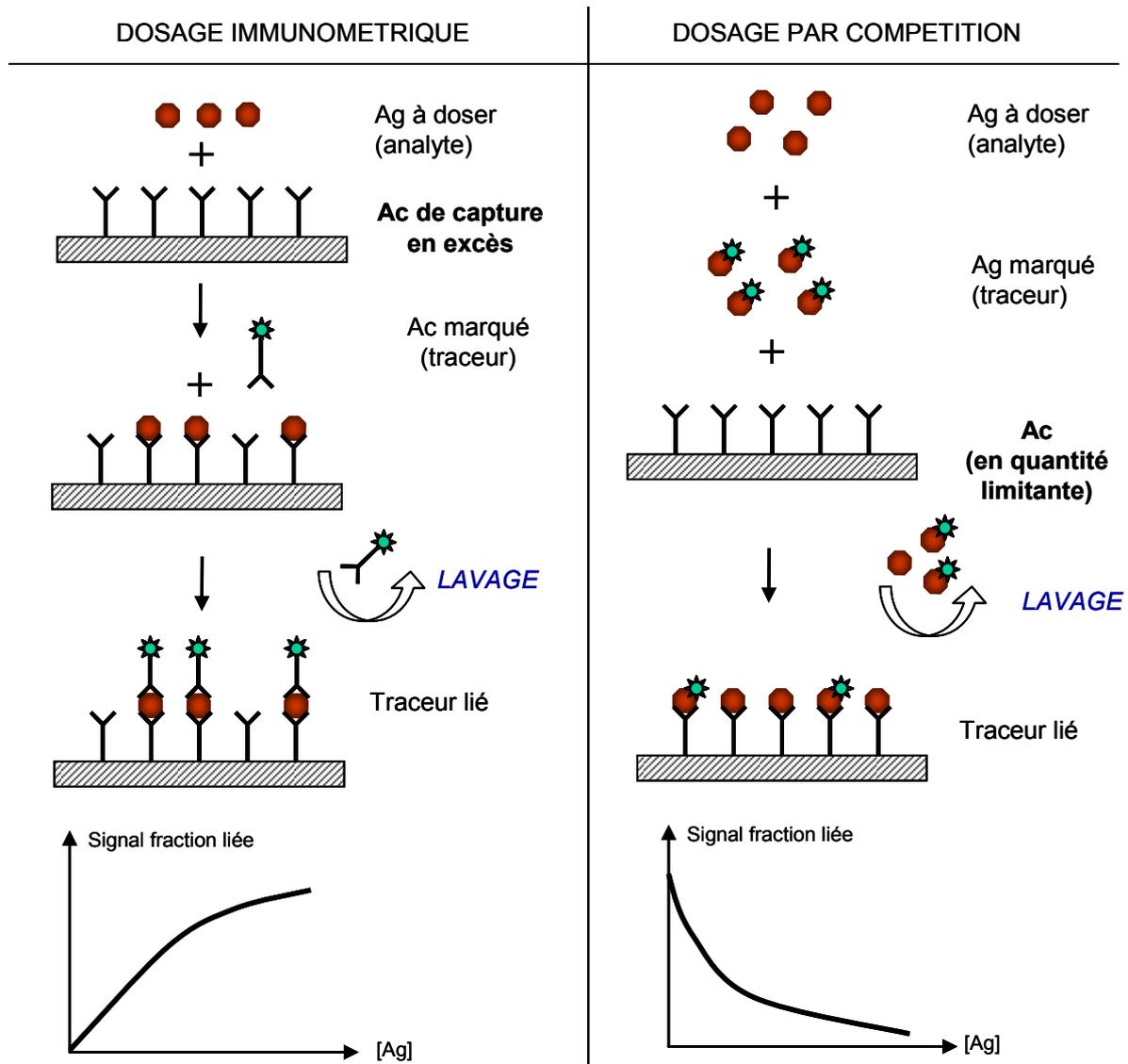


Figure 4 : Schéma-type des dosages immunométrique et compétitif (sur phase solide)

Dans le format immunométrique, l'analyte est pris en « sandwich » entre deux anticorps.

Dans le format compétitif, l'analyte et le traceur rentrent en compétition pour la fixation sur les sites de liaison de l'anticorps.

courbe d'étalonnage, soit inconnue dans les échantillons. Plus la concentration en Ag est importante, plus la liaison du traceur est déplacée : le signal obtenu est donc généralement inversement corrélé à la concentration en Ag.

Dans le cas des dosages immunométriques, le traceur correspond à un anticorps marqué au lieu d'un antigène marqué. Le principe consiste à prendre l'antigène à doser en « sandwich » entre deux anticorps, qui sont utilisés en excès par rapport à l'Ag. Généralement, le signal augmente avec la concentration en antigène à doser (linéairement pour de faibles concentrations). L'intérêt majeur de ce format de dosage réside dans l'emploi de réactifs en excès, favorisant la formation de complexes et aboutissant à une meilleure sensibilité que les dosages par compétition réalisés avec les mêmes anticorps, le gain en sensibilité étant de 10 à 1000 (Ekins, 1993). En revanche, cette méthode impliquant le plus souvent la fixation simultanée de deux molécules d'anticorps sur l'analyte, elle est moins aisément applicable au dosage des molécules de faible masse molaire. Il faut en effet pour cette méthode disposer de deux anticorps reconnaissant deux épitopes différents sur l'antigène (ou anticorps complémentaires). Toutefois, il a été décrit plusieurs méthodes permettant le dosage immunométrique d'haptènes (Creminon *et al.*, 1995 ; Pradelles *et al.*, 1994 ; Volland, 1999).

1.2.2.4. Méthodes de détection

La plupart des dosages immunologiques emploient des molécules marquées permettant la révélation du complexe immunitaire formé. Ce signal est porté par un marqueur lié (de façon covalente ou non) à l'Ac ou l'Ag. Notons qu'il existe des systèmes sans marquage, notamment le biocapteur BiAcore, basé sur une mesure de résonance de plasmon, mais qui est rarement utilisé en routine pour le dosage. De nombreux marqueurs peuvent être employés (pour revue, cf. Pelizzola *et al.*, 1995). Il s'agit le plus souvent d'enzymes (avec formation d'un produit coloré ou luminescent), de marqueurs fluorescents, luminescents ou radioactifs.

Les premiers dosages développés utilisaient des traceurs radioactifs (Yalow et Berson, 1959), utilisant notamment le Tritium (^3H) et l'Iode 125 (^{125}I), ce dernier étant le marqueur le plus utilisé en radioimmunoanalyse, en raison de sa forte activité spécifique. Les dosages RIA (*RadioImmunoAssay*) sont en général très sensibles, et permettent une mesure directe du signal. De plus, le marquage radioactif (au ^3H notamment) entraîne très peu de modification de la molécule, préservant ainsi son immunoréactivité. Cependant, pour des raisons de sécurité, ils nécessitent des précautions importantes de manipulation, et sont rarement entièrement automatisés. La gestion des déchets radioactifs implique un coût important, et il est nécessaire de renouveler fréquemment les traceurs en raison de leur décroissance

radioactive (ex : demi-vie de 60 jours pour ^{125}I). Aujourd'hui, les radioisotopes ne représentent plus qu'une faible fraction des immunoanalyses (Brossier *et al.*, 2001).

Grâce aux travaux de Engvall et Perlman permettant le marquage enzymatique (Engvall & Perlman, 1971), de nombreuses méthodes de dosage immunoenzymatique (EIA, pour *Enzyme ImmunoAssay*) se sont développées. La détermination de la concentration d'antigène marqué se fait en utilisant un substrat, généralement modifié par rapport au substrat naturel, qui conduira après réaction avec l'enzyme à la formation d'un produit portant le signal (généralement coloré, fluorescent ou chimiluminescent). Les dosages immunoenzymatiques sont utilisés en routine pour le dosage de nombreux composés, et permettent d'atteindre de très bonnes sensibilités (jusqu'aux attomoles ie. 10^{-18} moles, voire aux zeptomoles ie. 10^{-21} moles d'analyte) notamment grâce au phénomène d'amplification du signal inhérent au *turn-over* de l'enzyme (Cousino *et al.*, 1997). Les enzymes les plus utilisées sont la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline et la β -D-galactosidase⁵. En général, les dosages EIA sont utilisés en format hétérogène avec une mesure indirecte du signal : après élimination du traceur non engagé dans les complexes immunologiques par une étape de séparation (étape de lavage), le substrat est ajouté ; puis après réaction enzymatique (étape de révélation), le produit formé est quantifié.

Les méthodes par fluorescence ont été très développées ces dernières années en raison de leur haute sensibilité (Harma *et al.*, 2000 ; Schultz *et al.*, 2003) et de leur rapidité. Elles permettent en effet une mesure en direct, évitant toute étape de révélation. Les dosages immunologiques par fluorescence seront présentés dans la partie suivante.

I.3. Fluorescence et phénomène de FRET

Depuis une dizaine d'années, les méthodes de mesure par fluorescence sont de plus en plus utilisées pour le développement de nouvelles méthodes de détection, dans le cadre des dosages immunologiques, des biopuces, mais aussi plus largement en biologie (pour des études biochimiques structurales ou en biologie cellulaire notamment). Un des aspects des plus attrayants de la fluorescence résulte de sa sensibilité intrinsèque et son grand domaine linéaire de concentration.

⁵ Notre laboratoire utilise une autre enzyme : l'acétylcholinestérase (AChE), purifiée à partir des organes électriques de l'anguille électrique *Electrophorus electricus* (Ellman *et al.*, 1961 ; Grassi & Pradelles, 1983).

I.3.1. Description de la fluorescence

I.3.1.1. Notions physiques

La fluorescence, comme la phosphorescence et la chimiluminescence, correspond à un phénomène de luminescence, c'est-à-dire un phénomène d'émission de photons à partir d'une molécule dans un état électronique excité. Dans le cas de la chimiluminescence, c'est une réaction chimique (oxydation, fixation de Ca^{2+} ...) qui donne lieu à la formation d'une espèce excitée. Pour la fluorescence et la phosphorescence, l'excitation provient de l'absorption de photons.

Lorsque l'on irradie une molécule avec des photons d'énergie appropriée, il est possible de promouvoir les électrons de cette molécule dans un état d'énergie excité. En retournant à son état fondamental à partir de l'état excité, la molécule restitue à l'environnement l'énergie des photons absorbés par différents processus, radiatifs et non radiatifs (Albani, 2001 ; Lakowicz, 1983).

Suite aux travaux de Perrin (Perrin F., 1929), Jablonski proposa une représentation des différents niveaux d'énergie et des sauts entre ces niveaux associés au phénomène de fluorescence (Jablonski, 1935). Le diagramme de Perrin-Jablonski est présenté sur la Figure 5 (p.40). L'absorption de photons par la molécule provoque le passage d'électrons du niveau électronique fondamental S_0 à un état excité S_n ($n \geq 1$). Le retour de S_n à S_1 a lieu par conversion interne. Le retour de S_1 à S_0 est réalisé par différents processus compétitifs :

- dissipation d'énergie par phénomènes non radiatifs ;
- inhibition (les molécules peuvent céder leur énergie à des molécules situées à proximité, soit par transfert d'énergie à distance, soit par collision) ;
- émission de photons ;
- passage par un état de transition triplet T_1 (lui-même suivi soit d'un phénomène d'émission de photons, de dissipation d'énergie par des phénomènes non radiatifs, ou d'inhibition).

Lorsque la molécule excitée est dans un état singulet, l'émission de photons est appelée fluorescence, tandis que lorsqu'il y a passage par un état triplet, on parle de phosphorescence. La durée de vie de la fluorescence est très brève (inférieure à 10^{-5} s) ; la durée de vie de la phosphorescence est beaucoup plus élevée.

Comme représenté sur le diagramme de Perrin-Jablonski, il existe plusieurs niveaux vibrationnels autour de chaque état : les photons absorbés, tout comme les photons émis,

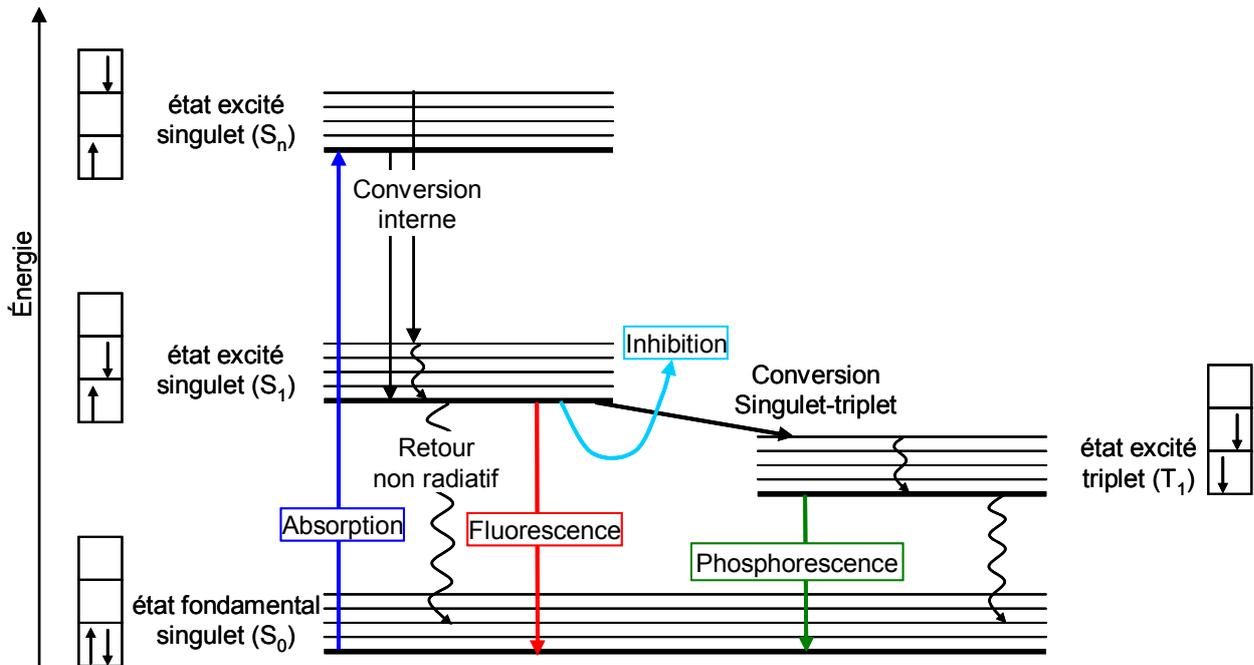


Figure 5 : Diagramme partiel des niveaux d'énergie d'un système photoluminescent (diagramme de Perrin-Jablonski)

L'absorption de photons par la molécule provoque le passage d'électrons du niveau électronique fondamental S_0 à un état excité S_n ($n \geq 1$). Le retour de S_n à S_1 a lieu par conversion interne. Le retour de S_1 à S_0 est réalisé par différents processus compétitifs : ① retour non radiatif, ② inhibition (transfert d'énergie à distance ou par collision), ③ émission de photons (fluorescence), ④ passage par un état de transition triplet T_1 (qui lui-même peut être suivi d'un phénomène d'émission de photons : phosphorescence).

Les schémas à côté des niveaux d'énergie indiquent la direction des spins d'une paire d'électrons (spins appariés pour les états singulet et non appariés pour l'état triplet).

(D'après : Albani, 2001).

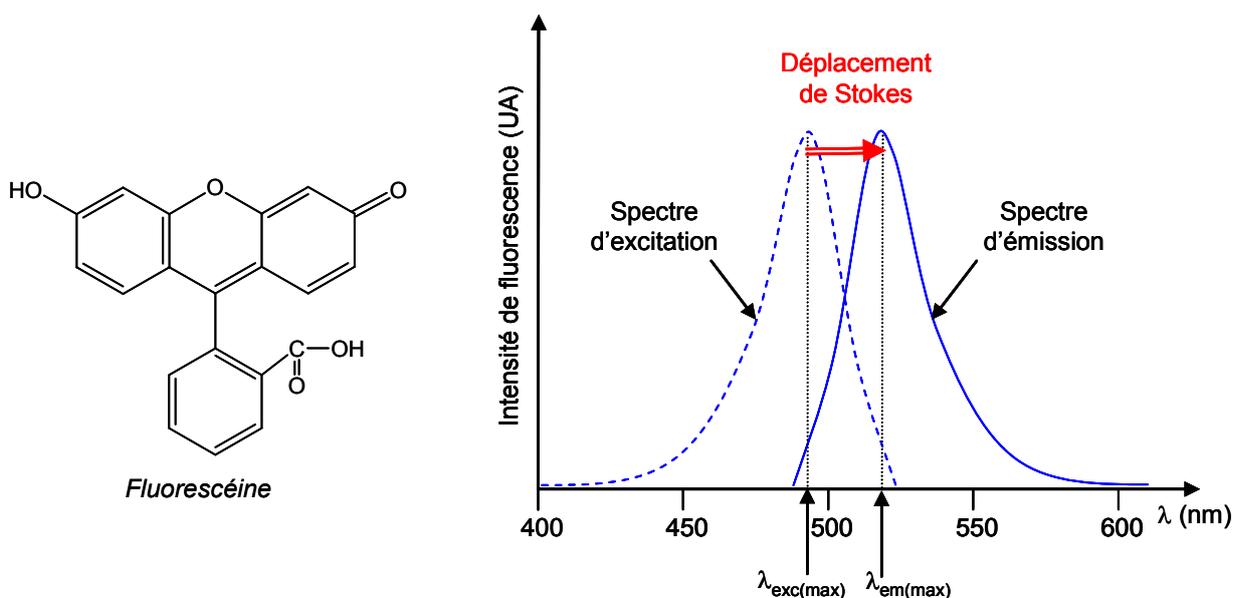


Figure 6 : Structure chimique et spectres d'excitation et d'émission de la Fluorescéine

Structure chimique de la fluorescéine et spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de la Fluorescéine.

Notations : λ_{EXCmax} : longueur d'onde maximale d'excitation (492 nm) et λ_{EMmax} : longueur d'onde maximale d'émission (520 nm).

n'ont pas tous la même énergie. Cela a pour conséquence l'existence de spectres d'excitation et d'émission qui rendent compte des propriétés spectrales de la lumière absorbée et émise.

1.3.1.2. Propriétés générales des fluorophores

Les molécules fluorescentes ou fluorophores sont caractérisées par des propriétés d'absorption de la lumière (caractérisées par le coefficient d'extinction molaire) et de réémission de la lumière (dont rend compte le rendement quantique). Ces propriétés dépendent de la longueur d'onde (spectres d'excitation et d'émission).

- Spectres d'excitation

La mesure du spectre d'excitation pour les espèces fluorescentes est réalisée en mesurant les variations de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation. La largeur du spectre provient de la vibration autour de l'état fondamental. Le spectre d'excitation et le spectre d'absorption sont généralement superposables.

- Spectre d'émission

Le spectre d'émission semble être l'image du spectre d'absorption à travers un miroir. Le déplacement vers le rouge du spectre d'émission par rapport au spectre d'absorption correspond à la perte d'énergie entre photon absorbé et photon émis. Ce phénomène observé pour la première fois par Stokes en 1852 est appelé « déplacement de Stokes » (Stokes, 1852). Il s'explique par les relaxations vibrationnelles qui s'opèrent au sein du fluorophore durant le phénomène de fluorescence. Le déplacement de Stokes (différence entre les maxima d'émission et d'excitation de fluorescence) est en général compris entre 30 et 50 nm pour les fluorophores organiques. (ex : 28 nm pour la fluorescéine, cf Figure 6, p.40). Le spectre d'émission ne varie pas en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

- Coefficient d'extinction molaire

Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) relie la quantité de lumière absorbée pour une longueur d'onde donnée à la concentration de fluorophore en solution ($M^{-1}.cm^{-1}$).

- Rendement quantique

Le rendement quantique de fluorescence (Φ_f) rend compte de l'efficacité relative de la fluorescence comparée aux autres voies de désexcitation. Il est calculé par le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés par un fluorophore.

Ces propriétés varient en fonction de la structure des molécules. En général, la fluorescence la plus intense se rencontre dans les composés qui comportent des groupements fonctionnels aromatiques de faible énergie de transition $\pi \rightarrow \pi^*$, comme par exemple la fluorescéine, dont

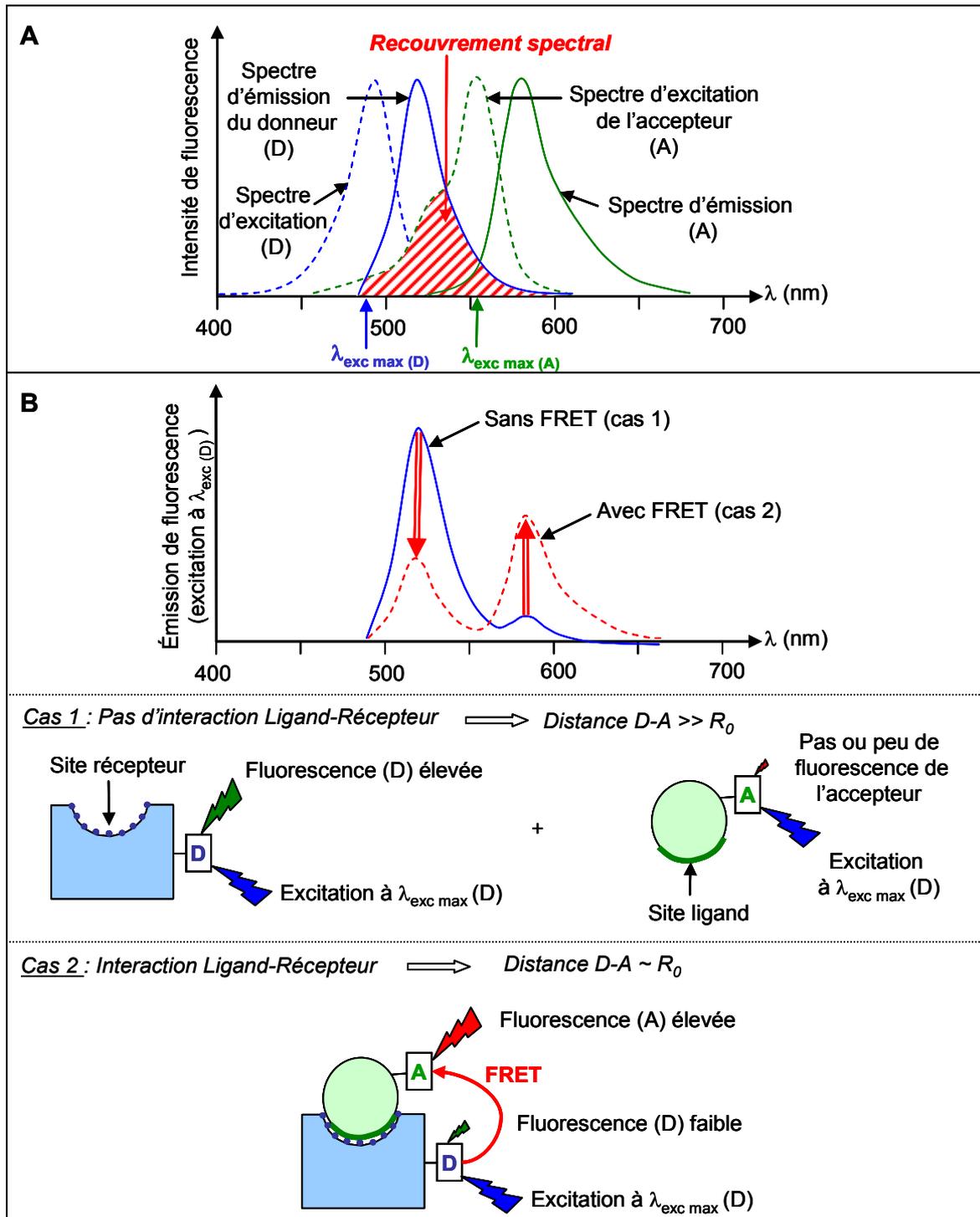


Figure 7 : Principe du transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET)

A : Superposition des spectres du donneur (D) et de l'accepteur (A). L'aire hachurée correspond au recouvrement spectral du spectre d'émission de D par le spectre d'excitation de A.

B : Spectres d'émission de fluorescence (excitation à λ_{EXCmax} du donneur) d'un mélange de récepteurs marqués avec D et de ligands marqués avec A.

Cas 1 : En l'absence d'interaction ligand-récepteur, le spectre de fluorescence correspond au spectre d'émission de D avec éventuellement une légère contribution de A.

Cas 2 : Lorsqu'il y a interaction ligand-récepteur, la distance D-A est suffisamment faible pour que se produise un transfert d'énergie entre D et A, qui se traduit par une modification du spectre de fluorescence. On observe une diminution de la fluorescence du donneur tandis que la fluorescence de l'accepteur augmente.

la structure chimique comprend trois noyaux aromatiques et un hétérocycle (Figure 6, p.40). Les molécules qui contiennent des structures carbonées aliphatiques ou alicycliques ou des doubles liaisons conjuguées peuvent également être fluorescentes. De plus, la fluorescence est particulièrement intense dans les molécules qui présentent une structure rigide.

Les propriétés des fluorophores varient également en fonction de l'environnement. Elles sont notamment dépendantes de la température, du solvant (notamment la polarité et le pH), la concentration. Différents phénomènes moléculaires peuvent conduire à une extinction (inhibition) de la fluorescence.

1.3.1.3. Les phénomènes d'extinction de fluorescence et définition du FRET

L'extinction (ou l'inhibition) de fluorescence comprend au sens large tout phénomène diminuant l'intensité de fluorescence. Mis à part les effets de propriétés optiques (ex : réabsorption, turbidité de la solution) qui ne sont pas des phénomènes à l'échelle moléculaire, cette diminution de l'intensité de fluorescence peut avoir diverses origines donnant lieu à une extinction de fluorescence irréversible ou réversible. Dans ce dernier cas, nous parlerons de « *quenching* » de fluorescence⁶.

- Le photoblanchiment, un phénomène d'extinction irréversible

Le photoblanchiment est un phénomène irréversible de photodestruction des molécules qui a lieu à l'état excité, conduisant à une modification de la structure du fluorophore. Les molécules photoblanchies ne peuvent plus être excitées (dans certains cas cependant, la modification de la structure donne lieu à la formation d'une molécule elle-même fluorescente, mais avec des propriétés spectrales différentes). Le phénomène de photoblanchiment dépend des conditions d'éclairement (longueurs d'onde et puissance), chaque fluorophore présentant une sensibilité propre au photoblanchiment selon sa structure et son environnement.

- Les phénomènes d'extinction réversible de fluorescence ou « quenching »

Nous appelons *quenching* tout phénomène d'extinction réversible de fluorescence. Le *quenching* peut avoir diverses origines, notamment le *quenching* de contact ou le transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET).

Le *quenching* de contact correspond à l'interaction par « contact » d'un fluorophore à l'état excité avec une molécule dite extinctrice (ex : l'oxygène) désexcite le fluorophore sans émission de photons.

⁶ Pour des raisons de commodité, nous avons opté pour l'emploi du terme anglophone « *quenching* » par rapport au terme français d' « extinction réversible de fluorescence ».

Le FRET (pour *Förster* ou *Fluorescence Resonance Energy Transfer*) correspond à un phénomène de transfert d'énergie de fluorescence décrit par Förster en 1948 impliquant deux fluorophores, un donneur (D) et un accepteur (A). Ce phénomène se produit lorsque plusieurs conditions bien particulières sont réunies, à savoir lorsque (i) les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur se recouvrent, (ii) les deux fluorophores se trouvent à une distance inférieure à 100 Å, et (iii) leurs dipôles de transition électronique ont une orientation respective appropriée. On observe alors une diminution de la fluorescence du donneur, qui dans le cas d'un accepteur fluorescent, s'accompagne d'une augmentation de la fluorescence de l'accepteur (Figure 7, p.42).

Le transfert d'énergie décroît en $1/R^6$, R étant la distance entre le donneur et l'accepteur. On définit le rayon de Förster ou R_0 comme étant la distance à laquelle se produit 50 % du FRET.

I.3.2. Exemples de méthodes de détection par fluorescence

Les applications de la fluorescence sont très diverses. La fluorescence est notamment utilisée en biologie (immunofluorescence), en biochimie structurale (pour l'étude des interactions entre molécules par exemple) et pour la mise au point des dosages immunologiques, des dosages PCR, des biopuces et des biocapteurs.

I.3.2.1. Dosages immunologiques par fluorescence

Il existe principalement 4 types de dosages immunologiques par fluorescence (en plaque de microtitration) : les dosages basés sur l'utilisation d'une enzyme, ceux reposant sur une mesure de l'anisotropie de fluorescence, les dosages en temps résolu et les dosages par FRET.

- *Dosages immunoenzymatiques fluorescents*

Ces dosages font généralement intervenir une étape de séparation faisant appel à l'utilisation d'une phase solide. Après lavage, l'ajout du substrat conduit par action de l'enzyme à la formation d'un composé fluorescent dont la quantification est réalisée en solution (Yolken & Stopa, 1979). Des méthodes de détection par chimiluminescence ont également été employées, permettant une limite de détection 10 fois meilleure qu'avec la révélation colorimétrique (Sabelle *et al.*, 2002).

- *Dosages par polarisation de fluorescence*

Ces dosages sont basés sur une mesure de l'anisotropie (voir Lakowicz, 1983) qui augmente lorsque le fluorophore est lié à l'anticorps. Le premier dosage immunologique de ce type fut réalisé en 1973 par Dandliker *et al.* (Dandliker *et al.*, 1973) et Spencer *et al.* (Spencer *et al.*,

1973). Ils sont utilisés en routine pour le dosage de nombreux composés (voir la revue de Burke *et al.*, 2003). Cependant, ils sont généralement limités au dosage de composés dont la masse molaire est inférieure à 20 kDa (Hemmila, 1985).

- *Dosages par fluorescence en temps résolu*

Ces dosages sont basés sur l'emploi de chélates de lanthanide (ex : europium, terbium), à durée de vie longue (de 10 à 100 μ s) (Bazin *et al.*, 2001). Ils ont été décrits en formats hétérogène et homogène.

Dans le cas du format hétérogène, le traceur est lié directement au lanthanide. Après lavage, la détection est réalisée par ajout d'une solution d'« exaltation » chélatante du lanthanide et comprenant le chromophore nécessaire pour l'excitation du lanthanide par transfert d'énergie (les lanthanides ne peuvent généralement pas être excités directement). On peut employer comme groupe chélatant un dérivé de l'EDTA qui se lie à l'europium par exemple.

Ce format a permis la mise au point de dosages simultanés de plusieurs analytes. Par exemple, l'équipe de Hemmilä et Lövgren a décrit un dosage par fluorescence en temps résolu employant 4 lanthanides (europium, terbium, samarium et dysprosium) qui émettent des rayonnements suffisamment étroits et durant un temps assez long pour être différenciables spectralement et temporellement (Xu *et al.*, 1992).

Les dosages en format homogène correspondent à un dosage par FRET (cf ci-dessous) où l'on utilise deux molécules marquées. L'une est marquée avec un chélate de lanthanide, l'autre avec un fluorophore organique de courte durée de vie de fluorescence, accepteur de la fluorescence du chélate. Ce type de dosage permet une mesure résolue dans le temps évitant les interférences du milieu (Mathis & Roux, 1998). Des systèmes commerciaux utilisent ce procédé (TRACE, Cisbio International).

- *Dosages par FRET (mesure de la fluorescence du donneur)*

Les dosages par FRET sont basés sur le principe de transfert d'énergie par résonance de fluorescence entre deux fluorophores. Ils sont utilisés le plus souvent en format homogène. Nous décrivons ici les dosages basés sur la mesure du *quenching* (diminution du signal du donneur).

La première méthode de dosage immunologique par FRET fut décrite par Ullman en 1976 (Ullman *et al.*, 1976), qui montra qu'il était possible de réaliser des dosages en format compétitif et immunométrique basés sur ce phénomène, la mesure étant réalisée à la longueur d'onde du donneur (mesure du *quenching*) de la manière suivante.

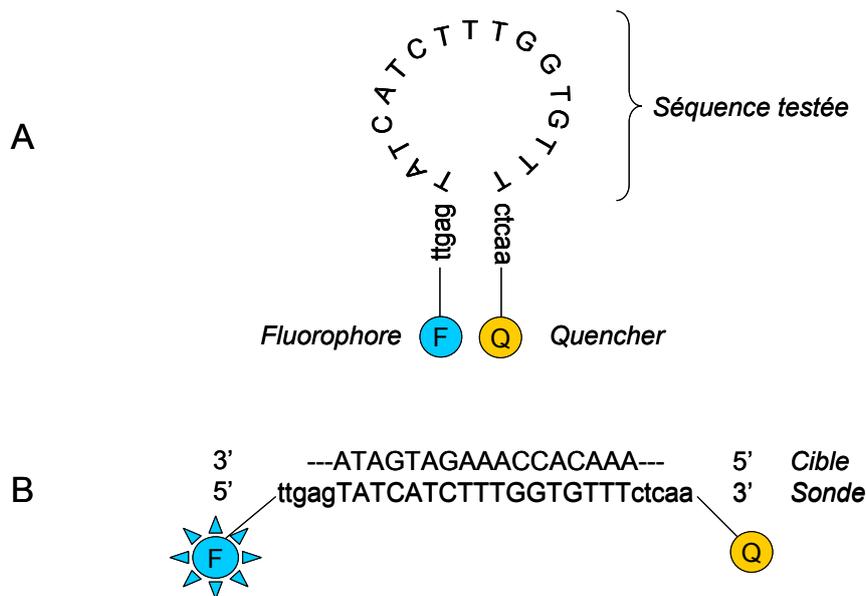


Figure 8 : Structure d'une sonde à ADN (*molecular beacon*)

A : Lorsque la sonde ADN est repliée, le fluorophore F porté par l'extrémité 5' est « quenché » par le composé *quencher* Q fixé en 3' en raison de leur proximité spatiale.

B : L'ajout d'un acide nucléique de séquence complémentaire à la celle de la sonde (cible) a pour conséquence la linéarisation de la sonde éloignant les extrémités 5' et 3' et entraîne une augmentation de la fluorescence de F. Adapté d'après l'article de Tyagi et Kramer (1996).

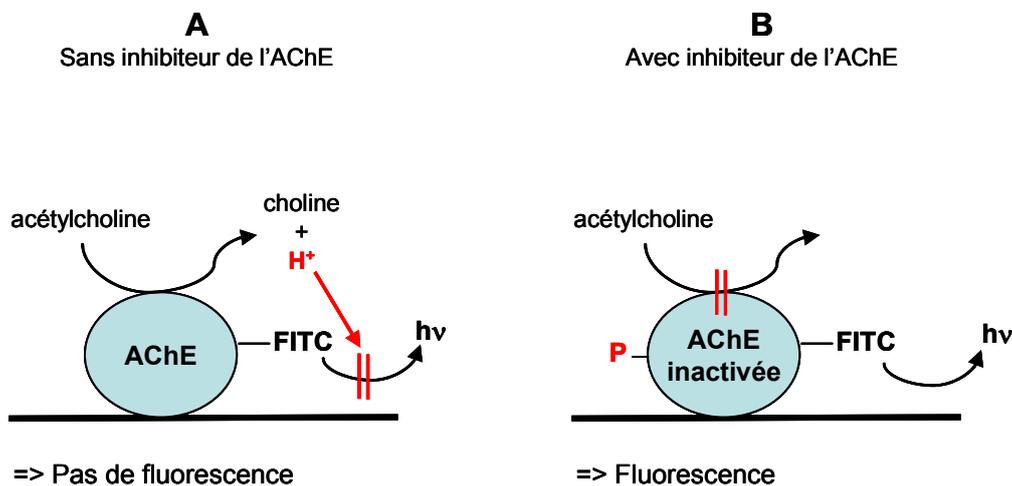


Figure 9 : Principe d'un capteur enzymatique pour la détection d'anticholinestérase

A : Sans inhibiteur, l'enzyme est fonctionnelle. L'hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE (acétylcholinestérase) conduit à la formation de la choline et d'un proton. L'abaissement du pH inhibe la fluorescence de la fluorescéine (FITC) fixée sur l'enzyme (*quenching*).

B : En présence d'un inhibiteur de l'enzyme (ici P pour pesticide), la réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine n'a plus lieu.

D'après l'article de Rogers *et al.* (1991).

Dans le format compétitif, l'anticorps est marqué avec l'accepteur (tétraméthylrhodamine) et le traceur marqué avec le donneur (fluorescéine) selon le schéma :



où Ag correspond à l'analyte, AgD correspond au traceur marqué avec le donneur, AcA à l'anticorps marqué avec l'accepteur.

Sans analyte, le signal de D est faible ; l'ajout d'analyte conduit à une augmentation du signal de D proportionnellement à sa concentration.

Dans le format immunométrique, Ullman utilise un anticorps marqué avec le donneur et un anticorps marqué avec l'accepteur pouvant se lier simultanément à l'antigène multivalent. Le schéma est le suivant :



Dans ce cas, l'ajout d'antigène conduit à une diminution du signal de D.

Ullman et Khanna montrèrent par la suite que le transfert d'énergie ne pouvait avoir lieu qu'à des distances inférieures à 100 Å (Ullman & Khanna, 1981). Par la suite, cette méthode a été employée pour le dosage de plusieurs composés, aussi bien en format compétitif qu'immunométrique (Szollosi *et al.*, 1998).

D'autres marqueurs ont été utilisés pour ces dosages, notamment des marqueurs dans le rouge lointain permettant de limiter la fluorescence intrinsèque du milieu et d'augmenter l'efficacité du transfert d'énergie par FRET. On peut citer par exemple les fluorophores Cyanine, commercialisés par Amersham Bioscience, les Alexas (Molecular Probes, Inc), ou les chélates de terre rare (voir ci-dessus : dosages en temps résolu). Les Alexas sont particulièrement brillants, peu sensibles aux variations de pH entre 4 et 10 et plus stables au photoblanchiment que les fluorophores traditionnels tels que la Fluorescéine ou la Rhodamine (Panchuk-Voloshina *et al.*, 1999). Des dosages par FRET utilisant les Cyanine et les Alexas ont été décrits (Lichlyter *et al.*, 2003 ; Medintz *et al.*, 2003 ; Schobel *et al.*, 1999). Très récemment, des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents ou Quantum Dots (Alivisatos, 2004) très résistants au photoblanchiment ont été employés pour la mise au point de dosages par FRET (Clapp *et al.*, 2004 ; Medintz *et al.*, 2004).

- *Dosages par FRET (mesure de la fluorescence de l'accepteur)*

Certaines méthodes de FRET sont basées sur la mesure de la fluorescence de l'accepteur (A) qui augmente avec le transfert. Cependant, elles sont moins nombreuses que les méthodes par mesure de la fluorescence du donneur (Lakowicz, 1999). On peut citer par exemple Wang *et*

al. qui réalisent un dosage en temps résolu (Wang *et al.*, 2001), ou bien Arai *et al.* qui utilisent des variants de la protéine fluorescente GFP (Arai *et al.*, 2001).

1.3.2.2. Exemples de méthodes de détection par quenching de fluorescence

Le phénomène de *quenching* par FRET a été utilisé dans de nombreux procédés. On peut citer par exemple les travaux de Astles et Miller qui effectuent le dosage d'un médicament (phénytoïne) dans le plasma grâce à un immunocapteur basé sur le phénomène de FRET (Astles & Miller, 1994). Le signal dépend du degré de transfert de fluorescence du traceur (phénytoïne marquée à la phycoérythrine) à l'anticorps marqué au Texas Red. La quantification du complexe immunologique se fait par une mesure de *quenching* de fluorescence. Ce format permet une mesure sans aucune étape de séparation.

Un *quenching* de fluorescence peut aussi se produire avec des composés accepteurs non fluorescents. On peut citer des composés tels que des métaux lourds, des atomes lourds, des molécules chimiques comme par exemple le rouge de méthyle, des nanoparticules telles que celles vendues sous la dénomination Nanogold® par la société Nanoprobes (USA), ou bien encore les molécules vendues sous les dénominations Dabcyl® (Eurogentec, Belgique), QSY Dyes (Molecular Probes Inc., USA), ElleQuencher® (Oswell/Eurogentec) ou Black Hole Quenchers® (Biosearch Technologies Inc., USA). Par exemple, le phénomène de *quenching* avec un accepteur non fluorescent a été utilisé pour la mise au point de sondes moléculaires (« *molecular beacons* ») employant des acides polynucléiques qui ont la particularité de s'hybrider avec eux-mêmes en se repliant (Bonnet *et al.*, 1999 ; Dubertret *et al.*, 2001) (Tyagi & Kramer, 1996). Selon cette méthode, un composé fluorophore (D) est fixé à l'extrémité 3' de la sonde et un accepteur non fluorescent (A : nanoparticule ou Dabcyl) est fixé à son extrémité 5'. Les deux extrémités de la sonde étant proches lorsqu'elle est repliée, il se produit un phénomène de FRET entre D et A entraînant un *quenching* de la fluorescence de D. La présence d'un acide polynucléique pouvant s'hybrider avec une région de la sonde (acide nucléique cible) va induire une linéarisation de ce dernier et donc une augmentation de la distance entre D et A, donnant lieu à une augmentation de la fluorescence de D (voir l'illustration sur la Figure 8, p.46).

D'une façon générale, de nombreux procédés basés sur le *quenching* de fluorescence ont été développés, utilisant le fait que l'intensité de fluorescence varie en fonction de l'environnement. Par exemple, la fluorescéine est un indicateur de pH, son émission peut être corrélée à la concentration en H⁺. Cette propriété a été utilisée pour mesurer, par exemple,

l'inhibition de l'Acétylcholinestérase (AChE) par les pesticides organophosphorés (Figure 9, p.46). L'enzyme est coimmobilisée avec un indicateur de pH fluorescent. L'hydrolyse du substrat, l'acétylcholine, par l'AChE conduit à un changement local de pH. L'inhibition de cette réaction peut être corrélée à la concentration en pesticides (Rogers *et al*, 1991). De façon similaire, le *quenching* de la fluorescence par l'oxygène est aussi employé comme principe de détection (par exemple avec le ruthénium comme fluorophore indicateur) (Trettnak & Wolfbeis, 1990).

I.4. Immunocapteurs en flux continu

A l'heure actuelle, la grande majorité des dosages immunologiques sont réalisés en plaque de microtitration. Les plaques de microtitration (ou « microplaques ») se présentent sous forme d'un support en plastique ou en verre dans lequel est moulée une série de puits ou « cupules » (généralement 96 puits de 7 mm de diamètre répartis sur une surface de 12x8 cm²), où sont effectuées la réaction de dosage et/ou la mesure du signal. Les microplaques sont utilisées couramment en immunoanalyse, tirant parti du fait que le nombre important de puits permet de doser en parallèle plusieurs échantillons. Les appareils de mesure de routine sont le plus souvent adaptés à ce type de support.

La nécessité croissante de disposer de dosages encore plus rapides et permettant de doser simultanément de nombreux composés dans un même échantillon, le développement des biopuces⁷ à ADN et des biocapteurs et les progrès technologiques en terme d'instrumentation et de microfluidique ont conduit au développement de systèmes d'immunoanalyse miniaturisés, compacts et/ou en flux.

I.4.1. Immunocapteurs : généralités

I.4.1.1. Définition

Les immunocapteurs sont dérivés de la technologie des biocapteurs. D'après la définition donnée par l'IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*), un biocapteur est un « instrument compact conçu pour produire un signal, discret ou continu, proportionnel à la

⁷ Equivalent du terme « microarray » en anglais, une biopuce peut être définie comme une « surface plane monolithique comportant quelques centaines à quelques milliers de zones de reconnaissance moléculaire générant après réaction avec un échantillon de composition donnée, un signal pouvant être détecté par une instrumentation de mesure » (Pirrung, 2002).

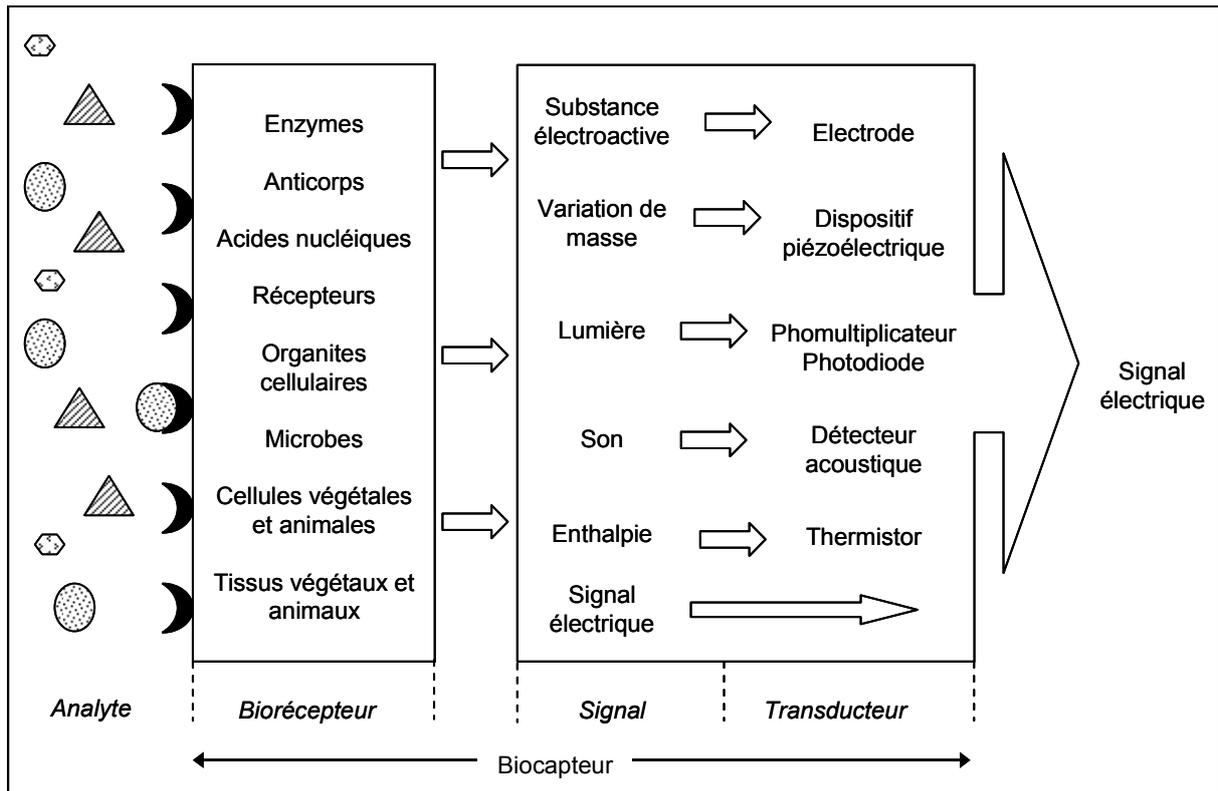


Figure 10 : Représentation schématique d'un biocapteur

L'analyte interagit avec le biorécepteur, induisant une modification d'ordre chimique ou physique qui est transformée en signal électrique par le transducteur.

Adapté de la revue de Nakamura et Karube (2003).

concentration d'un analyte ou d'une groupe d'analytes, qui combine un élément d'origine biologique appelé biorécepteur et un transducteur représentant le mode de détection » (Thevenot *et al.*, 2001). Le biorécepteur est capable d'interagir spécifiquement avec l'analyte et d'induire de ce fait une modification d'ordre chimique ou physique (l'anticorps dans le cas des immunocapteurs). Le transducteur est l'élément physique qui sert à exploiter cette modification pour la transformer en signal électrique. Le type de transducteur est donc choisi en fonction du biorécepteur et de la réaction qui a lieu (Figure 10, p.50).

1.4.1.2. Des méthodes de détection variées

De nombreux immunocapteurs ont été décrits (voir la revue de Marquette & Blum, 2006). Les principaux types de transducteurs sont électrochimiques, optiques, sensibles à une variation de masse (Suleiman & Guilbault, 1994) ou une variation thermique (Zhang & Tadigadapa, 2004). On peut également citer la détection de type magnétique qui peut être utilisée dans le cas d'un marquage à l'aide de nanoparticules magnétiques (Baselt *et al.*, 1998).

Les premiers biocapteurs étaient de type électrochimiques dont le développement a été initié suite aux travaux de Clark en 1962 (Clark & Lyons, 1962). Les biocapteurs électrochimiques utilisent généralement une enzyme produisant une substance électroactive. La mesure est réalisée par voltampérométrie ou par impédancemétrie⁸.

En 1979, le premier immunocapteur, de type ampérométrique, résulte de l'adaptation d'un dosage ELISA de la gonadotropine (Aizawa *et al.*, 1979). Dans ce système, des anticorps anti-gonadotropine sont immobilisés sur une électrode à oxygène. La gonadotropine contenue dans l'échantillon entre en compétition avec le traceur (gonadotropine marquée à la catalase). Après lavage, une solution d'eau oxygénée est ajoutée. La catalase fixée produit alors de l'oxygène, dont la concentration est mesurée par l'électrode. De la même façon, différentes enzymes ont été utilisées. Un autre format consiste à utiliser non pas une enzyme mais directement une substance électroactive (du type ferrocène) qui sert directement de marqueur.⁹

Pour les immunocapteurs optiques (Rabbany *et al.*, 1994), la reconnaissance immunologique se traduit par un changement de propriétés optiques, par exemple en terme d'absorbance, de

⁸ La voltampérométrie repose sur la détermination de l'intensité de courant et/ou du potentiel, permettant de suivre par exemple le cycle d'oxydoréduction d'une espèce à la surface d'une électrode. L'impédancemétrie correspond à la mesure de la conductance, de la résistance ou de l'impédance permettant de suivre la concentration d'une espèce chargée générée au cours d'une réaction.

⁹ Pour une revue générale concernant les biocapteurs électrochimiques, le lecteur peut se référer aux revues de Thévenot *et al.* (2001) et Bakker & Telting-Diaz (2002).

fluorescence ou de chimiluminescence. La détection est réalisée le plus souvent par une caméra CCD (*Charge Coupled Device*) ou par un photomultiplicateur et peut se faire *via* des fibres optiques (Wolfbeis, 2002). Par exemple, Rowe *et al.* décrivent un immunocapteur optique (Rowe *et al.*, 1999), permettant la détection simultanée de plusieurs analytes dans des échantillons cliniques : l'antigène F1 de *Yersinia pestis* (glycoprotéine capsulaire spécifique de *Y. pestis*) pour le diagnostic de la peste, l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus*, et le D-dimère (recherché lorsque l'on soupçonne une thrombose). Le format est le suivant : des anticorps spécifiques sont greffés sur la surface d'un guide d'onde ; l'analyte fixé est détecté grâce à un anticorps secondaire marqué avec un fluorophore ; et la mesure est réalisée par une caméra CCD. Dans le domaine clinique, on peut citer également des immunocapteurs permettant la détection de la protéine A de *S. aureus* (Chang *et al.*, 1996), ou l'entérotoxine B de Staphylocoque (King *et al.*, 1999 ; Tempelman *et al.*, 1996).

Le système le plus employé correspond au système BiAcore (Pharmacia Biosensor) basé sur le principe de résonance plasmonique de surface (SPR) (Liedberg *et al.*, 2006). Ce système ne requiert aucun marquage des molécules et permet une mesure en flux et en continu du signal. Il est utilisé dans de nombreux laboratoires pour la détermination de constantes cinétiques et peut permettre le dosage d'analytes. Aujourd'hui cet appareil permet la réalisation de quatre dosages en parallèle. Il est à noter toutefois que ce système n'est généralement pas applicable aux composés de faible masse moléculaire.

Malgré la diversité de systèmes développés en laboratoire, peu de systèmes d'immunoanalyse ont abouti au développement d'appareils commercialisés. Ils sont notamment en nombre plus restreint que les biocapteurs catalytiques. Les capteurs de glucose portatifs (utilisant la glucose oxydase) permettant la mesure de glucose sanguin tel que celui proposé par le Pr Turner (Turner *et al.*, 1999) représentent 90 % des ventes de biocapteurs (Alocilja & Radke, 2003). Seul l'instrument Biacore a été commercialisé à grande échelle.

A l'heure actuelle, les principales limitations des immunocapteurs concernent le coût des instruments, le nombre d'analytes pouvant être dosés en parallèle, la rapidité d'exécution, la portabilité du système et la régénération de la partie sensible.

I.4.2. Immunocapteurs en flux continu

I.4.2.1. Définition

Les immunocapteurs en flux sont définis comme étant des immunocapteurs où la réaction immunologique a lieu en circulation de fluide. On parle d'immunocapteur en flux continu lorsque le flux n'est pas interrompu pour réaliser la mesure.

I.4.2.2. Avantages attendus

Dans le cadre d'une détection en continu d'un analyte, les dosages en flux continu semblent particulièrement adaptés car ils pourraient permettre un apport permanent en échantillon. Ils répondent en particulier à la problématique du traitement d'un volume important d'échantillon.

L'élimination des étapes de lavage et la mesure en temps réel ou se rapprochant de celui-ci pourraient permettre une diminution de la durée de l'analyse et une automatisation plus aisée.

I.4.2.3. Méthodes employées

De la même façon que pour les dosages immunologiques classiques, la mesure peut se faire soit en phase liquide, soit après lavage sur phase solide ; le dosage peut être de type compétitif ou immunométrique ; et différents systèmes de détection peuvent être employés.

La plupart des dosages en flux disponibles à ce jour sont des dosages en format dit hétérogène (phase solide/phase liquide). En effet, les dosages en format homogène sont plus difficiles à mettre en œuvre pour une détection en flux car ils nécessitent l'apport en continu de récepteurs et/ou d'analytes marqués. L'échantillon se déplace en continu sur la zone de réaction, qui peut avoir lieu à la surface de billes, de membranes fonctionnalisées, d'une lame en verre, d'une surface en PDMS, ou encore sur la paroi d'un capillaire par exemple.

Les premiers dosages immunologiques en flux, développés au début des années 1980, étaient basés sur l'emploi de marqueurs radioactifs (Kamel *et al.*, 1980) ou enzymatiques (Nolan *et al.*, 1981). Ils nécessitaient l'introduction et le mélange de différents réactifs à différents intervalles durant le dosage. Depuis, plusieurs types de dosages en flux ont été décrits, la plupart utilisant une détection par fluorescence, électrochimique ou par résonance plasmonique de surface.

Les procédés par détection par fluorescence sont les plus courants pour ce genre d'application. On peut distinguer les procédés selon le type de molécules immobilisées à la

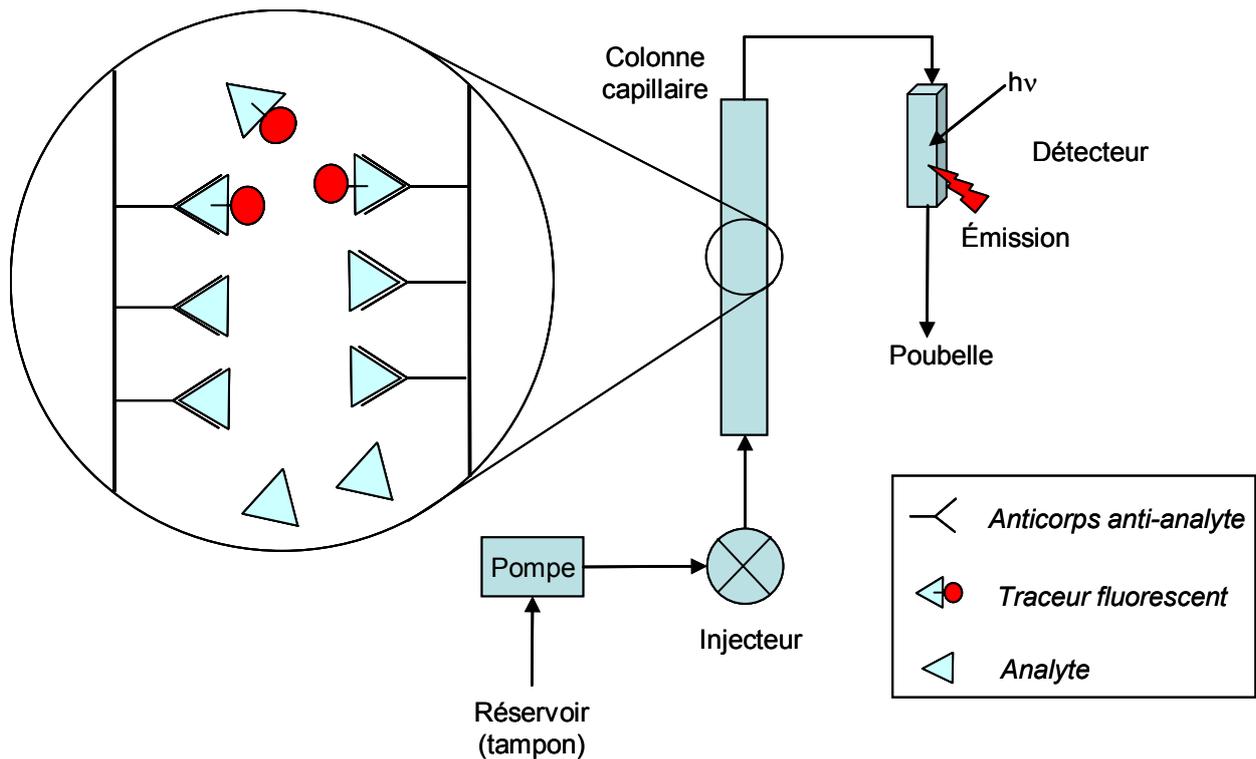


Figure 11 : Schéma d'un dosage immunologique en flux d'après Sheikh *et al.*

Dans ce système, la zone de réaction est un capillaire dont la surface a été fonctionnalisée avec des anticorps reconnaissant l'analyte d'intérêt complexé avec un traceur fluorescent. Lorsque la solution comprenant l'analyte est injectée, il se produit une réaction de déplacement du complexe anticorps-traceur proportionnellement à la concentration en analyte de la solution. La quantité de traceur fluorescent ainsi libéré en solution est mesurée dans une cuve avec un système de détection adapté.

D'après l'article de Sheikh *et al.* (2001).

surface du capteur (immobilisation de l'anticorps ou immobilisation de l'analyte ou d'un analogue de l'analyte).

I.4.2.3.1. Immobilisation de l'anticorps

La plupart des procédés de dosages immunologiques en flux mettent en œuvre un anticorps immobilisé sur les parois d'un capillaire. Sheikh *et al.* (Sheikh & Mulchandani, 2001) ont développé un immunocapteur en flux continu de type compétitif, avec immobilisation de l'anticorps puis saturation par un analyte marqué qui joue le rôle de traceur. Le passage de l'analyte dans la chambre de réaction induit une compétition avec le traceur pour la liaison avec l'anticorps. La quantité de traceur libérée est détectée en sortie du capillaire en phase liquide (Figure 11, p.54).

En ce qui concerne les dosages immunométriques, on peut citer le biocapteur développé par l'équipe du Dr F. Ligler (Ligler *et al.*, 1998) permettant de détecter des molécules présentes dans l'air. Ce biocapteur est constitué d'une fibre optique sur laquelle sont couplées des molécules d'avidine. Des anticorps anti-analytes biotinylés sont immobilisés sur cette fibre *via* le complexe avidine/biotine. La détection s'effectue en faisant circuler l'échantillon (molécules présentes dans l'air, solubilisées dans un tampon) sur cette fibre puis des anticorps anti-analytes marqués avec un fluorophore. La fluorescence, issue de la complexation des anticorps de capture, de l'analyte et des anticorps traceurs, est mesurée.

Il a également déjà été proposé (notamment dans le brevet américain de Platshon *et al.*, 1999) l'utilisation de capillaires pour effectuer des dosages d'analytes avec mesure après lavage sur phase solide, soit par compétition, soit par dosage sandwich (en utilisant un deuxième anticorps fluorescent). En utilisant ce type de procédé, l'équipe du Pr Reichert (Plowman *et al.*, 1999) a proposé une méthode permettant de doser simultanément, sur une même phase solide, différents analytes. Des anticorps reconnaissant différents analytes sont immobilisés sur une phase solide à des endroits distincts. Une solution, contenant l'échantillon et différents anticorps anti-analytes complémentaires des premiers marqués à l'aide d'un fluorophore (anticorps secondaires), est injectée. La mesure de la fluorescence qui est issue de la complexation des anticorps de capture, de l'analyte et des anticorps traceurs correspondant aux différents sites d'immobilisation des anticorps est réalisée après lavage.

I.4.2.3.2. Immobilisation de l'analyte ou d'un analogue

Certains auteurs ont utilisé une phase solide sur laquelle est immobilisé l'analyte ou un analogue de l'analyte à détecter, comme proposé par l'équipe du Pr Gauglitz (Barzen *et al.*,

2002). L'échantillon contenant l'analyte à détecter est préincubé avec un anticorps anti-analyte marqué. Lors du passage de cette solution sur la phase solide, les anticorps non-complexés vont se fixer sur la phase solide *via* l'analyte immobilisé. Ainsi le signal fluorescent mesuré au niveau de la phase solide est inversement proportionnel à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon.

Les immunocapteurs en flux continu pourraient répondre, en partie, à la problématique de la détection des agents de la menace, en permettant le traitement d'un volume important d'échantillon et le suivi en continu dans des lieux difficiles d'accès (montagnes, rivières). L'idée serait de développer des biocapteurs autonomes permettant le dosage simultané de plusieurs analytes. Plusieurs obstacles sont encore à franchir pour pouvoir relever ce défi, notamment la mesure simultanée de plusieurs molécules, l'apport de réactifs, la régénération de la phase solide et la mesure en temps réel. En effet, l'ensemble des procédés de détection d'analytes en format hétérogène précédemment décrits nécessite le plus souvent la réalisation d'une étape distincte de régénération de la phase solide avant de pouvoir effectuer une nouvelle détection de l'analyte au sein d'un nouvel échantillon ainsi qu'une étape de lavage avant la mesure. Ces étapes limitent par conséquent l'application de ces différents procédés à la détection en continu d'un analyte dans un milieu.

I.5. Approche proposée

Cette thèse s'inscrit dans la perspective de mise au point d'un système de détection en flux continu pour la détection des agents de la menace. Dans ce contexte, le Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse (LERI) propose une nouvelle méthode de dosage immunologique par FRET appelée SPIT-FRI (pour *Solid-Phase Immobilized Tripod for Fluorescent Renewable Immunoassay*) qui a fait l'objet de ce travail de thèse. Ce procédé, potentiellement automatisable et facilement régénérable, est basé sur l'emploi d'un réactif trifonctionnel ou « tripode » dont la mise en œuvre dans le cadre d'un procédé de détection en continu d'un analyte a été breveté par le CEA au début de cette thèse (Volland et al., 2002).

Les applications envisagées de ce dosage concernent aussi bien des systèmes de distribution d'eau (captage, embouteillage, entreposage et distribution proprement dite) que des systèmes de ventilation, des lieux clos sensibles (mesure atmosphérique), ou encore les eaux de baignade, les fermes d'aquaculture, et plus généralement les usines agroalimentaires.

Nous présenterons d'abord le principe de ce dosage, puis nous décrirons les molécules modèles utilisées pour notre étude (en plus des toxines décrites précédemment, voir p.21) et décrirons les objectifs du travail de thèse.

I.5.1. Principe du SPIT-FRI

Le concept original du SPIT-FRI repose sur l'utilisation d'un réactif trifonctionnel ou « tripode ». Ce réactif possède trois fonctions chimiques permettant la fixation i) d'un analogue de la molécule à doser, ii) d'un fluorophore, et iii) d'une molécule permettant un lien à la phase solide. La méthode du SPIT-FRI est basée sur le phénomène de transfert d'énergie par résonance de fluorescence ou FRET (cf p.43).

Le principe, décrit sur la Figure 12 (p.58), se décompose en quatre étapes.

(1) Dans un premier temps, le tripode est fixé sur la phase solide, puis (2) saturé avec des anticorps dirigés contre l'analyte d'intérêt, marqués avec un deuxième fluorophore, dont le spectre d'absorption recouvre en partie le spectre d'émission du fluorophore lié au tripode. La fixation de l'anticorps entraîne un phénomène de FRET entre le fluorophore du tripode (le donneur) et le fluorophore de l'anticorps (l'accepteur), induisant une diminution de la fluorescence du donneur. (3) Avec l'ajout de l'analyte, la liaison tripode-anticorps est déplacée. La fluorescence du donneur est alors restaurée, proportionnellement à la concentration en analyte ajoutée. (4) La régénération se fait par simple ajout d'anticorps marqué. La phase solide est alors prête pour un nouveau dosage.

Cette approche nous est apparue séduisante à plusieurs points de vue car elle permettrait à la fois un signal localisé, permettant une détection simultanée de plusieurs agents et cumulatif durant l'injection d'analyte, ainsi qu'une régénération simple de la phase solide, qui constituent à l'heure actuelle les principales limitations des immunocapteurs destinés à la détection en continu de molécules (cf p.49).

I.5.2. Molécules « modèles »

Nous avons choisi de mettre au point le dosage, dans un premier temps, sur quatre molécules modèles illustrant trois catégories de molécules, à savoir : la substance P (SP), modèle peptidique ; la β -lactoglobuline (BLg), modèle protéique, et l'atrazine (Atz) et l'aflatoxine B1 (AFB1), modèles de petite molécule chimique. Ces molécules ayant été simplement utilisées comme modèle d'analyte dans le cadre de l'étude de mise au point du dosage SPIT-FRI, nous nous limiterons à un bref résumé de leurs propriétés respectives (structure, fonctions et le cas échéant toxicité).

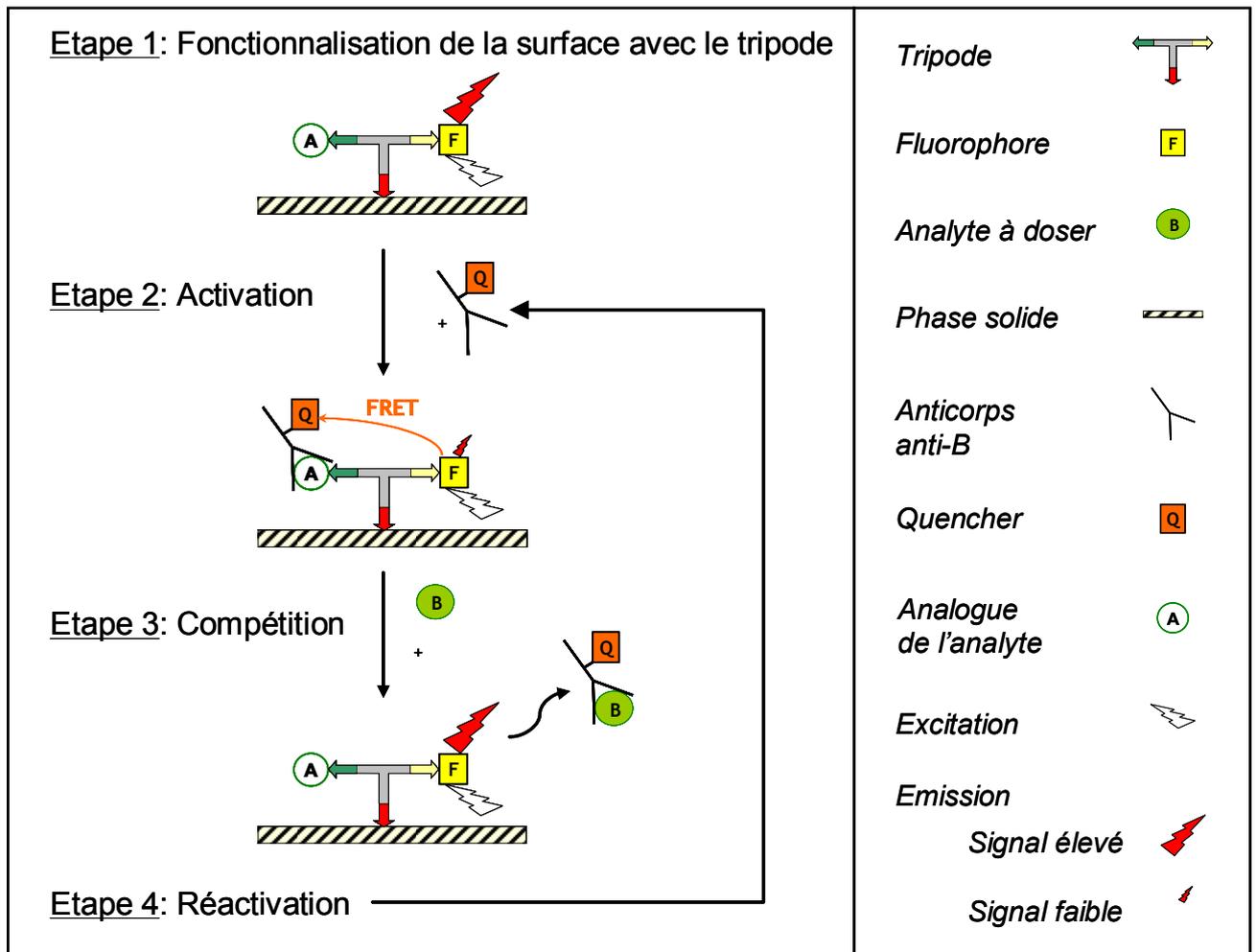


Figure 12 : Principe du dosage proposé basé sur l'utilisation d'un tripode (SPIT-FRI)

Etape 1 : Ce dosage fait intervenir un tripode comportant 3 fonctions chimiques permettant la fixation à la surface du capteur, la fixation d'une molécule analogue à la molécule à doser (A) et d'un fluorophore (F).

Etape 2 : La complexation du tripode avec l'anticorps marqué avec un *quencher* (Q) donne lieu à une diminution de la fluorescence de F.

Etape 3 : L'ajout d'analyte (B) qui rentre en compétition avec l'analogue A pour la fixation sur les sites de reconnaissance de l'anticorps conduit à un déplacement de l'anticorps, ce qui se traduit par une restauration de la fluorescence de F.

Etape 4 : La surface est réactivée par ajout d'anticorps *quencher*.

I.5.2.1.1. La Substance P

La Substance P est un neuropeptide de 11 acides aminés, de séquence : Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-CONH₂ (Figure 13, p.60). La SP est classée parmi les tachykinines qui sont des peptides se terminant par la séquence Gly-Leu-Met-CONH₂. La structure de la Substance P a été déterminée à partir d'extraits de cerveau par Chang et Leeman (Chang & Leeman, 1970). A partir de cette découverte, la synthèse a pu être réalisée (Tregear *et al.*, 1971) et des anticorps ont pu être produits permettant de localiser la présence du neurotransmetteur dans diverses régions cérébrales (Couraud *et al.*, 1987). La Substance P est largement distribuée dans l'organisme, notamment au niveau du système nerveux central. Les concentrations les plus élevées sont trouvées dans le Locus niger, l'hypothalamus et la glande pinéale. Elle a un rôle vasodilatateur, modifie certaines sécrétions (insuline, histamine). Elle assurerait, au niveau de la moelle, la transmission des influx nociceptifs (impliqués dans la douleur). Par ailleurs, elle joue probablement un rôle dans certains troubles mentaux comme les états dépressifs [pour revue, se référer à Hokfelt *et al.* (2001)].

I.5.2.1.2. La β -Lactoglobuline

La β -Lactoglobuline ou BLg (Figure 14, p.60) appartient à la famille des lipocalines. Les lipocalines sont de petites molécules secrétées qui peuvent s'associer à des ligands hydrophobes. Ainsi la BLg peut lier le rétinol, la vitamine D et le cholestérol (Papiz *et al.*, 1986 ; Wang *et al.*, 1997). Il existe différents variants de la BLg dont les plus communs sont les variants A et B, qui se différencient par deux mutations en position 64 (variant A : acide aspartique / B : glycine) et 118 (variant A : valine / B : alanine). La BLg possède 9 feuillets β anti-parallèles et une hélice α . Les feuillets β forment un calice, au milieu duquel se fixe le rétinol. La BLg possède 2 ponts disulfures, entre les résidus 106-119 et 66-160, ainsi qu'une cystéine libre en 121 (Papiz *et al.*, 1986). La BLg est présente dans le lait sous forme de dimères de 36 kDa, aux pH proches de son point isoélectrique (pI=5,8).

La BLg est un des allergènes majeurs du lait de vache. Sa fonction n'a pas encore été élucidée (Kontopidis *et al.*, 2004).

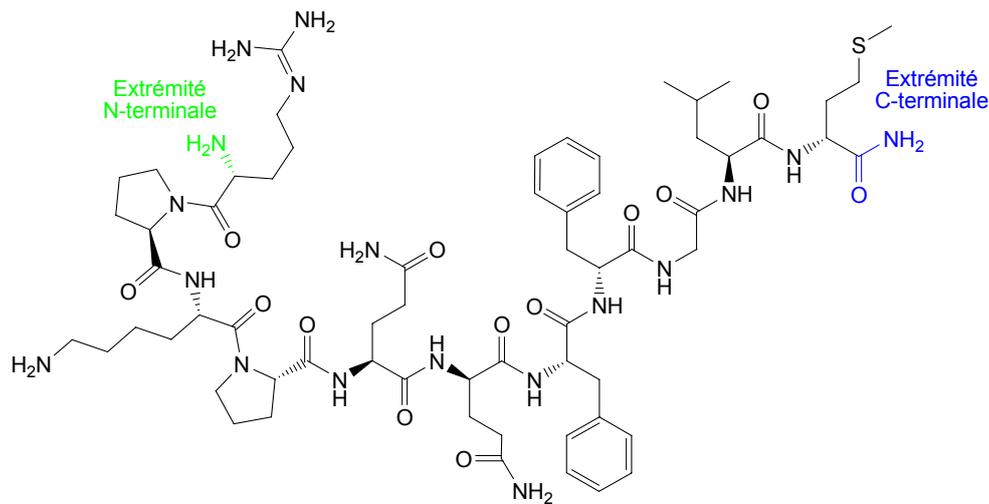


Figure 13 : Structure de la Substance P

Séquence: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-CONH₂ (1348 Da).

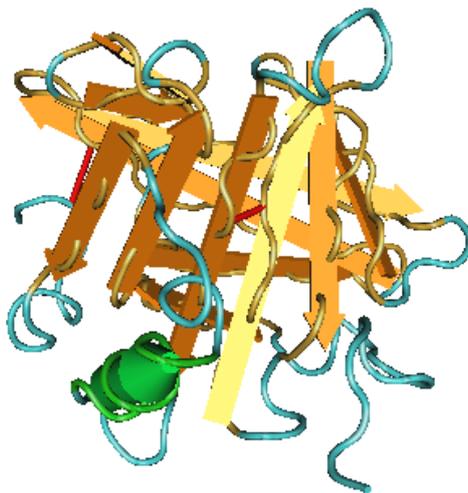


Figure 14 : Structure de la β -lactoglobuline bovine A

162 acides aminés (18364 Da). Source : Molecular Modeling Database.

Tableau 3 : Récapitulatif des molécules-modèles choisies pour la mise au point du dosage

<i>Molécule</i>	<i>Masse molaire</i>	<i>Structure</i>
Substance P (SP)	1347 Da	Peptide, 11 acides aminés
β -lactoglobuline A (BLgA)	18 364 Da	Protéine (une chaîne), 162 acides aminés
Atrazine (Atz)	216 Da	2-chloro-4(éthylamino)-isopropylamino)-s-triazine
Toxine botulinique A (TBA)	150 kDa	Protéine (di-chaîne), 1285 acides aminés
Ricine (Ric)	62 kDa	Protéine (di-chaîne), 529 acides aminés
Aflatoxine B1 (AFB ₁)	312 Da	Molécule chimique

I.5.2.1.3. L'Atrazine

L'Atrazine (2-chloro-4(ethylamino)-isopropylamino)-s-triazine, 215,7 Da) est un pesticide présentant un effet herbicide (voir structure dans le Tableau 6, p.84). Cette molécule appartient à la famille chimique des triazines dont la structure de base est un cycle aromatique contenant 3 azotes. Les triazines les plus connues, outre l'Atrazine, sont la Simazine, la Cyanazine, le Prometron et la Propazine.

L'Atrazine a été introduite en France en 1962. Etant l'un des herbicides les moins chers du marché, elle a été massivement utilisée pour la culture du maïs. Toujours autorisée aux USA, l'utilisation de l'Atrazine est interdite en France depuis juin 2003 ainsi qu'en Europe depuis septembre 2004 (certains pays de l'Union Européenne disposent d'une dérogation, sous conditions, jusqu'en 2007). La dose maximale tolérée dans l'eau domestique pour l'Atrazine est de 0,1 µg/L, soit 0,46 nM (cf le rapport de la Commission Européenne, 2004). En effet, chez l'homme, ce composé peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau, et des effets graves sur la santé en cas d'ingestion ou d'exposition prolongée. L'Atrazine a été reconnue comme mutagène, tératogène et induisant des effets sur le système reproductif. De plus, l'Atrazine est un composé nocif pour l'environnement (toxicité pour les organismes aquatiques).

La surveillance nécessite des méthodes de détection très fiables et très sensibles. Plusieurs méthodes de dosage de l'Atrazine ont été décrites en plaque de microtitration (Bacigalupo *et al.*, 2003 ; Seidel *et al.*, 2004). Lopez a décrit un immunocapteur électrochimique pour l'atrazine (Lopez *et al.*, 1998) ; de même, Vianello *et al.* ont proposé un système de détection ampérométrique en flux continu présentant une gamme de dosage entre 9 et 180 µg/L d'atrazine (1998). Récemment, l'équipe du Pr Barcelo a mis au point un biocapteur optique (River Analyzer) permettant la détection de 0,15 µg/L d'atrazine en 15 minutes (Rodriguez-Mozaz, 2004).

I.5.2.1.4. L'aflatoxine B1

L'aflatoxine B1 (AFB₁), petite molécule chimique de 312 Da (voir structure sur la Figure 25, p.86), est produite par les moisissures *Aspergillus flavus* et *A. parasiticus*, naturellement présentes dans l'air ambiant, le sol et sur les cultures. Ces espèces fongiques produisent également l'aflatoxine B2 (AFB₂), ainsi que les aflatoxines G1 (AFG₁), et G2 (AFG₂), ces deux dernières étant seulement produites par *A. parasiticus*. Les principales sources de

contamination alimentaire par les aflatoxines sont les céréales, l'arachide, les graines de coton et les fruits secs, ainsi que le lait (aflatoxine M1). Molécules lipophiles de petite taille, les aflatoxines sont chimiquement très stables ; elles résistent à l'acidité et aux hautes températures, jusqu'à 250 °C (Bhatnagar *et al.*, 2002). Les procédés de conservation usuels (stérilisation, pasteurisation, lyophilisation, congélation) ne les détruisent que très peu. Différents procédés de décontamination des aliments ont pu être mis au point pour réduire la concentration en aflatoxines de denrées contaminées (Harvey *et al.*, 1991 ; Park, 2002).

Les aflatoxines sont mutagènes, carcinogènes et tératogènes. Elles présentent des effets cancérigènes principalement au niveau du système hépatique. La toxicité de l'AFB₁, dont la DL₅₀ (dose conduisant à la mort de 50 % de la population) est estimée à 0,5 mg/kg de poids corporel chez l'homme (Lee *et al.*, 2004), est plus élevée que la plupart des molécules cancérigènes connues.

L'AFB₁, la plus toxique des quatre aflatoxines naturelles, a été classée dans la catégorie I des molécules cancérigènes par l'IARC, c'est à dire comme substance aux effets cancérigènes avérés chez l'homme (International Agency for Research on Cancer, 1996). Les monooxygénases cytochrome p450 dépendantes transforment AFB₁ en époxyde (sur la double liaison du cycle dihydrofurane), pouvant interagir avec les acides nucléiques et les protéines (McLean & Dutton, 1995 ; Wang & Groopman, 1999). La formation d'adduits à l'ADN au niveau de la Guanine induit une modification du cadre de lecture (Foster *et al.*, 1983). Chez l'homme, des études ont permis de mettre en évidence une mutation du gène suppresseur de tumeur p53 (codon 249) dans un cas sur deux de carcinome hépatocellulaire associé à une exposition aux aflatoxines (Stern *et al.*, 2001).

Plusieurs épisodes d'intoxications aiguës aux aflatoxines chez l'homme ont été rapportés dans la littérature. Le plus important eut lieu en Inde en 1974 avec un taux de mortalité de 25 % parmi la population ayant consommé du maïs fortement contaminé correspondant à l'ingestion de 2 à 6 mg d'aflatoxine durant environ 1 mois (Krishnamachari *et al.*, 1975). Plusieurs épisodes survinrent également au Kenya en 1981 et en 2004 (Center for Disease Control and Prevention, 2004). L'AFB₁ n'est pas considérée classiquement comme un agent de la menace à proprement parler et ne fait pas partie de la liste des agents de la CDC (Tableau 1, p.18) ; cependant, en 1995, l'Irak a révélé disposer d'aflatoxines parmi ses réserves d'armes biologiques (Kortepeter & Parker, 1999). Des extraits de cultures fongiques, dont l'obtention ne nécessite pas de technicité particulière, pourraient directement être utilisés pour empoisonner les aliments ou les sources d'eau de façon particulièrement insidieuse,

puisque les premiers symptômes d'une aflatoxicose étant peu spécifiques, il serait difficile d'identifier l'origine d'une telle attaque (Stark, 2005).

I.5.3. Objectifs de la thèse

Dans la perspective de mise au point de systèmes de détection rapides et sensibles des agents de la menace biologique, ce travail avait pour objectif d'étudier un nouveau procédé de dosage immunologique par fluorescence, basé sur l'emploi d'un réactif trifonctionnel (tripode). Cette méthode originale, pouvant permettre la détection simultanée de plusieurs agents, la possibilité de réaliser plusieurs essais successifs sur une même surface et la détection de faibles concentrations grâce à un effet cumulatif de la phase solide, pourrait pallier certaines limitations des immunodosages en flux. Ce procédé a fait l'objet d'un dépôt de brevet par le CEA au début de la thèse (Volland et al., 2002). La faisabilité de cette méthode avait été montrée par des expériences préliminaires en microplaque pour une molécule, la Substance P, qui a été utilisée comme modèle de référence dans cette thèse.

L'objectif de la thèse était d'évaluer les performances de cette méthode en microplaque et la faisabilité d'un dosage en flux. Nous nous sommes notamment penchés sur la question de son applicabilité à des molécules de plus grande taille que la Substance P, qui n'était pas évidente en raison de l'assujettissement du FRET aux faibles distances. Le Tableau 3 (p.60) présente les différentes molécules modèles et toxines utilisées, montrant leur diversité de structure et de taille.

La première partie de ce travail a ainsi consisté à mettre au point le dosage SPIT-FRI (voir description du principe au I.5.1, p.57) en plaque de microtitration sur la Substance P, peptide de 11 acides aminés. Différents paramètres ont été étudiés afin d'améliorer les caractéristiques du dosage en terme de sensibilité et robustesse. Nous avons étudié l'influence des paramètres de mesure de fluorescence sur phase solide, des paramètres d'incubation (durée, pH, tampon, température), des fluorophores (nature du fluorophore, influence de la distance donneur-accepteur), et de l'anticorps (affinité, ratio de marquage).

Dans un deuxième volet, nous présenterons les résultats obtenus pour les autres molécules modèles. Nous avons utilisé plusieurs stratégies de mise au point du tripode pour les petites molécules chimiques d'une part, et les protéines d'autre part. Nous exposerons également les résultats des campagnes d'immunisation pour la production d'anticorps dirigés contre la toxine botulinique A et la ricine, et les problèmes rencontrés pour l'adaptation au SPIT-FRI.

La troisième partie concerne la transposition du SPIT-FRI à un système en flux. Après une partie méthodologique, nous exposerons les résultats obtenus qui mettent en évidence la faisabilité de la méthode mais aussi la complexité de l'analyse du signal. Nous présenterons rapidement le système de détection mis au point par le LETI, qui ouvre de nouvelles perspectives pour le développement de cette méthode.

La quatrième partie, en marge du projet principal, est relative à un autre format de dosage immunologique, basé sur l'inhibition de la fluorescence sur phase solide (SPI-FIA, pour *Solid-Phase Inhibited Fluorescence ImmunoAssay*). Au cours des essais de mise au point du SPIT-FRI en microplaque, nous avons en effet observé une diminution de la fluorescence lors de la fixation des molécules à la surface qu'il nous a semblé intéressant d'exploiter pour mettre au point un nouveau format de dosage rapide et sans étape de lavage en microplaque. Nous présenterons les résultats obtenus avec différentes molécules modèles.

II. MATÉRIEL & MÉTHODES

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel pour les expériences en plaques de microtitration

II.1.1.1. Plaques de microtitration

Nous avons employé des microplaques de 96 puits en polystyrène de différente qualité. Pour les dosages où la réaction a lieu sur phase solide, nous avons utilisé des plaques en polystyrène « haute adsorption » (Maxisorp®). La surface traitée « haute adsorption » est une surface modifiée par irradiation, à base de polystyrène, qui présente une forte affinité aux groupes polaires et hydrophiles, permettant une adsorption des protéines beaucoup plus élevée que sur le polystyrène non traité, qui a été employé pour les dosages dits « en milieu homogène » où la réaction a lieu en phase liquide. Les puits sont de forme cylindrique à fond plat.

Ces plaques en polystyrène traité ou non peuvent être de différentes couleurs. Pour les mesures d'absorbance, nous avons employé des plaques en polystyrène transparent de la marque Nunc (Roskilde, Danemark). Pour les mesures de fluorescence, nous avons principalement utilisé des plaques en polystyrène noir des marques Nunc, Matrix Technologies (Hudson, USA) et Corning (New York, USA). Nous avons aussi employé des plaques en polystyrène blanc (Nunc), ou « mixte » constituées de polystyrène noir sur les côtés et transparent au fond des puits (Corning).

II.1.1.2. Instruments de mesure de fluorescence pour plaques de microtitration

II.1.1.2.1. Fonctionnement des appareils : généralités

Nous rappellerons ici brièvement le fonctionnement des lecteurs de fluorescence¹⁰. Les principaux composants d'un appareil de mesure de fluorescence sont : la source d'excitation, les filtres ou les monochromateurs, le transducteur et la cellule de mesure.

¹⁰ Pour une présentation générale des instruments de mesure par fluorescence, le lecteur peut se référer à Skoog *et al.* (2003).

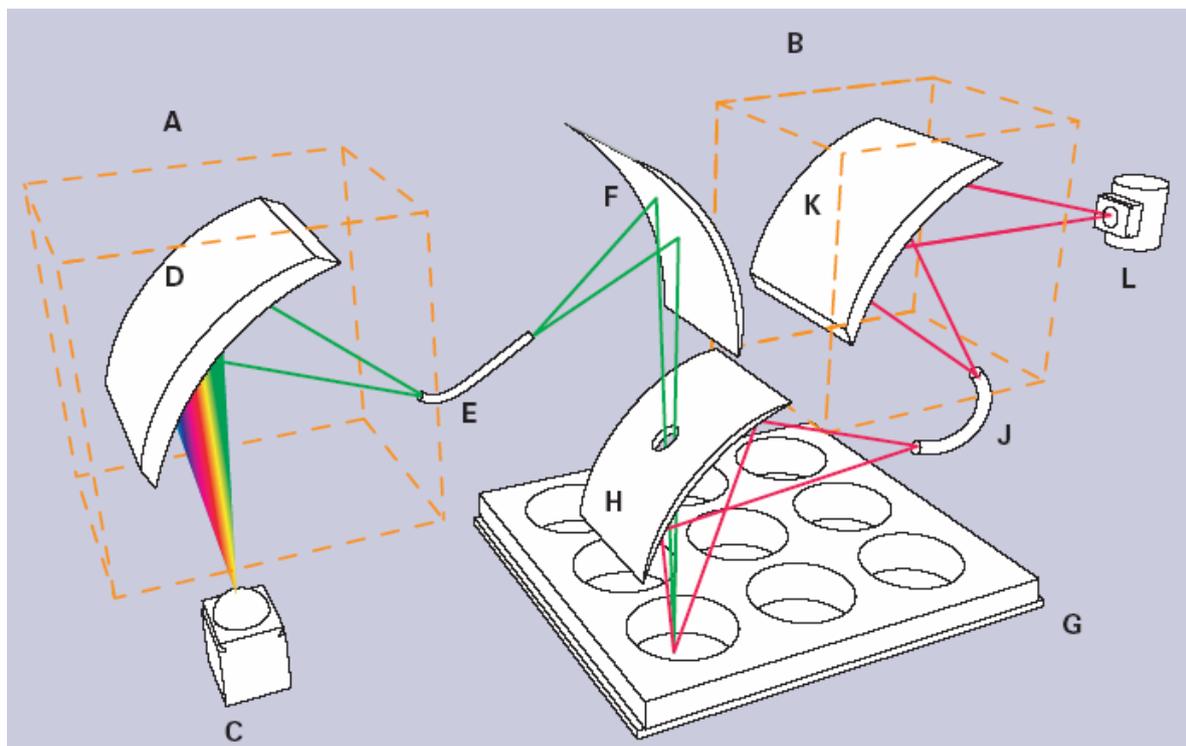


Figure 15 : Fonctionnement d'un spectrofluorimètre

Cet instrument utilise un monochromateur d'excitation (A) et un monochromateur d'émission (B).

Le faisceau lumineux de la lampe (C) est envoyé sur un réseau de diffraction (D) qui permet de sélectionner la longueur d'onde d'excitation désirée. La lumière transmise par une fibre optique (E) est réfléchi sur un miroir de focalisation (F) et dirigée vers le centre du puits de la plaque (G). La fluorescence résultante revient sur un miroir de focalisation (H). Après passage par une seconde fibre optique (J), le faisceau est dispersé par le réseau de diffraction (K).

Le rayonnement de fluorescence à la longueur d'onde d'émission choisie est détecté par un tube photomultiplicateur (L).

(D'après la brochure du Spectramax Gemini XS, Molecular Devices)

- Source

Généralement, il s'agit d'une lampe à vapeur de mercure qui présente un spectre de raies dans l'UV et le visible, ou une lampe à arc à xénon possédant un spectre continu de 300 à 1300 nm ; certains appareils utilisent une source laser.

- Filtres et monochromateurs

Classiquement, on distingue deux types d'appareils selon le mode de sélection des longueurs d'onde des rayonnements, à savoir les spectrofluorimètres d'une part, qui comportent un monochromateur permettant de balayer le spectre de la lumière, et les fluorimètres d'autre part, qui utilisent des filtres.

Les fluorimètres utilisent des filtres pour la sélection des longueurs d'onde aussi bien des rayonnements d'excitation que d'émission de fluorescence. Un filtre est caractérisé par son spectre de transmittance, défini par la position de son maximum de transmittance (ou longueur d'onde nominale), sa bande passante, la transmittance dans cette bande passante et en dehors et ses fronts de montée et de descente. On utilise généralement des filtres interférentiels qui exploitent le phénomène d'interférence optique et permettent d'obtenir une bande passante relativement étroite. Ils sont constitués de plusieurs couches diélectriques dont l'empilement conditionne le spectre de transmittance.

Les spectrofluorimètres sont équipés d'au moins un et souvent de deux monochromateurs à réseaux décomposant la lumière à la manière d'un prisme. Ils requièrent une source de rayonnement continu (ex : lampe à xénon). Le réseau consiste en une surface, souvent recouverte d'un matériau réfléchissant, sur laquelle est gravé un très grand nombre de sillons. Lorsque le faisceau lumineux, rendu préalablement parallèle, arrive sur la surface gravée, il se produit un phénomène de diffraction de la lumière qui est responsable de la dispersion angulaire des longueurs d'onde du rayonnement.

- Transducteur

Comme tout instrument optique, un appareil de mesure de fluorescence utilise un transducteur permettant de convertir l'énergie du rayonnement en signal électrique. Le signal de fluorescence étant en général de très faible intensité, un amplificateur à gain élevé est nécessaire pour les mesures. Les tubes photomultiplicateurs sont les détecteurs les plus fréquemment utilisés dans les appareils sensibles de fluorescence. Ils contiennent une surface solide photosensible qui émet des électrons lorsqu'elle est irradiée, et d'autres surfaces qui émettent des cascades d'électrons lorsqu'elles sont frappées par les électrons émis par la

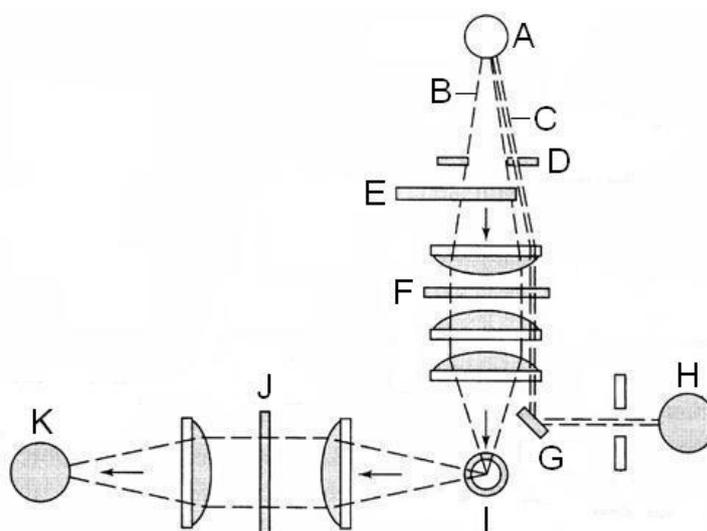


Figure 16 : Fonctionnement d'un fluorimètre

Le faisceau de la lampe (A) est séparé en deux : le faisceau d'excitation (B) et celui de référence (C) qui passe au travers d'un disque percé (D).

Les rayons transmis par l'obturateur (E) passent par le filtre primaire (F). Le faisceau de référence est réfléchi par un miroir (G) et mesuré par le photomultiplicateur de référence (H). Le faisceau d'excitation est focalisé sur l'échantillon (I). La fluorescence résultante passe par le filtre secondaire (J) et est détectée par le photomultiplicateur de l'échantillon (K).

(Source: Skoog D.A. et al., 2003 citant un document de Farrand Optical Co, Inc.)

Tableau 4 : Jeux de filtres du fluorimètre Envision

Pour chaque jeu de filtres sont indiquées la longueur d'onde nominale (nm), le pourcentage de transmittance ou T, en %, et la bande passante ou BP (nm) des filtres et la longueur d'onde de coupure (nm) du miroir dichroïque.

* Pour le filtre à 685 nm, T n'a pas été indiquée par le fournisseur.

(Source : Perkin-Elmer)

Jeu de filtres	Filtre primaire (excitation)	Filtre secondaire (émission)	Miroir dichroïque
485/535	485 nm, BP=14 nm, T=60%	535 nm, BP=25 nm, T=50%	505 nm
535/590	535 nm, BP=25 nm, T=50%	590 nm, BP=20 nm, T=60%	555 nm
620/685	620 nm, BP=10 nm, T=65%	685 nm, BP=35 nm, *	658 nm

surface photosensible, permettant l'amplification du signal. D'autres instruments utilisent les détecteurs à transfert de charges communément appelés CCD (*Charge Coupled Devices*), ou encore des détecteurs à barrettes de diode.

- *Cellule de mesure*

Les appareils de mesure de fluorescence en cuve utilisent des cellules en verre ou en silice conçues pour limiter la puissance de la lumière parasite atteignant le détecteur. Dans le cas des lecteurs de plaque de microtitration, la cellule de mesure correspond aux puits de la plaque.

Le fonctionnement d'un spectrofluorimètre est décrit sur la Figure 15 (p.68). Il utilise des monochromateurs à réseau. Le monochromateur d'excitation permet de décomposer la lumière de la lampe grâce au réseau de diffraction, puis de sélectionner une bande étroite de longueurs d'onde dans ce spectre. La lumière issue du monochromateur est dirigée sur l'échantillon contenu dans le puits. Le rayonnement de fluorescence résultant est détecté par un tube photomultiplicateur après avoir été dispersé par le monochromateur d'émission. Cet appareil permet l'acquisition de spectres d'excitation (longueur d'onde d'émission fixée ; variation de la longueur d'onde d'excitation) et d'émission (longueur d'onde d'excitation fixée ; variation de la longueur d'onde d'émission).

Le fonctionnement d'un fluorimètre est décrit sur la Figure 16 (p.70). Le faisceau émis par la source traverse le filtre primaire (ou filtre à l'excitation), puis est focalisé dans le puits de la microplaque à l'aide de lentilles. Le rayonnement d'émission de fluorescence traverse un second filtre (filtre à l'émission) et est détecté par un tube photomultiplicateur.

Afin de réduire la lumière parasite issue de la lumière d'excitation, un dispositif permettant de filtrer sélectivement la lumière peut être placé en amont du filtre à l'émission. On peut utiliser un miroir dichroïque qui réfléchit ou transmet la lumière en fonction de la longueur d'onde.

II.1.1.2.2. Lecteurs utilisés

Sauf spécification contraire, nous avons utilisé le fluorimètre Envision 2100 Multilabel Reader commercialisé par Perkin-Elmer (Boston, USA). Ce lecteur fonctionne avec une lampe à arc à xénon de type « flash » fournissant des impulsions de lumière de forte intensité à intervalles de temps régulier. Il possède un système optique additionnel permettant une lecture par le dessous du puits. La mesure peut être optimisée en réglant le gain, le nombre de flashes, le nombre de lectures par puits et la hauteur de focalisation dans le puits (h de 0 à 6 mm). Nous avons utilisé trois jeux de filtres décrits dans le Tableau 4 (p.70) composés chacun d'un filtre primaire (sélection des longueurs d'onde d'excitation), d'un filtre

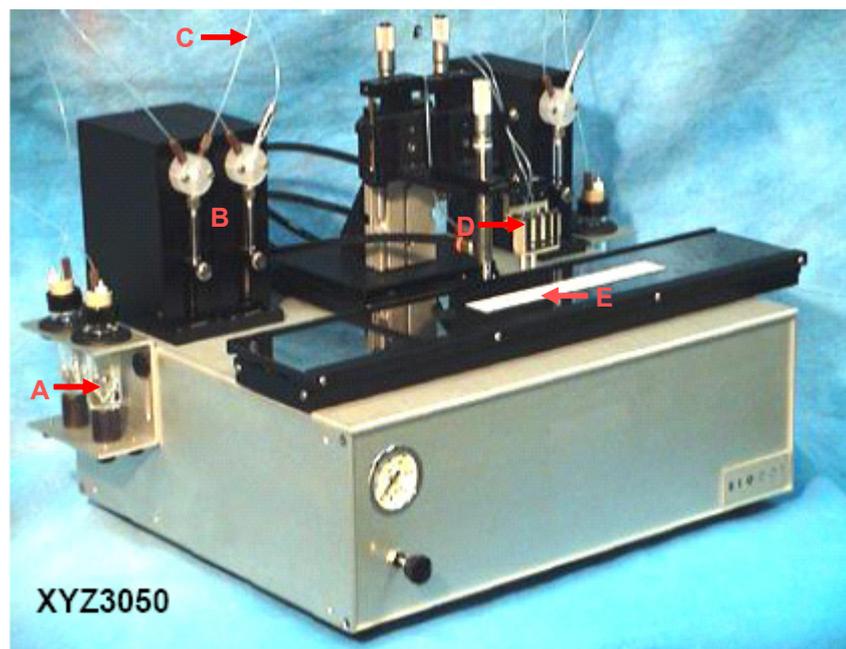


Figure 17 : Robot de dépôt

D'après Biodot, Inc.

La solution (A) est prélevée par une pompe à seringues (B). Le liquide est transporté dans une tubulure flexible (C) qui est reliée à la valve (D) qui permet de dispenser des gouttes sur la lame fixée sur le porte-support (E). Un bras robotisé permet de contrôler la position de l'embout sur l'axe des X.

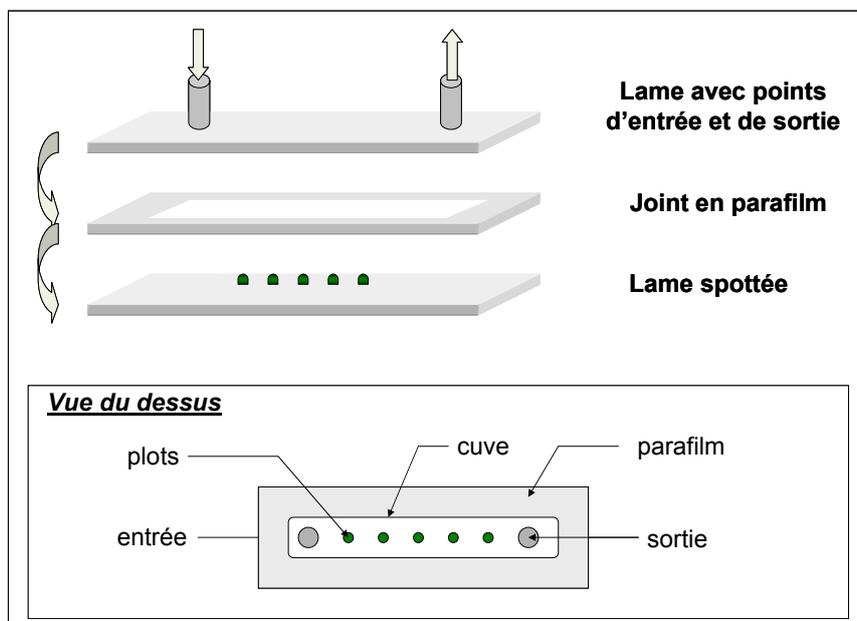


Figure 18 : Montage de la microcellule pour les lames

Une lame possédant un point d'entrée et un point de sortie est superposée à la lame fonctionnalisée (lame spottée). Le joint est effectué grâce à une couche de parafilm dont l'épaisseur et la forme définissent le volume et la géométrie de la microcellule ainsi formée. En insert : vue du dessus.

secondaire (sélection des longueurs d'onde d'émission) et d'un miroir dichroïque caractérisé par sa longueur d'onde de coupure ou « *cut off* » (seuls les rayons de longueur d'onde supérieure à celle-ci étant transmis).

Les premiers résultats présentés dans cette thèse ont été obtenus à l'aide du fluorimètre Analyst AD commercialisé par Molecular Devices (Sunnyvale, USA) fonctionnant avec une lampe à arc à xénon fournissant un éclairage continu. Nous avons utilisé un jeu de filtres à 485 nm pour l'excitation et 535 nm pour l'émission, avec un miroir dichroïque à 505 nm. Nous avons également utilisé le spectrofluorimètre Spectramax Gemini XS (Molecular Devices) fonctionnant avec une lampe flash à arc à xénon (cf Figure 15, p.68).

II.1.1.3. Autre matériel pour plaques de microtitration

Nous avons utilisé des distributeurs (Autodrop) et laveurs (Washer 120) automatiques de plaques, ainsi qu'un photomètre pour plaques équipé de filtres à 414 nm et 560 nm (Multiskan EX), commercialisés par Labsystems (Helsinki, Finlande).

Nous avons également employé une thermosoudeuse pour plaques manuelle (Combi Thermo Sealer) distribuée par ABgene (Epsom, Royaume-Uni). Cet appareil permet de sceller les plaques avec un film afin d'empêcher l'évaporation des solutions contenues dans les puits.

II.1.2. Matériel pour les expériences en format capillaire et lame

II.1.2.1. Capillaires et lames

Nous avons utilisé des capillaires en borosilicate commercialisés par Wale Apparatus (Hellertown, USA). Les capillaires sont longs de 5 cm et présentent une section carrée ou ronde. Les capillaires à section carrée ont une arête interne de 0,5 mm, et une paroi de 0,5 mm d'épaisseur. Les capillaires à section ronde ont un diamètre interne de 0,5 mm et une paroi de 0,2 mm d'épaisseur.

Nous avons utilisé des lames de microscopie en verre « Gold Seal », de taille standard (longueur 75 mm, largeur 25 mm, épaisseur 1 mm), distribuées par Electron Microscopy Science (Hatfield, USA). Nous avons également employé des lames en polystyrène transparent Maxisorp (voir II.1.1.1, p.67), commercialisées par Nunc.

II.1.2.2. Robot de dépôt

Nous avons utilisé un robot de dépôt ou « spotteur » Biojet Quanti 3000 distribué par Biodot (Irvine, USA), qui est présenté sur la Figure 17 (p.72). Ce robot permet de délivrer des gouttes de faible volume (de 10 nL à 1 µL) avec précision (CV inter-gouttes < 5%).

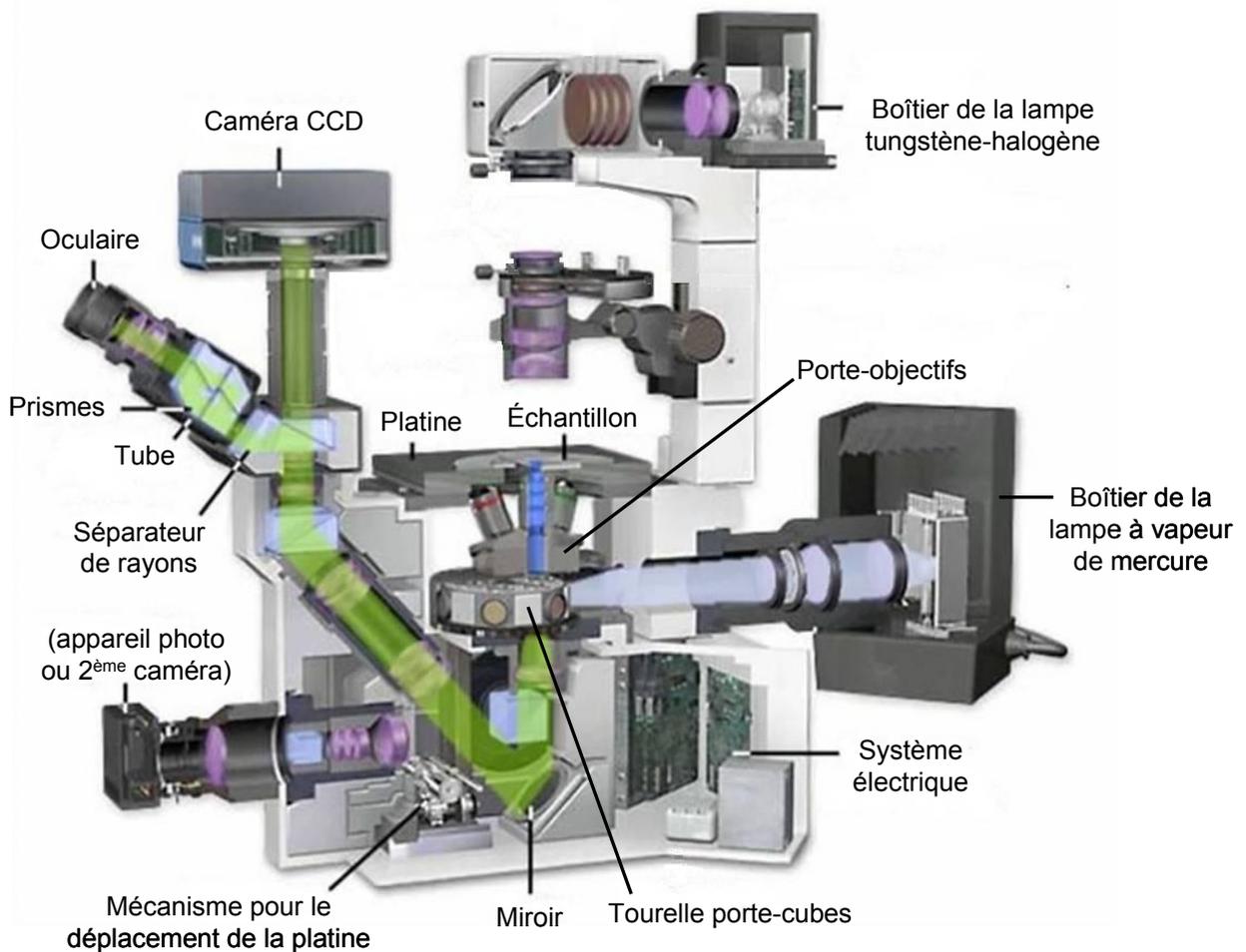


Figure 19 : Schéma du microscope à fluorescence

Schéma du microscope IX71 (Olympus).

Le faisceau de la lampe à vapeur de mercure (en bleu clair sur le schéma) traverse un système de lentilles et de filtres avant d'arriver au niveau du bloc optique (ou « cube ») qui comporte un filtre à l'excitation, un miroir dichroïque et un filtre à l'émission. Après avoir traversé le filtre à l'excitation, la lumière réfléchiée par le miroir dichroïque (en bleu foncé) est focalisée sur l'échantillon grâce à l'objectif. La lumière émise (en vert) revient par l'objectif, traverse le miroir dichroïque, puis le filtre à l'émission, avant de suivre le train optique du microscope. Le séparateur de rayons permet d'orienter la lumière vers les oculaires ou la caméra CCD.

(Source : Davidson M.W., 2006)

II.1.2.3. Matériel pour le système fluide

II.1.2.3.1. Pompe et tubulures

Nous avons utilisé une pompe péristaltique IPCN-8 canaux fabriquée par Ismatec (Glattbrugg, Suisse) permettant d'obtenir un flux relativement exempt d'impulsions et employant jusqu'à 8 tubulures en parallèle. Le flux, contrôlé par la vitesse du moteur et le diamètre intérieur de la tubulure, est compris entre 0,4 $\mu\text{L}/\text{min}$ et 11 mL/min . Nous avons utilisé des tubulures en tygon commercialisées par Bioblock (Illkirch, France) de différents diamètres internes (0,2 / 0,5 / 0,8 mm).

II.1.2.3.2. Microcellule pour lame

Nous avons utilisé une lame de verre vierge percée en deux endroits, où nous avons fixé des embouts en plastique. Un joint est intercalé entre la lame percée et la lame fonctionnalisée, créant ainsi une microcellule étanche, pouvant être connectée aux tubulures d'entrée et de sortie (voir Figure 18, p.72). Le joint est constitué d'un rectangle de parafilm dessinant une microcellule de 25 mm de long, 3 mm de large et 100 μm de haut ($V=7,5 \mu\text{L}$). L'ensemble est maintenu avec deux pinces sur les côtés afin d'assurer l'étanchéité.

Nous avons également utilisé une lame à 4 embouts, permettant une double circulation en parallèle dans deux microcellules de 10 mm x 3 mm x 100 μm chacune.

II.1.2.4. Microscope à fluorescence et matériel associé

Nous avons utilisé un microscope inversé Olympus IX71-S8F (Olympus Europa, Hamburg, Allemagne) présenté sur la Figure 19 (p.74). Le microscope est équipé d'une lampe à vapeur de mercure (HBO, 100 Watts). La lumière de la source traverse un système de lentilles et de filtres avant d'arriver au niveau du bloc optique (ou « cube ») qui comporte un filtre à l'excitation, un miroir dichroïque et un filtre à l'émission. Après avoir traversé le filtre à l'excitation, la lumière réfléchiée par le miroir dichroïque (longueur d'onde inférieure au *cut off*) est focalisée sur l'échantillon grâce à l'objectif. La lumière émise revient par l'objectif, traverse le miroir dichroïque (qui transmet la lumière de longueur d'onde supérieure au *cut off*), puis le filtre à l'émission avant de suivre le train optique du microscope. L'intensité de la lumière arrivant sur l'échantillon et l'aire de la zone illuminée sont définies manuellement respectivement à l'aide du diaphragme d'ouverture (DO) et du diaphragme de champ (DC).

Nous avons employé un objectif grossissant 4 fois (Olympus) et trois blocs optiques ou « cubes » correspondant à une émission de fluorescence dans le bleu, le vert ou le rouge. Les

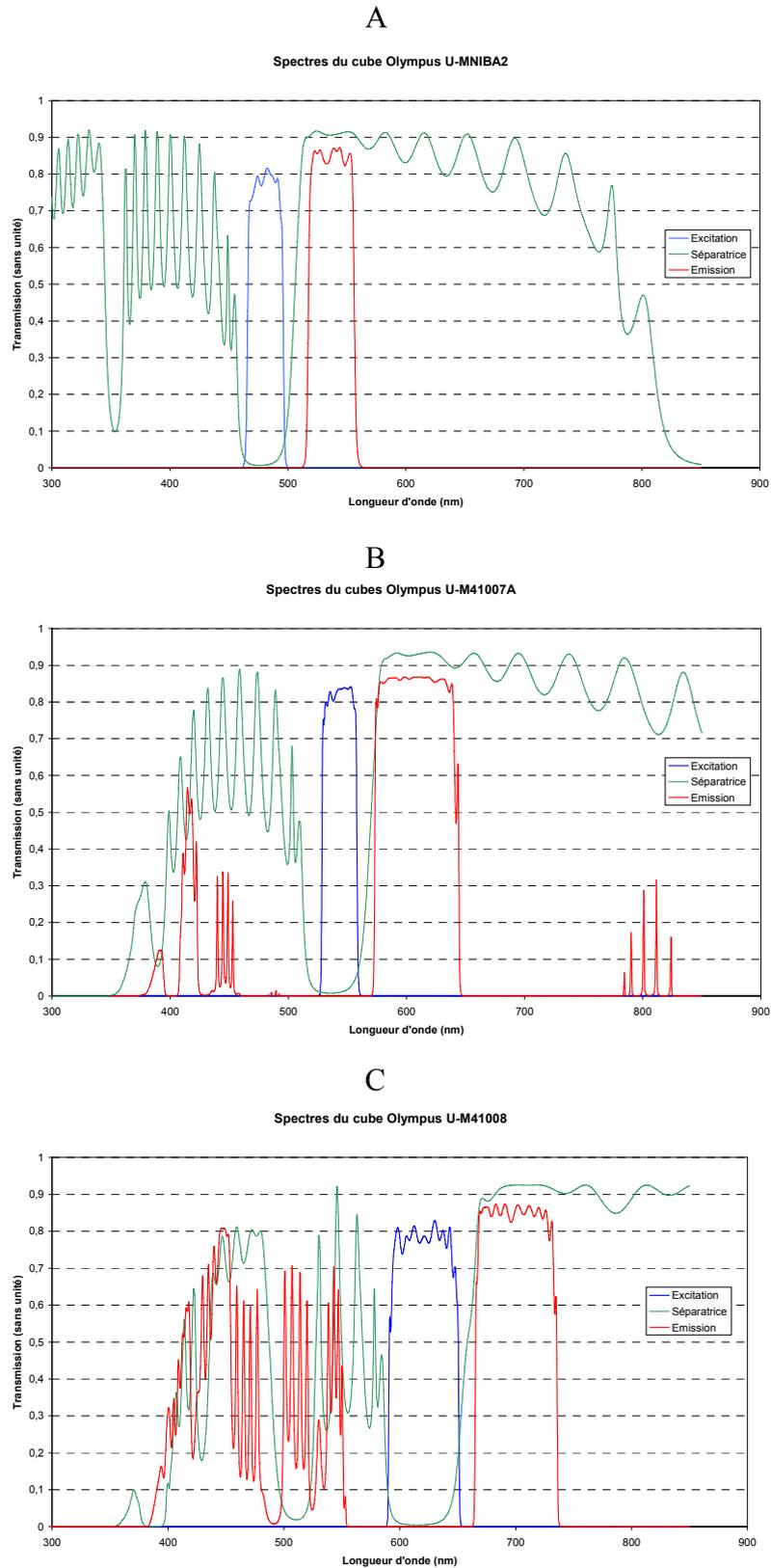


Figure 20 : Spectres de transmission des filtres des blocs optiques du microscope à fluorescence

Spectres de transmission des filtres à l'excitation (en bleu), à l'émission (en rouge) et du miroir dichroïque ou « séparatrice » (en vert) pour les blocs optiques « bleu » (A), « vert » (B) et « rouge » (C). (Spectres obtenus par François Perraut, CEA/LETI)

spectres de transmission des filtres et miroirs dichroïques utilisés sont présentés sur la Figure 20 (p.76). Pour le cube bleu, les filtres à l'excitation et à l'émission sélectionnent respectivement les longueurs d'onde à 485 +/- 30 nm et 535 +/- 40 nm (*cut off* à 505 nm). Le cube vert possède un filtre à l'excitation de bande passante 545 +/- 30 nm, et un filtre à l'émission de bande passante 610 +/- 70 nm, et un *cut off* à 570 nm. Enfin, le cube rouge permet de sélectionner une excitation à 620 +/- 60 nm et une émission à 700 +/- 75 nm (*cut off* à 660 nm).

Nous avons utilisé une caméra CCD (*Charge Coupled Device*) HisIS23E commercialisée par Europixel (Italie) permettant l'acquisition d'images de 768 x 512 pixels. Le capteur CCD est sensible à tous les photons ayant une longueur d'onde allant de 400 nm à 1 µm. Il prend une image en noir et blanc, sensible au nombre total de photons.

Nous avons équipé le microscope d'une platine motorisée MSM8R (Prior Scientific Instruments, Cambridge, Royaume-Uni) et d'un obturateur automatique IX2 (Olympus). Les logiciels d'acquisition des images ont été écrits par Emmanuelle Schultz et François Perraut du CEA Grenoble (Labview). Ils permettent de contrôler le déplacement de la platine du microscope, l'obturateur (déterminant le temps d'exposition et la fréquence des mesures), et le *binning*. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel Image J (Rasband, 2006).

II.1.3. Autres instruments

- *Spectrophotomètre à cuve*

Nous avons utilisé un spectrophotomètre à cuve HP 8453 distribué par Hewlett-Packard (Palo Alto, USA) permettant la mesure des spectres d'absorbance de solutions dans l'ultraviolet et le visible.

- *Spectromètre de masse Maldi-Tof*

Nous avons utilisé un spectromètre de masse Maldi-TOF (pour Matrix Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-Of-Flight) Voyager DE STR commercialisé par Applied Biosystems (Foster City, USA). Suivant la méthode du Maldi-TOF, la solution à analyser est mélangée à une solution de petites molécules organiques appelée matrice et déposée sur une plaque de métal. L'irradiation de la matrice par un laser provoque l'excitation électronique des molécules de la matrice, puis l'ionisation des molécules déposées et leur désorption. Les ions sont alors accélérés et envoyés dans un tube de vol maintenu sous vide où ils volent jusqu'au détecteur à une vitesse d'autant plus élevée que leur masse est faible. Les temps de

passage permettent de calculer le rapport de la masse (m) sur la charge de la molécule ionisée (z).

- *Appareils pour chromatographies*

Nous avons utilisé une HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) avec détecteur d'absorbance (UV/visible) commercialisée par Waters (St Quentin en Yvelines, France).

Les électrophorèses ont été réalisées à l'aide de l'appareil Phast System commercialisé par Amersham Biosciences (Piscataway, USA). Cet appareil utilise des gels précoulés et permet de contrôler les étapes de migration et de coloration du gel.

- *Synthétiseur de peptides*

Nous avons utilisé le synthétiseur de peptides ABI433A (Applied Biosystems, USA).

II.2. Réactifs

II.2.1. Réactifs chimiques

Sauf indication contraire, tous les réactifs chimiques présentent les meilleures caractéristiques de pureté et ont été achetés chez Sigma (St Louis, USA).

II.2.2. Tampons courants

Le tampon Phosphate, utilisé dans de nombreux protocoles, correspond à du tampon phosphate de potassium pH 7,4. 1L de la solution-mère à 1M est obtenu en mélangeant 802 mL de solution de K_2HPO_4 1M et 198 mL de solution de KH_2PO_4 1M. Il est utilisé généralement à 0,1M (préparé par dilution à partir de la solution-mère à 1M).

Le tampon d'immobilisation ou de « *coating* » correspond à du tampon Phosphate 50 mM pH 7,4 (préparé extemporanément) utilisé pour l'immobilisation par adsorption des protéines sur les plaques Maxisorp.

Le tampon EIA est composé de tampon Phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant 0,1 % de BSA (sérum albumine bovine), 0,15 M de NaCl et 0,01% d'azide de sodium (NaN_3). Il est utilisé pour la saturation des supports (plaques, capillaires et lames), la BSA permettant d'éviter

l'adsorption passive des protéines et de limiter le signal non spécifique, ainsi que pour la dilution des standards et échantillons.

Le tampon PVP est composé de tampon Phosphate 0,1 M pH 7,4 contenant 0,1 % de PVP [poly(vinyl-pyrrolidone)], 0,15 M de NaCl et 0,01 % de NaN₃. Il est utilisé comme le tampon EIA.

Le tampon de lavage est composé de tampon Phosphate 10 mM pH 7,4 contenant 0,05 % de Tween 20 (détergent amphiphile permettant de limiter les interactions non spécifiques entre protéines). Il est utilisé pour le lavage des supports (plaques, capillaires et lames).

Le « milieu d'Ellman » est composé de tampon Phosphate 0,1 M pH 7,4 additionné de NaCl 0,15 M, d'acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB) à $2,5 \cdot 10^{-4}$ M et de iodure d'acétylthiocholine à $7,5 \cdot 10^{-4}$ M (préparé extemporanément). Il est utilisé pour la révélation des dosages EIA (voir description de la méthode d'Ellman, au II.3.1.1, p.90).

Le tampon d'électrophorèse est composé de Tris 10 mM pH 8 contenant 5 % de SDS et 1 mM d'EDTA.

II.2.3. Fluorophores et *quencher*s

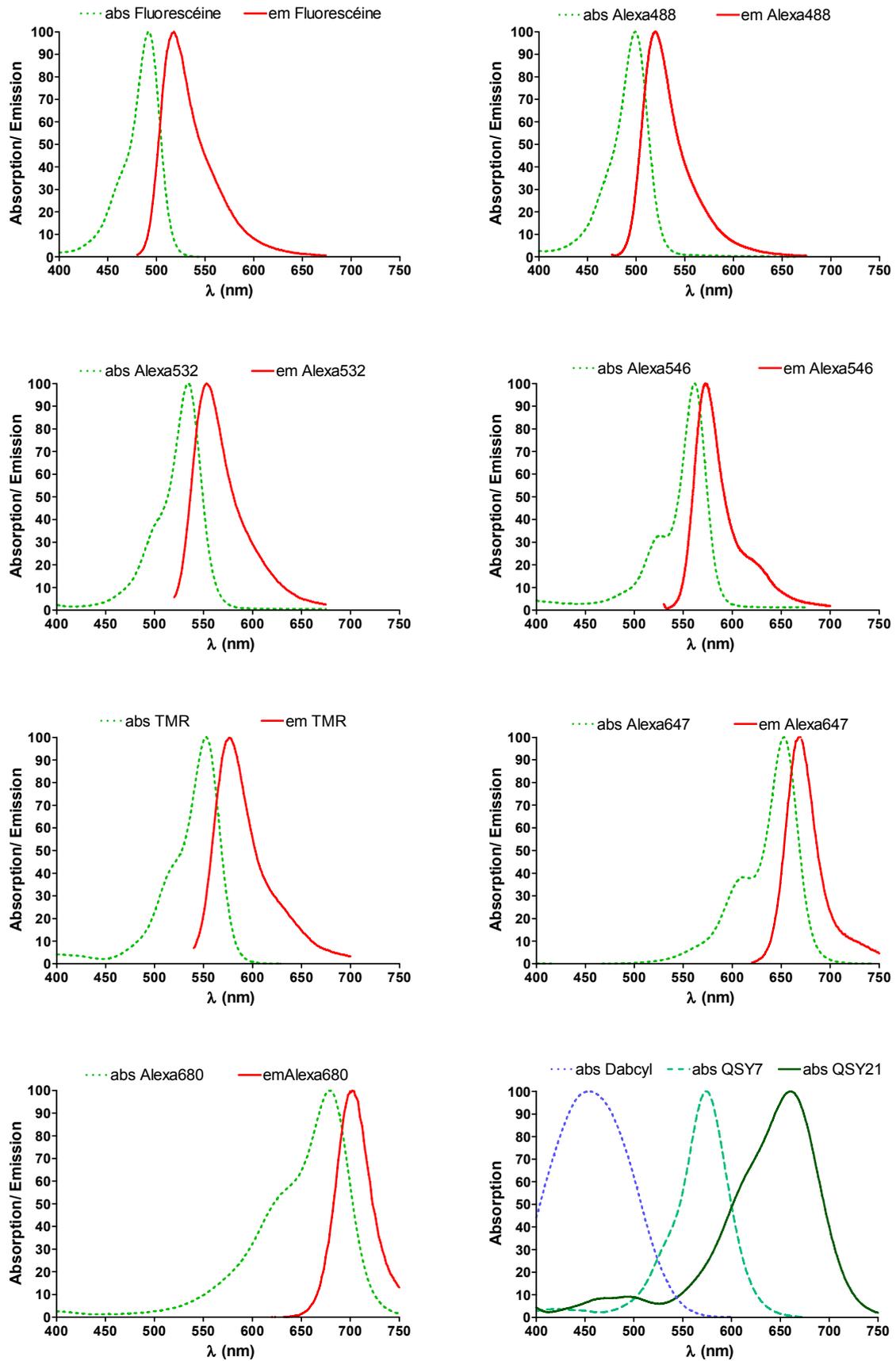
Nous avons utilisé différents fluorophores ou *quencher*s sous forme d'ester actif : la Fluorescéine, la Tétraméthylrhodamine (TMR), les Alexa Fluor A488, A532, A546 et A647, A680 et les *quencher*s QSY 7, QSY 21 et Dabcyl commercialisés par Molecular Probes (Eugene, USA) ainsi que la Cyanine 5.0 (notée Cy5.0) distribuée par Amersham Biosciences. Nous avons également utilisé l'Alexa 532 sous forme maléimide (fonction réactive aux thiols) commercialisé par Molecular Probes.

Le Tableau 5 (p.80) présente les structures chimiques, les longueurs d'onde maximales d'excitation (λ_{ABSmax}) et d'émission (λ_{EMmax}), les coefficients d'absorption molaire à λ_{ABSmax} ($\epsilon(\lambda_{\text{ABSmax}})$ en $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), le Stokes' shift (différence en nm entre λ_{EMmax} et λ_{ABSmax}) et le rendement de fluorescence (Φ_d) des différents fluorophores et *quencher*s. Les spectres d'absorption et d'émission des fluorophores sont présentés sur la Figure 21 (p.81).

Tableau 5 : Structure et propriétés spectrales des fluorophores et quenchers utilisés

Notations : PM (Da) : poids moléculaire ; λ_{ABSmax} et λ_{EMmax} (nm) : longueurs d'onde d'absorption et d'émission maximale ; $\epsilon(\lambda_{\text{ABSmax}})$ ($\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) : coefficient d'absorption molaire à λ_{ABSmax} ; SS (nm) : *Stokes' shift* ; Φ_d : rendement de fluorescence. NC : non communiqué par le fournisseur. NA : non applicable. (Molecular Probes)

Nom	PM (Da)	Structure	λ_{ABSmax} (nm)	λ_{EMmax} (nm)	$\epsilon(\lambda_{\text{ABSmax}})$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	SS (nm)	Φ_d
Fluorescéine	586		495	520	74000	25	0,79
Alexa 488	643		495	519	78000	24	0,94
Alexa 532	723		530	555	81000	25	0,8
Alexa 546	1079		556	573	112000	17	0,96
TMR	527,5		554	584	85000	30	0,2
Alexa 647	1250	NC	649	666	250000	17	0,7
Alexa 680	1150	NC	684	707	183000	23	0,7
Dabcyl	366		453	NA	32000	NA	NA
QSY 7	791		560	NA	90000	NA	NA
QSY 21	815		661	NA	90000	NA	NA

Figure 21 : Spectres des fluorophores et *quenchers* utilisés

(données Molecular Probes)

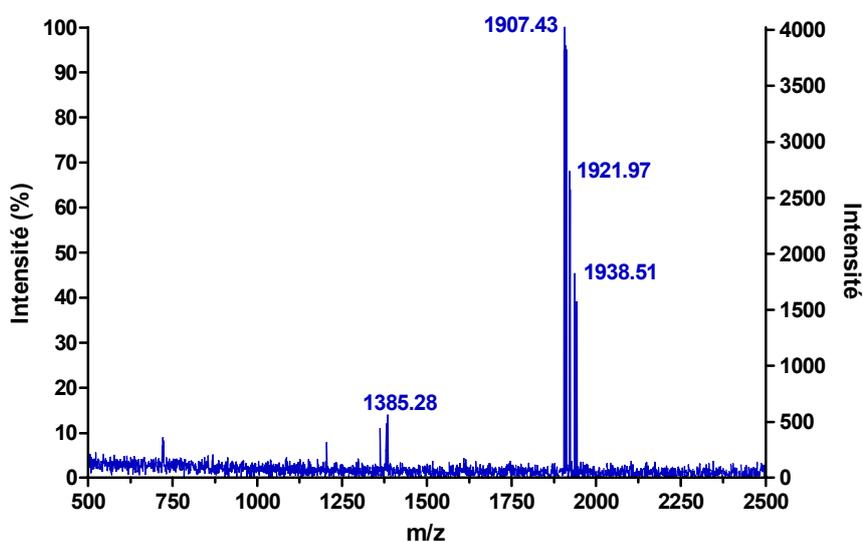
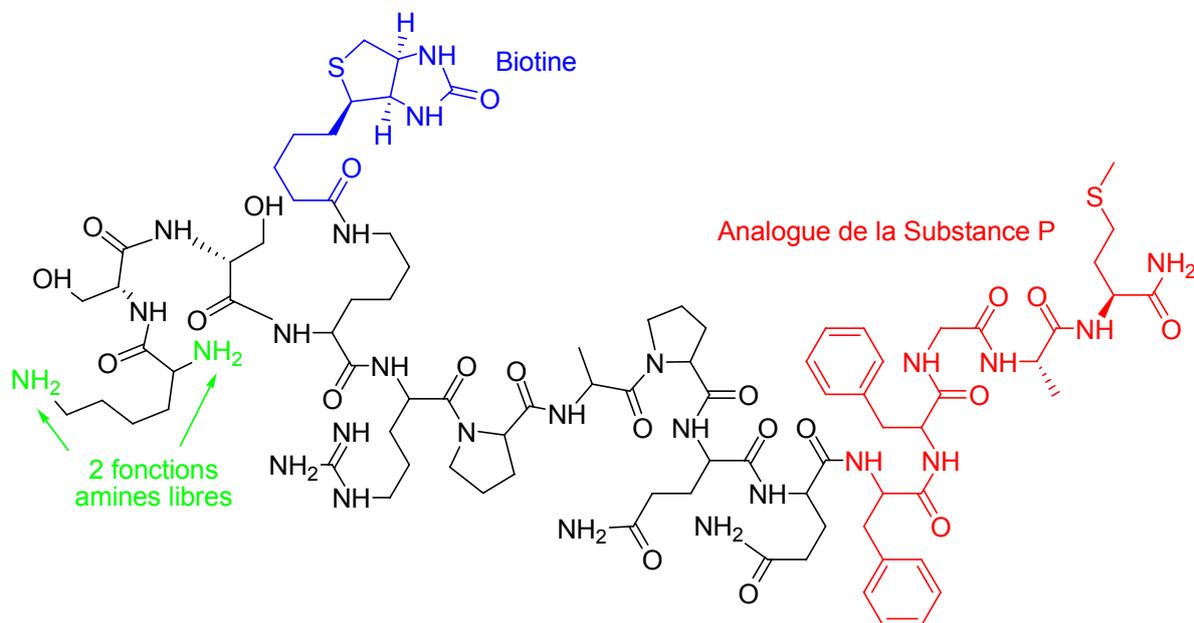


Figure 22 : Structure et spectre de masse du peptide Ala¹⁰SP-biot (support du tripode SP)

Le peptide Ala¹⁰SP-biot (support du tripode SP) correspond à la séquence suivante : Lys-Ser-Ser-Lys(Biotine)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Ala-MetCONH₂ (masse moléculaire : 1907 Da, biotine comprise).

Le spectre de masse a été obtenu à l'aide du Maldi-TOF [matrice : acide αcyano-4-hydroxycinnamique, acquisition en mode linéaire, échelle 500-2500 Da, puissance du laser à 2996 (unités arbitraires)].

II.2.4. Anticorps, standards et échantillons

II.2.4.1. Réactifs Substance P

Nous avons utilisé quatre Anticorps Monoclonaux (AcM) dirigés contre la Substance P ou SP (AcM SP14, 19, 24 et 31) et un Antisérum (As) polyclonal (As 418) de spécificité C-terminale obtenus au laboratoire (Couraud et al., 1987).

Nous avons employé la Substance P commercialisée par Neosystem (Strasbourg, France) conservée en solution d'acide acétique 1% à 1 mg/mL à -20°C.

Nous avons également utilisé le peptide Lys-Ser-Ser-Lys(Biotine)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Ala-Met-CONH₂, noté Ala¹⁰ SP-biot (voir la structure sur la Figure 22, p.82). Il a été synthétisé au laboratoire par le Dr Hervé Bernard suivant une chimie Fmoc standard¹¹, puis nous l'avons purifié par chromatographie HPLC en phase inverse (références des appareils utilisés p.77). Il a été conservé sous forme lyophilisée à -20°C. Il présente une masse moléculaire de 1907 Da, biotine comprise (voir le spectre de masse sur la Figure 22, p.82).

Nous avons utilisé des échantillons de cervelet et de moelle épinière de souris et de rats que nous avons préparé selon le protocole suivant. La moelle épinière et le cervelet de 2 rats Sprague-Dawley et 3 souris Balb/c sont homogénéisés avec 5 mL d'acide acétique 1 M par gramme d'extrait à l'aide de l'Ultra-Turrax. Après chauffage à 95°C durant 10 min, les extraits sont centrifugés à 20000 g pendant 45 min. Le surnageant est évaporé sous vide (SpeedVac) et conservé à -20°C. Avant dosage, les extraits ont été repris dans le même volume de tampon PVP que le volume d'acide acétique initial, puis dilués de façon adéquate.

II.2.4.2. Réactifs β -lactoglobuline

Nous avons utilisé sept anticorps monoclonaux dirigés contre la β -lactoglobuline (BLg) native obtenus au laboratoire présentant des spécificités différentes. Cinq d'entre eux reconnaissent la protéine sous forme native (AcM BLg 2, 75, 88, 97, 117). Il a été montré que les épitopes reconnus par ces anticorps se situent dans des régions différentes (Clement *et al.*, 2002). Deux

¹¹ La stratégie Fmoc utilise le fluorène-méthoxycarbonyle pour protéger la fonction amine de l'acide aminé à coupler. Labile en milieu nucléophile, il est clivé par une solution de pipéridine dans le DMF (diméthylformamide) dans des conditions douces. Les protections latérales doivent être stables en milieu basique et clivées en condition acide (TFA). Cette stratégie est bien adaptée aux synthétiseurs automatiques, comme celui utilisé. La déprotection peut être suivie en spectrophotométrie U.V. ce qui permet de mesurer l'efficacité des couplages.

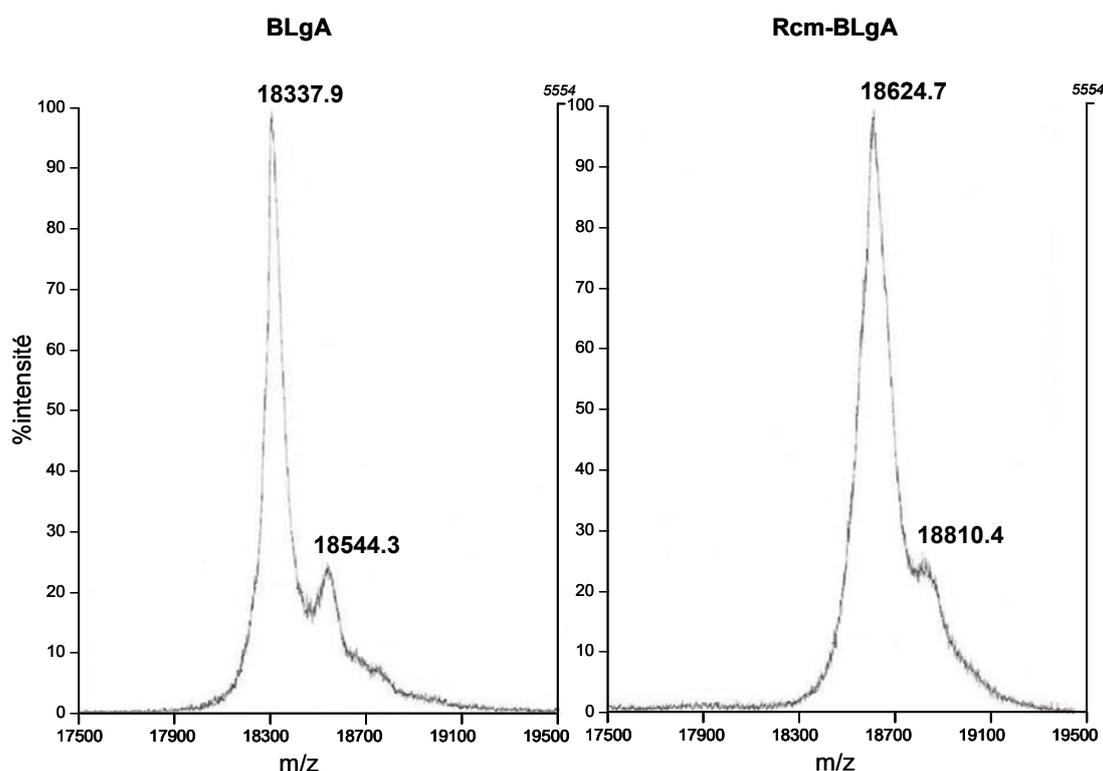
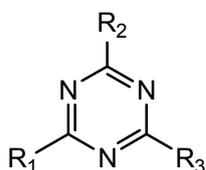


Figure 23 : Spectres de masse de la BLgA et la Rcm-BLgA

La différence des masses moléculaires de la BLgA (18338 Da) et de la Rcm-BLgA (18624 Da) est de 286 Da, correspondant à la réduction et carbamidométhylation des 5 cystéines ($5 \times 57 \text{ Da} = 285 \text{ Da}$).

Tableau 6 : Structure des triazines utilisées

Les triazines sont constituées d'un cycle contenant 3 azotes et portant 3 groupements (R_1 , R_2 et R_3) variables.



Triazine	R_1	R_2	R_3	PM (Da)
1 : Atrazine	Cl	NHCH ₂ CH ₃	NHCH(CH ₃) ₂	216
2 : Ametryn	SCH ₃	NHCH ₂ CH ₃	NHCH(CH ₃) ₂	227
3 : Prometron	OCH ₃	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH(CH ₃) ₂	225
4 : Prometryn	SCH ₃	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH(CH ₃) ₂	241
5 : Propazine	Cl	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH(CH ₃) ₂	230
6 : Simazine	Cl	NHCH ₂ CH ₃	NHCH ₂ CH ₃	202
7 : Simetryn	SCH ₃	NHCH ₂ CH ₃	NHCH ₂ CH ₃	213
8 : Terbutryn	SCH ₃	NHCH ₂ CH ₃	NHC(CH ₃) ₃	241
9 : Cyanazine	Cl	NHCH ₂ CH ₃	NHC(CH ₃) ₂ CN	241
10 : Atrazine desethyl	Cl	NH ₂	NHCH(CH ₃) ₂	188
11 : Terbutylazine	Cl	NHCH ₂ CH ₃	NHC(CH ₃) ₃	230
12 : Atrazine deisopropyl	Cl	NH ₂	NHCH ₂ CH ₃	174

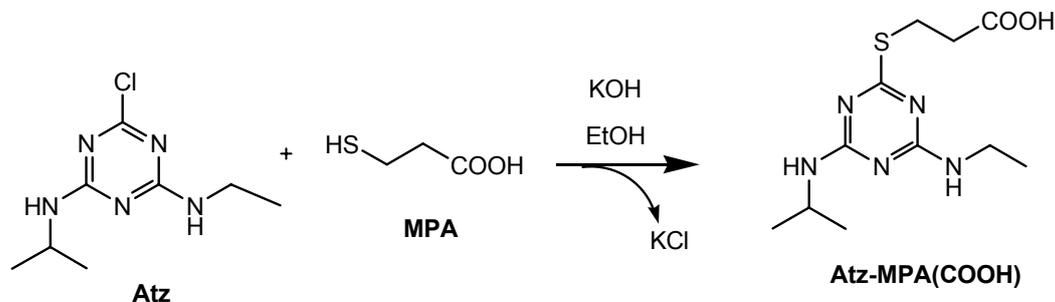


Figure 24 : Synthèse du dérivé acide 3-mercaptopropanoïque de l'Atrazine

En présence de KOH, l'acide 3-mercaptopropanoïque (MPA) réagit sur le groupement Cl de l'Atrazine. (D'après Goodrow *et al.*, 1990)

anticorps reconnaissent la protéine réduite et carbamidométhylée (ou Rcm-BLg pour *Reduced carbamidomethylated BLg*) qui correspond à une forme « dénaturée » de la BLg (AcM-BLg 74 et 92). Les anticorps 74 et 92 peuvent se lier simultanément sur la Rcm-BLg (anticorps complémentaires).

Nous avons utilisé la BLg (variant A) sous la forme native (BLgA, 18364 Da) et sous la forme réduite et carbamidométhylée (Rcm-BLgA, 18650 Da) que nous avons préparée au laboratoire suivant le protocole décrit par Negroni *et al.* (1998).

Protocole de préparation de la BLgA : la BLgA est extraite et purifiée par une série de précipitations sélectives et d'étapes chromatographiques à partir de lait. 1 L de lait de vache frais entier pasteurisé commercial (Tourey SA, Laiterie de Theix, Ceyrat, France) est amené à pH 4.6 par ajout d'HCl, puis centrifugé 20 min à 7000 g à 15°C pour séparer le lactosérum du culot de caséines. Le pH du lactosérum est amené à pH 2 avec de l'HCl et 7 % (massique) de NaCl sont ajoutés afin de précipiter l' α -lactalbumine. Après 20 min à RT (pour *Room Temperature* ou température ambiante) sous agitation, et centrifugation (20 min, 10000 g, 15°C), 23% (massique) de NaCl sont ajoutés au surnageant pour précipiter la BLg. Après 10 min à RT sous agitation, et centrifugation (20 min, 10000g, 15°C), le culot est repris par 50 mL d'eau distillée, puis la solution est dialysée contre 5 L d'eau distillée durant 18 h à 4°C (seuil de coupure à 3500 Da). La solution de BLg précipitée est purifiée par chromatographie d'échange d'anions pour séparer le variant A du B.

Protocole de préparation de la Rcm-BLgA : la Rcm-BLgA est obtenue par réduction puis carbamidométhylation de la BLgA. 8,2 μ moles de BLgA sont repris dans 15 mL de tampon Tris 0,1 M, Urée 1 M ajusté à pH 8,2. Le DTT (dithiothréitol) est ajouté dans un rapport de 50 moles de DTT par mole de BLg. Après 1h30 de réaction à 60°C, l'iodoacétamide est ajoutée dans un excès molaire de 5 par rapport au DTT pour 30 min à 20°C à l'obscurité. Le mélange est dialysé contre de l'eau distillée (18 h, 4°C) puis lyophilisé.

Nous avons contrôlé la pureté de la BLg et la Rcm-BLg par analyse Maldi-TOF (voir Figure 23, p.84) et vérifié leur capacité de liaison aux anticorps par test immunoenzymatique.

Nous avons utilisé des échantillons de lait frais entier (Tourey SA) chauffés à 95 °C pendant 0, 30 s, 1 min, 2 min, 5 min, 15 min et immédiatement refroidis par dilution au 1/10^{ème} dans du tampon PVP à 4°C.

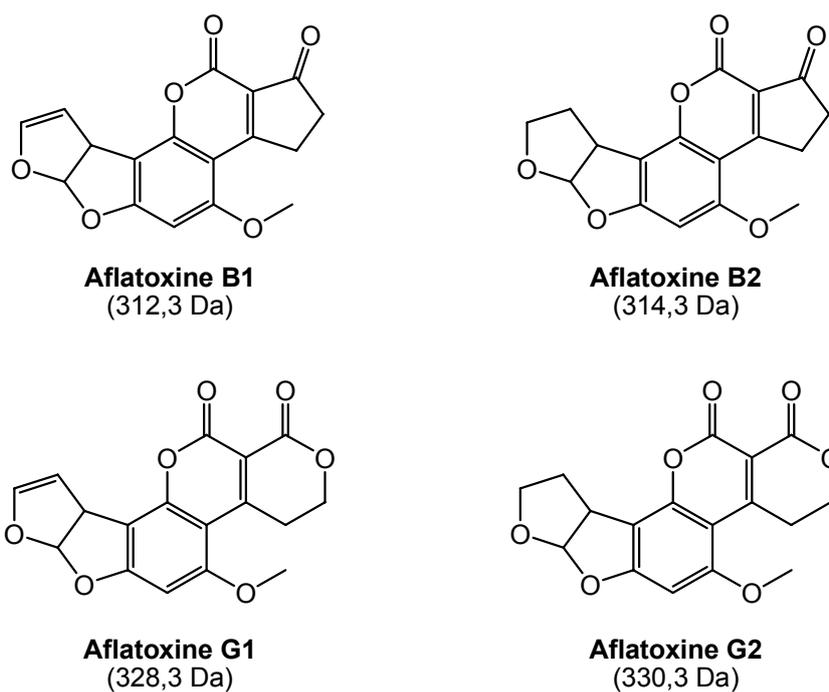


Figure 25 : Structures des aflatoxines B1, B2, G1 et G2

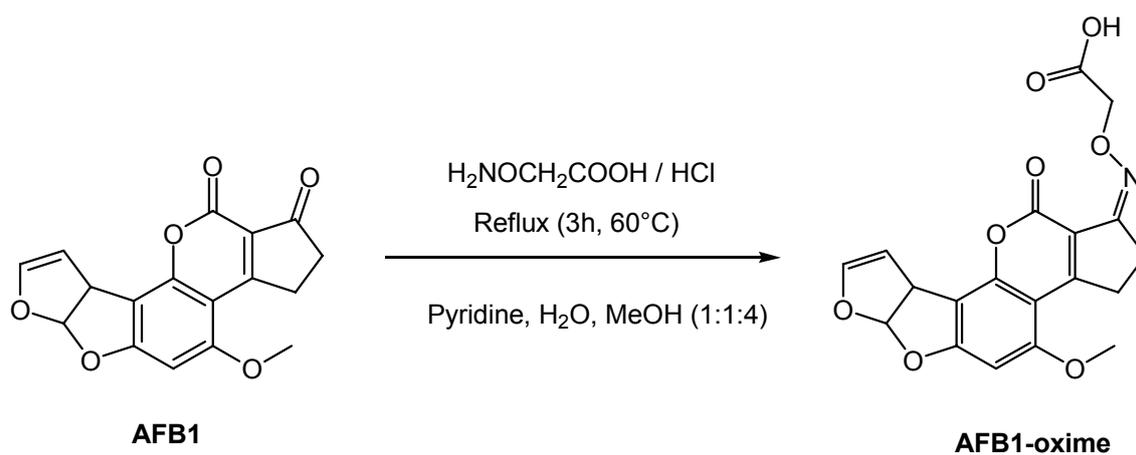


Figure 26 : Synthèse du dérivé oxime de l'aflatoxine B1

II.2.4.3. Réactifs Atrazine

Nous avons utilisé trois anticorps monoclonaux de souris commerciaux dirigés contre l'Atrazine couplée à la BSA. Nous nous sommes procurés l'Ac ATZ 1 (K82341M) auprès de BioDesign International (Saco, USA), et les anticorps ATZ 2 (A4100) et ATZ 3 (A 4099-33) auprès de US Biological (Swampscott, USA). Les protocoles de préparation des immunogènes et les caractéristiques de spécificité des anticorps ne sont pas indiqués par les fournisseurs.

Nous avons utilisé douze triazines (Atrazine, Amétryn, Prometron, Prometryn, Propazine, Simazine, Simetryn, Terbutryn, Cyanazine, Atrazine desethyl, Terbutylazine, et Atrazine desisopropyl) commercialisées par Sigma. Leurs formules sont indiquées sur le Tableau 6 (p.84).

Pour la mise au point du tripode, nous avons utilisé le peptide T de séquence : Gly-Ser-Gly-Ser-Cys-Ser-Gly-Ser-Lys(biot)-CONH₂ (PM : 995 Da, biotine comprise), synthétisé et purifié au laboratoire, conservé sous forme lyophilisée à -20°C.

Nous avons également utilisé un dérivé acide 3-mercaptopropanoïque de l'Atrazine (Atz-MPA, 285 Da). Il a été synthétisé par le Dr Frédéric Taran (CEA Saclay, Service des Molécules Marquées, SMMCB) selon la méthode de Goodrow *et al.* (1990) décrite sur la Figure 24 (p.84). Il a été conservé en méthanol (solution-mère à 4,69 mg/mL) à -20 °C. L'analyse Maldi-TOF indique un pic majoritaire à 285 Da correspondant à l'Atz-MPA, et un pic secondaire à 210 Da, dont l'analyse RMN révèle qu'il s'agit de l'acide 3,3'-dithiopropanoïque (HOOC-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-COOH) présent à hauteur de 20 %.

II.2.4.4. Réactifs Aflatoxine B1

Nous avons utilisé deux anticorps monoclonaux de souris commerciaux dirigés contre l'aflatoxine B1 (AFB1) : AcM-ATB (3AF27) distribué par HyTest (Turku, Finlande), et AcM-AFA (K55980M) commercialisé par BioDesign International. Les protocoles de préparation des immunogènes et les caractéristiques de spécificité des anticorps ne sont pas indiqués par les fournisseurs.

Nous avons utilisé les aflatoxines B1, B2, G1 et G2 (Sigma) dont les structures sont présentées sur la Figure 25 (p.86), ainsi qu'un dérivé oxime de l'AFB1 (385,3 Da) synthétisé par le Dr Frédéric Taran (CEA Saclay, Service des Molécules Marquées) selon la méthode décrite par F.S. Chu (Chu *et al.*, 1977) illustrée sur la Figure 26 (p.86).

Tableau 7 : Séquence des peptides PepTB-01 à 11

La séquence est indiquée par les numéros d'acides aminés correspondant à la séquence de la TBA.
Pour le peptide TB-Nter, une cystéine a été ajoutée à la séquence 1-15 de la TBA du côté C-terminal.

Peptide	Séquence ¹²	Position sur la TBA	PM (Da)
PepTB-1	Phe-Asn-Leu-Phe-Asp-Lys-Glu-Leu-Asn-Glu-Lys-Glu-Ile-Lys-Asp-Leu-Tyr-Asp-Asn-Gln-Ser-Asn-Ser-Gly CONH ₂	1071–1094	2861
PepTB-2	Asn-Ile-Met-Phe-Lys-Leu-Asp-Gly-Cys-Arg-Asp-Thr-His-Arg-Tyr-Ile-Trp-Ile-Lys-Tyr-Phe-Asn-Leu-Phe-Asp-Lys-Glu-Leu-Asn-Glu-Lys-Glu-Ile-Lys-Asp-Leu-Tyr-Asp-Asn-Gln-Ser-Asn-Ser-Gly CONH ₂	1051–1094	5399
PepTB-3	Asn-Gly-Arg-Leu-Ile-Asp-Gln-Lys-Pro-Ile-Ser-Asn-Leu-Gly-Asn-Ile-His-Ala-Ser-Asn-Asn-Ile-Met-Phe CONH ₂	1031–1054	2667
PepTB-4	Asn-Arg-Trp-Ile-Phe-Val-Thr-Ile-Thr-Asn-Asn-Arg-Leu-Asn-Asn-Ser-Lys-Ile-Tyr-Ile-Asn-Gly-Arg-Leu-Ile-Asp-Gln-Lys-Pro-Ile-Ser-Asn-Leu-Gly-Asn-Ile-His-Ala-Ser-Asn-Asn-Ile-Met-Phe CONH ₂	1011–1054	5132
PepTB-5	Glu-Ile-Lys-Gln-Arg-Val-Val-Phe-Lys-Tyr-Ser-Gln-Met-Ile-Asn-Ile-Ser-Asp-Tyr-Ile-Asn-Arg-Trp-Ile CONH ₂	991–1014	3045
PepTB-6	Ser-Gly-Trp-Lys-Val-Ser-Leu-Asn-Tyr-Gly-Glu-Ile-Ile-Trp-Thr-Leu-Gln-Asp-Thr-Gln-Glu-Ile-Lys-Gln CONH ₂	971–994	2897
PepTB-7	Tyr-Phe-Asn-Ser-Ile-Ser-Leu-Asn-Asn-Glu-Tyr-Thr-Ile-Ile-Asn-Cys-Met-Glu-Asn-Asn-Ser-Gly-Trp-Lys-Val-Ser-Leu-Asn-Tyr-Gly-Glu-Ile-Ile-Trp-Thr-Leu-Gln-Asp-Thr-Gln-Glu-Ile-Lys-Gln CONH ₂	951–994	5270
PepTB-8	Ile-Val-Tyr-Asn-Ser-Met-Tyr-Glu-Asn-Phe-Ser-Thr-Ser-Phe-Trp-Ile-Arg-Ile-Pro-Lys-Tyr-Phe-Asn-Ser CONH ₂	931–954	3007
PepTB-9	Asn-Gln-Ile-Gln-Leu-Phe-Asn-Leu-Glu-Ser-Ser-Lys-Ile-Glu-Val-Ile-Leu-Lys-Asn-Ala-Ile-Val-Tyr-Asn CONH ₂	911–934	2791
PepTB-10	Ser-Arg-Tyr-Ala-Ser-Lys-Ile-Asn-Ile-Gly-Ser-Lys-Val-Asn-Phe-Asp-Pro-Ile-Asp-Lys-Asn-Gln-Ile-Gln-Leu-Phe-Asn-Leu-Glu-Ser-Ser-Lys-Ile-Glu-Val-Ile-Leu-Lys-Asn-Ala-Ile-Val-Tyr-Asn CONH ₂	891–934	5024
PepTB-11	Asn-Ile-Ile-Asn-Thr-Ser-Ile-Leu-Asn-Leu-Arg-Tyr-Glu-Ser-Asn-His-Leu-Ile-Asp-Leu-Ser-Arg-Tyr-Ala CONH ₂	871–894	2833
PepTB-Cter	Gly-Cys-Ser-Trp-Glu-Phe-Ile-Pro-Val-Asp-Asp-Gly-Trp-Gly-Glu CONH ₂	1278-1292	1697
PepTB-Nter	Pro-Phe-Val-Asn-Lys-Gln-Phe-Asn-Tyr-Lys-Asp-Pro-Val-Asn-Gly-Val-Asp-Ile-Cys CONH ₂	1-15	2198

¹² Les lysines sont indiquées en vert sur la séquence des peptides PepTB-1 à 11 (lieu d'incorporation de la BSA). Les cystéines sont indiquées en bleu sur la séquence des peptides PepTB-Cter et Nter (lieu d'incorporation de la BSA-SMCC).

II.2.4.5. Réactifs Toxine Botulinique A

Nous avons utilisé la Toxine Botulinique A (TBA) commercialisée par Sigma (1295 acides aminés, 149322 Da) et les fragments Hc/TBA, Hc1/TBA et Hc2/TBA (protéines recombinantes) fournis par le Dr Michel Popoff de l'Institut Pasteur. Nous avons aussi utilisé un antisérum polyclonal de lapin obtenu par immunisation avec le fragment Hc/TBA fourni par le Dr Popoff.

Plusieurs peptides ont été synthétisés et purifiés au laboratoire :

- les peptides PepTB-1 à -11, couvrant la séquence de Hc1/TBA (correspondant à la séquence 874-1071 de la TBA) ;
- le peptide PepTB-Cter correspondant à la séquence des 15 acides aminés du côté C-terminal de la TBA ;
- le peptide PepTB-Nter correspondant à la séquence des 18 derniers acides aminés du côté N-terminal de la TBA à laquelle a été ajoutée une cystéine en position C-terminale.

Leur séquence est indiquée dans le Tableau 7 (p.88).

II.2.4.6. Réactifs Ricine

Nous avons utilisé les chaînes A et B de la Ricine (RicA et RicB) commercialisées par Sigma. La protéine entière (Ric) a été utilisée sous forme d'un extrait obtenu par broyage de graines de ricin (graine de *Ricinus communis*, Truffaut, Paris) dans du tampon EIA, qui a été préparé au laboratoire. La concentration en Ricine entière de l'extrait est estimée à 1 % de la concentration massique en graines de ricin.

II.3. Méthodes et protocoles

II.3.1. Dosages EIA

Au cours de ce travail, nous avons utilisé une méthode de dosage immunoenzymatique (EIA) utilisant l'AcétylCholineEstérase (AChE) classiquement employée au laboratoire. Nous avons utilisé cette méthode à deux effets. Tout d'abord, les tests EIA nous ont permis de caractériser les réactifs mis au point pour le SPIT-FRI (anticorps et tripodes), notamment en terme de capacités de reconnaissance immunologique après marquage. En outre, la méthode EIA a tenu lieu de référence pour évaluer les performances des dosages développés au cours de cette thèse.

II.3.1.1. Principe général des dosages EIA

Cette méthode de dosage immunoenzymatique est basée sur l'utilisation de l'AcétylCholineEstérase (AChE), enzyme responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine. Les dosages reposent sur le couplage de cette enzyme à un anticorps ou un antigène, formant le traceur, puis la révélation se fait par méthode colorimétrique.

- *Propriétés de l'AChE*

L'AChE utilisée au laboratoire est extraite des organes électriques d'un poisson, le Gymnote (*Electrophorus electricus*). Cette enzyme possède de nombreux avantages : relativement facile à purifier, présente en grande quantité dans les organes électriques du Gymnote, son efficacité est remarquable, puisqu'elle catalyse l'hydrolyse de 16 000 moles d'acétylcholine par site et par seconde (Vigny et al., 1978), ce qui autorise une limite de détection de son activité de l'ordre de l'attomole, et l'obtention d'un signal continu sur plusieurs heures. Cette propriété donne la possibilité d'augmenter la précision du dosage et sa sensibilité en réalisant la réaction enzymatique sur un temps plus long. À titre de comparaison, les limites de détection (calculées à partir des valeurs de constantes catalytiques et des coefficients d'absorption molaire) de la β -galactosidase et de la phosphatase alcaline sont respectivement 10 et 20 fois plus faibles que celle de l'AChE (Ishikawa et al., 1983).¹³

- *Méthode de révélation*

La révélation de l'activité enzymatique se fait par la méthode d'Ellman, qui utilise un pseudo-substrat, l'acétylthiocholine, hydrolysé par l'AChE à la même vitesse que le substrat naturel, et conduisant à la formation de thiocholine. La thiocholine réagit à son tour avec l'acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB), un réactif classiquement utilisé pour mesurer les groupements thiols (Ellman et al., 1961). Le DTNB réduit formé absorbe fortement dans le visible en produisant une coloration jaune. Le maximum d'absorption du DTNB réduit est obtenu à 412 nm, avec un coefficient d'extinction molaire de $13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

- *Définition de l'Unité d'Ellman (UE)*

Les concentrations d'AChE sont exprimées en fonction des mesures effectuées avec la méthode d'Ellman. D'après la définition donnée par Jacques Grassi dans sa thèse (Grassi, 1990) : « Une unité Ellman est définie comme la quantité d'enzyme produisant un accroissement d'absorbance d'une unité à 412 nm pendant 1 minute, dans un volume de 1 mL de milieu d'Ellman (voir composition au II.2.2, p.78), pour 1 cm de trajet optique à 25°C. Une

¹³ On trouvera dans la thèse de J. Grassi une description précise des propriétés de l'Acétylcholinestérase et de son utilisation en immunoanalyse (Grassi, 1990).

unité Ellman correspond à $7,35 \cdot 10^{-2}$ unités enzymatiques, l'unité enzymatique étant définie comme la quantité d'enzyme catalysant l'hydrolyse d'une μmole de substrat pendant 1 min à 25°C ».

II.3.1.2. Préparation des traceurs

II.3.1.2.1. Traceurs enzymatiques

Le marquage des anticorps à l'AChE se fait sur les fragments Fab' produits par protéolyse enzymatique modérée (voir protocole p.102). Le couplage est réalisé avec l'AChE préalablement dérivatisée au SMCC permettant le couplage entre les amines de l'AChE et les fonctions thiols des Fab'. Le SMCC (succinimidyl ester de l'acide 4-(N maléimide-méthyl)-cyclohexane-1-carboxylique) est un réactif hétérobifonctionnel (ie. comportant deux fonctions réactives différentes) incluant d'une part une fonction maléimide réactive vis-à-vis des thiols, et d'autre part une fonction ester actif réagissant avec les amines primaires (voir II.3.3.2.1., p.97). Le couplage de l'enzyme a donc lieu au niveau des groupements SH de la région charnière des anticorps. Cela présente l'avantage de placer l'enzyme à distance du paratope de l'anticorps, limitant les interférences dans la reconnaissance antigène-anticorps.

Lorsque la molécule à marquer ne possède pas de fonction thiol mais seulement des amines primaires, elle est traitée avant le couplage à l'AChE par un autre réactif hétérobifonctionnel, le SATA (ester N-hydroxysuccinimidique de l'acide S-thioacétyl acétique), réagissant par un ester actif sur les fonctions amines primaires et permettant l'incorporation d'une fonction thiol protégée. L'étape de déprotection est réalisée par ajout d'une solution d'hydroxylamine/HCl¹⁴ libérant la fonction thiol.

II.3.1.2.2. Traceurs biotinylés

Il est également possible d'employer des traceurs biotinylés, c'est-à-dire marqués avec la biotine (sous forme d'ester actif). La révélation se fait alors par utilisation de streptavidine-AChE.

Protocole de biotinylation (pour 500 μg de protéine) : à 500 μL de solution protéique à marquer (concentrée à 1 mg/mL) sont ajoutés 500 μL de tampon borate 0,1 M pH 8,5 et 20 μL de solution de biotine-amidocaproate succinimidyl ester (Sigma) à 10 mg/mL en DMF. Après 30 min d'incubation à RT sous agitation, 100 μL de solution de glycine 0,2 M pH 8,5

¹⁴ Suivant le protocole classique décrit dans la notice d'utilisation du kit n°23460 Pierce (Rockford, Illinois) disponible sur internet (<http://www.piercenet.com/files/1316as4.pdf>).

sont incubés pour à nouveau 30 min (RT). Enfin, on complète jusqu'à 5 mL par du tampon EIA (concentration finale : 100 µg/mL).

II.3.1.3. Protocoles de coating, de lavage et de révélation des plaques

- *Protocole de coating*

Les protéines (anticorps, neutravidine) sont adsorbées sur la phase solide Maxisorp des microplaques à raison de 120 µL à 200 µL par puits (selon le volume de réaction), en tampon d'immobilisation (ou tampon de *coating*, voir II.2.2 pour la composition, p.78), à la concentration de 5 µg/mL. Les plaques sont incubées filmées (pour éviter l'évaporation des solutions contenues dans les puits) durant 18 h à température ambiante (RT pour *Room Temperature*). Elles sont ensuite vidées puis saturées par ajout de 300 µL par puits de tampon EIA. Les plaques filmées peuvent être conservées pendant plusieurs mois à 4°C.

- *Protocole de lavage*

La plaque est lavée avec du tampon de lavage (voir II.2.2 pour la composition, p.78) à l'aide du laveur automatique en effectuant 5 cycles aspiration / remplissage de tampon, puis après 2-3 minutes en tampon, à nouveau 5 cycles finissant par une étape d'aspiration.

- *Protocole de révélation des dosages EIA*

Après lavage de la plaque où a eu lieu la réaction immunologique avec le traceur AChE, 200 µL de milieu d'Ellman (voir II.2.2 pour la composition, p.78) sont ajoutés. Après incubation sous agitation à RT durant 1 h (sauf mention contraire), l'absorbance est mesurée à 414 nm avec le lecteur d'absorbance pour plaques.

Dans le cas de traceurs biotinylés, 200 µL de solution de Streptavidine-AChE à 2 UE/mL sont incubés durant 2 h avant la révélation avec le milieu d'Ellman.

II.3.1.4. Dosages par compétition

La mise au point des dosages par compétition se fait classiquement en deux étapes.

Dans un premier temps, une gamme de dilution de l'anticorps est réalisée en présence du traceur, généralement utilisé à 2 Unités Ellman (UE)/mL (voir définition de l'UE au II.3.1.1), afin de choisir judicieusement la concentration d'anticorps qui sera employée pour le dosage. En effet, elle doit permettre de générer un signal suffisant pour réaliser le dosage tout en étant limitante afin de favoriser la compétition par l'analyte.

La courbe d'étalonnage en présence de l'analyte employé à différentes concentrations et de l'anticorps à la concentration choisie est ensuite effectuée (« courbe standard »). Les concentrations des échantillons à doser sont estimées par rapport à cette courbe d'étalonnage.

II.3.1.4.1. Test de dilution de l'anticorps

Généralement, on réalise une gamme d'anticorps sur une plaque revêtue d'anticorps de capture (suivant le protocole décrit p.92). Les anticorps de capture sont soit des anticorps CAS (anticorps polyclonal de Chèvre Anti-immunoglobulines de Souris, reconnaissant la partie Fc des Ig de souris) soit des anticorps SAL (anticorps monoclonal de Souris Anti-immunoglobulines de Lapin reconnaissant la partie Fc des Ig de lapin) selon l'origine des anticorps utilisés pour le dosage. Dans les puits sont déposés : 50 µL de solution d'anticorps à différentes concentrations, 50 µL de traceur-AChE (employé, sauf mention contraire, à 2 UE/mL), et 50 µL de tampon. La plaque est incubée durant 18 h à 4°C scellée (pour éviter l'évaporation des solutions contenues dans les puits). La plaque est ensuite lavée et révélée comme indiqué précédemment.

On trace alors l'absorbance en fonction de la concentration en anticorps. Cette courbe $\text{Signal} = f(\text{Concentration})$ présente une forme caractéristique en cloche. La diminution du signal à partir d'une certaine concentration en anticorps est appelée « effet crochet ». Le signal maximal observé correspond à la capacité maximale de liaison des anticorps de capture adsorbés sur la phase solide. Pour des concentrations fortes d'anticorps, une partie du traceur se lie à l'Ac sans être capturé par la phase solide et donc éliminés lors du lavage, à l'origine de l'effet crochet.

Pour l'établissement de la courbe d'étalonnage, on choisit généralement de se placer à une concentration d'anticorps se situant dans la partie croissante de la courbe et fournissant un signal d'environ 300 mDO.

II.3.1.4.2. Etablissement de la courbe d'étalonnage et analyse des données

Le dosage par compétition est réalisé par l'incubation de : 50 µL de l'anticorps (ou de l'antisérum) à la concentration choisie, 50 µL de traceur-AChE (employé, sauf mention contraire, à 2 UE/mL), et 50 µL de standard à différentes concentrations ou de l'échantillon à analyser dilué en tampon EIA. Après 18 h d'incubation à 4°C, la plaque est lavée et révélée.

La courbe standard, correspondant au signal d'absorbance (Bx) en fonction de la concentration en standard (x), est analysée par régression sigmoïdale.

Les régressions sigmoïdales sont effectuées avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, USA)¹⁵. Elles correspondent à l'équation suivante équation logistique à 4 paramètres appelée également équation de Hill) :

$$[7] \quad Y_x = Y_{\min} + \frac{(Y_{\max} - Y_{\min})}{1 + 10^{(\text{LogEC}_{50} - X) \cdot \text{Pente}}}$$

Où Y_x est le signal obtenu pour une concentration X en analyte ; Y_{\min} et Y_{\max} les signaux obtenus aux plateaux inférieur et supérieur. Le paramètre *Pente* (sans unité) correspond à la pente de la courbe sigmoïdale ; s'il est positif, la courbe croît avec la concentration X et s'il est négatif, la courbe décroît. Une pente « standard » est de 1 ; lorsqu'elle est supérieure (en valeur absolue), la courbe est plus pentue, et inférieure à 1, la pente est plus douce.

Pour une meilleure visualisation, les courbes sont parfois présentées en portant en ordonnée B_x/B_{\max} (où B_{\max} représente le signal maximal obtenu sans analyte).

Les concentrations des échantillons à doser sont extrapolées à partir de cette courbe de référence. La sensibilité du dosage est généralement caractérisée par l'EC50 qui correspond à la concentration entraînant une inhibition de 50 % du signal B_{\max} . La zone linéaire du dosage est définie par l'intervalle [EC20, EC80], EC20 et EC80 générant respectivement 20 % et 80 % d'inhibition du signal) et la pente de la courbe de régression. Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) déterminées par calcul sont les concentration en standard fournissant un signal égal à la moyenne (μ) du signal B_{\max} moins 3 fois (LD) ou 10 fois (LQ) l'écart-type (σ). Pour ce calcul, μ et σ sont généralement calculés sur un nombre de réplicats (n) supérieur ou égal à 4.

II.3.1.4.3. Calcul du pourcentage de réaction croisée entre un analyte et des analogues

Pour évaluer la spécificité des anticorps, nous calculons le pourcentage de réaction croisée (RC) entre l'analyte et chacun des analogues de cet analyte à l'aide de la formule suivante :

$$[8] \quad \text{RC (\%)} = \text{EC}_{50}(\text{analyte}) / \text{EC}_{50}(\text{analogue}) \times 100.$$

Où les EC50 (en M) sont obtenues à partir des courbes standard obtenues dans les mêmes conditions en employant comme compétiteur l'analyte et l'analogue.

II.3.1.5. Dosages immunométriques

Les dosages immunométriques font intervenir deux anticorps, un anticorps de capture immobilisé sur la phase solide et un anticorps de révélation (anticorps traceur) marqué à

¹⁵ Voir le site internet : <http://www.graphpad.com>

l'AChE ou biotinylé. Le protocole consiste faire réagir 100 μ L de solution de standard ou d'échantillon dilué en tampon EIA avec 100 μ L de traceur-AChE en excès (de 5 à 10 UE/mL) sur une plaque revêtue d'anticorps de capture (suivant le protocole de coating décrit précédemment). Après 18 h d'incubation à 4°C, la plaque est révélée après lavage.

La courbe standard (signal d'absorbance B en fonction de la concentration en standard) est analysée par régression linéaire ; les concentrations des échantillons à doser sont extrapolées à partir de cette courbe de référence. Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont calculées comme étant les concentrations en standard fournissant respectivement un signal égal à $\mu(B_0)+3\sigma$ et à $\mu(B_0)+10\sigma$, B_0 étant le signal obtenu en absence d'analyte (non-spécifique), μ et σ étant calculés sur un nombre de réplicats (n) supérieur ou égal à 4.

II.3.2. Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux anti-toxines

II.3.2.1. Couplage des peptides à la BSA

Les peptides PepTB-1 à -11, PepTB-Nter et -Cter ont été conjugués à la BSA dérivatisée par le réactif hétérobifonctionnel SMCC. Les peptides PepTB-Cter et -Nter ont réagi *via* la cystéine présente dans leur séquence alors que les peptides PepTB-1 à -11 ont préalablement subi une réaction avec le SATA (voir principe de couplage au II.3.1.2, p.91).

II.3.2.2. Immunisations

En ce qui concerne les immunisations avec HcTBA, RicA et RicB, 3 souris Biozzi ont été immunisées pour chaque lot avec la préparation immunogénique. Celle-ci comprend 50 μ L de solution de protéine à 2 mg/mL (soit 100 μ g), 200 μ L d'eau distillée et 300 μ L d'adjuvant complet de Freund (1/3 de la préparation est injecté dans chaque souris).

Le mélange des onze peptides PepTB (1 à 11) couplés à la BSA d'une part, et le peptide PepTB 1-BSA seul d'autre part, ont été injectés à 2 lapins. De même, les peptides TB-Cter et TB-Nter couplés à la BSA ont été injectés à 2 lapins chacun. Ces immunisations ont eu lieu suivant le même protocole que pour les souris mais avec 375 μ g de protéine par lapin.

Deux rappels ont lieu 3 semaines puis 8 à 10 semaines après l'immunisation (J0). Des prélèvements sanguins sont réalisés avant immunisation (saignée S0), puis 2 semaines après chaque immunisation (saignées S1, S2 et S3). Après centrifugation à 3000 g durant 10 min des sérums, les surnageants sont récupérés et azidés à 0,05 % puis conservés à 4°C.

II.3.2.3. Titration des sérums en anticorps

La titration des sérums se fait par un test de dilution des antisérums en utilisant comme traceurs les antigènes ou haptènes utilisés pour l'immunisation couplés à l'AChE (voir II.3.1.2, p.91) ou à la biotine (voir II.3.1.2.2, p.91).

Les couplages des protéines Hc, RicA et RicB avec la biotine ont été effectués avec un rapport de 5 moles de biotine-amidocaproate succinimidyl ester par mole de protéine. Pour les peptides PepTB-1 à -11, le rapport molaire biotine/peptide (R) a été modulé en fonction du nombre d'amines libres du peptide : R=3 pour les peptides PepTB-2 et -10 comportant 6 fonctions amines libres (5 lysines et la fonction amine terminale), R=5 pour PepTB-1 comportant 4 amines libres, R=6 pour les peptides PepTB-4, -5, -6, -7 et -9 comportant 3 amines libres, R=8 pour PepTB-3 et -8 comportant 2 amines libres et R=10 pour PepTB-11 qui ne comporte comme amine libre que l'amine terminale).

50 μ L de sérums dilués (de 10^2 à 10^6 fois en tampon EIA) et 50 μ L de solution de traceur sont incubés dans les puits revêtus d'anticorps de capture. Après 16 h d'incubation à 4°C, la mesure d'absorbance à 414 nm permet d'identifier le sérum le plus immunoréactif (présentant le signal maximal).

II.3.2.4. Production d'anticorps monoclonaux

Les cellules de rate de la souris présentant le sérum le plus immunoréactif sont fusionnées avec des cellules de myélomes NS1 comme décrit par J. Grassi (Grassi *et al.*, 1988). L'utilisation d'un milieu de culture sélectif permet de conserver uniquement les hybridomes, dont on teste la présence après environ 10 jours en évaluant la capacité de liaison des surnageants avec le traceur sur plaque revêtue d'anticorps CAS (test de liaison). La présence des hybridomes est vérifiée alors au microscope dans les plaques de culture puits par puits. On réalise ensuite des dilutions successives des hybridomes sélectionnés jusqu'à obtenir 1 cellule de myélome par puits qui donnera naissance à une population clonale d'hybridomes après croissance dans des volumes de plus en plus grands. 5 souris Nude sont alors inoculées par voie intra-péritonéale avec chaque clone sélectionné. L'ascite est prélevée 3 semaines après l'inoculation.

II.3.2.5. Protocole de purification des anticorps par acide caprylique

A 5 mL de liquide d'ascite sont ajoutés 20 mL de tampon acétate 60 mM pH 4. Le pH est ajusté à pH 4,6 par ajout de quelques gouttes de NaOH 5 M, puis on ajoute goutte à goutte 550 μ L d'acide caprylique. Après 1 h sous agitation, la solution est centrifugée à 6000 g

durant 40 min. Le surnageant est ensuite dialysé contre 4 L de tampon Phosphate 0,05 M pH 7,4 durant 18 h.

II.3.2.6. Etudes de complémentarité des anticorps

Chacun des anticorps est immobilisé sur des plaques de microtitration (suivant le protocole classique de *coating* avec 200 μ L de solution d'anticorps à 5 μ g/mL puis saturation avec 300 μ L de tampon EIA). On dépose alors 100 μ L de chacun des mêmes anticorps biotinylés (à 100 ng/mL) avec 100 μ L de solution standard de protéine à une concentration donnée. Après 18 h d'incubation à 4 °C, les plaques sont lavées et révélées selon le protocole décrit précédemment p.92 (streptavidine-AChE puis milieu d'Ellman).

II.3.3. SPIT-FRI

II.3.3.1. Principe général

Le SPIT-FRI, dont le principe est décrit sur la Figure 12 (p.58), fait intervenir deux molécules marquées : (i) le tripode, qui comporte un analogue de la molécule à doser, une biotine permettant sa fixation à la surface, et un fluorophore jouant le rôle de Donneur, et (ii) l'anticorps qui est marqué avec un fluorophore (ou *quencher*) Accepteur.

Nous avons utilisé des supports (plaques de microtitration, capillaires ou lames) qui ont été revêtus de neutravidine. Les dosages sont réalisés en 3 étapes :

- Etape 1 : immobilisation sur le support du tripode comportant l'analogue, la biotine et le fluorophore donneur ;
- Etape 2 : incubation de l'anticorps marqué avec le fluorophore accepteur ;
- Etape 3 : incubation de l'analyte (solution de standard ou d'échantillon).

Une nouvelle incubation de l'anticorps marqué permet de régénérer la phase solide.

II.3.3.2. Méthode de couplage des anticorps avec les fluorophores et quenchers

II.3.3.2.1. Principe du couplage

Nous avons utilisé des fluorophores et *quenchers* sous forme d'ester actif (voir II.2.3, p.79) réagissant sur les fonctions amine primaire des anticorps suivant la réaction décrite sur la Figure 27 (p.98). Après couplage, les anticorps ont été purifiés par chromatographie de tamisage moléculaire afin d'éliminer le fluorophore libre. La concentration a été estimée à partir du spectre d'absorbance.

Réaction d'un ester actif sur une fonction amine

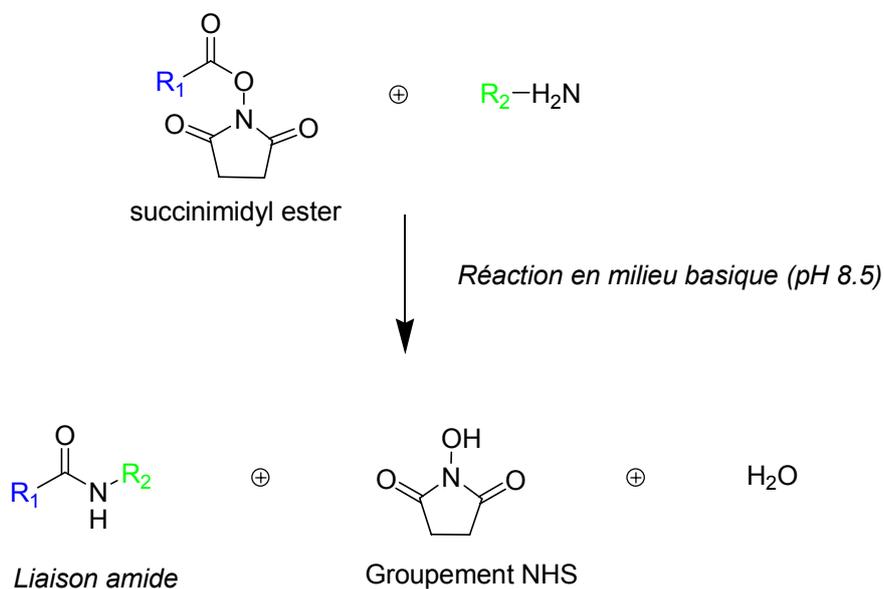


Figure 27 : Réaction d'un ester actif sur une amine primaire

Tableau 8 : Coefficients d'extinction molaire et facteurs correctifs des fluorophores et *quenchers*
D'après Molecular Probes, Inc.

Fluorophores / <i>quenchers</i>	λ_{EXCmax} (nm)	$\epsilon_{\lambda_{max}}$ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	FC_{280}
Fluorescéine	494	68000	0,30
A488	495	71000	0,11
A532	532	81000	0,09
A546	546	104000	0,12
TMR	555	65000	0,30
A647	650	239000	0,03
A680	679	184000	0,05
Dabcyl	453	32000	0,3
QSY7	560	90000	0,22
QSY21	660	89000	0,32

II.3.3.2.2. Mode opératoire

Les fluorophores et *quencher*s lyophilisés sont repris par du DMF (diméthylformamide) anhydre pour obtenir des solutions à 10 mg/mL, conservées sous forme d'aliquots à -20 °C. Le marquage est réalisé en ajoutant à la solution d'anticorps fortement concentrée (à 1 mg/mL minimum en tampon borate 0,1 M pH 9) une quantité de fluorophore (à 10 mg/mL en DMF) correspondant à un rapport de couplage (R) de 10 moles d'ester par mole d'anticorps [sauf pour la TMR (R=50) et sauf mention contraire]. Après réaction durant 18 h à 4 °C, sous agitation (agitateur rotateur) et à l'obscurité, l'excès d'ester actif est inactivé par ajout de Tris/HCl 1 M pH 9 (1/10^{ème} du volume de la solution de marquage) (15 min à RT).

Les anticorps marqués sont purifiés par chromatographie de tamisage moléculaire Sephadex G25 (élution en tampon Phosphate 0,1 M pH 7,4 NaN₃ 0,01 %). Pour chaque fraction, l'absorbance est mesurée à 280 nm et à la longueur d'onde d'absorption maximale du fluorophore λ_{\max} (voir Tableau 8, p.98) à l'aide du spectrophotomètre UV/visible. On trace alors le profil d'élution (absorbance en fonction de la fraction). Les fractions correspondant à l'anticorps marqué (premier pic d'absorbance simultanée à 280 nm et à λ_{\max}) sont réunies.

II.3.3.2.3. Calcul de la concentration en anticorps et du ratio TMR/Ac après marquage (Rf)

- A partir du spectre d'absorbance

La concentration en anticorps (C) et le nombre moyen de moles de fluorophores incorporés par mole d'anticorps Rf (ou « ratio d'incorporation ») sont calculés à partir du spectre d'absorbance de la solution à l'aide des formules suivantes :

$$[9] \quad C = \frac{A_{280} - FC_{280} \times A_{\lambda_{\max}}}{\epsilon_{280(Ac)}}$$

$$[10] \quad R_f = \frac{A_{\lambda_{\max}}}{\epsilon_{\lambda_{\max}(Fluo)} \times C}$$

avec C : concentration en anticorps (M) ; Rf : ratio d'incorporation (en mole de fluorophore par mole d'anticorps) ; A₂₈₀ : absorbance de la solution à 280 nm ; $\epsilon_{280(Ac)}$: coefficient d'extinction molaire de l'anticorps à 280 nm (204 000 M⁻¹.cm⁻¹ pour une IgG) ; FC₂₈₀ : Facteur Correctif correspondant à l'absorbance du fluorophore à 280 nm ; A _{λ_{\max}} : absorbance de la solution à λ_{\max} (longueur d'onde d'absorption maximale du fluorophore) ; $\epsilon_{\lambda_{\max}(Fluo)}$: coefficient d'extinction molaire du fluorophore à λ_{\max} .

Le facteur correctif (FC₂₈₀), correspondant à l'absorbance du fluorophore à 280 nm, varie selon le fluorophore (voir Tableau 8, p.98).

- *Par dosage protéique*

Les concentrations en anticorps sont également mesurées à l'aide d'un dosage protéique (Perbio Science, Rockford, Illinois, USA). Ce dosage est basé sur l'utilisation de l'acide bicinchoninique (BCA) et d'ions cuivriques en milieu alcalin. Les ions cuivreux générés par réduction par les protéines forment avec le BCA un complexe stable et intensément coloré ($\lambda_{\max} = 562 \text{ nm}$).

En cas de différence entre les deux valeurs de concentrations obtenues par méthode d'absorbance ou dosage protéique, on utilise la valeur obtenue avec le dosage protéique.

II.3.3.2.4. Vérification des capacités de liaison des anticorps marqués

Les capacités de reconnaissance des anticorps marqués avec les fluorophores sont comparées avec celles des anticorps natifs (non marqués) en réalisant des tests de liaison avec l'analyte couplé à l'AChE ou à la biotine (voir test de dilution d'anticorps au II.3.1.4, p.92).

II.3.3.2.5. Calcul de l'aire de recouvrement des spectres anticorps et tripode et de R_0

Les spectres d'absorbance et d'émission de fluorescence ont été mesurés pour chaque couple tripode et anticorps marqué, permettant de visualiser la zone de recouvrement spectral caractérisée par la grandeur J calculée avec la formule suivante :

$$[11] \quad J = \frac{\sum_{\lambda} F(D)_{\lambda} \cdot \varepsilon(A)_{\lambda} \cdot \lambda^4 \cdot \Delta\lambda}{\sum_{\lambda} F(D)_{\lambda} \cdot \Delta\lambda} \quad (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^3)$$

où $F(D)_{\lambda}$ correspond à la fluorescence du donneur (en unités arbitraires) et $\varepsilon(A)_{\lambda}$ au coefficient d'absorbance de l'accepteur (en $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) pour la longueur d'onde λ .

On peut alors calculer R_0 , cette grandeur caractéristique de chaque couple correspondant à la distance entre A et D où l'efficacité du transfert est de 50%:

$$[12] \quad R_0 = 9.79 \times 10^3 (\kappa^2 \cdot n^{-4} \cdot \Phi(D) \cdot J)^{1/6} \quad (\text{\AA})$$

où κ^2 est le facteur d'orientation ($=2/3$), n est l'indice de réfraction ($=1,4$) et $\Phi(D)$ le rendement de fluorescence du donneur.

Le calcul de l'aire est effectué soit à partir des spectres des marqueurs libres, soit à partir des spectres des tripodes et anticorps marqué.

II.3.3.3. Préparation de fragments d'anticorps Fab, F(ab')₂, Ac-red et Fab'

II.3.3.3.1. Principe de préparation des fragments d'anticorps

A partir de l'anticorps entier AcM SP31, différents fragments ont été préparés, résultant d'actions protéasiques et/ou réductrices ménagées qui préservent le site de liaison des anticorps à l'antigène, tout en supprimant tout ou partie du fragment Fc. Les fragments Fab, monovalents, résultent du clivage de l'anticorps au-dessus de la région charnière et peuvent être obtenus par action de la ficine ou comme ici de la papaïne. L'obtention de fragments F(ab')₂ est réalisée par protéolyse en utilisant de la pepsine en conditions acides qui clive l'anticorps après la région charnière. La production de fragments monovalents Fab' découle d'une réduction en conditions douces par la β-mercaptoéthanolamine des fragments F(ab')₂ divalents. Les thiols résultants sont ensuite bloqués par action de la N-éthylmaléimide (NEM) pour éviter une polymérisation ultérieure éventuelle. L'anticorps réduit ou Ac-red, monovalent, résulte de la réduction de l'anticorps entier au niveau des ponts disulfures reliant les chaînes lourdes. Il est obtenu en suivant le même protocole que pour la préparation des fragments Fab' mais à partir de l'anticorps entier au lieu des fragments F(ab')₂.

II.3.3.3.2. Mode opératoire

- *Fragments Fab*

A 3 mg d'anticorps en tampon phosphate de sodium 0,05 M pH 7 (640 µL) sont ajoutés 120 µL de solution contenant 8 µg de matrice solide (CH Sepharose 4B) revêtue de papaïne en tampon phosphate de sodium, 8 µL de L-cystéine 1 M et 8 µL de solution d'EDTA 100 mM (la cystéine et l'EDTA étant les cofacteurs de la papaïne). Après 5 h de réaction à 37°C sous agitation, les fragments Fab sont séparés par chromatographie d'affinité (Protéine A) qui retient spécifiquement les fragments Fc des anticorps. Les Fab non retenus sur la colonne sont récupérés en tampon phosphate de sodium 0,05M pH 7 (tandis que les fragments Fc sont élués en tampon glycine 0,1 M pH 3,5) puis dialysés contre ce même tampon.

- *Fragments F(ab')₂*

L'anticorps (4 mg) est incubé en tampon formiate 0,1 M pH 3 en présence de pepsine avec un ratio massique pepsine/Ac de 1/200 durant 1 h à 37°C/ La réaction est arrêtée par ajout de 100 µL de Tris 1 M pH 8. Les fragments F(ab')₂ sont alors purifiés par chromatographie d'exclusion en utilisant un gel Ultrogel ACA 44 (Ciperghen, USA). L'élution se fait en tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 6. Les fractions sont analysées par mesure de l'absorbance à 280 nm, et les fractions correspondant aux fragments F(ab')₂ sont réunies.

- *Fragments Fab'et Ac-red*

2 mg de F(ab')₂ (ou 3,3 mg d'anticorps entier pour Ac-red) en solution dans 1,5 mL (ou 2 mL pour Ac-red) de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 6 sont réduits par addition de 1/10^{ème} du volume d'une solution de β-mercaptoéthanolamine à 0,3 M (ou 1 M pour Ac-red). Après 1 h de réaction à 30°C sous agitation, la β-mercaptoéthanolamine est éliminée par chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne Sephadex G25 en tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 6 EDTA 5 mM dégazé.

Les fractions collectées (1,5 mL) sont analysées en terme de concentration de thiols à l'aide du DTNB de la façon suivante. Sur une plaque de microtitration sont déposés 50 µL de chacune des fractions et 150 µL de DTNB 5 mM. Après 5 min de réaction, l'absorbance à 414 nm est mesurée et les fractions correspondant au Fab' sont réunies, avant addition d'1/10^{ème} du volume d'une solution de N-éthylmaléimide (NEM) 0,1 M. Après 2 h de réaction à 30°C et concentration de la solution par ultrafiltration sur MakroSep 30K, l'excès de NEM est éliminé par chromatographie de tamisage moléculaire (Sephadex G25) puis les fractions correspondant au Fab' (ou à Ac-red) sont réunies.

II.3.3.3.3. Electrophorèses

L'efficacité des protéolyses et des purifications est analysée par électrophorèse. 40 µL de tampon d'électrophorèse et 10 µL de bleu de bromophénol sont ajoutés à la solution d'anticorps. Les échantillons ainsi qu'une solution de standards de masses moléculaires connues ou « marqueur de taille » (contenant également du bleu de bromophénol et du tampon d'électrophorèse) sont chauffés à 95°C pendant 5 min avant dépôt sur le gel d'électrophorèse. La migration et la coloration sont réalisées à l'aide de l'appareil Phast System. Les profils électrophorétiques des solutions sont également réalisés après réduction des ponts disulfures (ajout de 5 µL de β-mercaptoéthanol à la solution avant chauffage à 95°C).

Après vérification de la pureté des fragments par électrophorèse et dialyse, la concentration des fragments est estimée par mesure de l'absorbance à 280 nm et les solutions purifiées conservées à -20°C.

II.3.3.4. Préparation des tripodes

II.3.3.4.1. Tripodes SP

Le tripode SP est préparé par marquage fluorescent du peptide Ala¹⁰SP-biot (voir II.2.4.1, p.83). Les 5 derniers acides aminés du côté C-terminal du peptide Ala¹⁰SP-biot correspondent à la partie reconnue par l'anticorps monoclonal SP31. Trois modifications ont été réalisées par rapport à la séquence de la substance P : 1) la Leu¹⁰ de la SP est remplacée par une alanine, afin de réduire légèrement l'affinité de l'anticorps pour le peptide. 2) pour limiter le marquage à la région N-terminale du peptide, la Lys³ de la SP est également remplacée par une alanine, 3) enfin, 4 acides aminés sont ajoutés sur l'extrémité aminée (une lysine portant une biotine, deux sérines et une lysine).

Le tripode est purifié et les fractions sont analysées par spectrométrie de masse et test d'immunoréactivité.

- *Protocole de marquage fluorescent*

Le peptide Ala¹⁰SP-biot a été marqué avec les différents marqueurs fluorescents sous forme d'esters actifs (voir la description des marqueurs fluorescents au II.2.3, p.79) suivant un protocole similaire à celui utilisé pour le marquage des anticorps (cf p.97). A 100 µL d'une solution de peptide à 1 mg/ml (en tampon Borate 0,1 M pH 9) sont ajoutés 10 équivalents molaires d'ester actif du fluorophore (en DMF). Après 18 h de réaction à 4 °C à l'obscurité, 100 µL de tampon Tris/HCl 1 M pH 9 sont ajoutés pour neutraliser les esters actifs restants.

- *Conditions de purification HPLC*

Les peptides marqués ont été purifiés par chromatographie HPLC en phase inverse sur colonne analytique C18 100 Å Vydac 5 µm (250 x 4.6). Les peptides repris dans le tampon A (H₂O/TFA 0,1 %) sont élués à un débit de 1 mL.min⁻¹ par un gradient de tampon B (acétonitrile/TFA 0,04 %) de 0 à 50 % en 50 minutes (dans le tampon A). Les fractions sont collectées toutes les minutes et le suivi de l'HPLC se fait par mesure d'absorbance à 214 nm, 280 nm et à la longueur d'onde d'absorption maximale du fluorophore λ_{ABSmax} .

- *Analyse Maldi-Tof*

Sur une plaque de métal sont déposés 1 µL de solution à analyser et 1 µL de matrice acide α -cyano-4-hydroxycinnamique en solution à 10 mg/mL (en tampon acétonitrile 50 % TFA 0,3 % dans de l'eau distillée). Après séchage de la goutte, la plaque est insérée dans l'appareil Maldi-TOF. Le spectre obtenu représente m/z en abscisse, et la quantification relative en ordonnée (intensité en % par rapport à la masse à la plus abondante).

- *Test d'immunoréactivité des fractions*

Le test d'immunoréactivité des fractions correspond à un test de liaison avec l'anticorps monoclonal AcM SP31. Les fractions préalablement évaporées (Speed-Vac) sont reprises par 100 μL d'eau distillée. 100 μL de chaque fraction, diluée au $1/100^{\text{ème}}$, $1/1000^{\text{ème}}$ et $1/10000^{\text{ème}}$ en tampon EIA, sont incubés durant 18 h à 4°C sur des plaques revêtues d'AcM SP31 (*coating* avec 120 μL /puits de solution d'anticorps suivant le protocole décrit p.92). Après lavage, les plaques sont révélées par ajout de streptavidine-AChE puis de milieu d'Ellman (voir protocole de révélation p.92).

La superposition des profils d'absorbance (λ_{ABSmax} du fluorophore) et d'immunoréactivité permet de visualiser plusieurs pics susceptibles de contenir le peptide marqué. L'analyse par spectrométrie de masse des éluats correspondants permet de les identifier. Les fractions correspondant au tripode sont alors regroupées. Après évaporation, le tripode est repris par du tampon Phosphate 0,1 M pH 7,4 NaN_3 0,01% puis la solution est conservée à -20°C .

II.3.3.4.2. Tripodes Atrazine

Nous avons préparé deux types de tripodes pour l'atrazine. Le dérivé acide 3-mercaptopropanoïque de l'atrazine ou Atz-MPA (voir structure et synthèse p.86) a été couplé soit à la BSA, soit au peptide T de séquence Gly-Ser-Gly-Ser-Cys-Ser-Gly-Ser-Lys(biot)-CONH₂, préalablement marqués avec l'Alexa 532.

- *Tripode obtenu par marquage du peptide T*

Le peptide T de séquence :



a été utilisé comme support du tripode, permettant le greffage d'un fluorophore maléimide sur la cystéine et de l'analogue au niveau de l'amine N-terminale.

- *Couplage du peptide T à l'Alexa 532*

La concentration du peptide T est calculée par dosage des thiols (voir protocole p.102), le nombre de moles de thiols correspondant au nombre de moles de cystéine et donc de peptide. A 300 nmoles de peptide (dans 300 μL de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 6) sont ajoutées 900 nmoles d'Alexa 532 maléimide (dans 75 μL de DMF) pour une réaction de 18 h à 4°C . Après purification par chromatographie en phase inverse, les fractions sont analysées par spectrométrie de masse Maldi-TOF et test de fluorescence pour réunir celles correspondantes au peptide marqué.

- *Couplage du peptide T-A532 au dérivé acide mercaptopropanoïque de l'atrazine*

L'atrazine-MPA est d'abord activée par formation d'un ester actif sur l'acide carboxylique pour permettre sa réaction avec l'amine primaire du peptide T. 5 μ moles d'Atz-MPA en méthanol sont évaporées (Speed Vac) puis mises à réagir avec 1,2 équivalents de DCC et de N-hydroxysuccinimide (NHS) en DMF durant 18 h à 4°C.

Un protocole classique de couplage d'ester actif sur fonction amine (voir p.99) est ensuite effectué, en utilisant un rapport de 2, 5, 10, 25, 50, 100 ou 500 moles d'Atz-MPA par mole de peptide. Après marquage, le peptide T-A532-Atz correspondant au tripode est purifié par une nouvelle chromatographie HPLC en phase inverse. Les fractions sont analysées par spectrométrie de masse Maldi-TOF et test d'immunoréactivité afin d'identifier les fractions correspondant au tripode (peptide T-Atz-A532).

• *Tripode Atz-BSA*

Nous avons également réalisé un tripode Atz préparé à partir de BSA sur laquelle ont été greffés le fluorophore et l'analogue sous forme d'esters actifs (réagissant avec les amines primaires de la BSA). Les tripodes BSA ont été obtenus par marquage de 100 μ g de BSA (66000 Da) avec le fluorophore (TMR ou A 532) sous forme d'ester actif, la biotine-amidocaproate succinimidyl ester et l'atrazine-MPA activée. Différents rapports de marquages ont été testés pour chacun des réactifs ($R = 0, 2, 5, 10, 25, 50$). La réaction est effectuée en tampon borate 0,1 M pH 8,5 dans un volume final de 75 μ L. Après 18 h de réaction sous agitation, les solutions sont analysées par spectrométrie de masse Maldi-TOF.

Les tripodes sont analysés par spectrométrie de masse et leur immunoréactivité est contrôlée par test de liaison avec les anticorps anti-atrazine.

II.3.3.4.3. Tripode AFB1

Le tripode pour l'aflatoxine a été préparé, comme pour l'atrazine, à partir du peptide T servant de support pour la liaison du fluorophore et de l'analogue. Le peptide T a été marqué à l'Alexa 532 maléimide réagissant sur la cystéine puis purifié par chromatographie en phase inverse comme précédemment décrit pour l'atrazine. Après activation au DCC et au NHS comme précédemment décrit pour l'atrazine, l'oxime d'AFB1 (voir description et méthode de synthèse au II.2.4.4, p.87) est couplé au peptide T-A532 puis purifié par une nouvelle chromatographie en phase inverse.

II.3.3.4.4. Tripodes BLg

Le tripode BLg correspond à la BLgA purifiée au laboratoire (protocole de purification de la BLg décrit au II.2.4.2, p.83) doublement marquée sur ses fonctions amines primaires avec (i) la biotine (biotine amidocaproate succinimidyl ester, Sigma), et (ii) le fluorophore (Fluorescéine ou Alexa532 succinimidyl ester, cf p.79).

Le couplage de la BLgA avec la biotine et le fluorophore est réalisé en tampon borate 0,1 M dans différentes conditions selon : l'incubation simultanée ou séquentielle de la biotine et du fluorophore, le pH du tampon de couplage, la durée de la réaction de marquage, et les rapports de marquage de la biotine et des fluorophores (1, 2, 5, 10, 25, 50 moles d'ester actif par mole de protéine). Lorsque cela n'est pas spécifié, le couplage a lieu durant 30 min à pH 8.

Le tripode est purifié par chromatographie de tamisage moléculaire Sephadex G25 permettant d'éliminer le fluorophore et la biotine n'ayant pas réagi (élution en tampon Phosphate 0,1 M pH 7,4 NaN₃ 0,01%). Pour chaque fraction, on mesure l'absorbance à 280 nm et à la longueur d'onde d'absorption maximale du fluorophore λ_{ASBmax} (voir Tableau 8, p.98) afin de tracer le profil d'élution. Les fractions correspondant au tripode sont réunies.

La concentration de la solution et le nombre de moles de fluorophore par mole de BLg (Rf) sont évalués à partir de l'absorbance à 280 nm et à λ_{ASBmax} (voir méthode de calcul p.99) en utilisant comme coefficient d'extinction molaire à 280 nm de la BLg : $\epsilon_{280nm}(BLg) = 17\ 600\ M^{-1}.cm^{-1}$. La concentration de la solution est également vérifiée à l'aide d'un dosage protéique (kit Perbio Science). En cas de différence entre les deux concentrations estimées, on utilise la valeur obtenue avec le dosage protéique.

Les tripodes sont analysés par spectrométrie de masse (on emploie comme matrice de l'acide sinapinique, utilisée pour les protéines de masse supérieure à 5 kDa). Leur immunoréactivité est vérifiée par test de déplacement de la liaison du traceur BLg-AChE (voir protocole au II.3.1.4, p.92) ainsi que par test immunométrique (voir protocole au II.3.1.5., p.94) en employant les anticorps anti-BLg reconnaissant la BLg native et la Rcm-BLg (description des anticorps au II.2.4.2, p.83).

II.3.3.4.5. Tripode Ricine

Le tripode pour la ricine a été préparé par marquage de la chaîne B de la ricine (RicB, 50 μ g) à la biotine-amidocaproate succinimidyl ester (ratio de couplage = 5 moles de biotine/mole de RicB) et à l'Alexa 532 succinimidyl ester (ratio de couplage = 10 moles d'A532/mole de RicB) en suivant le protocole de couplage décrit pour la BLg (au II.3.3.4.4, p.106). Le tripode

est ensuite purifié par chromatographie de tamisage moléculaire. La concentration et le ratio de marquage de la ricine marquée ont été évalués par méthode d'absorbance.

II.3.3.5. Protocole général du SPIT-FRI en microplaque

II.3.3.5.1. Protocole du dosage en microplaque

Nous utilisons des plaques revêtues de neutravidine selon le protocole de *coating* décrit précédemment (voir p.92) à raison de 120 µL/puits (5 µg/mL).

Comme pour le dosage EIA compétitif (voir p.92), la mise au point du dosage se fait classiquement en plusieurs étapes.

- *Tests de dilution de tripode et d'anticorps*

Tout d'abord, les concentrations en tripode et en anticorps sont choisies par test de dilution d'anticorps sur plaque revêtue de tripode consistant à faire varier la concentration en tripode et en anticorps. Selon le protocole standard, 100 µL de solution de tripode sont incubés durant 18 h à 4° C sur les plaques revêtues de neutravidine. Après lavage, 100 µL de solution d'anticorps marqué avec l'accepteur sont incubés à nouveau pour 18 h à 4°C. La mesure de fluorescence est effectuée après lavage avec 100 µL de tampon PVP 0,1 M pH 8,5.

Le pourcentage de *quenching* %Q est défini comme : $\%Q = (F_{\max} - F_{\min}) / F_{\max} * 100$, où F_{\min} et F_{\max} correspondent au signal du tripode fluorescent respectivement avec et sans anticorps.

La concentration en tripode est généralement choisie comme étant la plus faible concentration permettant d'obtenir un signal F_{\max} suffisant et un pourcentage de *quenching* %Q maximal. La concentration en anticorps-accepteur est généralement choisie comme étant la plus faible concentration permettant d'obtenir une extinction de signal maximale (classiquement 100 nM).

- *Etablissement de la courbe d'étalonnage et dosage*

Le protocole standard consiste à incuber successivement dans les puits (à raison de 100 µL/puits) la solution de tripode à la concentration choisie, puis après lavage la solution d'anticorps à 100 nM (sauf indication contraire) durant 18 h à 4 C sur les plaques revêtues de neutravidine. Après lavage, 100 µL de solution de standard (gamme) ou d'échantillon sont mis à incuber pour 5 h à RT sous agitation. Sauf mention contraire, le tampon de dilution est du tampon PVP pH 7,4. La régénération du dosage s'effectue par une nouvelle incubation de 100 µL de solution d'anticorps durant un temps suffisant et à une concentration suffisamment élevée pour permettre le retour au niveau de fluorescence le plus bas dans tous les puits

(généralement à 100 nM durant 18 h à 4°C, sauf indication contraire). Sauf mention contraire, la mesure de fluorescence est effectuée après lavage avec 100 µL de tampon PVP 0,1 M pH 8,5 (mesure en mode « point final »).

Selon certaines variantes du procédé, les temps et températures d'incubation et les concentration en tripode et anticorps peuvent être modifiées.

La mesure peut également être effectuée en mode cinétique, ie. à différents temps durant l'incubation (le délai entre le dépôt et le début de la cinétique est mesuré).

La mesure peut être effectuée avec plusieurs appareils et à différentes longueurs d'onde (cf p.70). Le lecteur Envision permet de régler le nombre de flashes par mesure, le nombre de mesures par puits et le gain du photomultiplicateur. L'augmentation du nombre de flash entraîne une augmentation de l'intensité du signal et de la précision mais un nombre de flashes trop élevé peut saturer l'appareil. Les conditions standard correspondent à une mesure avec le lecteur de fluorescence Envision avec 25 flashes par mesure, 5 mesures par puits, un gain de 150 et une hauteur de focalisation (h) de 2 mm. Les paramètres peuvent être adaptés selon l'expérience (concentration en fluorophore, longueur d'onde de mesure).

II.3.3.5.2. Analyse des données

La méthode d'analyse consiste à calculer pour chaque concentration x en standard le pourcentage d'inhibition du *quenching* $IQ\% = (F_x - F_{min}) / (F_{max} - F_{min}) * 100$, où F_x correspond au signal obtenu pour la concentration x , F_{min} est le signal obtenu sans analyte ($x=0$) et F_{max} correspond au signal témoin du tripode sans anticorps-Accepteur.

La courbe de l' $IQ(\%)$ en fonction de la concentration en standard est analysée par régression sigmoïdale de la même façon que pour les dosages EIA compétitifs (voir au II.3.1.4, p.92). Les concentrations des échantillons à doser sont alors extrapolées à partir de cette courbe de référence. La sensibilité du dosage est caractérisée par l' EC_{50} (concentration générant une inhibition du *quenching* de 50 %) et la zone linéaire définie par l'intervalle $[EC_{20}, EC_{80}]$, fournissant respectivement 20 % et 80 % d' IQ . La limite de détection (LD) est déterminée par extrapolation par rapport à la courbe de régression comme la concentration en standard fournissant un signal égal à la moyenne (μ) du signal F_{min} plus 3 fois l'écart-type (σ).

II.3.3.6. Protocoles du SPIT-FRI en flux

II.3.3.6.1. Protocole de silanisation des supports en verre

Nous avons utilisé une chimie de greffage mise au point, développée et brevetée par des chercheurs du Laboratoire de Fonctionnalisation et de Chimie pour les Microsystèmes (LFCM) du CEA Grenoble (équipe du Dr Françoise Vynet), initialement conçue pour le greffage d'oligonucléotides sur supports en verre. Cette chimie, intitulée « CEA2 », est basée sur l'emploi du 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane (Figure 28, p.110). Elle permet de créer une interface entre un substrat inorganique (verre, oxyde métallique, etc.) et des molécules possédant des fonctions amine primaire NH_2 .

Le protocole de la chimie CEA2 est décrit sur la Figure 29 (p.110). La fonctionnalisation jusqu'au stade aldéhyde comporte 4 étapes : l'activation, la silanisation, l'hydrolyse acide et l'oxydation.

- Activation : les supports sont activés par incubation dans une solution basique forte.
- Silanisation : les supports sont rincés avec de l'éthanol et du toluène et séchés à chaud afin d'éliminer toute trace d'eau ; ils sont ensuite mis à incuber dans une solution de 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane en toluène. Une étape de chauffage permet ensuite la réticulation des silanes (liaisons Si–O–Si).
- Hydrolyse acide : l'hydrolyse acide (HCl) permet d'ouvrir la fonction époxyde du silane en fonction diol. Les supports une fois séchés peuvent être conservés à 4 °C sous azote.
- Oxydation : le diol est oxydé en aldéhyde par action du métapériodate de sodium (NaIO_4). Cette étape est immédiatement suivie de l'immobilisation de la protéine.

Pour les lames, les incubations sont effectuées par immersion complète dans une cuve en pyrex sous agitation orbitale. Les capillaires sont remplis par capillarité et maintenus en position inclinée dans un tube rempli de solution d'incubation.

II.3.3.6.2. Immobilisation de la neutravidine

Après la dernière étape de la chimie CEA2 (oxydation), les supports sont rincés à l'eau distillée et séchés à la soufflette. Ils sont ensuite mis à incuber avec une solution de neutravidine à 1 mg/mL en tampon Na_2HPO_4 0,05 M NaCNBH_3 0,025 M durant 18 h à RT. Dans le cas des lames, le tampon d'immobilisation contient également du glycérol. Les fonctions NH_2 de la neutravidine réagissent sur le carbonyle (attaque nucléophile) formant une imine instable (ou « base de Schiff ») et libérant une molécule d' H_2O . La présence du

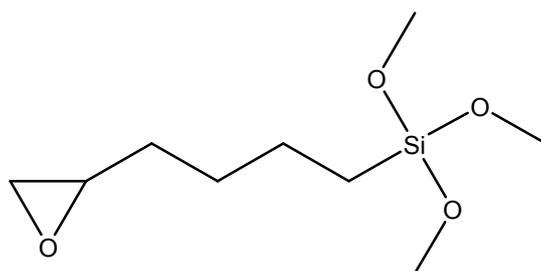


Figure 28 : Structure du 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane

Le 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane ($C_{12}H_{26}O_4Si$) est utilisé dans la chimie CEA2 utilisée pour le greffage de la neutravidine sur les supports en verre.

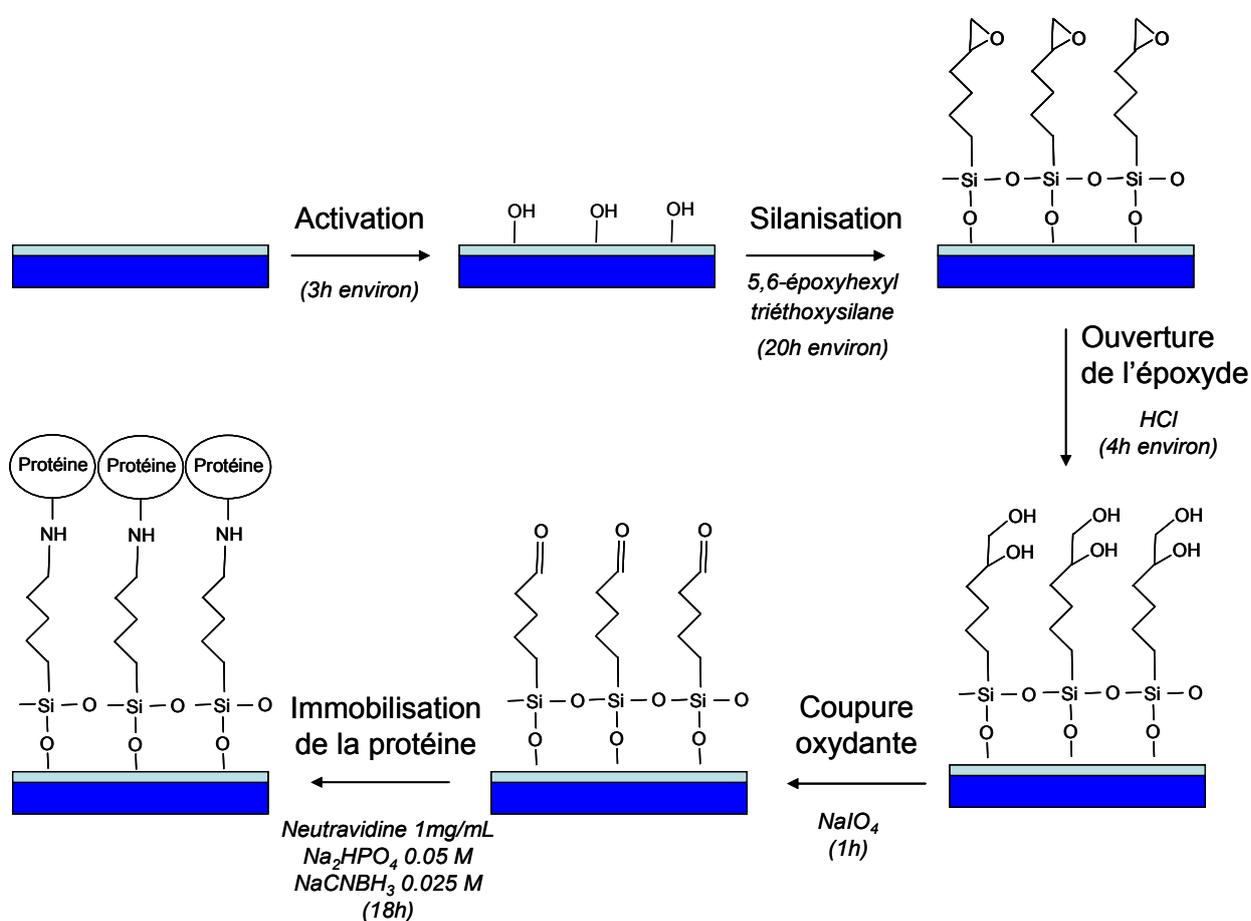


Figure 29 : Protocole de greffage de la neutravidine sur les supports en verre (chimie CEA2)

Après une activation de la surface en milieu basique, la silanisation permet le greffage du silane par création de liaisons Si–O–Si. Par hydrolyse acide, on ouvre la fonction époxyde du silane en fonction diol. Enfin, l'oxydation du diol en aldéhyde par action du NaIO₄ s'effectue juste avant le greffage de la neutravidine, dont les fonctions amines primaires NH₂ réagissent avec les fonctions aldéhyde du silane.

réducteur NaCNBH_3 dans le tampon d'immobilisation permet de réduire l'imine en amine secondaire, très stable.

Les capillaires sont simplement remplis de la solution de neutravidine, bouchés et mis à incubés en position horizontale. Pour les lames, la solution de neutravidine est déposée à leur surface sous forme de gouttes par le robot de dépôt Biojet Quanti 3000 (voir II.1.2.2, p.73). La solution est filtrée (0,22 μm) avant dépôt afin d'éviter une obstruction des tubulures. On relève les coordonnées (X,Y) des gouttes sur la lame. Le volume des gouttes et leur disposition sur la lame selon l'axe des abscisses sont contrôlés par le robot, tandis que l'axe des ordonnées est contrôlé manuellement. Le volume des gouttes est fixé à 10,2 nL ou 20,4 nL. Les lames ainsi spottées sont incubées dans une enceinte humide. Après incubation, les supports sont lavés afin d'ôter l'excédent de solution n'ayant pas réagi. Les capillaires ont été remplis et vidés 5 fois avec du tampon de lavage. Les lames ont été lavées en bain quelques secondes.

La surface est ensuite saturée avec de la BSA afin d'empêcher la fixation de molécules par réaction avec les aldéhydes inoccupés ou par adsorption non spécifique. Les supports capillaires et lames sont immergés dans un tube Falcon rempli de tampon EIA et incubés durant 2 h à 4°C au minimum. Ils peuvent être conservés en tampon EIA durant plusieurs mois à 4°C.

II.3.3.6.3. Protocole de dosage en flux

Les supports revêtus de neutravidine et saturés en tampon EIA sont rincés avec du tampon Phosphate 0,05 M pH 7,4 (5 cycles de remplissage pour les capillaires ; bain de quelques secondes pour les lames). Après un séchage léger à l'air comprimé, le tripode (en tampon PVP) est mis à incuber en statique durant 2 h à RT (par remplissage du capillaire ou bien entre lame et lamelle en chambre humide pour les lames).

Après lavage et séchage doux à l'air comprimé, le support est installé sur la platine du microscope et relié au système fluide (*via* la microcellule, à 1 ou 2 cuves, dans le cas de la lame) comme décrit au II.1.2.3, p.75. La circulation du fluide est assurée par une pompe permettant des débits faibles et sans à-coups. Les tubulures utilisées sont en tygon transparent, préalablement saturé avec des protéines (BSA) pour éviter l'adsorption non-spécifique des protéines injectées.

On effectue alors la mise au point du microscope et la programmation du logiciel de déplacement de la platine et de contrôle de l'obturateur automatique pour mesurer la

fluorescence de la (ou des) zone(s) souhaitée(s). La mesure de fluorescence est réalisée à l'aide du microscope avec le jeu de filtres adéquat (cf Figure 20, p.74).

Différentes solutions, séparées par une bulle d'air (d'environ 5 μ L) sont passées successivement, à un débit, une concentration et durant un temps variables, sur le support où le tripode est immobilisé (tampon PVP, solution d'anticorps, tampon de lavage et tampon PVP, standard, PVP). Ces différentes étapes représentent un cycle de dosage.

Nous avons également injecté successivement plusieurs concentrations de standard sans régénération par l'anticorps ; dans ce cas, du tampon PVP est intercalé entre les différentes concentrations de standards.

II.3.3.6.4. Incubations en conditions statiques

Pour les essais en conditions statiques, les capillaires sont remplis successivement avec les solutions d'anticorps et d'analyte et mis à incubés en position horizontale (bouchés). Les mesures sont réalisées en cinétique ou bien en tampon PVP après lavage.

Pour les lames, les incubations sont effectuées entre lame et lamelle. Les mesures sont réalisées après lavage et dépôt d'une goutte de tampon PVP entre lame et lamelle.

Différentes concentrations de tripodes, d'anticorps et d'analytes ainsi que différents temps d'incubation ont été testés.

II.3.3.6.5. Acquisition des images

Nous avons utilisé le plus petit objectif dont nous disposions (x4), ce qui nous a permis d'observer les plots sur lame dans leur totalité, et les capillaires (500 μ m de diamètre interne) dans toute leur largeur. Différents réglages sont effectués avant l'acquisition des images. L'axe du faisceau d'éclairage et l'axe de la caméra sont alignés (centrage de la lampe et de l'iris du diaphragme de champ). Après avoir positionné le support et affiné la mise au point, l'ouverture du diaphragme de champ (DC) est ajustée pour n'éclairer que le champ observé (« DC ajusté »). Sauf mention contraire, le diaphragme d'ouverture (DO) est fermé.

Les images sont acquises avec la caméra CCD en *binning* 4x4. Les images obtenues ont une taille de 192 x 128 pixels. La durée de l'illumination (temps d'exposition), la fréquence des images et le déplacement de la platine sont contrôlés par un logiciel écrit par François Perraut et Emmanuelle Schultz du CEA Grenoble (Labview). Sauf mention contraire, nous avons utilisé un temps d'exposition de 1 seconde.

II.3.3.6.6. Méthode d'analyse des images

Les images sont analysées avec le logiciel ImageJ (voir Rasband, 2006). Une image acquise en fermant l'obturateur de la lampe (image du « noir ») qui correspond à l'offset de la caméra (tous les pixels de la caméra n'étant pas équivalents) est soustraite à toutes les images acquises. Les images successives d'un même plot sont regroupées par pile et analysées simultanément. Le logiciel calcule la moyenne des niveaux de gris sur différentes zones du plot fluorescent (signal spécifique) et en dehors du plot (non-spécifique). La sélection des zones analysées ou régions d'intérêt (ROI pour *Region Of Interest*) est effectuée manuellement ou de façon automatique. Les courbes obtenues sont analysées à l'aide du logiciel Prism.

II.3.4. SPI-FIA

II.3.4.1. Principe général

Le dosage proposé fait intervenir des traceurs fluorescents, l'anticorps ou l'analyte (ou un analogue de l'analyte) pouvant être utilisé comme traceur. Il est effectué en plaque de microtitration en polystyrène noir. Le principe utilisé est illustré sur la Figure 30 (p.114). Lorsque le traceur est libre en solution dans le puits, sa fluorescence est élevée. Lorsque le traceur est immobilisé sur la phase solide, sa fluorescence est faible.

II.3.4.2. Protocoles des dosages immunométriques

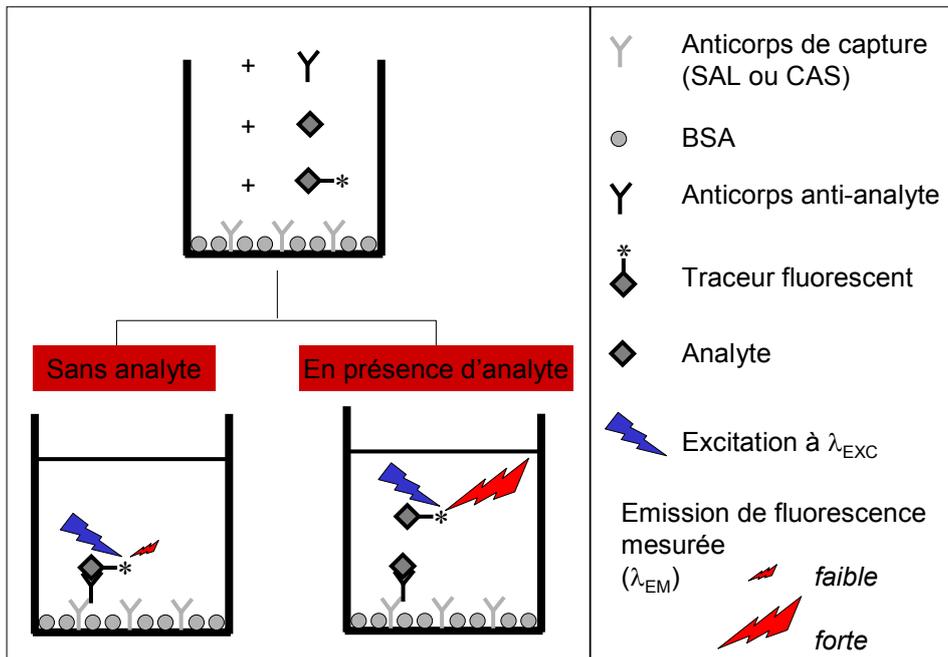
II.3.4.2.1. Protocole « long »

On utilise des plaques dont les puits ont été revêtus avec l'anticorps de capture (120 µL/puits). 50 µL de standard (gamme) ou d'échantillon et 50 µL d'anticorps traceur à la concentration adéquate sont co-incubés pendant 18 h à 4°C. Sauf mention contraire, on utilise comme tampon de dilution le tampon PVP. La mesure de fluorescence est réalisée sans lavage après l'incubation aux longueurs d'onde de fluorescence du traceur.

Dans le cas du dosage simultané de BLg et Rcm-BLg, on utilise des plaques *coatées* avec 120 µL/puits d'un mélange des deux anticorps (AcMs 88 et 92) à 2,5 µg/mL chacun (soit une concentration totale en anticorps de 5 µg/mL). La solution de traceur correspond à un mélange des anticorps AcM117-A647 et AcM74-TMR aux concentrations adéquates.

A

Principe de dosage en format compétitif



B

Principe de dosage en format immunométrique

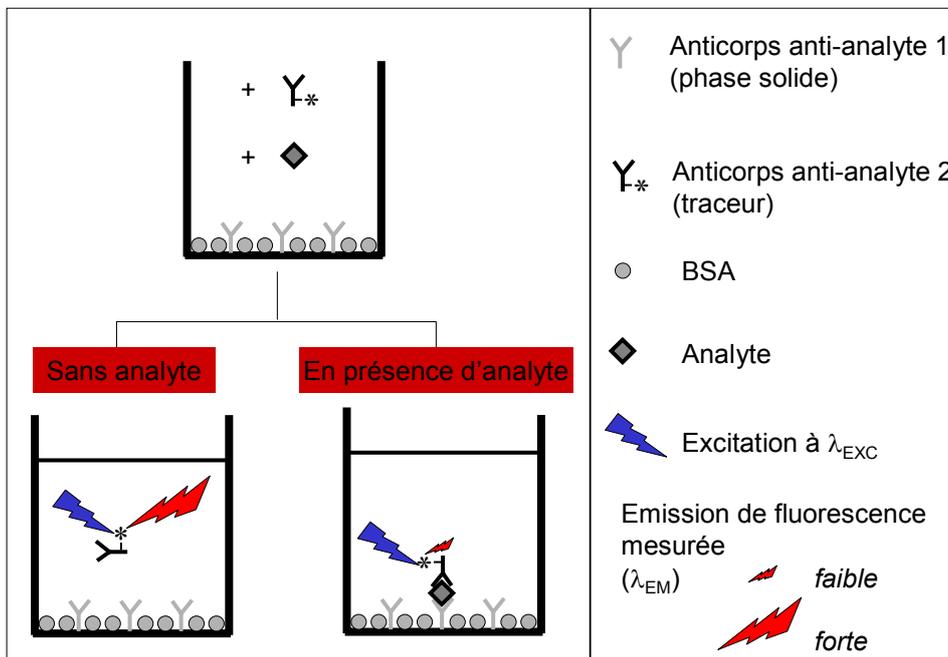


Figure 30 : Principe du SPI-FIA

A : format compétitif

B : format immunométrique

Le SPI-FIA repose sur la différence de signal de fluorescence mesurée entre le fluorophore libre en solution (fluorescence maximale) et immobilisé sur la paroi des puits (fluorescence faible).

La courbe standard (signal en fonction de la concentration) est analysée par régression linéaire. Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont calculées comme étant les concentrations en standard fournissant respectivement un signal égal à $\mu(F_0)-3\sigma$ et à $\mu(F_0)-10\sigma$, F_0 étant le signal obtenu en absence d'analyte, μ et σ étant calculés sur un nombre de réplicats (n) généralement supérieur ou égal à 4.

II.3.4.2.2. Protocole « court »

Le standard est préincubé (100 μ L) durant 30 min. Après lavage, on ajoute l'anticorps traceur (100 μ L) puis la mesure est réalisée en cinétique dès que possible après le dépôt durant 10 min (le délai entre le dépôt et le début de la cinétique est mesuré). Les courbes sont analysées par régression linéaire. La courbe standard correspond à la pente des droites en fonction de la concentration (sigmoïde). Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont calculées comme étant les concentrations en standard fournissant respectivement un signal égal à $\mu(S_0)+3\sigma$ et à $\mu(S_0)+10\sigma$, S_0 étant la pente obtenue en absence d'analyte.

II.3.4.3. Protocoles des dosages par compétition

II.3.4.3.1. Avec immobilisation de l'anticorps

On utilise des plaques dont les puits ont été revêtus d'anticorps de capture CAS ou SAL à raison de 120 μ L/puits (voir protocole de *coating* au II.3.1.3, p.92).

Le protocole « long » consiste à co-incuber 50 μ L de standard (gamme) ou d'échantillon, 50 μ L d'anticorps et 50 μ L de traceur fluorescent durant 18 h à 4°C. La mesure de fluorescence est réalisée sans lavage aux longueurs d'onde de fluorescence du traceur. La courbe standard est analysée par régression sigmoïdale (calcul de l'EC50 et de la pente). Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont calculées comme étant les concentrations en standard fournissant respectivement un signal égal à $\mu(F_{\min})+3\sigma$ et à $\mu(F_{\min})+10\sigma$, F_{\min} étant le signal obtenu en absence d'analyte (généralement $n=4$ réplicats).

Pour le protocole « court », l'anticorps est préincubé (100 μ L/puits) pendant 2 h à RT. Après lavage de la plaque, 100 μ L d'un mélange des solutions de traceur et de standard sont déposés dans les puits. La mesure est réalisée en cinétique dès que possible après le dépôt durant 10 min (le délai entre le dépôt et le début de la cinétique est mesuré). Les résultats sont analysés de la même façon que pour le protocole court type immunométrique (voir II.3.4.2.2, p.115).

II.3.4.3.2. Avec immobilisation de l'analyte (ou analogue de l'analyte)

On utilise des plaques dont les puits ont été revêtus avec de la neutravidine à raison de 120 µL/puits.

Le protocole « long » est réalisé par incubation simultanée de 50 µL de standard (gamme) ou d'échantillon, 50 µL d'anticorps et 50 µL de traceur fluorescent (analogue de l'analyte) durant 18 h à 4°C. La mesure de fluorescence est réalisée sans lavage aux longueurs d'onde de fluorescence du traceur. L'analyse est similaire au dosage avec immobilisation de l'anticorps (voir II.3.4.3.1, ci-dessus).

Le protocole « court » est similaire au dosage avec immobilisation de l'anticorps, sauf que la préincubation concerne l'analogue biotinylé sur la plaque neutravidine.

III. RÉSULTATS & DISCUSSION

III.1. Mise au point du dosage SPIT-FRI de la Substance P en microplaque

Le dosage SPIT-FRI (*Solid-Phase Immobilized Tripod for Fluorescent Renewable Immunoassay*) a été mis au point en plaque de microtitration sur le modèle de la Substance P (SP), choisi en raison de l'existence au laboratoire de plusieurs anticorps dirigés contre cette molécule et de dosages immunoenzymatiques pouvant tenir lieu de référence.

La méthode proposée fait intervenir deux molécules marquées : i) le tripode, comprenant un analogue de la molécule à doser, une fonction permettant sa liaison à la phase solide (biotine) et un fluorophore (D, fluorophore donneur) ; et ii) l'anticorps marqué avec un second fluorophore jouant le rôle d'accepteur (A). La première partie présente la stratégie employée pour la préparation du tripode et de l'anticorps marqué (méthode de couplage et de purification) et les résultats obtenus (rendements de marquage, étude de l'immunoréactivité des molécules marquées et évaluation du *quenching* en milieu homogène), en employant la Fluorescéine et la TMR comme couple de fluorophores.

Le SPIT-FRI impliquant une mesure de la fluorescence sur phase solide, qui s'est révélée difficile à mettre en œuvre avec le lecteur dont nous disposions initialement, nous avons comparé plusieurs appareils et optimisé les conditions de mesure afin d'augmenter le rapport signal/bruit.

Nous avons par la suite évalué l'influence de différentes conditions expérimentales (nature du tampon, température et durée des incubations, concentration en tripode) et de la méthode d'analyse des données sur le dosage (limites de détection et de quantification, gamme linéaire du dosage), puis le dosage a été validé sur des échantillons biologiques. Les résultats ont été comparés avec le dosage immunoenzymatique de référence (dosage EIA compétitif).

Le protocole étant sous cette forme relativement long à réaliser, nous avons évalué la possibilité d'effectuer le dosage dans un temps plus réduit. Nous avons également étudié l'influence du rapport A/D, de l'affinité, de la taille et de la valence de l'anticorps sur l'efficacité du *quenching* et les performances du dosage. Plusieurs couples (D, A) ont également été comparés.

III.1.1. Préparation des réactifs (tripode et anticorps marqué)

III.1.1.1. Mise au point du tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine

L'étape de déplacement par l'analyte (SP) étant consécutive à l'immobilisation de l'anticorps sur le tripode, les caractéristiques du dosage dépendront fortement du choix de l'anticorps et de l'analogue. Nous avons choisi d'utiliser l'anticorps monoclonal (AcM) SP31 (anticorps de référence) qui présente une très forte affinité pour la SP. La constante à l'équilibre K_D , déterminée au laboratoire par des tests d'inhibition avec un traceur radiomarqué et analyse de Scatchard, est de $7.10^{-11}M$ (Couraud *et al.*, 1987).

La possibilité d'employer directement la SP comme analogue a été rapidement écartée. En effet, nous avons montré qu'il n'y a aucun déplacement par l'analyte lorsque l'anticorps SP31 est déjà complexé avec le traceur SP-Fluorescéine, même pour des concentrations en SP élevées (100 nM). La constante de dissociation du complexe SP – AcM SP31 est si faible qu'elle n'a pu être mesurée avec l'appareil BiAcore. Cela nous a conduit à synthétiser un analogue du peptide présentant une affinité moindre pour l'anticorps SP31. À partir de la séquence de la Substance P (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-CONH₂), plusieurs modifications ont été réalisées.

Tout d'abord, du côté C-terminal, la Leu¹⁰ a été remplacée par Ala¹⁰ dans le but de faciliter le déplacement du complexe tripode-anticorps par la SP. Cette substitution concerne en effet la zone de reconnaissance de l'anticorps monoclonal SP31, qui reconnaît les 5 derniers acides aminés carboxyterminaux du peptide. Le peptide Ala¹⁰SP est toujours reconnu par l'anticorps, mais avec une réactivité croisée de 13% par rapport à la Substance P (cf Couraud *et al.*, 1987).

Par ailleurs, dans le but de limiter le marquage fluorescent à la partie N-terminale du peptide, la Lys³ a également été substituée par une Alanine, éliminant l'amine primaire présente sur la chaîne latérale. La Lys³ n'étant pas comprise dans le site de reconnaissance de l'anticorps SP31, cette substitution ne modifie pas l'affinité de l'anticorps pour l'analogue.

Enfin, à l'extrémité aminoterminal du peptide, nous avons ajouté une Lysine dérivée par une molécule de biotine sur la chaîne latérale, deux Sérines suivies d'une Lysine dont les deux fonctions amines sont susceptibles de réagir avec le fluorophore. Les Sérines ont été ajoutées pour éloigner le fluorophore du site de reconnaissance (le fluorophore sera fixé au niveau des amines de la Lysine N-terminale), mais aussi pour compenser le caractère hydrophobe de la biotine et du fluorophore, susceptible de diminuer fortement la solubilité du peptide.

Le peptide ainsi obtenu [Lys-Ser-Ser-Lys(Biotine)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Ala-Met-CONH₂ noté Ala¹⁰SP-biot] a été marqué avec l'ester actif de Fluorescéine, réagissant sur les fonctions amines primaires libres du peptide avec un rapport de couplage (R) de 10 moles de Fluorescéine par mole de peptide (voir mode opératoire au II.3.3.4.1, p.103).

Nous avons ensuite purifié le tripode résultant par une chromatographie en phase inverse afin d'éliminer le fluorophore en excès et, éventuellement, le peptide non marqué restant. Les conditions chromatographiques ont été mises au point sur une petite fraction de la solution de peptide Ala¹⁰SP-biot avant marquage, de la solution de peptide après marquage et d'une solution de Fluorescéine libre (conditions de l'HPLC p.103). Le profil d'élution du peptide avant marquage comporte un pic unique au temps de rétention $t_r=34,5$ min (absorbance à 214 nm seulement). En revanche, les profils d'élution de la Fluorescéine libre et du tripode présentent de nombreux pics très rapprochés. L'absence de pic à 214 nm à $t_r=34,5$ min sur le profil du tripode indique que tout le peptide a été marqué avec la Fluorescéine. La superposition des profils d'élution de la Fluorescéine et du tripode permet de mettre en évidence plusieurs pics présents uniquement sur le profil du tripode (pics à $t_r=40-41$ min et $t_r=44-45$ min) mais ne suffit pas pour l'identification univoque d'un seul pic (Figure 31, p.122).

En parallèle, nous avons analysé les fractions à l'aide d'un dosage immunoenzymatique (EIA) avec l'anticorps SP31 (voir test d'immunoréactivité au II.3.3.4.1, p.104). Les fractions diluées au 1/100^{ème} sont incubées dans des puits revêtus d'Ac SP31. Après lavage, la solution de traceur Streptavidine-Acétylcholinestérase (AChE) est incubée, faisant intervenir la liaison de la streptavidine sur la biotine présente sur le peptide. Les plaques sont ensuite révélées par ajout de solution de révélation (milieu d'Ellman) puis mesure de l'absorbance à 414 nm (voir description de la méthode d'Ellman p.90). Les puits présentant un signal d'absorbance à cette longueur d'onde correspondent aux fractions contenant le peptide biotinylé qui a été immobilisé sur la phase solide *via* l'anticorps SP31. Comme montré sur la Figure 32 (p.122), on observe deux pics d'immunoréactivité : pour les fractions 40-41 d'une part, et pour les fractions 44-45 d'autre part.

L'analyse Maldi-TOF indique que les fractions 40-41 contiennent une majorité de peptide monomarké, tandis que les fractions 44 et 45 contiennent une majorité de peptide dimarké à la Fluorescéine. Toutefois, toutes les fractions contiennent les deux formes, avec de nombreux pics autour des masses molaires 2378 et 2854 Da.

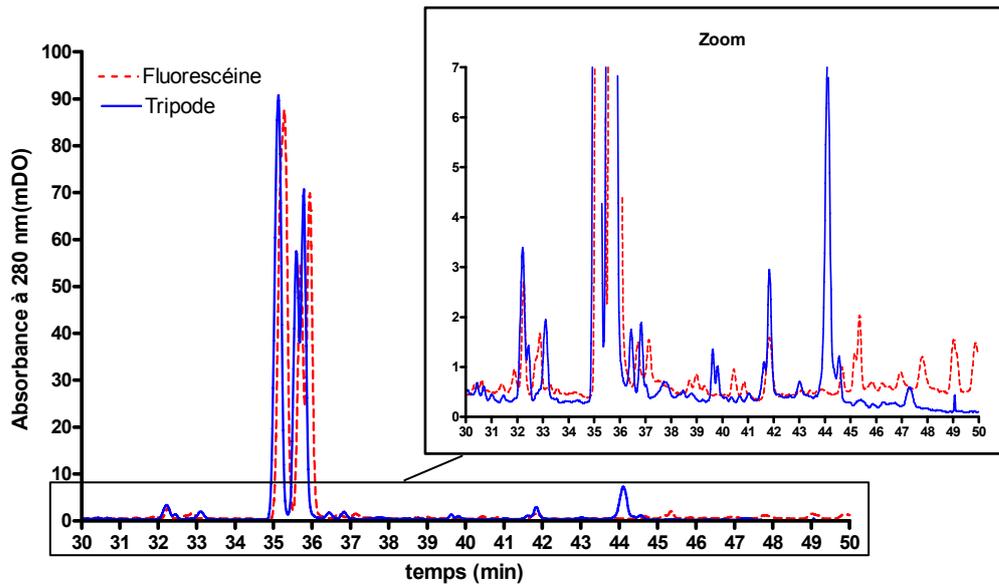


Figure 31 : Profils des éluions HPLC de la Fluorescéine libre et du tripod Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine

Absorbance à 280 nm pour les fractions 30 à 50. En insert : zoom (absorbances de faible intensité).

Conditions chromatographiques : Colonne analytique C18 Vydac 5 µm, tampon d'équilibration : H₂O/TFA 0,1 %, gradient de 0 à 50 % de tampon Acétonitrile/TFA 0,04 % en 50 min, débit : 1 mL.min⁻¹, volume d'injection : 50 µL.

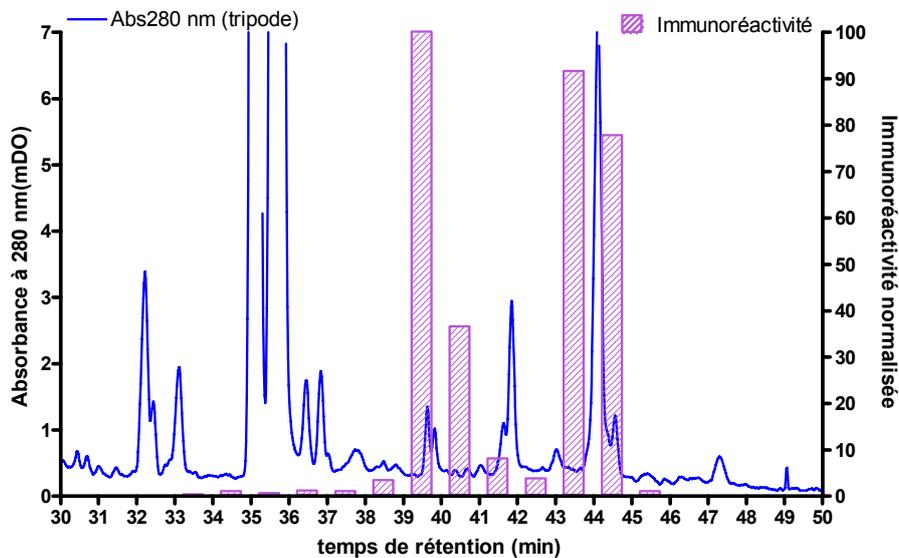


Figure 32 : Profils d'absorbance et d'immunoréactivité de la purification HPLC du tripod Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine

La courbe correspond à l'absorbance à 280 nm des fractions de l'éluion HPLC du tripod.

L'histogramme correspond à l'immunoréactivité des fractions mesurée par le test immunoenzymatique suivant.

Test d'immunoréactivité des fractions : Incubation de 100 µL de chaque fraction HPLC diluée au 1/100^{ème} en tampon EIA (18 h, 4°C) sur une plaque revêtue d'anticorps SP31. Mesure de l'absorbance à 414 nm après révélation par 200 µL de solution de Streptavidine-AChE à 2 UE/mL (2h, RT) puis 200 µL de milieu d'Ellman (15 min, RT). Sur le graphe, une valeur de 100 en immunoréactivité correspond à une absorbance à 414 nm de 936 mDO.

Nous avons ensuite purifié de la même façon la totalité du mélange réactionnel et rassemblé les fractions correspondantes au tripode fluorescent. Nous avons finalement choisi d'utiliser le pool 43-44 en raison de sa fluorescence plus élevée que le pool 40-41.

Les spectres d'absorbance et d'émission de fluorescence du tripode ainsi préparé présentent respectivement un maximum à 492 nm (λ_{EXCmax}) et 536 nm (λ_{EMmax}) soit un léger décalage par rapport à la fluorescéine libre (490 et 535nm).

III.1.1.2. Marquage de l'anticorps SP31 à la TMR

L'AcM SP31 (1 mg) a été marqué avec la TétraméthylRhodamine (TMR) suivant une chimie ester actif classique avec un rapport de couplage R de 50 moles de TMR par mole d'Ac (voir mode opératoire au II.3.3.2.2, p.99). Afin d'éliminer l'excès de TMR libre, la solution a été purifiée par chromatographie de tamisage moléculaire Sephadex (G25).

Le suivi de l'élution, réalisé par mesure de l'absorbance des fractions à 280 nm et 555 nm (caractéristiques respectivement de l'Ac et de la TMR) est présenté sur la Figure 33-A (p.124). Les fractions présentant une absorbance à 280 et/ou à 555 nm ont été réunies en trois pools. Le premier pool, contenant les molécules de poids moléculaire le plus élevé et présentant une forte absorbance à 280 nm et deux pics à 519 nm et 558 nm, correspond à l'anticorps marqué. Le second pool présente un pic d'absorbance à 260nm qui correspond probablement au groupement N-Hydroxysuccinimide (NHS) libéré qui absorbe fortement à cette longueur d'onde. Le dernier pool correspond à la TMR libre qui présente un maximum d'absorbance à 555 nm. L'élution de la TMR s'effectue au-delà du volume total de la colonne (déterminée grâce au Ferricyanure et correspondant d'ailleurs à l'élution de la NHS) et présente un aspect très étalé, démontrant la présence d'interactions de la TMR avec la phase stationnaire, dont la nature reste à éclaircir.

La concentration en Ac-TMR est calculée à partir de la valeur d'absorbance à 280 nm en soustrayant l'absorbance de la TMR à cette longueur d'onde, puis le ratio TMR/Ac (Rf)¹⁶ est déterminé en calculant le ratio de la concentration théorique en TMR sur celle de l'anticorps selon la méthode indiquée par Molecular Probes (voir méthode de calcul au II.3.3.2.3, p.99). Le ratio Rf ainsi obtenu est de 3,6 moles de TMR par mole d'anticorps.

¹⁶ Nous distinguons le rapport de couplage R, correspondant au nombre de moles de marqueur ajouté en début de réaction par mole de protéine et le ratio d'incorporation Rf, correspondant au nombre de moles de marqueur effectivement incorporé par mole de protéine.

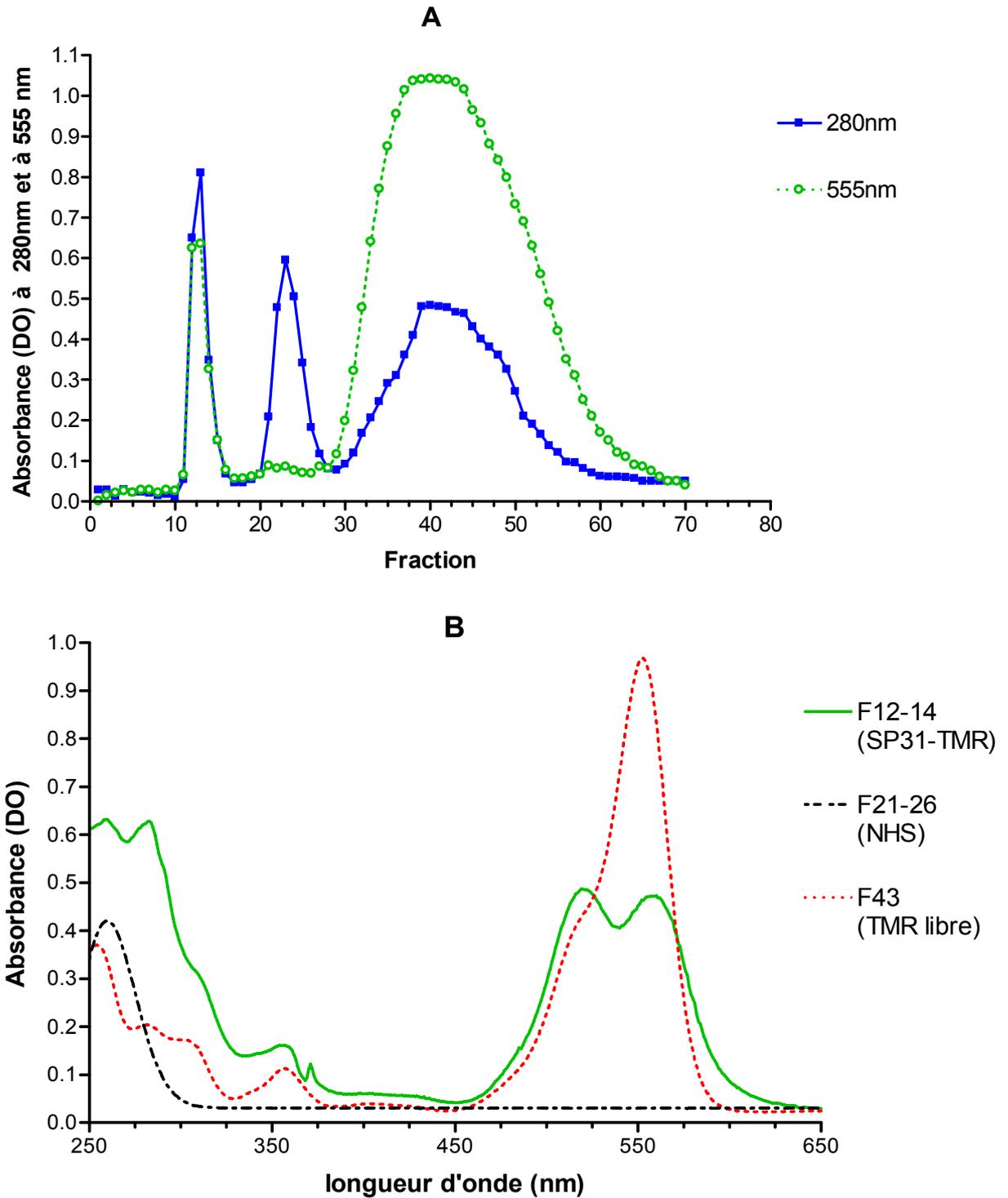


Figure 33 : Profil d'élution par chromatographie de tamisage moléculaire G25 de AcM SP31 après marquage à la TMR et spectres d'absorbance des pools obtenus

A : profil d'élution des fractions (absorbance à 280 nm et 555 nm)

B : spectres d'absorbance des fractions 12 à 14, fractions 21 à 26 et de la fraction 43 (en tampon Phosphate d'élution)

Rapport de couplage TMR/AcM SP31 R=50.

Conditions chromatographiques : Colonne Sephadex G25 medium (50 mL); tampon d'élution : tampon Phosphate 0,1 M pH 7,4 NaN₃ 0,01% ; 1 mL/fraction.

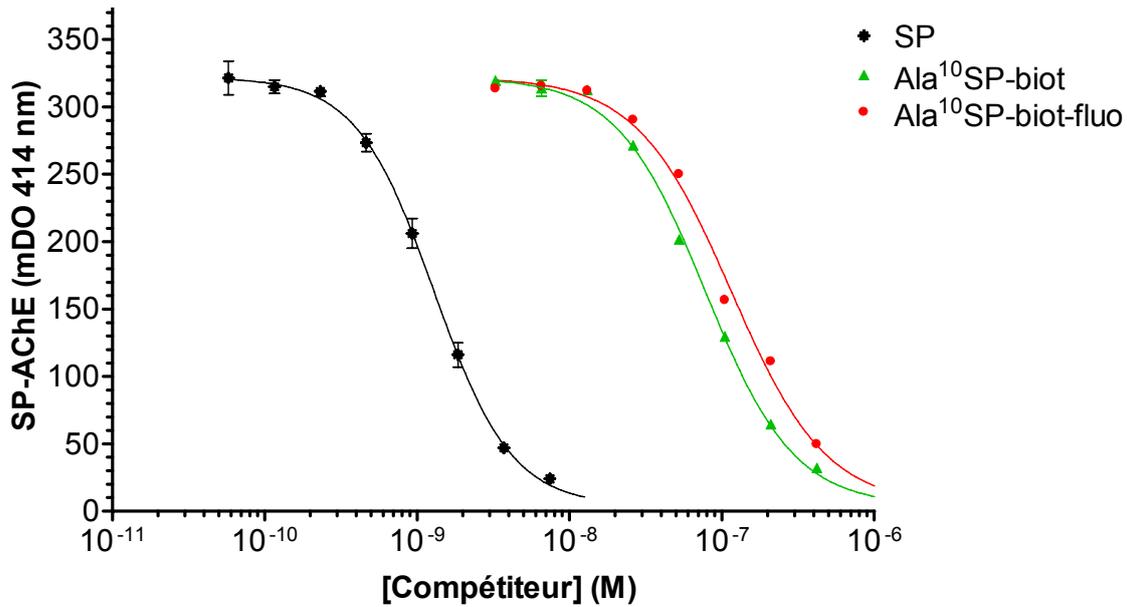
La Figure 33-B (p.124) présente les spectres d'absorbance de la TMR libre et l'anticorps-TMR, qui diffèrent notamment en ce qui concerne la hauteur relative des pics à 518 nm et 555 nm. Ce phénomène, rapporté par Lakowicz et utilisé comme méthode d'analyse spectroscopique (Geoghegan *et al.*, 2000 ; Hamman *et al.*, 1996), est dû à la présence de dimères de TMR formés entre deux molécules de TMR suffisamment proches sur l'anticorps. Le coefficient d'extinction molaire à 555 nm est donc différent pour la TMR libre ou sous forme de dimère. De ce fait, la méthode d'estimation du ratio par absorbance, bien que généralement employée du fait de sa simplicité, présente une certaine imprécision. Toutefois, il nous a paru difficile d'évaluer le coefficient d'extinction molaire de la TMR dimère et le rapport de TMR dimère / TMR monomère sur l'anticorps. Nous nous sommes donc contentés de ce calcul pour le rapport d'incorporation ; par conséquent, il est possible que le rapport d'incorporation soit légèrement sous-estimé. Par ailleurs, nous avons vérifié la concentration en anticorps obtenue par la méthode d'absorbance par un dosage protéique¹⁷.

III.1.1.3. Evaluation des propriétés d'immunoréactivité des réactifs

La conservation des propriétés de reconnaissance immunologique de l'analogue et de l'anticorps après marquage a été évaluée grâce à des dosages immunoenzymatiques.

L'immunoréactivité du tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine vis-à-vis de l'anticorps SP31 a été déterminée par dosage par compétition avec le traceur SP-AChE, par comparaison à la SP et à l'analogue biotinylé Ala¹⁰SP-biot non fluorescent. Les gammes obtenues sont présentées sur la Figure 34 (p.126). L'EC₅₀ (concentration générant 50 % d'inhibition du signal) est 60 fois plus élevé et le facteur de pente légèrement plus faible (1,5 au lieu de 1,7) pour Ala¹⁰SP-biot que pour la SP, illustrant la forte perte d'immunoréactivité suite à la substitution de la Leu¹⁰ de la SP par l'Alanine. En revanche, la différence entre le peptide Ala¹⁰SP-biot avec ou sans Fluorescéine est faible (EC₅₀ à peine 1,5 fois plus élevé pour le peptide Fluorescéine), illustrant la faible incidence du marquage fluorescent sur la reconnaissance par l'anticorps. L'ajout de 4 acides aminés (Lys-Ser-Ser-Lys) du côté aminoterminal du tripode et l'utilisation d'une Fluorescéine comprenant un bras espaceur (5 carbones) ont probablement permis un éloignement suffisant de la zone de fixation de la Fluorescéine et de la région épitopique pour que la présence du fluorophore n'affecte pas l'immunoréactivité du peptide.

¹⁷ La détermination de la concentration par le dosage protéique pouvant également être biaisée par l'absorbance résiduelle de la TMR à 560 nm (longueur d'onde de lecture pour le dosage des protéines), nous avons soustrait au signal celui d'un témoin de TMR libre présentant la même absorbance à 560 nm que l'anticorps marqué.



Compétiteur	EC50 (nM)	EC20 (nM)	EC80 (nM)	Facteur de pente
SP	1,29	0,57	2,92	-1,7
Ala ¹⁰ SP-biot	78	31	197	-1,5
Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine	115	43	310	-1,4

Figure 34 : Courbes de compétition pour SP, Ala¹⁰SP-biot et Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine avec l'anticorps SP31 et le traceur SP-AChE

Protocole : dosage EIA compétitif (cf p.92) effectué avec 50 µL de compétiteur SP, Ala¹⁰SP-biot ou Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine (gamme), 50 µL de l'AcM SP31 à 30 ng/mL et 50 µL de traceur SP-AChE à 2 UE/mL sur une plaque revêtue d'anticorps CAS (18 h, 4°C). Mesure de l'absorbance à 414 nm après révélation durant 1 h. (n=2 réplicats)

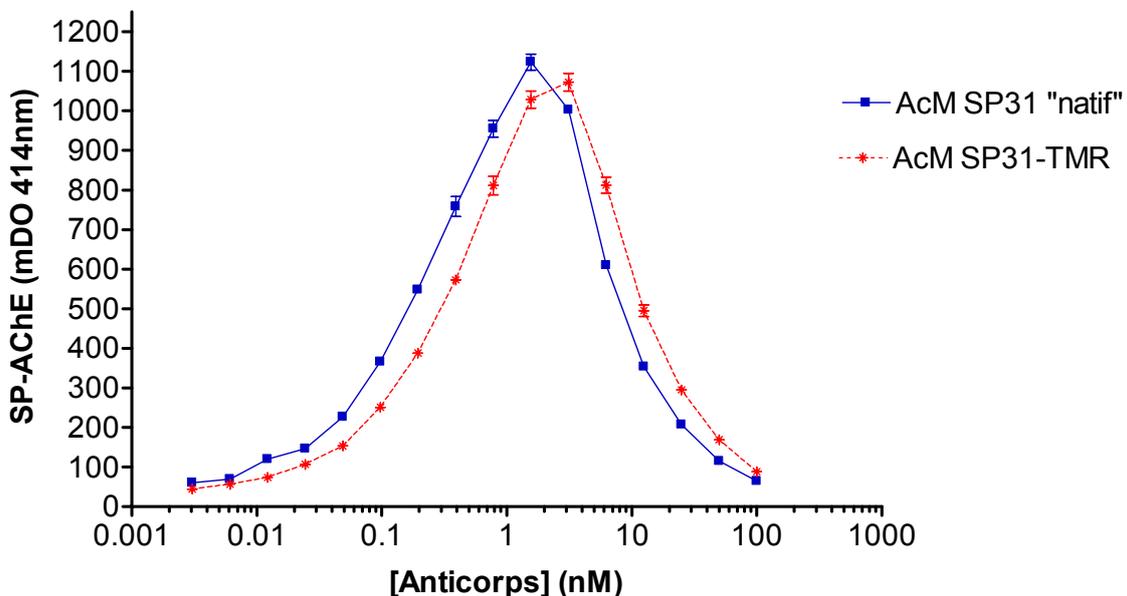


Figure 35 : Liaison de l'anticorps SP31 marqué ou non à la TMR avec la SP-AChE

Protocole : test de dilution d'anticorps (cf p.92) effectué avec 50 µL d'AcM SP31-TMR non marqué (gamme), 50 µL de traceur SP-AChE (2 UE/mL) et 50 µL de tampon sur une plaque revêtue d'anticorps CAS (18 h, 4°C). Mesure de l'absorbance à 414 nm après révélation durant 1 h. (n=2 réplicats)

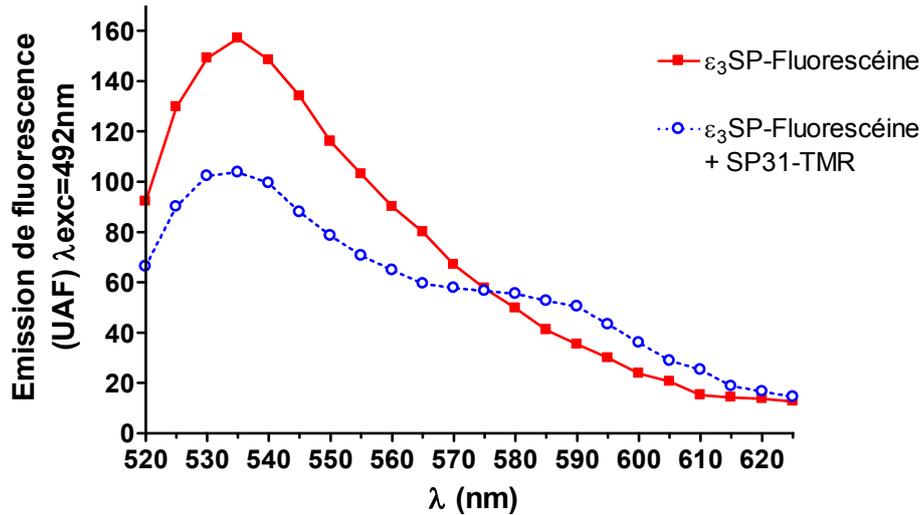
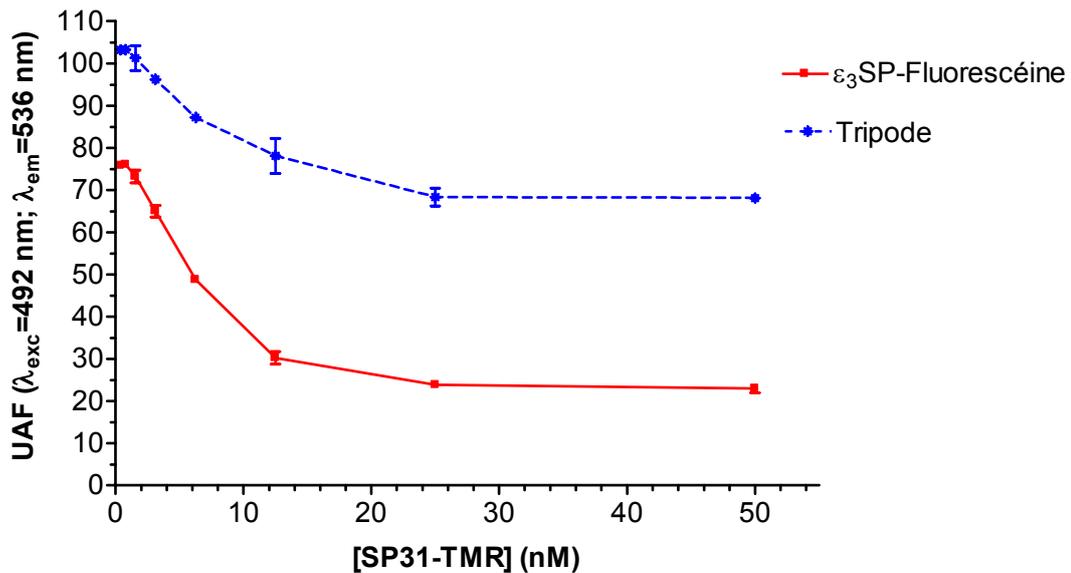


Figure 36 : Spectre d'émission de fluorescence de ϵ_3 SP-Fluorescéine avec et sans SP31-TMR en solution

Protocole : Incubation de 50 μ L de solution de peptide ϵ_3 SP-Fluorescéine à 25 nM avec 50 μ L de tampon ou d'AcM SP31-TMR à 12,5 nM en tampon Phosphate (2 h, RT) sur une plaque en polystyrène noir non traitée (Nunc) lavée¹⁸. Acquisition des spectres avec le lecteur Spectramax Gemini XS avec $\lambda_{\text{EXC}} = 492\text{nm}$, *cut off* à 515 nm, 2 mesures/puits. (UAF : Unité Arbitraire de Fluorescence)



Peptide	%quenching maximal	CQ50 (nM)
Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine	37	7,5
ϵ_3 SP-FLuorescéine	72	6

Figure 37 : **Quenching** de Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine et de ϵ_3 SP-Fluorescéine par SP31-TMR en solution

Protocole : Incubation de 50 μ L de Ala¹⁰SPbiot-Fluorescéine ou ϵ_3 SP-Fluorescéine (purifié) à 12,5 nM avec 50 μ L d'AcM SP31-TMR (gamme) en tampon Phosphate (2 h, RT) sur une plaque non traitée (Nunc) lavée. (n=3). Mesure avec le lecteur Spectramax ($\lambda_{\text{EXC}} = 492\text{nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 536\text{nm}$, *cut off* à 515 nm, 5 mesures/puits). CQ₅₀ : concentration d'Ac fournissant 50% du *quenching* maximal.

¹⁸ Le lavage de la plaque non traitée avant le dépôt permet d'éviter l'adsorption non-spécifique des molécules (protéines, peptides) sur le polystyrène (voir au III.4.1.1, p.253).

Pour évaluer l'influence de la présence de TMR sur l'anticorps sur les capacités de reconnaissance de celui-ci, nous avons réalisé un test de dilution d'Ac en présence de SP-AChE. L'anticorps marqué ou non à la TMR a été incubé à différentes concentrations avec le traceur sur une plaque revêtue d'anticorps de capture CAS (Ac de polyclonal Chèvre Anti immunoglobulines de Souris). Les courbes (Figure 35, p.126) présentent un aspect caractéristique en cloche. Le signal maximal observé correspond à la capacité maximale de liaison des anticorps de capture adsorbés sur la phase solide. Pour des concentrations plus fortes d'anticorps, une partie du traceur SP-AChE se lie à l'Ac sans pouvoir être capturé par la phase solide. Les complexes traceur-anticorps ainsi formés seront donc éliminés lors du lavage, ce qui explique ce phénomène appelé « effet crochet ».

Nous observons un léger décalage de la courbe de l'anticorps marqué par rapport à l'anticorps natif, une même concentration en anticorps donnant lieu à un signal légèrement plus faible pour l'anticorps marqué. Cette différence pourrait traduire une légère diminution de la capacité de liaison de l'anticorps marqué avec l'anticorps de capture reliée à la présence de fluorophores sur la partie constante Fc des anticorps. En revanche, le signal maximal est du même ordre de grandeur pour l'anticorps marqué et l'anticorps natif, démontrant la conservation des capacités de reconnaissance de l'anticorps marqué envers la SP-AChE.

III.1.1.4. Evaluation du quenching en conditions homogènes

L'incubation du peptide ϵ_3 SP-Fluorescéine avec l'AcM SP31-TMR induit une diminution de la fluorescence ou *quenching* à $\lambda_{EM}=536\text{nm}$ (longueur d'onde d'émission maximale de la Fluorescéine) par rapport au spectre du peptide seul (Figure 36, p.127), corrélée à une légère augmentation de la fluorescence à $\lambda_{EM}=590\text{nm}$ (longueur d'onde d'émission maximale de la TMR) par rapport à une même solution de SP31-TMR sans peptide Fluorescéine excitée à 492 nm.

À l'opposé, l'ajout de TMR libre ou liée à un anticorps non spécifique n'entraîne aucune modification de fluorescence de la SP-Fluorescéine, démontrant que la modification de fluorescence observée précédemment est bien liée à un phénomène dépendant de la distance.

L'ajout de SP31-TMR en excès par rapport au peptide ϵ_3 SP-Fluorescéine fournit un *quenching* de 75 % (Figure 37, p.127), tandis que le *quenching* n'atteint que 34 % au plateau avec le tripode. Cette différence peut s'expliquer d'une part en raison d'un rapport molaire Fluorescéine/peptide 1,5 fois plus élevé pour le tripode que pour ϵ_3 SP ayant pour conséquence

Tableau 9 : Comparaison des lecteurs Spectramax et Analyst pour la mesure de la fluorescence sur phase solide

Protocole : Incubation de 100 μ L de tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine à 500 nM (18 h, 4°C) sur une plaque revêtue de neutravidine (Nunc). Mesure de la fluorescence après lavage et ajout de 100 μ L/puits de tampon Phosphate 0,1 M pH 7,4 (n=8 réplicats) avec le lecteur Spectramax ($\lambda_{\text{EXC}}=492$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=535$ nm, *cut off* à 515 nm, 5 mesures/puits) ou Analyst [$\lambda_{\text{EXC}}=485$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=530$ nm, dichroïque 505 nm, lampe continue (intégration : 0,1 s), h=5,59 mm (milieu du puits)].

Notations : S/N : Rapport signal/blanc ; S/N et Z' indicateurs de variabilité définis selon les équations [7] et [8] (p.130)

Lecteur	Spectramax	Analyst
Signal au plateau (UAF)	3	$5,7 \cdot 10^7$
Ecart-type (UAF)	0,2	$1,66 \cdot 10^6$
S/B (signal/blanc)	4	137
S/N (signal/bruit)	9,9	34,2
Z'	0,59	0,91

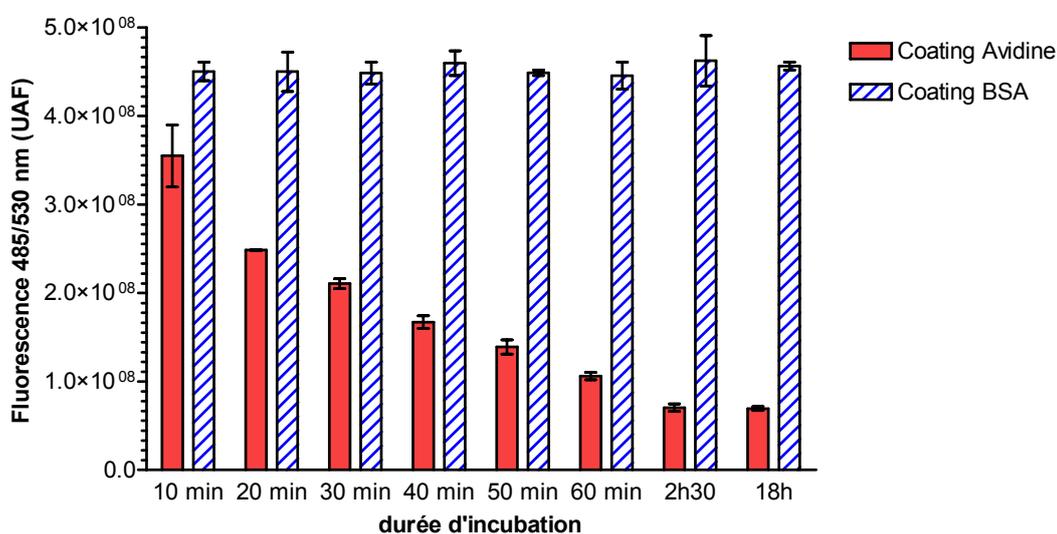


Figure 38 : Suivi de la fluorescence au cours de la fixation du tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine sur la neutravidine

Protocole : A t=0 : dépôt de 100 μ L/puits de solution de tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine (à 12,5 nM en tampon EIA) sur plaque revêtue de neutravidine ou de BSA (Matrix HighBind).

Mesure de la fluorescence toutes les 10 min pendant 1 h, puis à t=2h30 et t=18 h (incubation à RT sans agitation) avec le lecteur Analyst (h=5,59 mm) à 485/530 nm (n=8).

directe une diminution du rapport A/D, et d'autre part en raison d'une plus faible affinité de l'Ac pour le tripode (cf Figure 34, p.126).

III.1.2. Mesure de fluorescence sur phase solide

III.1.2.1. Comparaison de plusieurs lecteurs

Les premiers tests ont été réalisés avec le lecteur Spectramax Gemini XS (Molecular Devices) dont nous disposons au laboratoire. Même avec des concentrations élevées de tripode, des signaux très faibles sont obtenus sur phase solide. Nous avons utilisé deux indicateurs pour évaluer la variabilité de ces mesures : 1) le rapport signal/bruit (ou S/N pour *signal/noise*), et 2) le facteur Z' , calculés selon les formules suivantes :

$$[13] \quad S/N = \frac{\mu_+ - \mu_-}{\sqrt{\sigma_+^2 + \sigma_-^2}}$$

$$[14] \quad Z' = 1 - \frac{3 \times (\sigma_+ + \sigma_-)}{\mu_+ - \mu_-}$$

avec μ_+ : moyenne du contrôle positif, μ_- : moyenne du contrôle négatif et σ_+ : écart-type du contrôle positif et σ_- : écart-type du contrôle négatif (en UAF).¹⁹

Pour une concentration en tripode de 500 nM, permettant de saturer complètement la phase solide en tripode, le rapport S/N est de 9,9 et Z' à peine supérieur à 0,5 (Tableau 9, p.129). L'emploi d'un autre lecteur de plaque (fluorimètre Analyst)²⁰ nous a permis d'obtenir des valeurs de fluorescence et un rapport S/N plus élevés. Nous avons donc employé cet appareil, ainsi qu'un autre fluorimètre (Envision) dont le laboratoire a fait l'acquisition par la suite.

Outre la limitation due à la saturation de la phase solide revêtue de neutravidine, la fluorescence est plus faible sur phase solide qu'en phase liquide (voir Figure 39, p.131), et ce pour les trois lecteurs utilisés. La mesure de la fluorescence du tripode au cours de son accrochage sur la neutravidine révèle bien une diminution progressive du signal par comparaison à une solution déposée sur un puits sans neutravidine (Figure 38, p.129). Après 2h30 d'incubation, la fluorescence a diminué de 85 %.²¹

¹⁹ On considère que Z' est de bonne qualité lorsqu'il est supérieur à 0,9 (correspondant à un ratio S/N de 40), suffisant entre 0,7 et 0,9, passable entre 0,5 et 0,7 et insuffisant lorsqu'il est inférieur à 0,5 (ce qui équivaut à un rapport S/N de 8). Le facteur Z' est utilisé de préférence au ratio S/N dans les cas où la variabilité est élevée (plus grande discrimination) ; à l'inverse lorsque le bruit est faible, on utilise plutôt le rapport S/N (Zhang, 1999).

²⁰ Le lecteur Analyst nous a été prêté par le Département d'Ingénierie des Protéines (CEA/DSV/DIEP).

²¹ Nous reviendrons sur le phénomène de diminution de la fluorescence lors de la fixation des fluorophores dans la partie 4 (p.251).

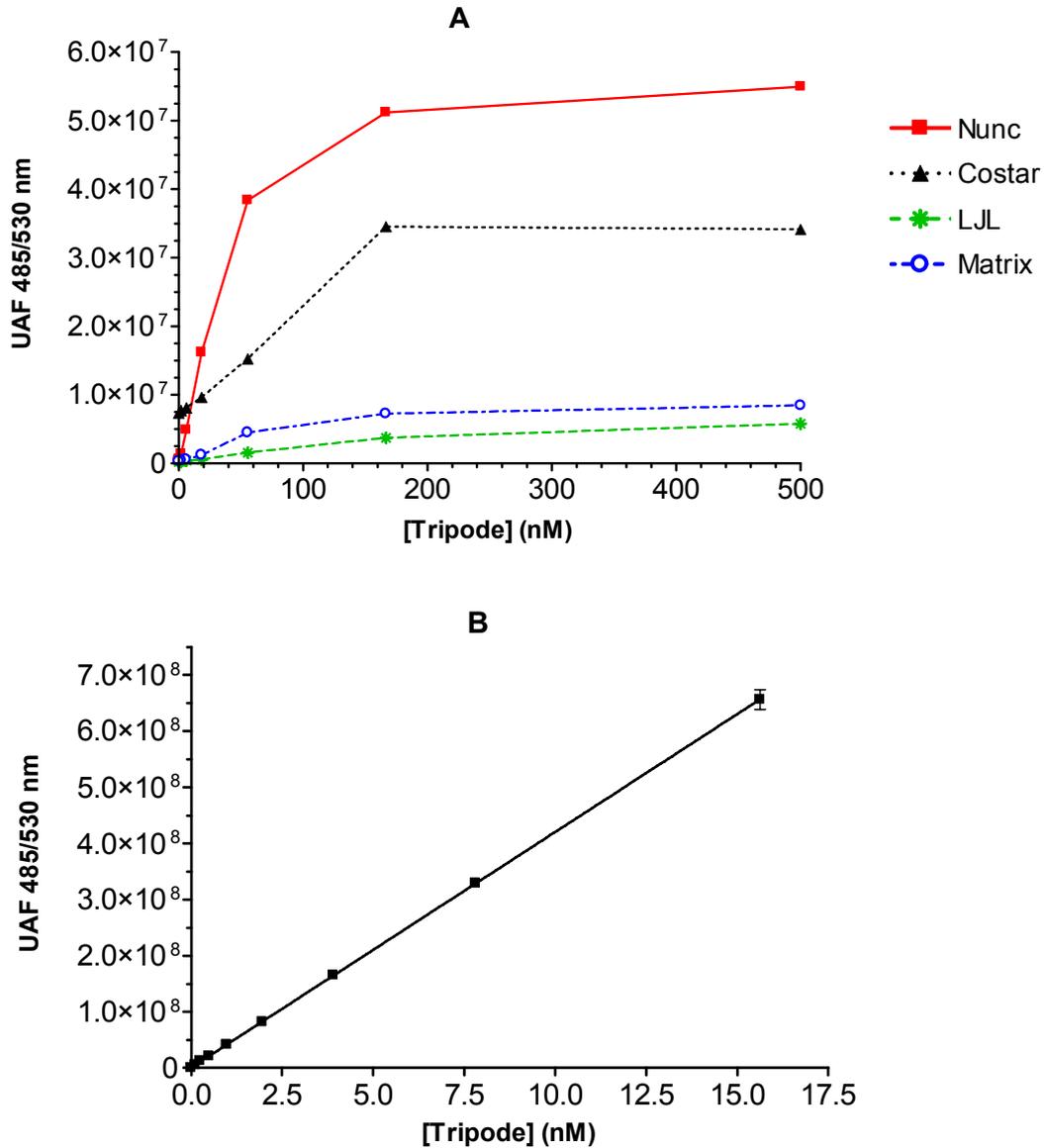


Figure 39: Comparaison de la mesure de la fluorescence du tripode sur phase solide pour différentes plaques et en phase liquide (lecteur Analyst)

A : Comparaison de différentes phases solides ; B : mesure en milieu homogène.

Protocole :

(A) Incubation de 100 μ L de tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine (18 h, 4°C) sur une plaque revêtue de neutravidine (Nunc, Costar, Matrix ou LJI). Mesure de la fluorescence après lavage et ajout de 100 μ L/puits de tampon Phosphate avec le lecteur Analyst à 485/535 nm.

(B) Mesure de la fluorescence de 100 μ L de tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine sur une plaque non traitée (Nunc) lavée (mêmes conditions de mesure que pour A). (Remarque : il y a saturation du détecteur pour les concentrations en tripode supérieures à 30 nM).

Les lecteurs Analyst et Envision permettent un réglage de la hauteur de focalisation pour la mesure dans les puits. La fluorescence est légèrement plus élevée lorsque la focalisation est proche du fond du puits, l'optimum se situant à une hauteur $h=2$ mm (lecteur Envision) ou $h=1$ mm (lecteur Analyst) permettant une augmentation de 5 à 10 % du signal. Toutefois, la valeur reste toutefois très inférieure à la fluorescence en phase liquide.

III.1.2.2. Comparaison de plusieurs plaques de microtitration

Nous avons comparé des plaques de microtitration à forte adsorption de différentes marques pour vérifier si la capacité de fixation de neutravidine (donc de tripode) pouvait être augmentée. Avec les plaques Nunc, le signal est plus élevé que pour les plaques Costar, Matrix et LJI (Figure 39-A, p.131). Cela est probablement dû à une meilleure capacité d'adsorption du polystyrène des plaques Nunc que nous emploierons préférentiellement.

III.1.2.3. Tampon de lecture

Le signal diminue lorsque le volume de tampon augmente, le signal étant quasiment deux fois plus élevé sans tampon par rapport à une lecture avec 200 μ L de tampon (Figure 40, p.133). Cependant, le profil de précision montre une augmentation des CV pour les mesures à sec (environ 8 % pour les mesures réalisées avec du tampon de lecture, presque le double pour la lecture « à sec »).²²

La mesure de fluorescence sur phase solide a finalement été réalisée en présence de 100 μ L de tampon de lecture (soit le même volume que le volume réactionnel). L'utilisation du tampon EIA induit une augmentation des signaux et des CV par rapport au tampon Phosphate (expérience réalisée à pH 7,4). Cette augmentation est probablement due à la fluorescence intrinsèque de la séralbumine bovine dans ces conditions de mesure (485/535 nm). De plus, l'utilisation d'un tampon filtré diminue le nombre de puits « aberrants » par plaque, dus probablement à la présence de particules dans le tampon. Par ailleurs, la fluorescence du tripode-Fluorescéine augmente fortement avec le pH (Figure 41-A, p.133).

Au regard de ces résultats, nous avons finalement choisi d'utiliser les plaques de microtitration en polystyrène noir Nunc, et du tampon PVP ou Phosphate à pH 8,5 filtré comme tampon de lecture à raison de 100 μ L/puits.

²² Petrou *et al.* (2002) et Mastichiadis *et al.* (2003) proposent de mesurer le signal de la fluorescéine à sec après un traitement des puits au glycérol puis chauffage ; dans nos conditions ce protocole n'a pas permis d'amélioration du rapport signal/bruit.

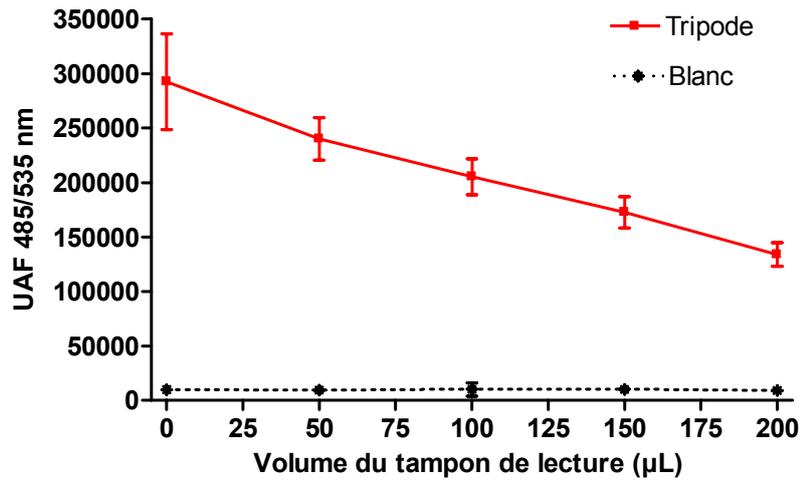


Figure 40 : Signal sur phase solide (Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine) en fonction du volume de tampon de lecture

Protocole : Incubation de 100 µL de solution de tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine à 25 nM en EIA (18 h, 4°C) sur plaque revêtue de neutravidine (Nunc). Mesure de la fluorescence après lavage et dépôt de 0, 50, 100, 150 ou 200 µL/puits de tampon Phosphate 0,1M pH 8,5 avec le lecteur Envision à 485/535 nm (conditions standard), n=8 réplicats

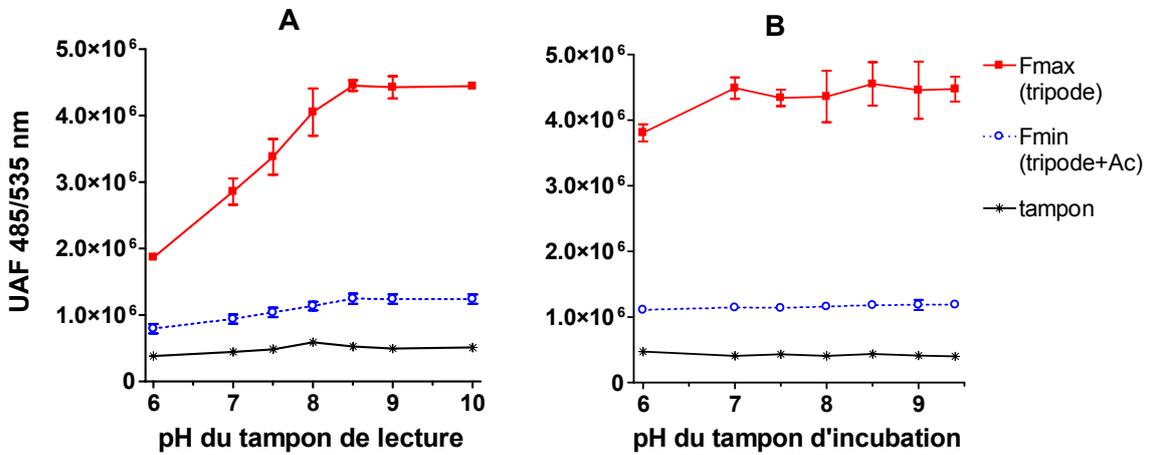


Figure 41 : Influence du pH du tampon d'incubation et de lecture sur le signal (tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine, anticorps AcM SP31-TMR).

A : influence du pH du tampon de lecture (pH du tampon d'incubation fixé à 7,4)

B : influence du pH du tampon d'incubation (pH du tampon de lecture fixé à 8,5)

Protocole : Incubations successives (100 µL, 18 h, 4°C) de tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine à 25 nM et de l'AcM SP31-TMR à 100 nM (Fmin) ou de tampon (Fmin) sur plaque revêtue de neutravidine (Matrix HighBind). Mesure de la fluorescence après lavage avec 100 µL de tampon (tampon Phosphate 0,1 M à différents pH) avec le lecteur Analyst (h=1 mm). (n=4 réplicats)

III.1.3. Mise au point du dosage

III.1.3.1. Description de la méthode

Le dosage proposé comprend 4 étapes : l'immobilisation du tripode sur phase solide, le *quenching* par l'anticorps, le déplacement par l'analyte, et l'étape de régénération (ajout d'anticorps).

Une gamme de tripode Ala¹⁰SP-Fluorescéine sur plaque revêtue de neutravidine fournit un signal fluorescent croissant en fonction de la concentration puis atteint un plateau (Figure 39, p.131) reflétant la saturation des sites de neutravidine par le tripode fluorescent. Nous avons choisi pour la mise au point du dosage de nous placer à 25 nM, cette concentration permettant d'obtenir un signal suffisant tout en étant limitante (phase solide non saturée).

La fixation de l'AcM SP31-TMR sur le tripode induit une diminution du signal proportionnelle à la concentration d'anticorps. La Figure 42-A (p.135) présente une courbe standard de *quenching*, les signaux étant exprimés en pourcentage de diminution par rapport au signal Fmax correspondant au tripode seul (calcul du pourcentage de *quenching* ou % Q). Un plateau de *quenching* (70 %) ²³ est atteint à partir d'une concentration en Ac de 100 nM, reflétant probablement la saturation des sites de tripode par l'Ac-TMR. Notons que les plaques peuvent être conservées plusieurs semaines après l'étape de *quenching* en glycérol ²⁴.

Dans une troisième étape, la Substance P est ajoutée pour déplacer les complexes tripodes-anticorps formés. La fluorescence augmente proportionnellement à la concentration en analyte (inhibition du *quenching*). La Figure 42-B (p.135) présente une courbe d'étalonnage standard (obtenue dans des conditions non optimisées).

²³ Avec les mêmes réactifs, le *quenching* est deux fois plus élevé qu'en format homogène qui engendrait seulement 34% de *quenching* (cf

Figure 37, p.127). Il se peut, que malgré la purification du tripode par HPLC, une quantité non négligeable de fluorescéine demeure libre dans la solution, limitant le *quenching* en solution, tandis que le fluorophore serait éliminé par le lavage sur phase solide. Il est également possible que la liaison du peptide à la phase solide améliore le transfert d'énergie (modification de l'orientation des dipôles de D et A).

²⁴ Le glycérol est fréquemment employé dans la fabrication des kits de dosages commercialisés afin de conserver les plaques sans contenu liquide dans les puits pour en faciliter le stockage et l'expédition. Le procédé de stockage en glycérol a permis la réutilisation de la plaque 5 fois, après une semaine d'intervalle entre chaque essai, sans incidence sur le dosage.

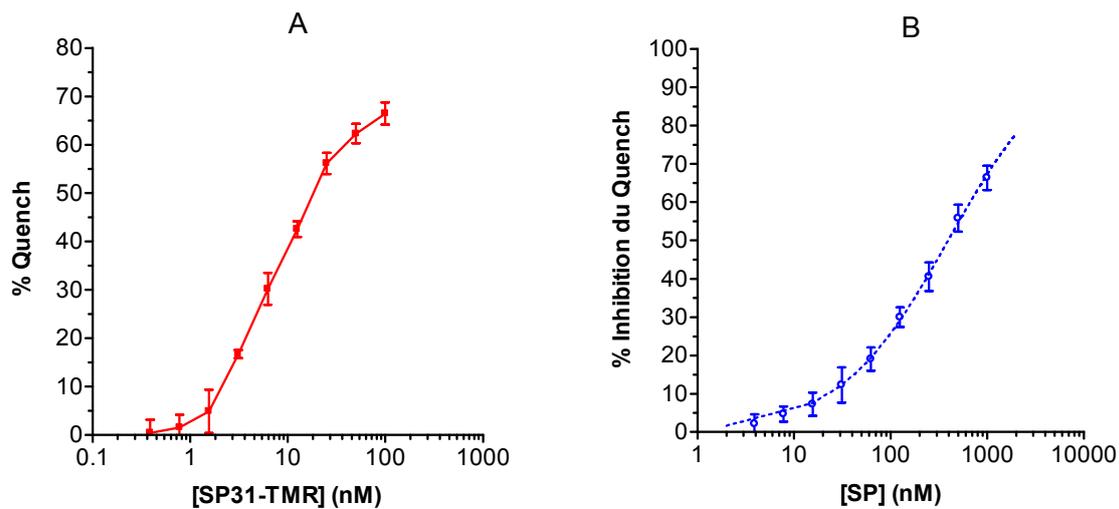


Figure 42 : Test de dilution d'AcM SP31-TMR (*quenching* du tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine) et courbe d'étalonnage pour la SP (*inhibition du quenching*)

A : test de dilution d'anticorps

B : courbe d'étalonnage pour la SP

Protocole : A : test de dilution standard avec tripode : Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine à 25 nM, anticorps : AcM SP31-TMR à concentration variable ; B : test de déplacement standard avec tripode : Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine à 25 nM, anticorps : concentration fixée à 100 nM, standard : SP. Tampon d'incubation : tampon EIA ; tampon de lecture : tampon EIA (100 µL/puits) ; plaque Matrix High Bind, n=4 réplicats.

Mesure de la fluorescence après lavage avec le lecteur Analyst [$\lambda_{\text{EXC}}=485$ nm, $\lambda_{\text{EM}}=530$ nm, dichroïque à 505 nm, lampe continue (intégration : 0,1 s), h=1 mm].

Les signaux sont exprimés en pourcentage en attribuant la valeur 100 au signal F_{max} correspondant au tripode seul, et la valeur 0 au signal F_{min} correspondant au tripode avec l'anticorps (calcul du pourcentage d'inhibition du *quenching* ou % IQ). La zone linéaire de la courbe (correspondant au domaine dynamique du dosage) se situe entre 65 nM et 2,4 μ M, l' EC_{50} se situant à 380 nM (concentration permettant une inhibition de 50 % du *quenching*) et la limite de détection à 28 nM (résultats obtenus sans optimisation sur plaque Matrix).

Le dosage a été répété 10 fois de suite sur une même surface solide en réalisant une nouvelle incubation de l'anticorps (mesures effectuées avec le lecteur Analyst). Nous observons une diminution significative du signal de fluorescence au cours des mesures (Figure 43-A, p.137) reflétant probablement le photoblanchiment des molécules fluorescentes. Les données exprimées en % IQ (attribution de la valeur 100 au signal F_{max} et de la valeur 0 au signal F_{min}) mettent en évidence que la proportionnalité entre les signaux obtenus pour les différentes concentrations en SP est conservée (Figure 43-B, p.137). Toutefois, ce phénomène de diminution progressive du signal n'en demeure pas moins limitant concernant le nombre de régénérations potentielles de la phase solide. L'utilisation du lecteur Envision qui fonctionne avec une lampe flash au lieu d'une lampe continue pour le lecteur Analyst, permet d'éviter toute diminution du signal (stabilité observée jusqu'à 1000 lectures du même puits).

Ces résultats illustrent donc la faisabilité de cette méthode montrant l'efficacité du FRET sur phase solide (quasiment 70 % de *quenching*), la possibilité de déplacer l'anticorps par ajout de SP et la possibilité de réaliser des dosages successifs sur la même surface. Nous avons alors comparé différentes conditions d'incubation et concentrations en tripode en vue d'améliorer la sensibilité du dosage.

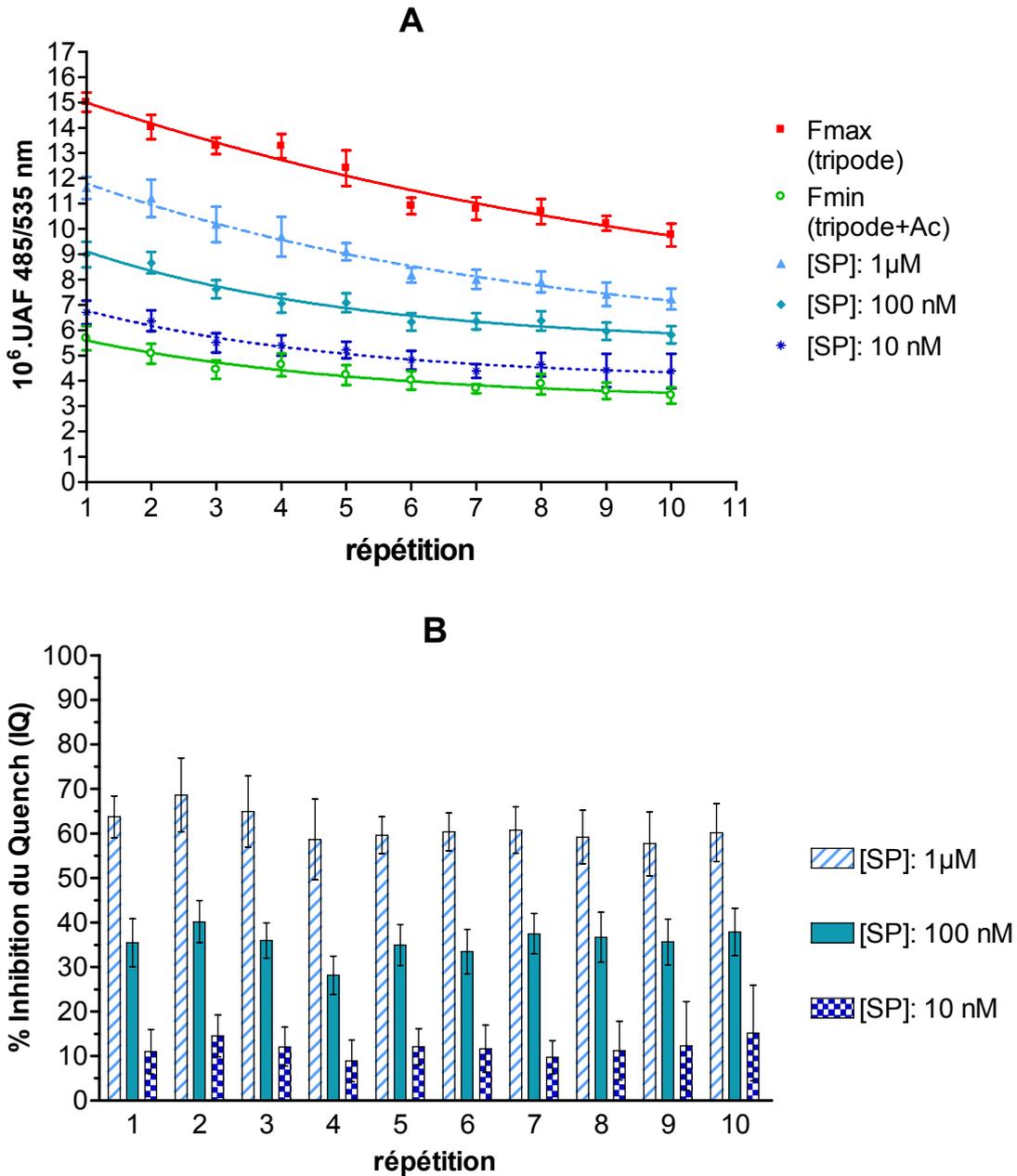


Figure 43 : Experiences de régénération (Quench/Déplacement successifs sur une même surface)

A : Données brutes (UAF)

B : données normalisées (%IQ)

Protocole SPIT-FRI standard réalisé sur plaque Matrix HighBind revêtue de neutravidine, tampon d'incubation : tampon EIA, tampon de lecture : tampon EIA, n=8 réplicats

Incubations successives (100 μL /puits) : ① du tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine (à 25 nM, 18 h, 4°C) → ② de l'AcM SP31-TMR (à 100 nM, 18 h, 4°C). → ③ du standard SP (à 1 μM , 100 nM, 10 nM durant 5 h à RT sous agitation) → ④ Mesure de la fluorescence après lavage avec le lecteur Analyst (h=1 mm).

Les étapes 2 à 4 sont répétées 10 fois successivement.

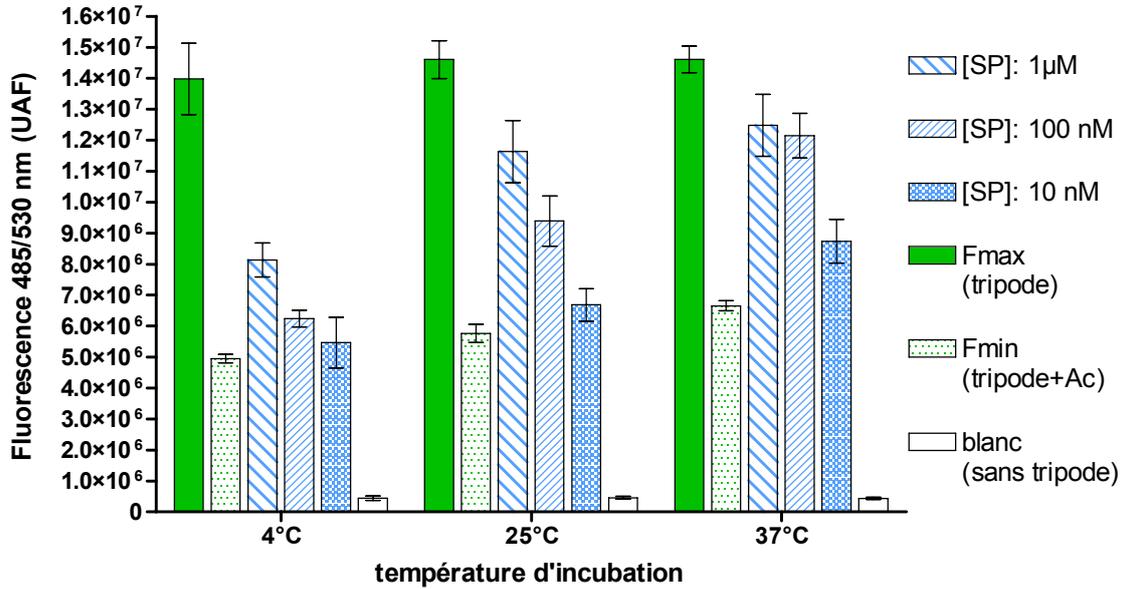


Figure 44 : Influence de la température d'incubation de la SP sur le déplacement

Protocole SPIT-FRI standard sur plaque (Matrix) revêtue de neutravidine avec tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine à 25 nM (18 h, 4°C), anticorps AcM SP31-TMR à 100 nM (18 h, 4°C), standard SP à 1 µM, 100 nM et 10 nM en tampon EIA (incubation 5 h sous agitation à 4°C, 25°C ou 37°C). Mesure de la fluorescence avec le lecteur Analyst. (n=8 répliquats/concentration)

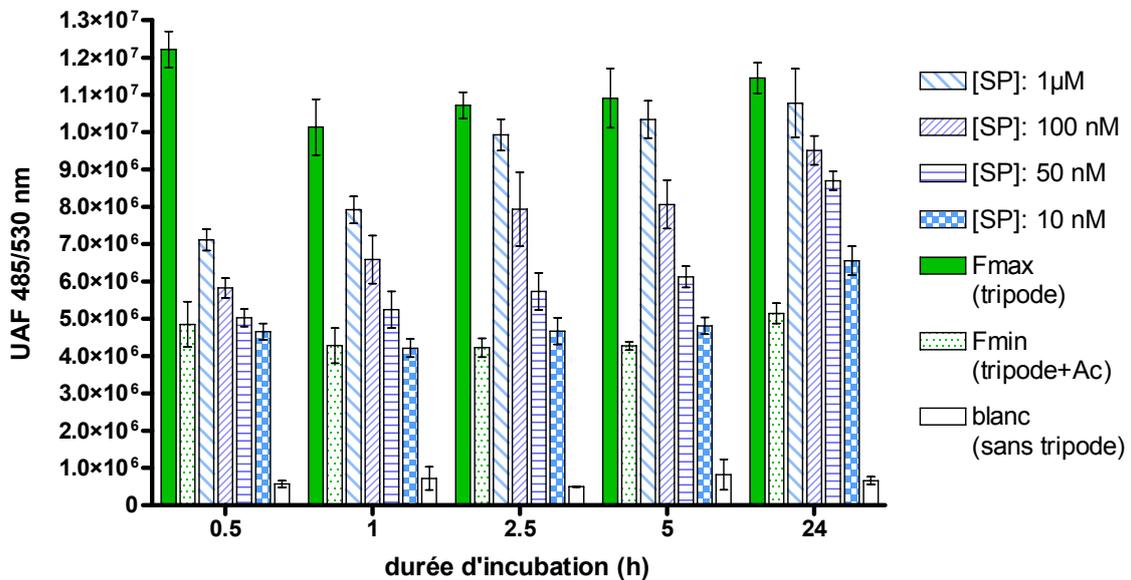


Figure 45 : Influence de la durée d'incubation de la SP sur le déplacement

Protocole SPIT-FRI standard sur plaque (Matrix) revêtue de neutravidine avec tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine à 25 nM (18 h, 4°C), anticorps AcM SP31-TMR à 100 nM (18 h, 4°C), standard SP à 1 µM, 100 nM et 10 nM en tampon EIA (incubation à 25°C sous agitation durant 30 min, 1 h, 2h30, 5 h ou 24 h). Mesure de la fluorescence avec le lecteur Analyst. (n=3 répliquats/concentration)

III.1.3.2. Optimisation des conditions d'incubation

III.1.3.2.1. Tampon, pH, température et durée d'incubation

Les premières expériences ont conduit à une forte variabilité de la fluorescence du tripode en fonction des puits, traduisant l'importance du retour complet à température des échantillons et de la plaque avant dépôt, permettant de diminuer les CV intra-essais sur la totalité d'une plaque de 16% à 8% (concentration en tripode de 25 nM). La comparaison avec des dosages ELISA classiques effectués dans les mêmes conditions montre que les dosages fluorescents sont plus sensibles aux variations thermiques (8% de CV en fluorescence *versus* 4% de CV en ELISA).

L'augmentation de la température d'incubation du standard favorise la réaction de déplacement, le signal augmentant avec la concentration en SP (Figure 44, p.138). Hélas, la température favorise également la dissociation du complexe anticorps-tripode en l'absence de SP (augmentation du signal Fmin).

En utilisant du tampon Phosphate pour l'incubation, le déplacement est plus faible qu'avec les tampons EIA, PVP, TRIS et Glycine pour les concentrations en Substance P inférieures à 50 nM. La différence est d'autant plus importante que la concentration en SP est faible. Cela montre l'importance d'utiliser un tampon contenant un agent de saturation afin d'éviter toute adsorption non-spécifique. Le pH du tampon n'a pas d'influence notable sur la réaction entre pH 7 et pH 9,4 ; on observe toutefois une légère diminution des signaux pour des pH inférieurs à 7 (voir Figure 41-B, p.133).

L'incubation du standard SP durant des temps variables (Figure 45, p.138) met en évidence une amélioration de la sensibilité avec l'augmentation de la durée d'incubation. La plus faible concentration en SP (10 nM) peut être détectée à partir de 2h30 d'incubation. Comme dans le cas des températures élevées, on note une dissociation du complexe Ac-tripode plus élevée pour les incubations longues.

Nous avons donc employé indifféremment le tampon PVP ou le tampon EIA (tampons d'usage courant) à pH 7,4, la réaction immunologique se déroulant à température ambiante (25°C) pour toutes les incubations, afin d'éviter tout changement brusque de température, durant 5 h.

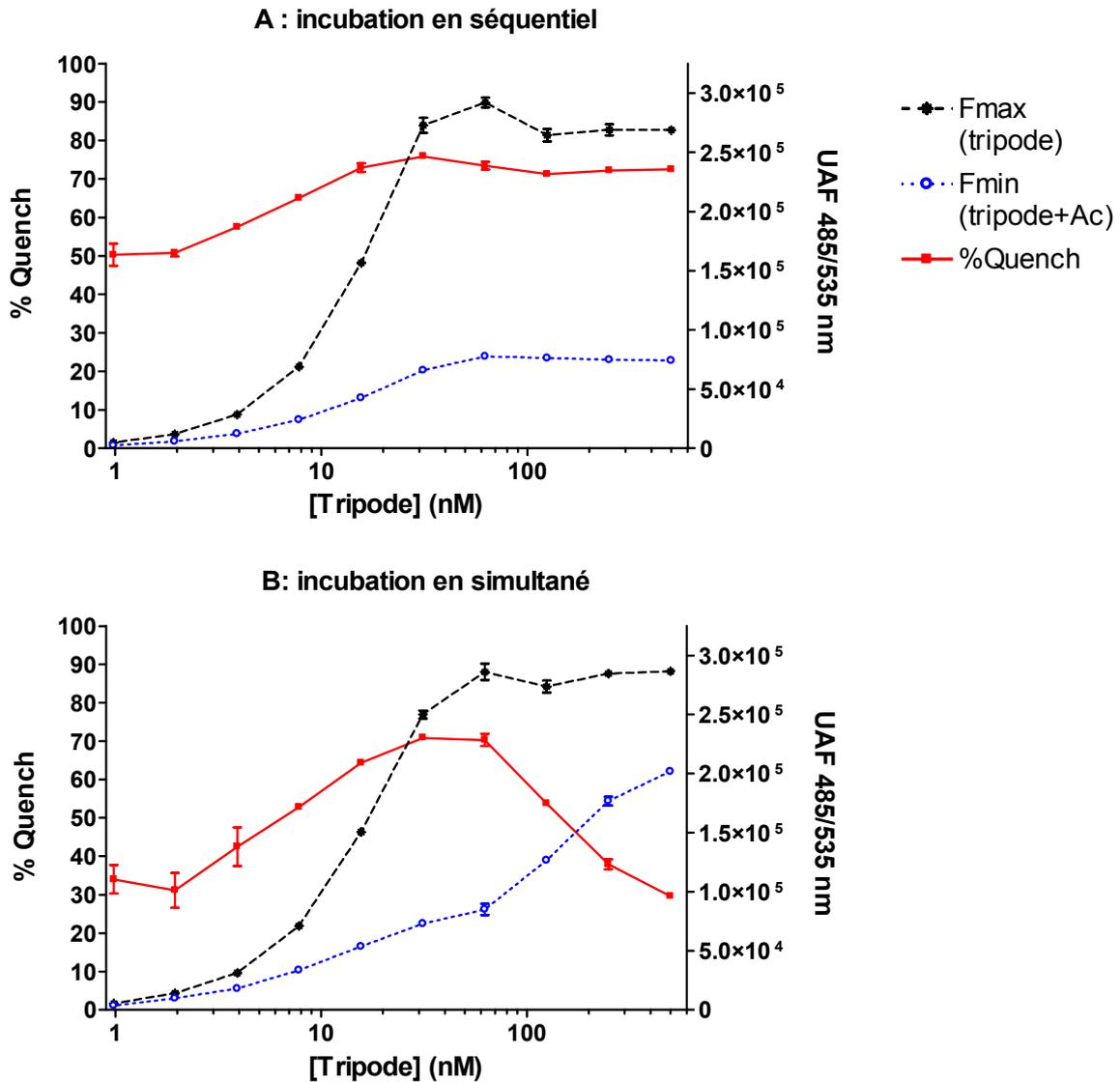


Figure 46 : Influence de la densité de tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine sur le *quenching* par l'AcM SP31-TMR, comparaison des incubations en séquentiel et en simultané.

A : incubation en séquentiel du tripode et de l'Ac

B : incubation en simultané

Protocole :

(A) Incubation de 50 μ L de solution de tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine (gamme) + 50 μ L de tampon durant 18 h à 4°C sur plaque neutravidine (Nunc), lavage, puis incubation de 50 μ L d'AcM SP31-TMR à 100 nM (PVP) et 50 μ L de tampon (18 h, 4°C).

(B) Incubation simultanée de 50 μ L de solution de tripode (gamme) et 50 μ L d'anticorps à 100 nM sur plaque neutravidine (18 h, 4°C).

Mesure de la fluorescence après lavage avec 100 μ L de tampon Phosphate pH 8,5 à 485/535 nm (Envision). Les concentrations indiquées sur les graphes correspondent aux concentrations finales des solutions dans les puits.

III.1.3.2.2. Influence de la concentration en tripode

La diminution de la concentration en tripode, favorisant le déplacement par la Substance P, va de paire avec une diminution de l'EC50. Cependant, pour des concentrations en tripode inférieures à 25 nM, les signaux souffrent d'une forte variabilité (CV>10 % pour l'inhibition du *quenching*), malgré une augmentation du gain ou du nombre de flashes lors de l'acquisition, qui peut s'expliquer par la diminution du signal Fmax et du pourcentage de *quenching*, ces deux phénomènes concourant à restreindre l'intervalle (Fmax-Fmin).

Nous constatons en effet un phénomène de diminution du *quenching* corrélé à la diminution de la concentration en tripode (50 % de *quenching* pour 1 nM de tripode, contre 75% pour 25 nM de tripode), comme illustré sur la Figure 46-A (p.140) que nous ne savons pas expliquer à l'heure actuelle. Il est possible qu'en présence d'une forte concentration surfacique (ou « densité ») en tripode, les molécules de TMR des anticorps liés participent au *quenching* de plusieurs groupements fluorescéine voisins, entraînant alors une inhibition de signal plus importante.

La même expérience réalisée avec une incubation en solution des réactifs avant le dépôt sur phase solide montre que la diminution du *quenching* pour les faibles concentrations est légèrement accentuée en cas de préincubation des deux réactifs en solution. Il en est de même avec une incubation simultanée du tripode et de l'Ac dans le puits (Figure 46-B). Dans les deux cas, il y a réaction en solution du tripode et de l'Ac avant la liaison du complexe immunologique formé sur phase solide. L'Ac étant divalent, il peut théoriquement être lié à deux molécules de tripode simultanément formant un complexe (Ac + 2 tripodes) contribuant à diminuer le *quenching* par rapport au complexe (Ac + 1 tripode) du fait de la diminution du rapport Accepteur/Donneur. Naturellement, la probabilité de formation de complexe (Ac + 2 tripodes) sera d'autant moins élevée que la concentration en tripode est faible mais sera, intuitivement, plus faible pour une incubation des réactifs en séquentiel qu'en simultanée pour une même concentration (faible) en tripode. L'ajout de l'Ac uniquement après immobilisation des tripodes dont la disposition sur la phase solide est aléatoire interdit en effet la liaison des Ac à deux molécules de tripode simultanément lorsque la densité en tripode est faible. Le *quenching* diminue également pour des concentrations en tripode supérieures à 50 nM en cas d'incubation simultanée des deux réactifs (« effet crochet ») contrairement à l'incubation séquentielle (l'étape de lavage permettant d'éliminer le tripode non fixé sur phase solide avant l'incubation de l'anticorps).

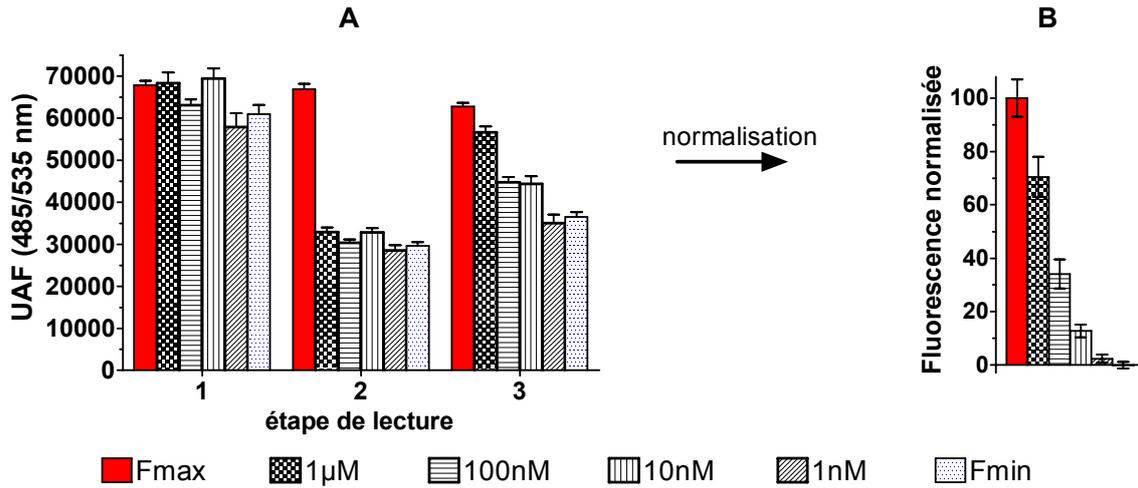


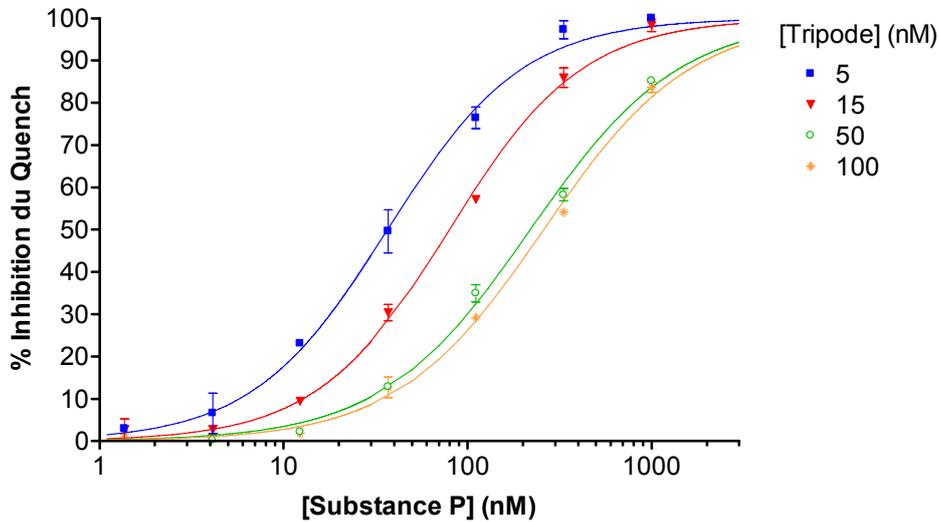
Figure 47 : Exemple de normalisation des signaux obtenus après déplacement par rapport aux signaux obtenus après incubation du tripode et de l'anticorps

A : données brutes

B : données normalisées

Protocole SPIT-FRI standard avec le tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine employé à 5 nM. Mesure de la fluorescence après chaque étape (1 : après incubation du tripode, 2 : après incubation de l'Ac, 3 : après incubation de la SP) après lavage et ajout de 100 µL de tampon Phosphate 0,1 M pH 8,5 ; n=4 réplicats/concentration.

Normalisation puits à puits avec 100= valeur de fluorescence après l'incubation du tripode, et 0= valeur de fluorescence après l'incubation de l'Ac.



[Tripode] (nM)	EC50 (nM)	EC20 (nM)	EC80 (nM)	LD (nM)
5	36,8	11,7	120	3,1
15	79,7	25,7	263	6,9
50	219,8	63,1	812	14
100	259,7	74	977	17,7

Figure 48 : Influence de la concentration en tripode sur la sensibilité du dosage

Protocole : protocole SPIT-FRI standard avec le tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine employé à 5,15, 50 ou 100 nM, n=4 réplicats/concentration, normalisation des données puits à puits (cf Figure 47).

Dans le cas de concentrations en tripode inférieures à 25 nM, engendrant une diminution de l'intervalle ($F_{\max}-F_{\min}$), la variabilité des signaux après immobilisation du tripode, si elle n'est que de 7,5 % en moyenne ($n=24$), constitue toutefois un facteur limitant. Pour pallier ce problème, les signaux ont été « corrigés » en utilisant une méthode de normalisation consistant à attribuer, pour chacun des puits, la valeur 100 au signal après l'incubation du tripode, et la valeur 0 après l'incubation de l'anticorps (Figure 47, p.142). Après normalisation des données, les courbes standard obtenues sont de meilleure qualité.

La Figure 48 (p.142) présente les courbes standard pour différentes concentrations en tripode, après normalisation. Plus la concentration en tripode est faible, plus le dosage est sensible (EC_{50} plus faible). Avec la concentration en tripode la plus faible (5 nM), la zone linéaire du dosage se situe entre 12 nM et 120 nM, avec une EC_{50} à 37 nM et une limite de détection de 3 nM.

III.1.3.2.3. Déplacements successifs par la SP

La Figure 49 (p.144) présente les résultats obtenus avec des incubations successives de solution de Substance P (à 4 concentrations différentes) sur une phase solide après *quenching* du tripode par l'anticorps. Aucune régénération par ajout d'anticorps TMR n'est ensuite effectuée. Une inhibition spécifique du *quenching* dose-dépendante et cumulative est observée. Sur une phase solide comportant une faible concentration tripode (concentration de la solution d'incubation : 5 nM), la plus forte concentration en SP (1 μ M) conduit très rapidement à une inhibition complète du *quenching*, phénomène observé plus tardivement pour les plus fortes concentrations en tripode. L'effet semble bien cumulatif avec une additivité plus intense (pente plus forte) pour les 5 premières mesures. L'augmentation est plus faible entre les répétitions 6 à 11. Il faut remarquer que cette rupture de pente est parallèle à une incubation longue (18 h) et traduit peut-être une réorganisation de la phase solide, les anticorps étant liés de façon divalente à deux molécules de tripode voisines devenant alors plus « difficiles » à déplacer. Il est enfin intéressant de constater que la solution de SP la plus faiblement concentrée (1 nM) indétectable à la première mesure des graphes B et C est clairement observée ($IQ > 5\%$) après la 5^{ème} mesure.

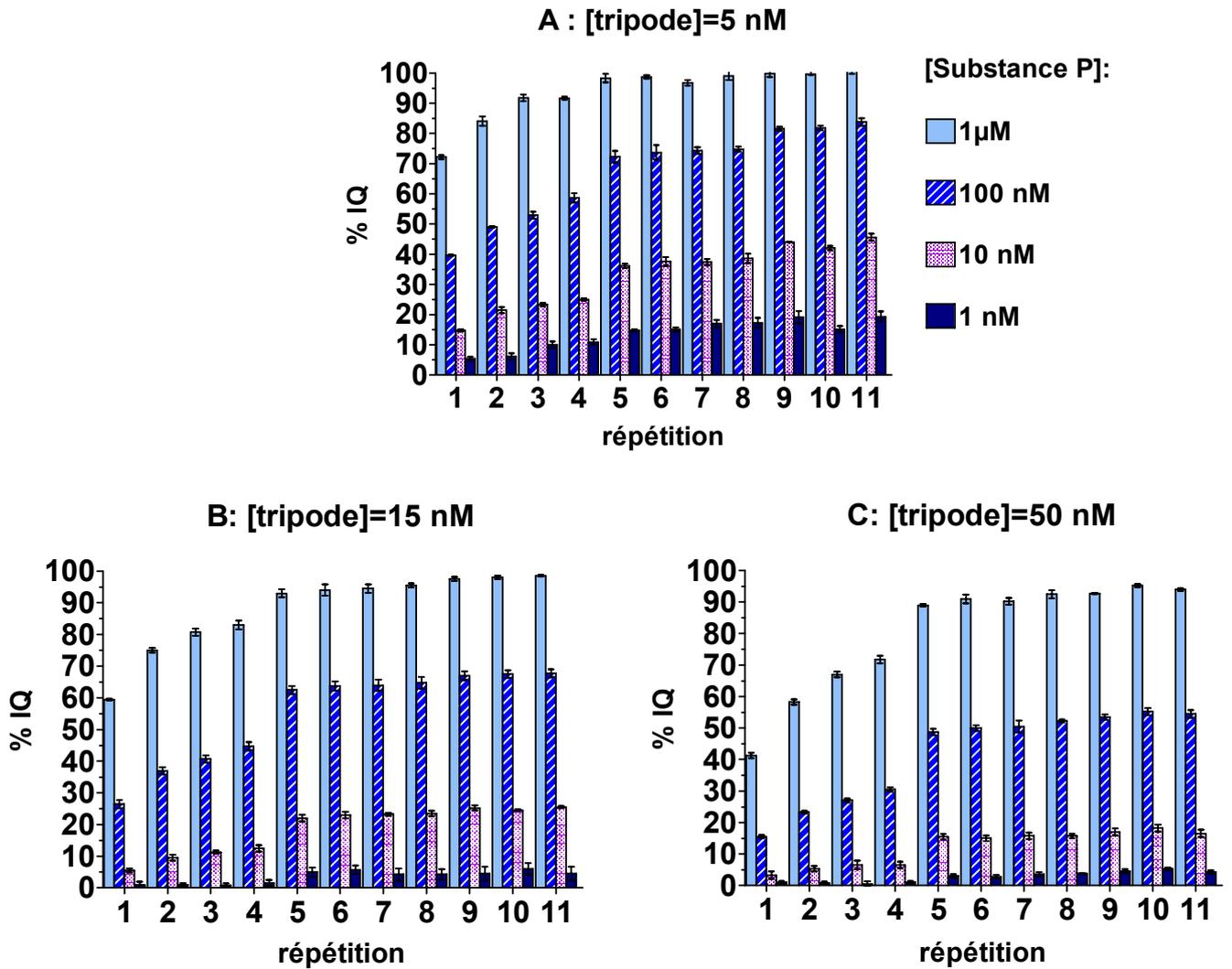


Figure 49 : Incubations successives de la SP sans ajout d'anticorps

Protocole : Incubations séquentielles (100 μ L, 18) sur plaque neutravidine du tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine à 5, 15 ou 50 nM puis de l'anticorps SP31-TMR (100 nM), puis 11 incubations successives de la solution de SP à 1 nM, 10 nM, 100 nM ou 1 μ M durant 1 h à RT sous agitation (solution renouvelée pour chaque incubation), sauf pour la 5^{ème} incubation (18 h d'incubation). Entre chaque incubation de SP, la fluorescence est mesurée avec le lecteur Envision (conditions standard) après lavage et ajout de 100 μ L de tampon PVP.

III.1.3.3. Validation du dosage

III.1.3.3.1. Répétabilité et reproductibilité

Les CV inter- et intra-essais sont respectivement de 31,4 ; 16 ; 7,3 et 12,4 % et de 37,1 ; 17,5 ; 9,1 et 13,6 % pour des concentrations en Substance P de 400, 150, 50 et 15 ng/mL. Ces résultats montrent une bonne précision du dosage pour des concentrations proches de la limite de quantification, mais pour une quantification précise des fortes concentrations en SP (supérieures à 300 ng/mL), il est préférable d'effectuer une nouvelle mesure après dilution.

III.1.3.3.2. Mesures dans des échantillons biologiques

Le contenu en SP d'extraits de cerveau et de moëlle épinière de rats et de souris a été analysé par le dosage mis au point ainsi que par le dosage immunoenzymatique de référence (dosage EIA par compétition avec l'AcM SP31 et le traceur SP-AChE). De façon globale, on remarque que le SPIT-FRI fournit des valeurs plus élevées que le dosage de référence pour les mêmes échantillons. Cependant, les deux dosages montrent que les échantillons de moëlle épinière sont plus riches en SP que les échantillons de cerveau (environ 2 fois), aussi bien chez le rat que chez la souris (

Tableau 10, p.146). La différence observée entre les deux dosages est probablement due à l'utilisation d'un analogue de la SP au lieu de la SP originelle comme traceur. L'utilisation de l'analogue Ala¹⁰SP dans le SPIT-FRI pourrait en effet augmenter les réactions croisées avec les autres neurokinines présentes dans les échantillons, conduisant à une augmentation de la concentration estimée.

Par ailleurs, nous avons évalué l'influence de deux matrices biologiques sur le dosage, le plasma et l'urine (origine humaine). Les résultats mettent en évidence que l'effet matrice est plus faible dans le cadre du SPIT-FRI que du dosage EIA compétitif. En effet, l'effet matrice disparaît à partir d'une dilution au tiers de la matrice dans le cas du SPIT-FRI, ce qui n'est observé qu'à partir d'une dilution au 1/10^{ème} (urine) ou au 1/20^{ème} (plasma) pour le dosage EIA par compétition, comme l'illustre la Figure 50 (p.146).

Tableau 10 : Analyse de la concentration en Substance P (en ng/mL) d'échantillons de cerveau et de moëlle épinière de souris et de rats (dosage SPIT-FRI versus EIA par compétition)

Protocole SPIT-FRI standard avec incubation séquentielle (100 µL/puits) du tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine (25 nM, 1 h, 20°C), de l'AcM SP31-TMR (100 nM, 2h, 20°C), du standard ou de l'échantillon dilué au ½ (5 h, 20°C) sur plaque revêtue de neutravidine. Mesure de la fluorescence après lavage avec le lecteur Envision (conditions standard).

Protocole EIA standard avec incubation simultanée de 50 µL de traceur SP-AChE (2 UE/mL), 50 µL de l'AcM SP31 à 25 ng/mL et 50 µL de standard ou d'échantillon dilué au 1/20^{ème} durant 18 h à 4°C sur plaque revêtue d'anticorps CAS. Mesure de l'absorbance à 414 nm après lavage et révélation (1 h).

Concentrations estimées à partir de la courbe standard, n=2 réplicats/échantillon de cerveau (C) ou de moëlle épinière (ME) de souris ou de rats. Préparation des échantillons : voir au II.2.4.1, p.83.

[SP] (µ ± σ) en ng/mL	C (rats)	ME (rats)	C (souris)	ME (souris)
SPIT-FRI	59,8 ± 8,1	93,9 ± 6,4	44,9 ± 10,5	87,3 +/- 9,0
EIA	38,3 ± 5,8	63,9 ± 8,7	34,9 ± 3,3	72,6 +/- 13,2

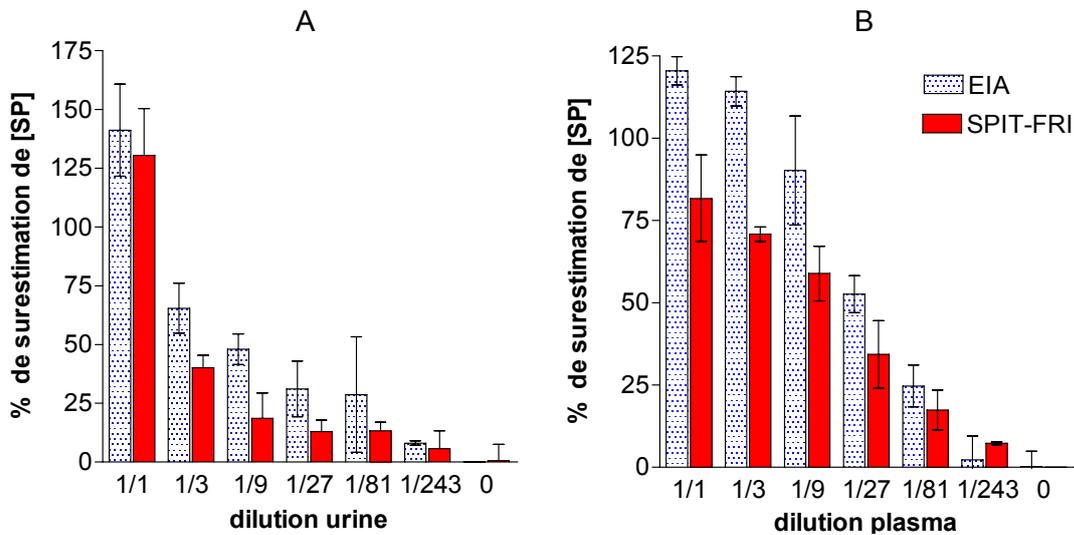


Figure 50 : Influence de la présence d'urine et de plasma dans le tampon sur l'estimation de la concentration en SP (dosage SPIT-FRI versus EIA par compétition)

A : urine à différentes dilutions en tampon PVP

B : plasma à différentes dilutions en tampon PVP

Protocole des dosages : cf. Tableau 10.

III.1.4. Evaluation de différents paramètres en vue d'optimiser le dosage

III.1.4.1. Durée des étapes d'incubation

Le protocole tel que présenté précédemment étant relativement long à réaliser, nous avons souhaité optimiser les durées d'incubation de chaque étape.

Tout d'abord, le suivi de la fixation du tripode Ala¹⁰SP-Fluorescéine sur la neutravidine en cinétique (mesure de la diminution du signal avec la fixation sur phase solide, cf partie 4 des résultats) montre qu'un plateau est atteint à partir de 30 min de réaction pour une concentration en tripode de 15 nM (incubation à RT). Si le signal obtenu à l'équilibre est légèrement plus faible avec une incubation à RT qu'à 4°C, cela montre toutefois qu'il est possible de réduire la durée de cette étape ; une incubation d'1 h sous agitation permettant de s'assurer que l'équilibre est atteint.

Concernant l'étape d'incubation de l'anticorps, il est absolument nécessaire qu'elle soit suffisamment longue pour s'assurer d'avoir atteint l'équilibre, faute de quoi il ne serait pas possible d'envisager des dosages répétés sur une même phase solide. En effet, si l'état d'équilibre n'est pas atteint après l'étape d'incubation de l'anticorps, le taux de *quenching* ne sera pas équivalent pour tous les puits variant en particulier selon que les puits aient contenu une concentration en analyte plus ou moins élevée avant l'étape de régénération. La Figure 51 (p.149) présente le signal de fluorescence mesuré en cinétique durant 4 cycles successifs de *quenching* et déplacement par la Substance P (tripode Ala¹⁰SP-Fluorescéine employé à 5 nM, anticorps SP31-TMR à 100 nM). Nous constatons qu'un plateau de *quenching* est atteint après 1 h d'incubation de l'Ac. Bien sûr, la durée nécessaire pour atteindre l'équilibre lors de l'étape de l'incubation de l'anticorps varie selon les concentrations en tripode et en anticorps employées ainsi que les conditions d'incubation. En incubant l'anticorps à 100 nM durant 2 h, on s'assure d'un retour au *quenching* complet pour tous les puits même pour des densités plus élevées en tripode sur la phase solide. Nous remarquons sur la Figure 51 que, si le signal a effectivement diminué après l'incubation de l'anticorps et lavage (F_{min}) par rapport au signal F_{max} correspondant au tripode sans anticorps, le signal mesuré durant l'incubation de l'anticorps est plus élevé que le signal F_{max}. Cela provient du fait qu'aux longueurs d'onde de mesure (485/535 nm), les molécules de TMR de l'anticorps sont excitées et génèrent un signal de fluorescence. Par ailleurs, la mesure comparée de la fluorescence avant et après lavage révèle un signal plus élevé avant lavage de la plaque. Nous avons pu montrer que cela

provient du fait que la TMR qui, comme pour la Fluorescéine, présente un signal plus élevée en solution que sur phase solide. Les cinétiques de *quenching* étant effectuées sans lavage, elles reflètent donc à la fois : (i) le *quenching* de la Fluorescéine par la TMR et (ii) la diminution de la fluorescence de la TMR portée par l'anticorps lorsque ce dernier se lie à la phase solide, donnant finalement lieu à un pourcentage de *quenching* apparent supérieur au pourcentage de *quenching* réel de la Fluorescéine par la TMR. Notons que la méthode permettant un accès direct au signal durant la réaction immunologique, il est envisageable d'évaluer les constantes cinétiques de l'anticorps envers le tripode et envers l'analyte. Cependant, pour une détermination précise de ces constantes, des modèles mathématiques complexes sont nécessaires, puisqu'il faut prendre en compte notamment le phénomène de diffusion des molécules et la déplétion en anticorps libre (ie. non complexé) durant la réaction, ainsi que la divalence de l'anticorps ; à cela s'ajoute, dans nos conditions expérimentales, l'absence de relation connue entre la quantité d'anticorps fixé et le pourcentage de *quenching* (pour les faibles concentrations en tripode), la fluorescence de l'accepteur aux longueurs d'onde de mesure ainsi que la différence d'intensité de fluorescence en solution et sur phase solide. Nous avons en effet constaté une différence de signal de fluorescence importante entre les fluorophores libres en solution et liés à la phase solide (phénomène que nous avons exploité pour la mise au point d'une méthode de dosage, cf. partie 4 des résultats). Un exemple de courbe d'association/dissociation de l'anticorps sur le tripode après une normalisation des signaux éliminant la fluorescence de la TMR à 485/535nm et la différence de signal de base entre chaque puits est présenté sur la Figure 53 (p.150).

L'analyse des signaux cinétiques lors du déplacement montre que la réaction est lente, l'équilibre étant loin d'être atteint après 1 h d'incubation. Une cinétique réalisée sur un temps plus long ²⁵ montre que l'équilibre est atteint seulement après 8 à 10 h de réaction (Figure 54, p.150). La lenteur de cette cinétique est probablement due au fait qu'il s'agit d'un déplacement du complexe anticorps-tripode par la SP, tandis que pour le *quenching* par l'anticorps, plus rapide, concerne une réaction de liaison de l'Ac sur le tripode sans compétition. La réaction de compétition est également probablement ralentie par la diffusion des molécules vers et en partance de la phase solide. En effectuant dans ce cas des mesures rapprochées en début de cinétique (ex : 1 mesure/ min durant 15 min) on obtient une courbe

²⁵ Pour l'acquisition des cinétiques sur des temps longs, nous avons scellé les plaques afin d'éviter l'évaporation dans les puits qui conduit à une réduction du volume dans les puits et donc du signal (voir p.132).

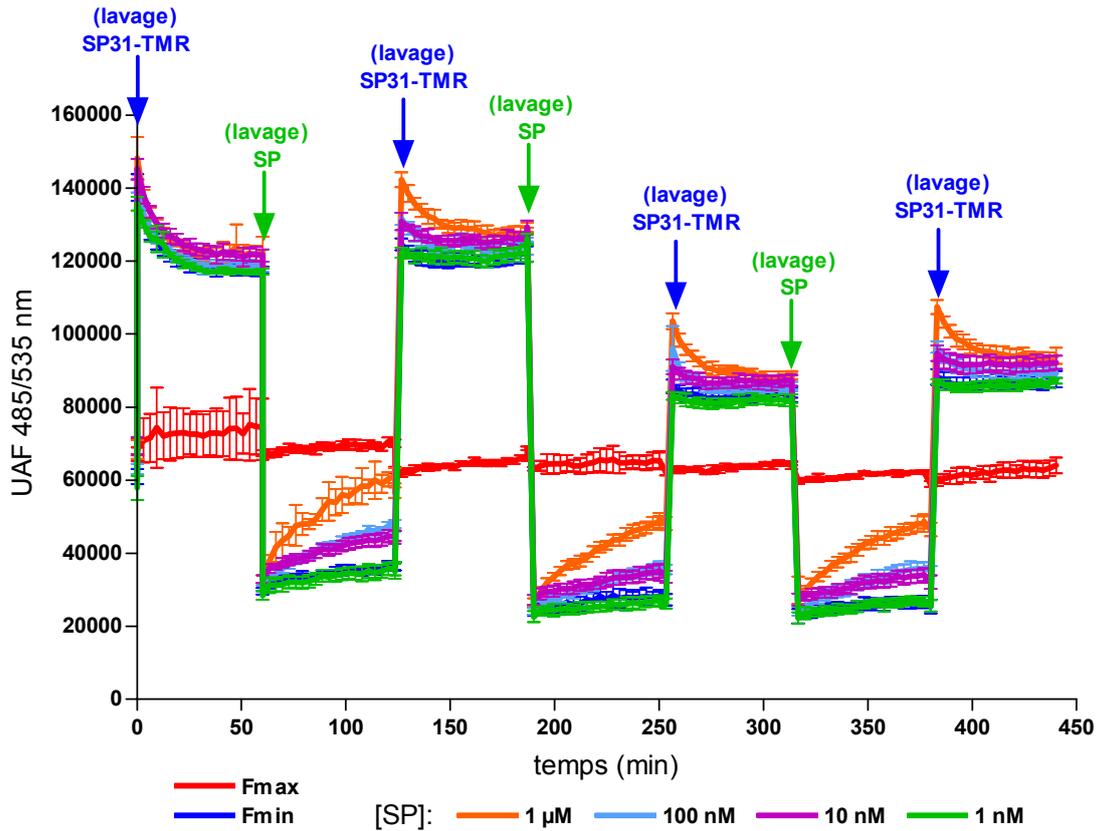


Figure 51 : Mesures en cinétique pour 4 cycles de régénération/déplacement par la SP

Protocole : Incubations successives (100 μ L/puits) de solution d'AcM SP31-TMR à 100 nM et de Substance P à 1 μ M, 100 nM, 10 nM et 1 nM (tampon PVP) sur plaque revêtue de neutravidine après incubation du tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine à 5 nM durant 1 h à RT (plaque Nunc maxisorp noire). Mesure de la fluorescence en mode cinétique durant 1 h (1 mesure/190 sec) avec le lecteur Envision à 485/535 nm. Avant chaque mesure, agitation orbitale de la plaque 20rpm.

Fmax : signal obtenu dans les puits avec tripode sans anticorps.

Fmin : signal obtenu dans les puits avec tripode et anticorps sans analyte.

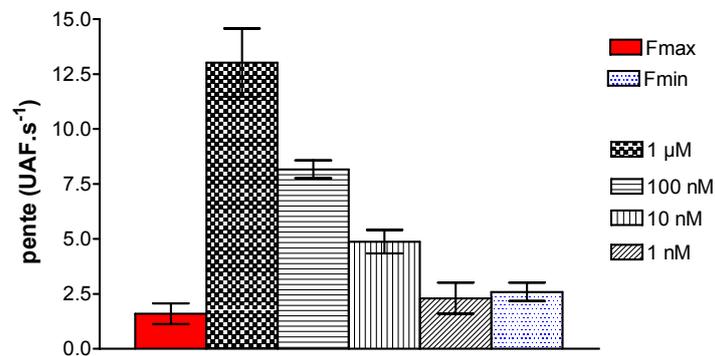


Figure 52 : Analyse de la pente initiale des cinétiques de déplacement sur 15 min

Protocole SPIT-FRI standard avec [tripode]=15 nM et mesure en mode cinétique (1 mesure/min durant 15 min à partir de la première mesure à RT)

Calcul de la pente de la courbe de régression linéaire (So) en UAF.s⁻¹ en fonction de la concentration.

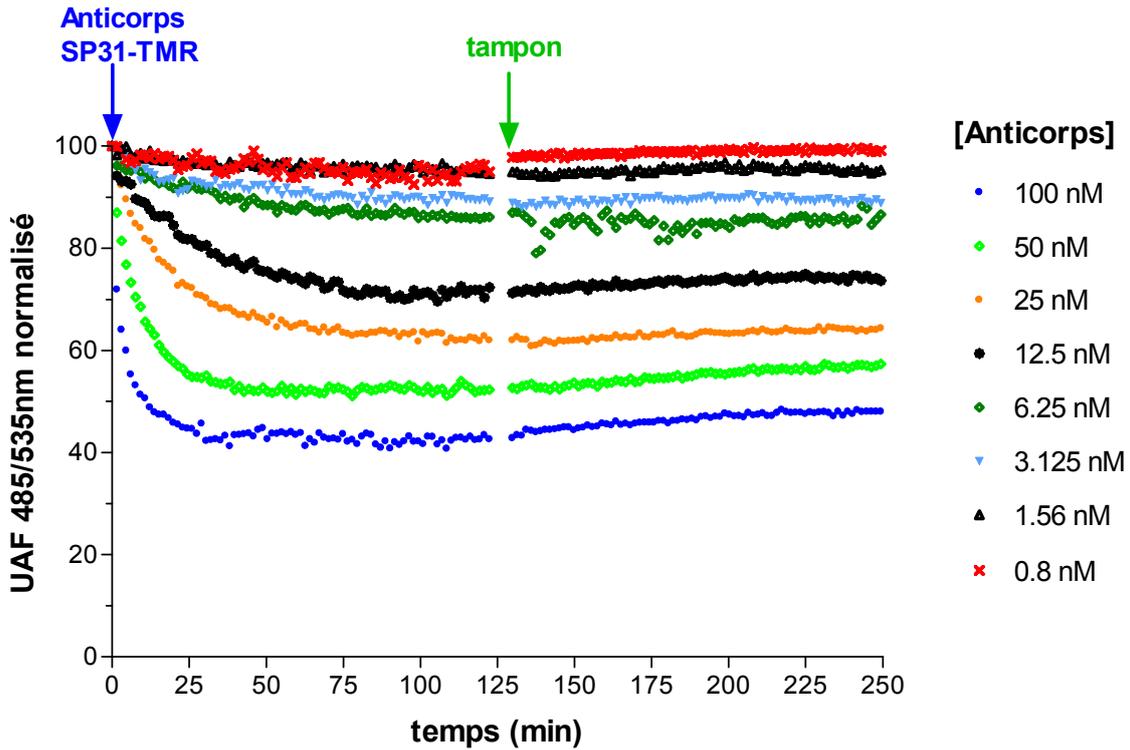


Figure 53 : Cinétiques d'association et de dissociation de l'anticorps SP31-TMR sur le tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine pour différentes concentrations en anticorps

Dilution d'Ac SP31-TMR, mesure en cinétique, signaux normalisés et soustraction de la fluorescence de la TMR.

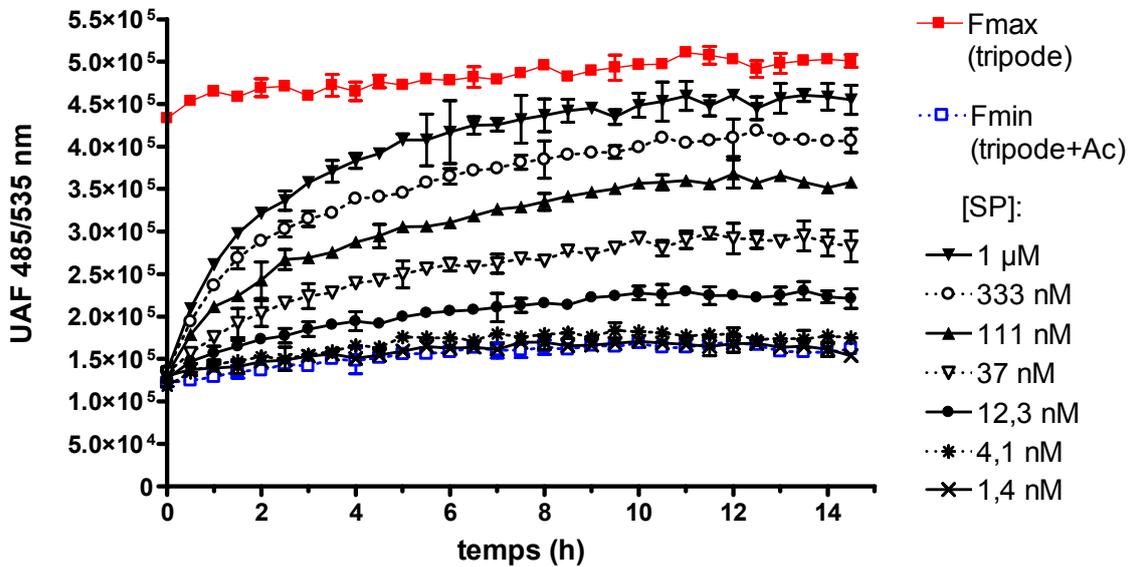


Figure 54 : Cinétique de déplacement par la Substance P (14 h)

Protocole : Incubations successives (100 µL/puits) de tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine (45 nM, 1 h, RT), puis de l'AcM SP31-TMR (100 nM, 2h, 20°C) sur plaque Costar High Bind en polystyrène noir à fond transparent revêtue de neutravidine. Après lavage, dépôt à t=0 du standard et thermoscellage de la plaque ; mesure en mode cinétique (délai entre le dépôt et le premier point de la mesure : environ 2 min) à 485/535 nm (mesure par le dessous de la plaque), 1 mesure/30 min pendant 15 h. Signal à t=0 normalisé.

s'apparentant à une droite dont la pente augmente avec la concentration en standard comme illustré sur la Figure 52 (p.149). Une analyse sans attendre l'équilibre est donc envisageable pour réduire la durée de l'étape d'incubation de l'analyte.

III.1.4.2. Modification du rapport accepteur/donneur

La modification du rapport A/D conditionnant fortement le FRET, il nous a semblé intéressant d'étudier l'influence de ce paramètre sur le dosage. Pour cela, il est possible de modifier le nombre de fluorophores présents sur le tripode Ala¹⁰SP-biot ou sur l'anticorps.

Des expériences préliminaires ont montré que l'augmentation du nombre de fluorophores présents sur le tripode Ala¹⁰SP-biot (expériences réalisées avec l'anticorps SP31-TMR comportant 3,2 moles de TMR/mole d'Ac) entraîne une diminution de la gamme dynamique de signal en raison d'un *quenching* plus faible et d'un signal réduit (expériences réalisées par le Dr Hervé Volland). La diminution du signal est probablement due au phénomène d'*autoquenching* de la Fluorescéine à fortes concentrations. La diminution du *quenching* peut s'expliquer par la diminution du rapport A/D induite par l'augmentation du rapport Fluorescéine/tripode.

Ces résultats nous ont conduit à augmenter le ratio TMR/Ac. Le marquage de l'anticorps SP31 avec la TMR a été effectué en suivant le protocole classique de marquage (voir II.3.3.2, p.97) en faisant varier le rapport de couplage (R=5, 25, 50, 100 ou 500 moles de TMR par mole d'anticorps), toutes conditions égales par ailleurs (même volume réactionnel et mêmes conditions d'incubation)²⁶.

Comme attendu, le nombre de molécules de TMR présentes sur l'anticorps (Rf : ratio d'incorporation, calculé par méthode d'absorbance) augmente avec le rapport de couplage (Tableau 11, p.152). Nous observons une modification du spectre d'absorbance selon le rapport TMR/Ac, la hauteur relative de l'absorbance à 518 nm par rapport à 555 nm augmentant avec le rapport TMR/Ac. Comme expliqué précédemment (cf. p.123), ce phénomène correspond à la formation de dimères de molécules de TMR liées à l'anticorps.

L'affinité de l'anticorps SP31 marqué avec différents ratios de TMR pour la SP a été évaluée par un test immunoenzymatique sur plaque CAS avec le traceur SP-AChE. Le décalage des courbes vers la droite (Figure 55-A, p.152) traduit une diminution de la reconnaissance par l'anticorps de capture avec le rapport de couplage R : plus R augmente, plus le nombre de sites de liaison du CAS diminue. Par contre, les capacités de reconnaissance de l'anticorps

²⁶ Les concentrations en anticorps marqué ont été évaluées par dosage de protéines (cf p.123).

Tableau 11 : $A_{518\text{ nm}}/A_{555\text{ nm}}$ et ratio TMR/Ac de l'AcM SP31-TMR dans différents rapports de couplage

R : rapport molaire TMR/Ac utilisé pour le couplage ; Rf : rapport TMR/Ac calculé à partir de l'absorbance de l'Ac marqué purifié ; $A_{518\text{ nm}}/A_{555\text{ nm}}$: rapport de l'absorbance à 518 nm et à 555 nm de l'Ac marqué purifié. ($A_{518\text{ nm}}/A_{555\text{ nm}} = 0,5$ pour une solution de TMR libre)

Rapport de couplage (R)	5	25	50	100	500
$A_{518\text{ nm}}/A_{555\text{ nm}}$	0,5	0,75	1	1,15	1,3
TMR/Ac (Rf)	1,1	2,8	3,2	3,5	6,1

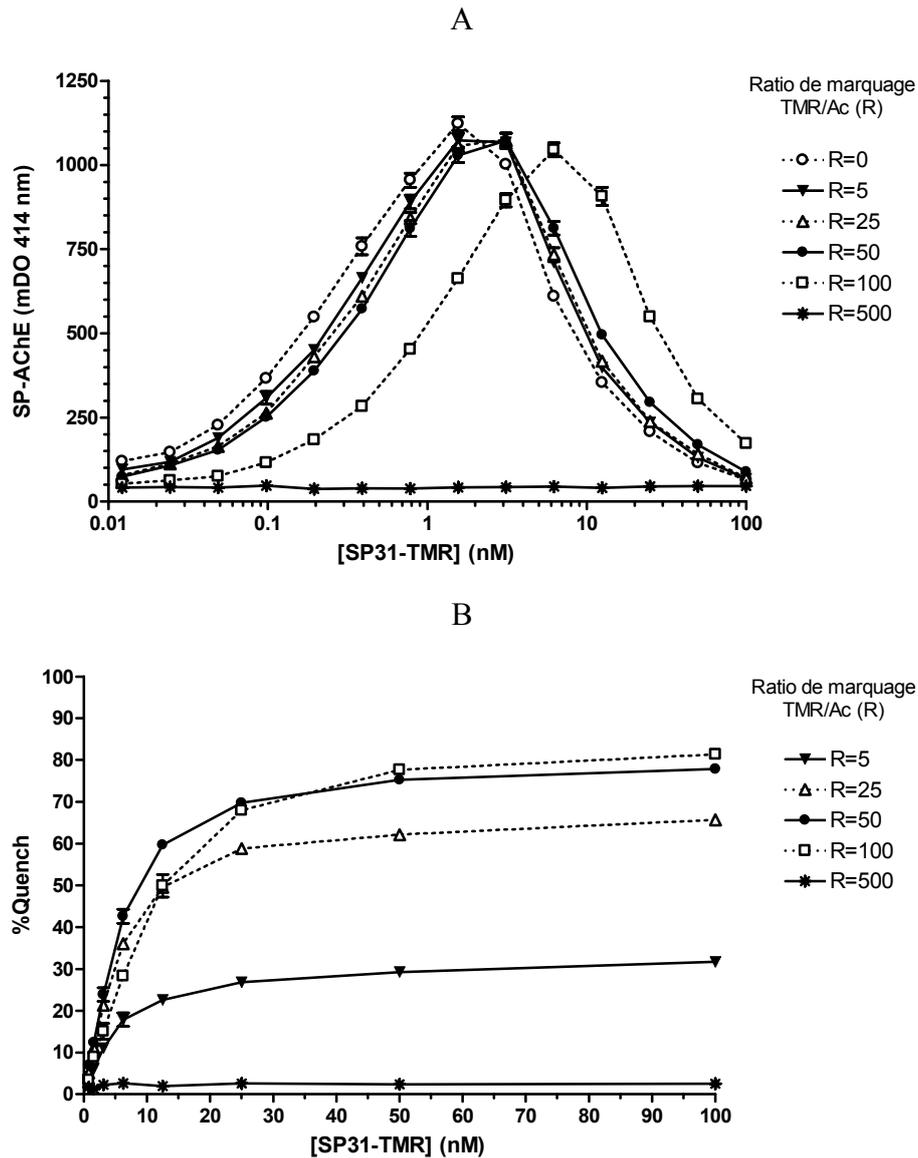


Figure 55 : Influence du ratio TMR/Ac SP31 sur les capacités de liaison avec la SP-AChE et sur le quenching du tripode Ala¹⁰SP(biot)-Fluorescéine

A : Test de dilution de l'AcM SP31-TMR avec le traceur SP-AChE sur plaque revêtue d'anticorps CAS (protocole standard). Mesure de l'absorbance à 414 nm après lavage et révélation (1 h).

B : Test de dilution de l'AcM SP31-TMR (R=5, 25, 50, 100 ou 500) avec le tripode Ala¹⁰SP(biot)-Fluorescéine (25 nM) sur plaque neutravidine. Mesure de la fluorescence après lavage avec le lecteur Envision à 485/535 nm (conditions standard) après chaque étape (signaux normalisés puits à puits).

vis-à-vis du traceur SP-AChE sont quasiment entièrement conservées pour R5, R25, R50 et R100, les signaux maxima étant du même ordre de grandeur. Ce n'est pas le cas pour R500, pour lequel on note une absence totale de signal quelle que soit la concentration en anticorps employée, qui correspond à un masquage total des sites de liaisons du CAS et/ou une perte totale d'immunoréactivité pour le traceur SP-AChE.

La Figure 55-B (p.152) présente les résultats de *quenching* du tripode Ala¹⁰SP(biot)-Fluorescéine par l'anticorps SP31 marqué avec les différents ratios de TMR. Comme pour le test d'immunoréactivité, l'anticorps marqué avec un excès molaire de R=500 n'est pas fonctionnel. On observe une augmentation du *quenching* maximal avec l'augmentation du rapport de couplage de l'anticorps avec la TMR, avec 30%, 62%, 77% et 81% de *quenching* respectivement pour R=5, 25, 50 et 100. Pour R=100, on observe un *quenching* plus faible que pour R=50 pour les faibles concentrations en anticorps. Ceci est probablement lié à une légère perte d'immunoréactivité de l'anticorps correspondant à la faible baisse du signal maximal observée sur la reconnaissance de la SP-AChE.

En conclusion, l'anticorps marqué avec R=50 permet d'obtenir un bon pourcentage de *quenching* tout en conservant une bonne immunoréactivité. Il ne paraît donc pas opportun de modifier ce paramètre dont le choix initial était arbitrairement judicieux.

III.1.4.3. Comparaison de différents anticorps anti-SP

Comme tout dosage immunologique par compétition, les propriétés du dosage sont directement liées à l'affinité de l'anticorps pour le traceur et pour l'analyte. Disposant de plusieurs anticorps anti-SP d'affinité variée, nous avons souhaité étudier l'influence de l'affinité de l'anticorps sur les performances du dosage. En plus de l'AcM SP31, nous avons utilisé les anticorps monoclonaux de souris SP14, SP19 et SP24 ainsi que l'anticorps polyclonal de lapin As 418.

Pour les quatre anticorps monoclonaux, le marquage avec la TMR, effectué dans des conditions similaires (marquage de 3,3 nmoles d'anticorps, volume réactionnel de 600 µL, rapport de couplage R=50 moles de TMR/mole d'Ac), engendre des rendements équivalents (3 moles de TMR/Ac environ) avec un ratio $A_{518\text{ nm}}/A_{555\text{ nm}}$ proche de 1.

L'Ac SP31 permet d'atteindre le plateau de *quenching* le plus rapidement (Figure 56, p.154) ; toutefois les anticorps SP14 et SP24 donnent lieu au plateau à un *quenching* légèrement plus élevé que SP31. L'anticorps SP19 fournit en revanche un *quenching* plus faible, sans doute en raison d'une moins forte affinité envers le tripode.

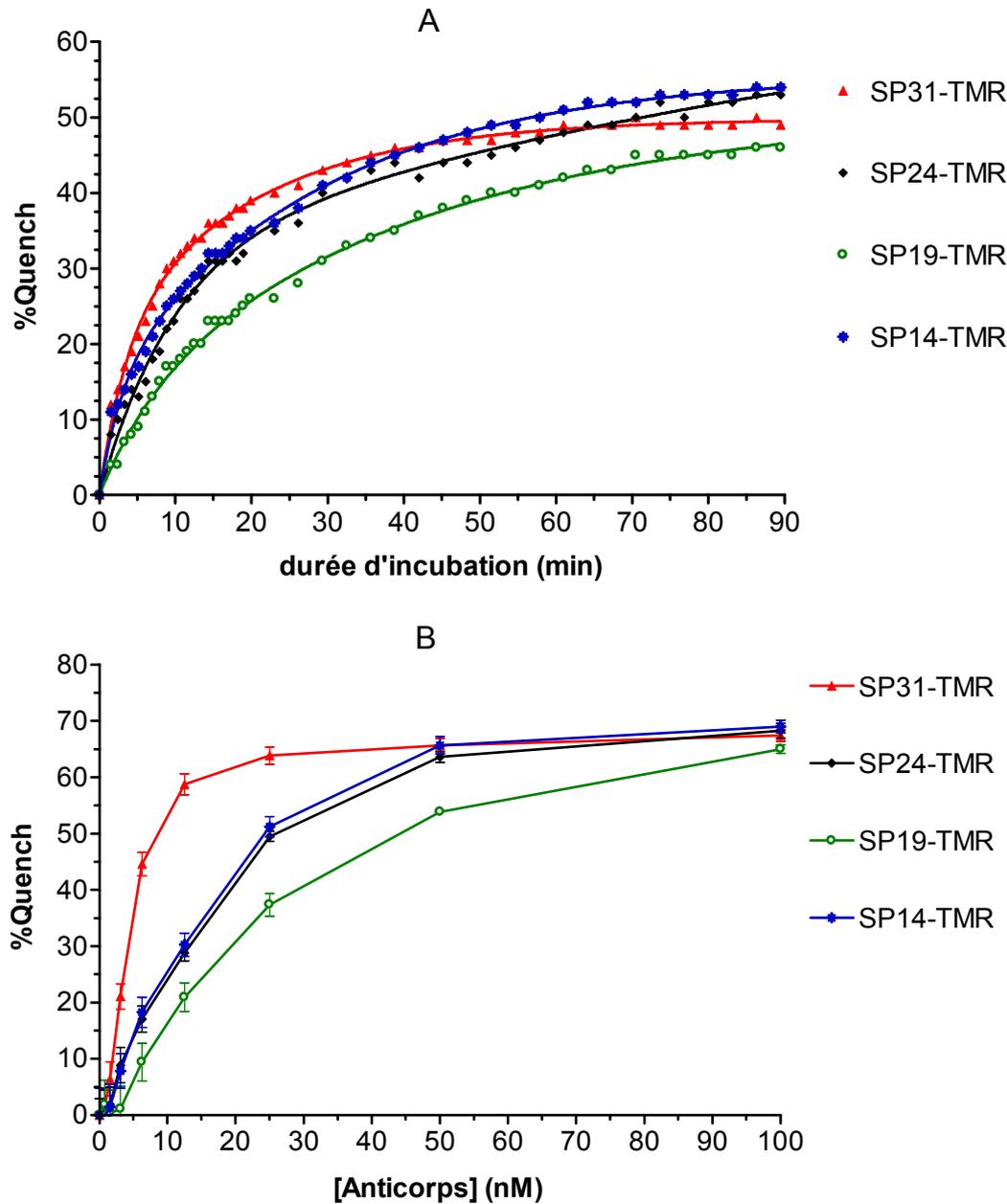


Figure 56 : Quenching du tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine par les anticorps SP14, SP19, SP24 et SP31-TMR (mesure en cinétique et en point final)

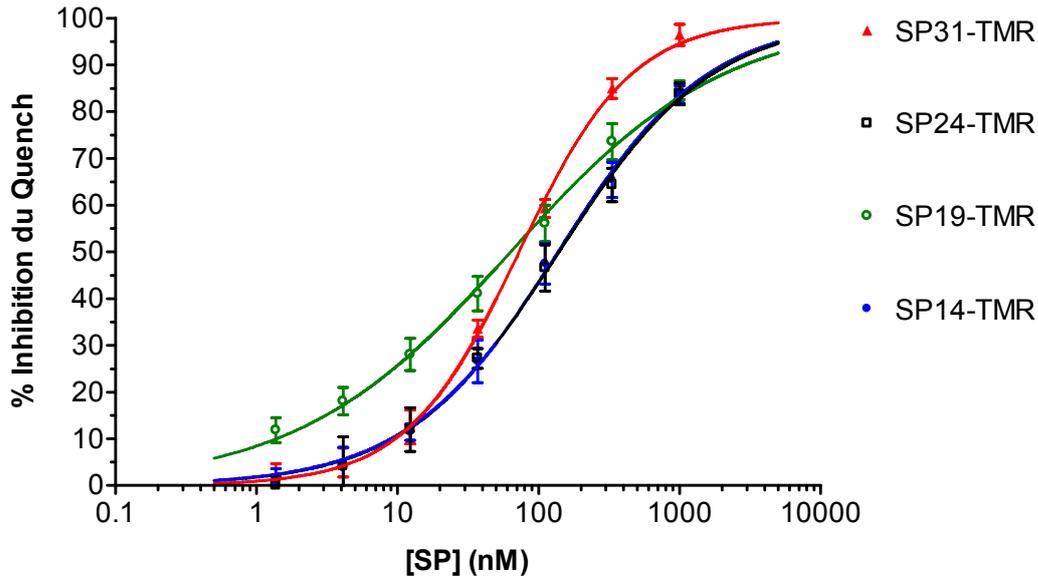
A : mesure du quenching en mode cinétique

B : test de dilution d'anticorps (mesure en point final)

Protocole :

(A) incubation du tripode (5 nM, 18 h, 4°C), lavage, dépôt de l'anticorps à 100 nM à t=0 et mesure en cinétique durant 1 30 à RT (1 mesure/55 sec durant 20 min puis 1 mesure/190 sec) avec le lecteur Envision à 485/535 nm.

(B) : incubations successives (100 µL/puits, 18 h, 4°C) du tripode (15 nM) et de l'anticorps (gamme), puis mesure de fluorescence après lavage avec le lecteur Envision à 485/535 nm, n=3 réplicats.



anticorps	%Qmax	EC50 (nM)	EC20 (nM)	EC80 (nM)	pente
SP14-TMR	62.0	136.8	25.0	750	0.82
SP19-TMR	53.4	63.3	6.0	741	0.57
SP24-TMR	62.3	139.8	24.8	791	0.80
SP31-TMR	64.5	72.6	20.8	263	1.09

Figure 57 : Courbe d'étalonnage pour la SP avec les anticorps SP14, SP19, SP24 et SP31-TMR

Protocole SPIT-FRI standard avec tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine (15 nM, 18 h, 4°C), anticorps SP31-TMR (50 nM, 18 h, 4°C), et standard SP (5 h, 20°C). Mesure de la fluorescence après lavage avec le lecteur Envision à 485/535 nm, n=3 réplicats.

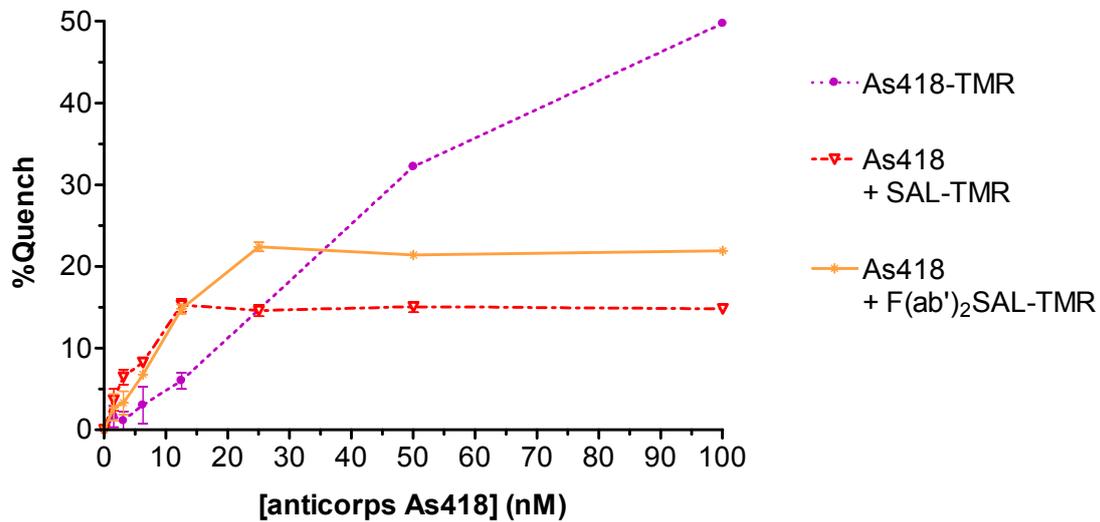


Figure 58 : Quenching du tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine avec l'anticorps polyclonal As 418 lié à la TMR ou révélé avec l'anticorps SAL-TMR

Test de dilution de l'anticorps As 418-TMR ou As 418 non marqué (purifié) avec le tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine (15 nM). Mesure de fluorescence après lavage directement (pour As 418-TMR) ou après révélation avec 100 µL d'anticorps SAL-TMR ou F(ab')₂SAL-TMR (50 nM, 2 h, RT). h, RT sous agitation).

L'utilisation de l'anticorps AcM SP19 autorise la mesure de concentrations plus faibles par rapport à l'anticorps SP31 avec un EC50 légèrement plus bas (Figure 57, p.155) ; en revanche les anticorps SP14 et SP24 fournissent un EC50 supérieur (de 2 fois environ) qui est probablement relié à une plus faible affinité relative envers la SP par rapport au tripode.

Malgré une limite de quantification plus faible, l'utilisation de l'anticorps SP19 ne semble cependant pas avantageuse car : (1) il est nécessaire d'utiliser une concentration plus élevée pour obtenir le même pourcentage de *quenching*, (2) l'intervalle (Fmax- Fmin) est plus faible, (3) la dissociation en tampon est plus rapide et 4) le facteur de pente de la courbe d'étalonnage de la Substance P est moins élevé.

Nous avons alors souhaité évalué la possibilité d'employer un anticorps polyclonal, plus facile d'obtention que les monoclonaux, et qui présente généralement une affinité moyenne meilleure. L'anticorps polyclonal As 418 dirigé contre la SP marqué avec la TMR fournit cependant un *quenching* inférieur aux anticorps testés précédemment, avec 48 % de *quenching* pour une concentration en anticorps de 100 nM (Figure 58, p.155). Il faut noter que le plateau de *quenching* n'est pas encore atteint pour cette concentration, indiquant probablement une forte détérioration des capacités de liaison de l'anticorps pour le tripode, peut-être due au marquage à la TMR²⁷. Nous avons également alors testé la possibilité d'utiliser l'anticorps non marqué puis de réaliser le *quenching* secondairement par incubation d'anticorps SAL (anticorps monoclonal de Souris Anti-immunoglobulines de Lapin) marqué. Si le plateau est atteint pour une concentration plus faible en anticorps As 418 (reflétant probablement une meilleure affinité de l'anticorps non marqué), le pourcentage de *quenching* maximal est plus faible qu'avec l'anticorps As 418-TMR (17 % au plateau). L'utilisation d'anticorps F(ab')₂SAL-TMR pour la révélation permet d'augmenter le *quenching* (24 % au plateau). Cette augmentation de *quenching*, inversement corrélée au ratio molaire TMR/Ac (Rf: SAL Ac entier / TMR=4,3 contre F(ab')₂ SAL / TMR=2,6), est sans doute liée à la diminution de la distance (D, A).

²⁷ Le ratio TMR/Ac (As 418) n'a pas été déterminé et l'anticorps utilisé non purifié après marquage pour des raisons pratiques (nous ne disposions malheureusement que d'une petite quantité d'antisérum).

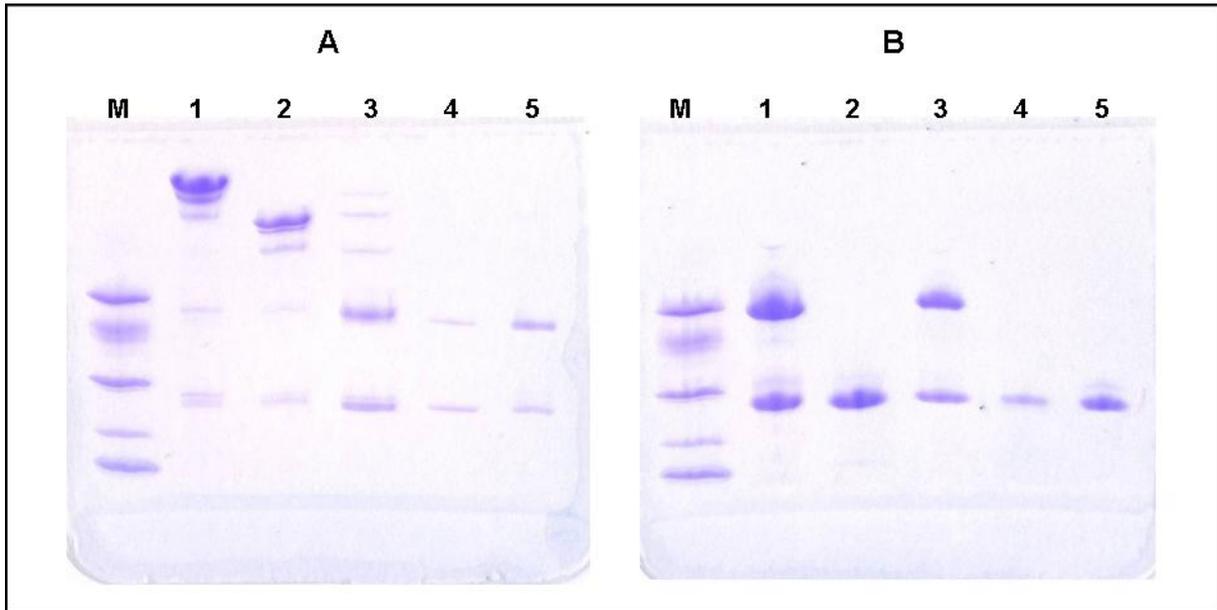
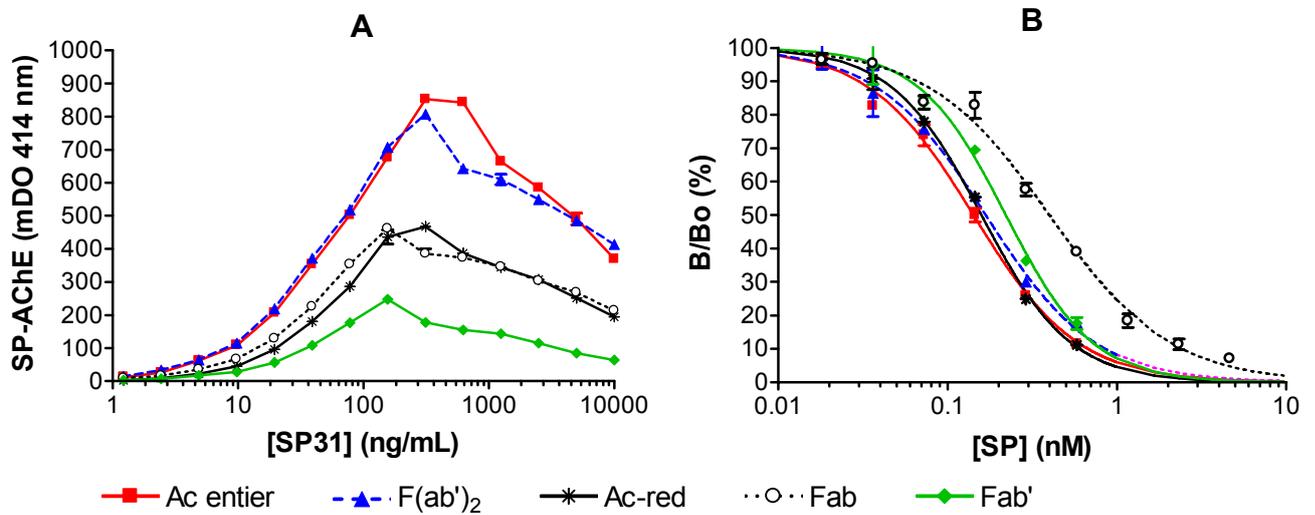


Figure 59 : Electrophorèse des différents fragments de SP31

A : sans réduction B : après réduction
 M : marqueur de taille 1 : Ac SP31 entier 2 : F(ab')₂ SP31 3 : Ac-red SP31
 4 : Fab' SP31 5 : Fab SP31



Fragment SP31	Ac entier	F(ab') ₂	Ac-red	Fab'	Fab
EC50 (nM)	0,142	0,167	0,158	0,219	0,393

Figure 60 : Capacité de liaison des fragments d'Ac SP31 biotinylés à la SP-AChE et test de déplacement

A : Test de dilution de l'anticorps SP31 biotinylé (Ac entier, F(ab')₂, Ac-red, Fab', Fab) sur plaque neutravidine avec 50 µL de solution d'Ac, 50 µL de traceur SP-AChE (2 UE/mL) et 50 µL de tampon.

B : Protocole EIA compétitif classique, avec traceur : SP-AChE à 2 UE/mL, anticorps SP31 (Ac entier, F(ab')₂, Ac-red, Fab' ou Fab) utilisé à la concentration fournissant un signal d'environ 200 mDO, et gamme de SP. (EC50 (nM) indiquées dans le tableau).

III.1.4.4. Utilisation de fragments de l'anticorps SP31

Nous avons comparé différentes formes moléculaires de l'anticorps de différente taille dans le but de diminuer la distance entre le donneur et l'accepteur afin d'optimiser le transfert d'énergie entre les deux molécules. Pour cela, nous avons produit différents fragments d'anticorps à partir de l'anticorps entier SP31 (150 kDa). Il s'agit des fragments $F(ab')_2$ (100 kDa) produit par pepsinolyse de l'anticorps entier, Fab' (56 kDa) et Ac-red (pour anticorps réduit, 75 kDa) issus d'une réduction ménagée respectivement du fragment $F(ab')_2$ et de l'anticorps entier, et Fab (50 kDa) produit par papainolyse à partir de l'anticorps entier. L'électrophorèse des fragments (Figure 59, p.157) met en évidence des bandes de forte intensité à 150, 100, 75, 56 et 50 kDa respectivement pour l'anticorps entier, $F(ab')_2$, Ac-red, Fab' et Fab, correspondant aux masses molaires attendues. Toutefois, l'électrophorèse révèle également la présence de composés de plus faibles masses molaires, notamment une bande à 25 kDa, de faible intensité, présente dans tous les échantillons qui correspondrait éventuellement à une réduction ou hydrolyse modérée des fragments dans les solutions.

Afin d'évaluer les capacités de liaison des fragments d'anticorps SP31 à la Substance P, nous avons effectué un test immunoenzymatique de liaison au traceur SP-AChE avec les fragments d'anticorps biotinylés sur une plaque revêtue de neutravidine (Figure 60-A, p.157). Le décalage des courbes vers la droite traduit la plus faible capacité de liaison à la neutravidine des fragments par rapport à l'anticorps entier. Les fragments de l'anticorps présentent également une moins bonne affinité pour la SP-AChE (diminution de la hauteur du pic). Si les $F(ab')_2$ conservent tout de même une très bonne capacité de reconnaissance pour la SP-AChE, quasi similaire à celle de l'anticorps entier, les Ac-red et les Fab perdent quasiment un facteur 2, tandis que les Fab' montrent une capacité de reconnaissance encore plus faible. On remarque que les fragments conduisant aux signaux les plus faibles sont monovalents (présentant un seul site de liaison). Il a été montré qu'il existe un phénomène de coopérativité entre sites qui stabilise la liaison avec l'antigène (correspondant à la notion d'avidité). Cependant il est peu probable que ce phénomène puisse expliquer une telle distorsion. Il est peut-être possible que la biotinylation ait affecté les capacités de reconnaissance des fragments.

Le test EIA par compétition avec la SP (Figure 60-B, p.157) révèle un EC50 plus faible avec les fragments Fab et Fab' qu'avec l'anticorps entier, tandis que le dosage avec les fragments Ac-red et $F(ab')_2$ a une sensibilité proche de celle obtenue avec l'anticorps entier. La

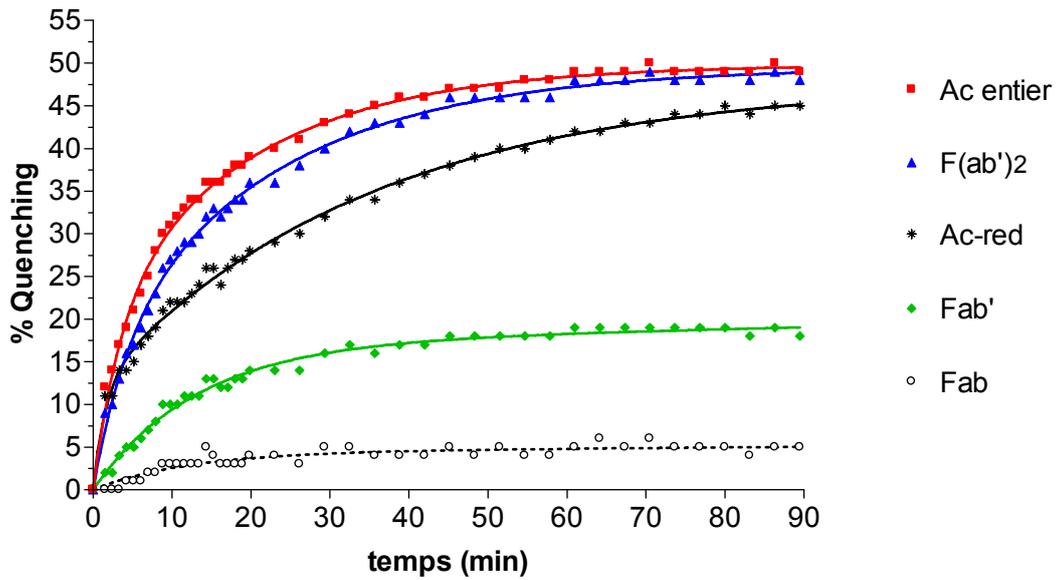


Figure 61 : Cinétique de quenching du tripode Ala¹⁰SP-Fluorescéine par l'anticorps SP31-TMR entier ou les fragments F(ab')₂, Ac-red, Fab' et Fab

Incubation du tripode (5 nM ; 18 h, 4°C), lavage puis dépôt à t=0 de l'AcM SP31-TMR [anticorps entier, F(ab')₂, Ac-red, Fab' et Fab] sur plaque neutravidine (100 nM). Mesure de la fluorescence en cinétique avec le lecteur Envision à 485/535 nm, 1 mesure/55 sec durant 20 min puis 1 mesure/3 min. Courbe : régression exponentielle à 2 phases.

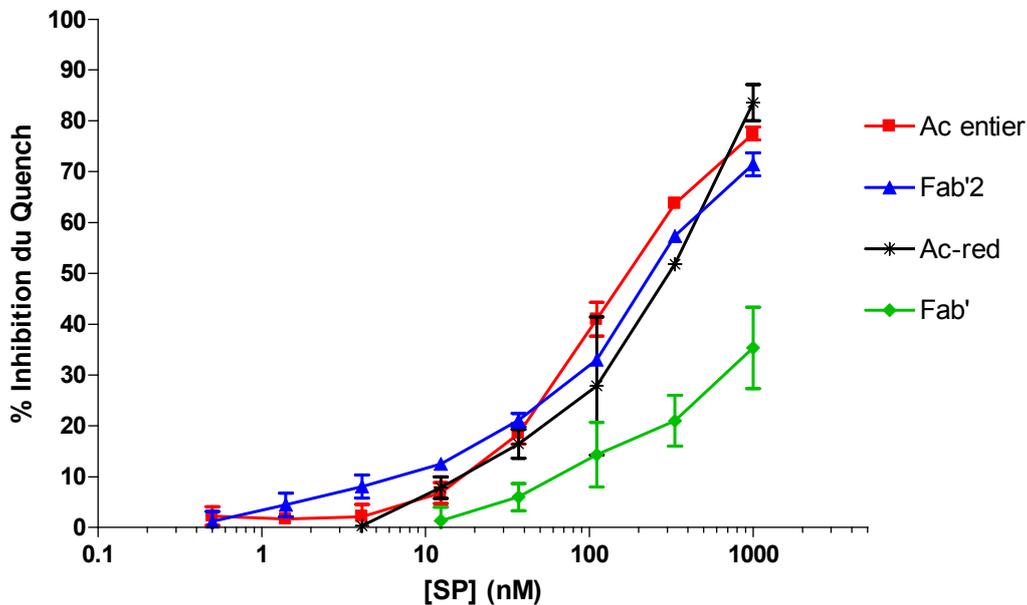


Figure 62 : Courbe d'étalonnage de la SP avec l'Ac SP31-TMR entier ou F(ab')₂, Ac-red, Fab' et Fab

Protocole SPIT-FRI standard avec tripode Ala¹⁰SP-Fluorescéine à 25 nM, anticorps SP31-TMR à 100 nM, n=3 réplicats/concentration.

diminution est plus importante pour le fragment Fab (diminution d'un facteur 3) que pour le fragment Fab' (diminution d'un facteur 2).

Le marquage des fragments de l'anticorps SP31 avec la TMR, effectué dans les conditions de couplage standard avec 50 moles de la TMR/mole d'anticorps, conduit à l'obtention de rendements d'incorporation différents : 3,2 ; 1,2 ; 2,6 ; 1,1 et 0,8 respectivement pour l'anticorps entier, F(ab')₂, Ac-red, Fab' et Fab.

Nous avons ensuite comparé le *quenching* du tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine par les différents fragments d'anticorps marqués avec la TMR. La Figure 61 (p.159) présente la cinétique de *quenching* du tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine par les différents fragments de l'anticorps SP31 marqués à la TMR (à la même concentration molaire) pendant 90 min sur une phase solide revêtue de tripode Ala¹⁰SP-Fluorescéine (faible densité). Le fragment F(ab')₂ qui présente un ratio TMR/Ac plus de 2,5 fois plus faible que l'anticorps entier, fournit malgré une cinétique un peu plus lente un *quenching* quasiment équivalent à celui-ci, avec un plateau de *quenching* à 50%. Cette faible distorsion en terme de *quenching*, alors que le ratio TMR/Ac est plus faible, est peut-être lié à une distance (D,A) plus faible dans le cas du fragment F(ab')₂ ; toutefois ce raisonnement n'est pas applicable pour les fragments Fab' et Fab de petite taille mais qui ne génèrent qu'un *quenching* très faible (15 % et 5 % de *quenching* respectivement). Le fragment Ac-red fournit un *quenching* intermédiaire, un peu plus faible (45 %) que F(ab')₂. Les mêmes résultats sont obtenus avec différentes concentrations en anticorps.

L'utilisation de fragments monovalents Fab' pour le dosage entraîne une forte augmentation de l'EC50 par rapport à l'anticorps entier (EC50 13 fois supérieure), soit une distorsion beaucoup plus forte que pour le test immunoenzymatique compétitif (EC50 1,5 fois plus élevée pour les Fab' que pour l'anticorps entier). L'emploi des fragments Ac-red et F(ab')₂ permet en revanche d'atteindre une sensibilité presque équivalente à l'anticorps entier en terme d'EC50 (Figure 62, p.159).

Les résultats ne sont pas évidents à interpréter car ils tiennent compte de plusieurs paramètres, notamment du nombre de fluorophore par anticorps, de l'affinité des anticorps pour le tripode, de leur valence et avidité et de la distance moyenne entre donneurs et accepteurs. Il est difficile dans ces conditions d'établir à partir de cette comparaison une relation directe entre la forme moléculaire de l'anticorps et l'efficacité du FRET. De plus, les sites d'incorporation des fluorophores sur les sites amines des anticorps peuvent également différer. Le marquage fluorescent a été effectué sur les fragments d'anticorps en raison de la dégradation potentielle

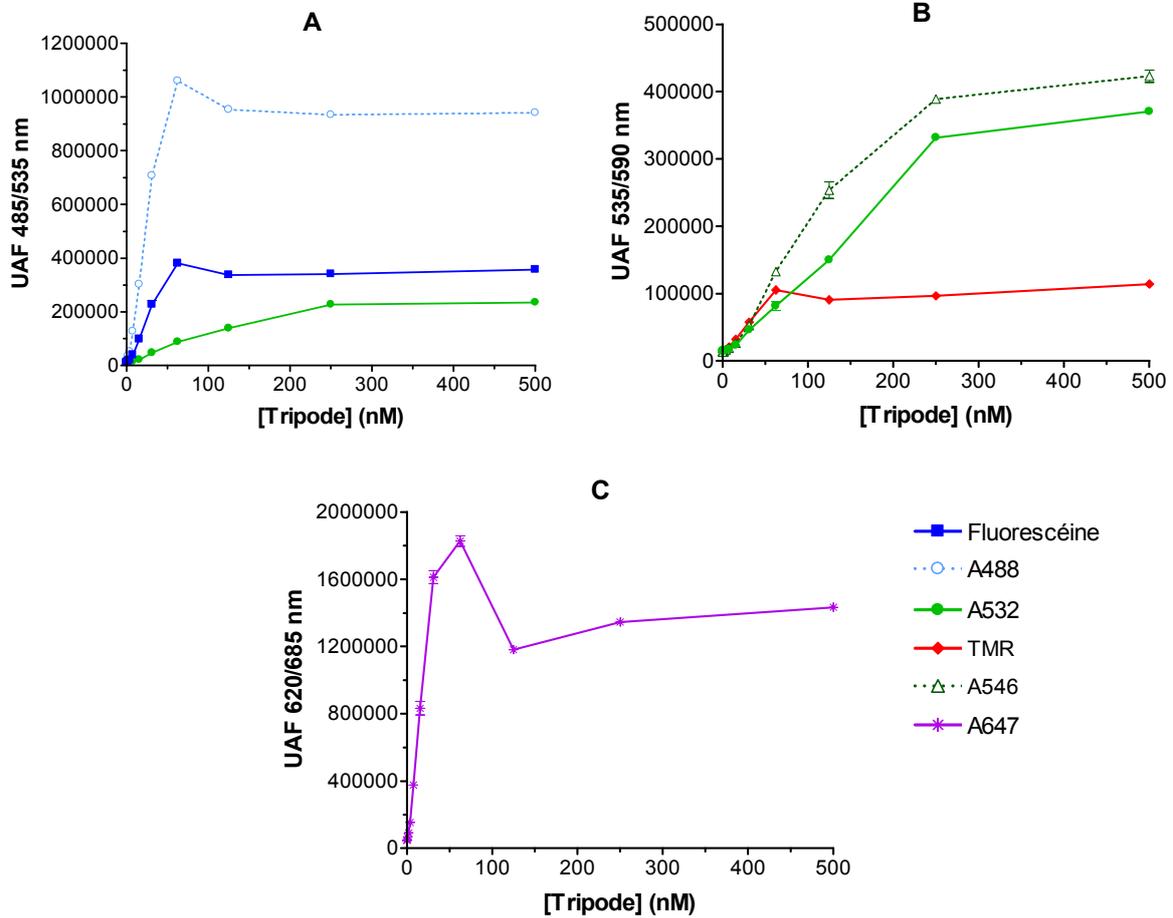


Figure 63 : Gammes de tripodes Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine, A488, A532, A546, TMR et A647

A : mesure à 485/535 nm

B : mesure à 535/590 nm

C : mesure à 620/685 nm

Incubation de 100 µL/puits de tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine, A488, A532, A546, TMR ou A647 à différentes concentrations en PVP durant 2 h (RT), mesure de la fluorescence après lavage et ajout de 100 µL/puits de tampon Phosphate 0,1 M pH 8,5 (lecteur Envision).

des fluorophores durant les hydrolyses enzymatiques et réductions. Cependant, il serait peut-être possible de réaliser les hydrolyses après le marquage, ce qui permettrait de s'assurer de la conservation des sites d'incorporation de la TMR sur l'anticorps.

III.1.4.5. Comparaison de plusieurs couples (donneur, accepteur)

Nous avons comparé différents couples (donneur, accepteur) choisis en fonction du recouvrement du spectre d'émission du donneur et du spectre d'absorption de l'accepteur, dans la limite des filtres dont nous disposons (485/535 nm, 535/590 nm, 620/685 nm). Nous avons choisi d'utiliser comme fluorophores (D et A) la Fluorescéine, la TMR, et des Alexas (A488, A532, A546, A647) qui présentent une meilleure stabilité au photoblanchiment que les fluorophores classiques. Nous avons également testé comme accepteur des molécules *quencher*s non fluorescentes (Dabcyl, QSY7, QSY21). Afin d'estimer la capacité de transfert des différents couples envisagés, nous avons calculés l'aire de recouvrement J entre les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur ainsi que la grandeur R_0 caractérisant la distance à laquelle se produit 50 % du transfert d'énergie à partir des spectres des fluorophores libres (Tableau 12, p.163). Plusieurs couples présentent des R_0 supérieurs à celui du couple de référence Fluorescéine/TMR ($R_0=61,1 \text{ \AA}$), notamment le couple A647/A680 avec un R_0 de 82,5 \AA .

Le peptide Ala¹⁰SP-biot a été marqué avec chacun des fluorophores dans les mêmes conditions que décrites pour la Fluorescéine (cf p.120), avec un rapport R=10 moles de fluorophores/mole de peptide, puis purifié par HPLC. Comme précédemment, les mesures ont été réalisées avec 100 μL de tampon de lecture²⁸. La fluorescence augmente avec la concentration de tripode, le plateau étant atteint généralement pour 62,5 nM de tripode²⁹. Nous constatons que la fluorescence est presque 3 fois plus élevée pour le tripode Alexa 488 par rapport au tripode Fluorescéine (dans les mêmes conditions de mesure). Les Alexas A532 et A546 génèrent une fluorescence respectivement 3,5 et 4 fois plus intense que la TMR. Par ailleurs, il est intéressant de noter que la fluorescence du tripode Alexa 532 est élevée à 485/535 nm, correspondant aux 2/3 du signal du tripode Fluorescéine. Pour certains fluorophores, le signal de fluorescence devient plus faible pour les fortes concentrations en

²⁸ La mesure à sec en glycérol et après chauffage à 37°C (15 min) conduit à l'augmentation du signal de la Fluorescéine et de la TMR (+138% et +118%), mais n'a aucun effet ou entraîne une légère diminution du signal pour les autres fluorophores.

²⁹ Pour les tripodes A532 et A546, la concentration nécessaire pour atteindre le plateau est plus élevée probablement en raison d'une sous-estimation de la concentration en tripode.

Tableau 12 : Valeurs de l'aire de recouvrement J et du Ro pour les couples (D,A) testés

J exprimé en $10^{-14} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^3$ (ligne du haut) et Ro exprimé en Å (ligne du bas) calculés à partir des spectres d'absorbance et d'émission des fluorophores libres selon les équations [11] et [12] indiquées p.100.

D \ A	Dabcyl	A532	A546	TMR	QSY7	A647	A680	QSY21
Fluorescéine	5,7 43,6 Å	34,3 58,8 Å	38,5 60,0 Å	43,1 61,1 Å	38,6 60,0 Å			
A488	5,6 44,8 Å	36,1 61,1 Å	38,5 61,7 Å	43,7 63,0	37,8 61,5 Å			
A532			59,0 64,5 Å	49,9 62,7 Å	73,1 66,9 Å	50,0 62,3 Å	13,6 50,6 Å	29,1 57,4 Å
A546						80,4 70,0 Å	39 60,2 Å	46,2 63,8 Å
TMR						93,7 71,8 Å	39,6 60,4 Å	52,4 50,2 Å
A647							293,8 82,5 Å	138,8 72,8 Å

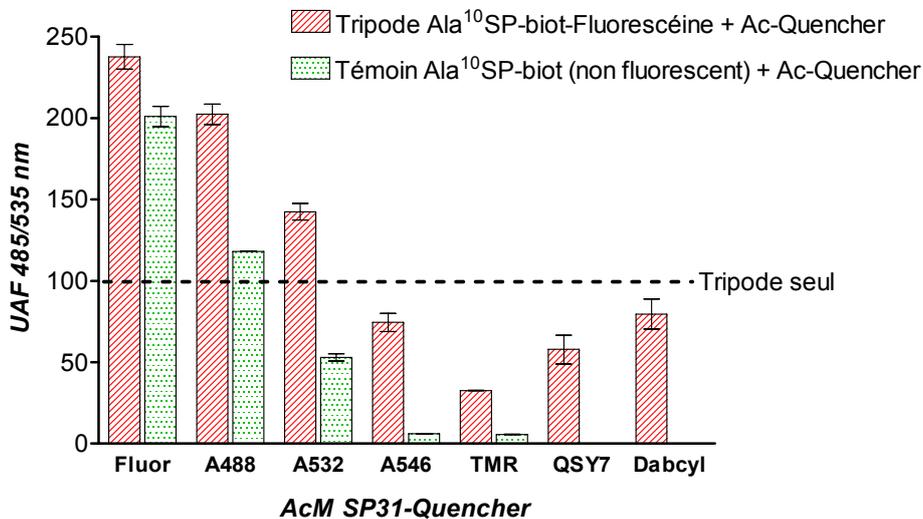


Figure 64 : Effet de la fluorescence de l'anticorps sur le quenching sur phase solide (tripode Fluorescéine)

Protocole : Incubation séquentielle (100 μL /puits, 18h, 4°C) du tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine ou du peptide Ala¹⁰SP-biot (50 nM) et de l'anticorps SP31-Fluorescéine, A488, A532, A546, TMR, QSY7 et Dabcyl (100 nM) sur plaque neutravidine. Mesure de la fluorescence après lavage à 485/535 nm.

Fluorescence exprimée en % par rapport à la fluorescence du tripode.

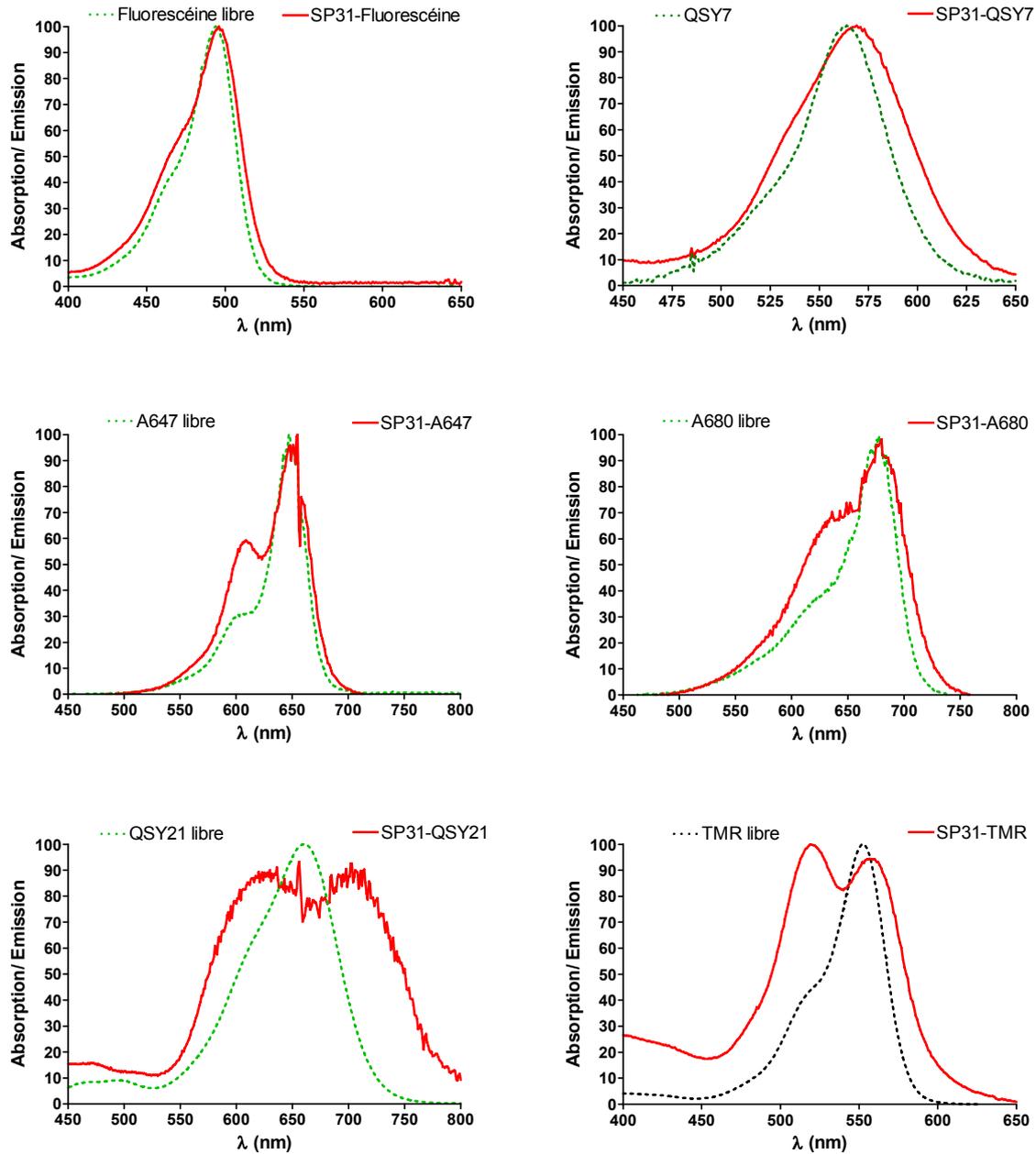


Figure 65 : Spectres d'absorbance des marqueurs Fluorescéine, QSY7, A647, A680, QSY21 et TMR libres et liés à l'AcM SP31-TMR

Spectres des marqueurs libres ou liés à l'anticorps AcM SP31 (rapport de couplage R=10 moles de marqueur/mole d'Ac sauf pour la TMR, R=50) après purification de l'Ac par chromatographie. Mesure avec le spectrophotomètre UV/visible en tampon Phosphate 0,1 M pH 7,4 NaN₃ 0,01 %.

tripode, reflétant l'*autoquenching* du fluorophore, particulièrement important pour l'Alexa 647.

L'AcM SP31 a été marqué avec les différents fluorophores ou *quencher*s avec un rapport de couplage $R=10$ moles de marqueur par mole d'Ac, excepté avec la TMR pour laquelle on emploie un rapport R de 50 en raison d'une réactivité plus faible. Les rapports d'incorporation sur l'Ac varient selon les marqueurs, avec 1,7 ; 2,2 ; 1,6 ; 3,2 ; 8 ; 10 ; 1,25 ; 1,9 et 1,1 moles d'accepteur/mole d'anticorps respectivement pour la Fluorescéine, l'A488, l'A532, l'A546, la TMR, l'A647, l'A680³⁰, le Dabcyl, le QSY7 et le QSY21³¹. Nous constatons pour tous les marqueurs un décalage de quelques nanomètres (1 à 5 nm) vers le rouge des spectres d'absorbance des marqueurs liés à l'Ac par rapport aux marqueurs libres. De plus, nous observons une augmentation (d'importance variable) du rapport des absorbances au niveau de l'épaule du pic d'absorbance du marqueur (voir spectres sur la Figure 65, p.164), pour les marqueurs Fluorescéine, QSY7, A647, A680, TMR et QSY21 (de l'effet le plus faible au plus fort). Ce phénomène est probablement lié à la formation de dimères entre deux molécules fixées sur un même anticorps (comme précédemment mentionné pour la TMR, voir p.123). La modification de spectre d'absorbance de l'accepteur a pour conséquence une modification de l'aire de recouvrement avec le donneur (dont nous n'avons pas mesuré de changement notable du spectre d'émission avec le marquage du tripode) ainsi que de la valeur R_0 . Ainsi, pour le couple A532/A680 par exemple, le R_0 théorique calculé à partir des spectres des fluorophores libres (50,6 Å) devient nettement élevé lorsque l'on considère le spectre de l'anticorps SP31-A680 (66,1 Å). Il en va de même, dans une moindre mesure, avec le couple A532/A647 qui présente un R_0 de 62,3 Å avec le marqueur libre contre 65,5 Å avec l'anticorps SP31-A647.

Le Tableau 13 (p.166) présente le pourcentage de *quenching* maximal ($\%Q_{\max}$) obtenu au plateau pour les différents couples présentant un *quenching* significatif après l'ajout d'anticorps. Ayant constaté une décroissance du *quenching* avec la densité en tripode, l'expérience a été effectuée avec une concentration en tripode élevée (50 nM).

Les taux de *quenching* les plus élevés (supérieurs à 80 %) sont obtenus en utilisant les Alexas A647 et A680 comme accepteurs, que ce soit avec le tripode A532, TMR, A546 ou A647.

³⁰ Le ratio d'incorporation de 10 obtenu pour l'AcM SP31-A680 est probablement surestimé puisqu'il impliquerait un rendement de 100% (rapport de couplage de 10) alors qu'on détecte une partie du fluorophore demeurée libre.

³¹ Les *quencher*s QSY7 et QSY21 n'ont pu être solubilisés complètement avant marquage (présence d'un précipité) ce qui pourrait être à l'origine des rendements de marquage relativement faibles.

Tableau 13 : Pourcentage de *quenching* maximal des couples (D,A) testés

%*Quenching* maximal obtenu par test de dilution de l'anticorps SP31-Accepteur (A546, TMR, QSY7, Dabcyl, A647, A680, QSY21) avec le tripode Ala¹⁰SP-biot-Donneur (Fluorescéine, A488, A532, A546, TMR, A647) employé à 50 nM sur plaque neutravidine (incubations séquentielles de 18 h à 4°C). Mesure à 485/535 nm (*), 535/590 nm (**) ou 620/685 nm (***)

Les cases non remplies (-) fournissent une valeur de *quenching* (apparent) nulle ou négative ; nd : non déterminé.
En rouge : %*Quenching* max > 70%

D \ A	Dabcyl	A532	A546	TMR	QSY7	A647	A680	QSY21
Fluorescéine (*)	10,1	-	18,9	76,6	45,9	nd	nd	nd
A488 (*)	9,9	-	15,3	58,4	26,6	nd	nd	nd
A532 (*)	nd	-	35,5	77,2	50,4	82,6	83,0	15,9
A532 (**)	nd	-	-	-	48,1	84,9	83,6	20,8
A546 (**)	nd	nd	-	-	31,5	80,2	83,0	14,0
TMR (**)	nd	nd	-	-	47,3	84,6	81,0	9,5
A647 (***)	nd	nd	nd	nd	nd	-	81,4	6,0

Tableau 14 : EC50 (nM) obtenu avec les couples (D,A) sélectionnés

EC50 (nM) obtenus avec l'anticorps SP31-Accepteur (A546, TMR, QSY7, Dabcyl, A647, A680, QSY21) et le tripode Ala¹⁰SP-biot-Donneur (Fluorescéine, A488, A532, A546, TMR, A647) employé à 50 nM sur plaque neutravidine. Mesure à 485/535 nm (*), 535/590 nm (**), ou 620/685 nm (***)

En rouge : couples sélectionnés.

Donneur \ Accepteur	TMR	A647	A680
Fluorescéine (*)	80 nM	nd	nd
A532 (*)	76 nM	92 nM	415 nM
A546 (**)	nd	230 nM	>500 nM
TMR (**)	nd	80,7 nM	354 nM
A647 (***)	nd	nd	75 nM

Cette grande efficacité de transfert est probablement due au fort coefficient d'extinction molaire de ces molécules, et comme nous l'avons vu, à la modification des spectres d'absorbance ayant pour conséquence une augmentation du Ro. Le couple A532/TMR se situe juste après, avec un *quenching* de 77,7 % pour une mesure à 485/535 nm (aucun *quenching* n'est mesuré pour une mesure à 535/590 nm). Le couple « de référence » Fluorescéine/TMR génère un *quenching* du même ordre de grandeur (76,6 %). En revanche, le *quenching* est faible pour le Dabcyl qui présente en effet un faible taux de recouvrement de la Fluorescéine et de l'A488 ; les marqueurs QSY7 et QSY21, alors que le recouvrement J est élevé, ne permettent pas non plus l'obtention d'un *quenching* élevé. Pour certains couples (Fluorescéine/A532, A488/A532), la fluorescence est même plus élevée avec l'anticorps que sans. Comme l'illustre la Figure 64 (p.163), l'emploi d'un peptide Ala¹⁰SP-biot non fluorescent à la place du tripode met en évidence la fluorescence de l'A532 aux longueurs d'onde de mesure, masquant complètement le *quenching*. Il en est de même lorsque l'on utilise le même fluorophore comme donneur et accepteur ; après soustraction de la fluorescence intrinsèque de l'anticorps, on observe un *quenching* positif, probablement dû à l'*autoquenching* des molécules de Fluorescéine. Dans une moindre mesure, on observe que la TMR fluoresce légèrement à 485/535 nm. Ainsi, lorsque l'anticorps couplé à l'accepteur présente une fluorescence non négligeable, le pourcentage de *quenching* calculé ne reflète pas directement l'efficacité du transfert.

Les 9 couples fournissant un *quenching* supérieur à 70% ont été testés en déplacement avec la Substance P. Les couples Fluorescéine/TMR, A532/TMR (mesure à 485/535 nm), A532/A647 (mesure à 485/535 nm ou 535/590 nm), TMR/A647 et A647/A680 sont équivalents en terme de sensibilité (EC50 de 80 nM environ avec une concentration en tripode de 50 nM), les 4 autres couples donnant lieu à des EC50 supérieures. Un test de dilution d'anticorps SP31 marqué avec les fluorophores sur une plaque revêtue d'anticorps CAS en présence de SP-AChE révèle que les anticorps SP31-TMR et A647 ont conservé une bonne capacité de liaison avec la SP (légère diminution de la reconnaissance par le CAS) mais l'anticorps SP31-A680 a perdu une partie de ses capacités de liaison à la SP (signal maximal à hauteur de la moitié du signal de l'anticorps non marqué) ce qui pourrait expliquer la moins bonne sensibilité obtenue avec cet anticorps (il autorise toutefois une bonne sensibilité avec le tripode A647).

Le couple Fluorescéine/TMR reste donc parmi les couples (D,A) les plus performants à la fois en terme de *quenching* et de déplacement.

III.1.5. Discussion – conclusion

- *Vérification du principe*

Nous avons montré que le procédé SPIT-FRI pouvait être appliqué avec succès en plaque de microtitration sur le modèle de la Substance P, petit peptide de 11 acides aminés. La liaison de l'anticorps SP31-TMR sur le tripode fixé sur la phase solide (*via* une liaison neutravidine-biotine) entraîne une diminution du signal de la Fluorescéine portée par le tripode du fait du phénomène de FRET se produisant entre les deux fluorophores ; l'ajout d'analyte (SP) conduit à une augmentation du signal proportionnelle à la concentration. Par ailleurs, nous avons montré que ce procédé autorisait la régénération de la phase solide, plusieurs dosages ayant été effectués successivement sur une même phase solide après une nouvelle incubation de l'anticorps-accepteur dans les puits. Nous avons constaté une limitation potentielle du nombre de régénérations du fait du photoblanchiment des molécules de tripode, phénomène qui a pu être évité par l'emploi d'une lampe flash comme source d'excitation.

- *Sensibilité du dosage*

Différents paramètres ont été étudiés pour optimiser les qualités de ce dosage (nature du tampon, température et durée des incubations, concentration en tripode). Nous avons mis en évidence l'influence de la densité de tripode à la surface sur le *quenching*, la gamme dynamique de signal (Fmax-Fmin) diminuant avec la densité en tripode du fait de la diminution conjointe de Fmax et du *quenching*. Toutefois, l'emploi d'une faible densité en tripode permet d'améliorer la sensibilité du dosage (diminution de l'EC50).

Dans les conditions optimisées ([tripode]=5 nM), le dosage SPIT-FRI de la SP avec le couple (Fluorescéine, TMR) présente une EC50 de 35 nM, soit 230 fois supérieure à celle obtenue avec le dosage EIA par compétition de référence (EC50 de 0,15 nM) employant comme traceur la SP-AChE. Cette différence est due au format utilisé, puisque dans le dosage EIA compétitif, traceur et standard sont incubés simultanément exerçant une compétition vis-à-vis des sites de liaison de l'Ac, tandis que dans le SPIT-FRI, l'étape de déplacement par l'analyte ne s'effectue qu'après la formation du complexe analogue-anticorps.

La phase solide étant le siège du signal, la limite de détection (de 4 nM dans ces conditions) peut être diminuée avec l'incubation successive de la solution de standard sur la même phase solide (« effet cumulatif »).

- *Choix du couple (D,A)*

Si plusieurs couples (D, A) se sont révélés fonctionnels pour ce dosage, nous utiliserons par la suite préférentiellement le couple (Alexa 532, Alexa 647) pour plusieurs raisons. Tout

d'abord, ce couple a fourni un *quenching* très élevé (85 %) qui peut s'expliquer par le recouvrement spectral important des spectres d'excitation de l'A532 et d'émission de l'A647, la très faible fluorescence de l'A647 aux longueurs d'onde de mesure de l'A532 et le fort coefficient d'extinction molaire de l'A647. De plus, la lecture peut être réalisée aussi bien à 535/590 nm qu'à 485/535 nm, ce qui permet une plus grande flexibilité en terme de source d'excitation utilisée. Par ailleurs, les Alexas sont très peu sensibles aux variations de pH entre 4 et 10, et plus résistants au photoblanchiment que les fluorophores « traditionnels » (Fluorescéine, TMR). Enfin, il nous semble intéressant de conserver une molécule fluorescente comme accepteur (et non une molécule *quencher*, tel que QSY 21 par exemple) pour se réserver la possibilité de mesurer le cas échéant sa fluorescence directement à 620/685 nm (témoin de la présence de l'anticorps).

Nous avons constaté que les spectres (principalement d'absorbance) étaient susceptibles d'être modifiés suite au marquage des molécules avec les fluorophores, cette modification se répercutant sur le recouvrement spectral du donneur et de l'accepteur.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent que pour tous les couples étudiés, un pourcentage de *quenching* plus élevé pourrait être obtenu en choisissant des filtres à l'excitation et à l'émission avec des bandes passantes précises et restreintes permettant de s'affranchir de la fluorescence de l'accepteur aux longueurs d'onde de mesure.

- *Mesure sur phase solide*

La diminution du signal sur phase solide allant de paire avec une diminution du *quenching*, les faibles concentrations en tripode (inférieures à 25 nM) sont difficiles à détecter dans ces conditions expérimentales. La mesure du signal après chaque étape d'incubation (tripode, anticorps et analyte) a permis d'améliorer la qualité des réplicats grâce à la normalisation du signal qui est pondéré en fonction du signal initial pour chaque puits. Toutefois cette triple mesure entraîne une importante lourdeur expérimentale du procédé.

La durée des étapes préliminaires au dosage proprement dit (déplacement par l'analyte) a pu être limitée à 1 h pour le tripode et 2 h pour l'anticorps, au lieu de deux fois 18 h initialement, sans affecter la sensibilité du dosage ; de plus, les phases solides peuvent être conservées en glycérol après incubation de l'anticorps. Par ailleurs, nous avons montré qu'une analyse cinétique des signaux pouvait être effectuée sur les quinze premières minutes de déplacement, en mesurant la pente à l'origine de la courbe. Cette méthode d'analyse peut permettre d'accélérer le procédé et de s'affranchir des mesures de contrôle effectuées pour les faibles concentrations.

La qualité du signal sur phase solide et le pourcentage de *quenching* sont probablement encore perfectibles *via* notamment une amélioration de la technique de mesure sur phase solide (augmentation du rapport signal/bruit) et une meilleure adéquation des filtres à l'excitation et à l'émission avec le couple (tripode-donneur ; anticorps-accepteur). La qualité du dosage dépend aussi fortement de la nature des réactifs, en particulier du choix de l'analogue et de l'anticorps.

- *Choix de l'analogue et de l'anticorps*

Si l'affinité de l'anticorps envers le tripode doit être limitée pour autoriser un déplacement par l'analyte, elle doit être suffisante pour permettre la formation d'un complexe tripode-anticorps stable, condition nécessaire à l'obtention du *quenching*. Pour exemple, l'utilisation de la SP comme analogue pour le tripode conduit à la formation d'un complexe anticorps SP31-tripode d'une telle stabilité qu'il ne peut être déplacé, même avec une concentration élevée en analyte, tandis que l'emploi de l'analogue Ala¹⁰SP moins bien reconnu par l'anticorps SP31 permet un déplacement efficace.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence que le marquage fluorescent est susceptible d'altérer les capacités de reconnaissance de l'anticorps (ex : pour le SP31-TMR lorsque le rapport de couplage est supérieur ou égal à 100) et par voie de conséquence directe le pourcentage de *quenching*. Cependant, plus le rapport A/D est élevé, plus le *quenching* est efficace, à condition que les capacités de liaison de l'anticorps soient conservées.

De plus, l'efficacité du *quenching* dépend directement de la distance (D,A). L'utilisation d'un fragment F(ab')₂ présentant un taux de marquage plus faible que l'anticorps entier a permis l'obtention d'un *quenching* similaire à celui-ci qui peut s'expliquer par la diminution de la distance (D,A) dans le cas du F(ab')₂. Nous avons également observé une diminution importante du *quenching* lorsque l'on intercale une « couche » d'anticorps entre le tripode-Fluorescéine et l'anticorps-TMR. Cependant, à l'inverse de ce qui était attendu, l'utilisation d'un fragment d'anticorps monovalent de petite taille (type Fab ou Fab') a engendré un *quenching* plus faible que l'anticorps entier probablement en raison du rendement de marquage TMR/Ac moindre.

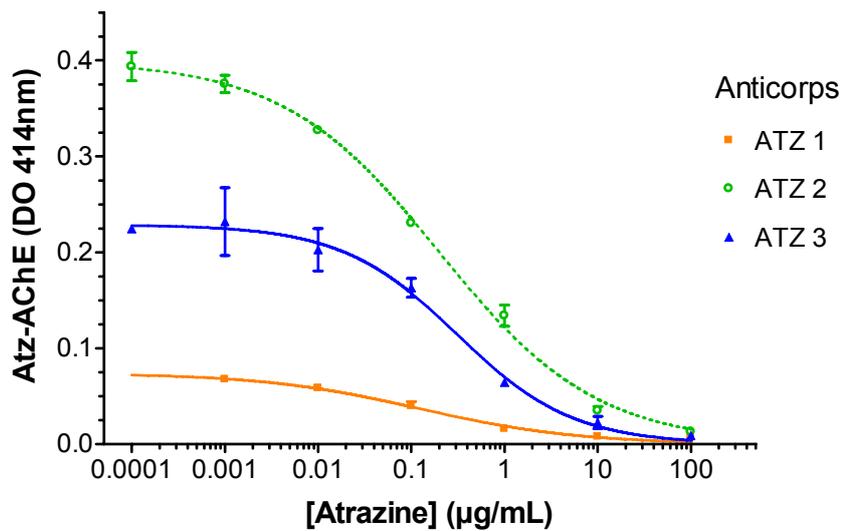
La partie suivante sera consacrée à l'évaluation de l'applicabilité du SPIT-FRI au dosage d'autres molécules de tailles variables (petites molécules chimiques et protéines) dont trois toxines.

III.2. Evaluation du SPIT-FRI sur des modèles de petites molécules chimiques et protéiques

Après avoir étudié le SPIT-FRI sur un modèle peptidique, la Substance P, nous nous sommes intéressés à l'évaluation du procédé sur d'autres molécules. Nous présenterons successivement les résultats obtenus avec des molécules chimiques de petite taille et des protéines. Pour la première catégorie, nous avons utilisé l'atrazine (Atz), petite molécule de 215,7 Da, permettant d'envisager la mesure de résidus de pesticides dans l'environnement (cf p.60), et l'aflatoxine B1 (AFB1) molécule de 312 Da, contaminant alimentaire susceptible d'être employée à des fins de terrorisme biologique (cf p.61). Nous avons choisi comme premier modèle protéique la β -Lactoglobuline ou BLg (cf p.59) car nous disposions au laboratoire de plusieurs anticorps monoclonaux affins et spécifiques dirigés contre cette molécule, et présentant comme application potentielle la mesure de traces d'allergène dans les aliments. Enfin, nous présenterons les résultats obtenus pour deux toxines, la toxine botulinique (cf p.21) et la ricine (cf p.23), choisies en raison du danger potentiel qu'elles représentent dans le cadre de la menace biologique, pour lesquelles nous avons mis au point des anticorps au laboratoire. Outre le développement du procédé proposé, cette partie s'inscrivait dans le cadre général de la thématique du laboratoire qui souhaitait disposer d'anticorps monoclonaux anti-toxines spécifiques et affins pour la mise au point de dosages et d'éventuelles applications en immunothérapie (collaboration avec l'Institut Pasteur).

III.2.1. Essais d'adaptation du SPIT-FRI à l'Aflatoxine B1 et à l'Atrazine

L'atrazine et l'aflatoxine ont été utilisés comme modèles d'étude pour l'application du SPIT-FRI à de petites molécules non peptidiques. La stratégie de mise au point du tripode que nous avons employée est relativement similaire à celle utilisée précédemment pour la Substance P ; elle est basée sur l'emploi d'un peptide biotinylé comportant des fonctions spécifiques permettant de greffer l'analogue du composé chimique et le fluorophore. Nous avons utilisé le couple de fluorophores (Alexa 532, Alexa 647) qui s'était révélé faire partie des couples les plus performants avec le modèle de la Substance P.



AcM	ATZ 1 (300 ng/mL)	ATZ 2 (150 ng/mL)	ATZ 3 (70 ng/mL)
EC50 (µg/mL)	0,116	0,227	0,281

Figure 66 : Dosage EIA compétitif avec les anticorps AcM ATZ 1, ATZ 2 et ATZ 3

Protocole standard de dosage EIA compétitif sur plaque CAS avec incubation de 50 µL d'anticorps ATZ 1 (300 ng/mL), ATZ 2 (150 ng/mL) ou ATZ 3 (70 ng/mL), 50 µL de traceur Atz-AChE (2 UE/mL) et 50 µL de standard Atz (18 h, 4°C), révélation : 2 h.

Tableau 15 : Pourcentages de réaction croisée de différentes triazines par rapport à l'atrazine pour les anticorps ATZ 1, ATZ 2 et ATZ 3

Le pourcentage de réaction croisée à partir des EC50 (nM) obtenus avec le dosage EIA compétitif (conditions expérimentales cf légende de la Figure 66 p.172)
nd : non déterminé

RC (%)	AcM1	AcM2	AcM3
Atrazine	100	100	100
Atrazine-MPA	4513	4123	93
Ametryn	nd	6822	4962
Prometron	2250	2866	2117
Prometryn	1825	2899	3094
Propazine	62	142	103
Simazine	60	27	11
Simetryn	534	734	756
Terbutryn	64	77	62
Cyanazine	1,38	0,98	1,21
Desethylatrazine	42	54	30
Terbutylazine	2,99	1,68	26
Desisopropylatrazine	3,77	4,25	564

III.2.1.1. Modèle Atrazine

III.2.1.1.1. Choix des anticorps et spécificité

Nous avons utilisé trois anticorps monoclonaux commerciaux dirigés contre l'atrazine (Atz) appelés Ac ATZ 1, ATZ 2 et ATZ 3. Les protocoles de préparation des immunogènes et les caractéristiques de spécificité des anticorps ne sont pas indiqués par les fournisseurs. Or l'atrazine est une petite molécule qui nécessite d'être couplée à une protéine porteuse pour être immunogénique. De plus, comme l'atrazine ne possède aucune des fonctions chimiques (NH₂, COOH, SH) classiquement utilisées pour le couplage, une étape de modification chimique préliminaire est nécessaire pour le préparer. Cette modification chimique va conditionner la spécificité des anticorps obtenus. La méthode de Goodrow *et al.* (cf. la publication originale de Goodrow *et al.*, 1990) étant fréquemment utilisée pour préparer un dérivé de l'atrazine comportant une fonction acide carboxylique permettant sa liaison à une protéine (voir Singh *et al.*, 2004 par exemple), nous avons pensé qu'il était probable que l'immunogène ait été préparé de cette façon.

En suivant ce protocole, un dérivé acide mercaptopropionique de l'atrazine (ou Atz-MPA) a été préparé. L'analyse au Maldi-TOF indique une masse majoritaire de 285 Da, correspondant à la masse molaire attendue. La pureté du composé synthétisée estimée par RMN révèle la présence de 10 à 20 % d'impuretés, correspondant à l'acide 3,3'-dithiopropanoïque qui est utilisé pour la dérivation de l'Atrazine (masse 210 Da). Un traceur enzymatique a alors été synthétisé par couplage de l'Atz-MPA à l'acétylcholinestérase (en tenant compte de la présence dans la solution de l'acide 3,3'-dithiopropanoïque qui contient également des fonctions acide carboxylique qui sont utilisées pour ce couplage).

Des gammes de dilutions des trois anticorps ATZ incubées avec le traceur Atrazine MPA-AChE montrent qu'ils reconnaissent ce traceur. La méthode de dérivation de l'atrazine utilisée est donc compatible avec la liaison des anticorps.

Afin de déterminer le potentiel de ces anticorps dans le cadre d'un dosage par compétition, nous avons dosé une gamme de concentration d'atrazine. Ce dosage a été effectué avec les anticorps ATZ 1, ATZ 2 et ATZ 3 à des concentrations de 200 ng/mL, 150 ng/mL et 70 ng/mL respectivement selon le protocole standard de dosage EIA compétitif (cf p.92). Les résultats sont présentés sur la Figure 66 (p.172). Les limites de quantification obtenues avec les trois anticorps (environ 80 % de signal maximal) sont de l'ordre de 10 ng/mL (soit 10 µg/L). D'ores et déjà, il était clair que cette sensibilité ne serait malheureusement pas

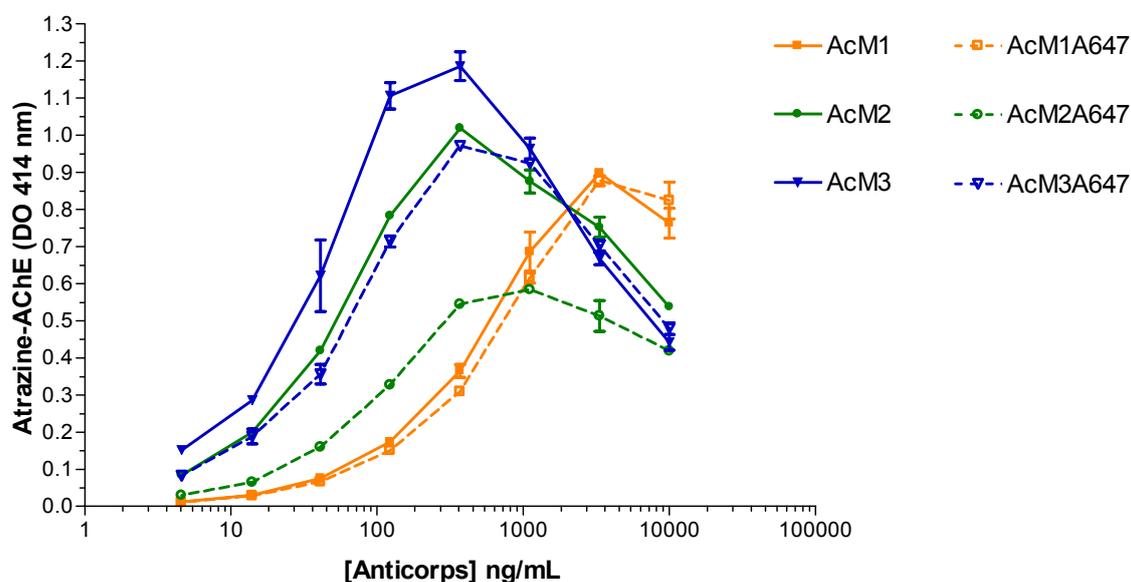


Figure 67 : Influence du marquage à l'A647 des anticorps ATZ 1, ATZ 2 et ATZ 3 sur leur capacité de liaison à l'Atz-AChE

Protocole standard de dilution d'anticorps sur plaque CAS.

Traceur : Atz-AChE (2 UE/mL) ; tampon : EIA ; incubation : 18 h à 4°C ; révélation : 1 h.

suffisante pour pouvoir envisager une application du SPIT-FRI qui serait développé avec ces anticorps. En effet, la limite de détection obtenue avec le dosage EIA compétitif est trop élevée pour déterminer si la concentration en atrazine dans des échantillons inconnus excède ou non le seuil de tolérance admis par les normes européennes (0,1 µg/L, voir au 0, p.60). Il était donc probable que le format du SPIT-FRI qui implique une liaison préalable de l'anticorps avec le traceur (tripode), et qui est donc défavorable pour la compétition de l'atrazine, fournisse un dosage encore moins sensible. Toutefois nous avons continué l'étude, car l'atrazine reste un bon modèle pour évaluer le dosage SPIT-FRI de petites molécules.

Pour étudier la spécificité du dosage avec les différents anticorps, nous avons comparé les courbes standard obtenues pour l'atrazine et pour douze analogues structuraux (triazines). Les taux de réaction croisée (RC) de chacune de ces molécules par rapport à l'atrazine (calculé selon l'équation [8] indiquée p.94) sont indiqués sur le Tableau 15 (p.172). On note que de nombreux analogues (prometron, prometryn, simetryn) ainsi que le dérivé acide mercaptopropionique de l'atrazine sont mieux reconnus que l'atrazine. L'ensemble de ces analogues possèdent un groupement méthyl à la position R₁, qui correspond au site de la modification de l'atrazine effectuée pour synthétiser le traceur et probablement l'immunogène. Ces analogues sont donc structurellement plus proches de l'immunogène que l'atrazine ce qui peut expliquer de telles réactions croisées.

III.2.1.1.2. Préparation des tripodes Atz

Nous avons utilisé deux stratégies pour obtenir le tripode Atz (protocoles décrits p.104) :

- greffage de l'analogue et du fluorophore sur le peptide T biotinylé (T pour Tripode),
- greffage de l'analogue, du fluorophore et de la biotine sur la BSA.

Le peptide T a été spécifiquement conçu pour la mise au point de tripodes. Sa séquence : Gly-Ser-Gly-Ser-Cys-Ser-Gly-Ser-Lys(Biotine)-CONH₂ (PM=995 Da, biotine incluse), comporte (i) une Lysine portant une biotine, (ii) une cystéine et (iii) une fonction amine terminale, permettant respectivement la reconnaissance de la neutravidine (via la biotine), le greffage d'un fluorophore maléimide (*via* le thiol de la cystéine), et le greffage de l'analogue (sur l'amine terminale). Nous avons dû utiliser un rapport de couplage Atz-MPA / peptideT très élevé. Malgré une purification par HPLC, le tripode fonctionnel reste contaminé par du peptide T-A532 non couplé à l'atrazine et détecté par analyse Maldi-TOF. Le faible rendement d'incorporation de l'atrazine-MPA activée sur les fonctions amines pourrait expliquer le relatif faible signal obtenu avec le traceur Atz-AChE.

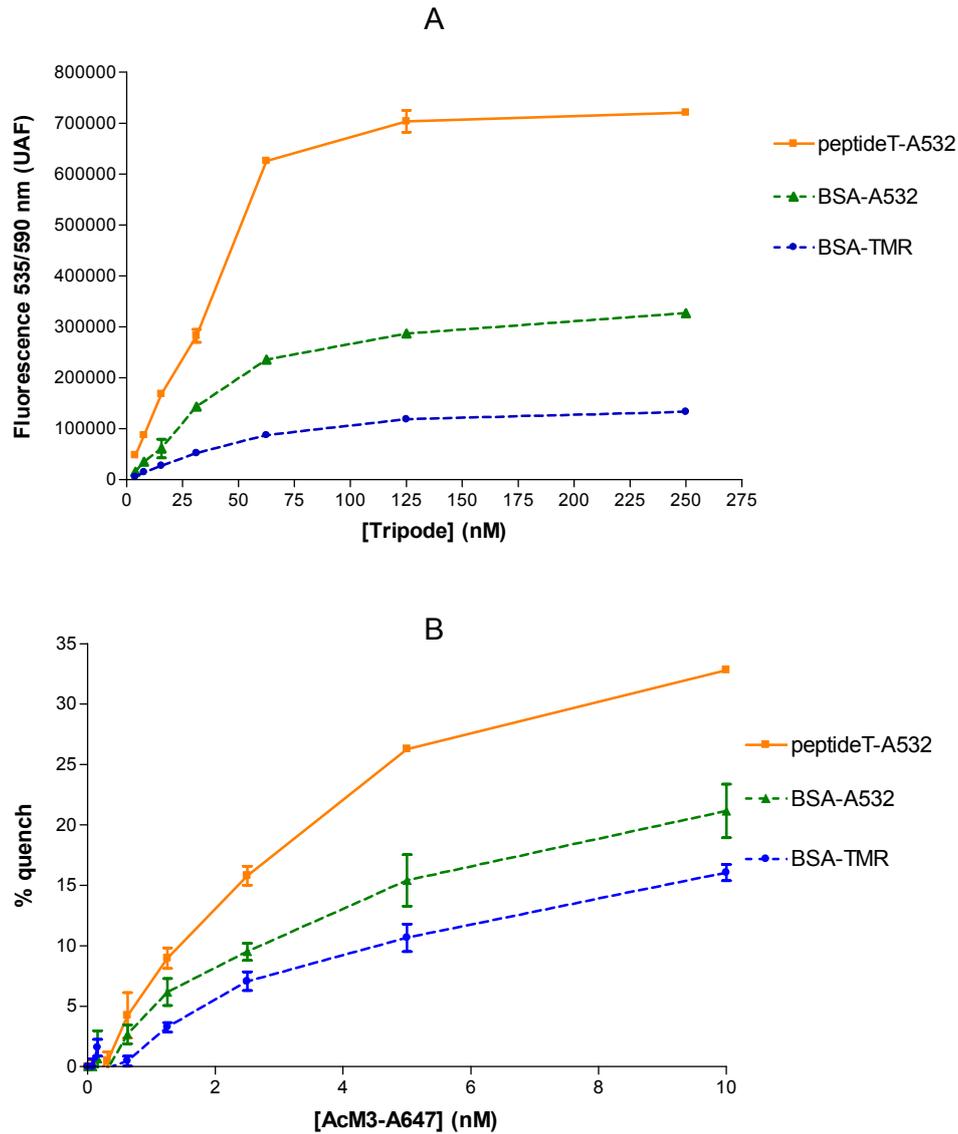


Figure 68 : Comparaison de la fluorescence sur phase solide et du *quenching* par l'anticorps AcM ATZ 3-A647 pour les tripodes peptide T-Atz-532 , BSA-Atz-A532 et BSA-Atz-TMR

A : Gamme des tripodes sur plaque neutraavidine

B : Gamme d'anticorps AcM3-A647 sur plaque revêtue de tripode

Protocole standard SPIT-FRI sur plaque neutraavidine :

(A) : incubation du tripode durant 2 h à RT

(B) : incubations en séquentiel du tripode (60 nM, 2h RT) puis de l'anticorps AcM ATZ 3-TMR (18 h, 4°C).

Mesures après lavage avec 100µL de tampon PVP à 535/590 nm.

La stratégie d'utiliser la BSA comme support, les fonctions amines libres présentes sur la protéine permettant de coupler le fluorophore et la biotine, a été effectuée en vue d'une adaptation ultérieure à des tripodes protéiques (cf III.2.2, p.185). La BSA a été marquée avec la biotine (R=2) et la TMR ou l'A532 (R=5) et purifiée par chromatographie de tamisage moléculaire (Sephadex G25), permettant d'éliminer le fluorophore et la biotine libres puis analysée au Maldi-TOF et par spectrométrie d'absorbance. Comme pour les anticorps, le marquage à la TMR induit un changement de l'allure du spectre (A518/A555), les concentrations des BSA-biot-fluorophore sont donc vérifiées par dosage protéique (BCA, voir p. 99). On observe un décalage du maximum du spectre de masse qui permet de vérifier que le marquage a bien eu lieu. L'atrazine a été couplé dans un second temps avec un ratio très élevé d'Atz-MPA permettant d'obtenir un composé qui est mieux reconnu que l'Atz-MPA seule par les anticorps, montrant que le ratio d'incorporation de l'atrazine sur la BSA est supérieur à 1 (RC= 290% avec l'Atz-MPA).

III.2.1.1.3. Tests de *quenching* par les anticorps marqués à l'A647

Le marquage des anticorps avec l'Alexa 647 (protocole cf. p.97) a fourni un ratio de 3,1 ; 3,7 et 3,6 moles d'A647 / mole d'anticorps pour les Ac ATZ 1, ATZ 2 et ATZ 3 respectivement. Le test de liaison des anticorps à l'atrazine couplée à l'acétylcholinestérase (Atz-AChE) montre que les Ac ATZ 2 et ATZ 3 ont vu leurs capacités de liaison diminuer après le marquage (Figure 67). Cependant, cette baisse n'est pas trop importante et ils demeurent fonctionnels.

• *Evaluation de l'emploi d'un tripode BSA*

Nous avons comparé les tripodes peptideT-A532, BSA-A532 et BSA-TMR en terme d'intensité de signal sur phase solide et en terme de *quenching*. Le tripode peptideT-A532 permet d'obtenir un signal le plus élevé au plateau (Figure 68, graphe A) bien que les tripodes BSA testés ici comportent davantage de fluorophores (Rf=2,5 et 3 respectivement pour l'A532 et la TMR) que le peptide (1 mole d'A532/mole de peptide).

La Figure 68-B (p.176) présente les pourcentages de *quenching* obtenus pour les différents tripodes avec l'anticorps AcM3-A647. Au plateau, nous obtenons 33 % d'inhibition du signal pour le tripode T-A532, contre 21% pour le tripode BSA-A532 et seulement 15 % pour le tripode BSA-TMR. Cette diminution du *quenching* s'explique probablement par l'augmentation du ratio fluorophore/tripode, malgré un ratio Atz/tripode supérieur. Un ratio plus faible en fluorophore sur la BSA pourrait sans doute permettre d'améliorer ce *quenching*,

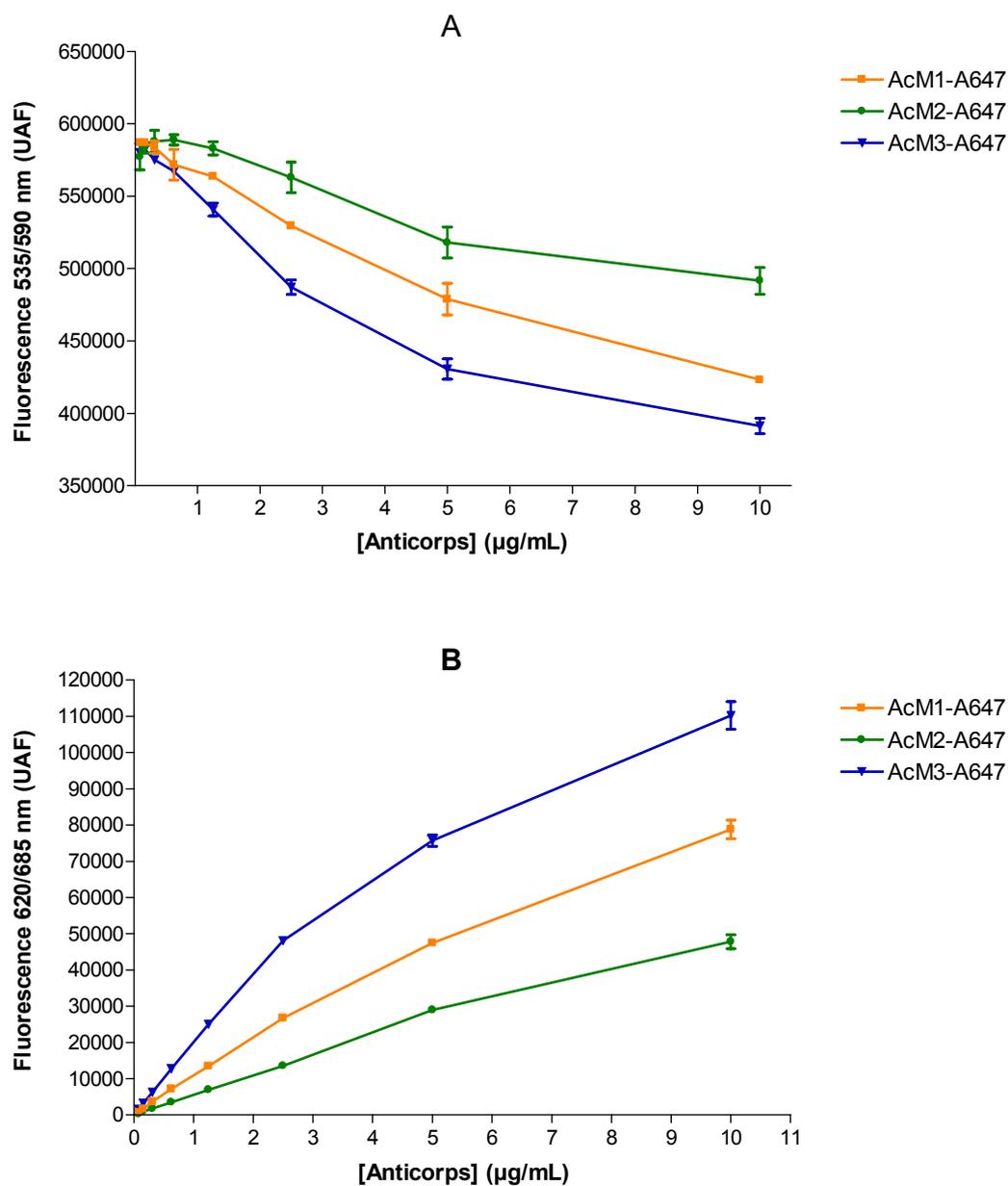


Figure 69 : Test de liaison des AcM 1, AcM 2 et AcM 3-A647 avec le tripode T-Atz-A532 avec mesure du quenching ou de la fluorescence de l'anticorps-A647

A : mesure du quenching (à 535/590 nm) ; B : mesure de la fluorescence de l'anticorps-A647 (à 620/685 nm)
 Test standard de dilution d'Ac avec incubation en séquentiel (100 µL/puits) du tripode T-Atz-A532 à 100 nM (2 h, RT) puis de l'AcM 1-A647, AcM 2-A647 ou AcM 3-A647 (18 h, 4°C). sur plaque revêtue de neutravidine. Mesure de fluorescence après lavage à 535/590 nm ou 620/685 nm.

sans que cela puisse garantir l'amélioration de la gamme dynamique de signal vu que le signal F_{max} diminuerait.

Le tripode préparé à partir du peptide T a été sélectionné pour les études ultérieures.

- *Comparaison des anticorps ATZ 1, ATZ 2 et ATZ 3 marqués avec l'A647*

La Figure 69-A (p.178) présente les résultats obtenus avec le tripode T-A532 pour les 3 anticorps marqués avec l'Alexa647. Pour une même concentration, les anticorps AcM1 et AcM2 donnent lieu à un *quenching* plus faible que l'anticorps AcM3. Nous obtenons en effet au plateau 16% et 27% de *quenching* avec AcM2 et AcM1 respectivement, contre 33 % avec AcM3.

La Figure 69 B) montre les résultats obtenus pour la même expérience avec une mesure de la fluorescence à 620/685 nm, correspondant à la fluorescence de l'A647 porté par l'anticorps. Pour une même concentration, le signal est plus élevé pour l'anticorps AcM3, que pour AcM1 et AcM2. Le résultat est donc parallèle à celui obtenu avec la mesure du *quenching* de fluorescence.

Le nombre de fluorophores par anticorps étant sensiblement équivalent pour les 3 anticorps, on peut en déduire que l'augmentation du signal fluorescent à 685 nm (ou la diminution du signal à 535 nm) correspond à un nombre plus important d'anticorps présents sur la phase solide, reflétant donc l'affinité de l'anticorps pour le tripode immobilisé.

Il est à noter que, comme observé précédemment pour la Substance P, l'emploi d'une concentration en tripode inférieure à 50 nM induit une diminution du pourcentage de *quenching*. (voir la Figure 70 présente le pourcentage de *quenching* obtenu en faisant varier les concentrations de tripode T-A532 et les concentrations d'anticorps ATZ 3-A647).

III.2.1.1.4. Déplacement par l'atrazine

Pour obtenir une gamme (F_{max} - F_{min}) suffisante pour réaliser le dosage, il est donc nécessaire d'employer le tripode et l'anticorps fortement concentrés (60 nM et 10 μ g/mL). Cependant ces conditions sont défavorables à l'obtention d'un dosage sensible du fait de la quantité importante de complexe tripode-anticorps sur la phase solide. L'atrazine ne peut être détectée que pour des concentrations très élevées (détection à partir de 10 μ g/mL). Une mesure effectuée à 620/685 nm permet de détecter l'atrazine à partir de 1 μ g/mL dans les mêmes conditions expérimentales. Cette différence peut s'expliquer par le fait que la mesure du *quenching* induit une gamme de signal dynamique (correspondant à l'intervalle F_{max} - F_{min}) plus réduite que la mesure de la fluorescence de l'anticorps à 620/685 nm.

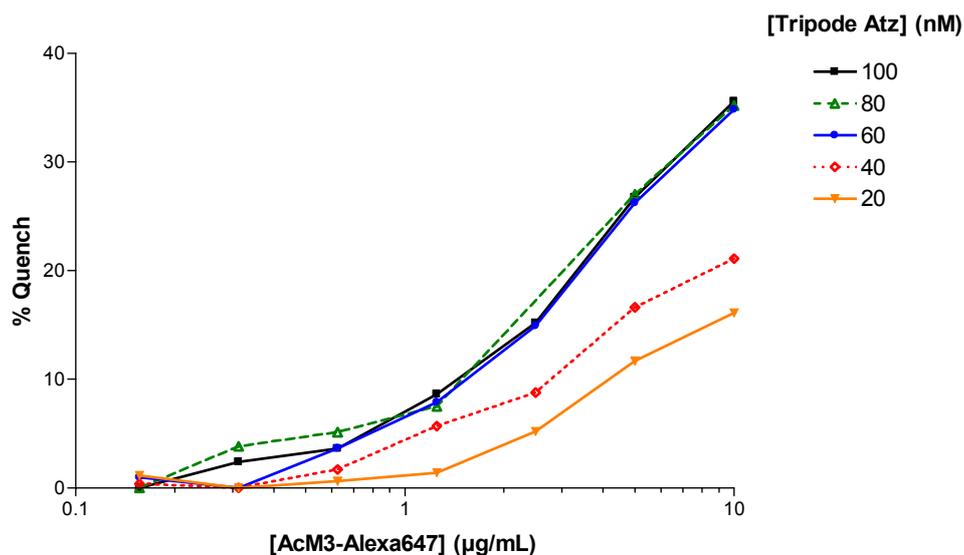


Figure 70 : Influence de la concentration en tripode sur le pourcentage de quenching

Plaque Maxisorp neutravidine. Incubation séquentielle : ① 100µL solution Tripode T-AtzMPA-A532 : 100, 80, 60, 40 et 20 nM (2 heures à RT) ; ② 100µL solution Anticorps AcM3-A647 : gamme de 10 µg / mL à 0,01 µg / mL (18 heures à 4°C).

Mesure après lavage en tampon PVP à 535/590 nm.

La mesure de la fluorescence de l'anticorps permettant une meilleure détection, nous avons pu diminuer les concentrations en tripode employées. En se plaçant à une concentration en tripode de 5 nM, et en employant l'Ac ATZ 3 en excès (1 µg/mL ou 10 µL/mL), le dosage obtenu en mesurant la fluorescence à 620/685 nm présente une meilleure sensibilité que celle du dosage EIA compétitif avec un EC₅₀ de 150 ng/mL environ. Dans ce cas et contrairement aux résultats obtenus pour la Substance P, l'incubation de l'analyte après formation du complexe anticorps-analogue n'entraîne pas de diminution de la sensibilité du dosage.

La mise en œuvre du SPIT-FRI est donc principalement dans ce cas limitée par la gamme dynamique (F_{max}-F_{min}) qui interdit l'emploi de concentration faible en tripode et ne permet pas une bonne détection du déplacement.

III.2.1.2. Aflatoxine

III.2.1.2.1. Choix des anticorps et spécificité

Nous avons utilisé deux anticorps monoclonaux commerciaux dirigés contre l'aflatoxine B1 (AFB1) appelés Ac AFA et Ac ATB. Comme pour l'atrazine, les protocoles de préparation des immunogènes et les spécificités des anticorps n'étant indiqués par les fournisseurs, nous avons testé leur liaison avec un traceur aflatoxine-AChE. L'AFB1, comme l'atrazine, nécessite d'être couplée à une protéine porteuse pour être immunogénique et ne possède pas de fonctions chimiques classiquement utilisées pour le couplage. Une étape de modification préliminaire est nécessaire pour le préparer. La méthode de Chu *et al.* (1977) étant fréquemment utilisée pour préparer un dérivé de l'aflatoxine en vue de son couplage à une protéine porteuse (voir Lee *et al.*, 2004 par exemple), un dérivé oxime d'AFB1 (ou Atz-MPA) a été préparé. L'analyse Maldi-TOF indique une masse de 385 Da, correspondant à la masse molaire attendue et l'analyse RMN confirme la pureté. Un traceur enzymatique a alors été synthétisé par couplage de l'oxime d'AFB1 à l'acétylcholinestérase.

Les deux anticorps reconnaissent le traceur AFB1-AChE. Le dosage EIA compétitif réalisé selon le protocole standard en employant le traceur à 2 UE/mL et l'anticorps ATB à 5 ng/mL a permis l'établissement d'une courbe d'étalonnage pour l'AFB1 présentant un EC₅₀ de 0,99 nM, et une limite de quantification de 0,27 nM (pente : -1,08). Les aflatoxines B2, G1 et G2 présentent des réactions croisées de 3,4 %, 11,7 % et 0,5 % respectivement. Dans les mêmes conditions, l'anticorps AFA (5 ng/mL) a fourni une EC₅₀ de 0,125 nM et une limite

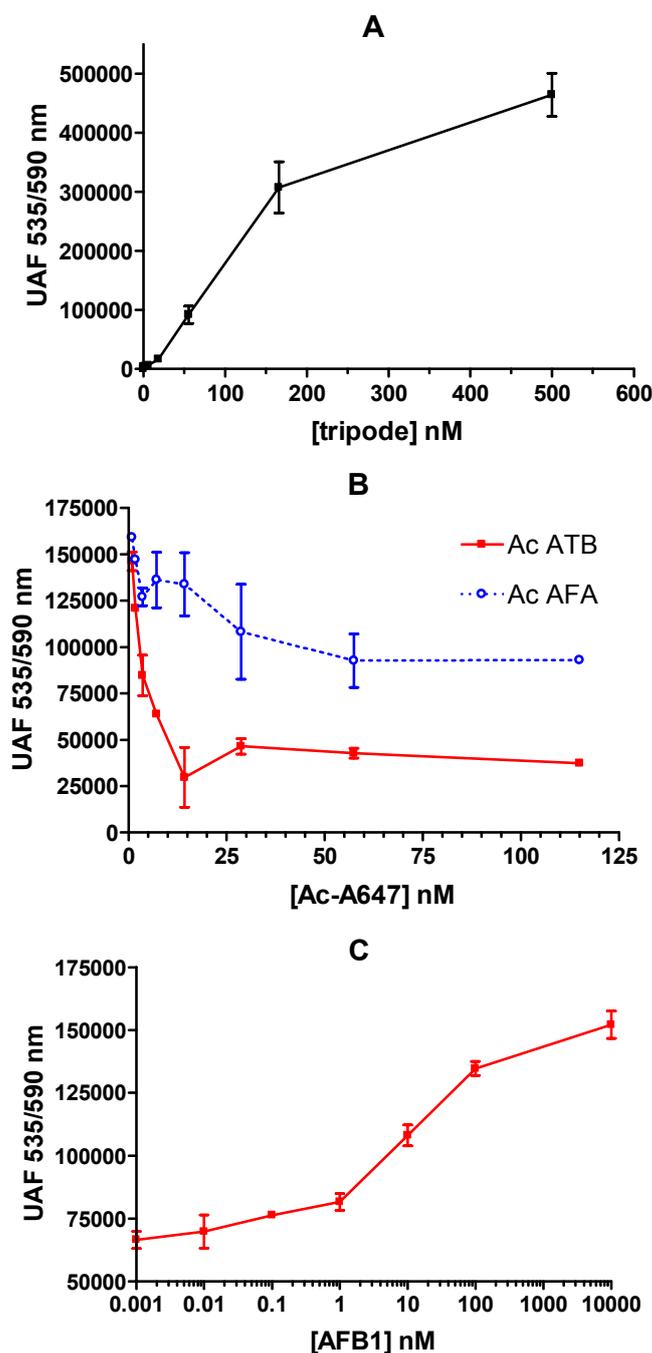


Figure 71 : Tests SPIT-FRI de quenching et déplacement pour AFB1

A : gamme de tripode T(biot)-A532-AFB1 (100 μ L/puits, 18h, 4°C) sur plaque neutravidine (n=2)

B : gamme d'anticorps AcM AFA-A647 et ATB-A647 sur plaque revêtu de tripode employé à 30 nM (n=2)

C : gamme de standard AFB1 avec anticorps ATB-A647 employé à 66,6 nM et tripode employé à 30 nM. (n=3)

Incubations séquentielles de 18 h à 4°C selon le protocole SPIT-FRI standard, mesure de la fluorescence à 535/590 nm avec le lecteur Envision. Pour la courbe C : données normalisées puits à puits en fonction de la fluorescence après incubation du tripode et après quenching.

de quantification de 0,03 nM (pente : -0,93), avec des réactions croisées de 50 % ; 23,1 % et 3,3 % respectivement pour AFB2, AFG1 et AFG2.

III.2.1.2.2. Préparation du tripode AFB1 et marquage des anticorps

Comme pour l'atrazine, nous avons effectué le greffage de l'analogue (oxime AFB1) sur le peptide T biotinylé marqué avec l'Alexa 532. Après purification HPLC du composé sur colonne C2 C18 pour éliminer l'AFB1 non fixé, la concentration du tripode a été estimée par mesure de l'absorbance à 532 nm.

Le marquage des anticorps a fourni un ratio d'incorporation de l'A647 de 4,4 et 1,8 moles d'A647 par mole d'anticorps, respectivement pour l'anticorps ATB et l'anticorps AFA.

III.2.1.2.3. Tests de *quenching* et dosage SPIT-FRI

Une gamme de tripode peptide T-AFB1-A532 sur plaque revêtue de neutravidine fournit un signal croissant qui ne semble atteindre un plateau qu'après une concentration de 500 nM en tripode (Figure 71-A). Les tests de *quenching* effectués avec une concentration en tripode de 30 nM réalisés pour les deux anticorps sont présentés sur la Figure 71-B. En employant l'anticorps à 115 nM et le tripode à 30 nM, on obtient un *quenching* de 43 % pour l'anticorps AFA et 74% pour ATB reflétant probablement la différence de taux de marquage (1,8 contre 4,4 moles de fluorophores/mole d'anticorps). Le *quenching* est trop faible pour envisager un dosage avec l'anticorps AFA qui a donc été écarté bien qu'il présente une meilleure affinité que l'anticorps ATB pour l'aflatoxine. Une gamme d'AFB1 permet de déplacer la liaison tripode-anticorps avec un EC50 de 30 nM (Figure 71-C) soit 30 fois moins bonne que celle obtenue avec le dosage EIA compétitif. Cette diminution de sensibilité peut, comme le dosage de la SP, être imputée au format séquentiel utilisé pour le SPIT-FRI tandis que le dosage EIA compétitif est réalisé en simultané.

III.2.1.3. Conclusions

Les essais de mise au point du SPIT-FRI sur le modèle de l'atrazine ont conduit à une sensibilité médiocre (détection à partir de 10 µg/mL seulement alors que l'EC50 est de 270 ng/mL en format EIA compétitif) empêchant d'établir une courbe d'étalonnage dans une limite de concentrations raisonnables. Cette mauvaise sensibilité peut être imputée à la fois au faible *quenching* limitant l'intervalle (Fmax-Fmin) et à la faible affinité des anticorps pour l'atrazine. Le *quenching* est probablement limité du fait de la présence de tripode 'incomplet' dans la solution de tripode malgré la purification HPLC, certaines molécules de tripodes

fluorescents n'étant pas liés à l'anticorps. Par la suite, le développement d'un dosage SPIT-FRI de l'atrazine passera par une amélioration de la qualité du tripode atrazine afin d'éviter que se trouvent immobilisés des peptides fluorescents ne comportant pas d'atrazine, afin d'obtenir un *quenching* plus élevé, et par l'utilisation d'un anticorps présentant une meilleure affinité envers l'atrazine ainsi qu'envers le tripode afin de favoriser le déplacement par l'atrazine.

Les essais de mise au point du dosage SPIT-FRI de l'aflatoxine B1 se sont révélés positifs avec l'anticorps ATB probablement en raison d'une bonne synthèse du tripode et d'un taux de marquage de l'anticorps élevé. L'EC50 est environ 30 fois supérieure à celle du dosage EIA compétitif mais reste faible (25 nM), la distorsion peut être imputée au format nécessitant le déplacement du complexe anticorps-tripode formé.

En conclusion, l'emploi d'anticorps commerciaux dont l'immunogène n'est pas connu, et l'affinité non caractérisée, n'est pas forcément aisé. Les résultats obtenus avec la Substance P ne sont pas directement transposables à d'autres molécules en terme d'efficacité du *quenching* et de sensibilité, puisque dépendant de nombreux paramètres (affinité relative de l'anticorps pour le tripode et l'analyte, rapport A/D, distance A-D) qui varient selon le modèle.

L'utilisation du tripode peptidique présentant une stoechiométrie analogue/fluorophore/biotine de 1 :1 :1 semble être une bonne stratégie. En utilisant un peptide porteur comportant une cystéine où est fixé le fluorophore A532, une Lysine et la séquence correspondant au peptide Ala¹⁰SP nous avons obtenu un *quenching* de 99% avec l'anticorps SP31-A647 (contre 82% avec le peptide utilisé précédemment) sans altérer les performances en terme d'EC50. Cette amélioration peut être imputée à la présence d'un seul fluorophore sur le tripode, augmentant de ce fait le rapport A/D. Cette augmentation du *quenching* permet une meilleure gamme dynamique (Fmax-Fmin) et fournit donc un dosage de meilleure qualité avec une limite de détection plus faible.

III.2.2. Evaluation du SPIT-FRI sur des modèles protéiques

Jusqu'à présent, nous nous sommes intéressés à l'évaluation du SPIT-FRI pour des molécules de petite taille : la Substance P, l'atrazine et l'aflatoxine. Ayant pour objectif l'application du procédé aux agents de la menace biologique, au premier rang desquels se trouvent plusieurs toxines, et en particulier la toxine botulinique et la ricine, nous avons souhaité évaluer son applicabilité pour des modèles protéiques. Le FRET étant un phénomène distance-dépendant, il n'est pas évident qu'il soit possible d'obtenir un taux de *quenching* suffisant pour la mise en œuvre du SPIT-FRI employant une protéine comme tripode du fait de l'augmentation de la distance D-A. Les protéines étant des molécules conformées, les anticorps obtenus par immunisation avec des protéines, purifiées ou recombinantes, sont le plus souvent dirigés contre un épitope conformationnel (on parle également d'anticorps « conformationnel ») : les acides aminés composant l'épitope appartiennent à des segments éloignés de la séquence polypeptidique mais se retrouvent spatialement proches du fait de la structure tertiaire. Il n'est pas très fréquent de produire lors d'immunisation employant une protéine conformée des anticorps reconnaissant une séquence peptidique linéaire. On parle alors d'épitope séquentiel, les acides aminés composant l'épitope étant situés dans une courte séquence polypeptidique, en général moins de 10 acides aminés (Atassi & Smith, 1978).

Dans ce cas, il se pose donc le problème de la conservation d'une structure conformée pour le tripode afin de permettre la liaison de l'anticorps. L'utilisation d'un peptide comme tripode impliquerait des études longues et difficiles pour tenter d'identifier les acides aminés de l'épitope et conférer au peptide la structure tridimensionnelle qu'il possède au sein de la protéine. Cela nécessiterait des moyens et du temps que nous n'avons pas.

Nous avons donc souhaité évaluer la possibilité d'employer un tripode protéique obtenu par marquage de la protéine avec le fluorophore et la biotine, stratégie qui paraît donc raisonnable dans le cas du dosage d'une protéine présentant un fort taux de conformation. Les protéines possédant plusieurs épitopes, la distance (D, A) pourra varier en fonction de l'anticorps utilisé. D'autre part, elles comportent souvent plusieurs sites de couplage (fonctions NH₂ et COOH), ce qui pourra conduire (comme pour les anticorps) à la fixation d'un nombre variable de fluorophores et/ou de biotine, et donc une distance D-A variables.

III.2.2.1. β -lactoglobuline

La β -lactoglobuline a été choisie comme modèle de protéine car nous disposions au laboratoire de plusieurs anticorps monoclonaux dirigés contre la BLg présentant des spécificités différentes. De plus, cette protéine, possédant une masse molaire de 18362 Da (variant A) est une protéine de relative petite taille. Sa masse molaire est tout de même plus de 10 fois plus élevée que la substance P, ce qui permettait déjà d'évaluer l'influence de ce paramètre. Parmi les anticorps monoclonaux dont nous disposions au laboratoire, nous avons utilisé cinq anticorps « conformationnels » reconnaissant spécifiquement la forme native (conformée) de la BLg, dirigés contre des régions épitopiques différentes: AcM117, AcM88, AcM97, AcM75 et AcM2. L'étude a été réalisée sur le couple de fluorophores (Fluorescéine, TMR) couple de référence employé précédemment pour la substance P.

III.2.2.1.1. Préparation du tripode

La BLg possède 16 fonctions amines (15 Lysines et l'amine N-terminale) permettant d'envisager un marquage direct de la protéine avec la biotine et le fluorophore sous forme d'esters actifs. L'élimination de l'ester actif en excès est effectuée grâce à une purification sur chromatographie de tamisage moléculaire (Sephadex G25). En revanche, l'élimination du « tripode incomplet » ie. BLg non marquée, ou BLG n'ayant incorporée que le fluorophore ou que la biotine, ne peut être effectuée facilement.

Concernant le rapport biotine/BLg, un ratio supérieur à 1 n'a pas d'intérêt particulier. De plus, des travaux réalisés au laboratoire associé INRA/CEA ont montré que la biotinylation avec un rapport de marquage supérieur à 1 modifie la conformation de la BLg (voir la thèse de K.Adel-Patient, 1999). Si le rapport effectif biot/BLg est légèrement inférieur à 1, la BLg-fluorescéine non biotinylé ne se liera pas à la neutravidine, mais si une grande proportion est marquée cela reste sans conséquence sur la qualité du dosage. Nous avons donc souhaité incorporer 1 ou légèrement moins d'1 mole de biotine/mole de BLg.

Un rapport molaire Fluorescéine/BLg inférieur à 1 conduirait à la présence de BLg-biot sur la phase solide ne comportant pas de fluorophore et donc de complexe BLg-biot/anticorps qui pourrait être déplacé par l'analyte sans induire de modification du signal, ce qui limiterait donc la sensibilité du dosage. Par ailleurs, plus le ratio molaire Fluorescéine/BLg est élevé, plus le rapport A/D est faible (pour un même ratio accepteur/anticorps), ce qui a pour conséquence directe une diminution du *quenching* ; cependant, l'augmentation du ratio molaire Fluorescéine/BLg peut permettre une augmentation du signal F_{max} (dans la mesure où l'auto*quenching* est limité). Avec les trois modèles d'haptènes étudiés précédemment, les

résultats obtenus avec un rapport de 1 mole de fluorophore par mole de tripode ont été satisfaisants. Cependant, dans le cas de la BLg, il est possible qu'il soit préférable d'employer un ratio plus élevé permettant une distance D-A moyenne correcte entre la fluorescéine incorporée et les molécules accepteuses de l'anticorps. Au vu de ces différents éléments, il nous a paru important de comparer différents ratios d'incorporation de la Fluorescéine sur la BLg.

Afin de déterminer les rapports de couplage à employer pour obtenir une stoechiométrie de BLg/biotine/Fluorescéine de 1:1:1, plusieurs marquages ont été effectués en employant différents rapports de couplage (R) biotine/BLg et fluorescéine/BLg dans différentes conditions expérimentales. Nous avons évalué le ratio d'incorporation (Rf) de chacune des molécules sur la BLg de plusieurs manières : par une analyse Maldi-TOF et par l'analyse des spectres d'absorbance. De plus, l'effet du marquage sur l'immunoréactivité de la BLg a été évalué par un test EIA compétitif avec la BLg-AChE et l'anticorps AcM 97 qui présente la meilleure reconnaissance du traceur BLg-AChE parmi les 5 anticorps choisis (test de dilution d'anticorps sur plaque CAS).

Il est connu que la BLg (variant A) est présente sous forme de monomères ou d'oligomères (dimères-octamères), l'oligomérisation variant selon le pH, la température et la concentration saline mais aussi la concentration en BLg de la solution, la présence de solvants et d'urée (Gottschalk *et al.*, 2003). Des oligomères intermédiaires peuvent également se former (Kumosinski & Timasheff, 1966). Cette oligomérisation est le plus souvent réversible, mais il a été montré récemment que dans certaines conditions les oligomères ne pouvaient être séparés (Piazza *et al.*, 2006).

La réaction de couplage des esters actifs sur les amines a été effectuée suivant le protocole classique donc à température ambiante en tampon borate 0,1 M pH 8,5 DMF 0,05 % durant 18 h. La comparaison de l'immunoréactivité du standard BLg avec un « témoin » correspondant à de la BLg incubée 18 h dans le tampon de couplage révèle une perte d'immunoréactivité vis-à-vis de l'anticorps AcM BLg 97 du « témoin », remettant en cause les conditions opératoires du couplage (Figure 72, p.191). La diminution de la durée d'incubation de la BLg dans le tampon de couplage (30 min au lieu de 18 h) a permis d'éviter ce phénomène. La durée de la réaction a été donc limitée à 30 min. Par ailleurs, le pH du tampon de couplage a été abaissé à 8 au lieu de 8,5.

Le couplage sera réalisé avec une durée de la réaction fixée à 30 min par réaction simultanée des deux esters actifs (biotine et fluorescéine) pour éviter deux incubations de la BLg dans le tampon basique.

Les premiers tests ont été faits avec un marquage séparé de la BLg à la biotine et à la Fluorescéine, en utilisant pour le couplage 1, 2, 5, 10 ou 20 moles de biotine/mole de BLg (notée BLg-B1, B2, B5, B10 et B20) ou de fluorescéine (notée F1, F2, F5, F10, F20).

L'analyse Maldi-TOF de la BLg-biotinylée permet d'identifier la présence de biotine sur la BLg. Elle révèle qu'un rapport de couplage 1 mole de biotine/BLg entraîne la présence de BLg non marquée (pic largement majoritaire) et marquée avec une mole et deux molécules de biotine (pic de faible intensité). Un rapport de 2 moles de biotine/BLg entraîne la présence de 4 formes de la BLg, avec la présence de BLg marquée 3 fois, le pic de la BLg marquée 1 fois étant majoritaire. Les rapports supérieurs (B5, B10, B20) entraîne le marquage de la totalité de la BLg et la présence de nombreuses formes intermédiaires. L'analyse Maldi-TOF de la BLg-Fluorescéine conduit à une incorporation relativement similaire, montrant que la réactivité de l'ester actif de la fluorescéine est comparable à celle de la biotine. L'analyse de l'incorporation de BLg-fluorescéine par mesure de l'absorbance fournit des ratio d'incorporation Fluorescéine/BLg de 0,7 ; 1,35 ; 3,9 ; 5,6 ; et 4,9 respectivement pour F1, F2, F5, F10 et F20. Pour les deux derniers, il semble que ce ratio soit sous-estimé par rapport à l'analyse Maldi, ce qui pourrait s'expliquer par l'augmentation du rapport A460 nm/A492 nm avec le rapport de couplage (correspondant à la formation de dimères de fluorophores) et donc une erreur quant au coefficient d'extinction molaire employé à 492 nm.

En ce qui concerne l'immunoréactivité de la BLg marquée vis-à-vis de l'anticorps AcM 97 (Figure 74, p.192), on observe une perte de reconnaissance progressive par l'anticorps en fonction du rapport de marquage biotine/BLg. Par exemple, la reconnaissance de la BLg par l'AcM 97 diminue d'un facteur 8 pour BLg-B20 contre un facteur 50 pour la BLg-F20. On observe une perte d'immunoréactivité encore plus importante de la molécule de BLg lorsqu'elle est marquée avec la Fluorescéine que lorsqu'elle est marquée avec la biotine (pour un même rapport de couplage). Il est possible que le marquage entraîne une altération du site épitopique du fait de l'incorporation du fluorophore sur ou à proximité de la zone de reconnaissance. Sachant que le taux d'incorporation de la fluorescéine et de la BLg sont du même ordre de grandeur pour le même rapport de couplage, et qu'il est probable que les mêmes fonctions amine primaire (les plus exposées) soient généralement le lieu d'incorporation des esters actifs, la différence observée en terme d'immunoréactivité entre la

BLg-biot et la BLg-Fluorescéine s'explique probablement par la différence de taille (215 Da pour la biotine contre 586 Da pour la Fluorescéine) et de structure donc d'interactions potentielles avec des acides aminés voisins, entraînant une modification de la conformation de la protéine.

De la même façon, nous avons pu observer que l'incorporation de fluorophores de nature différente conduisait à une altération différente de la reconnaissance par l'anticorps polyclonal GB1 reconnaissant différents épitopes de la BLg native. 6 fluorophores différents ont été comparés : la Fluorescéine, l'A488, la TMR, l'A532, le Cy5.0 et l'A647 (en employant un rapport de couplage de 10 moles de fluorophores par mole de BLg). Le rapport d'incorporation des fluorophores sur la BLg, calculé par méthode d'absorbance, varie entre 1,9 et 2,9 moles de fluorophore par mole de BLg selon le fluorophore (2,9 pour la Fluorescéine, 2,0 pour l'A488, 2,3 pour la TMR, 2,4 pour l'A532, 1,9 pour Cy5.0 et 2,2 pour A647). En utilisant l'antisérum polyclonal GB1, on constate une diminution de l'immunoréactivité de la BLg dont l'amplitude varie en fonction du marquage fluorescent (Figure 75, p.193). Le facteur de Réaction Croisée (RC) par rapport à la BLg standard varie entre 3 % pour la BLg-A532 et 77 % pour la BLg-A488.

La préparation du tripode a ensuite été effectuée par réaction simultanée des deux esters actifs avec un excès molaire de 1,2 pour la biotine et différentes stoechiométrie pour la Fluorescéine (F1, F2, F5, F10 et F20). Nous avons choisi d'augmenter légèrement le ratio de couplage de la BLg à la biotine car la présence de l'ester de Fluorescéine dans le tampon de couplage induira probablement une incorporation plus faible de la biotine sur la BLg. Nous constatons que la réaction simultanée des deux esters n'a pas de conséquence sur le ratio Fluorescéine/BLg. L'analyse Maldi-TOF des BLg marquée révèle la présence de BLg fluorescente non biotinylée dans tous les cas, cependant, nous avons conservé ces conditions expérimentales vu que la présence de moins d'une mole de biotine/BLg ne constitue pas un problème dans notre format de dosage grâce l'élimination de la BLg non biotinylée par l'étape de lavage. La proportion de BLg biotinylée non marquée avec le fluorophore est inversement corrélée au rapport de couplage Fluorescéine/ BLg et disparaît pour les ratios supérieurs ou égal à 5.

Nous avons ensuite réalisé des dosages EIA compétitifs en employant le traceur BLg-AChE pour estimer la réaction croisée (%) de la BLg-biot-Fluorescéine par rapport à la BLg non marquée avec les différents anticorps. Nous avons également montré que l'utilisation comme compétiteur de BLg-biot-Fluorescéine liée à la neutravidine (préincubation de la BLg-biot-Fluorescéine avec la neutravidine avant dosage) ne modifie pas l'EC50 par rapport à la BLg-

biot-Fluorescéine non liée à la neutravidine avec les 5 anticorps testés. Ainsi, la présence de la liaison de la neutravidine sur la BLg-biot-Fluorescéine n'empêche pas la liaison des anticorps. Enfin, les tests ELISA réalisés avec immobilisation de la BLg-biot-Fluorescéine sur la phase solide (*via* la neutravidine) montrent que la liaison de l'anticorps (biotinylé ou AChE pour la révélation) peut s'effectuer (ex de l'AcM 117-AChE, Figure 73, p.191).

Ainsi l'incorporation de fluorophores et/ou de biotine sur la la BLg entraîne une diminution de la reconnaissance de la BLg par les différents anticorps (modification de l'accessibilité de l'épitope par les anticorps et/ou de la structure tridimensionnelle de l'épitope) mais un taux de marquage limité permet de conserver une immunoréactivité « raisonnable » vis-à-vis des anticorps monoclonaux utilisés.

Pour les tests de SPIT-FRI, nous utiliserons donc la BLg-biot-Fluorescéine comportant 1 mole environ de biotine par BLg (rapport de couplage de 1,2) et différents ratios de Fluorescéine seront comparés afin de choisir le ratio A/D le meilleur dans notre format sachant que la présence de BLg biotinylée non fluorescente peut être limitante pour la sensibilité du dosage mais que l'emploi de BLg marquée avec un rapport de couplage de la fluorescéine plus élevé peut également être limitante au niveau de la reconnaissance par les anticorps et par voie de conséquence au niveau du *quenching*.

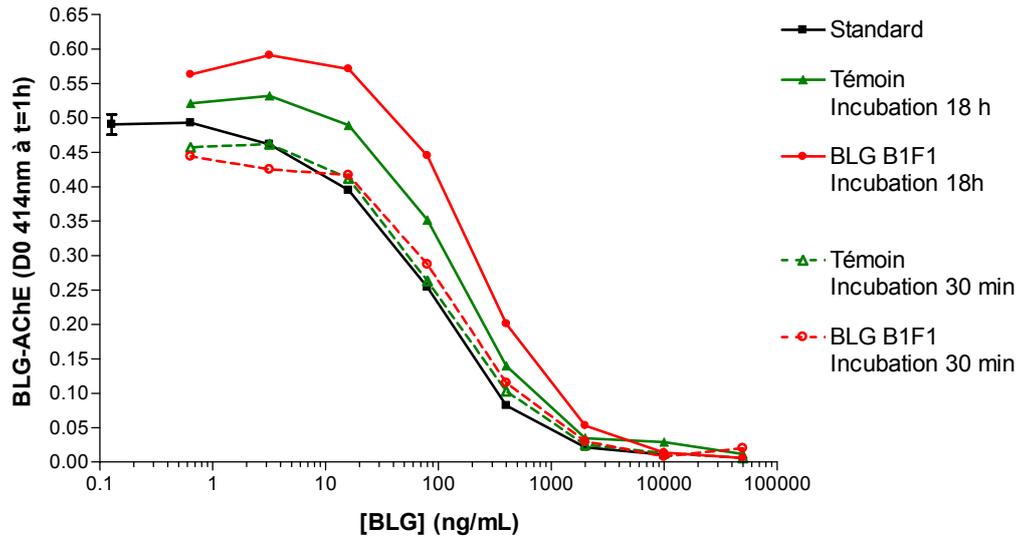


Figure 72 : Influence de la durée de la réaction de couplage de la BLg sur la reconnaissance par l'AcM 97
 BLg B1F1 : rapports de couplage biotine/BLg = 1 et fluorescéine/BLg = 1
 Durée de la réaction de couplage = 30 min ou 18 h.
 Témoin : BLg incubée suivant le même protocole que la BLg marquée mais sans ajout de fluorophore ni de biotine.
 Protocole de dosage EIA compétitif sur plaque CAS. Traceur : BLg-AChE (2 UE/mL), anticorps AcM BLg97 (15 ng/mL), incubation : 18 h à 4°C, révélation : 1 h. Standard : BLgA.

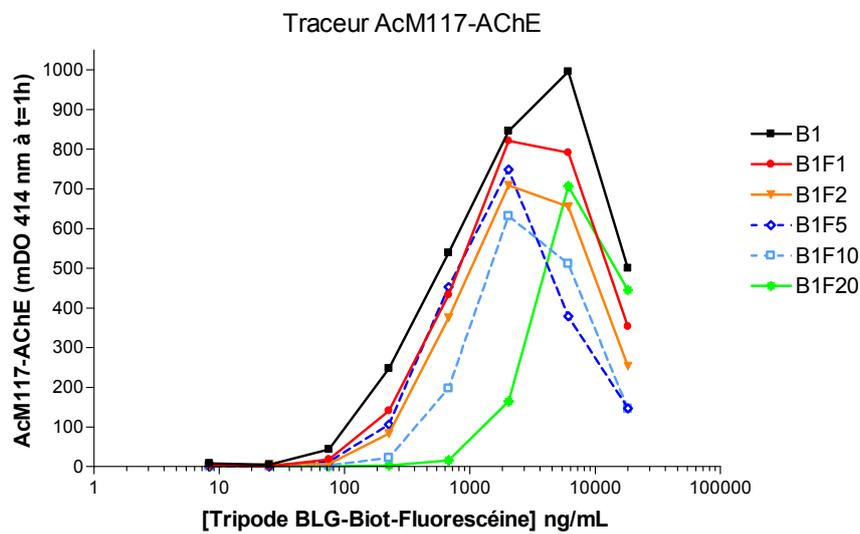


Figure 73 : Reconnaissance du tripode BLg Fluorescéine (F1, F2, F5, F10 ou F20) fixé sur la phase solide neutraavidine par l'anticorps AcM 117-AChE

Protocole ELISA :
 Incubation de 50 μ L de solution de BLg-biot(B1)-Fluorescéine(F1, F2, F5, F10, F20) à différentes concentrations et 50 μ L de solution de traceur AcM 117-AChE (2 UE/mL) durant 18 h à 4°C, révélation : 30 min.

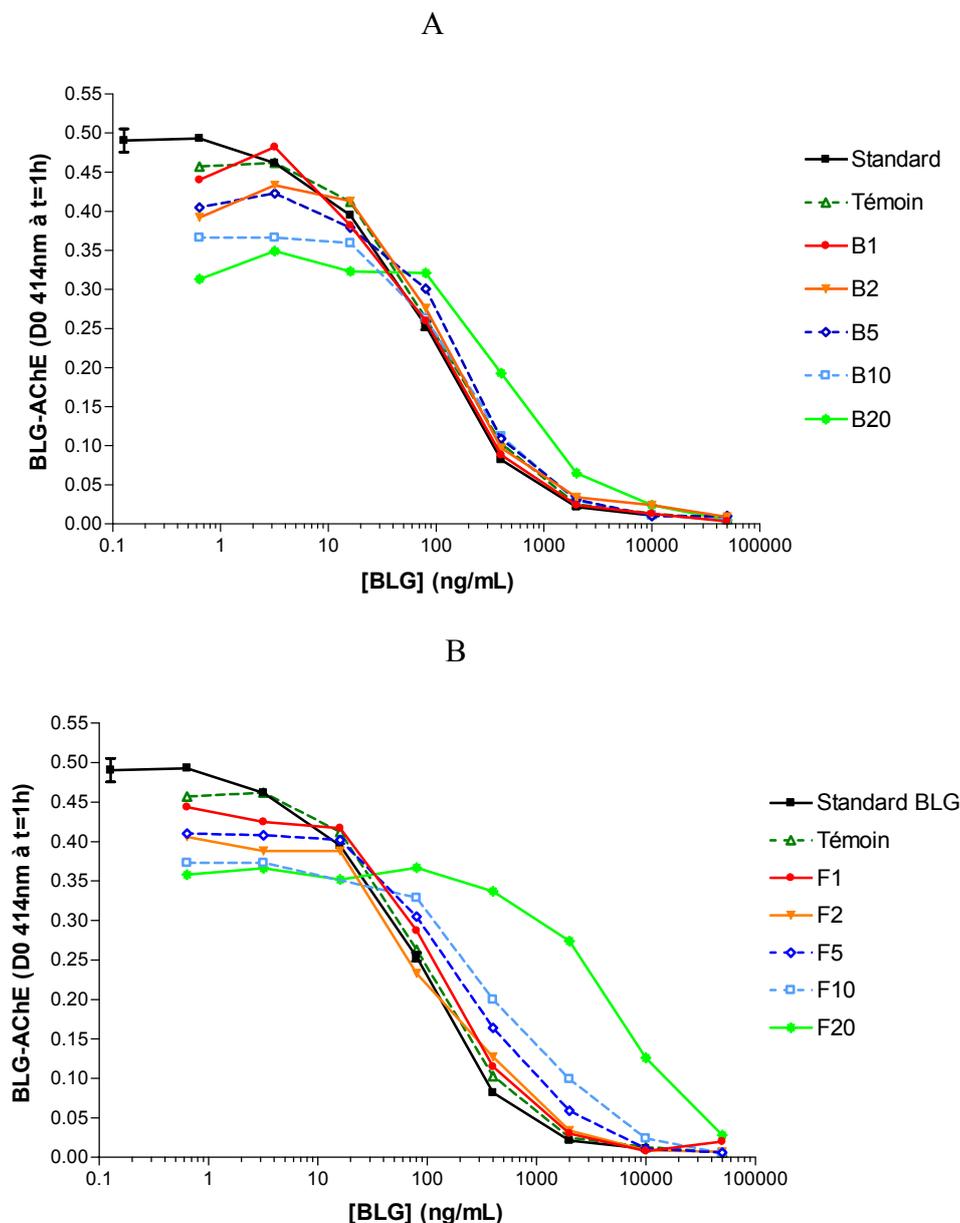


Figure 74 : Influence du rapport de couplage biotine/BLg et fluorescéine/BLg sur la concentration en BLg native (R=1, 2, 5, 10 ou 20)

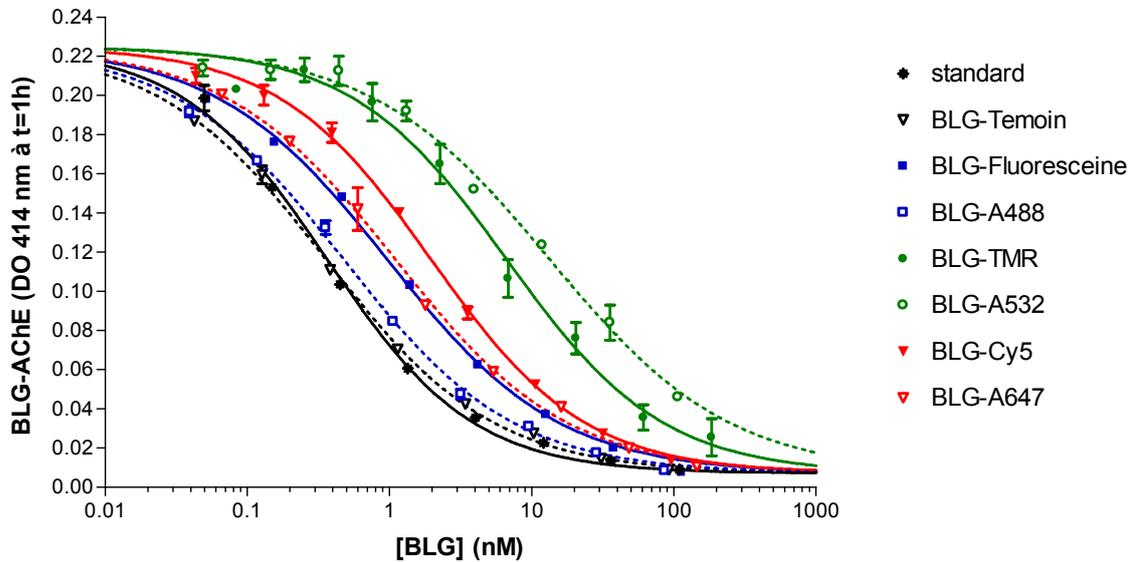
A : marquage de la BLg avec la biotine

B : marquage de la BLg avec la fluorescéine

Durée de marquage = 30 min

Témoïn : BLg incubée suivant le même protocole que la BLg marquée mais sans ajout de fluorophore ou de biotine

Dosage EIA compétitif standard sur plaque CAS. Traceur : BLg-AChE (2 UE/mL), anticorps AcM97 (15 ng/mL), incubation : 18 h à 4°C, révélation : 1 h. Standard : BLg native.



	<i>EC</i> 50 (nM)	RC (%)
Standard BLg	0,367	100
témoin	0,360	102
BLg-Fluorescéine	0,969	38
BLg-A488	0,479	77
BLg-TMR	6,71	5,5
BLg-A532	13,5	2,7
BLg-Cy5.0	1,97	19
BLg-A647	1,11	33

Figure 75 : Influence du marquage de la BLg par les fluorophores (Fluorescéine, A488, TMR, A532, Cy5.0, A647) sur la reconnaissance par l'antisérum polyclonal GB1

Dosage EIA compétitif sur plaque SAL. Traceur : BLg-AChE (à 2 UE/mL), antisérum : GB1 purifié (à 200 ng/mL), standard : BLg A. Incubation 18 h à 4°C. Révélation : 1 h.

Le témoin correspond à la BLg incubée et purifiée dans les mêmes conditions que les BLg marquées mais sans fluorophore. Les concentrations des solution-mères de BLg marquées ont été vérifiées par dosage protéique.

Le tableau récapitule les valeurs d'*EC*50 (nM) et les pourcentages de réaction croisée par rapport au standard.

III.2.2.1.2. Préparation des anticorps couplés à la TMR

Les anticorps AcM BLg 2, 75, 88, 97 et 117 ont été marqués avec la TMR suivant le protocole classique de couplage (cf p.97) en employant un ratio de 10 moles de TMR par mole d'anticorps. Comme pour les anticorps anti-SP TMR, on observe une forte augmentation du rapport A518nm/A555nm ; de ce fait, les mêmes précautions d'interprétation doivent donc être considérées quant au ratio d'incorporation calculé, qui est de 0,3 ; 3,5 ; 1,9 ; 2,5 et 4 moles de TMR/mole d'anticorps respectivement pour AcM BLg 2, 75, 88, 97 et 117. Notons que pour l'anticorps AcM2, plusieurs essais ont été effectués en augmentant le rapport de couplage TMR/Ac, mais le ratio d'incorporation reste inférieur à 1. Il est possible que l'anticorps ne présente pas un nombre suffisant d'amines primaires accessibles pour le couplage à la TMR.

L'effet du marquage à la TMR sur les capacités de reconnaissance des anticorps est évalué par test de liaison avec le traceur BLg-AChE sur plaque revêtue d'anticorps de capture CAS (Figure 76). Nous constatons pour les anticorps 2, 75, et 97 que les courbes des anticorps marqués et non marqués sont superposées démontrant que le marquage à la TMR n'a aucune incidence sur leur capacité de reconnaissance avec la BLg-AChE (l'AcM 2 n'étant marqué qu'en faible proportion). Pour l'anticorps AcM 88-TMR, une augmentation de la concentration en anticorps est nécessaire pour obtenir le signal maximal observée par rapport à l'anticorps non marqué, reflétant une diminution de la reconnaissance par les anticorps de capture due probablement au couplage de la TMR au niveau des régions constantes reconnues par le CAS. Il en est de même pour l'anticorps 117-TMR, pour lequel on observe aussi une diminution de la valeur maximale d'absorbance traduisant une diminution de sa capacité de liaison au traceur. Notons que les sensibilités obtenues avec des dosages EIA compétitifs sont relativement proches pour les anticorps marqués et non marqués à la TMR (ceux dont la capacité de liaison à la BLg AChE est altérée sont employés plus concentrés). La fonctionnalité des anticorps semble donc conservée après marquage à la TMR.

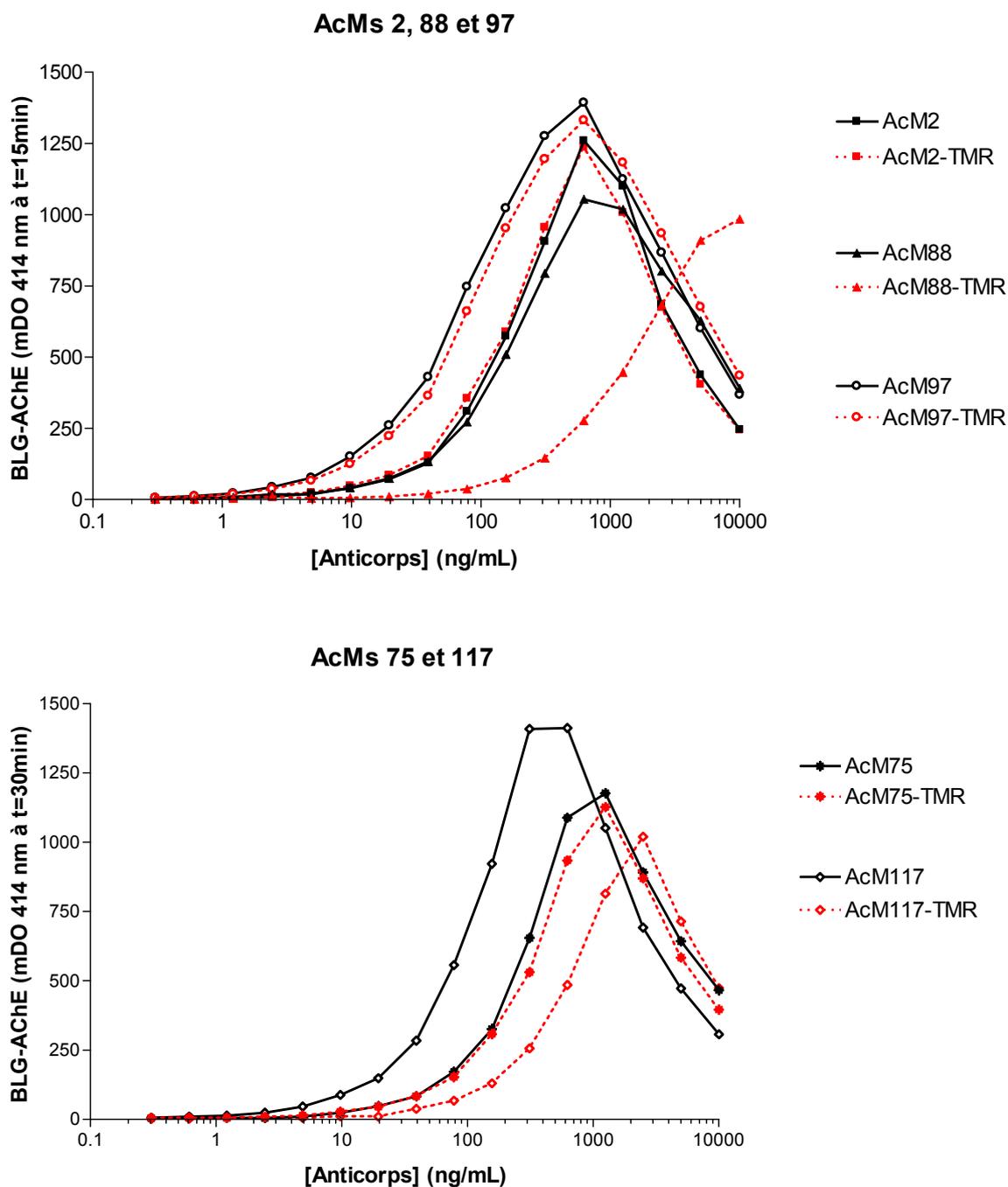


Figure 76 : Influence du marquage à la TMR des anticorps AcM BLg 2, 75, 88, 97 et 117 sur leur capacité de reconnaissance de la BLg-AChE

Protocole standard de dilution d'anticorps sur plaque CAS. Traceur BLg-AChE à 2 UE/mL, tampon : EIA, incubation 18 h à 4°C, révélation : 15 min ou 30 min selon l'anticorps.

III.2.2.1.3. Tests de *quenching* et de déplacement

La Figure 77 présente la fluorescence du tripode BLg-biot-Fluor préparés avec un rapport biotine/BLg de 1,2 et un rapport Fluorescéine/BLg de 1, 2, 5, 10 et 20, mesurée en solution et sur plaque revêtue de neutravidine à 485/535 nm. La fluorescence du tripode BLg augmente avec le rapport de couplage Fluorescéine/BLg de F1 à F5 avant de diminuer pour les rapports de couplage F10 et F20. Cette diminution de la fluorescence pour les rapports de couplage élevés résulte probablement du phénomène d'*autoquenching* de la Fluorescéine.

De même, une gamme de tripode sur phase solide induit une fluorescence maximale pour BLg-biot-Fluorescéine (F5) qui diminue ensuite pour F10 et F20. Notons qu'il faut utiliser une concentration élevée en tripode BLg (250 nM) pour atteindre le plateau. Ceci peut s'expliquer par le fait que toutes les molécules de BLg ne comporte pas de biotine.

En terme de *quenching*, les anticorps peuvent être classés par efficacité de la façon suivante : AcM117, 97, 75, 88 et 2 fournissant respectivement un *quenching* maximal (avec la BLg biot F1) de 53%, 45%, 40%, 40%et 5%. La différence observée semble refléter grossièrement le nombre de molécules de TMR liées à l'anticorps (dans l'ordre, 4 ; 2,5 ; 3,5 ; 1,9 et 0,3) mais l'anticorps 97 fournit un *quenching* plus important que l'anticorps 75 alors son ratio TMR/Ac est plus faible, et l'anticorps 88 fournit un *quenching* équivalent avec un ratio plus faible reflétant leur différence d'affinité pour le tripode (AcM 97>88>75). Par ailleurs, on obtient un *quenching* maximal avec le tripode BLgF1, quel que soit l'anticorps employé et la concentration en tripode. Le pourcentage de *quenching* diminue avec le rapport de couplage Fluorescéine/BLg, jusqu'à une absence totale de *quenching* pour le tripode BLg F20 (ex. de l'anticorps AcM 75-TMR cf Figure 78).

Comme un seul anticorps au maximum peut se fixer sur une molécule de tripode (anticorps monoclonaux), son effet « quencher » se trouve donc limité et proportionnel au nombre de molécules de TMR incorporées sur l'anticorps en rapport au nombre de molécules de Fluorescéine présentes. D'autre part, le *quenching* étant distance-dépendant entre le donneur et l'accepteur, et l'incorporation de la fluorescéine ne pouvant se faire qu'au niveau d'amines primaires dont la position est fixe, le taux de *quenching* variera en fonction de leur distance par rapport à l'épitope reconnu par l'anticorps portant les TMR dont la position varie elle-même selon l'anticorps.

D'ailleurs, l'emploi d'un mélange d'anticorps AcM117-TMR, AcM88-TMR et AcM97-TMR permet d'augmenter significativement mais sans réelle additivité le taux de *quenching* (65 % de *quenching*), ces trois anticorps pouvant se fixer simultanément sur une molécule de tripode. Ainsi le nombre des molécules de TMR susceptible de quencher la fluorescence du tripode est augmenté ainsi que leur dispersion sur le tripode.

La Figure 79 présente les courbes d'étalonnage du dosage de la BLg avec les anticorps AcM 75, 88, 97 et 117-TMR avec le tripode BLg-biot-fluorescéine(F1) .

Parmi les 4 anticorps testés, l'anticorps AcM117 permet d'obtenir la plus grande gamme dynamique et le meilleur taux de déplacement. La zone linéaire du dosage se situe entre 100 ng/mL et 10 µg/mL. (détection à partir de 50 ng/mL). L'anticorps 97 présentant la meilleure affinité pour le tripode n'est déplacé que pour des concentrations plus élevées. Ces résultats sont confirmés par une mesure de la fluorescence de l'anticorps à 535/590nm qui permet d'obtenir une meilleure précision.

III.2.2.1.4. Couple (A532, A647)

De la même façon, nous avons réalisé le dosage SPIT-FRI de la BLG avec le couple (A532, A647). Nous avons obtenu un rapport de marquage R_f d'environ 1,2 moles d'Alexa 532 / mole de BLg. Les anticorps AcM88 et AcM117 ont été marqués avec l'A647 fournissant un rapport $R_f = 3$ moles d'A647 par mole d'anticorps. Le marquage des anticorps à l'A647 induit une diminution des capacités de liaison des anticorps pour la BLg-AChE (diminution de 34% du signal maximal pour AcM 117 et de 44% pour AcM88). Le tripode BLg-Biot-A532 est également moins bien reconnu par les anticorps que la BLg native. On obtient un *quenching* de 32% pour l'anticorps AcM BLg 88 et 44% pour l'anticorps AcM BLg 117 dans les conditions fournissant le *quenching* maximal (concentration en tripode 60 nM, anticorps 100nM). Le faible *quenching* allié à des CV élevés donne une gamme dynamique insuffisante tant au niveau signal/bruit qu'au niveau du pourcentage de *quenching* pour mettre au point un dosage de qualité. La concentration la plus élevée en standard (100 nM) permet d'inhiber 40% du *quenching* avec AcM BLg117 et 20% avec AcM BLg88. L'AcM BLg117 permet donc d'obtenir de meilleurs résultats que l'AcM BLg88 dans ce format puisque l'on obtient à la fois un meilleur taux de *quenching* et un meilleur taux de déplacement. Ces résultats sont confirmés par une mesure de la fluorescence de l'anticorps à 620/685nm qui permet d'obtenir une meilleure précision.

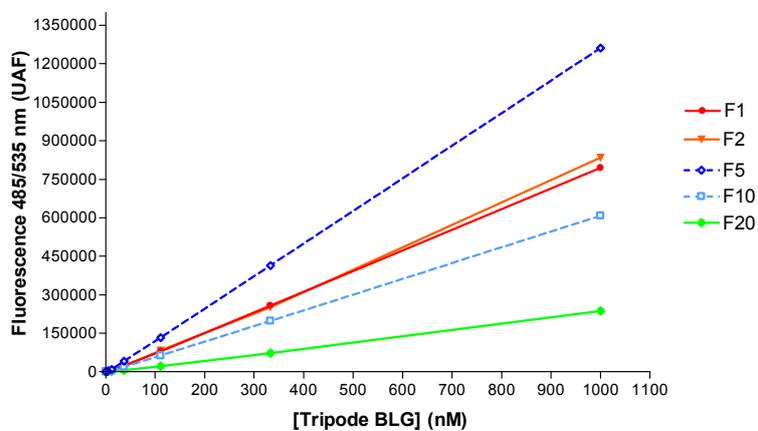


Figure 77 : Fluorescence du tripode BLg-Fluorescéine en solution pour des rapports de couplage Fluorescéine/BLg de 1,2,5,10 et 20

A : mesure de la fluorescence en solution

B : mesure de la fluorescence sur phase solide sur plaque neutraavidine

Rapports de couplage biotine/BLg=1,2, Fluorescéine/BLg=1, 2, 5, 10 ou 20.

Protocole : (A) Mesure la fluorescence de 100 μ L de solution de tripode (tampon PVP) déposés sur plaque Nunc.

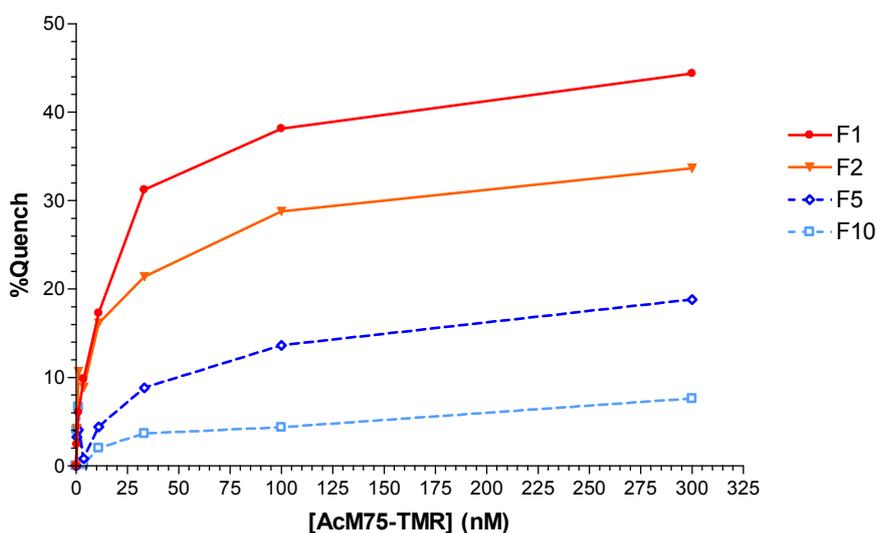


Figure 78 : Quenching des tripodes BLg-biot-Fluorescéine (F1, F2,F5 et F10) par l'anticorps AcM 75-TMR

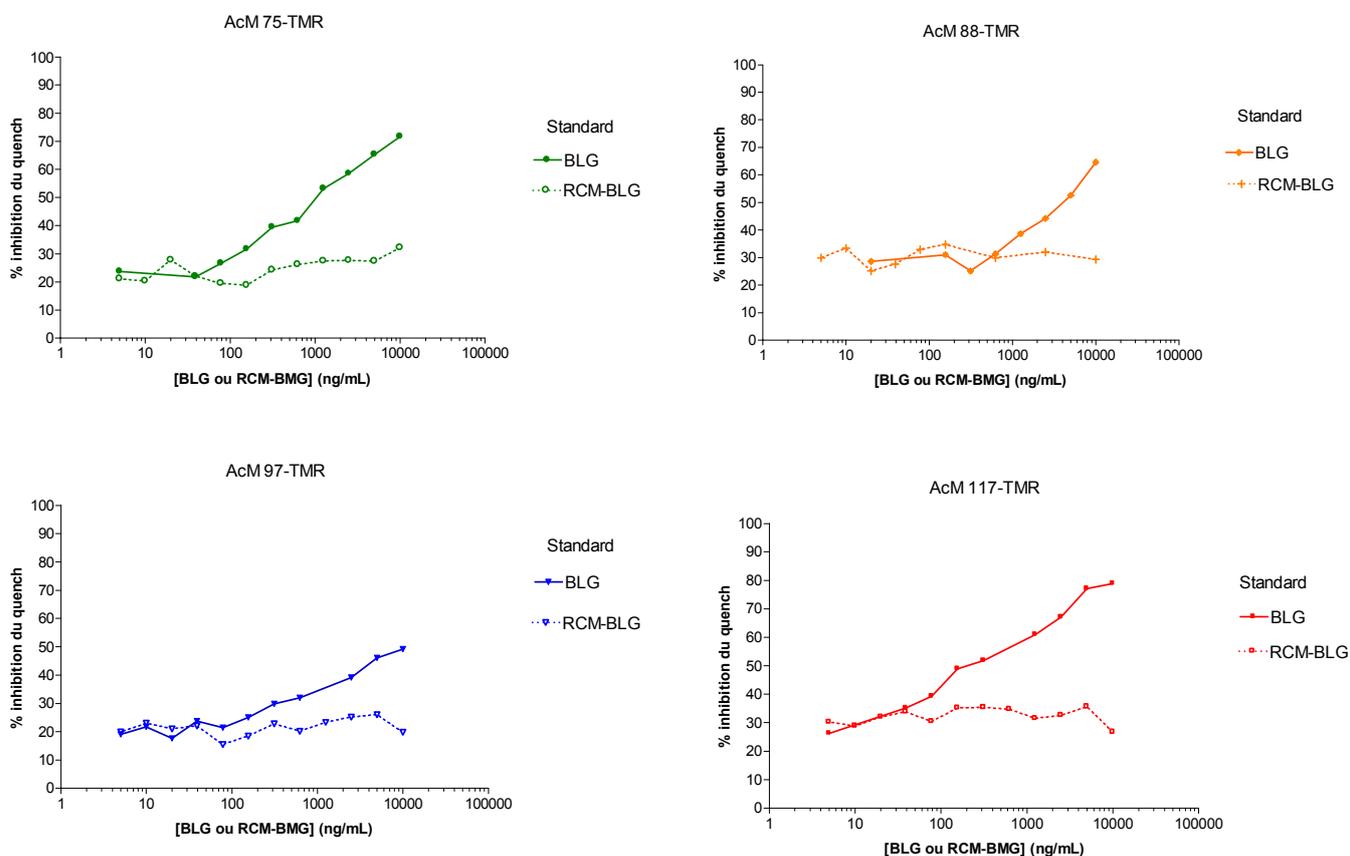


Figure 79 : Comparaison des anticorps AcM 75, 88, 97 et 117-TMR pour le *quenching* du tripode BLg-F1

Protocole standard de dosage SPIT-FRI sur plaque neutravidine.

Incubations séquentielles (100 μ L/puits) de Tripode BLg-biot(1,2)-Fluorescéine(1) à 100 nM (2 h, RT), 100 μ L d'anticorps AcM 75, 88, 97 ou 117-TMR à 100 nM (18 h à 4°C), et du standard BLgA (gamme).

Mesure de fluorescence après lavage à 535/590 nm.

III.2.2.1.5. Conclusions

Ces essais d'application du dosage à la BLg montrent l'importance d'une bonne affinité de l'anticorps marqué pour le tripode, et la difficulté de conserver une bonne reconnaissance après le marquage direct d'une protéine conformée telle que la BLg avec les fluorophores et la biotine.

De plus, la mise au point délicate des tripodes pour la BLg illustre la difficulté d'utiliser un simple greffage du fluorophore et de la biotine sur la protéine. Enfin, le faible taux de *quenching* démontre que l'incorporation aléatoire et fonction de la séquence et de la conformation peut altérer largement la capacité des groupements accepteurs à se trouver à distance correcte pour assurer un *quenching* efficace.

Au regard de ces résultats, et vu la difficulté d'utiliser une protéine conformée pour le tripode, nous avons souhaité obtenir des anticorps reconnaissant les toxines d'intérêt à partir d'une immunisation peptidique. Cependant sachant les risques que comportait une telle approche, nous avons en parallèle aussi démarré une approche d'immunisation protéique (injection de fragments de toxines).

La partie suivante décrit les résultats des immunisations réalisées au laboratoire et la caractérisation des anticorps obtenus ainsi que les perspectives d'utilisation dans le cadre du SPIT-FRI.

III.2.2.2. Toxine Botulinique

III.2.2.2.1. Stratégie d'immunisation

Nous avons initialement souhaité immuniser les animaux avec des peptides pour limiter l'impact de la structure tridimensionnelle des épitopes conformés (comme pour la BLg). De plus, l'utilisation d'un tripode peptidique autorise une distance (D,A) faible ce qui permet d'optimiser l'efficacité du transfert d'énergie entre les deux fluorophores. Toutefois, vu les problèmes possibles d'absence de reconnaissance des protéines conformées par des anticorps issus d'immunisations peptidiques, nous avons aussi mené en parallèle des immunisations avec des fragments des protéines, qui garantissent plus de résultats. Pour des raisons évidentes de toxicité, il est quasiment impossible d'immuniser les animaux avec la toxine entière sans leur faire subir un traitement atténuant leur toxicité, donc altérant souvent passablement leur structure, ce qui explique notre choix de fragments des toxines.

Les travaux de Clayton *et al.* (1995) montrent qu'une immunité contre la TBA peut être acquise par une vaccination avec le fragment correspondant au domaine de liaison Hc de 50 kDa (résidus 873 à 1285 de la TBA), non toxique. Cela a conduit plusieurs équipes à utiliser ce fragment pour la production d'anticorps monoclonaux neutralisants (Amersdorfer *et al.*, 1997 ; Pless *et al.*, 2001). A l'instar de ces équipes, notre stratégie d'immunisation a consisté à injecter aux souris le fragment Hc. En parallèle, nous avons également tenté plusieurs immunisations peptidiques.

III.2.2.2.2. Immunisations avec le fragment protéique Hc/TBA

Après mesure des titres en anticorps spécifiques des saignées par un test de liaison avec le traceur Hc/TBA biotinylé, les cellules de rate de la souris présentant le sérum le plus immunoréactif ont été fusionnées avec des cellules de myélome. A l'issue de la fusion, nous avons obtenu 14 clones stabilisés d'hybridomes produisant des anticorps reconnaissant l'immunogène biotinylé.

Tableau 16 : Test combinatoire des anticorps AcM TB avec Hc/TBA

Test combinatoire effectué selon le protocole décrit p.97 avec les anticorps AcM TB immobilisés sur phase solide (coating) ou utilisés comme traceur (biotinylés), standard : Hc/TBA à 1 ng/mL ; révélation streptavidine-AChE (2 h RT) puis Ellman (1 h) et mesure de l'absorbance à 414 nm.

Dans chaque case : moyenne de la DO (n=2) obtenue avec standard (en bas) ou non (signal non-spécifique, en haut).

En rouge : DO spécifique>2 ; orange : 2>DO spécifique>1 ; bleu : 1>DO spécifique>0,1 ; blanc : DO spécifique < 0,1. (DO spécifique=Signal avec standard - signal sans standard)

Hc/TBA 1 ng/mL		Traceur mAbTB-biot													
		1	2	4	5	7	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Phase solide mAbTB	1	0,020 0,033	0,028 1,549	0,072 2,641	0,026 0,037	0,028 2,619	0,038 0,929	0,020 0,536	0,026 1,245	0,022 1,906	0,110 2,740	0,032 2,042	0,025 0,103	0,043 1,847	0,074 2,112
	2	0,025 2,146	0,030 0,036	0,079 2,106	0,039 1,888	0,034 2,185	0,028 0,163	0,022 0,024	0,029 0,031	0,035 0,027	0,085 2,303	0,049 0,570	0,032 1,628	0,044 1,090	0,039 1,620
	4	0,029 1,132	0,029 0,480	0,131 0,139	0,033 0,971	0,049 0,062	0,027 0,366	0,038 0,239	0,031 0,512	0,031 0,745	0,194 0,182	0,036 0,723	0,026 0,813	0,046 0,694	0,057 0,048
	5	0,032 0,297	0,029 1,091	0,097 2,437	0,035 0,211	0,042 2,513	0,048 0,726	0,025 0,351	0,035 1,126	0,027 1,685	0,144 2,384	0,034 1,866	0,030 0,095	0,052 1,742	0,041 1,875
	7	0,028 1,069	0,033 0,474	0,157 0,183	0,039 0,867	0,050 0,080	0,046 0,307	0,036 0,215	0,037 0,844	0,030 0,681	0,211 0,224	0,037 0,686	0,033 0,779	0,044 0,833	0,068 0,065
	9	0,030 2,462	0,036 0,204	0,087 2,186	0,037 2,079	0,034 2,280	0,033 0,038	0,030 0,815	0,033 0,230	0,032 1,439	0,146 2,218	0,037 1,692	0,031 1,704	0,045 1,816	0,041 1,705
	10	0,025 2,205	0,027 0,024	0,104 2,277	0,033 1,951	0,099 2,441	0,028 0,948	0,024 0,021	0,031 0,026	0,028 0,027	0,152 2,434	0,031 0,980	0,030 1,576	0,031 0,919	0,059 1,763
	11	0,021 2,031	0,025 0,022	0,084 2,072	0,034 1,780	0,033 2,190	0,023 0,137	0,021 0,022	0,027 0,027	0,024 0,026	0,139 2,181	0,030 0,101	0,027 1,448	0,047 1,027	0,038 1,557
	12	0,020 2,275	0,021 0,020	0,037 2,355	0,023 2,038	0,025 2,441	0,023 0,651	0,022 0,018	0,021 0,023	0,017 0,028	0,043 2,478	0,015 0,027	0,012 1,695	0,019 0,197	0,015 1,817
	13	0,026 1,195	0,024 0,472	0,121 0,154	0,032 1,108	0,049 0,086	0,022 0,377	0,039 0,257	0,028 0,509	0,028 0,765	0,190 0,201	0,035 0,786	0,024 0,801	0,043 0,818	0,047 0,048
	14	0,022 2,124	0,021 0,032	0,068 2,181	0,027 1,955	0,027 2,368	0,027 0,747	0,021 0,122	0,026 0,042	0,027 0,023	0,111 2,401	0,029 0,027	0,024 1,325	0,039 0,696	0,036 1,700
	15	0,023 0,046	0,024 0,732	0,067 1,600	0,031 0,046	0,029 1,738	0,026 0,622	0,023 0,282	0,027 0,806	0,024 1,212	0,101 1,734	0,031 1,269	0,023 0,027	0,039 1,254	0,034 1,354
	16	0,024 2,159	0,026 0,690	0,081 2,009	0,031 1,835	0,027 1,975	0,026 0,730	0,023 0,223	0,028 0,783	0,026 0,353	0,129 1,980	0,032 0,995	0,028 1,526	0,036 0,038	0,035 1,407
	17	0,027 0,912	0,030 0,366	0,125 0,129	0,033 0,819	0,046 0,056	0,028 0,293	0,032 0,195	0,031 0,411	0,030 0,634	0,178 0,171	0,031 0,514	0,030 0,575	0,033 0,638	0,063 0,061

DO spécifique>2
 2>DO spécifique>1
 1>DO spécifique>0,1
 DO spécifique< 0,1

Pour mieux cerner les spécificités relatives de ces anticorps monoclonaux les uns par rapport aux autres, nous avons effectué des tests de complémentarité. Pour ce faire, des tests combinatoires ont été réalisés en employant chacun des 14 anticorps comme anticorps de capture (phase solide) et comme anticorps de révélation (traceur biotinylé), soit au total 196 combinaisons. Lorsque l'on emploie comme analyte la protéine recombinante Hc/TBA à 1 ng/mL (Tableau 16), 35 combinaisons d'anticorps présentent un signal spécifique supérieur à 2 unités d'absorbance (ou DO) et 49 autres entre 1 et 2 DO après 1 h de révélation. En revanche, seulement 4 couples présentent un signal spécifique supérieur à 1 DO dans les mêmes conditions lorsque l'on emploie la protéine TBA à 10 ng/mL (Tableau 17). Cela montre que les anticorps produits possèdent une meilleure affinité pour le fragment Hc que pour la protéine entière, qui est de surcroît utilisée à plus forte concentration (3,3 fois plus concentrée en terme de molarité, la masse molaire de la TBA étant de 150 kDa et celle de Hc/TBA de 50,5 kDa).

Ces résultats permettent de distinguer plusieurs groupes d'anticorps qui, à première vue, reconnaissent la même région de la protéine. Les anticorps appartenant à un même groupe sont caractérisés par l'absence de signal lorsqu'ils sont employés ensemble en test combinatoire. Ainsi, les tests combinatoires avec Hc/TBA mettent en évidence 5 groupes d'anticorps formés par les Ac 2, 10, 11, 12, 14 (groupe 1) ; les Ac 4, 7, 13, 17 (groupe 2) ; les Ac 1, 5 15 (groupe 3) ; l'Ac 9 (groupe 4) et l'Ac 16 (groupe 5). Les couples d'anticorps donnant un signal élevé avec la protéine entière sont (AcM 1 ; AcM 4), (AcM 1 ; AcM 7), (AcM 5 ; AcM 7) et (AcM 5 ; AcM 13) montrant bien la complémentarité des groupes 2 et 3. Quand on emploie le même anticorps comme anticorps de capture et comme anticorps de révélation, on n'observe aucun signal ; ce qui se traduit visuellement par une ligne diagonale claire sur le Tableau 16.

Cette étude fait par ailleurs ressortir deux observations intéressantes. La première est que, pour le même couple d'anticorps, une combinaison fournit toujours des résultats plus favorables, ce qui suggère soit une influence dans la conformation soit l'implication de l'anticorps le plus affiné comme traceur. De plus, ceci semble confirmé par le fait que 4 anticorps sont très majoritairement impliqués dans les meilleurs résultats (AcM 1, 4, 7 et 13). Ceci pourrait découler d'une incorporation plus efficace de la biotine lors du marquage d'où un signal plus fort. Cependant, 3 des ces anticorps appartiennent au même groupe (AcM 4, 7 et 13). L'épitope mis en jeu dans ce cas doit donc présenter une accessibilité idéale. Ce

Tableau 17 : Test combinatoire des anticorps AcMTB avec TBA (10 ng/mL).

Dans chaque case : :moyenne de 2 mesures d'absorbance à 414 nm à t=1h pour des puits contenant l'analyte (en bas) ou non (signal non-spécifique, en haut). DO spécifique=Valeur du bas- valeur du haut. Case colorée en orange : $2 > DO\ spécifique > 1$; en bleu : $1 > DO\ spécifique > 0,1$; en blanc : $DO\ spécifique < 0,1$.

TBA		Traceur mAbTB-biot													
10 ng/mL		1	2	4	5	7	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Phase solide mAbTB	1	0,017 0,024	0,020 0,276	0,069 1,122	0,025 0,026	0,026 1,130	0,034 0,297	0,016 0,062	0,025 0,298	0,017 0,525	0,102 1,083	0,023 0,727	0,020 0,018	0,024 0,542	0,029 0,752
	2	0,018 0,458	0,018 0,018	0,059 0,914	0,021 0,319	0,023 0,945	0,022 0,047	0,014 0,024	0,019 0,015	0,018 0,019	0,096 0,986	0,024 0,034	0,025 0,448	0,030 0,398	0,034 0,726
	4	0,022 0,315	0,029 0,147	0,113 0,112	0,029 0,264	0,042 0,037	0,025 0,129	0,029 0,051	0,025 0,154	0,020 0,160	0,159 0,146	0,024 0,212	0,030 0,183	0,026 0,198	0,051 0,050
	5	0,028 0,066	0,024 0,278	0,066 1,049	0,025 0,061	0,023 1,088	0,033 0,303	0,018 0,083	0,028 0,328	0,020 0,583	0,097 1,162	0,024 0,809	0,026 0,058	0,032 0,612	0,034 0,817
	7	0,015 0,266	0,029 0,126	0,101 0,120	0,031 0,209	0,033 0,037	0,027 0,106	0,023 0,049	0,031 0,127	0,022 0,159	0,158 0,138	0,025 0,166	0,028 0,148	0,030 0,210	0,045 0,040
	9	0,023 0,770	0,025 0,054	0,054 0,833	0,032 0,543	0,024 0,882	0,026 0,033	0,019 0,161	0,021 0,06	0,020 0,358	0,061 0,841	0,020 0,635	0,022 0,455	0,023 0,582	0,023 0,556
	10	0,014 0,243	0,017 0,029	0,059 0,704	0,023 0,143	0,072 0,823	0,024 0,247	0,018 0,033	0,021 0,027	0,019 0,022	0,101 0,824	0,020 0,093	0,026 0,246	0,027 0,141	0,050 0,541
	11	0,017 0,435	0,010 0,011	0,069 0,843	0,018 0,283	0,030 0,881	0,013 0,028	0,016 0,016	0,014 0,007	0,015 0,012	0,086 0,802	0,022 0,023	0,016 0,357	0,033 0,355	0,025 0,620
	12	0,012 0,573	0,012 0,012	0,025 0,686	0,014 0,396	0,014 0,815	0,014 0,185	0,014 0,019	0,019 0,017	0,012 0,022	0,035 0,783	0,016 0,018	0,014 0,391	0,014 0,135	0,031 0,611
	13	0,054 0,331	0,023 0,137	0,107 0,184	0,027 0,229	0,035 0,037	0,022 0,104	0,111 0,060	0,024 0,164	0,021 0,233	0,144 0,123	0,022 0,292	0,023 0,219	0,031 0,291	0,041 0,034
	14	0,019 0,672	0,025 0,018	0,058 0,809	0,025 0,513	0,018 0,825	0,015 0,247	0,014 0,031	0,017 0,023	0,015 0,014	0,085 0,848	0,017 0,020	0,014 0,401	0,023 0,247	0,024 0,601
	15	0,014 0,019	0,016 0,372	0,056 0,772	0,022 0,026	0,018 0,804	0,017 0,239	0,016 0,089	0,020 0,401	0,015 0,434	0,086 0,827	0,023 0,641	0,023 0,032	0,035 0,556	0,034 0,600
	16	0,020 0,646	0,019 0,254	0,069 0,854	0,020 0,445	0,020 0,829	0,019 0,290	0,016 0,065	0,020 0,296	0,015 0,067	0,101 0,837	0,022 0,362	0,018 0,375	0,027 0,027	0,027 0,570
	17	0,021 0,251	0,019 0,125	0,118 0,117	0,026 0,196	0,046 0,038	0,022 0,098	0,030 0,048	0,029 0,136	0,031 0,156	0,180 0,164	0,031 0,201	0,021 0,166	0,031 0,232	0,046 0,044

	DO spécifique > 1
	$1 > DO\ spécifique > 0,1$
	DO spécifique < 0,1

phénomène a déjà été observé au laboratoire dans le cadre de la mise au point d'autres dosages sandwich pour plusieurs molécules.

Ces anticorps ont permis de développer au laboratoire un dosage immunométrique à deux sites de la TBA. Les meilleures combinaisons ont été retestées après marquage des différents traceurs à l'acétylcholinestérase (AChE). Dans ces conditions, le couple (AcM 16, AcM 4) s'est révélé être le plus performant, autorisant une limite de détection inférieure à 50 pg/mL de TBA.

Dans la perspective de développer un dosage SPIT-FRI en employant ces anticorps, nous avons évalué la possibilité de les utiliser en format compétitif. Nous avons testé plusieurs molécules différentes comme traceur.

- *Traceurs Hc/TBA et TBA*

Dans un premier temps, nous avons utilisé comme traceur après biotinylation la protéine ayant servi d'immunogène Hc /TBA (Hc/TBA-biot). Tout d'abord, des tests d'évaluation du titre des ascites avec le traceur (employé à 2 ng/mL) nous ont permis de déterminer la dilution engendrant un signal de 200-300 mDO après 1h de révélation, correspondant à la dilution adéquate pour effectuer ensuite un dosage par compétition.

Les résultats de ces dosages montrent que tous les anticorps permettent d'obtenir une courbe de déplacement en utilisant comme standard Hc/TBA (gamme de 30 à 0,1 ng/mL) (voir Figure 80). L'anticorps AcM 12 se distingue des autres en présentant l'EC₅₀ la plus basse (7,4 ng/mL) et une limite de détection de 0,75 ng/mL. Celle-ci se révèle cependant nettement plus élevée que celle obtenue avec le dosage immunométrique (inférieure à 50 pg/mL). De plus, les dosages effectués avec la protéine entière révèlent, comme déjà constaté lors du développement des tests immunométriques, une forte diminution de la reconnaissance de la protéine entière par rapport à la protéine Hc/TBA (Figure 81). En effet, aucun déplacement n'est observé pour une concentration inférieure à 30 ng/mL en protéine entière. Ne pouvant augmenter cette concentration en raison de la forte toxicité de la protéine, nous n'avons pu obtenir des courbes d'étalonnage avec la protéine entière. Pour une concentration de TBA de 100 ng/mL, on observe une inhibition du signal de plus de 20% seulement pour 4 anticorps : AcM 12, 4, 9 et 7 (respectivement avec 34, 28, 27 et 23 % d'inhibition du signal).

L'utilisation d'un traceur TBA-biot a permis d'améliorer la sensibilité du dosage qui reste toutefois faible. De plus, l'emploi de TBA comme tripode ne peut être envisagé pour des raisons de toxicité, c'est pourquoi nous avons essayé de mettre au point des traceurs issus de fragments non toxiques de la protéine qui permettraient de sensibiliser le dosage.

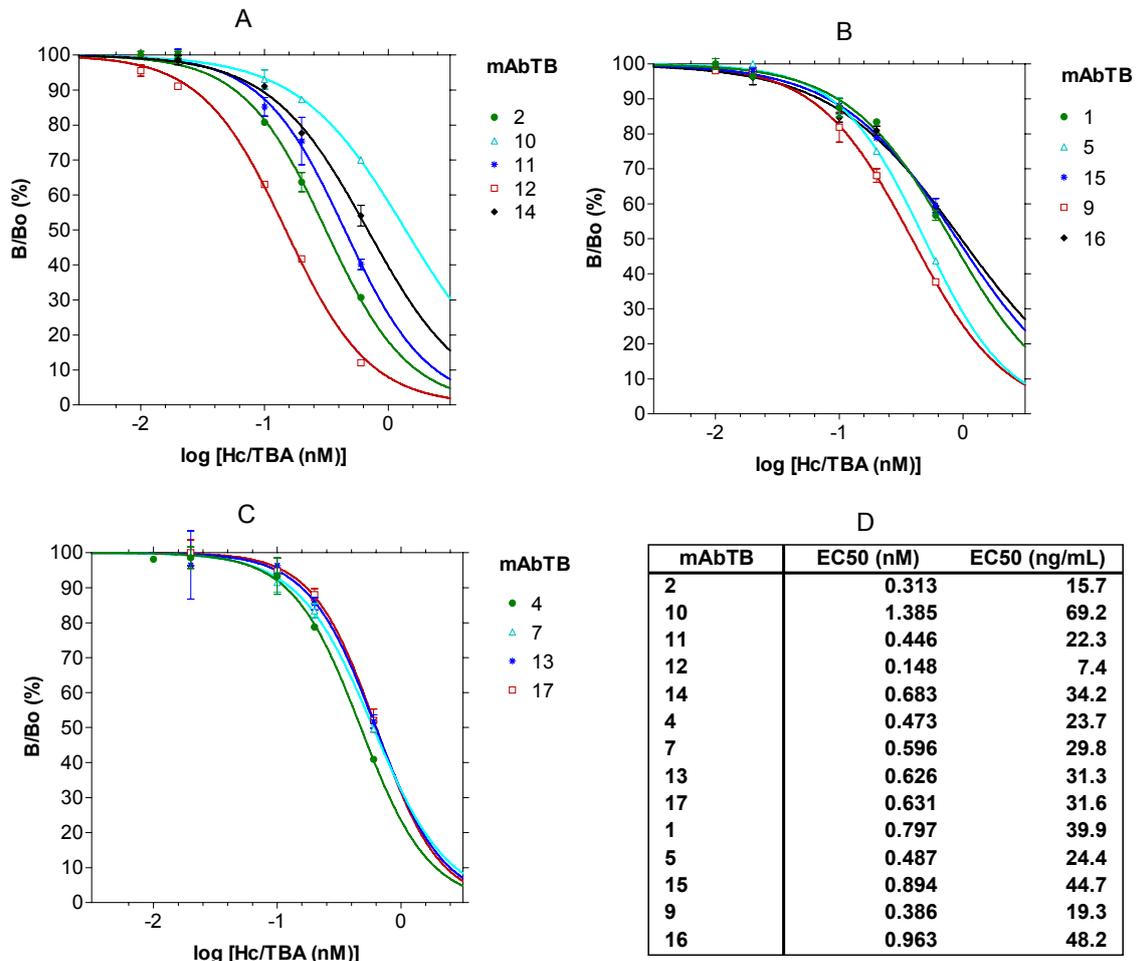


Figure 80 : Courbes de déplacement avec le standard Hc/TBA pour les 14 anticorps AcMTB (traceur Hc-TBA biotinylé)

Les graphes A, B, C représentent le signal d'absorbance exprimé en pourcentage par rapport au signal maximal (Bo) en fonction du logarithme de la concentration en protéine Hc/TBA, pour les 14 anticorps AcMTB (graphe A : anticorps du groupe 1, graphe B : anticorps du groupe 2, graphe C : anticorps des groupes 3 à 5). Les courbes sont modélisées par une régression non-linéaire de type sigmoïdale.

Le tableau (D) regroupe les EC50 (concentrations permettant un déplacement de 50% du signal) en nM et en ng/mL pour les 14 anticorps.

Les dosages sont réalisés en employant le traceur Hc/TBA biotinylé à 2 ng/mL et les anticorps à une dilution 10^{-6} pour les ascites AcMTB 1, 2, 5, 11, 16 et une dilution 3.10^{-6} pour les 9 autres.

Notations : B=Signal mesuré en présence de standard

Bo=Signal maximal (en l'absence de toxine TBA ou Hc/TBA)

Il ressort de cette étude que les anticorps présentent une affinité beaucoup plus importante pour Hc/TBA que pour TBA. Lorsque l'on emploie comme traceur Hc biotinylé, les interactions mises en jeu dans le complexe anticorps/traceur ne peuvent être déplacées que par un excès très important de protéine entière. Nous avons donc souhaité utiliser d'autres traceurs susceptibles d'être moins bien reconnu par les anticorps afin d'améliorer la sensibilité du dosage. Nous avons donc décidé d'utiliser comme traceur 2 protéines recombinantes Hc1 et Hc2 correspondant aux fragments N- et C-terminaux de la protéine Hc/TBA, d'un poids moléculaire d'environ 25000 Da chacune.

- *Essais avec Hc1 et Hc2*

Nous avons d'abord réalisé des tests de compétition avec le traceur Hc/TBA biotinylé pour évaluer la reconnaissance de Hc1 et Hc2 par les 14 anticorps. Les résultats sont résumés dans le Tableau 18 (le traceur Hc/TBA biotinylé étant employé à 2 ng/mL). Ces tests montrent que la majorité des anticorps reconnaissent Hc1 ou Hc2, même si certains anticorps notamment AcM 4, 7, 12, 14 et 17, ne reconnaissent que très peu les deux protéines. Par ailleurs, plusieurs anticorps semblent reconnaître à la fois Hc1 et Hc2, ce qui traduit soit un artefact, soit une contamination des solutions de protéines.

D'après ces résultats, les anticorps qui reconnaissent le mieux Hc1 sont AcM 1, 5 et 15; tandis que ceux qui reconnaissent le mieux Hc2 sont AcM 2, 9, 11. Tous les anticorps d'un même groupe ne présentent pas la même réactivité par rapport à Hc1 et Hc2, comme l'atteste la présence de 2 anticorps (AcM 2 et 11) parmi les meilleurs anticorps reconnaissant Hc2 tandis que AcM 12 ne donne qu'un signal très faible. En revanche, les trois anticorps reconnaissant le mieux Hc1 regroupent tous les anticorps du groupe 3, suggérant la liaison à un même épitope situé sur Hc1. Nous pouvons également noter que parmi les anticorps présentant une bonne affinité pour Hc2, AcM 9 est celui qui reconnaissait le mieux la protéine entière (avec 30% d'inhibition pour 100 ng/mL de TBA), tandis que les 3 anticorps reconnaissant le mieux Hc1 ne présentaient aucun déplacement avec TBA à 100 ng/mL. De plus, trois des 4 anticorps reconnaissant le mieux la protéine entière (AcM 4, 7 et 12) reconnaissent très peu Hc1 et Hc2. Pour confirmer ce résultat, nous avons réalisé des tests de liaison vis-à-vis des 2 protéines Hc1 et Hc2 biotinylés pour les 14 anticorps. Nous avons donc testé une gamme de dilution des différents anticorps sur une plaque revêtue d'anticorps de capture CAS en présence de traceur Hc1 ou Hc2 biotinylé à 2, 10 ou 100 ng/mL pour choisir la concentration adéquate en traceur.

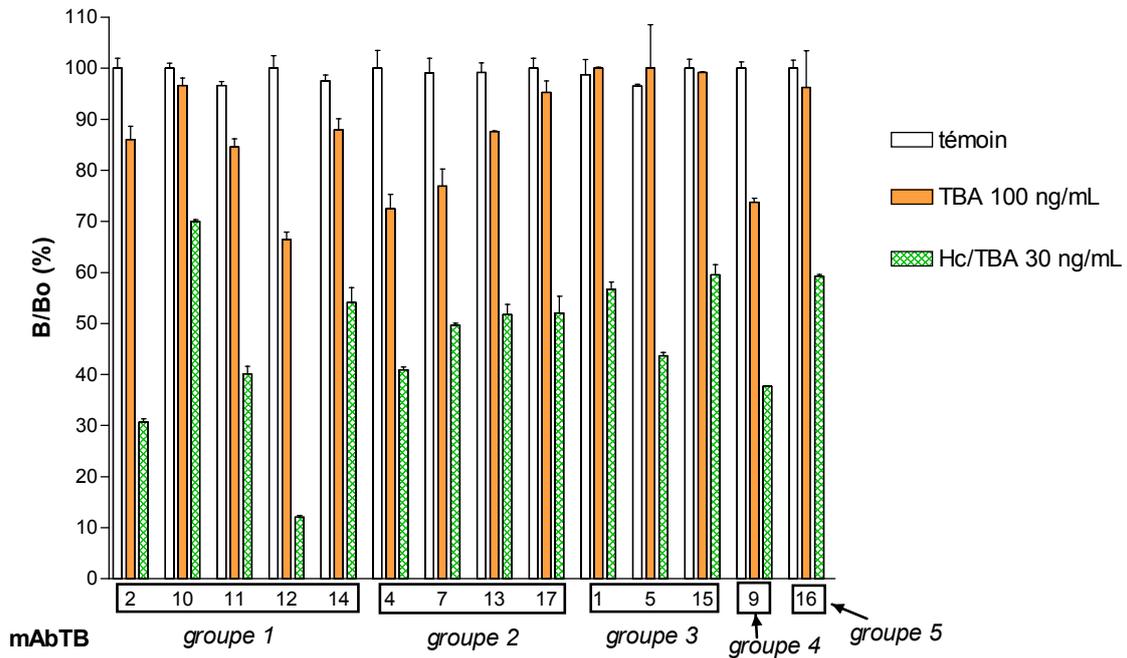


Figure 81 : Comparaison du déplacement avec Hc/TBA et TBA pour les 14 anticorps AcMTB

L'histogramme représente le signal d'absorbance (B) exprimé en pourcentage par rapport au signal maximal (Bo) dans 3 conditions : sans analyte (témoin, barre pleine blanche), avec Hc à 30 ng/mL (barre pleine orange), et avec TBA à 100 ng/mL (barre hachurée en vert).

Les dosages sont réalisés en employant le traceur Hc/TBA biotinylé à 2 ng/mL et les anticorps à une dilution 10^{-6} pour les ascites TB 1, 2, 5, 11, 16 et une dilution 3.10^{-6} pour les 9 autres.

Tableau 18 : Comparaison des 14 AcM TB pour la reconnaissance de Hc1 et Hc2

3 concentrations en protéine Hc1 ou Hc2 (10 ng/mL, 0,1 et 1 μ g/mL) ont été testées par dosage compétitif (en employant le traceur Hc/TBA biotinylé à 2 ng/mL et les ascites à une dilution 10^{-6} pour TB 1, 2, 5, 11, 16 et une 3.10^{-6} pour les 9 autres).

Notations : ++ : Signal significatif pour 10 ng/mL.

+ : Pas de signal pour 10 ng/mL mais signal significatif pour 0,1 et 1 μ g/mL.

+/- : Pas de signal pour 10 ng/mL et 0,1 μ g/mL mais signal significatif pour 1 μ g/mL

- : Signal non significatif pour les 3 concentrations.

AcM TB	Groupe 1				Groupe 2				Groupe 3			Gr4	Gr5	
	2	10	11	12	14	4	7	13	17	1	5	15	9	16
Hc1	+	+/-	+	-	-	+/-	+/-	+	+/-	++	++	++	+/-	+
Hc2	++	+	++	+/-	-	-	-	+/-	-	+	+	+	++	+/-

Avec le traceur Hc1 biotinylé à 10 ng/mL, on obtient des courbes de titration avec un signal élevé (signal maximum supérieur à 400 mDO après 1h de révélation) pour les anticorps AcM 1, 5, 15 et 16. Avec le traceur Hc2 biotinylé à 2 ng/mL, on obtient des courbes de titration avec un signal élevé (signal maximum supérieur à 400 mDO après 1h de révélation) pour les anticorps AcM 2, 9, 10, 11. Par ailleurs, il est à noter que, aussi bien avec Hc1 qu'avec Hc2, les anticorps 4, 7, 17, 12, 13 et 14 ne permettent pas d'obtenir un signal suffisant même avec la concentration en traceur la plus élevée (100 ng/mL).

Au vu des courbes de titration obtenues, nous avons donc choisi de tester pour le dosage compétitif 8 anticorps : AcM 1, 2, 5, 15, 16 avec le traceur Hc1-biot et AcM 2, 9, 10, 11, avec le traceur Hc2-biot.

Les résultats des dosages par compétition montrent qu'aucun des anticorps ne permet une forte inhibition du signal avec la protéine entière à 100 ng/mL, comme l'illustre la Figure 82. On observe seulement pour 3 anticorps une différence significative avec le témoin (AcM2 : 12,5% d'inhibition du signal, AcM9 : 7 % et AcM1 : 6 %). Par ailleurs, on peut noter que l'on observe un déplacement plus important (+ 10 à 30 % selon l'anticorps) pour les fragments Hc1 ou Hc2 que pour Hc (lorsque l'on rapporte les concentrations en terme de concentration molaire), Hc étant pourtant la protéine immunogène, sans pouvoir fournir d'explication à cette observation.

En conclusion, l'utilisation des fragments Hc1 et Hc2 comme traceur n'a pas permis d'améliorer la sensibilité du dosage par compétition. Parmi les anticorps reconnaissant le mieux TBA en compétition avec le traceur Hc/TBA (AcMTB 4, 7, 9, 12), trois ne reconnaissent ni Hc1 ni Hc2 (AcMTB 4, 7, 12), suggérant la reconnaissance d'un épitope conformationnel dont la structure ne serait pas retrouvée dans les protéines recombinantes Hc1 et Hc2. L'AcM 9 qui, avec 100 ng/mL de TBA, permettait avec le traceur Hc-biot un déplacement de 27 % du signal ne donne lieu qu'à une baisse de 7% avec le traceur Hc2-biot.

• *Essais avec les peptides PepTB01-PepTB11*

Les anticorps reconnaissant Hc1 ou Hc2 montrant clairement une plus forte affinité pour ces fragments que pour la protéine entière, il nous a paru logique d'essayer de développer dans un second temps un traceur moins bien reconnu à partir d'un analogue peptidique. Nous avons pour cela synthétisé 11 peptides de séquence contiguë et chevauchante recouvrant la totalité de la séquence de Hc1 (séquence des peptides décrite p.89). Testés par compétition avec le traceur Hc-biot pour les différents anticorps, ces peptides n'ont fourni que des résultats

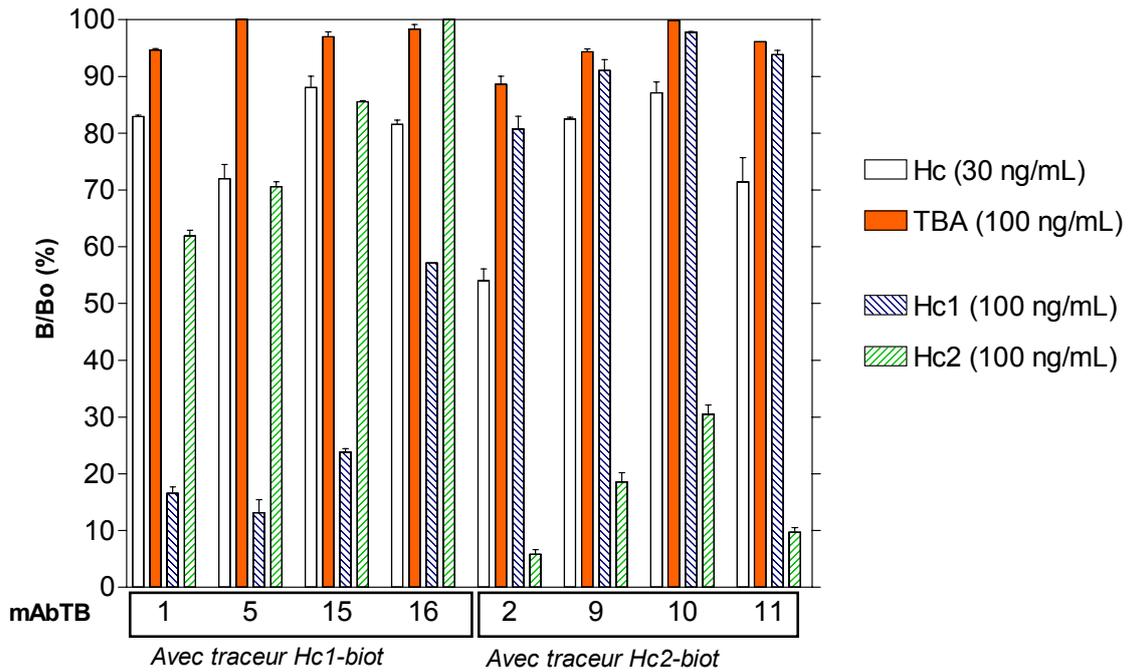


Figure 82 : Dosages par compétition avec les traceurs Hc1 et Hc2 biotinylés.

L'histogramme représente la valeur d'absorbance exprimée en pourcentage par rapport au signal du signal maximal (B_0) avec 4 compétiteurs différents : Hc à 30 ng/mL (barre pleine blanche), TBA à 100 ng/mL (barre plein orange), Hc1 à 100 ng/mL (barre hachurée en bleu) et Hc2 à 100 ng/mL (barre hachurée en vert).

Les dosages sont réalisés en employant le traceur Hc1-biot (à 10 ng/mL) avec les AcMs TB 1, 5, 15 ou 16, ou le traceur Hc2-biot (à 2 ng/mL) avec les AcMs TB 2, 9, 10 ou 11. Les anticorps sont utilisés à la dilution de l'ascite adéquate : 10^{-5} (pour les AcMs TB 9 et 16), $5 \cdot 10^{-6}$ (pour les AcMs TB 10 et 15) ou 10^{-6} (pour les AcMs TB 1, 2, 5 et 11).

décevants avec un faible déplacement (moins de 10 % du signal maximal) avec une forte concentration en peptide (50 µg/mL) pour quelques anticorps seulement.

Nous avons également réalisé un test de liaison directe de ces peptides biotinylés avec les anticorps. Aucun des peptides biotinylés n'est reconnu par les anticorps même à concentration élevée (2 µg/mL).

Aucun des peptides n'étant reconnu par les 7 anticorps reconnaissant Hc1, nous pouvons conclure que ces anticorps reconnaissent un épitope conformationnel dont la structure n'est pas conservée dans ces différents peptides.

Lorsqu'on évalue la liaison de ces peptides biotinylés avec un sérum polyclonal de lapin dirigé contre le fragment Hc/TBA (fourni par le Dr M. Popoff de l'Institut Pasteur), 4 de ces peptides sont reconnus (Pep01 > Pep02 > Pep03 > Pep04) ce qui montre que l'emploi d'une stratégie peptidique pour reconnaître la TBA peut être envisagée.

III.2.2.2.3. Immunisations peptidiques

Nous avons initié au laboratoire une campagne d'immunisation avec différents peptides recouvrant la séquence du fragment Hc/TBA afin d'obtenir des anticorps reconnaissant également avec la protéine entière, permettant d'une part de s'affranchir d'une éventuelle spécificité « conformationnelle » des anticorps, et d'autre part de limiter la distance entre le donneur et l'accepteur durant le développement ultérieur du dosage SPIT-FRI.

• Immunisations avec PepTB 01

Ce peptide semblant très bien reconnu dans les expériences précédentes avec l'antisérum de lapin anti-Hc a servi à immuniser 2 lapins qui présentent une très bonne réponse détectée par un test de liaison avec le traceur Pep01-biot. Le peptide Pep02-biot dont la séquence recouvre celle de Pep01 est également reconnu par les sérums, mais environ 10 fois moins bien.

Les dosages par compétition réalisés avec les antisérums (saignées S2 dilution à 10^{-5}) et le traceur Pep01-biot (0,1 ng/mL) montrent l'absence de déplacement avec la protéine entière, même à concentration élevée (100 ng/mL).

• Immunisations avec un mélange de l'ensemble des peptides Pep01-Pep11

2 autres lapins ont été immunisés avec le mélange équimolaire des 11 peptides couvrant la séquence de Hc1. Les tests de liaison réalisés avec les 11 traceurs biotinylés montrent une très bonne reconnaissance de 4 peptides (Pep01, 02, 06 et 07) par les 2 lapins. En revanche seul un lapin reconnaît les autres peptides (bon signal pour Pep03, 04, 05, 11 et faible avec les autres).

Les dosages par compétition réalisés avec les traceurs Pep01-biot (0,1 ng/mL) et Pep02-biot, Pep06-biot et Pep07-biot (1 ng/mL) pour les antisérums (saignées S2) employés aux dilutions adéquates n'ont fourni aucun déplacement avec la protéine entière même à concentration élevée (100 ng/mL).

- *Immunisations avec TBA-Cter et TBA-Nter*

De la même façon, les immunisations effectuées avec les peptides TBA-Cter et TBA-Nter ont permis d'obtenir des anticorps reconnaissant bien ces peptides, mais aucun déplacement n'a été observé avec la protéine entière, même à 100 ng/mL.

III.2.2.2.4. Conclusions

Les essais de mise au point d'anticorps anti-TBA n'ont pas permis d'obtenir des anticorps utilisables dans le cadre du SPIT-FRI. La production d'anticorps anti-toxine botulinique est difficile en raison de la toxicité très élevée de la molécule qui interdit son injection directe aux souris même à de faibles concentrations. Il n'existe que peu d'anticorps commerciaux reconnaissant cette protéine. En utilisant le fragment Hc comme immunogène, nous avons pu obtenir 14 anticorps monoclonaux. Parmi eux, les AcMs TB4 et TB16 ont permis le développement d'un test sandwich très sensible permettant de détecter moins de 0,1 ng/mL de TBA. En revanche, nous avons été confrontés à des résultats en format compétitif peu satisfaisants en terme de sensibilité. Pourtant, ces anticorps reconnaissent bien la protéine entière, puisqu'ils sont tout à fait fonctionnels en test sandwich. En comparant différents traceurs, nous avons pu montrer que l'utilisation comme traceur de la toxine entière au lieu du fragment Fc (utilisé comme immunogène) améliore la sensibilité, qui reste cependant insuffisante. Nous avons également tenté des immunisations avec des peptides recouvrant une partie de la séquence de la toxine botulinique (PepTB, TBA C-ter, TBA N-ter). Ces stratégies n'ont pas permis de produire des anticorps reconnaissant la protéine entière. Ces résultats illustrent la difficulté de produire des anticorps reconnaissant une protéine *via* des peptides recouvrant partiellement sa séquence. Nous avons cependant montré qu'un antisérum de lapin immunisé contre Hc pouvait reconnaître les peptides PepTB 01-04, montrant qu'il serait possible d'obtenir des anticorps anti-peptides qui reconnaîtraient la protéine entière. Il serait intéressant de recommencer l'expérimentation sur un nombre plus élevé de lapins avec ces 4 peptides.

III.2.2.3. Ricine

III.2.2.3.1. Obtention d'anticorps monoclonaux anti-Ricine

La toxicité de la ricine requérant la structure hétérodimérique, chaîne A (RicA) et chaîne B (RicB) reliées par un pont disulfure, nous avons utilisé chacune de ces deux chaînes séparément comme immunogène, suivant une stratégie déjà employée par d'autres équipes (Leonard *et al.*, 1987 ; Maddaloni *et al.*, 2004). A l'issue des immunisations, deux fusions ont été réalisées, pour la production d'anticorps anti-RicA et anti-RicB. La sélection des anticorps a été effectuée par dosage immunoenzymatique à l'aide de tests de liaison avec RicA-biot et RicB-biot. Nous avons obtenu 5 hybridomes produisant des anticorps dirigés contre la RicA (anticorps RCA) et 20 spécifiques de RicB (anticorps RCB).

De la même façon que pour la toxine botulinique, nous avons effectué une analyse combinatoire pour ces anticorps (625 combinaisons) avec un broyat de graine de ricin contenant la protéine entière (cf p.97). Après 10 minutes de révélation, 30 paires d'anticorps engendrent un signal d'absorbance supérieur à 1 DO, toutes utilisant comme traceur un des cinq mêmes anticorps, dont deux sont dirigés contre RicA (notés RCA n°1 et n°2) et trois contre RicB (notés RCB n°1, 2 et 3). De plus, ces 5 anticorps traceurs se révèlent fonctionnels avec la majorité des anticorps de capture, alors que seuls 7 des 20 autres anticorps traceur fournissent un signal (inférieur à 0,5 DO) après 10 min de révélation. Le développement d'un dosage immunométrique à 2 sites est bien avancé au laboratoire avec différentes combinaisons d'anticorps, permettant une détection inférieure au ng/mL.

Dans le but de développer ensuite un dosage SPIT-FRI, nous avons testé la liaison des 5 anticorps semblant les plus efficaces avec les traceurs RicA-biot (pour les AcMs RCA 1 et 2) et RicB-biot (pour les AcMs RCB 1, 2 et 3). A l'issue de ces tests, l'anticorps RCB 3 a été écarté car les signaux obtenus étaient trop faibles. Les courbes de dilution des 4 autres anticorps nous ont permis de déterminer les conditions adéquates à employer permettant l'obtention d'un signal d'environ 300 mDO.

Les dosages par compétition ont été réalisés avec le traceur RicA-biot à 10 ng/mL (avec les anticorps RCA 1 et 2 à 50 ng/mL) d'une part, et le traceur RicB-biot à 100 ng/mL (avec les anticorps RCB 1 et 2 à 50 ng/mL) d'autre part. Nous avons testé comme compétiteurs les protéines immunogènes (RicA et RicB) et la protéine entière contenue dans des broyats de graines de ricin (Figure 83, p.214). Les anticorps RCA permettent de doser RicA dans une

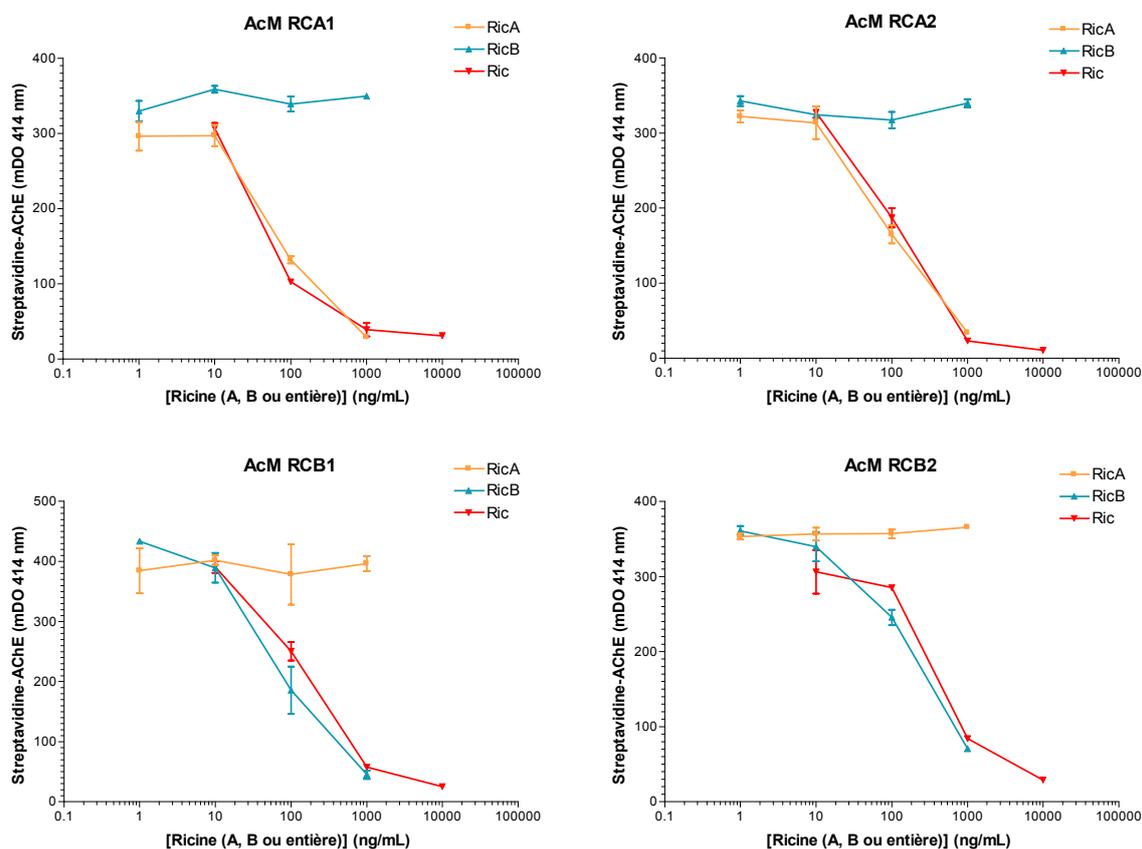


Figure 83 : Dosages par compétition de RicA, RicB et Ricine entière avec 4 anticorps

Les dosages par compétition sont réalisés avec le traceur RicA-biot à 10 ng/mL (avec les AcMs RCA1 et RCA2 à 50 ng/mL), et le traceur RicB-biot à 100 ng/mL (avec les Acs RCB1 et RCB2 à 50 ng/mL). Les graphes représentent le signal d'absorbance mesuré à 414 nm (mDO) en fonction de la concentration en Ricine entière (Ric) ou en fragment RicA ou RicB (gamme de 10 µg/mL à 1 ng/mL).

gamme de 10 ng/mL à 1 µg/mL environ, sans reconnaissance de la chaîne RicB. D'une façon équivalente, les 2 anticorps RCB ne reconnaissent pas RicA, et permettent de doser RicB dans une gamme équivalente. En revanche, les 4 anticorps permettent de doser la protéine entière dans une gamme de 10 ng/mL à 1 µg/mL environ (la concentration en protéine entière indiquée est calculée en faisant l'approximation d'un contenu en Ricine correspondant à 1 % de la masse totale des graines de ricin). La protéine entière est donc, pour ces 4 anticorps, reconnue de façon équivalente à l'immunogène dans ce format de dosage.

En conclusion, la stratégie des immunisations avec RicA et RicB s'est donc révélée performante, que ce soit avec la chaîne A ou la chaîne B de la protéine. Nous avons obtenu des anticorps anti-ricine complémentaires qui reconnaissent la protéine entière. Ces anticorps ont pu être employés pour la mise au point de dosages immunoenzymatiques fournissant de bonnes limites de détection aussi bien en format sandwich (< 1 ng/mL) que compétitif (environ 10 ng/mL).

III.2.2.3.2. Evaluation du SPIT-FRI appliqué à la Ricine

Nous avons choisi le couple de fluorophores (A532, A647) pour cette mise au point.

• Préparation du tripode

Le tripode a été préparé par marquage de la chaîne B de la Ricine (50 µg) à la biotine (ratio de couplage de 5 moles de biotine/mole de RicB) et à l'Alexa 532 (ratio de couplage de 10 moles d'A532/mole de RicB). Après couplage, le tripode purifié par chromatographie de tamisage moléculaire a été incubé à différentes dilutions sur une plaque en polystyrène noir revêtue de neutravidine. La fluorescence mesurée après lavage à 535/590 nm croît avec la concentration en tripode jusqu'à 60 nM, ce qui correspond à la saturation des sites de neutravidine, illustrant l'efficacité du couplage à la biotine et à l'Alexa 532.

• Anticorps

Le marquage des anticorps anti-RicB (RCB 1 et 2) avec l'Alexa647 a été réalisé selon le protocole classique (cf p.99, rapport de couplage de 10 moles d'A647/mole d'Ac). Les ratios d'incorporation sont de 3,2 et 5,3 moles d'A647 par mole d'Ac, respectivement pour les anticorps RCB 1 et 2. Pour les deux anticorps, on observe une diminution de la capacité de liaison à RicB-biot des anticorps marqués pour le traceur par rapport aux anticorps natifs (cf Figure 107, p.269). Par ailleurs, un test ELISA réalisé avec les anticorps RCB 1 et 2 marqués avec l'ACHé révèle une nette diminution de la reconnaissance du tripode par rapport à la ricine biotinylée par les deux anticorps (Figure 84, p.216).

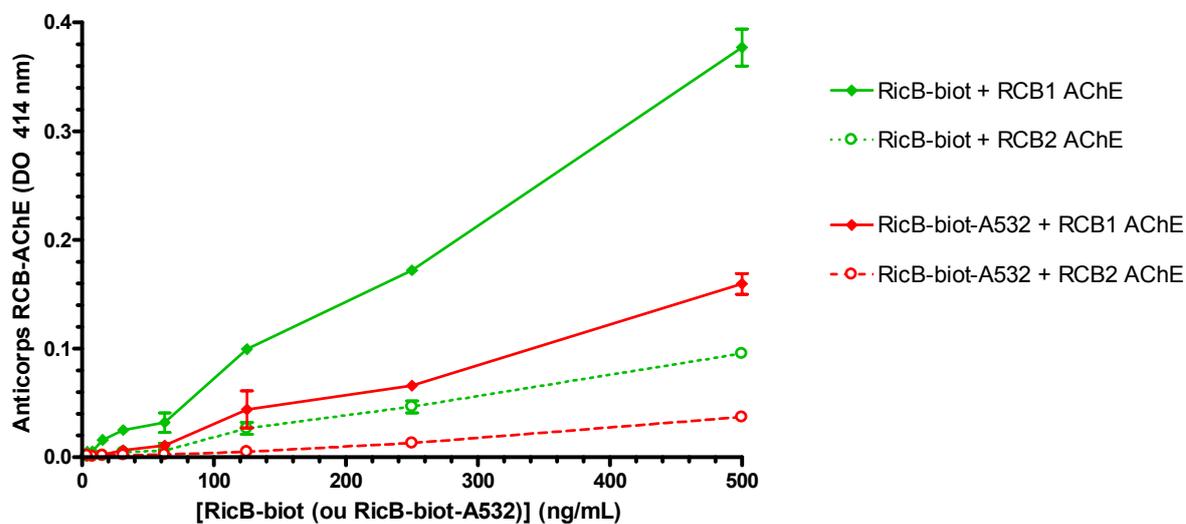


Figure 84 : Test de liaison des anticorps RCB 1 et 2 -AChE avec RicB-biot et RicB-biot-A532 (en format ELISA sur plaque neutravidine)

Test ELISA sur plaque revêtue de neutravidine.

Incubation de 50 μ L de RicB-biot ou RicB-biot-A532 à différentes concentrations avec 50 μ L d'AcM RCB (1 ou 2) -AChE à 2 UE/mL (18 h, 4°C). Révélation : 1h.

- *Quenching et déplacement par la ricine*

La Figure 85-B (p.218) présente les résultats de *quenching* de fluorescence obtenus après incubation d'une gamme d'anticorps RCB 1 et 2 -A647 dans des puits revêtus de tripode (le tripode étant employé à 15 nM). Le plateau de *quenching* est atteint pour une concentration plus faible en anticorps avec RCB 2 (8 nM) qu'avec RCB 1 (35 nM). En revanche, le *quenching* maximal est plus élevé pour RCB 1 (25 %) que pour RCB 2 (12 %), mais dans les deux cas, le *quenching* reste faible.

Il est possible que le faible taux de *quenching* soit dû à une faible reconnaissance du tripode ainsi conçu par les anticorps RCB marqués avec l'Alexa 647. Les essais de déplacement par la ricine entière (test réalisé avec l'anticorps RCB 1) montrent toutefois la faisabilité d'un tel dosage. Notons qu'il s'agit de résultats tout à fait préliminaires, réalisés dans des conditions non optimisées. D'autres études seront nécessaires pour optimiser la fabrication du tripode, notamment en ce qui concerne la stoechiométrie fluorophore/ricine/biotine).

III.2.3. Discussion-conclusion

Dans l'idéal, dans le format du SPIT-FRI, l'anticorps doit présenter envers l'analogue une constante d'association élevée et une constante de dissociation la plus faible possible, tandis qu'envers l'analyte, l'anticorps doit présenter une constante d'association plus élevée que pour l'analogue (pour favoriser de déplacement) combinée à une faible constante de dissociation (pour limiter la réassociation sur la surface). De plus, le ratio A/D devrait être maximal et la distance D-A minimale pour permettre un *quenching* maximal.

L'objectif est donc de s'approcher de ces conditions optimales pour chaque molécule. Le travail a donc été axé sur la mise au point du tripode, d'une part, et d'autre part, de l'anticorps.

- *Mise au point du tripode*

Différentes stratégies de mise en œuvre de la fabrication du tripode ont été explorées pour les différentes molécules modèles.

Dans le cas de la Substance P (cf partie 1), le tripode a été conçu à partir d'un peptide comportant une Lysine et la séquence analogue. Après purification par HPLC, ce peptide a été couplé au fluorophore avant de subir une seconde purification par HPLC.

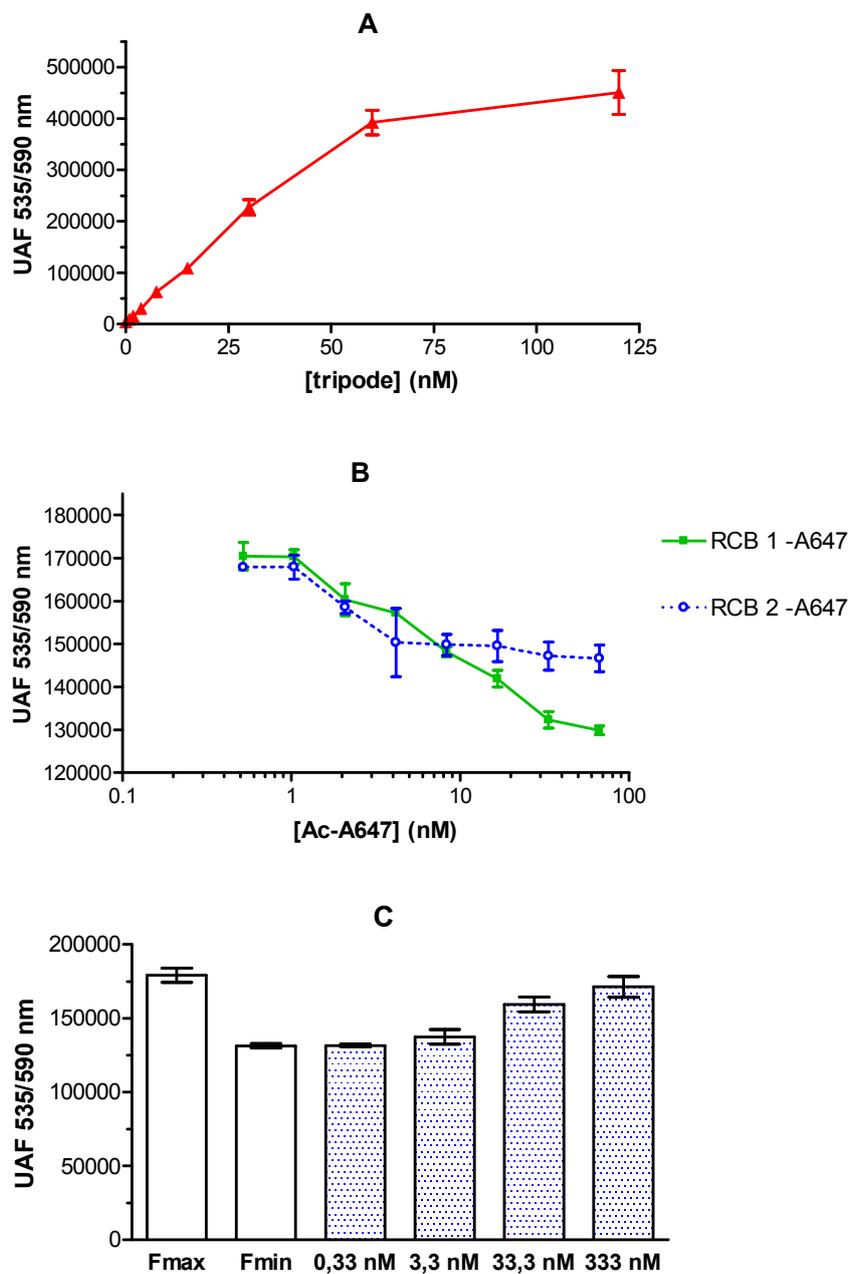


Figure 85 : Mise au point du dosage SPIT-FRI de la Ricine

A : Gamme de tripode RicB-biot-A532 sur plaque neutravidine.

B : *Quenching* du tripode RicB-biot-A532 par les anticorps RCB 1-A647 et RCB 2-A647.

C : Test de déplacement par la protéine entière (extrait de graine de ricin) avec l'anticorps RCB 1 -A647.

Dans le cas de l'aflatoxine, nous avons employé un peptide spécifique comportant une biotine (purifié par HPLC) couplé au fluorophore, repurifié (HPLC) avant greffage de l'AFB1 oxime avant de subir une dernière purification, permettant d'obtenir un composé relativement pur.

Pour l'atrazine, la même stratégie a été employée que pour l'aflatoxine. En parallèle, déjà dans l'objectif d'évaluer la faisabilité de l'emploi d'un tripode protéique, nous avons également utilisé une stratégie de couplage de l'atrazine-MPA sur de la BSA marquée avec la biotine et le fluorophore purifiée par chromatographie de tamisage moléculaire. Cette stratégie s'est révélée moins performante en terme de *quenching*, mais la modification du rapport A/D ne peut permettre de conclure à un effet de la distance D-A.

Dans le cas des modèles protéiques, nous avons marqué directement la protéine à doser avec le fluorophore et la biotine et éliminé simplement l'excès de fluorophore et de biotine libre par chromatographie de tamisage moléculaire. La solution de tripode comporte des protéines marquées avec un nombre de fluorophore et de biotine en nombre et localisation variables.

Nos résultats illustrent en premier lieu l'importance de la pureté du tripode utilisé, qui doit comporter dans l'idéal une stoechiométrie 1/1/1 pour l'analogue, la biotine et le fluorophore pour permettre un rapport A/D maximal. Le ratio fluorescéine/tripode est un paramètre clé qui doit être caractérisé au mieux. Une stratégie de marquage directe de la protéine avec le fluorophore et la biotine est réalisable, mais rend difficile le contrôle du rapport fluorophore et biotine/protéine. La purification de protéines marquées avec la biotine et le fluorophore est beaucoup plus délicate que dans le cas de petites molécules où l'on peut employer aisément une purification HPLC. Une stratégie de préparation via une molécule chimique porteuse telle que développée pour l'atrazine et l'aflatoxine devra donc être envisagée prochainement.

- *Caractéristiques de l'anticorps*

Nos résultats montrent que le marquage de l'anticorps avec le fluorophore peut conduire à un ratio fluorophore/Ac différent *et altérer* la reconnaissance de l'analyte avec une amplitude variable. Ces paramètres varient selon l'anticorps, le fluorophore et le ratio employé. Il est donc difficile de prédire le nombre de molécules de fluorophores incorporées sur l'anticorps et les capacités de liaison à l'analyte de l'anticorps après marquage. Le marquage a été effectué via des liaisons amines de l'anticorps, dont l'emplacement et le nombre diffère selon chaque anticorps. Il serait intéressant d'évaluer, à l'avenir, des marquages sur des fragments F(ab')₂ ou Fab' en utilisant des fluorophores maléimide réagissant sur les thiols, le(s) fluorophore(s) se fixant donc au niveau des fonctions SH des régions charnières de

l'anticorps. Si cette méthode semble pouvoir contrôler la localisation des fluorophores, elle sera "parasitée" par la fixation aléatoire se produisant sur les rares résidus cystéinyl présents.

A l'avenir, il pourrait être intéressant d'effectuer la sélection du tripode et de l'anticorps simultanément, en évaluant les capacités de liaison de l'anticorps marqué envers le tripode et l'analyte par méthode Biacore qui permettra de surcroît d'évaluer les constantes cinétiques d'association et de dissociation très importantes dans le cadre de notre procédé.

III.3. Transposition du SPIT-FRI à un dosage en flux

Dès le début de la thèse, le Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse avait engagé une collaboration avec le Laboratoire d'Electronique et des Technologies de l'Information (LETI) du CEA Grenoble, pour le développement d'un prototype de détection pour le SPIT-FRI.

En parallèle, nous avons souhaité réaliser une étude de faisabilité préliminaire afin d'appréhender les contraintes spécifiques du procédé et éventuellement d'orienter les choix de développement du prototype en cours de mise au point.

Le choix concernant le type d'instrument a été effectué en fonction des contraintes imposant une mesure de fluorescence sur support solide en circulation de fluide. Pour cela, nous avons utilisé comme instrument de mesure un microscope à fluorescence équipé d'une caméra CCD, et comme support de réaction des capillaires et supports plan (lames de microscopie), reliés à une pompe péristaltique assurant la circulation du fluide (voir Figure 86, p.222).

Dans un premier temps, l'utilisation d'un support capillaire, déjà utilisé par plusieurs équipes (Hisamoto et al., 2004 ; Misiakos & Kakabakos, 1998 ; Narang et al., 1997 ; Platshon et al., 1999), permettant la circulation de fluide et un rapport surface/volume élevé, nous a paru être la solution la plus simple.

Dans un second temps, nous avons utilisé des lames de microscopie en raison de l'adéquation avec l'instrumentation développée au LETI, basée sur la mesure de fluorescence par la tranche de la lame. Nous avons conçu un système formant une microcellule permettant la circulation du fluide sur la lame fonctionnalisée. Ce format a permis la réalisation d'un système multiplots grâce à l'emploi d'un appareil permettant le dépôt de gouttes sur les lames de microscopie (voir Matériel pour les expériences en format capillaire et lame, p.73 et Protocoles du SPIT-FRI en flux, p.109).

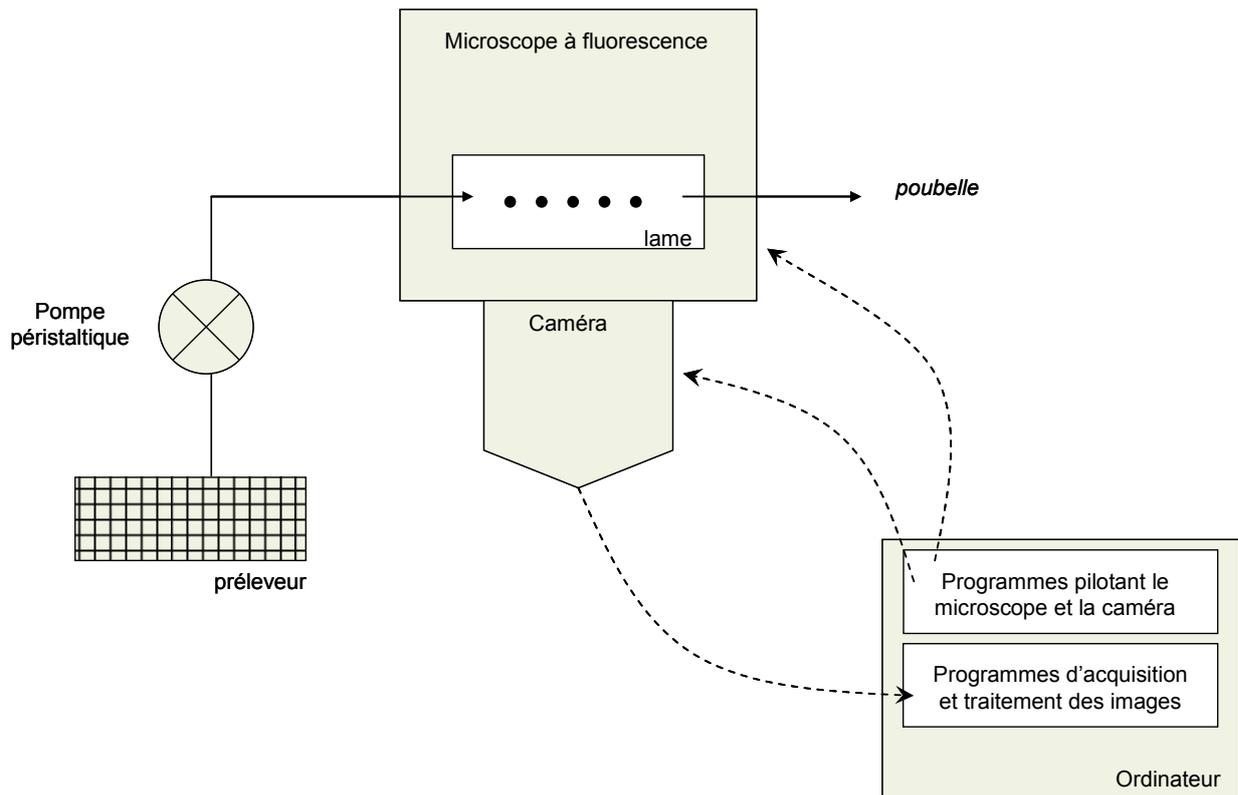


Figure 86 : Schéma du montage expérimental pour les expériences en circulation de fluide

Le système utilisé comprend une pompe péristaltique permettant la circulation du fluide dans les tubulures et la chambre réactionnelle et un microscope à fluorescence équipé d'une caméra CCD, d'un obturateur automatique et d'une platine motorisée pilotés par l'ordinateur (voir au II.1.2, Matériel pour les expériences en format capillaire et lame, p.73).

La chambre réactionnelle peut être un capillaire ou une lame.

III.3.1. Expériences en capillaire

III.3.1.1. Expériences en conditions statiques

III.3.1.1.1. Mesure de la fluorescence d'une gamme de tripode en solution

Avant d'initier les expériences, nous avons vérifié qu'il était possible de mesurer la fluorescence dans un capillaire avec le microscope. Nous avons vérifié la linéarité de l'instrument en réalisant une gamme de concentration de tripode en solution.

Nous avons utilisé des capillaires en verre de diamètre interne de 500 μm (un diamètre supérieur dépasse le champ d'observation avec l'objectif utilisé et un diamètre inférieur est délicat à manipuler).

La Figure 87 (p.224) présente les résultats obtenus pour une gamme de tripode Substance P-A532 dans un capillaire. Les images sont analysées avec le logiciel ImageJ, qui permet de sélectionner une zone sur le capillaire et de calculer la moyenne des niveaux de gris sur cette zone. Nous avons sélectionné une zone correspondant à l'ensemble de la portion du capillaire présent sur l'image (rectangle de 14784 pixels²). La courbe des niveaux de gris moyennés sur cette zone du capillaire en fonction de la concentration en tripode présente une excellente linéarité ($R^2=0.99$). Nous observons une saturation du capteur à partir de 20 000 Niveaux de Gris, qui se traduit par la perte de la linéarité.

III.3.1.1.2. Vérification de l'immobilisation du tripode sur phase solide

Le tripode a alors été immobilisé dans les capillaires préalablement revêtus de neutravidine en employant la chimie de silanisation CEA2 (voir Protocole de silanisation des supports en verre au II.3.3.6.1, p.109).

La comparaison des profils de fluorescence d'un capillaire revêtu de tripode et d'un capillaire rempli de solution de tripode permet de visualiser que la chimie d'immobilisation a bien fonctionné.

La Figure 88 (p.225) présente la coupe transversale d'un capillaire revêtu de tripode SP-A532 et d'un capillaire contenant le tripode en solution. Pour le capillaire rempli du tripode en solution, on observe une courbe en cloche dont le maximum se situe au centre du capillaire reflétant une distribution homogène des molécules dans le capillaire. Plus la distance par rapport au centre du capillaire est élevée, plus la fluorescence diminue jusqu'à être nulle à 350 μm , soit au niveau de la paroi. A l'inverse, pour le capillaire revêtu de tripode, le signal

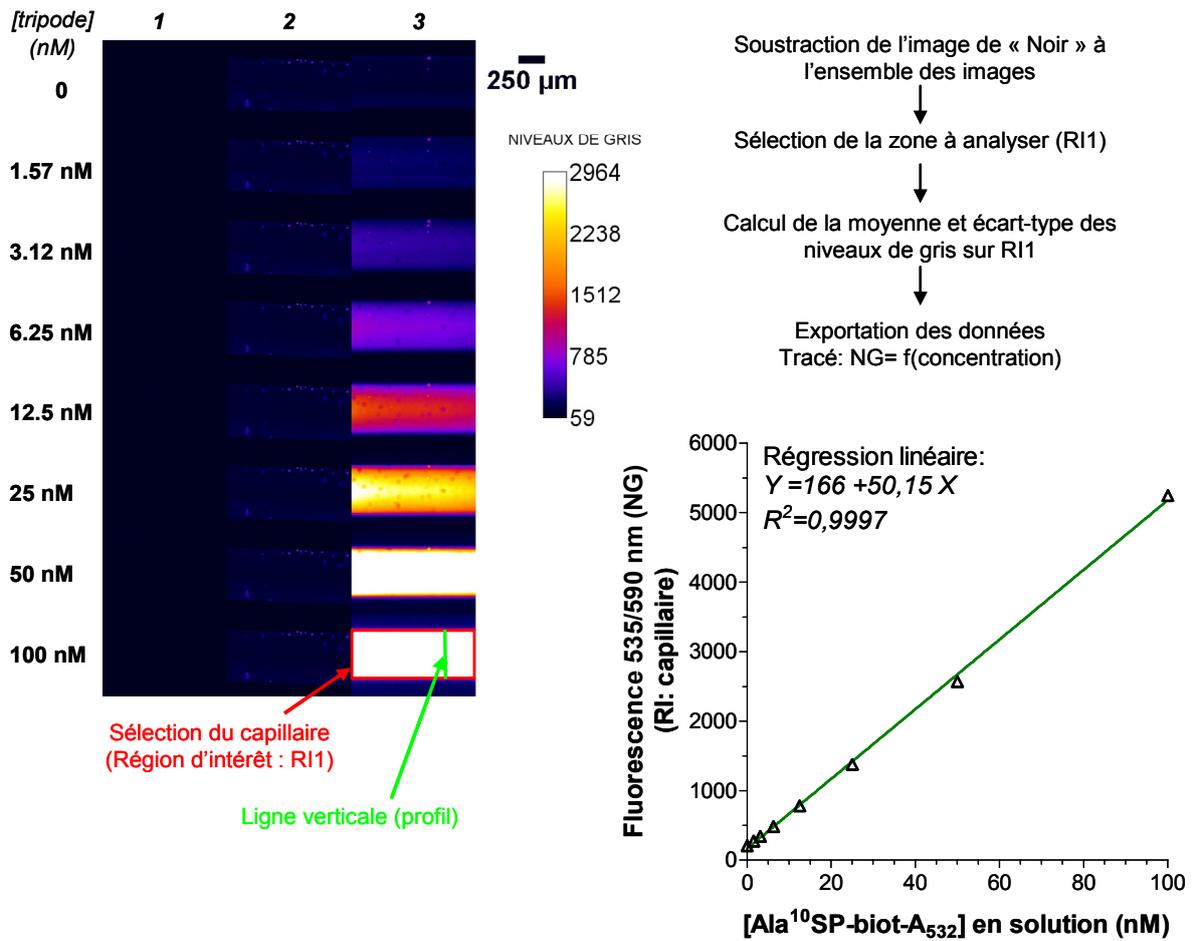


Figure 87 : Gamme de tripode SP-A532 en solution dans un capillaire

Colonne 1 : images d' « ambient » (sans capillaire).

Colonne 2 : images du capillaire témoin en tampon PVP

Colonne 3 : images du capillaire rempli de la solution de tripode SP-A532 à différentes concentrations

Le capillaire a été préalablement saturé (PVP) pour éviter l'adsorption non spécifique. Il est lavé entre chaque concentration avec du tampon de lavage.

5 mesures/concentration

Paramètres de mesure: Cube vert ; Te=1sec ; Binning 4*4 ; Diaphragmes : DO fermé / DC médian

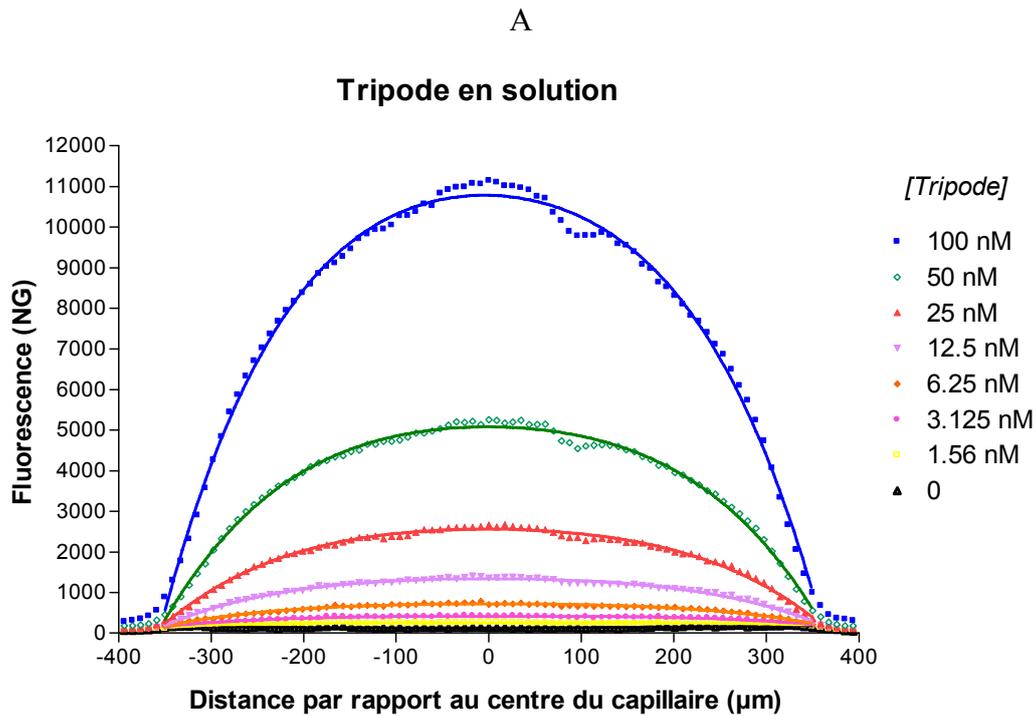


Figure 88 : Coupe transversale d'un capillaire revêtu de tripode SP-A532 ou contenant le tripode en solution

A : tripode SP-A532 en solution, conditions expérimentales voir Figure 87

B : capillaire revêtu de neutravidine sans tripode (témoin) ou après passage de 10 µL de solution du tripode SP-A532 à 100 nM à 60 µL/min et lavage, mesure en tampon PVP.

Paramètres de mesure : Cube vert ; Texp=1sec ; Binning 4x4 ; Diaphragmes : DO fermé / DC médian

augmente avec la distance par rapport au centre du capillaire confirmant que la fluorescence résulte des molécules fixées à la paroi.

Par ailleurs, la fluorescence mesurée après incubation du tripode dans un capillaire vierge est négligeable par rapport à celle mesurée dans un capillaire neutravidiné, montrant que l'adsorption non-spécifique du tripode sur le verre est faible.

III.3.1.1.3. Comparaison du *quenching* en statique avec différents couples (Donneur, Accepteur)

Nous avons comparé le *quenching* pour différents couples (donneur, accepteur). Disposant de filtres dans le bleu, le vert et le rouge, relativement proches de ceux du fluorimètre Envision, nous avons utilisé les mêmes couples que ceux utilisés pour les expériences en plaque de microtitration.

Les capillaires ont été fonctionnalisés avec les différents tripodes fluorescents en statique durant 18 h à 4°C à concentration élevée (5 µM). Après lavage, les capillaires ont été incubés dans une solution d'anticorps-accepteur en statique pour à nouveau 18 h à 4°C. Pour chaque donneur, un capillaire témoin a été réalisé (pas d'incubation dans la solution d'anticorps).

Après lavage, on mesure la fluorescence de la phase solide comparativement dans les capillaires « quenchés » ou non pour chacun des couples étudiés. Les mesures ont été effectuées en utilisant les blocs optiques bleu pour les tripodes Fluorescéine, A488 et A532, vert pour A532, A546 et TMR, et rouge pour A647.

Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 19 (p.228). A titre d'exemple, la Figure 89 (p.227) présente des images obtenues pour un capillaire revêtu de tripode SP-Fluorescéine avant et après *quenching* par l'anticorps AcM SP31-TMR.

Les couples fournissant un pourcentage de *quenching* supérieur à 70 % sont les couples Fluorescéine/TMR, A488/TMR, A532/A647, A546/A647, ainsi que A532/TMR, A546 et QSY7 (avec une excitation à 490 nm).

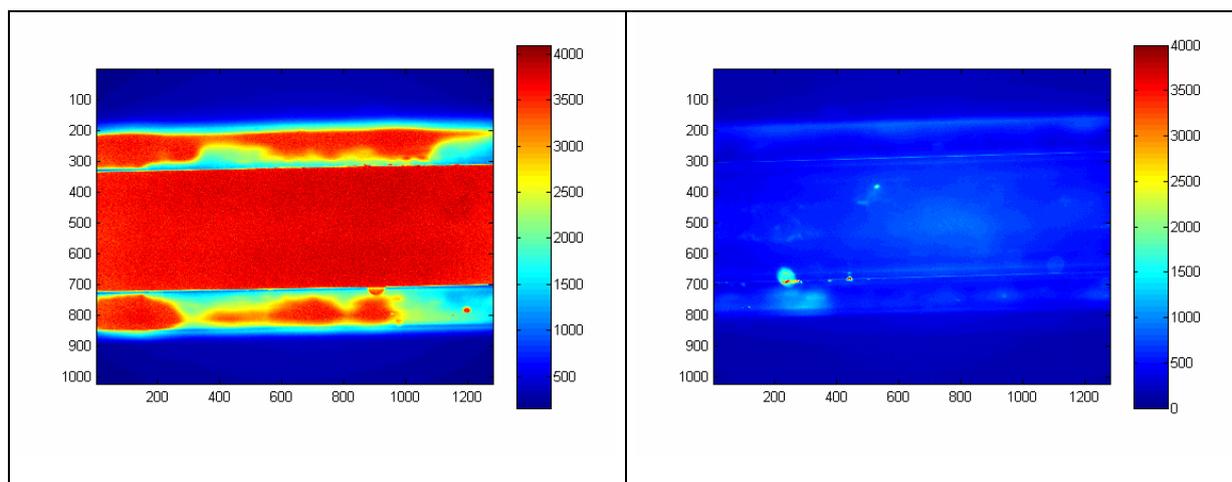


Figure 89 : Images avant et après *quenching* du tripode SP-Fluorescéine par l'anticorps AcSP31-TMR en capillaire

Les échelles de couleurs sont identiques pour les deux images (unités Niveaux de Gris).

Incubations successives en statique de solution de tripode Ala¹⁰SP-biot-Fluorescéine (52,4 μ M, 16h, 4°C), puis après lavage de solution d'anticorps AcM SP31-TMR (1,36 μ M, Rf=3,6 moles TMR/Ac, 30 min, RT) dans un capillaire (section carrée).

La mesure de fluorescence est réalisée après lavage en tampon Phosphate 0,1M pH 8,5.

Tableau 19 : Pourcentage de quenching pour différents couples (D, A) en capillaire

Incubations successives en statique du Tripode (5 µM en PVP, 18 h, 4°C) puis, après lavage, de l'anticorps (2 µM en PVP, 18 h, 4°C) ou de tampon (pour le capillaire témoin) dans des capillaires neutravidinés (section carrée).

Après lavage, la fluorescence est mesurée en tampon Phosphate 0,1 M pH 8,5.

$\% \text{ Quenching} = [\text{Fluo (capillaire anticorps)} - \text{Fluo (capillaire vierge)}] / [\text{Fluo (capillaire témoin)} - \text{Fluo (capillaire vierge)}] * 100$

DONNEUR (bloc optique)	ACCEPTEUR (A)	% QUENCH
Fluorescéine (cube bleu)	TMR	79%
	A532	-25%
	A546	45%
	QSY7	63%
	Dabcyl	50%
Alexa 488 (cube bleu)	TMR	87%
	A532	22%
	A546	56%
	QSY7	64%
	Dabcyl	36%
Alexa 532 (cube vert ; * : cube bleu)	TMR	-150% 89% (*)
	A546	-78% 74% (*)
	A647	89%
	QSY7	54% 80% (*)
	QSY21	28%
Alexa 546 (cube vert)	A647	86%
	QSY21	46%
TAMRA (cube vert)	QSY21	60%
Alexa 647 (cube rouge)	A680	65%
	QSY21	30%

Outre le recouvrement spectral, les différences observées en terme de *quenching* dépendent des filtres employés. Nous observons en effet un *quenching* négatif (ie. une augmentation de fluorescence) pour plusieurs couples, en raison (1) d'une excitation directe de l'accepteur et/ou (2) d'une réémission de l'accepteur « contaminant » le signal du donneur. L'emploi de filtres adaptés spécifiquement à chacun des couples permettrait d'améliorer le *quenching*.

Nous observons un phénomène singulier concernant l'excitation et le *quenching* d'Alexa 532 qui donne lieu à un pourcentage d'extinction de fluorescence plus élevé lorsqu'on mesure aux longueurs d'ondes de la fluorescéine. En utilisant le cube bleu au lieu du vert pour la lecture de l'A532, le *quenching* est en effet très nettement amélioré avec la TMR (-150 % avec le cube vert contre +89 % avec le bleu), l'A546 (-78 % *versus* +74 %) ainsi que le QSY7 (54 % *versus* 80 %). Ce résultat, déjà observé en plaque de microtitration, nous alerte sur l'importance d'une étude rigoureuse des conditions spectrales des mesures.

Notons également que les couples A647/A680 et A647/QSY21 présentent des R_0 théoriques particulièrement élevés (82,5 et 72,8 Å) mais un pourcentage de *quenching* relativement faible (65% et 30%). On peut envisager de la même façon une absorption directe de la lumière d'excitation par l'accepteur (limitant alors le *quenching* du donneur), conjuguée éventuellement (pour l'A680 du moins) à une émission partielle de l'accepteur dans la bande passante.

Le couple A532/A647 a été utilisé préférentiellement en raison de son pourcentage de *quenching* élevé (89 %) et la large gamme dynamique de signal généré dans nos conditions expérimentales. De plus, l'accepteur étant fluorescent, la fluorescence peut également être mesurée avec le bloc optique correspondant (rouge).

III.3.1.1.4. Expériences de déplacement/régénération en conditions statiques

Nous avons réalisé plusieurs incubations successives de la Substance P (10 µM) avec une étape de régénération avec l'anticorps-accepteur (couple A532/A647). La régénération (*quenching* durant 10 min) et le déplacement (80 min) sont réalisés en statique. On utilise le cube vert, avec un temps d'exposition de 50 msec. L'acquisition des images se fait comme suit : 1 image à t=0 (fluorescence initiale) ; 1 image après *quenching* (t=10 min) ; 15 images durant l'étape de déplacement (1 image / 300 sec). Les résultats sont présentés sur la Figure 90 (p.230).

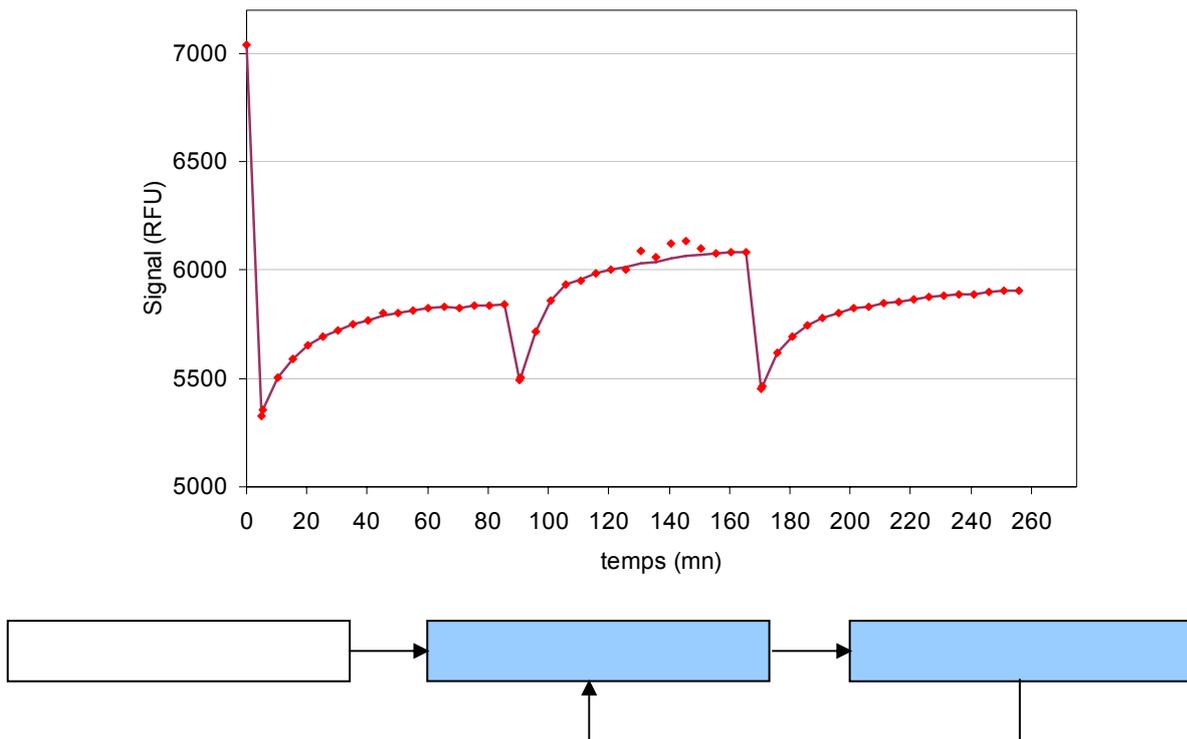


Figure 90 : Déplacements successifs en statique

Cinétiques de déplacement successives avec régénération de la phase solide (couple A532/A647) en statique. On utilise un capillaire fonctionnalisé avec le tripode Ala¹⁰SP-biot-A532 (5 μM) qui subit une étape de *quenching* durant 10 min (solution d'AcM SP31-A647 à 2,62 μM), suivie d'un déplacement par la Substance P (solution à 10 μM) durant 80 min. La régénération de la phase solide se fait par une nouvelle incubation d'anticorps-accepteur (*quenching* 10 min avec la solution d'AcM SP31-A647 à 2,62 μM).
 Cadence : 1 image / 5 min, cube vert, temps d'exposition=50 msec.

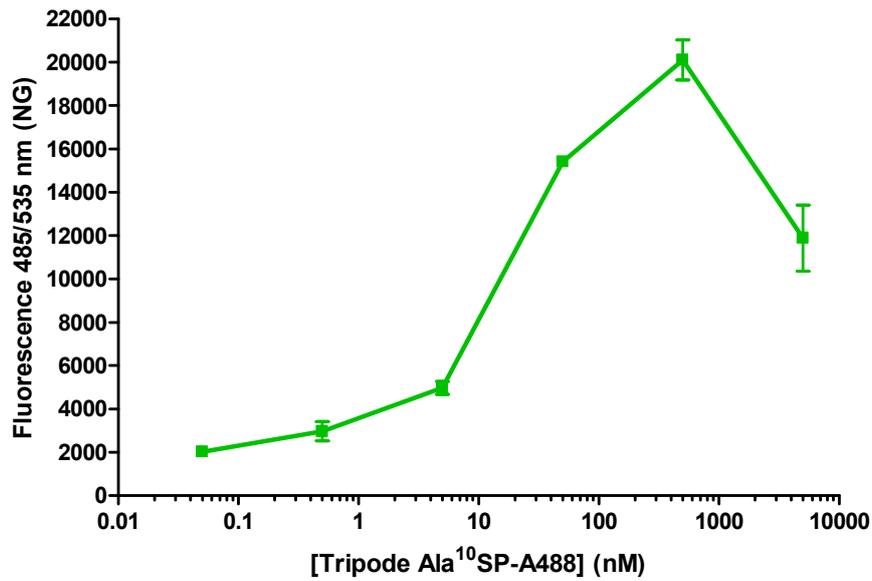


Figure 91 : Gamme de tripode Ala¹⁰ SP-A488 en capillaire

Incubation en statique (16h, 4°C) dans des capillaires neutravidinés (section carrée). Incubation de solution de tripode Ala¹⁰SP-A488 à différentes concentrations, lavage, puis mesure en tampon Phosphate 0,1 M pH 8,5. (moyennes de 2 capillaires)

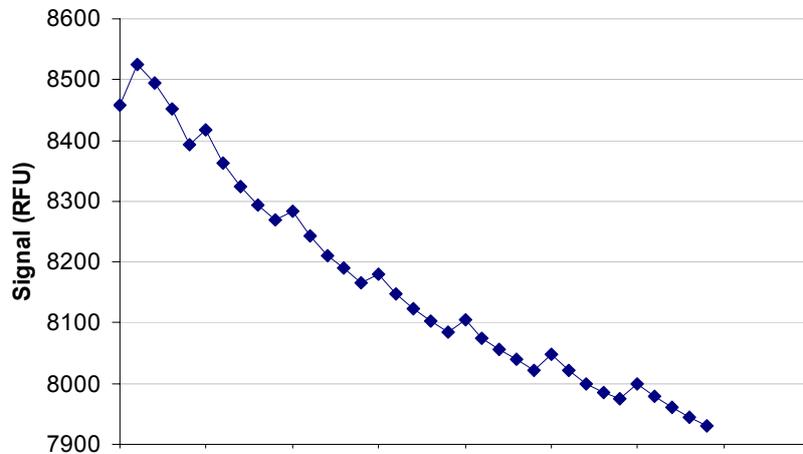


Figure 92 : Mise en évidence du photoblanchiment

Incubation de la Substance P (100 nM) en statique dans un capillaire revêtu de tripode Ala¹⁰SP-biot-A488 (50 nM) et d'anticorps SP31-TMR (500 nM).

Temps d'exposition=2 s ; série de 5 images enchaînées et pause de 5 min, cube bleu.

Cette courbe s'interprète de la façon suivante : la série 1 est à retirer. Après la dernière image de la série 1, on attend 5 min puis on effectue 5 images à la suite. On observe donc un accroissement du signal en début de série 2 puis une décroissance rapide causée par le photoblanchiment. Cette observation est reproduite pour toutes les séries suivantes.

On observe une augmentation du signal avec l'ajout de Substance P qui a pu être détectée dès 15 secondes d'incubation. Si la concentration employée est très élevée (10 μM), il faut préciser que la mesure n'est réalisée que sur un volume de 19 nL contenant 200 fmoles de Substance P environ (approximation). Il faut noter que la diffusion latérale dans le capillaire est susceptible de faire varier la concentration dans ce volume. Pour donner un ordre de grandeur, l'équipe de Ligler a publié un dosage du TNT en capillaire avec une limite de détection de 7 fmol en moins de 3 minutes (Narang et al., 1997).

III.3.1.1.5. Essais de sensibilisation et mise en évidence du photoblanchiment

Nous avons pensé que, comme pour le dosage en plaque de microtitration, l'emploi d'une quantité plus faible de tripode sur la phase solide pourrait permettre d'améliorer la sensibilité du dosage.

Pour cela, nous avons préparé des capillaires avec différentes concentrations de tripode. On observe que la fluorescence augmente linéairement avec la densité en tripode jusqu'à environ 50 nM puis augmente plus faiblement jusqu'à 500 nM, concentration au-delà de laquelle la fluorescence diminue. Cette diminution de fluorescence est probablement due au phénomène d'*autoquenching* préalablement observé en plaque de microtitration (voir Figure 91, p.231 : exemple du tripode SP-A488).

Pour le déplacement, nous avons choisi d'utiliser des capillaires fonctionnalisés avec une solution de tripode Ala¹⁰SP-biot-A488 à 50 nM, concentration qui permet d'obtenir un signal élevé sans être saturante. Après *quenching* par une solution d'Ac SP1-TMR, nous avons mesuré le signal de fluorescence durant l'incubation de la Substance P employée à différentes concentrations (0,1 nM, 1 nM et 100 nM) ainsi qu'en tampon afin d'évaluer la dissociation de l'anticorps. Les mesures ont été réalisées avec le cube bleu, avec un temps d'exposition de 2 secondes et nous avons effectué 5 mesures successives toutes les 5 minutes (sans éclairer le capillaire durant ces 5 minutes).

La mesure du signal en tampon (sans ajout de substance P) montre que le signal diminue légèrement. Les résultats obtenus pour la concentration en Substance P de 100 nM sont présentés sur la Figure 92 (p.231).

Nous observons que la première mesure effectuée après les 5 minutes d'incubation fournit un signal plus élevé que la dernière des 5 mesures précédentes, qui peut probablement être attribuée au déplacement par la Substance P. Nous constatons en revanche que le signal

diminue fortement, à chaque fois, au cours de 5 mesures successives. Le phénomène a été reproduit plusieurs fois.

Cette diminution du signal a été par la suite attribuée au phénomène de photoblanchiment du donneur qui constitue un facteur limitant pour ce format de dosage dans ces conditions. Cependant, il est à noter que l'on détecte 2 fmoles de Substance P en 5 minutes.

En conclusion, il semble que ce format permettrait d'atteindre une très bonne sensibilité, mais le déplacement à faible concentration est masqué par le photoblanchiment. De plus, pour améliorer la sensibilité, la quantité de tripode fluorescent sur la phase solide a été réduite, d'où une augmentation du temps de pose pour obtenir un signal suffisant, ce qui induit un photoblanchiment plus important. Il n'est donc pas forcément adéquat dans ce format de limiter la concentration en tripode sur la phase solide.

III.3.1.2. Expériences avec circulation de fluide

Après avoir vérifié que le principe du SPIT-FRI pouvait fonctionner en format capillaire en conditions d'incubation statique, nous avons réalisé des expériences en circulation de fluide. Le signal est donc ici mesuré durant le passage de la solution à un débit fixé.

III.3.1.2.1. Distribution de la fluorescence le long d'un capillaire

Ayant remarqué que la fluorescence n'était pas homogène le long du capillaire, nous avons mesuré la fluorescence sur différentes zones distantes de 1 cm sur un capillaire de 5 cm revêtu de neutravidine, avant et après l'immobilisation du tripode en circulation (50 $\mu\text{L}/\text{min}$). Nous observons que la fluorescence est d'autant plus élevée que la zone de lecture est proche du point d'entrée de la solution (Figure 93, p.234). Cela peut s'expliquer par le fait qu'il y a une déplétion progressive de la concentration en tripode qui réagit avec la neutravidine dès son entrée dans le capillaire.

Il est à noter que nous avons observé une influence du sens d'entrée de la solution dans le capillaire sur l'intensité de fluorescence en conditions d'incubation statique également. La réaction tripode-neutravidine est donc probablement très rapide.

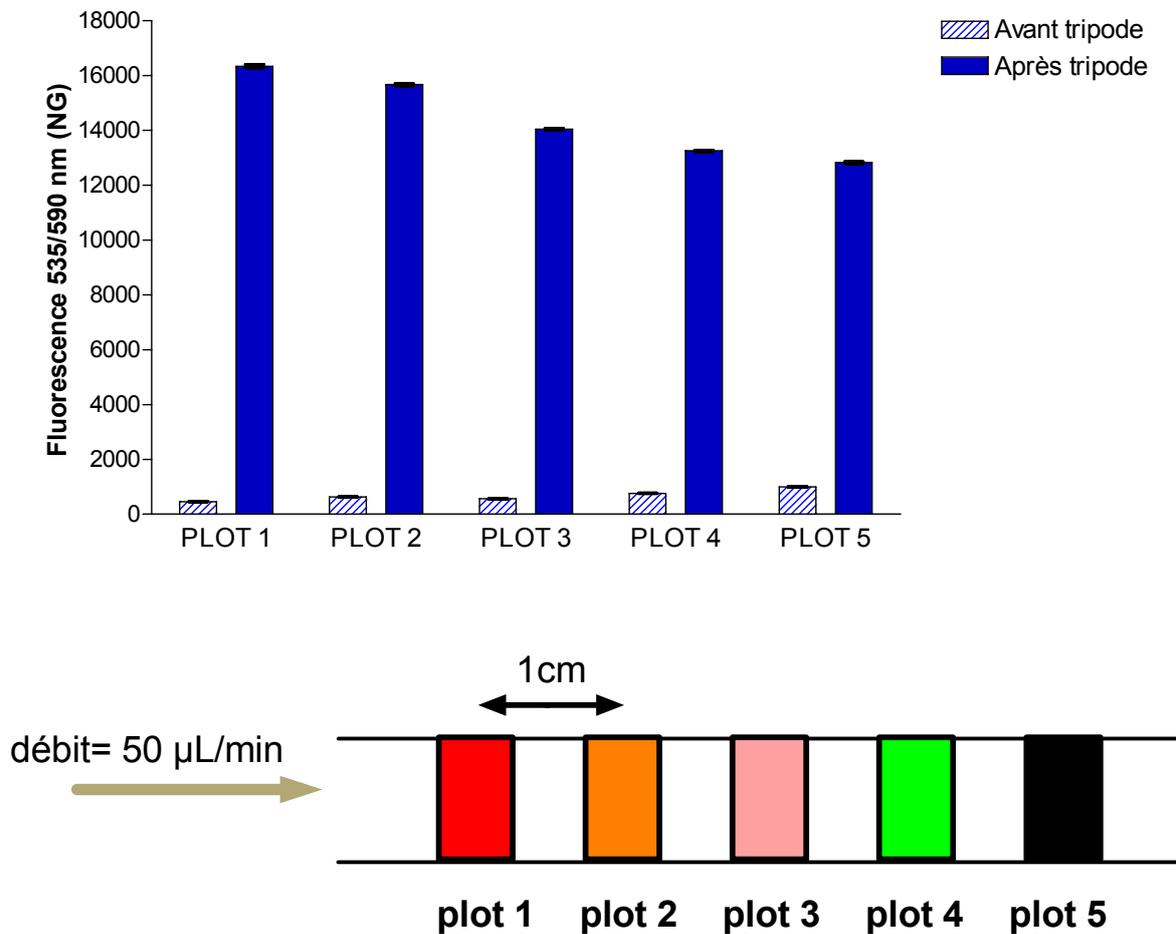


Figure 93 : Distribution de fluorescence le long d'un capillaire revêtu de tripode SP-A532

Comparaison des signaux avant et après immobilisation du tripode

Conditions : capillaire (section carrée) neutravidiné sur toute sa longueur ($L=5\text{cm}$), solution de tripode SP-A532 à 10 nM, débit 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 5 minutes, lavage puis mesure en PVP.

Tout le capillaire est fonctionnalisé, mais la mesure se fait sur 5 zones appelées « plots ». Les 5 plots sont équidistants. Le milieu du plot 1 se situe à 0,5 cm de l'entrée du capillaire, le milieu du plot 5 à 0,5 cm de la sortie.

Paramètres de mesure : Cube vert; $T_e=0.5\text{sec}$; Binning 4*4 ; DO ouvert / DC médian

III.3.1.2.2. Mesure du *quenching*/déplacement en flux et en continu

La Figure 94 présente la cinétique de *quenching* du tripode fluorescent (ici marqué avec l'A532) par l'anticorps-accepteur (ici l'A647) avec un débit de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$.

L'étape 1 correspond à la mesure du signal du capillaire revêtu de tripode en tampon. On observe une diminution de signal correspondant au photoblanchiment. Le passage d'une bulle d'air, permettant de séparer les réactifs, induit ici une diminution du signal. L'étape 2 correspond au passage de la solution d'Ac SP31-A647 utilisée à 100 nM durant 40 min.

En parallèle, nous avons mesuré la fluorescence pour un capillaire à l'intérieur duquel circule une solution de tampon. On observe une diminution progressive du signal de ce témoin, probablement dû au phénomène de photoblanchiment. En soustrayant cette courbe à celle obtenue avec l'anticorps, on obtient une cinétique de décroissance exponentielle correspondant à l'accrochage de l'anticorps sur le tripode. Le plateau est atteint en 15 minutes. La courbe « corrigée » est exprimée en pourcentage de *quenching* par rapport au signal de base. Le pourcentage de *quenching*, de 69 % au plateau, est plus faible que celui mesuré en statique.

De la même façon, nous avons réalisé la cinétique de *quenching* du tripode par l'anticorps-accepteur à 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. On constate un *quenching* d'environ 50%, semblant indiquer que le *quenching* diminue avec une augmentation du débit.

Par ailleurs, de la même façon que pour l'immobilisation du tripode, nous observons que la cinétique de *quenching* est d'autant plus rapide que le plot est proche de l'entrée du capillaire fonctionnalisé.

La cinétique de fixation de l'anticorps sur le tripode a également pu être suivie par la mesure de la fluorescence à la longueur d'onde d'émission du fluorophore fixé sur l'anticorps. On observe alors une augmentation du signal parallèle au *quenching*, et montrant que la diminution de signal est bien due à la fixation de l'anticorps sur le tripode.

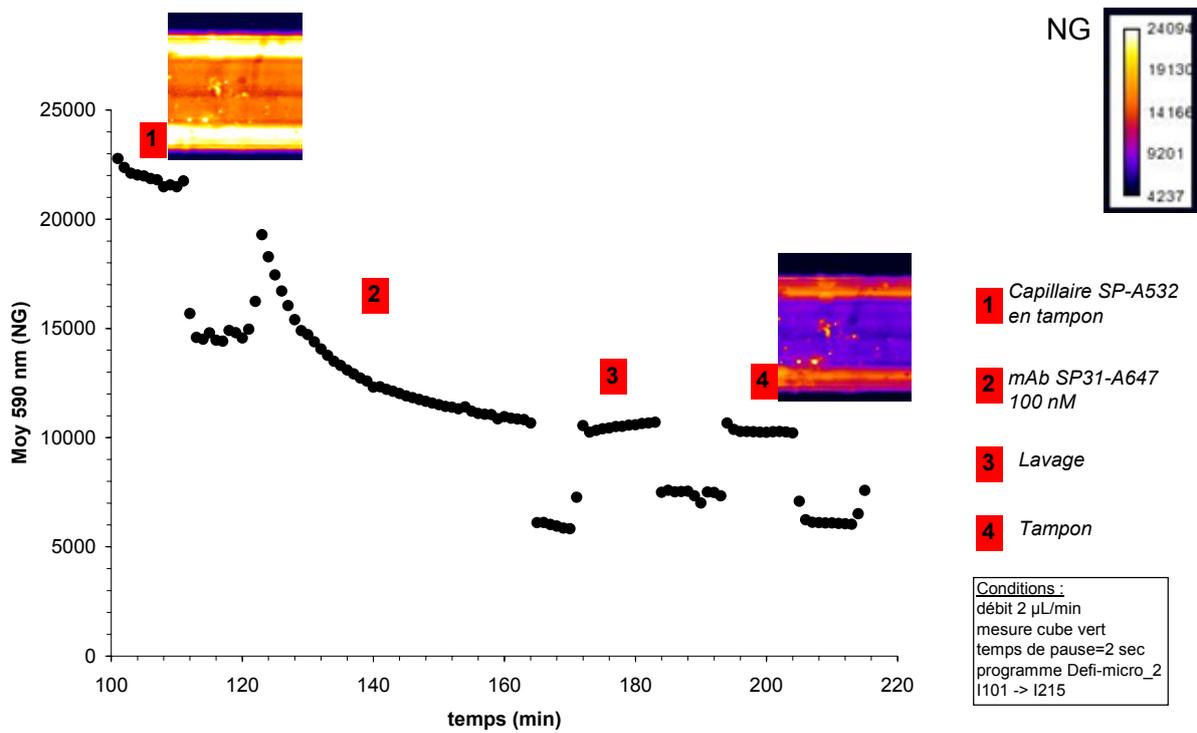
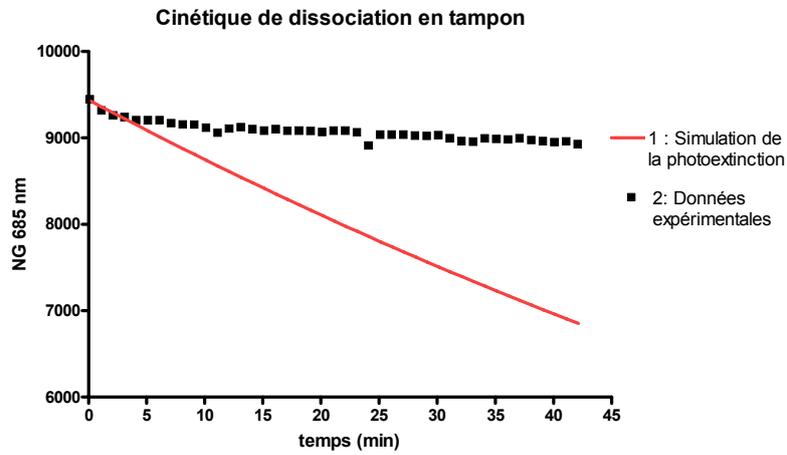


Figure 94 : Cinétique de *quenching* du tripode Ala¹⁰SP-biot-A532 par AcM SP31 A647 en capillaire à 2µL/min

Protocole : Capillaire neutravidine revêtu de tripode SP-A532. Mesure en cinétique durant le passage de tampon (t=100 à 111 min), bulle d'air (t=112 à 122 min), solution d'Ac SP31-A647 à 100 nM (t=123 à 164 min), bulle d'air (t=165 à 169 min), tampon de lavage (t=172 à 183 min), bulle d'air (t=184 à 193 min), et tampon (t=193 à 204 min) à un débit de 2 µL/min durant 40 min à RT.

Paramètres de mesure : Temps d'exposition 2 sec, 1 image/58 sec, cube vert, binning 4, objectif *4. (Région d'intérêt : tout le capillaire)

A



B

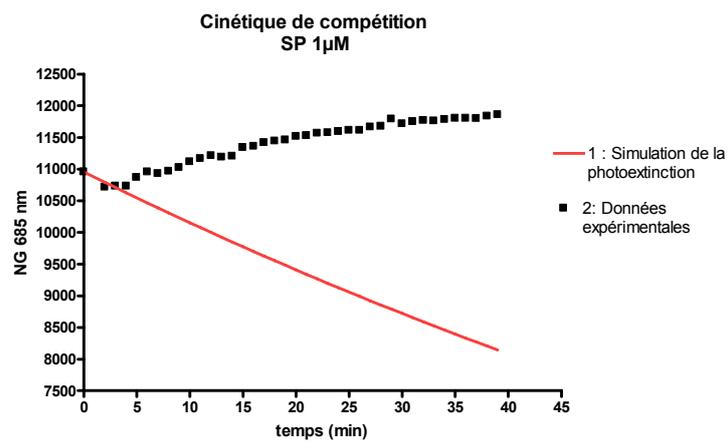


Figure 95 : Cinétique de la dissociation et de déplacement du complexe tripode SP-A532/SP31-A647 par la SP à 1 μ M à 2 μ L / min

A : Mesures en cinétique durant le passage de tampon

B : Mesures durant le passage de SP à 1 μ M.

Capillaire neutravidiné fonctionnalisé avec Tripode SP-A532, anticorps SP31-A647, débit de 2 μ L/min, mesures durant 40 min à RT.

En rouge : simulation du photoblanchiment.

III.3.1.2.3. Mesure de la dissociation et du déplacement avec circulation de fluide

Après l'étape de *quenching*, une solution de tampon est mise à circuler dans le capillaire. Le signal est mesuré en mode cinétique durant 40 minutes. En terme de signal brut, le signal semble proche de la stabilité même s'il diminue légèrement (Figure 95-A). On remarque que le signal diminue de façon notable entre t=0 et t= 3 minutes puis la pente de diminution de signal devient plus faible. Il est possible que le complexe ne se dissocie que très peu ou bien que la dissociation de l'anticorps ne fasse qu'« annuler » la composante de photoblanchiment. En effet, si l'on considère que le photoblanchiment se fait de la même façon que pour le tripode seul (courbe simulée en rouge), on obtient un pourcentage d'inhibition du *quenching* de 6 % à l'issue des 40 min de circulation du tampon dans le capillaire.

De la même façon que pour la dissociation, nous avons mesuré le signal avec une solution de Substance P concentrée à 1 µM en PVP. Les résultats sont présentés sur la Figure 95-B.

La courbe des signaux bruts montre une augmentation progressive du signal qui est cependant faible. Il est possible que cette augmentation du signal due à la diminution du *quenching* soit masquée en partie par le photoblanchiment. Comme pour la dissociation, on observe un délai de 3 minutes environ avant un changement de l'allure de la courbe. Si l'on considère que le photoblanchiment se fait de la même façon que pour le tripode seul (courbe simulée en rouge), on obtient un pourcentage d'inhibition du *quenching* de 44 % après 40 min de circulation de Substance P.

Nous avons remarqué que la fluorescence du tripode diminuait rapidement au cours des mesures, aussi bien en condition statique que dynamique à différents débits. Comme nous l'avons dit, cette diminution est donc probablement due à un photoblanchiment des marqueurs et non à une dissociation du tripode qui dépendrait probablement du débit. La fluorescence d'un capillaire revêtu de tripode SP-A532 en fonction du temps d'exposition cumulé révèle une courbe exponentielle décroissante qui peut être modélisée de façon approximative par une fonction monoexponentielle de type :

$$[15] \quad F(t) = A \times e^{-k t}$$

avec t (s) : temps d'exposition, A (NG) : fluorescence initiale, et k (NG.s⁻¹) : constante de photoblanchiment. On obtient une constante k de 0.008 NG.s⁻¹ ce qui correspond à une demi-vie (soit une diminution de signal de 50 %) de 100 secondes (= 0.69/k). Ce taux de photoblanchiment élevé est lié à la puissance de l'éclairage utilisé.

Lorsque l'anticorps se fixe, on observe une pente beaucoup plus faible de diminution de signal. Si l'on considère que le taux de photoblanchiment est identique, nous obtenons des résultats incohérents (inhibition du *quenching* supérieure à 100 %). Cela met en évidence le fait que la complexation du tripode avec l'anticorps Accepteur « protège » le fluorophore Donneur du photoblanchiment.

Ces résultats illustrent la nécessité de prendre en compte le phénomène de blanchiment afin de pouvoir mettre au point le dosage SPIT-FRI dans ces conditions expérimentales.

III.3.2. Expériences en lame

Pour les lames, nous avons suivi le même protocole de fonctionnalisation que pour les capillaires (chimie CEA2) puis la neutravidine a été immobilisée avec le robot de dépôt sous forme de gouttes avant incubation du tripode entre lame et lamelle. Les premières expériences, effectuées en employant le même tampon d'immobilisation que pour les capillaires sans modification, n'ont pas fourni de résultats concluants, même en employant une concentration élevée de tripode (5 μ M). Nous n'avons pas pu distinguer les plots du bruit de fond présent sur la lame. A ce stade, plusieurs hypothèses pouvaient être proposées : la neutravidine n'était pas fixée, elle avait été dénaturée, ou le tripode ne serait pas fixé. Il nous a donc été nécessaire d'optimiser le protocole du greffage sur lame.

III.3.2.1. Greffage du tripode sur les lames

III.3.2.1.1. Mise au point du protocole

Une étude menée par le Laboratoire de Fonctionnalisation et de Chimie pour les Microsystèmes (LFCM) du CEA Grenoble a permis d'étudier l'influence de différents paramètres sur l'efficacité de l'immobilisation de la neutravidine et du tripode (Paumier G., Rapport de stage, 2005).

Cette étude a permis, entre autres, de conclure qu'il est nécessaire d'ajouter un minimum de 2% de glycérol dans le tampon d'immobilisation pour que la réaction se fasse correctement (Figure 96, p.241). De même, nous avons observé au laboratoire des plots nets avec 2 % de glycérol dans le tampon d'immobilisation, tandis que les plots ne se distinguent pas du bruit de fond lorsque le tampon d'immobilisation ne contient pas de glycérol. Ces résultats vont dans le sens de travaux publiés montrant que la présence de glycérol dans le tampon d'immobilisation permet d'améliorer significativement la densité des plots (Olle, 2005), le glycérol permettant de prévenir de l'évaporation des spots durant l'incubation. Malgré l'immobilisation de la neutravidine dans une enceinte humide, les spots sans glycérol se seraient progressivement asséchés, conduisant à une dénaturation de la neutravidine, ce qui explique notre échec pour les premières expériences. Une incubation en atmosphère humide contrôlée permet d'éviter cet inconvénient.

Nous avons donc finalement choisi d'ajouter 2,5 % de glycérol dans le tampon d'immobilisation.

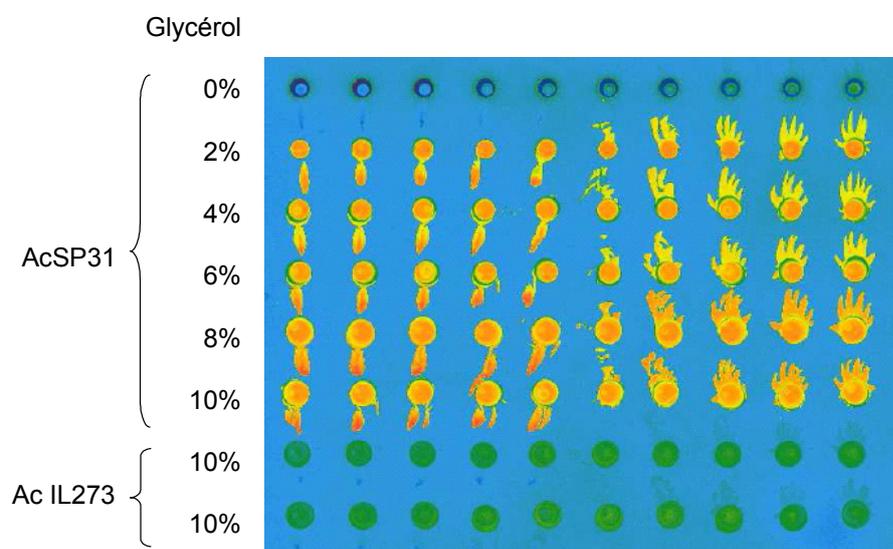


Figure 96 : Influence de la présence de glycérol dans le tampon d'immobilisation sur l'intensité des plots
Expérience réalisée par Guillaume Paumier (CEA Grenoble), lecteur Affymetrix.

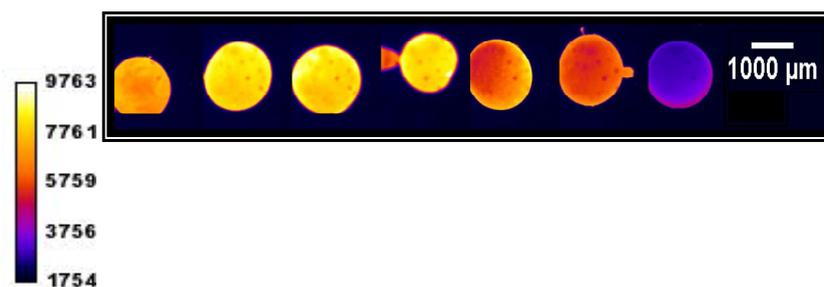


Figure 97 : Exemple de plots fluorescents (gamme de concentration de tripod)
Gamme de concentration de tripod Atz-biot-A532 sur plots neutravidine
(1,5 μM puis gamme de 3 en 3 en PVP)

Par ailleurs, nous avons observé qu'un séchage important après l'étape d'immobilisation de la neutravidine conduit également à une absence de fixation du tripode. Cependant, cette étape de séchage est indispensable pour déposer la solution de tripode entre lame et lamelle, faute de quoi la solution de tripode se dilue et sa répartition devient plus inhomogène. Nous avons donc effectué un séchage doux à l'air comprimé pour éviter l'altération de la surface de neutravidine.

Nous avons également comparé la fluorescence des plots à différents stades de la chimie CEA2 et par adsorption. Le stade habituel de greffage de la protéine avec la chimie CEA2 est le stade aldéhyde, les fonctions NH_2 de la neutravidine réagissant avec les fonctions aldéhyde du silane. Toutefois, l'immobilisation de la protéine au stade époxyde, théoriquement possible, permettrait de raccourcir le protocole de fonctionnalisation. Cependant, elle conduit à des spots très peu fluorescents et des traînées importantes. L'adsorption directe de la neutravidine sur des lames en polystyrène (Maxisorp) conduit à des plots moins fluorescents et à un bruit de fond plus élevé que pour l'immobilisation avec la chimie CEA2 au stade aldéhyde. Nous avons donc conservé le protocole initial, avec l'immobilisation de la neutravidine au stade aldéhyde.

Enfin, différents temps d'incubation du tripode ont été testés. Pour une durée d'incubation de 5 min, on observe déjà le spot fluorescent mais les écart-types sont élevés. Les résultats sont équivalents pour les durées d'une heure ou plus, avec des plots homogènes et bien fluorescents. Le tripode sera donc incubé durant 1 h minimum.

III.3.2.1.2. Morphologie des plots

Une goutte de 10,2 nL crée un plot de surface 7150 pixels² en moyenne soit 30 % de la surface de l'image acquise. La morphologie des plots obtenus est de forme circulaire souffrant toutefois de certaines irrégularités. Un halo autour du spot, une traînée à côté du spot, des plots secondaires de petite taille (« mini-spots ») ou des rayures (plot présentant des stries d'intensité plus faible) ont été observés.

Plusieurs phénomènes peuvent être à l'origine de ces « défauts ». A l'étape de dépôt de la neutravidine se forment parfois des minigoutelettes (la goutte se « divisant » lorsqu'elle entre en contact avec la surface en verre) qui sont probablement à l'origine des « mini-spots ». Les auréoles autour du spot pourraient s'expliquer par un « étalement » de la goutte de neutravidine au cours de l'incubation sur la lame. Au moment du dépôt, la goutte prend la forme d'une calotte sphérique, avec un angle de contact défini, correspondant à une situation d'équilibre. Cependant, il se peut que les conditions soient modifiées dans la chambre humide

(modification du degré d'hygrométrie), induisant un étalement progressif de la goutte. Il est aussi possible que le jet de tampon lors du lavage suivant l'étape d'immobilisation ou le jet d'air lors de l'étape de séchage soit responsable de la formation des traînées et des rayures, ces dernières étant nombreuses lorsque le séchage est appuyé.

Les plots présentent cependant une bonne reproductibilité (variabilité de l'aire des plots environ 10 % avec des CV inférieurs à 5 % en terme d'intensité de signal sur une même lame).

III.3.2.2. Modèle Substance P

III.3.2.2.1. Conditions d'incubation statique

Nous avons employé dans un premier temps des conditions d'incubation statique afin de vérifier la fonctionnalité du dosage sur lame.

- *Gamme de tripode Ala¹⁰SP-Alexa532*

Nous avons utilisé des lames fonctionnalisées avec des plots de neutravidine déposée avec le robot de dépôt. Nous avons utilisé pour les incubations un adaptateur en plastique adhérent à la lame et dans lequel sont percés 8 trous formant des puits où est déposée la solution de tripode. Pour chaque puits, nous avons 3 à 9 plots répliqués. L'incubation est réalisée à température ambiante durant 1h à RT. Une gamme de tripode montre une augmentation du signal jusqu'à 60 nM, concentration permettant de saturer tous les sites de neutravidine (voir la Figure 97, p.241).

- *Mesure du taux de quenching par l'anticorps SP31-Alexa647*

Nous avons utilisé une lame fonctionnalisée avec le tripode Ala¹⁰SP-Alexa532 (25 nM) et l'anticorps a été incubé à différentes concentrations.

La mesure de la fluorescence à 535/590 nm a permis de montrer une diminution du signal proportionnelle à la concentration en anticorps, atteignant jusqu'à 90% de *quenching* pour une concentration de 100 nM. Les résultats sont donc similaires à ceux obtenus en format capillaire.

La mesure de la fluorescence à 620/685nm confirme bien la présence de l'anticorps, la fluorescence augmentant avec la concentration en anticorps.

Toutefois on remarque que les écart-types sont élevés (CV de 10 à 20%) en raison probablement d'une forte variabilité de la fluorescence initiale entre les plots.

- *Mesure du déplacement par l'analyte*

Nous avons utilisé pour cela une lame fonctionnalisée avec le tripode Ala¹⁰SP-Alexa532 (25 nM) et l'anticorps à 100 nM, et l'analyte a été incubé à différentes concentrations.

La mesure de la fluorescence à 535/590 nm a permis de montrer une augmentation du signal pour les concentrations en SP, statistiquement significative pour les concentrations de 100 nM, 1 µM et 10 µM. Cependant, il est difficile d'établir une relation entre le signal obtenu et la concentration en SP.

III.3.2.2.2. Conditions d'incubation dynamique

Les conditions de débit (20 µL/min) et la géométrie de la microcellule (forme rectangulaire, 3 mm de largeur) ont été choisies en fonction des contraintes expérimentales. Nous avons en effet rencontré un problème de formation d'une bulle d'air au centre de la microcellule suite à la rupture du front de liquide. L'utilisation d'un débit supérieur ou égal à 20 µL/min et d'une microcellule étroite a permis de limiter ce phénomène.

- *Mesure du quenching et du déplacement par une solution de SP fortement concentrée (1 µM).*

Nous avons utilisé une lame présentant 4 plots de tripode Ala¹⁰SP-A532 (20 nM) alignés selon l'axe des X (axe entrée-sortie du liquide). 120 µL de solution d'anticorps à 66 nM, 300 µL de tampon PVP, 300 µL de solution de SP en PVP à 1 µM puis à nouveau 300 µL de PVP, ont été passés successivement dans la cuve à un débit de 20 µL/min dans la cuve. Nous avons mesuré la fluorescence successivement sur les plots 1 à 4 toutes les 30 secondes avec un temps d'exposition de 1 seconde. L'expérience a été réalisée successivement en employant les cubes vert et rouge.

Les résultats présentés (Figure 98) correspondent à la moyenne de la fluorescence mesurée pour les 4 plots. Ils mettent en évidence une forte diminution de la fluorescence de l'A532 lors du passage du tampon PVP sur le plot fonctionnalisé avec le tripode, correspondant probablement, comme dans le cas des capillaires, au photoblanchiment du tripode.

Durant le passage de l'anticorps, la fluorescence diminue de façon très nette par rapport à la diminution attendue du photoblanchiment. On observe au contraire une augmentation de la fluorescence dans le rouge d'une dizaine d'unités.

L'ajout de PVP induit une légère augmentation de la fluorescence, probablement en raison du lavage de l'anticorps et d'une dissociation, puis le signal tend à diminuer, la pente étant

stabilisée à partir de la mesure 30 environ. On note à la mesure 24 un signal très élevé, correspondant au passage de la bulle d'air.

Les mesures 56 et 57 marquent le passage de la bulle d'air séparant la solution de PVP et la solution de SP. L'ajout de l'analyte entraîne une augmentation de la fluorescence puis le signal se stabilise. La mesure 90 marque la fin de la solution de SP. On note que la fluorescence a augmenté entre la dernière mesure effectuée en présence de la solution de SP (mesure 89) et la première mesure effectuée en tampon PVP (mesure 91). Cependant, il n'y a pas d'augmentation de la fluorescence similaire à celle observé avec la SP.

S'il semble bien que l'ajout de SP entraîne une modification du signal, l'analyse des signaux est complexe. Nous avons estimé le pourcentage de *quenching* après passage de l'anticorps à 10 % et l'inhibition du *quenching* après passage de la SP à 38 %.

- *Passage successif de 3 concentrations en SP*

Dans les mêmes conditions que précédemment, nous avons fait passer successivement 100 μ L de solution de SP à 100 nM, 1 μ M et 10 μ M, observant une pente plus élevée pour 1 μ M que pour 100 nM. En revanche, la pente est médiane pour la concentration de 10 μ M ; probablement en raison du fait que l'anticorps a déjà été déplacé en proportion importante par le passage des solutions précédentes.

- *Passage répété d'une même concentration (1 μ M)*

Des injections répétées d'une même concentration ont été réalisées soit successivement, soit après régénération par l'anticorps. Sans régénération, on observe que la pente diminue avec le nombre d'injections, tandis qu'elle est identique lorsqu'il y a eu ajout d'anticorps entre les deux injections de Substance P, confirmant notre propos précédent concernant l'influence de la quantité d'anticorps sur le tripode sur l'inhibition du *quenching*. Si les courbes sont assez similaires lorsqu'il y a eu régénération par l'anticorps, on remarque que 1) la fluorescence diminue au cours du temps, 2) le *quenching* est plus élevé pour les 2^{ème} et 3^{ème} mesures que pour la première.

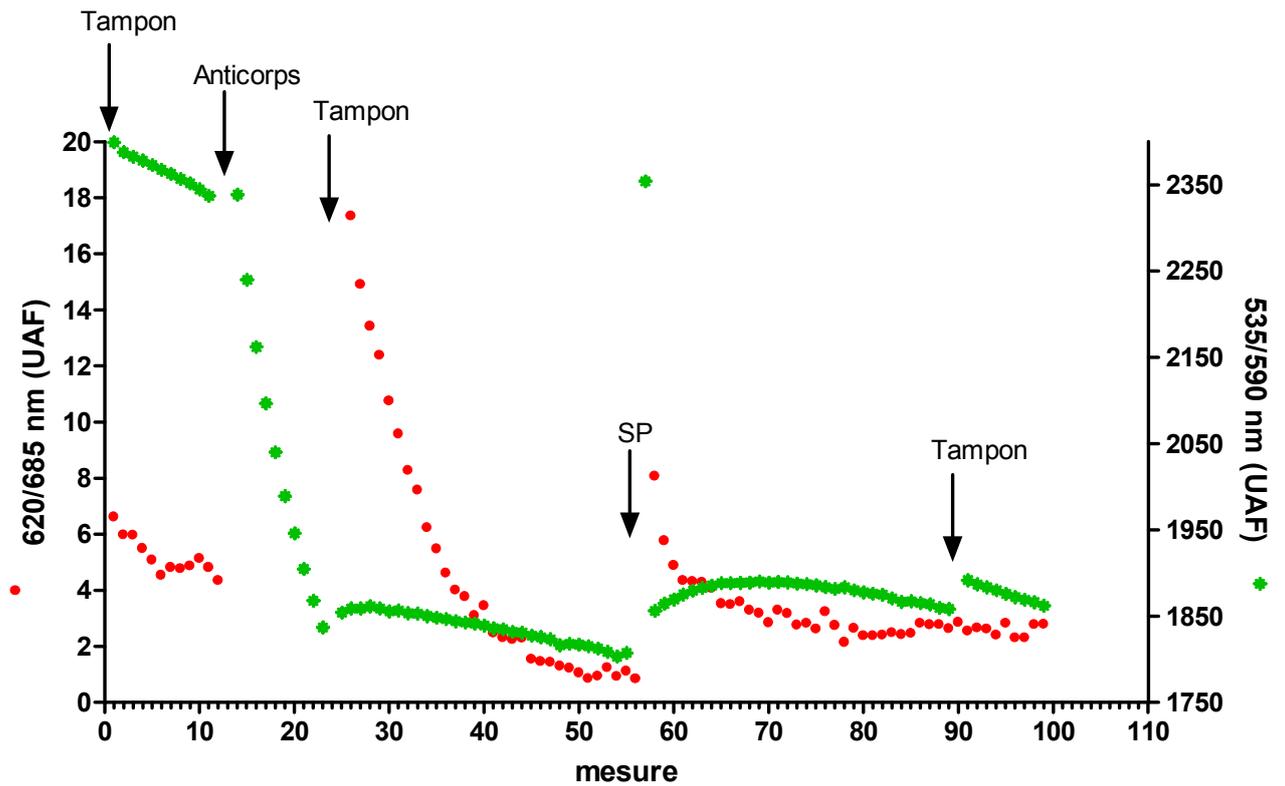


Figure 98 : Passage d'une solution de SP à 1 µM sur lame (20 µL/min)

En vert : signal mesuré avec le cube vert

En rouge : signal mesuré avec le cube rouge

Conditions de mesures : Mesures réalisées toutes les 30 secondes ; temps d'exposition : 1sec, DC ouvert, DO ajusté.

Les valeurs qui ne sont pas représentées correspondent à des valeurs de fluorescence dépassant la valeur supérieure de l'échelle. Elles correspondent au passage de la bulle de séparation ou bien, aux valeurs à 685 nm durant le passage de l'anticorps (se situant autour de 340 NG).

III.3.2.3. Modèle Atrazine

Si le modèle atrazine n'a permis sur plaque qu'une détection à de très fortes concentrations de l'atrazine (seulement à partir de 10 µg/mL), nous avons tout de même essayé de l'adapter au dosage en lame pour estimer la faisabilité d'une détection à la longueur d'onde de l'Alexa647 (porté par l'anticorps).

III.3.2.3.1. Gammes de tripode et d'anticorps en conditions statiques

Comme pour la SP, une gamme de tripode T-Atz-A532 incubée en conditions statiques montre une augmentation du signal avec la concentration en tripode jusqu'à 60 nM environ. Avec une mesure à 535/590 nm et un temps d'exposition de 1 sec (DO fermé, DC ouvert), on obtient un signal au plateau de 5200 NG.

L'incubation d'anticorps AcM Atz3-A647 sur des plots fonctionnalisés avec le tripode (employé à 20 nM) n'a conduit à aucune différence significative de fluorescence à 535/590 nm par rapport aux plots sans anticorps, quelle que soit la concentration en anticorps employée (jusqu'à 67 nM).

La mesure de la fluorescence à 620/685 nm a permis de montrer cependant la présence d'anticorps sur les plots. Le signal est significativement supérieur à la valeur du blanc ($>\mu+3\sigma$) dès 2,1 nM, et augmente avec la concentration en Ac.

Nous avons renouvelé l'expérience sur un plus grand nombre de plots (72 plots), en mesurant cette fois non pas la différence de fluorescence entre les plots sans Ac et avec Ac, mais pour chaque plot la différence de fluorescence avant et après l'incubation de l'Ac, en évitant toute exposition de la lame à la lumière entre ces deux mesures afin d'éviter le photoblanchiment. Nous avons mesuré un *quenching* de 18 +/- 11 %. Ces résultats suggèrent que le transfert d'énergie a bien lieu mais que sa mesure est rendue difficile lorsque l'on compare la fluorescence de puits sans Ac et avec Ac en raison de la forte variabilité entre les plots ; de plus le *quenching* est limité de par le faible rendement d'incorporation de l'atrazine sur le tripode (cf partie 2).

III.3.2.3.2. Conditions d'incubation dynamique

Les expériences ont été réalisées à 20 µL/min en faisant passer successivement dans la cuve différentes concentrations en atrazine à raison de 100 µL par concentration. Le plan de lame utilisée est une succession de 4 plots alignés selon d'axe des X (dans le sens entrée-sortie de

la cuve), et l'expérience a été réalisée 2 fois de suite afin d'effectuer les mesures à 535 nm et 685 nm.

La mesure des signaux en continu et en incubation dynamique a confirmé le faible pourcentage de *quenching*. Si la mesure à 590 nm n'est pas suffisamment robuste et sensible, nous avons montré qu'il était possible de mesurer la présence d'atrazine par la mesure de la fluorescence de l'anticorps à 685 nm sur le plot.

La présence de l'anticorps sur le tripode entraîne une fluorescence à 685 nm suffisante pour être mesurée. Après lavage, la fluorescence diminue progressivement, probablement en raison du photoblanchiment et de la dissociation du complexe anticorps-tripode. Cette diminution de fluorescence est plus importante lors du passage de l'atrazine qu'en tampon. De plus, plus la concentration en atrazine est élevée, plus le signal diminue rapidement. Dans ces conditions expérimentales, la limite de détection est inférieure ou égale à 1 µg/mL à 685 nm (confirmation des résultats par une analyse statistique).

La régénération du système par ajout d'anticorps a permis de montrer la répétabilité de l'expérience sur 4 cycles régénération/détection. Nous avons pour cela utilisé une concentration en Atrazine permettant de déplacer la totalité de l'anticorps présent sur le plot. Chaque cycle comprend : 80 µL de tampon, 80 µL d'anticorps à 66 nM, 80 µL de PVP et 80 µL d'atrazine à 100 µg/mL. Le passage de l'anticorps permet de restaurer le signal au niveau de celui du cycle précédent. D'autre part, le passage de l'atrazine sur les plots provoque pour tous les cycles une baisse du signal permettant quasiment le retour au signal de base (quasiment 100 % d'extinction).

III.3.3. Essai de détection simultanée de 2 molécules

Suite à des expériences ayant permis de détecter la SP et la BLg séparément, nous avons essayé de réaliser une détection simultanée de ces deux molécules dans une même chambre réactionnelle. L'expérience présentée ici a été effectuée dans un capillaire possédant 2 zones ou « plots » revêtus respectivement de tripodes SP-A532 et de BLg-A532 (des résultats similaires ont été obtenus en format lame).

Nous avons fait passer successivement une solution d'anticorps SP31-A47 et d'anticorps AcM 117-A647 (5 minutes chacune), une solution de BLg (10 µg/mL) et une solution de SP (10 µg/mL) (15 minutes chacune), chaque solution étant séparée par : une bulle d'air, du tampon (durant 5 minutes) et une seconde bulle d'air.

Nous avons estimé le pourcentage de *quenching* après passage de l'anticorps SP31 à 16 % sur le plot SP, tandis qu'aucune réaction n'est observée sur le plot BLg. Le passage de l'anticorps anti-BLg ne provoque aucun changement sur le plot SP, mais un léger *quenching* (estimé à 4 %) sur le plot BLg. La fixation de l'anticorps sur le tripode est donc bien spécifique.

Lors du passage de la BLg, nous avons observé une modification du signal (changement brusque de la pente de photoblanchiment qui devient plus faible) traduisant une désorption d'une fraction de l'anticorps 117. Nous avons estimé l'inhibition du *quenching* après passage de la BLg à 85 %.

Sur le plot SP, le même phénomène a été observé lors du passage de la BLg, avec une inhibition du *quenching* de 50 % alors que cet anticorps ne reconnaît pas la SP (cela a été vérifié par des expériences en plaque de microtitration). La même expérience réalisée en statique n'induit pas cette réaction parasite. Nous avons donc pensé que la désorption des anticorps était due au passage en flux d'une concentration trop élevée de protéine. Nous avons fait passer, sur le même couple tripode-anticorps, une solution à 1mg/mL de BSA (66 kDa) dans les mêmes conditions (20 μ L/min). Nous avons constaté une augmentation du signal reflétant la dissociation du complexe anticorps-tripode. En revanche, le passage d'une molécule de petite taille (Atrazine à 1 mg/mL) n'a pas provoqué cette dissociation.

La diminution de la concentration en BLg est rendue difficile par le faible taux de *quenching*. Nous avons alors recommencé l'expérience avec le tripode BLg-Fluorescéine et l'anticorps Ac 117-TMR permettant l'obtention d'un *quenching* plus élevé et montrant la faisabilité de la détection d'une concentration en BLg de 10 μ g/mL.

III.3.4. Discussion-conclusion

Les différents essais de dosage en format capillaire et lame ont permis de vérifier la fonctionnalité du principe du SPIT-FRI sur ces supports, en statique et en circulation de fluide. Nous mesurons une diminution de la fluorescence avec l'ajout d'anticorps quencher, et une réaugmentation du signal lors de l'ajout de l'analyte qui déplace l'anticorps, pour une concentration élevée en analyte. Toutefois, nous avons été confronté à un problème de reproductibilité des signaux en raison de la forte variabilité de la fluorescence initiale des plots. De plus, le photoblanchiment progressif du tripode ajoute à la complexité des signaux. Nos résultats suggèrent de surcroît que le photoblanchiment est différent pour le tripode lorsque celui-ci est quenché ou non par l'anticorps : le fluorophore serait « protégé » du

photoblanchiment lorsqu'il participe à un transfert d'énergie avec un autre fluorophore comme cela a pu être montré par Song *et al.* (1995).

Concernant le photoblanchiment, nous avons essayé de réduire le nombre de mesures et l'intensité d'excitation, mais cette stratégie n'a pas permis d'améliorer le système, fonctionnant alors comme une « boîte noire ». Disposer des cinétiques permet une interprétation plus fine des résultats car les cinétiques nous renseignent sur le type de réaction qui a eu lieu. Nous avons pu montrer qu'une augmentation progressive pouvait correspondre à une réaction de déplacement du complexe anticorps-tripode, tandis que le passage d'une solution absorbante qui ne déplace pas le complexe entraîne une augmentation brusque du signal (palier). De nombreux facteurs externes (ex : formation d'une microbulle d'air - notamment en format lame-, passage d'une poussière fluorescente, modification de la lumière externe) sont susceptibles de modifier fortement le signal, rendant extrêmement difficile la détermination de la concentration d'un analyte sans disposer de la cinétique. Ces inconvénients auraient peut-être pu être évités avec l'emploi d'une photodiode pour corriger des variations de puissance de la lumière d'excitation de la lampe source, l'utilisation d'un système fluide performant avec des vannes évitant le passage de bulles d'air pour séparer les solutions et l'emploi d'une cuve en PDMS pour la microcellule pour lame.

Nous avons donc essayé de trouver des méthodes de « correction » du signal du photoblanchiment. Cependant, ce phénomène est extrêmement complexe car comme nous l'avons montré, le photoblanchiment est réduit lorsque l'anticorps est fixé sur le tripode. Nous avons tenté d'ajouter aux signaux la valeur estimée perdue par photoblanchiment mais nous sommes arrivés à des résultats incohérents, avec une inhibition du *quenching* supérieure à 100 % dans certains cas. Ce travail qui nécessite une étude à part entière dépasse donc nos compétences et devra être réalisé par une équipe spécialiste de la modélisation des signaux et des réactions biologiques.

D'après les premiers résultats, le prototype conçu par le LETI, qui utilise une diode comme source d'excitation, permet d'éviter ce phénomène de photoblanchiment. Par ailleurs, il serait possible d'employer des fluorophores plus résistants au photoblanchiment comme les quantum dots. Enfin, il est envisageable de remplacer le support de l'appareil lorsque la fluorescence descend en dessous d'un certain seuil.

III.4. Etude d'une nouvelle méthode de dosage immunofluorescent (SPI-FIA)

Au cours des études de mise au point du SPIT-FRI en plaque de microtitration (voir III.1 et III.2), nous avons mis en évidence une diminution de fluorescence corrélée à la fixation des fluorophores sur la phase solide. Ce phénomène a déjà été décrit dans la littérature dans le cadre du développement de dosages fluoroimmunologiques en format hétérogène basés sur une mesure de la fluorescence des fluorophores immobilisés dans le puits. Plusieurs auteurs ont en effet rapporté avoir mesuré une plus faible intensité de fluorescence sur phase solide qu'en phase liquide, limitant de façon importante la gamme dynamique (Hemmila, 1985 ; Kakabakos et al., 1999 ; Singh et al., 1996). Pour pallier ce problème, certains auteurs ont prélevé la fraction liquide des puits puis réalisé la lecture dans une autre plaque, tandis que d'autres ont réalisé la mesure en phase liquide après dissolution des molécules fixées. A notre connaissance, aucun auteur n'a décrit un dosage basé sur la fluorescence différentielle entre les fluorophores en phase liquide et sur la phase solide, en lisant directement la fluorescence totale du puits, comprenant la fluorescence de la fraction liquide et de la phase solide. Il nous a semblé intéressant d'évaluer l'intérêt de cette méthode en raison des avantages qu'elle pourrait présenter pour le développement de dosages rapides en microplaque, en une seule étape, avec un accès direct aux cinétiques réactionnelles.

Dans un premier temps, nous avons essayé de caractériser le phénomène de diminution de fluorescence observé. Nous avons comparé différents fluorophores, différents supports et différents appareils de mesure. Nous avons établi la relation de proportionnalité entre la diminution de fluorescence mesurée et la concentration en traceur, condition indispensable à la mise au point d'un dosage.

Pour mieux cerner les domaines d'application potentiels de la méthode, nous avons souhaité évaluer la faisabilité d'un tel dosage sur des molécules de diverses natures, en employant différents formats de dosage (compétitif et immunométrique). Nous présenterons les résultats obtenus avec la BLg, l'aflatoxine et la ricine.

Enfin, nous avons souhaité évaluer la possibilité d'un dosage simultané de deux analytes. Nous présenterons les essais de mise au point d'un dosage simultané des formes native et dénaturée de la BLg qui a été utilisé pour le suivi de la dénaturation thermique du lait.

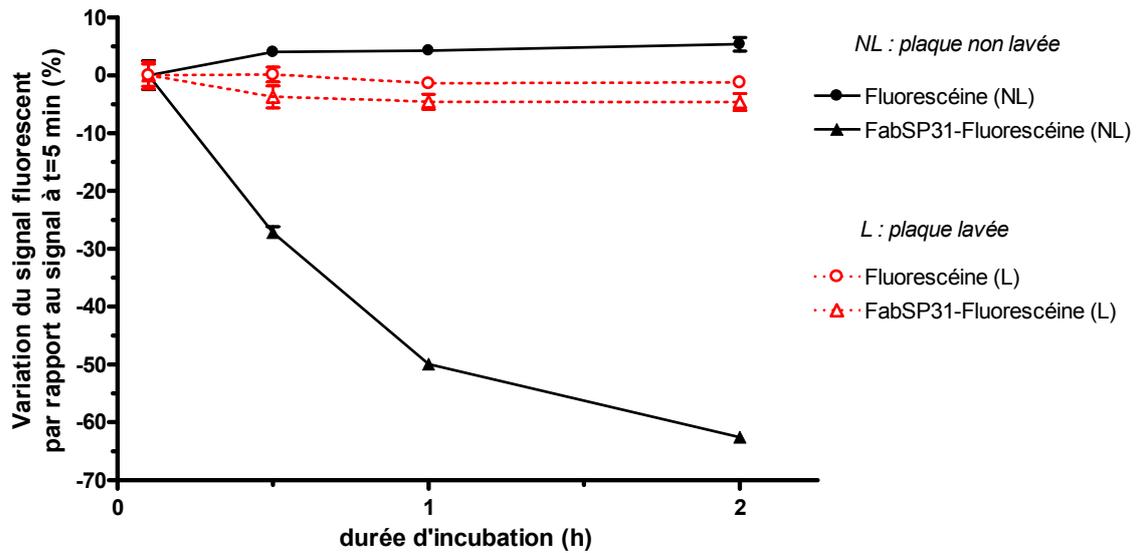


Figure 99 : Suivi cinétique de la fluorescence de FabSP31-Fluorescéine et de la Fluorescéine libre dans des puits lavés ou non

A $t=0$: dépôt de 150 μL de solution d'anticorps FabSP31-Fluorescéine (8,3 nM) ou de Fluorescéine libre (à 29 nM) en tampon Phosphate 0,1 M pH 7,4 dans les puits d'une plaque en polystyrène noir non traité pour l'adsorption (Nunc), lavée (L) ou non lavée (NL) avant dépôt.

Mesure de la fluorescence à $t = 5 \text{ min}$, 30 min, 1 h et 2 h avec le lecteur Spectramax Gemini XS ($\lambda_{\text{EXC}}=492 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}}=536 \text{ nm}$, *cut off* à 515 nm).

III.4.1. Mise en évidence du phénomène de diminution de fluorescence sur phase solide

III.4.1.1. Expériences d'adsorption de protéines et peptides fluorescents sur phase solide

Nous avons observé une diminution du signal de fluorescence au cours de l'adsorption de protéines et peptides fluorescents sur des microplaques à faible ou forte capacité d'adsorption. La Figure 99 (p.252) présente le suivi de la fluorescence d'une solution d'anticorps FabSP31-Fluorescéine en tampon Phosphate, déposée dans des puits en polystyrène noir non traité (à faible capacité d'adsorption) préalablement lavés ou non, par référence à une solution de Fluorescéine libre dans les mêmes conditions. Le lavage est réalisé suivant le protocole « classique » décrit au II.3.1.3 (p.92). Pour les puits non lavés, nous constatons que le signal de l'anticorps-Fluorescéine diminue au cours du temps (diminution de 75 % du signal après 16 h d'incubation), tandis que le signal de la Fluorescéine est stable. Le lavage des puits avant le dépôt de la solution entraîne la stabilisation du signal de l'anticorps.

L'ajout d'un agent de saturation (PVP, albumine, gélatine) dans le tampon de réaction permet également d'éviter ce phénomène de diminution du signal et de stabiliser le signal de l'anticorps, mettant en évidence un lien direct entre l'adsorption de l'anticorps sur la phase solide et la diminution de fluorescence. Ce résultat est reproduit par l'ajout de Tween dans le tampon de réaction, démontrant l'influence directe de ce détergent sur l'adsorption passive des protéines sur la phase solide. Par ailleurs, la même évolution du signal est observée pour des peptides fluorescents avec une diminution progressive de l'intensité de fluorescence en l'absence d'agent de saturation dans le tampon de réaction (-80 % en 16 h pour ϵ_3 SP-Fluorescéine).

Ces résultats mettent en évidence que les protéines et peptides, à la différence de la Fluorescéine libre, petite molécule hydrophobe, ont tendance à s'adsorber sur les parois du polystyrène, même non traité pour l'adsorption, et que cette adsorption s'accompagne d'une forte diminution de fluorescence.

La Figure 100 A (p.254) présente le suivi du signal fluorescent au cours de l'adsorption de la BLg marquée avec l'Alexa 488 sur une plaque à haute capacité d'adsorption (Maxisorp), la BLg-A488 ayant été diluée en tampon Phosphate, le signal étant mesuré en parallèle dans les mêmes conditions en tampon PVP.

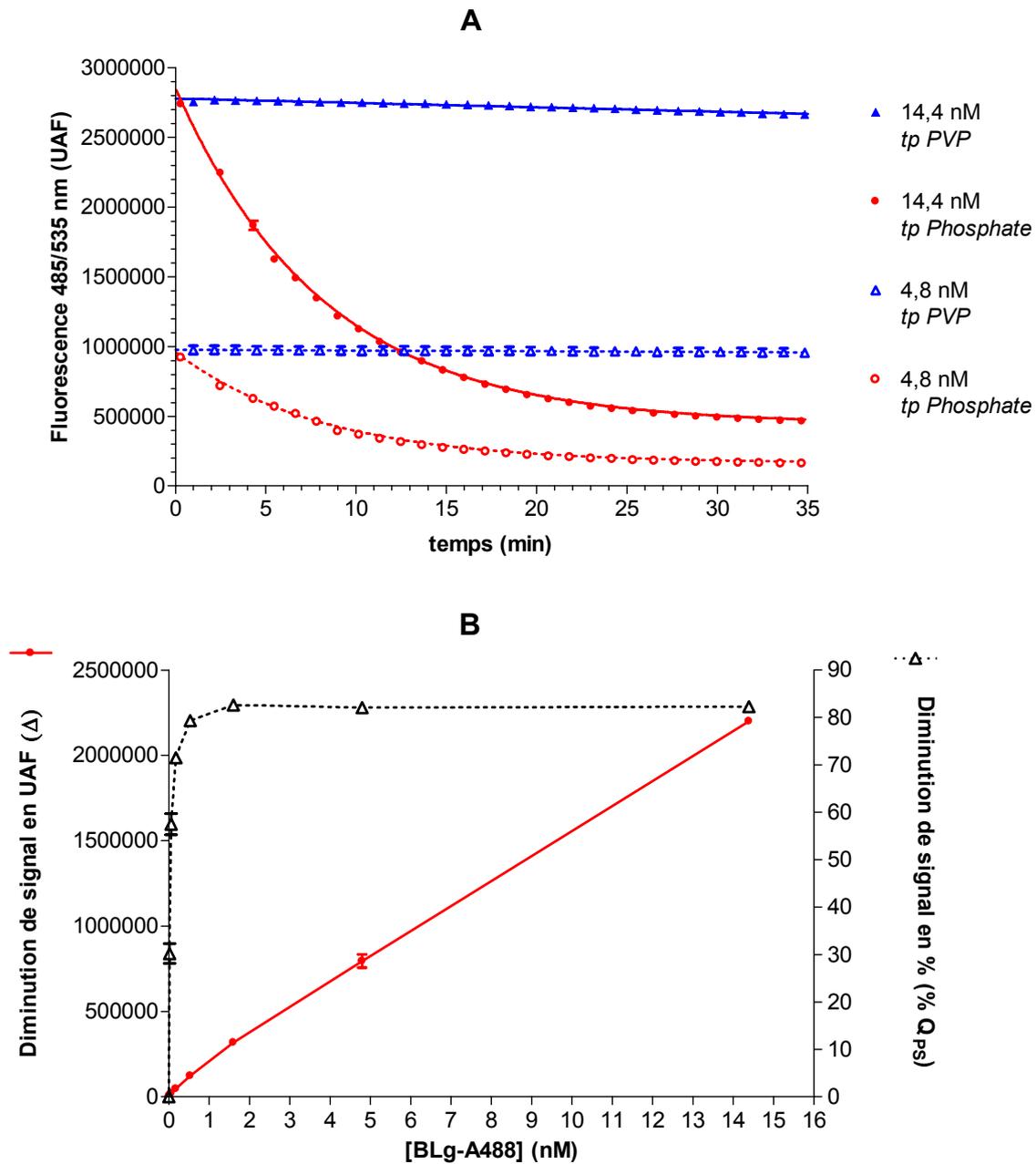


Figure 100 : Adsorption de la BLg-A488 dans des puits *Maxisorp*

A: Suivi de la fluorescence de la BLg-A488 (14,4 nM et 4,8 nM, 100 μ L/puits) en tampon Phosphate 0,1 M pH 7,4 ou en tampon PVP dans une plaque noire Nunc *Maxisorp* avec le lecteur Envision ($\lambda_{\text{EXC}}=485\text{nm}$, $\lambda_{\text{EM}}=535\text{ nm}$), 1 mesure / 72 sec durant 35 min (blanc soustrait). Régression exponentielle décroissante $F = F_{\text{min}} + (F_{\text{max}} - F_{\text{min}}) * \exp[-So / (So - F_{\text{min}}) * t]$

B: Diminution du signal en intensité (Δ) et en pourcentage (%Q_{ps} : pourcentage de *quenching* apparent sur phase solide³²) en fonction de la concentration en BLg-A488 avec $\Delta = F(t_0) - F(t_{35\text{ min}})$. et $\%Q_{\text{ps}} = [F(t_0) - F(t_{35\text{ min}})] / F(t_0) * 100$

³² Voir la discussion concernant la notion de *quenching* apparent sur phase solide dans la partie Discussion au III.4.1.5 (p.257)

Nous observons une diminution de la fluorescence pour la BLg-A488 en tampon Phosphate, tandis que la fluorescence demeure stable en tampon de saturation. La cinétique est de type exponentielle. Un plateau est atteint après 30 min d'incubation, correspondant à 83% de diminution du signal (Figure 100 B). La cinétique sur polystyrène Maxisorp est plus rapide que sur le polystyrène non traité où le plateau n'était pas tout à fait atteint à 2 h d'incubation (voir sur la Figure 99). Comme précédemment décrit pour les plaques non traitées, une simple dilution dans le tampon PVP empêche l'adsorption des protéines sur la phase solide.

Ces données suggèrent qu'il serait possible de réduire la durée du protocole classique de *coating* utilisé au laboratoire, qui comprend une étape d'adsorption (16 h à RT) et une étape de saturation (2 h à RT ou 16 h à 4°C, cf Matériel et Méthodes, p.92), d'autant plus que les concentrations protéiques utilisées pour l'étape de coating sont élevées (classiquement, au moins 5 µg/mL pour les anticorps).

La diminution de signal fluorescent entre le signal avant et après adsorption (Δ en UAF) augmente linéairement avec la concentration en BLg-A488. En terme de pourcentage, cela correspond à une diminution de 83 % du signal pour des concentrations supérieures à 1 nM. Notons que ce pourcentage diminue pour des concentrations inférieures à 1 nM, tendant vers zéro de façon asymptotique (Figure 100 B).

Nous observons de façon similaire une diminution du signal de fluorescence corrélée à l'adsorption pour la protéine BLg marquée avec les fluorophores Fluorescéine, TMR, Alexa 532, Cy5.0 et Alexa 647, avec un pourcentage de diminution de signal de 60 %, 52 %, 68 %, 62 % et 73 % respectivement.

III.4.1.2. Expériences de capture de molécules fluorescentes biotinylées par la neutravidine immobilisée

Nous avons mesuré la fluorescence des solutions de BLg fluorescentes et biotinylées dans des puits revêtus ou non de neutravidine (dans tous les cas, la surface est revêtue de sérum-albumine bovine, empêchant l'adsorption passive). Le pourcentage de diminution de signal des protéines fluorescentes après capture par la neutravidine est identique à celui obtenu après adsorption sur la surface *Maxisorp*.

Nous avons également réalisé une expérience similaire avec le peptide Ala¹⁰SP biotinylé et marqué avec différents fluorophores (gamme de 1 à 100 nM). Comme attendu, le signal est identique avant et après incubation pour les puits revêtus d'albumine, tandis que le signal est plus faible après incubation pour les puits revêtus de neutravidine. Les pourcentages de *quenching* maximal (obtenus pour les concentrations comprises entre 25 et 50 nM) sont du

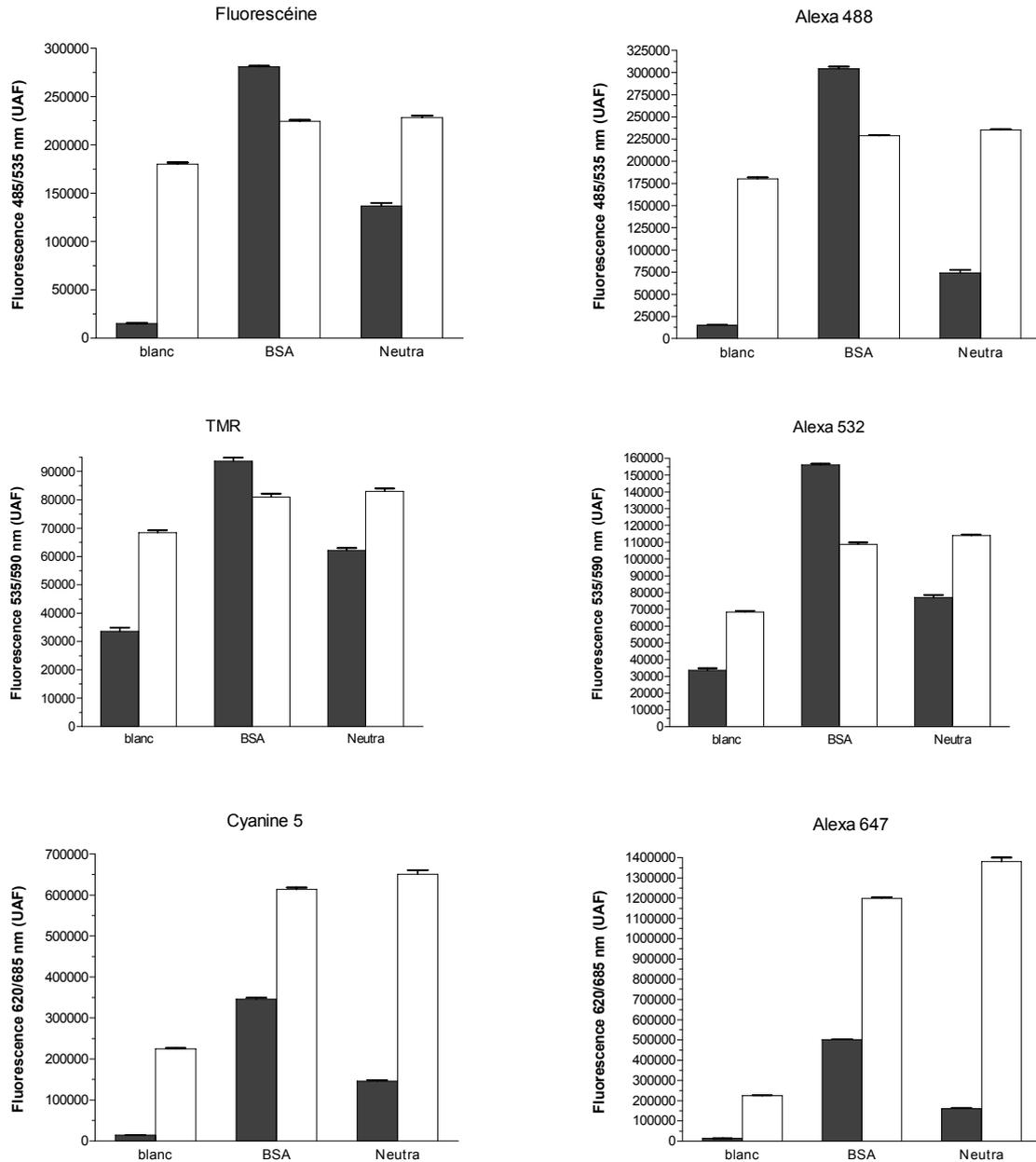


Figure 101 : Comparaison du signal fluorescent sur phase solide sur plaques noires et blanches

Signal fluorescent de BLg fluorescentes et biotinylées en PVP (100 μ L/puits) après 4 h d'incubation à RT dans des puits revêtus ou non de neutravidine d'une plaque Nunc Maxisorp noire (barres noires) ou blanche (barres blanches) (n=6). Le blanc correspond au tampon seul.

Mesure avec le lecteur Envision à 485/535 nm pour la Fluorescéine et l'Alexa488, à 533/590 nm pour la TMR et l'A532, et à 620/685 nm pour la Cy5.0 et l'Alexa647.

même ordre de grandeur que pour la BLg, sans être toutefois identiques, avec 53 % et 71 % pour la Fluorescéine et l'Alexa 488, 66 % et 62 % pour la TMR et l'Alexa 532, 67 % pour l'Alexa 546 et 77 % pour l'Alexa 647 (le Cy5.0 n'ayant pas été testé). Pour tous les fluorophores, le pourcentage de « *quenching* » diminue pour les concentrations supérieures à 60 nM, probablement en raison de la présence de peptide en excès dans la phase liquide. Par ailleurs, il diminue pour les concentrations inférieures à 25 nM (au lieu de 1 nM pour la BLg). A ce jour, nous n'avons pas d'explication claire de ce phénomène.

III.4.1.3. Expériences de capture de molécules fluorescentes par des anticorps immobilisés

Nous avons observé que la cinétique de liaison des traceurs fluorescents sur des anticorps immobilisés sur la phase solide s'accompagne d'une diminution progressive du signal fluorescent. Par exemple, nous avons pu suivre la cinétique de capture de l'anticorps SP31 marqué à la fluorescéine par des anticorps CAS fixés sur phase solide. De la même façon, la fixation du peptide ϵ_3 SP-Fluorescéine dans des puits revêtus d'anticorps SP31 s'accompagne d'une diminution de fluorescence. Après lavage, seule une très faible partie de la fluorescence est détectée lorsque le traceur est lié à la phase solide.

III.4.1.4. Comparaison de plaques et lecteurs de plaques

Le phénomène de diminution de la fluorescence sur phase solide est observé avec tous les lecteurs de fluorescence testés (Envision, Analyst, Spectramax). Le pourcentage de *quenching* est identique pour les plaques de marques Nunc et Matrix Technologies en polystyrène noir.

En revanche, avec des plaques blanches, le phénomène n'est plus observé. Au contraire, la fluorescence augmente légèrement (environ + 10 %) avec la fixation de la protéine sur la phase solide (Figure 101).

III.4.1.5. Discussion

Pour tous les fluorophores testés (Fluorescéine, TMR, Cy5.0, et les Alexas 488, 532, A546 et 647) qui possèdent des propriétés spectrales et chimiques diverses, nous observons une fluorescence beaucoup plus faible après leur liaison sur la phase solide que lorsqu'ils sont en solution, que les fluorophores soient fixés sur un peptide ou sur une protéine. Le phénomène est observé aussi bien par adsorption directe de la molécule fluorescente sur le support en polystyrène que par liaison neutravidine-biotine, ou encore *via* un anticorps immobilisé. Nous avons montré qu'il existait une relation de proportionnalité entre la diminution de fluorescence et la concentration en molécule fluorescente. Toutefois, pour les concentrations inférieures à un certain seuil (1 nM pour la BLg et 25 nM pour Ala¹⁰SP), le pourcentage de

diminution du signal sur phase solide devient plus faible, rejoignant le zéro de façon asymptotique. La valeur de ce pourcentage étant nulle en l'absence de fluorophore, il semble logique qu'il diminue pour les très faibles concentrations. Toutefois, à l'heure actuelle, nous n'expliquons pas l'écart important entre les deux molécules en terme de concentration à partir de laquelle le pourcentage de diminution de fluorescence est plus faible.

Cette diminution de fluorescence sur phase solide a été observée avec plusieurs lecteurs dont le fonctionnement est différent et pour des plaques de différentes marques en polystyrène noir. Nous avons montré que ce phénomène ne se produit pas avec les plaques en polystyrène blanc. Cela suggère que ce n'est pas le matériau proprement dit qui interagit avec le fluorophore mais les pigments noirs. En effet, le noir absorbe la lumière de tout le spectre du visible, entre 400 et 800 nm, les fluorophores testés ayant un spectre d'émission compris dans cette zone. Ainsi le support solide pigmenté absorberait la fluorescence émise par la fluorescéine, mais non pas par une simple réabsorption (qui aurait lieu même lorsque la molécule est en solution) mais par un phénomène particulier qui aurait lieu seulement lorsque le chromophore est suffisamment proche, à l'instar du phénomène de FRET. C'est cette propriété permettant de distinguer la fraction libre de la fraction liée que nous avons employée pour la mise au point de dosages immunologiques.

D'autres études seraient nécessaires pour déterminer précisément le phénomène à l'origine de cette diminution de fluorescence sur phase solide, et pour vérifier qu'elle se produit avec tout luminophore émettant dans le spectre d'absorption du matériau de la phase solide.

Nous parlerons donc de *Quenching* apparent sur Phase Solide (noté Q_{PS}) qui correspond à la diminution du signal fluorescent observée sur phase solide. Nous parlons de « *quenching* » car il s'agit d'une inhibition de signal réversible ; cependant n'ayant pas pu déterminer si un phénomène physique de *quenching* moléculaire est réellement à l'origine de cette diminution de fluorescence, nous ajoutons le qualificatif « apparent ». La notation Q_{PS} permet de le différencier du *quenching* résultant du phénomène de transfert d'énergie par résonance de fluorescence ou FRET (noté Q) utilisé dans le cadre du dosage SPIT-FRI.

Nous avons souhaité illustrer la faisabilité de ce principe de détection original basé sur la diminution de fluorescence sur phase solide pour la mise au point de dosages immunologiques de différents formats (de type compétitifs et immunométriques) qui ont été réalisés avec les modèles BLg, Aflatoxine et Ricine dont nous disposons dans le cadre du SPIT-FRI.

III.4.2. Mise au point d'un dosage par compétition avec immobilisation de l'anticorps (modèle BLg)

Dans ce format, qui correspond au format ELISA classique, l'anticorps est immobilisé sur la phase solide, et la compétition a lieu entre le traceur BLg fluorescent et le standard BLg. À titre d'exemple, nous présenterons ici les résultats obtenus avec l'antisérum polyclonal de lapin anti-BLg (GB1).

III.4.2.1. Comparaison de différents fluorophores

Nous avons mesuré le signal des traceurs BLg (BLg marquée avec différents fluorophores) en présence de différentes concentrations d'anticorps polyclonal de lapin GB1 sur une plaque revêtue d'anticorps de capture SAL (anticorps monoclonal de souris anti-immunoglobulines de lapin). Les résultats sont présentés sur la Figure 102.

Pour tous les traceurs, on observe une diminution de la fluorescence inversement proportionnelle à la concentration en antisérum. La gamme dynamique de signal, correspondant à $F_{max}-F_{min}$, varie selon les fluorophores. Les traceurs Alexa 488, Fluorescéine, Alexa 647 et Cy5.0 permettent d'obtenir une gamme dynamique importante, en raison d'un signal F_{max} élevé et d'un pourcentage de *quenching* sur phase solide d'environ 50%. En revanche, la gamme dynamique est faible pour les traceurs TMR et Alexa 532 en raison d'un très faible pourcentage de *quenching*. Cette faible gamme dynamique est probablement due à une faible reconnaissance par l'anticorps. En effet, nous avons montré précédemment que le marquage fluorescent était susceptible d'altérer l'immunoréactivité de la BLg, en particulier, par le marquage à la TMR ou à l'Alexa532.

Au vu de ces résultats, et après avoir comparé différentes concentrations de traceur, nous avons choisi d'utiliser le traceur BLg-A488 à 30 ng/mL avec l'anticorps GB1 à 1 µg/mL.

III.4.2.2. Mise au point du dosage. Comparaison de la mesure en point final et en cinétique.

Nous avons souhaité savoir s'il pouvait être intéressant d'utiliser les données cinétiques pour optimiser l'analyse.

Nous avons montré que la préincubation de l'anticorps sur la phase solide permet d'obtenir des courbes avec une cinétique plus rapide. C'est pourquoi le dosage a été réalisé avec préincubation de l'anticorps. Le dosage de la BLg par format compétitif dans ces conditions (en employant le traceur BLg-Alexa488 à 30 ng/mL et l'anticorps GB1 purifié à 1 µg/mL préincubé) donne une EC_{50} (signal induit par l'analyte /signal maximal = 0,5) de 113 ng/mL (Figure 104) avec une analyse en point final (après 2 h d'incubation à RT).

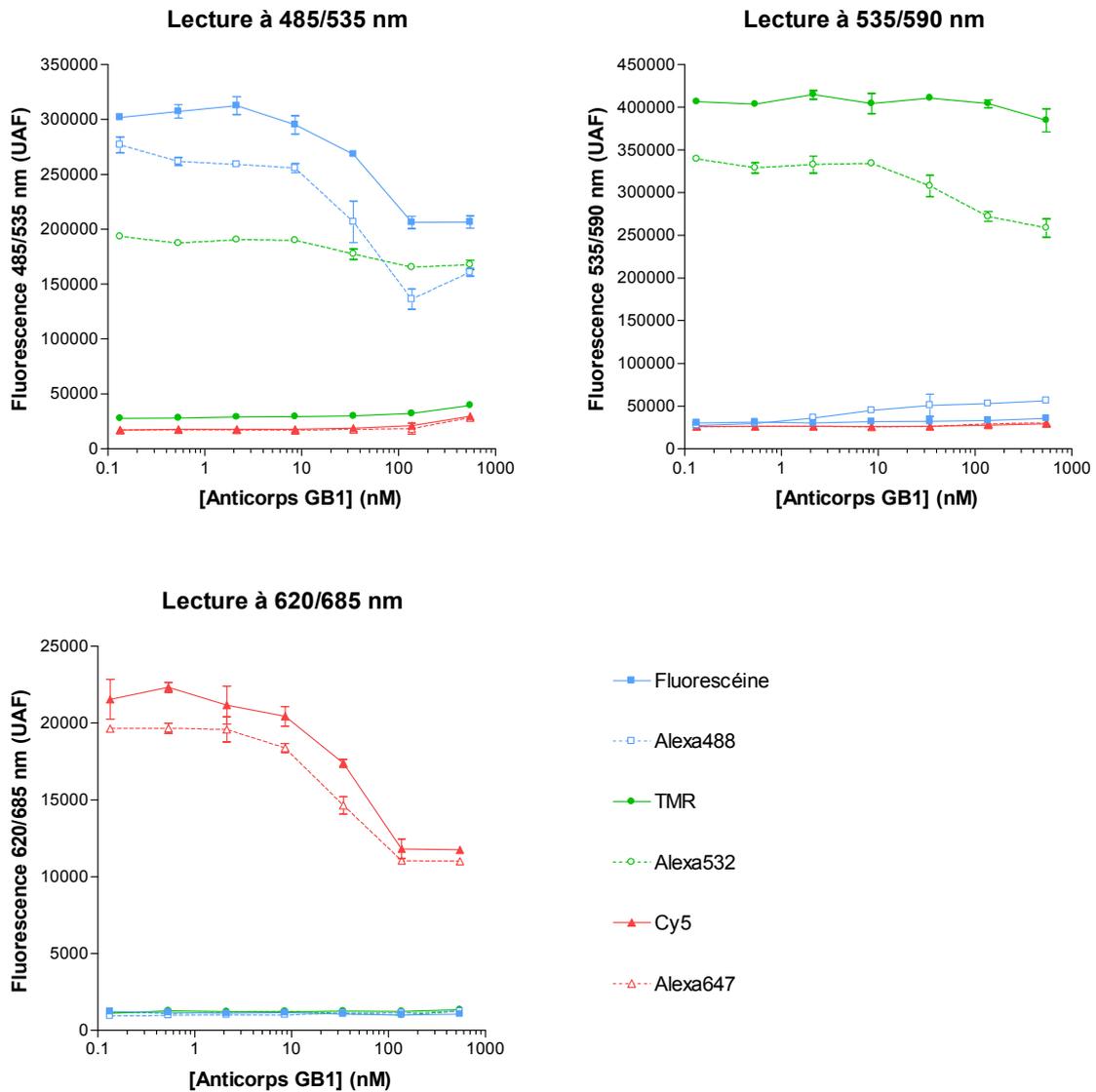


Figure 102 : Comparaison des traceurs BLg Fluorescéine, A488, TMR, A532, Cy5.0 et A647 avec l'anticorps polyclonal GB1

Incubation simultanée d'anticorps polyclonal GB1 et de traceur BLg (Fluorescéine, A488, TMR, A532, Cy5.0 ou A647) durant 2 h à RT (volume de réaction : 150 μ L, tampon PVP) dans des puits revêtus d'anticorps SAL (plaque Nunc noire Maxisorp).

Mesure de la fluorescence avec le lecteur Envision à 485/535 nm, 535/590 nm et 620/685 nm.

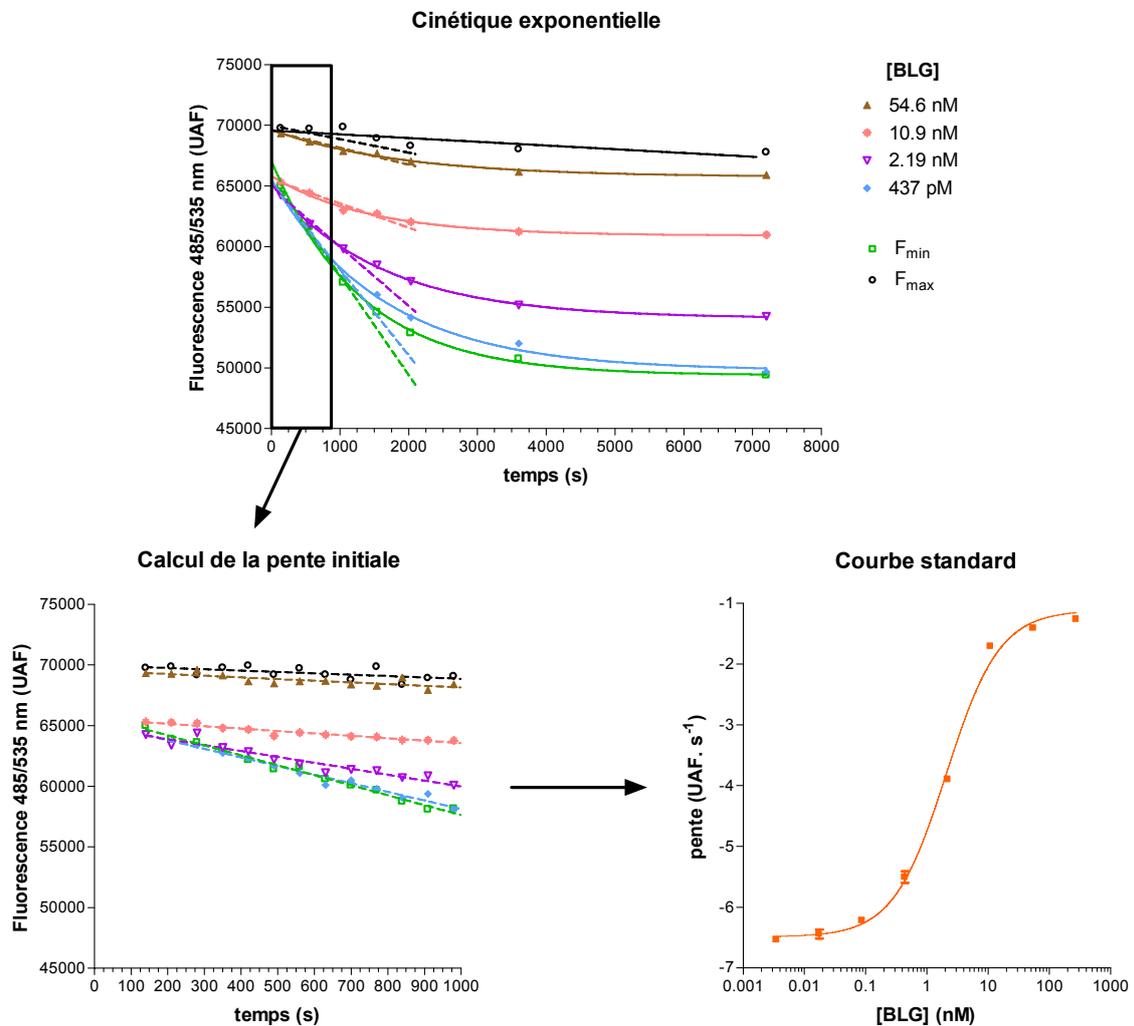


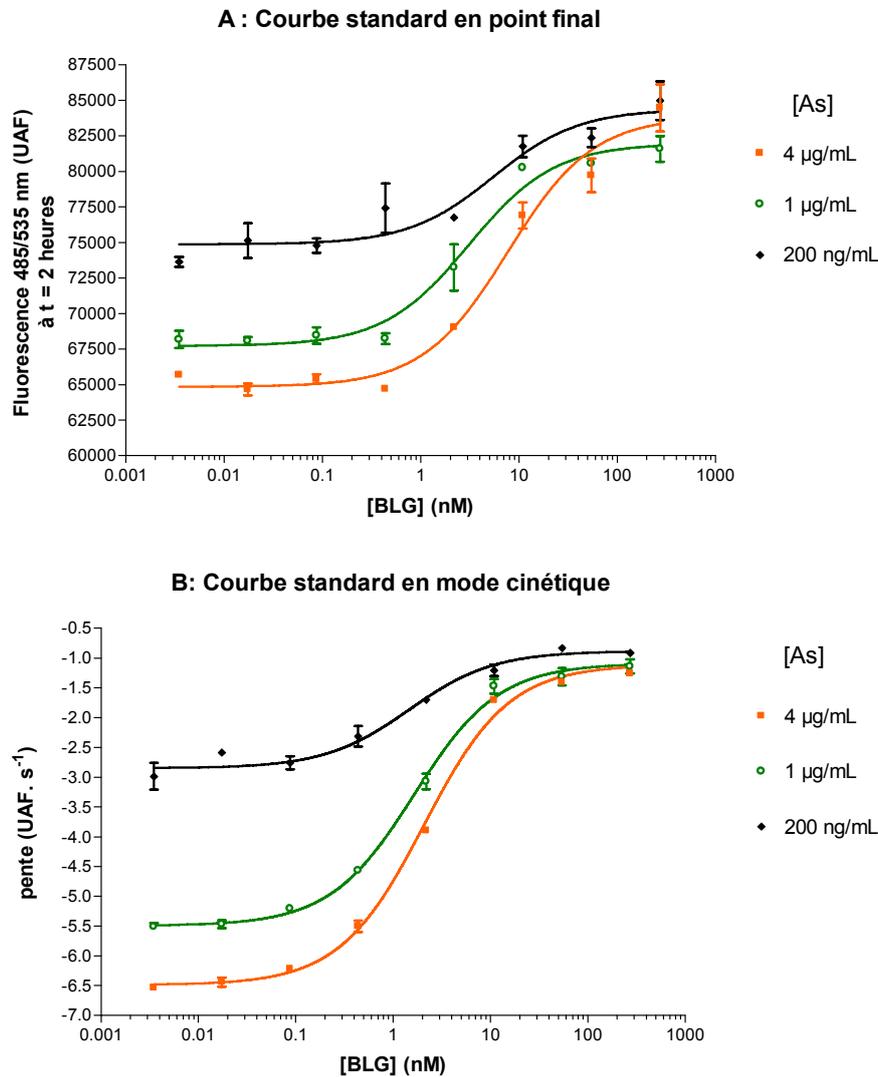
Figure 103 : Illustration de la méthode d'analyse des courbes cinétiques par régression linéaire sur les 11 premières minutes de réaction.

Plaque SAL.

Dosage séquentiel : ① 100 μ L d'antisérum GB1 à 4 μ g / mL (2 h, RT) ② 100 μ L d'un mélange de traceur BLg-Alexa488 (concentration finale : 820 pM) et de standard BLg. Mesure de la fluorescence en cinétique à 485/535 nm immédiatement après le dépôt.

En bas à gauche : zoom sur les 11 premières minutes de cinétique => calcul de la pente initiale

En bas à droite : tracé de la pente (UAF · s⁻¹) en fonction de la concentration en standard



[As]	EC50 (nM)	Point final (t=2h)	Analyse cinétique
4 µg/mL		7.729	2.080
1 µg/mL		3.100	1.646
200 ng/mL		5.504	1.460

Figure 104 : Courbes standards du dosage BLg en point final (durée d'incubation = 2 h) et en mode cinétique (11 min), pour 3 concentrations en antisérum.

Plaque SAL. Dosage séquentiel : ① 100 µL d'antisérum GB1 purifié à 4 µg / mL, 1 µg / mL ou 200 ng / mL (2 h, RT). ② Dépôt de 100 µL du mélange de traceur BLg-Alexa488 (concentration finale : 820 pM) et de standard. Mesure de la fluorescence à 485/535 nm en cinétique (t=1 à 11 min) puis en point final à t=2 h.

A (Courbe standard en point final) : Signal à t = 2 h en fonction de la concentration en standard.

B (Courbe standard en mode cinétique) : Pente estimée par régression linéaire en fonction de la concentration en standard.

Le tableau récapitule les EC₅₀ (nM) pour la mesure en point final et l'analyse cinétique, pour les 3 concentrations en anticorps testées.

La Figure 103 illustre la méthode d'analyse que nous avons employée pour réaliser un dosage rapide. Le suivi de la réaction au cours du temps met en évidence une cinétique du type exponentielle. Le début de la courbe peut s'apparenter à une droite. Nous avons considéré pour la régression linéaire les points acquis entre $t = 1$ min et $t = 11$ min (1 mesure/minute). Si l'on reporte la pente de la courbe de régression en fonction de la concentration, nous obtenons une courbe standard de type sigmoïdale.

Cette analyse (dosage total réalisé en 11 min) a été comparée avec l'analyse en point final (après incubation durant 2 h). On obtient un EC_{50} de 60 ng/mL contre 113 ng/mL pour le dosage en point final (avec une concentration en anticorps préincubé de 1 μ g/mL), montrant que la méthode d'analyse par la pente est avantageuse en terme de sensibilité du dosage.

La diminution de la concentration en anticorps permet d'améliorer encore cette sensibilité ($EC_{50} = 53$ ng/mL soit 2,9 nM avec une concentration en anticorps de 200 ng/mL) (Figure 104).

Ces résultats sont comparables avec ceux obtenus avec le dosage EIA de référence pour lequel nous avons déterminé l' EC_{50} dans les mêmes conditions expérimentales (78 ng/mL).

III.4.3. Mise au point d'un dosage par compétition avec immobilisation d'un analogue de l'analyte (modèle Aflatoxine B1)

Disposant des réactifs mis au point pour le SPIT-FRI, nous avons choisi d'employer un format compétitif avec immobilisation sur la phase solide d'un analogue de la molécule à doser correspondant au conjugué peptideT(biot)-AFB1. Nous avons utilisé deux anticorps monoclonaux commerciaux dirigés contre l'AFB1 (AcMs ATB et AFA) marqués avec l'Alexa647. Nous avons choisi d'utiliser un mode d'incubation séquentiel (incubation de l'analogue puis, après lavage, incubation du mélange d'anticorps et standard) afin de pouvoir suivre aisément la cinétique de fixation de l'anticorps sur la phase solide. En effet, comme nous l'avons montré sur le modèle BLg, la cinétique de fixation du traceur est plus rapide lorsque l'analogue est préalablement immobilisé sur phase solide, sans que cela n'affecte la sensibilité du dosage.

III.4.3.1. Mesure du « quenching apparent » sur phase solide pour les anticorps ATB-A647 et AFA-A647

La Figure 105 (p.264) présente les pourcentages de *quenching* apparent sur phase solide obtenus pour différentes concentrations en analogue et anticorps incubés séquentiellement sur une plaque revêtue de neutravidine. Pour chaque anticorps et concentration en anticorps, le

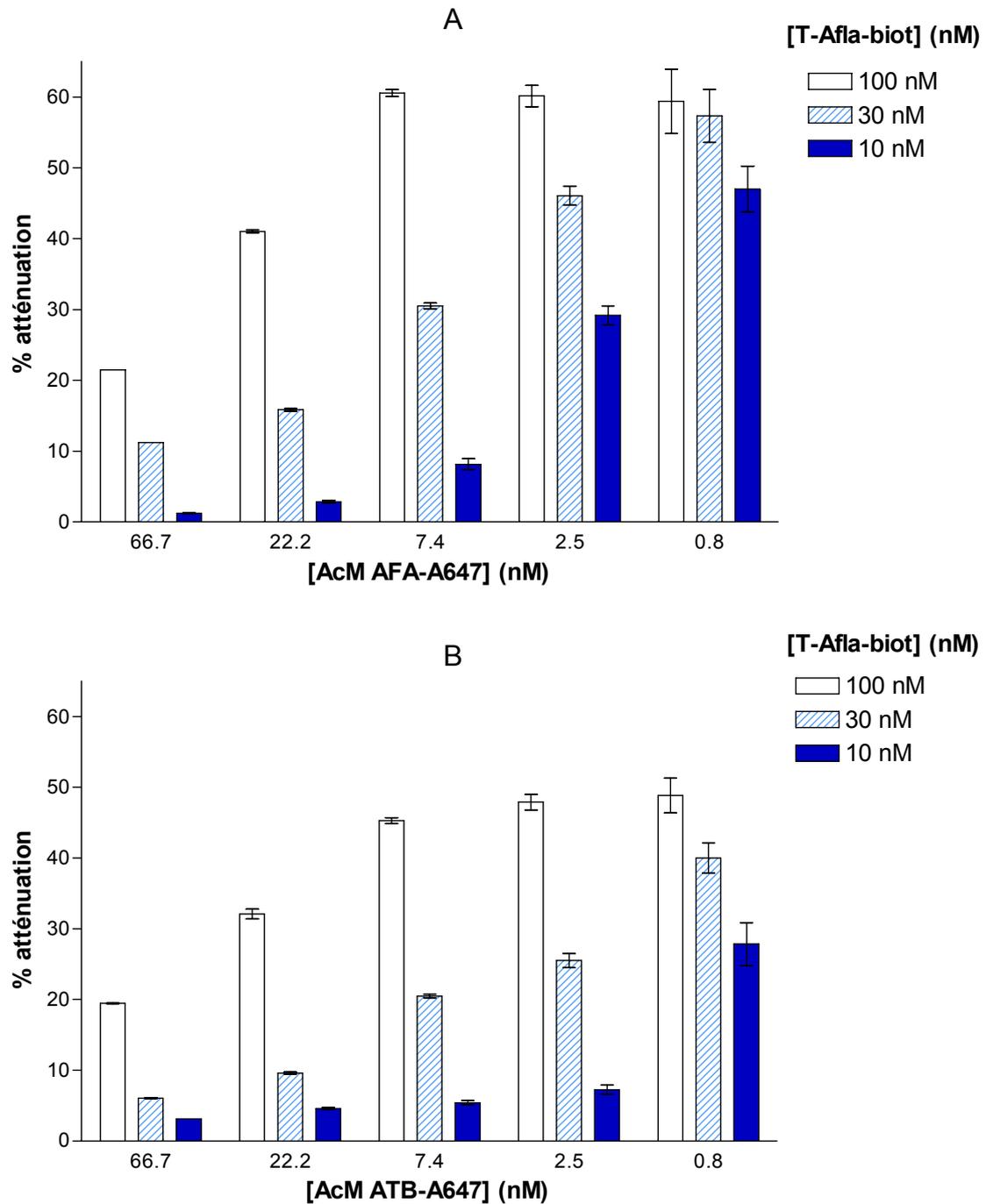


Figure 105 : Atténuation de fluorescence (%) pour différentes concentrations d'anticorps AFA-A647 et ATB-A647 et d'analogue peptide T(biot)-AFB1

Incubations séquentielles (100 μ L) d'analogue (à 10, 30 ou 100 nM) durant 30 min à RT, puis après lavage de d'anticorps AFA-A647 (graphe A) ou ATB-A647 (graphe B) durant 4 h à RT. Mesure de fluorescence (sans lavage) avec le lecteur Envision à 620/685 nm.

pourcentage de *quenching* est calculé par référence à la fluorescence des puits témoins, sans analogue immobilisé, contenant l'anticorps.

Pour les deux anticorps, le pourcentage de *quenching* maximal est atteint pour la concentration en analogue la plus élevée (100 nM) avec les concentrations en anticorps faibles (7,4 nM, 2,5 nM et 0,8 nM). Les résultats obtenus avec les concentrations en anticorps inférieures à 0,8 nM n'ont pas été retenus car les variations entre les réplicats sont trop élevées (CV>8%).

Pour les concentrations en analogue faibles (10 nM et 30 nM), on observe que, même avec la concentration en anticorps la plus basse (0,8 nM), le pourcentage de *quenching* maximal n'est pas atteint. Cela peut s'expliquer par le fait que la concentration minimale en anticorps permettant de saturer les sites des ligands immobilisés est d'autant plus faible que la densité du ligand sur la phase solide est faible. Pour des concentrations en anticorps supérieures à cette concentration « saturante », une certaine quantité d'anticorps reste en solution, entraînant une diminution du *quenching* mesuré. La proportion d'anticorps se trouvant en solution par rapport à l'anticorps immobilisé est d'autant plus élevée que la concentration en anticorps est élevée.

Le pourcentage de *quenching* sur phase solide maximal est de 61 % avec l'anticorps AcM AFA-A647 contre 49% avec AcM ATB-A647. Cette différence est probablement liée à une affinité plus élevée de l'anticorps AFA envers l'Aflatoxine par rapport à l'anticorps ATB. En revanche, il est à noter que l'anticorps AcMATB-A647 est plus fluorescent que l'anticorps AcMAFA-A647 en raison d'un rapport de marquage de 4,4 moles d'A647 par mole de AcM ATB, contre 1,8 moles d'A647 par mole de AcM AFA. Or, afin d'obtenir le dosage le plus sensible et le plus robuste possible, il est nécessaire d'employer les concentrations les plus faibles possibles en anticorps et en analogue tout en ayant un signal de *quenching* ($F_{\max} - F_{\min}$) le plus élevé possible et bien sûr les plus faibles coefficients de variations. L'anticorps ATB, qui ne conduit à un *quenching* que de 49 %, est en fait susceptible d'être tout aussi performant que l'anticorps AFA, puisque le signal de *quenching* généré ($F_{\max} - F_{\min}$) est du même ordre de grandeur. Les deux anticorps ont donc été utilisés pour la mise au point du dosage par compétition avec AFB1.

III.4.3.2. Dosage par compétition des aflatoxines AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2

Au vu des résultats obtenus en terme de *quenching*, et sachant que plus la densité en analogue est élevée, plus la cinétique de fixation de l'anticorps sur la phase solide est rapide, nous avons choisi de préincuber l'analogue à une concentration de 100 nM durant 30 min à RT.

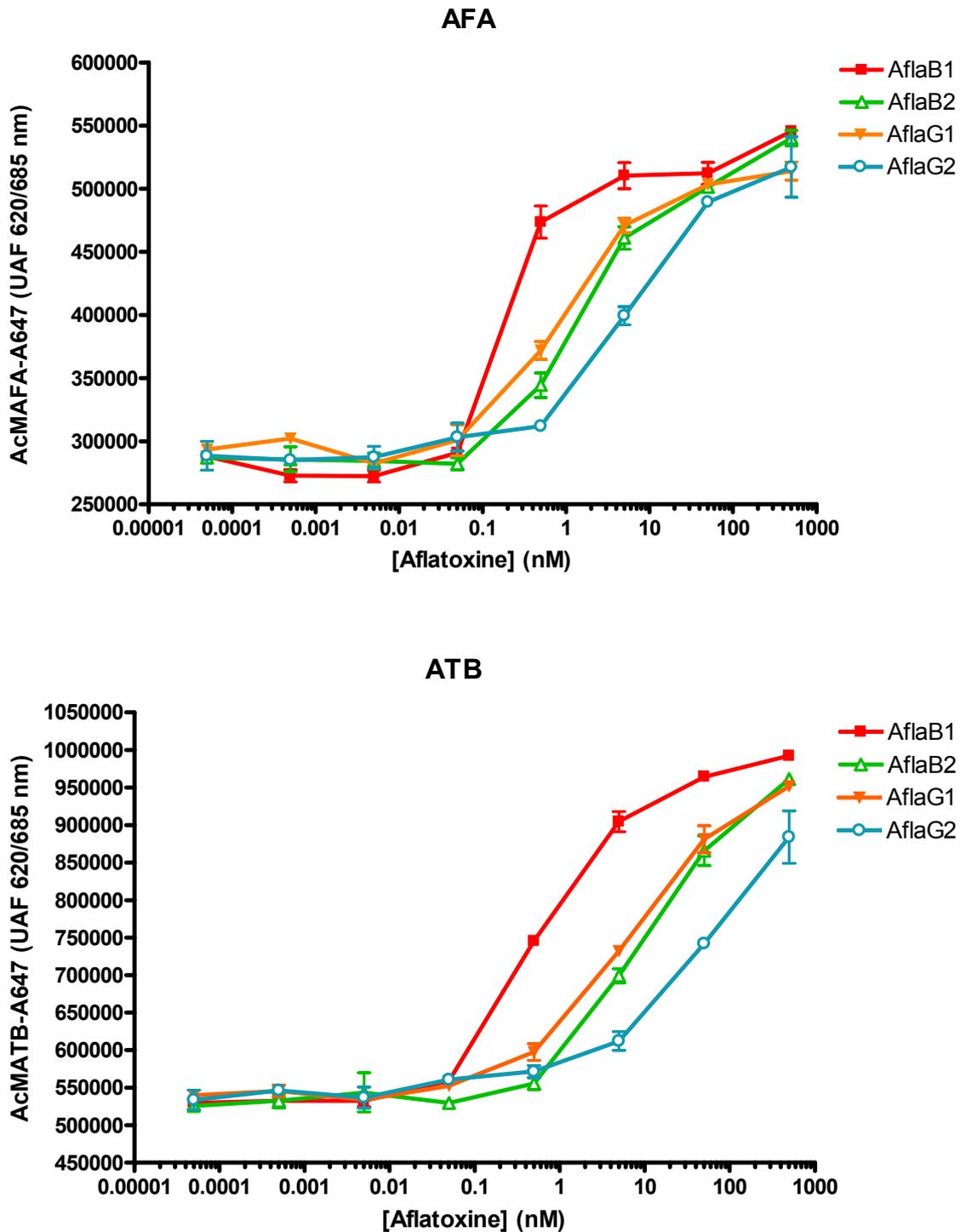


Figure 106 : Dosage de l'Aflatoxine par mesure de l'atténuation de fluorescence

Incubations séquentielles de 100 μ L d'analogue peptide(biot)-AFB1 (100 nM) durant 30 min à RT, puis après lavage de 100 μ L d'un mélange d'anticorps AFA-A647 ou ATB-A647 (6,7 nM) et de standard AFB1, AFB2, AFG1 ou AFG2 à différentes concentrations durant 4 h à RT.

Mesure de fluorescence (sans lavage) avec le lecteur Envision à 620/685 nm.

Des dosages par compétition réalisés avec une gamme de standard AFB1 en présence des anticorps à différentes concentrations ont permis d'établir que, pour les deux anticorps, les concentrations optimales se situent entre 2 et 10 nM. Pour des concentrations inférieures à 2 nM, les coefficients de variations se révèlent trop élevés (supérieurs à 10 %), et pour des concentrations supérieures à 10 nM, la sensibilité du dosage (évaluée par la valeur d'EC50) diminue.

La Figure 106 présente les résultats des dosages réalisés avec les anticorps AFA-A647 et ATB-A647 employés à 6,6 nM, en utilisant comme standard les quatre aflatoxines AFB1, AFB2, AFG1 et AFG2. La mesure a été réalisée en point final après 4 h d'incubation. Comme précédemment décrit pour la BLg (voir au III.4.2.2, p.259), l'analyse cinétique réalisée sur les 10 premières minutes de la réaction conduit à des résultats similaires, avec des valeurs d'EC50 du même ordre de grandeur que celles obtenues après 4 h de réaction.

La sensibilité du dosage de l'AFB1, évaluée par la valeur d'EC50, est meilleure avec l'anticorps AFA (0,2 nM) qu'avec l'anticorps ATB (0,8 nM). Cette tendance se trouve d'ailleurs vérifiée pour les composés apparentés puisque les EC50 pour les composés AFB2, AFG1 et AFG2 sont de 1 nM, 1,2 nM et 9 nM pour l'anticorps AFA contre 0,8 nM, 10,2 nM, 9 nM et 75 nM pour l'anticorps ATB. Si pour les deux anticorps, la reconnaissance d'AFG2 semble faible avec des réactions croisées de 1 à 2 %, l'anticorps AFA présente une forte réaction croisée avec les composés AFB2 et AFG1 (20 et 16 % respectivement) alors que l'anticorps ATB, malgré sa plus faible affinité semble plus spécifique d'AFB1, en ne présentant que des réactions croisées de l'ordre de 8 % pour AFB2 et AFG1. La limite de détection de l'AFB1 est de 0,06 nM avec l'anticorps AFA contre 0,12 nM avec l'anticorps ATB (n=3). Les deux anticorps pourraient présenter un intérêt.

Pour le dosage de l'AFB1, le choix de l'anticorps utilisé dépendra donc de l'application envisagée. L'anticorps AFA présente les meilleures limites de détection et de sensibilité mais une spécificité moindre pour AFB1 par rapport aux aflatoxines AFB2, AFG1 et AFG2 que l'anticorps ATB.

III.4.4. Mise au point d'un dosage en format immunométrique (modèle Ricine)

Les dosages immunométriques à 2 sites ou dosages sandwichs sont très utilisés en immunoanalyse en raison de leur forte spécificité (emploi de 2 anticorps dits « complémentaires » reconnaissant donc des épitopes différents sur l'antigène) et sensibilité (classiquement plus élevée d'un facteur 1000 que les dosages par compétition réalisés avec les mêmes anticorps) (Grassi, 1990). Nous avons donc souhaité évaluer la possibilité d'utiliser le SPI-FIA pour la mise au point de dosages sandwichs. Disposant d'anticorps anti-ricine complémentaires, nous avons choisi cette molécule comme modèle pour cette étude.

III.4.4.1. Choix des anticorps

III.4.4.1.1. Présélection des anticorps

Pour la Ricine, nous avons employé les anticorps monoclonaux obtenus au laboratoire.

Nous avons obtenu 5 clones de lymphocytes produisant des anticorps dirigés contre la RicA (anticorps RCA) et 20 clones pour RicB (anticorps RCB).

L'adaptation à la méthode nécessite le marquage fluorescent des anticorps traceur. Comme nous l'avons mis en évidence à plusieurs reprises, le marquage fluorescent des anticorps est susceptible de modifier leurs propriétés de reconnaissance. Cette modification varie en fonction de très nombreux paramètres, i.e. l'anticorps, le fluorophore, le rendement de marquage, l'emplacement du fluorophore sur l'anticorps, etc. L'idéal serait donc en théorie de réaliser les tests d'évaluation combinatoire des différents couples en employant comme anticorps traceur les anticorps déjà marqués avec le fluorophore. Toutefois, un protocole de marquage systématique de tous les anticorps avec les marqueurs fluorescents est difficile du fait du coût de ces molécules.

Nous avons donc présélectionné les anticorps les plus performants en utilisant comme traceurs les anticorps biotinylés, selon la méthode utilisée classiquement au laboratoire (l'ester actif de biotine, moins coûteux que les fluorophores, est acheté en grande quantité au laboratoire). Toutes les combinaisons (anticorps de capture, anticorps traceur biotinylé), soit 625 combinaisons, ont été testées avec la protéine entière contenue dans des broyats de graine de ricin, l'ajout de Streptavidine-AChE permettant la révélation enzymatique.

Suite à ces tests, nous avons sélectionné 4 anticorps parmi les plus performants pour la mise au point du dosage (RCA 1, RCA 2, RCB 1 et RCB 2).

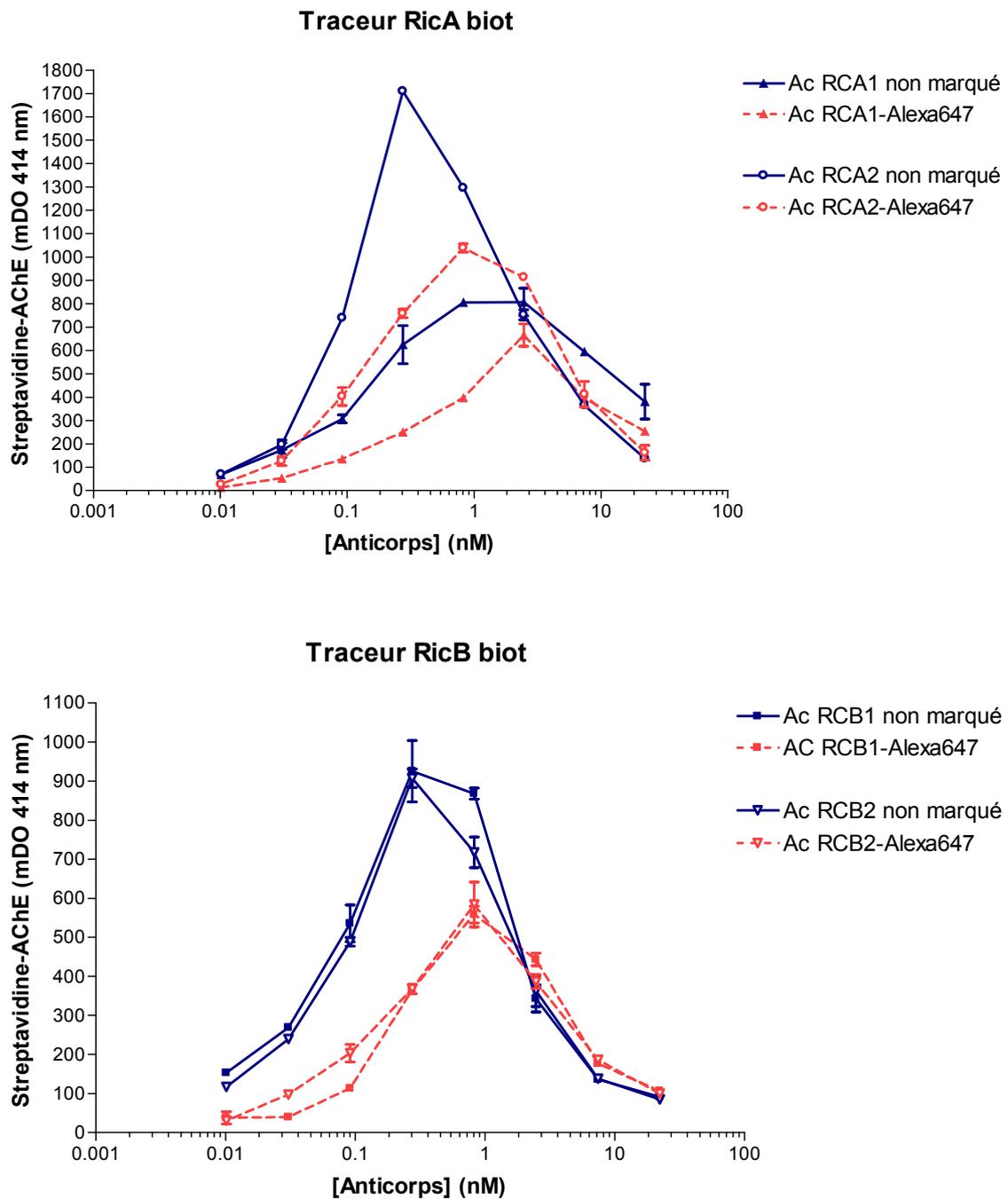


Figure 107 : Influence du marquage des anticorps Anti-RicA (RCA 1 et 2) et Anti-RicB (RCB 1 et 2) avec l'Alexa 647 sur la reconnaissance de RicA-biot et RicB-biot.

Plaque CAS.

① Co-incubation du traceur biotinylé et de l'anticorps (volume : 150 μ L) durant 18 h à 4°C. Utilisation de RicA-biot (111 pM) pour les anticorps RCA, et RicB-biot (1,11 nM) pour les anticorps RCB.

② Streptavidine-AChE à 2 UE/mL (200 μ L) durant 2 h à RT. Révélation : 1 h.

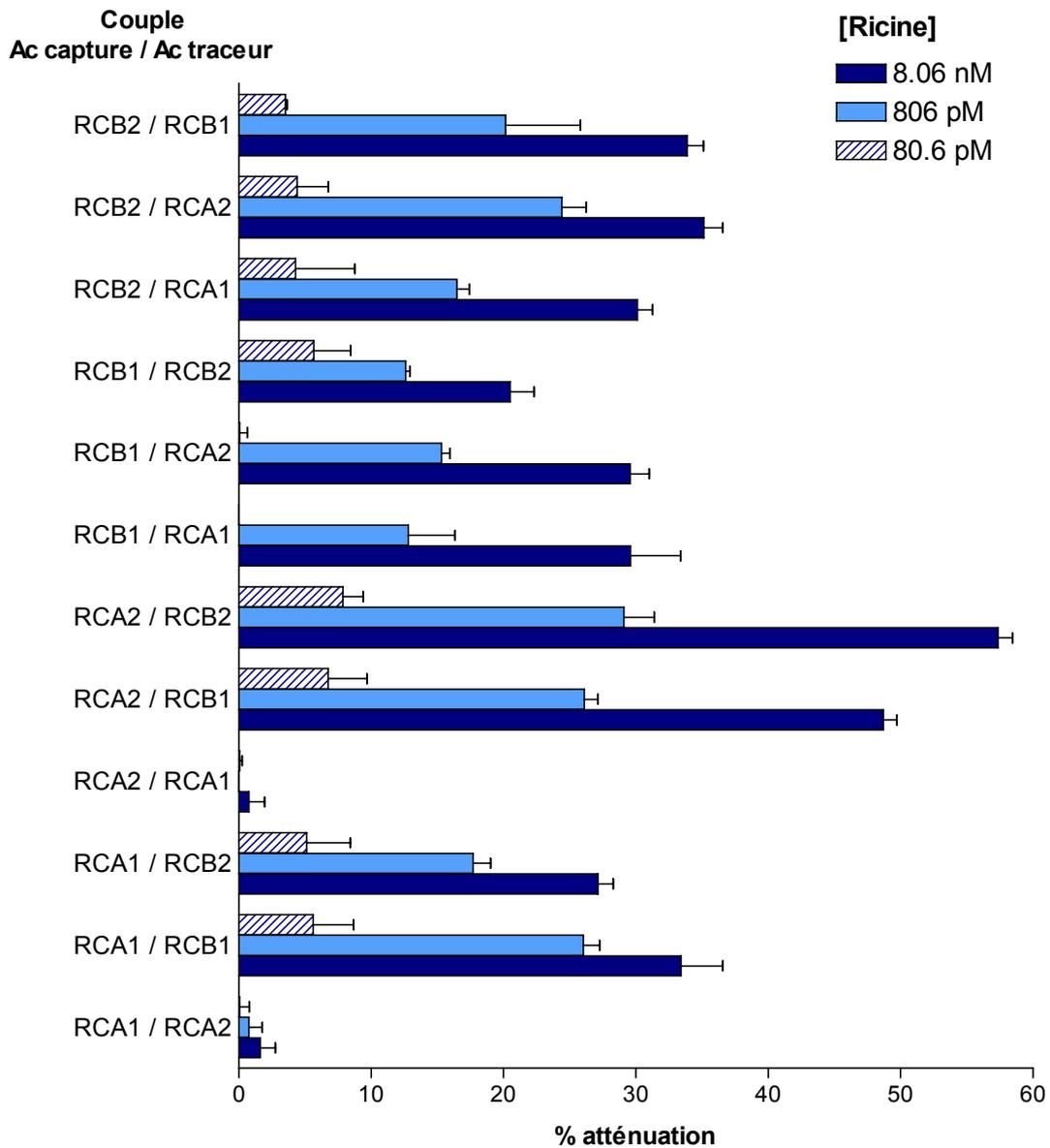


Figure 108 : Test de combinaisons d'Anticorps anti-ricine (Anticorps de capture / Anticorps traceur) avec mesure de l'atténuation de fluorescence sur phase solide

Plaque Maxisorp noire revêtue d'anticorps de capture (RCA 1, RCA 2, RCB 1 et RCB 2).

Co-incubation du traceur et du standard durant 18 h à 4°C (Volume= 100 µL).

- Standard : Ricine entière contenue dans des broyats de graine de ricin, à 500 ng/mL (soit 8,06 nM), 50 ng/mL ou 5 ng/mL.

- Traceur : anticorps RCA 1, RCA 2, RCB 1 ou RCB 2 marqué avec l'Alexa 647 à 50 ng/mL (soit 333 pM).

Mesure de la fluorescence à $\lambda_{exc}=620$ nM $\lambda_{em}=685$ nM après incubation (sans lavage de la plaque).

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'atténuation par rapport au signal maximal (correspondant au signal du témoin sans ricine).

III.4.4.1.2. Choix du fluorophore et marquage des anticorps

Nous avons choisi comme fluorophore l'Alexa 647 qui permet d'obtenir (i) un signal maximal élevé (rendement de fluorescence de 0,7), (ii) un pourcentage d'atténuation élevé sur le polystyrène noir (75 % environ), et (iii) une mesure dans le rouge permettant de limiter le signal fluorescent non spécifique due à la fluorescence des molécules présentes dans l'échantillon.

Les anticorps ont donc été marqués avec l'Alexa 647 dans un rapport de couplage de 10 moles d'Alexa par mole d'anticorps selon le protocole classique. Les rapports de marquage, calculés à partir des spectres d'absorbances, sont de 6,0 ; 4,5 ; 3,2 et 5,3 moles d'A647 par mole d'Ac, respectivement pour les anticorps RCA 1, RCA 2, RCB 1 et RCB 2.

Sur la Figure 107 sont présentées les courbes de dilutions des anticorps marqués avec l'A647 (*versus* non marqués) sur une plaque revêtue d'anticorps de capture CAS avec les traceurs Ricine A et Ricine B biotinylés, testés pour les anticorps RCA et RCB respectivement.

La formation des complexes Anticorps-Ricine biotinylée est révélée en utilisant la Streptavidine-AChE. Pour tous les anticorps, on observe pour l'anticorps marqué un signal maximal plus faible que pour le même anticorps non marqué. Ceci illustre la diminution de la capacité de liaison des anticorps marqués pour le traceur. Cependant, malgré cet effet, l'ensemble des Ac marqués par le fluorophore reste fonctionnel.

III.4.4.1.3. Choix du couple avec le traceur fluorescent

La capacité de liaison des anticorps marqués ayant été modifiée lors du marquage, il nous a paru utile d'évaluer leurs propriétés en effectuant de nouveaux tests de combinatoire en dosage sandwich.

Le mélange de solution d'anticorps-Alexa 647 et de ricine est incubé durant 18 h sur des plaques en polystyrène noir Maxisorp revêtues d'anticorps RCA ou RCB, puis la fluorescence est mesurée dans les puits (sans étape de lavage). L'atténuation de fluorescence ou « *quenching* apparent » reflète la fixation des anticorps marqués sur la phase solide.

Les résultats, présentés sur la Figure 108, concordent avec ceux obtenus pour les traceurs biotinylés. Pour les couples (RCA 1, RCA 2), que ce soit avec l'anticorps RCA 1 ou RCA 2 utilisé comme traceur ou sur phase solide, le signal d'atténuation est nul ou faible. Ce résultat indique que les anticorps RCA 1 et RCA 2 ne peuvent pas se lier simultanément à la Ricine. Ils reconnaissent probablement un épitope situé dans la même région, voire le même épitope.

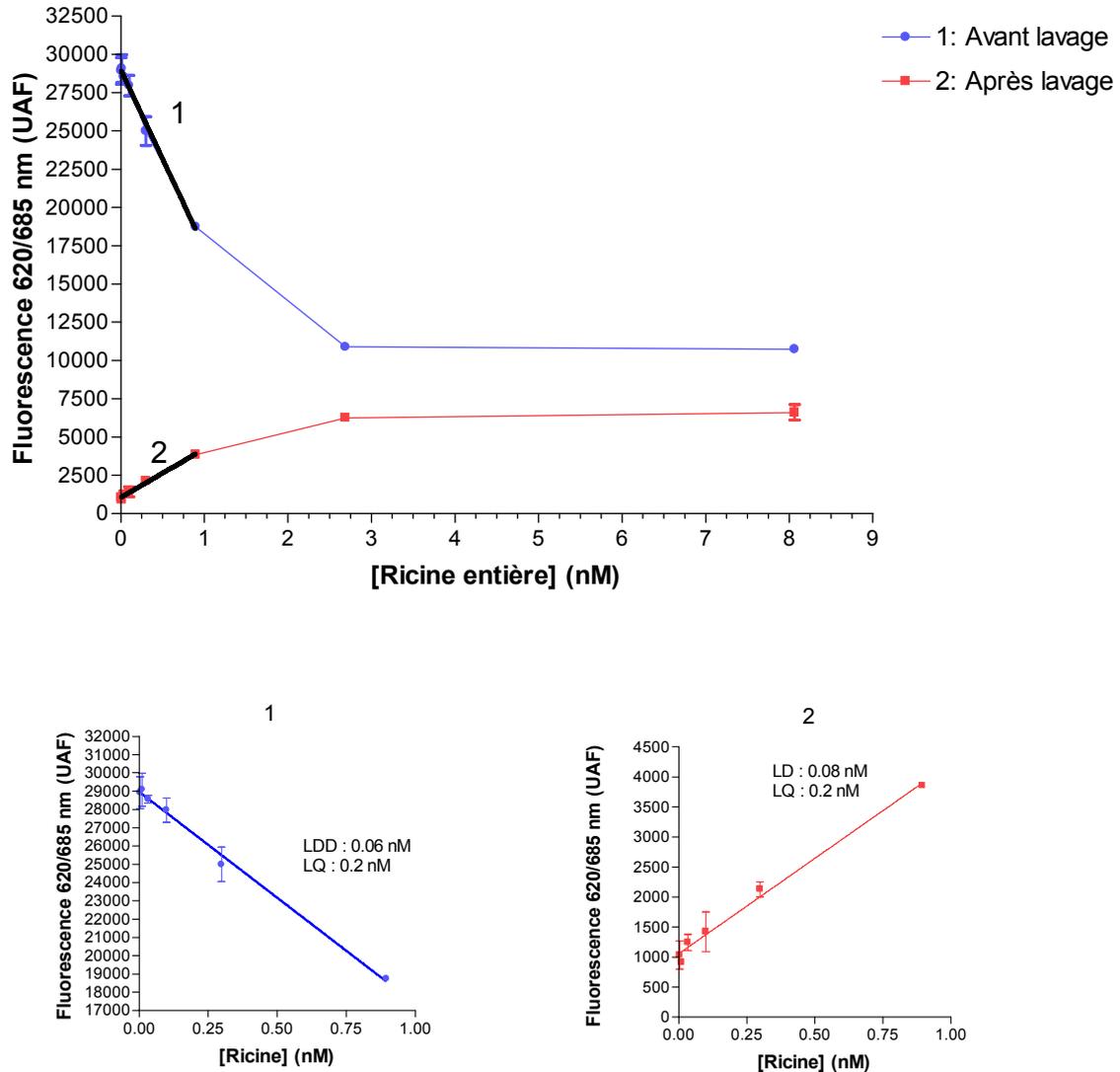


Figure 109 : Gamme d'étalonnage du dosage de la Ricine (mesure en point final après 18 h d'incubation). Comparaison de la mesure de l'atténuation de fluorescence et de la fluorescence sur phase solide.

Plaque noire revêtue d'anticorps RCA 2. Incubation simultanée de l'anticorps RCB 2-A647 (333 pM) et du standard (Ricine entière) à différentes concentrations durant 18 h à 4°C.

Mesure de la fluorescence à $\lambda_{exc}=620\text{nm}$, $\lambda_{em}=685\text{nm}$: ① avant lavage (mesure de l'atténuation de fluorescence) ; ② après lavage avec 100 μL de tampon de PVP (mesure de la fluorescence sur phase solide).

Régression linéaire : Fluorescence= A*Concentration+B.

① A=28967 +/- 215 UAF, B= -11598 +/-555 UAF. LD= 0,06 nM (concentration minimum détectable), LQ=0,2 nM (concentration minimum quantifiable)

② A=1054 +/- 63 UAF, B=3176 +/- 162 UAF. LD= 0,08 nM, LQ= 0,21 nM

Les autres couples permettent en revanche d'obtenir une atténuation de fluorescence élevée, correspondant à une diminution de signal comprise entre 20 % et 57 % selon le couple (pour

la concentration en ricine la plus élevée). Les deux couples permettant d'obtenir le signal d'atténuation le plus élevé utilisent l'anticorps RCA 2 sur phase solide, RCB 1 et 2 étant employés comme traceurs. Avec la concentration en ricine la plus élevée, on obtient un signal de 57 % pour le couple (RCA 2, RCB 2-A647) et 49% pour (RCA 2, RCB 1-A647).

Le couple (RCA 2, RCB 2-A647) a donc été sélectionné pour la mise au point du dosage.

III.4.4.2. Validation du dosage

Le dosage est réalisé avec une incubation simultanée de la gamme standard de ricine et de l'anticorps RCB 2-A647 sur une plaque revêtue d'anticorps RCA 2. Le signal est mesuré de deux manières différentes : 1) en point final, après 18 h d'incubation à 4°C, et 2) en cinétique, immédiatement après le dépôt et durant 1h30 à RT.

III.4.4.2.1. Mesure en point final

Les résultats sont présentés sur la Figure 109 (courbe 1). Comme attendu, on observe une diminution du signal avec la concentration en ricine. La gamme dynamique s'étend entre 10 700 pour la concentration la plus élevée en ricine et 28 500 UAF pour le signal du témoin sans ricine, soit une plage de 17 800 UAF.

La première partie de la courbe est linéaire, jusqu'à 1 nM environ. Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) ont été calculées à partir de la régression linéaire, correspondant respectivement à la moyenne du signal maximal moins 3, et moins 10 fois l'écart-type. On obtient LD= 0,1 nM et LQ=0,25 nM.

III.4.4.2.2. Comparaison de la mesure de l'atténuation de fluorescence et de la mesure de la fluorescence sur phase solide

Nous avons également mesuré la fluorescence après lavage de la plaque avec 100 µL de tampon de lecture (courbe 2 sur la Figure 109). Cette mesure correspond au dosage de la fluorescence sur la phase solide.

La gamme dynamique s'étend entre 1000 UAF (signal du blanc) et 6600 UAF (signal pour la concentration la plus élevée en ricine), soit une plage de 5600 UAF. La gamme dynamique est donc plus faible que celle obtenue avant le lavage de la plaque, en raison de la diminution de la fluorescence sur phase solide.

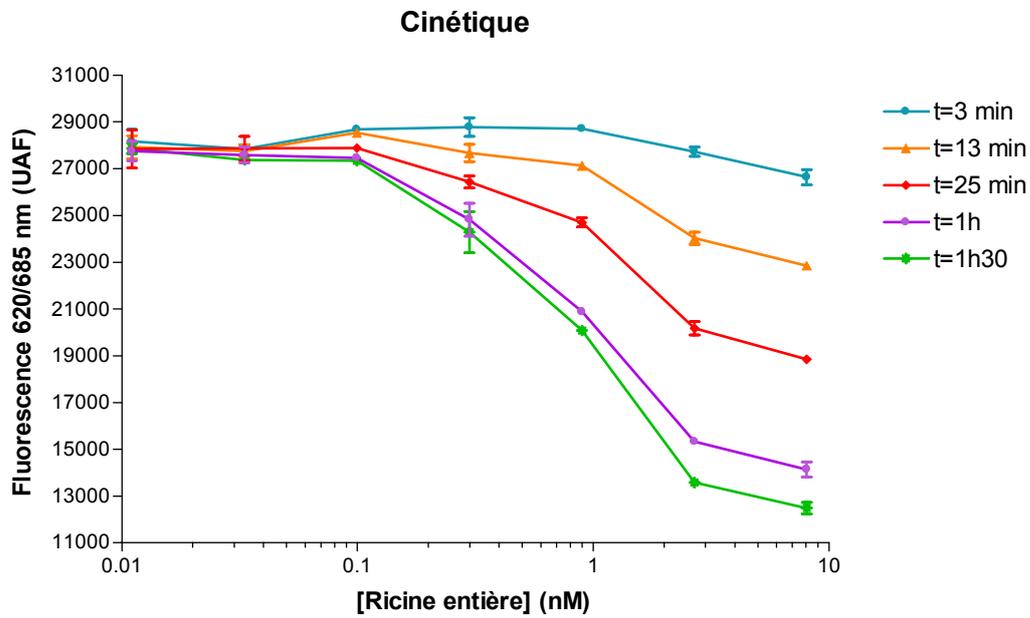


Figure 110 : Gamme d'étalonnage de la Ricine pour différentes durées d'incubation (t= 3 min à t= 1 h30).

Plaque noire revêtue d'anticorps RCA 2. Incubation simultanée de l'anticorps RCB 2-A647 (333 pM) et du standard (RicA, RicB ou Ricine entière) à différentes concentrations durant 1h30 à RT sous agitation.

Mesure de la fluorescence à $\lambda_{exc}=620nm$, $\lambda_{em}=685 nm$ à t=3 min, t= 13 min, t= 25 min, t= 1 h, t= 1 h30.

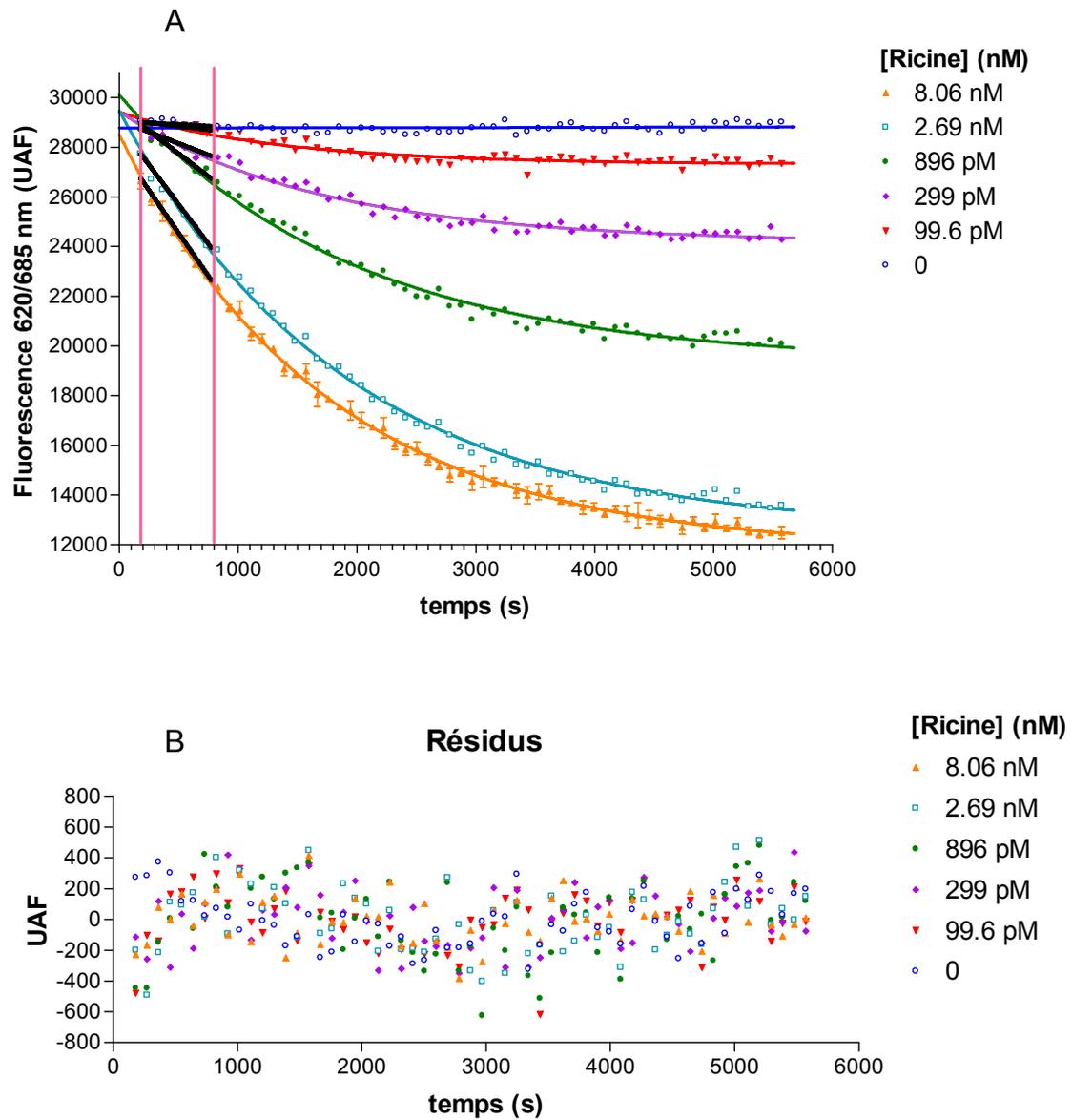


Figure 111 : Cinétique obtenue en format sandwich pour 5 concentrations en ricine.

A : Données cinétiques (fluorescence en fonction du temps) pour 5 concentrations en ricine et le témoin sans ricine.

- Régression monoexponentielle sur l'ensemble des données, de $t=180$ secondes à $t=5574$ secondes (modèle monomoléculaire, en couleur).

- Régression linéaire sur les données de $t=180$ sec à $t=780$ sec (en noir).

B : courbe des résidus (différence entre les données expérimentales et les valeurs calculées par la courbe de régression monoexponentielle).

Si la précision des signaux s'avère légèrement plus élevée que pour le dosage par *quenching* de fluorescence, les limites de détection et de quantification, calculées à partir de la moyenne du signal minimal (blanc) plus 3, ou plus 10 fois l'écart-type, sont similaires (respectivement de 0,08 nM et 0,20 nM).

III.4.4.2.3. Analyse cinétique

Afin d'optimiser la durée du dosage, nous avons souhaité étudier la cinétique de réaction dans le puits.

Les données cinétiques ont été collectées immédiatement après le dépôt durant 1h30 à RT à raison de 1 mesure/ 90 sec. La plaque est agitée entre chaque mesure au sein de l'appareil afin d'augmenter la vitesse de la réaction. Le temps entre le dépôt dans les puits et le début de la cinétique a été évalué à 3 minutes.

La Figure 110 présente la gamme d'étalonnage obtenue à différents temps de l'étude cinétique. Comme attendu, on observe une augmentation de la gamme dynamique alliée à une augmentation de la sensibilité et de la précision du dosage avec la durée de l'incubation.

Les données collectées ont été analysées de plusieurs manières.

- Régression exponentielle

La cinétique peut être modélisée par une régression de type monoexponentielle décroissante (modèle monomoléculaire). L'équation de régression est la suivante :

$$[16] \quad F(t) = F_m - (F_m - F_0) \times e^{-\left(\frac{S_0}{F_m - F_0}\right) \times t}$$

Avec F_0 : ordonnée au temps $t=0$ (en unité arbitraire de fluorescence UAF); F_m : asymptote horizontale correspondant au signal à l'équilibre (UAF) ; S_0 : pente au temps $t=0$ (s^{-1}).

La Figure 111 présente les courbes obtenues pour 5 concentrations en Ricine. La qualité de l'ajustement de la courbe aux données expérimentales est estimée par l'analyse des résidus (différence entre les données expérimentales et les valeurs calculées) qui sont dispersés de façon aléatoire entre - 500 UAF et + 500 UAF, soit moins de 2 % du signal maximal.

Nous avons souhaité savoir si la sensibilité et la précision du dosage pouvaient être améliorée en utilisant les paramètres estimés S_0 et F_m pour tracer la gamme d'étalonnage de la courbe à la place du signal de fluorescence.

Pour la mesure en point final après 1h30 d'incubation (graphe A de la Figure 112), on obtient un EC_{50} de 0,88 nM et une gamme linéaire entre 0,34 et 2,3 nM. En traçant S_0 en fonction de la concentration (graphe B de la Figure 112), on obtient une courbe sigmoïdale avec une gamme linéaire de dosage comprise entre 0,4 nM et 5,9 nM ($EC_{50}=1,45$ nM). Lorsque F_m est en ordonnée, on obtient de la même façon une courbe sigmoïdale (gamme linéaire : 0,7 nM – 4,3 nM, $EC_{50}=1,7$ nM). La sensibilité du dosage est donc légèrement moins bonne que celle obtenue avec l'analyse en point final.

- *Régression linéaire*

La cinétique durant les 10 premières minutes (ici de $t=3$ min à $t=13$ min) peut être modélisée par une droite, de pente p ($UAF.s^{-1}$). En traçant p en fonction de la concentration, on obtient une courbe sigmoïdale avec une gamme linéaire de dosage comprise entre 0,35 nM et 2,7 nM, et un EC_{50} de 0,82 nM (graphe C de la Figure 112).

On obtient donc avec cette analyse cinétique durant les 10 premières minutes de réaction une sensibilité équivalente au dosage en point final après 1h30 de réaction.

Il faut noter que le temps entre le dépôt et le début de la cinétique a été estimé constant pour tous les puits (180 secondes), alors que le dépôt a été réalisé manuellement et engendre donc un certain délai entre chaque puits. Par ailleurs, on observe une variation de la valeur de fluorescence initiale entre chaque puits. Cela est probablement dû à une légère variation dans la quantité de solution déposée dans les puits. Ces différents points pourraient être améliorés en utilisant un automate pour le dépôt des solutions. Certains appareils de lecture de fluorescence en plaque spécialement conçus pour les mesures de cinétique en sont équipés.

III.4.4.2.4. Evaluation de la reconnaissance des chaînes A et B de la Ricine par le dosage

La Figure 113 présente les résultats des courbes d'étalonnages obtenues avec la chaîne A, la chaîne B et la ricine entière.

On observe une reconnaissance légère de la chaîne B de la Ricine tandis qu'il n'y a aucune reconnaissance de la chaîne A aux concentrations testées. Ce résultat découle des propriétés de la chaîne B de la Ricine qui est une lectine. Cette chaîne peut donc se lier aux sucres présents sur l'anticorps de la phase solide et être ensuite reconnue et révélée par l'anticorps traceur RCB 2-A647.

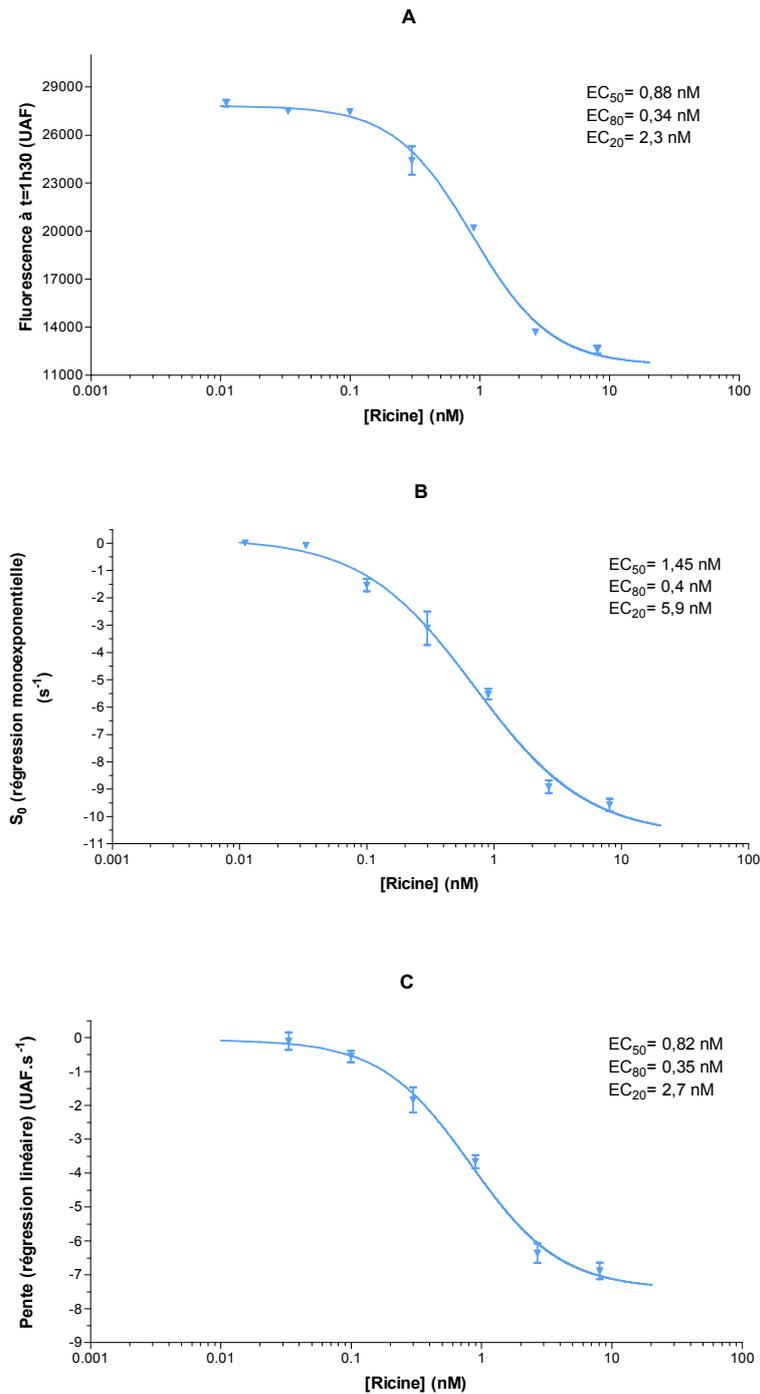


Figure 112 : Courbes d'étalonnage de la Ricine (analyse en point final à t=1h30, analyse sur les données acquises en cinétiques durant 1h30, et analyse sur les données acquises en cinétiques durant 12 minutes)

A : Fluorescence à t=1h30 en fonction de la concentration en ricine

B : S₀ (paramètre estimé par la régression exponentielle sur les données de t=180 secondes à t=5574 secondes) en fonction de la concentration en ricine

C : Pente (paramètre estimé par la régression linéaire de t=180 secondes à t=780 secondes) en fonction de la concentration en ricine

Pour les 3 graphes sont indiquées les concentrations d'EC₅₀, EC₈₀ et EC₂₀ en nM.

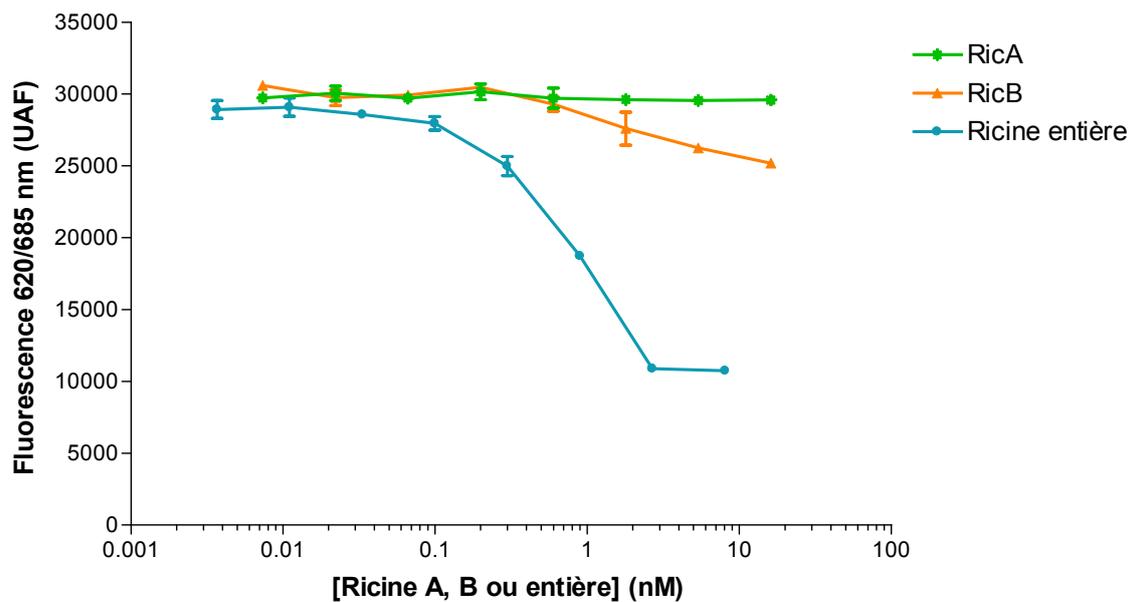


Figure 113 : Courbe d'étalonnage pour la Ricine entière et les chaînes A et B de la ricine.

Plaque noire revêtue d'anticorps RCA 2. Incubation simultanée de l'anticorps RCB 2-A647 (333 pM) et du standard (RicA, RicB ou Ricine entière) à différentes concentrations durant 18 h à 4°C.

Mesure de la fluorescence à $\lambda_{exc}=620\text{nm}$, $\lambda_{em}=685\text{ nm}$.

III.4.5. Mise au point d'un dosage simultané de deux molécules en format immunométrique (modèle BLg sous forme native et Rcm-BLg)

Nous avons souhaité évaluer la faisabilité d'un dosage simultané de deux analytes avec cette méthode de dosage. Notre choix s'est porté sur le modèle de la BLg car nous disposons d'anticorps complémentaires reconnaissant la BLg sous forme native d'une part, et la forme réduite et carbamidométhylée ou Rcm-BLg (correspondant à une forme dénaturée) d'autre part.

Nous avons donc, de la même façon que pour la Ricine, mis au point séparément le dosage de la BLg sous forme native et sous forme dénaturée, en employant deux marqueurs différents, la TMR et l'A647.

III.4.5.1. Dosages séparés

III.4.5.1.1. Modèle BLg

Nous avons employé le couple d'anticorps AcM 88 (anticorps de capture) / AcM 117 (anticorps traceur) marqué avec l'Alexa 647.

Les résultats obtenus avec différentes concentrations en traceur AcM117-A647 (0,1 ; 0,3 ; 1 ; 5 et 15 µg/mL) montrent que plus la concentration en traceur est élevée, plus le signal spécifique est élevé (augmentation de l'intervalle entre Fmin et Fmax). Cependant, la limite de détection la plus faible est obtenue pour la concentration en traceur la plus faible (0,1 µg / mL), correspondant à la concentration pour laquelle le pourcentage de *quenching* maximal ($Q_{PS}(\max) = (F_{\max} - F_{\min}) / F_{\max} \times 100$) est le plus grand. Lorsque la concentration en traceur augmente, le pourcentage d'atténuation diminue et la limite de détection augmente.

A l'inverse, notons que pour les dosages immunométriques classiques, les limites de détection les plus basses sont obtenues en excès de traceur, aussi bien pour les dosages EIA (traceur AChE et révélation colorimétrique avec lavage) que pour les dosages immunofluorescents avec lecture sur phase solide après lavage.

Cette différence s'explique par le format de notre dosage. En effet, la quantité de l'anticorps traceur pouvant se lier à la phase solide et donc participer à la baisse du signal est conditionnée par la capacité de liaison de l'anticorps immobilisé sur la paroi des puits. L'utilisation d'une quantité d'anticorps traceur supérieure à cette capacité n'augmente en rien la sensibilité du dosage mais à l'inverse diminue le pourcentage d'anticorps immobilisé et donc le pourcentage de la baisse du signal, ce qui limite la sensibilité du dosage.

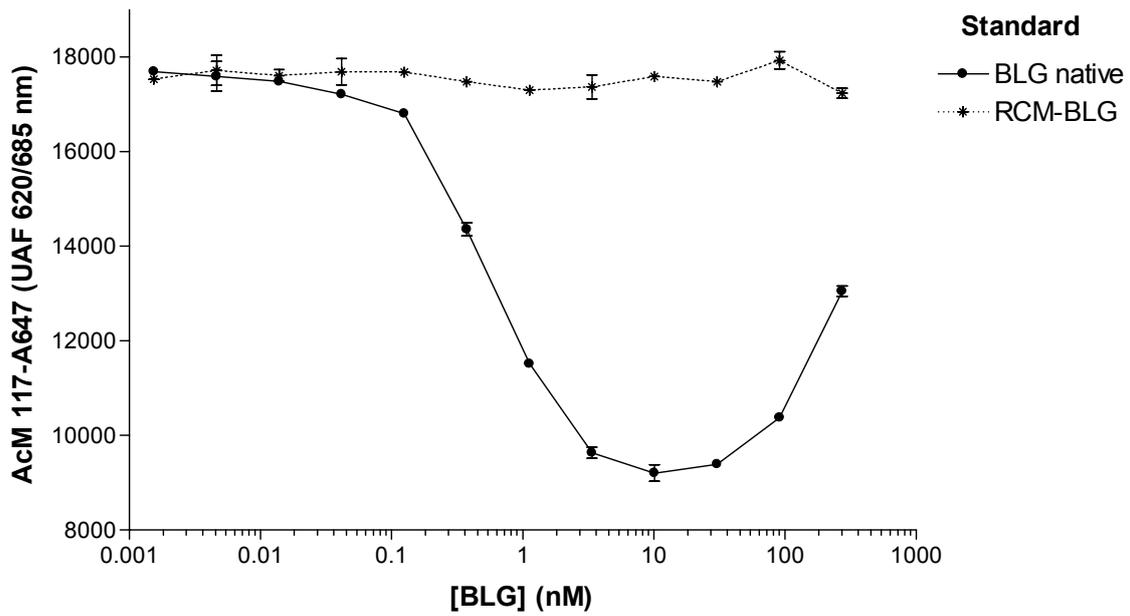


Figure 114 : Courbe d'étalonnage de la BLg native en format immunométrique

Incubation de 50 μ L de standard (BLg ou Rcm-BLg) et 50 μ L d'anticorps AcM117-A647 sur plaque revêtue d'anticorps AcM 88 (18 h, 4°C). Lecture de fluorescence à 620 / 685 nm.

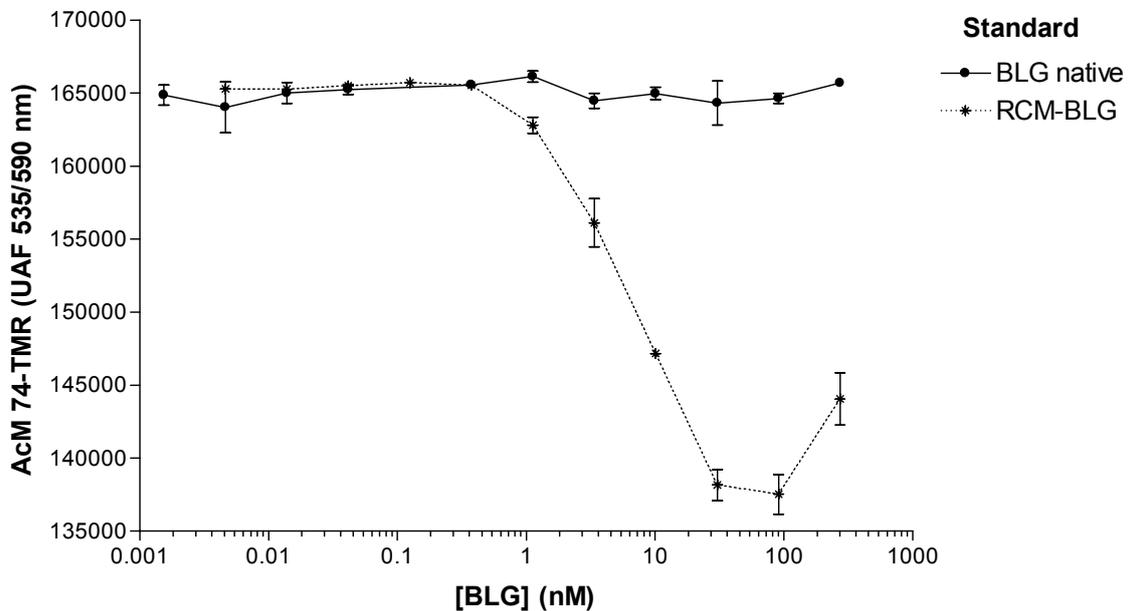


Figure 115 : Courbe d'étalonnage de la Rcm-BLg en format immunométrique

Incubation de 50 μ L de standard (BLg ou Rcm-BLg) et 50 μ L d'anticorps AcM74-TMR sur plaque revêtue d'anticorps AcM 92 (18 h, 4°C). Lecture de fluorescence à 535 / 590 nm.

Pour effectuer le dosage de la BLg, l'anticorps AcM117-A647 est utilisé à 100 ng/mL, concentration permettant d'engendrer la plus forte diminution du signal par rapport au signal initial. En suivant le protocole décrit dans le matériel et méthodes, on obtient une courbe (Figure 114) comportant deux parties. La première partie, de 50 pg/mL à 300 ng/mL, correspond aux concentrations pour lesquelles le signal est inversement proportionnel à la quantité de BLg présente dans les puits. La deuxième partie (concentrations supérieures à 300 ng/mL) correspond aux concentrations pour lesquelles le signal devient proportionnel à la quantité de BLg présente dans le puits. Cette augmentation du signal est due à une quantité de BLg dans les puits supérieure à la capacité de capture de l'anticorps immobilisé sur la paroi des puits. En effet, si la quantité de BLg est supérieure à la capacité de capture, l'ensemble des sites de liaison de la phase solide est occupé mais il reste de la BLg libre dans le milieu qui va se lier à l'anticorps traceur. Ainsi, les anticorps traceurs dont les sites sont occupés ne pourront plus se lier à la phase solide, et donc induire une diminution de la fluorescence. Ce phénomène augmente avec la quantité de BLg persistant dans le milieu et donc avec la quantité totale de BLg déposée.

La détermination du point d'inflexion de la courbe est donc indispensable pour obtenir un dosage correct de la BLg. D'autre part, il est nécessaire d'effectuer le dosage de chaque échantillon à 2 dilutions différentes au minimum pour déterminer dans quelle partie de la courbe on se situe. On obtient une limite de détection de 1 ng/mL et une limite de quantification de 4,5 ng/mL dans ces conditions expérimentales.

Avec le dosage EIA de référence, on obtient dans les mêmes conditions expérimentales des limites de détection et de quantification respectivement de 3 pg/mL et 30 pg/mL, soit 333 et 150 fois plus faible que celles obtenues avec le SPI-FIA. Cet écart important peut s'expliquer par le fait que la méthode n'emploie pas d'enzyme capable d'amplifier le signal. Par ailleurs, il a été nécessaire, vu le format du dosage, d'utiliser des concentrations en anticorps faibles afin de maintenir une forte proportion d'anticorps fixés par rapport aux anticorps libres en solution, tandis que le dosage EIA utilise les anticorps en large excès. Avec une mesure de fluorescence sur la phase solide après lavage (FIA), on observe en effet une diminution des limites de détection et de quantification avec l'augmentation de la concentration en anticorps qui restent néanmoins plus élevées que celles obtenues avec le SPI-FIA. Avec une mesure de la fluorescence après lavage, nous avons obtenu (dans les mêmes conditions expérimentales que pour le SPI-FIA) des limites de détection et de quantification de 18 et 65 ng/mL (avec l'anticorps employé à 5 µg/mL). Ces résultats illustrent l'intérêt de la mesure simultanée des

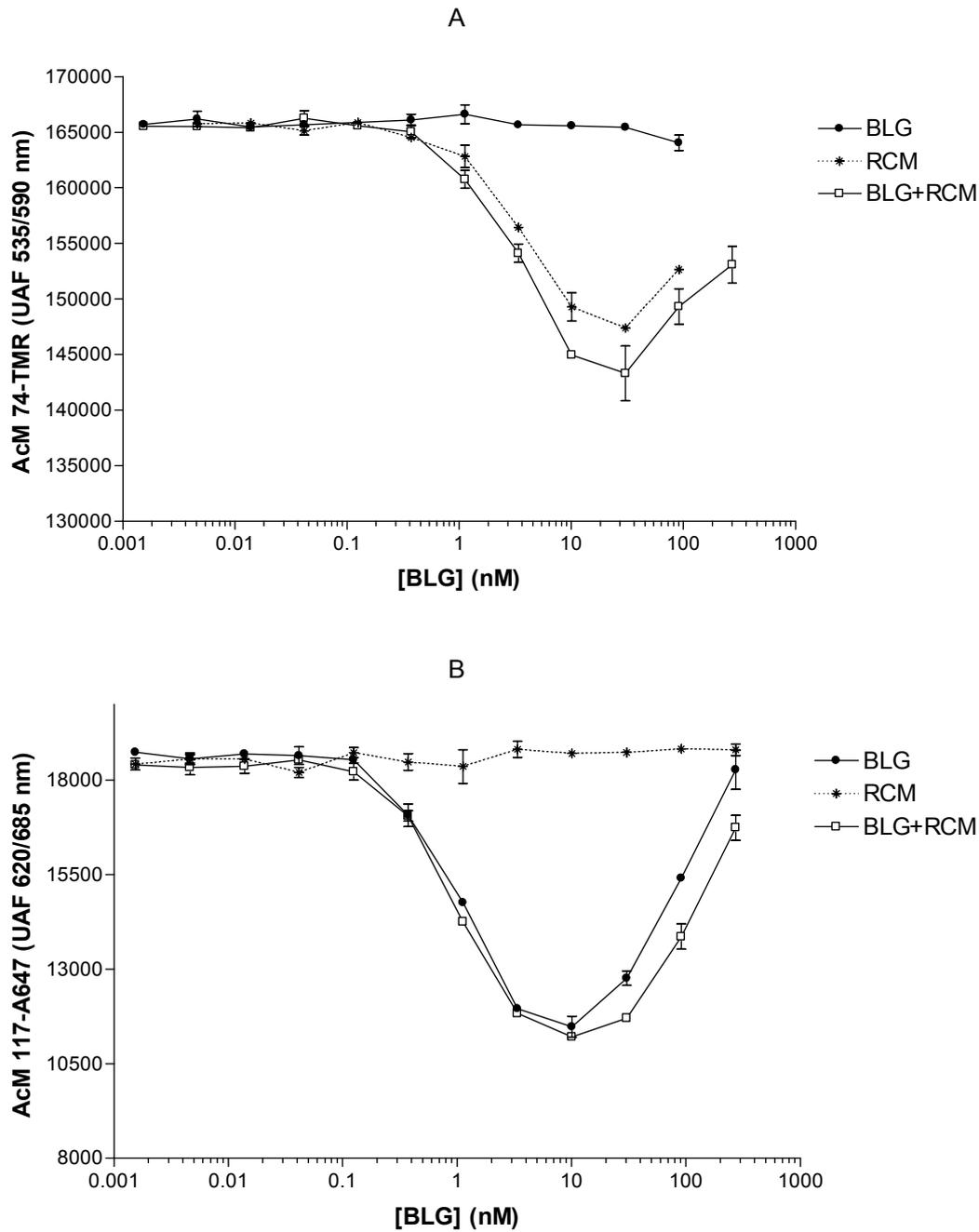


Figure 116 : Courbes d'étalonnage de la Rcm-BLg (A) et de la BLg (B) en format immunométrique (dosage simultané)

Incubation de 50 μ L de standard (BLg, Rcm-BLg ou d'un mélange équimolaire de BLg et Rcm-BLg) et 50 μ L d'un mélange d'anticorps AcM 117-A647 et AcM74-TMR sur plaque revêtue d'anticorps AcM 88 et 92 (18 h, 4°C).³³

Lecture de fluorescence à 620 / 685 nm et 535 / 590 nm.

³³ La concentration en BLG indiquée en abscisse correspond à la concentration de la forme Rcm (graphe A) ou native (graphe B), l'autre forme étant présente à la même concentration. La concentration en BLG totale est donc en réalité le double de celle indiquée pour le mélange BLG+RCM, mais pour des raisons de lisibilité nous avons choisi cette présentation sur le même graphe.

fractions liquide et solide du SPI-FIA par rapport à une mesure sur phase solide utilisée traditionnellement dans le cadre des dosages immunofluorescents en plaque.

Par ailleurs, il est à noter que l'analyse des cinétiques de réaction en puits nous a permis d'optimiser la durée du dosage. Lorsque le standard a été préincubé (préincubation de 30 min), on observe une cinétique de diminution de signal extrêmement rapide, permettant une analyse en moins de quinze minutes après ajout de l'anticorps, soit une durée totale d'incubation (standard et anticorps) de 45 min. En effet, les cinétiques sont nettement plus rapides lorsque le dosage est réalisé séquentiellement que lorsque les réactifs (standard et anticorps) sont incubés simultanément. Dans le cas de la réaction en simultané, la réaction anticorps-antigène a lieu en solution et sur phase solide (plus rapide en solution que sur phase solide). En revanche, lorsque le standard a été préincubé, la cinétique représente seulement la réaction de fixation de l'anticorps sur l'analyte sur la phase solide. La réaction est plus rapide et les coefficients de variation plus faibles. La cinétique du signal est de type exponentielle décroissante. Sur un temps court ($t=1$ à $t=11$ min), la cinétique est linéaire. Si l'on reporte la pente de ces droites en fonction de la concentration, on obtient une courbe de type sigmoïdale.

III.4.5.1.2. Modèle Rcm-BLg

Nous avons utilisé un couple d'anticorps reconnaissant la forme Rcm-BLg (AcM 92 et AcM74), l'anticorps AcM 92 étant utilisé sur phase solide et l'anticorps AcM74-TMR comme traceur employé à 300 ng/mL.

Les résultats sont présentés sur la Figure 115 (p.281). La courbe de Rcm-BLg présente la forme caractéristique en cloche du dosage immunométrique. A l'inverse des résultats obtenus avec le couple (AcM 88, AcM117-A647), la BLg n'est pas reconnue par les anticorps, même avec la concentration la plus élevée. La limite de détection de la Rcm-BLg est d'environ 0,5 nM et de quantification 0,8 nM.

III.4.5.2. Dosage simultané de la BLg native et de la Rcm-BLg

Pour réaliser ce dosage, nous avons immobilisé simultanément sur la paroi du puits les deux anticorps de capture AcM 88 et AcM 92. La solution d'immobilisation est donc un mélange des deux anticorps, chaque anticorps étant concentré à 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (soit une concentration totale en anticorps de 5 $\mu\text{g/mL}$).

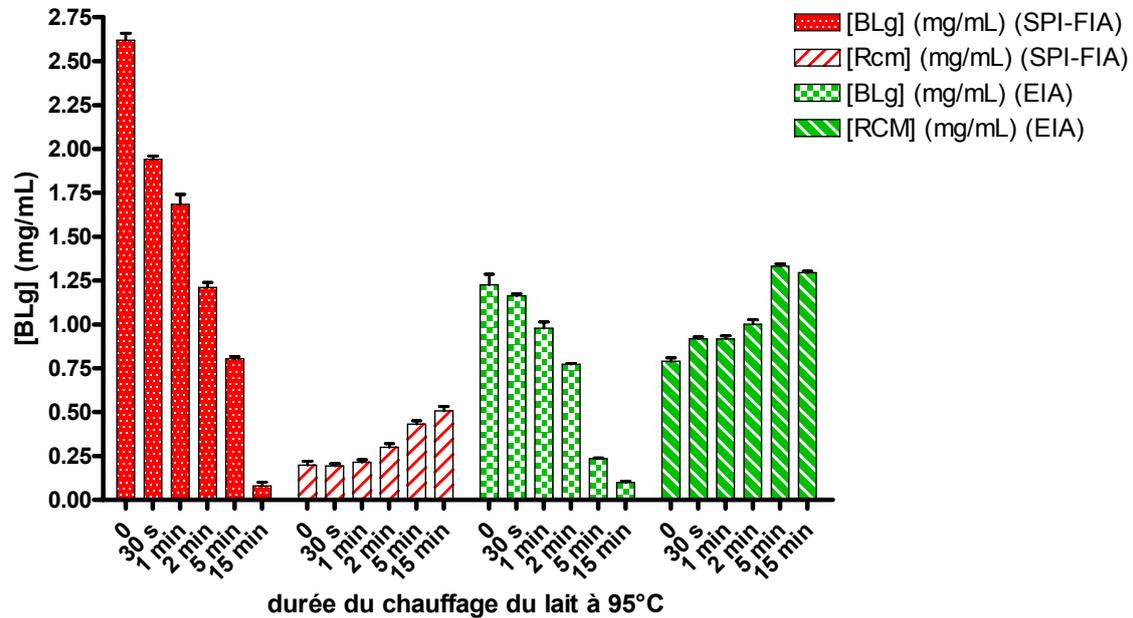


Figure 117 : Suivi de la dénaturation thermique du lait par le dosage simultané de la BLg sous forme native et sous forme Rcm-BLg

Echantillons de lait frais entier pasteurisé (Tourey, SA) chauffés à 95 °C durant 0, 30 s, 1 min, 2 min, 5 min, 15 min et immédiatement refroidis par dilution au 1/10^{ème} dans du tampon PVP à 4 °C.

Dosages EIA : dosage BLg native avec les anticorps AcM88 (capture) et AcM 117-AChE ; dosage Rcm-BLg avec les anticorps 92 (capture) et 74-AChE.

Dosage SPI-FIA : dosage simultané avec les anticorps 88 et 92 en capture et les anticorps 117-A647 et 74-TMR comme traceurs.

L'utilisation des deux fluorophores Alexa647 et TMR pour marquer les anticorps AcM 117 et AcM 74 nous permet de mesurer simultanément le signal spécifique de chaque traceur à des longueurs d'onde différentes. La solution de traceur est donc un mélange des deux anticorps traceur (l'anticorps AcM117 étant concentré à 100 ng/mL et AcM74 à 300 ng/mL).

Nous dosons une gamme de BLg native seule, une gamme de Rcm-BLg seule et une gamme comportant un mélange équimolaire de BLg native et de Rcm-BLg. Les courbes d'étalonnage obtenues sont représentées sur la Figure 116-A pour la fluorescence de la TMR et sur la Figure 116-B pour la mesure de la fluorescence de l'Alexa 647 (p.283). Elles sont assez proches de celles obtenues avec les dosages séparés des formes Rcm-BLg et BLg native. Toutefois, on remarque que la gamme dynamique ($F_{max}-F_{min}$) est légèrement plus faible pour les deux courbes d'étalonnage. Cela provient peut-être du fait que la densité en anticorps de capture est plus faible aussi bien pour l'anticorps 88 que pour l'anticorps 92 qui se « partagent » la place dans le puits. La densité en anticorps étant plus faible sur la phase solide, la diminution de signal potentiellement générée est plus faible avec une même concentration en anticorps traceur. Par ailleurs, on observe que, dans les deux cas, la présence de la seconde forme de la BLg (BLg native pour le dosage de la Rcm-BLg, ou Rcm-BLg pour le dosage de la BLg native) entraîne une légère surestimation de la concentration en Rcm-BLg ou de la BLg native.

Ce dosage simultané de la BLg native et dénaturée a été utilisé pour suivre la dénaturation thermique du lait (Figure 117, p.285). Nous avons utilisé des échantillons de lait frais chauffés à 95 °C durant 0, 30 s, 1 min, 2 min, 5 min, 15 min et immédiatement refroidis par dilution au 1/10^{ème} dans du tampon PVP à 4°C. Les échantillons ont été dosés (concentration en BLg native et Rcm-BLg) avec le dosage immunométrique simultané ainsi qu'avec la méthode de référence (EIA). On observe dans les deux cas que le chauffage du lait à 95°C conduit à une diminution progressive de la concentration en BLg native et une augmentation parallèle de la concentration en Rcm-BLg. En revanche, on observe une forte distorsion en terme de concentration, les concentrations de BLg native estimées par le SPI-FIA étant supérieures à celles estimées par EIA, tandis que les concentrations de Rcm-BLg sont sous-estimées. Cette différence peut avoir plusieurs origines. Tout d'abord, il est possible que le marquage des anticorps 74 et 117 avec les fluorophores TMR et A647 ait modifié leur capacité de reconnaissance immunologique et leur spécificité respective envers les formes dénaturées et natives de la BLg. De plus, l'incubation simultanée des deux formes de la BLg dans le même puits est également susceptible d'introduire un biais en raison des réactions

croisées entre les formes natives et dénaturées avec les anticorps utilisés, puisque comme nous l'avons observé précédemment, la présence de la seconde forme de la BLg entraîne une légère surestimation de la concentration en BLg ou Rcm-BLg lors du dosage simultané. Cela pourrait expliquer la surestimation de la concentration en BLg native, mais n'explique pas la sous-estimation de la concentration en Rcm-BLg par rapport au dosage EIA, qui trouve peut-être son origine dans la modification de la spécificité de l'anticorps 74 suite au marquage à la TMR.

III.4.6. Discussion-conclusion

Durant les études de mise au point du SPIT-FRI, nous avons observé une diminution de fluorescence lors de la liaison des molécules sur la phase solide dans les plaques de microtitration qui a abouti, en marge du projet principal, au développement d'une méthode de dosage originale (SPI-FIA pour *Solid-Phase Inhibited Fluorescence ImmunoAssay*). Ce phénomène représentait un obstacle pour la détection de fluorescence sur phase solide en plaque de microtitration, puisqu'il entraîne une diminution du rapport signal/bruit. Plusieurs articles ont relaté précédemment la difficulté d'obtention de signaux fluorescents élevés sur la phase solide. Certains auteurs ont mis en évidence une diminution de fluorescence sur phase solide en plaque de microtitration (Singh *et al.* 1999; Hemmila 1985; Sinosich & Chard 1979), dans le cadre de la mise au point de dosages fluoroimmunologiques avec mesure de la fluorescence fixée (FIA). Pour pallier ce problème, certains auteurs ont prélevé la fraction liquide des puits puis réalisé la lecture dans une autre plaque, tandis que d'autres ont réalisé la mesure en phase liquide après dissolution des molécules fixées. Une telle méthode, qui à notre connaissance n'avait pas été auparavant explorée, méritait pourtant d'être évaluée en raison des avantages potentiels que pourrait conférer une méthode de dosage hétérogène en format standard de microplaque ne nécessitant aucune étape de séparation entre les phases solide et liquide.

Pour évaluer la performance de cette nouvelle méthode de dosage, nous avons utilisé les « molécules modèles » dont nous disposons dans le cadre du SPIT-FRI. Les dosages ont été effectués comme des dosages immunofluorescents hétérogènes classiques (FIA), mais la mesure de fluorescence a été réalisée directement après la réaction, sans étape de séparation. La fluorescence mesurée correspond donc à la somme de la fluorescence de la solution et de la fluorescence « surfacique ». Nous avons démontré que la diminution de la fluorescence totale (correspondant donc à la fluorescence des phases solide et liquide) est proportionnelle à

la proportion de fluorophores fixés / en solution. La diminution de fluorescence varie entre -60% à -90% selon le fluorophore, pour les six fluorophores testés (Fluorescéine, Tétraméthylrhodamine, Cy5.0, et les Alexas A488, A532 et A647).

L'application potentielle du dosage a été illustrée sur plusieurs molécules, de taille et nature différentes. De plus, nous avons démontré que la méthode peut être employée pour la mise au point de dosages en format immunométrique et en format compétitif (format compétitif « classique », avec l'anticorps immobilisé, ou format « ELISA », avec l'analogue de l'antigène immobilisé). Par ailleurs, nous avons prouvé la fonctionnalité de la méthode avec des anticorps monoclonaux et polyclonaux (exemple des anticorps polyclonaux de lapin GB1 dirigés contre la BLg). De plus, nous avons développé un dosage simultané de deux molécules (BLg native et carbamidométhylée) en utilisant deux fluorophores (Tétraméthylrhodamine et Alexa 647). Pour illustrer ses potentialités, ce dosage a été utilisé pour le suivi de la dénaturation du lait au cours du chauffage. Les résultats du dosage simultané des deux formes de la BLg présentent une excellente corrélation avec les résultats obtenus par le dosage séparé des deux molécules.

Un dosage de la Ricine en format immunométrique et un dosage de l'Aflatoxine B1 en format compétitif ont également pu être développés. L'utilisation du SPI-FIA comme méthode de dosage représente un gain de temps important sans altérer la sensibilité du dosage par rapport au dosage EIA, pour le format compétitif du moins, car les sensibilités atteintes avec le format immunométrique sont toutefois plus faibles.

Ces travaux pourraient être poursuivis afin d'améliorer les qualités du procédé et de mieux comprendre les phénomènes impliqués.

Compréhension du phénomène physique intervenant dans le SPI-FIA. Si nous avons pu montrer sur plusieurs molécules et plusieurs formats que cette méthode fonctionne, nous ne sommes pas, à l'heure actuelle, en mesure d'expliquer avec certitude l'origine de la diminution de fluorescence observée au cours de l'immobilisation des molécules sur les parois des puits. Nous avons observé que la fluorescence présente un maximum d'intensité pour une hauteur de focalisation de 5 mm lorsque les molécules fluorescentes sont en solution, contre 2 mm lorsque les molécules sont immobilisées à la paroi ; cependant, la fluorescence mesurée sur phase solide est toujours très inférieure à celle mesurée en solution. Nos résultats, en accord avec ceux de la littérature (Kakabakos, 1999), montrent que le phénomène de *quenching* décrit pour les plaques en polystyrène noir ne se produit pas avec des plaques en polystyrène blanc (au contraire, la fluorescence peut augmenter, de 0 à 10%

selon le fluorophore). Plusieurs phénomènes physiques sont susceptibles d'entraîner un signal plus faible pour les molécules immobilisées sur les parois que pour les molécules libres en solution, phénomènes qui peuvent être liés à l'instrument de mesure employé, à la distribution spatiale des molécules dans les puits, ou à une modification de la fluorescence à proximité du support. Il est possible qu'une grande partie de la lumière d'excitation ne parvienne pas aux molécules fixées sur les parois des côtés des puits, notamment dans le cas des plaques noires où la diffusion de la lumière est moindre que pour les plaques blanches aux propriétés réfléchissantes. Il est aussi possible qu'il existe un phénomène de *quenching* de fluorescence par le support en polystyrène noir lié à la présence de pigments dans le polystyrène, assujetti à la distance fluorophore-pigment.

Influence de la distance fluorophore-support. Nous avons montré que lorsque 4 couches de molécules sont intercalées entre le support et le fluorophore (anticorps de capture, BLg, anticorps secondaire et anticorps de révélation CAS marqué à l'A488) le phénomène de diminution de fluorescence à la surface bien que plus faible n'est pas aboli. Il serait intéressant de déterminer la relation entre la distance séparant le fluorophore et le support et la diminution de fluorescence. Pour cela, il serait possible d'employer une molécule de taille variable sur laquelle auraient été fixés d'un côté le fluorophore et de l'autre une molécule de biotine qui permettrait la liaison sur la surface revêtue d'avidine.

Généralisation à d'autres types de fluorophores. Nous avons montré que cette méthode pouvait être employée avec six fluorophores différents (Fluorescéine, Tétraméthylrhodamine, Cy5.0, et les Alexas A488, A532 et A647), qui présentent des caractéristiques physiques différentes (longueurs d'onde d'excitation et d'émission, coefficient d'absorption molaire, et rendement de fluorescence). Si la diminution de fluorescence est liée à un phénomène de *quenching* ou d'absorption par les pigments contenus dans le support, la méthode pourrait être généralisable aux luminophores dont le spectre d'émission recouvrerait le spectre d'absorption du pigment de la phase solide.

Il pourrait être très intéressant de tester la compatibilité des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents (quantum dots) avec cette méthode afin de faciliter la détection multiplexe. En effet, les quantum dots présentent des spectres d'émission recouvrant une plage très étroite de longueurs d'onde et dont la longueur d'onde d'émission peut être ajustée à façon en fonction du diamètre du nanocristal. De plus, quelque soit la longueur d'onde d'émission il est possible d'utiliser la même longueur d'onde d'excitation. La mesure multiplexe pourrait être effectuée en mesurant le spectre de chaque puits à la longueur d'excitation des quantum dots, comme

l'a fait l'équipe du Dr Matoussi qui a mis au point un dosage simultané de quatre toxines en plaque de microtitration avec des quantum dots de taille différente (Goldman *et al.*, 2004).

Enfin, il serait très intéressant de tester l'utilisation de chélates de terre rare avec une mesure de la fluorescence en temps résolu afin de s'affranchir de la fluorescence de la matrice (Mathis, 1995). La principale limitation de la méthode réside en effet, comme pour tous les dosages sans séparation des molécules libres et liées, dans la fluorescence parasite de la matrice.

Utilisation de microbilles. Nous pourrions également tester l'utilisation de microbilles de polystyrène en suspension dans les puits afin d'accélérer le procédé et de faciliter le dosage simultané de plusieurs molécules grâce à l'utilisation de billes revêtues avec différents anticorps (ou compétiteurs) dans le même puits.

Apports de la méthode. La plupart des dosages en format hétérogène nécessite la séparation des molécules libres et liées au support (étape de lavage, précipitation, filtration, etc). Récemment, avec le développement des biocapteurs, des méthodes de dosage hétérogène sans séparation des fractions libres et liées ont été développées afin de suivre en cinétique la reconnaissance moléculaire à la surface du capteur. La méthode de référence est celle du BiAcore, basée sur le phénomène de résonance plasmonique de surface, qui est très intéressante car elle permet de suivre les cinétiques de réaction et ne nécessite aucun marquage des molécules, mais qui toutefois, requiert l'emploi d'un instrument coûteux. Un autre principe a été développé, utilisant un phénomène d'exaltation de fluorescence sur une surface métallique (Attridge *et al.*, 1991 ; Sokolov *et al.*, 1998). De la même façon, l'équipe du Professeur Lakowicz décrit une augmentation de fluorescence d'un facteur 16 pour le Texas Red déposée sur une surface en colloïde d'argent (Lukomska *et al.*, 2004). Ce phénomène a été utilisé pour la mise au point de dosages immunologiques ; on peut citer notamment les travaux de Lobmaier (Lobmaier *et al.*, 2001 ; Lochner *et al.*, 2003) employant des plaques de microtitration recouvertes de colloïde d'argent. L'équipe du Professeur Gauglitz a développé une autre méthode utilisant des plaques revêtues de colloïde d'or (Seidel *et al.*, 2004), qui est basée sur une diminution de la fluorescence des molécules fixées sur la phase solide, l'épaisseur du revêtement en or conditionnant l'efficacité du *quenching*.

Le procédé du SPI-FIA représente un autre principe de dosage hétérogène sans étape de séparation. Il présente l'avantage supplémentaire de ne nécessiter aucune chimie de coating, une simple plaque de microtitration commerciale pouvant être employée sans traitement particulier. De plus, l'efficacité du *quenching* est particulièrement élevée puisque nous avons

mesuré un signal jusqu'à 10 fois plus faible (avec l'Alexa488). Les sensibilités obtenues avec ce dosage sont du même ordre de grandeur que les dosages immunofluorescents classiques, alors que le dosage est plus rapide (moins de 15 min) et réalisé sans étape, ce qui permet d'envisager un emploi en routine de ce procédé.

En conclusion, le procédé du SPI-FIA présente de nombreux avantages. Tout d'abord, n'impliquant aucune étape de séparation, le SPI-FIA présente des avantages certains pour l'automatisation et l'emploi en routine. De plus, le signal peut être mesuré en temps réel, permettant d'optimiser aisément les durées d'incubation. Cette méthode est compatible avec de nombreux fluorophores et plusieurs formats de dosage immunologique (compétitifs ou immunométriques). Par ailleurs, la méthode est potentiellement applicable à des molécules de nature diverse (protéine, acide nucléique, sucre, acides gras....), et le procédé peut être réalisé dans des plaques de microtitration commerciales en polystyrène noir et ne requiert pas de système de mesure de fluorescence spécifique. Enfin, le SPI-FIA peut être utilisé pour le dosage de plusieurs composés simultanément. Cette méthode pourrait être employée pour la mise au point de méthodes de screening haut débit en laboratoire.

IV. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Le développement d'un appareillage basé sur un biocapteur et intégrant l'ensemble des opérations depuis le traitement des échantillons jusqu'au rendu des résultats fait l'objet de réflexions et de travaux expérimentaux de nombreuses équipes depuis plus d'une décennie. Sa mise en œuvre requiert l'association de compétences et techniques scientifiques très diverses. Les domaines d'application de ce type d'appareil sont bien entendu très diversifiés mais sous-entendent en général une mesure multiplexée afin de détecter divers composés ou agents dans le même échantillon. Pour des raisons évidentes de spécificité et de sensibilité, de nombreux biocapteurs reposent sur l'emploi d'anticorps. La détection, comme nous l'avons développé dans l'introduction, peut faire appel à différentes méthodes, la fluorescence étant souvent la solution retenue. La mesure se fait en général en point final mais le suivi en continu constitue un attrait évident.

Dans les années 1990, l'avènement du biocapteur BiAcore, appareil basé sur le phénomène de Résonance Plasmonique de Surface (SPR) permettant de déterminer en flux les constantes d'affinité des anticorps (Karlsson *et al.*, 1991), a ouvert le champ des Immunocapteurs en Flux Continu (IFC).

Les deux principales applications actuelles de ces systèmes intégrés sont l'analyse environnementale ou agroalimentaire, sachant que les composés recherchés sont principalement de petits composés chimiques de type pesticides ou antibiotiques. En parallèle, la détection environnementale s'est étendue du fait de préoccupations circonstanciées au domaine de la biosécurité et donc à un ensemble de composés d'origine biologique (protéines, bactéries, virus) appelés agents de la menace. Dans ce cadre, les solutions les plus élaborées en terme d'intégration sont probablement les systèmes d'analyse AWACSS (Tschmelak *et al.*, 2005) ou APDS (Hindson *et al.*, 2005) dédiés à la mesure de polluants aqueux ou d'agents de la menace sous forme d'aérosol. On ne peut cependant ne pas citer les travaux menés par d'autres équipes dans le domaine des biopuces tels que les travaux de Knecht *et al.* (2004) proposant un système automatisé mesurant 10 antibiotiques en parallèle dans le lait, ou ceux de l'équipe de F. Ligler (Moreno-Bondi *et al.*, 2006) détectant différents agents dans le sérum humain. Si ces méthodes présentent de nombreux avantages, plusieurs limitations ont réduit leur essor, notamment en raison des difficultés rencontrées pour réutiliser la phase solide après dosage et pour détecter simultanément plusieurs molécules.

Dans ce contexte, le Service d'Immunologie et de Pharmacologie (SPI) a proposé une nouvelle méthode appelée SPIT-FRI (pour *Solid-Phase Immobilized Tripod for Fluorescent Renewable Immunoassay*) qui, sans avoir la prétention d'être la méthode « idéale », pourrait pallier ces inconvénients. Cette méthode, proposée par le Dr Hervé Volland en 2002 (Volland, H. 2002), est basée sur le phénomène de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) et l'emploi d'un réactif original (tripode), comprenant un fluorophore, un analogue de la molécule à doser, et une molécule permettant son immobilisation sur un support (pour une description du principe, se référer au schéma p.57). Elle a fait l'objet de ces travaux de thèse qui ont permis :

1. de valider la méthode proposée en plaque de microtitration sur une molécule modèle, la Substance P;
2. de fournir des éléments de réponse concernant les possibilités d'adaptation à d'autres molécules, notamment à des toxines qui pourraient être employées comme agents de la menace;
3. d'évaluer la faisabilité d'un dosage en flux continu.

De plus, ces travaux ont permis de mettre au point une autre méthode de dosage rapide en microplaque, basée sur la diminution de fluorescence sur phase solide (SPI-FIA, pour *Solid-Phase Inhibited Fluorescence ImmunoAssay*), dont l'intérêt a été discuté à fin de la partie de Résultats et discussion correspondante.

Malgré des problèmes de sensibilité de la mesure de la fluorescence sur la phase solide en plaque de microtitration, les expériences réalisées durant cette thèse ont démontré la faisabilité de ce procédé de dosage pour deux haptènes : la substance P, peptide de 11 acides aminés (1349 Da), et l'aflatoxine B₁, petite molécule chimique de 312 Da ; et deux protéines : la β -lactoglobuline (18,3 kDa) et la ricine (62 kDa). La limite de détection se situe, selon les molécules et les conditions expérimentales, entre 1 et 10 nM, et l'EC₅₀ (concentration correspondant à une inhibition de 50 % du *quenching*) entre 30 nM et 500 nM.

Jusqu'à 16 déplacements successifs ont pu être réalisés sur une même surface en plaque de microtitration avec une bonne reproductibilité (CV inter-essais < 10 %). Nous avons également mis en évidence un effet cumulatif après plusieurs incubations successives dans le même puits, permettant de détecter de plus faibles concentrations.

Nous avons montré que la diminution de la densité en tripode, l'utilisation d'un anticorps moins affiné envers le tripode, l'augmentation de la température, et l'augmentation de la durée de l'incubation de l'analyte entraînent une augmentation de l'efficacité du déplacement (diminution de l'EC50), mais augmentent également la dissociation spontanée du complexe anticorps-tripode. Par ailleurs, la diminution de la densité en tripode ainsi que l'utilisation d'un anticorps moins affiné s'accompagnent d'une diminution du *quenching*, entraînant une diminution du signal spécifique.

Les expériences effectuées aussi bien en capillaire que sur support-plan, ont permis de vérifier la fonctionnalité du principe en flux continu à faible débit (2 $\mu\text{L}/\text{min}$ à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$). La possibilité de la remployer la surface a pu être démontrée en capillaire (4 cycles dosage-régénération successifs). Enfin, nous avons effectué une détection simultanée de Substance P et de BLg en flux, illustrant la faisabilité d'une détection multiplexe. Cependant, nous nous sommes heurtés à plusieurs difficultés de réalisation des expériences en flux au niveau expérimental et de l'analyse des résultats. La complexité des signaux obtenus a rendu l'interprétation des résultats difficile, en raison notamment d'un phénomène de photoblanchiment très important dont l'amplitude est fonction de la présence de l'anticorps sur le tripode. Ce résultat peut être attribué au fait que le FRET « protège » le fluorophore du photoblanchiment, puisque lorsque le donneur est impliqué dans un transfert d'énergie, le temps de vie à l'état excité diminue, ce qui a pour conséquence de diminuer la probabilité d'oxydation de la molécule qui a lieu à partir de l'état excité (Song *et al.*, 1995).

Notre travail a permis d'appréhender un certain nombre de paramètres influençant les performances du SPIT-FRI, et d'évaluer l'apport de ce procédé par rapport aux méthodes décrites précédemment, notamment dans le cadre de l'élaboration d'un capteur en flux des agents de la menace.

Le procédé reposant sur le phénomène de FRET, la sensibilité du dosage dépend en premier lieu de l'efficacité du transfert d'énergie, mesurée par le pourcentage de *quenching* ou *quenching*, qui est lui-même fonction de plusieurs paramètres. Nos résultats montrent que le choix du couple [Donneur (D), Accepteur (A)] doit être fait au cas par cas, car l'efficacité du FRET ne dépend pas seulement des caractéristiques intrinsèques du couple de fluorophores mais aussi d'autres paramètres qui varient selon chaque modèle, comme, notamment, la distance (D, A), le ratio D/A et la stabilité du complexe tripode-anticorps.

Tout d'abord, le *quenching* varie en fonction du couple de fluorophores utilisés. Une vingtaine de couples (D, A) ont été testés sur le modèle de la Substance P. Douze couples

(Donneur, Accepteur) ont pu être utilisés pour le modèle de la Substance P avec une excellente efficacité de FRET (présentant de 55 à 90 % de *quenching*). Les couples fournissant le *quenching* le plus élevé (de 80 à 90 %) emploient comme accepteurs les fluorophores Alexa 647 et Alexa 680, qui possèdent les coefficients d'extinction molaire les plus élevés parmi les fluorophores testés.

Pour un même couple (D, A), nous avons montré que de nombreux paramètres sont susceptibles de jouer sur l'efficacité du *quenching*, comme la concentration en anticorps, les ratios de marquage de l'anticorps et du tripode en fluorophores, l'affinité de l'anticorps pour le tripode, la densité en tripode, la valence et la taille de l'anticorps, ou la molécule utilisée pour le tripode (taille, degré de conformation).

Par ailleurs, nous avons obtenu, avec les mêmes fluorophores, des résultats très différents pour la SP et pour la BLg. Dans le cas de la BLg, nous avons mesuré un *quenching* plus faible que pour la SP en employant les mêmes fluorophores (ex : 53% contre 70% avec le couple Fluorescéine, TMR ; 40% contre 85% avec le couple A532, A647). Cette différence peut être reliée à une moins bonne stabilité du complexe anticorps-tripode, et à une distance (D, A) plus élevée. Si dans le cas du tripode SP, la présence de fluorophore à proximité de l'épitope ne modifie pas la reconnaissance par l'anticorps, nous avons montré que le marquage de la BLg avec des fluorophores était susceptible d'altérer fortement leur immunoréactivité, diminuant la stabilité du complexe tripode-anticorps, et par voie de conséquence directe, le pourcentage de *quenching*. Les rapports et conditions de couplage de la BLg ont été optimisés pour obtenir environ 1 mole de biotine et 1 mole de fluorophore par mole de tripode afin d'avoir un signal suffisant sans engendrer une perte importante d'immunoréactivité.

Pour les fortes densités surfaciques de tripode, nous avons mis en évidence un phénomène d'*autoquenching* du donneur entraînant une diminution du signal fluorescent. De plus, nos résultats suggèrent que pour les fortes densités en tripode, un même anticorps peut inhiber la fluorescence de plusieurs molécules de tripode à proximité du tripode avec lequel il est complexé.

Nous avons observé que les marquages fluorescents entraînaient des modifications des propriétés réactionnelles des molécules se traduisant par une perte d'affinité des anticorps, ou une diminution des capacités de liaison des tripodes à l'anticorps. Cette perte de reconnaissance est le plus souvent légère, les molécules demeurant fonctionnelles. Le degré de modification de la reconnaissance varie selon plusieurs paramètres. Plus le nombre de fluorophores incorporés par molécule (ratio d'incorporation) est élevé, plus les propriétés de

reconnaissance de la molécule sont affectées. De plus, le marquage pouvant entraîner une forte modification de la conformation de la molécule, les capacités de liaison sont d'autant plus susceptibles d'être modifiées que la conformation est impliquée dans la formation du complexe immunologique. Toutefois, nous n'avons pas pu déterminer de règle générale. Outre l'influence du ratio d'incorporation et le degré de conformation de la molécule, les conséquences du marquage fluorescent sur les capacités de reconnaissance immunologique varient selon chaque molécule et chaque fluorophore, et l'emplacement des sites de fixation des fluorophores sur la molécule (proximité du paratope ou de l'épitope). Ces résultats rejoignent les nombreuses observations rapportées dans la littérature, démontrant, pour des marquages différents, une modification des propriétés réactionnelles des molécules, de plus ou moins forte amplitude (Kierszenbaum *et al.* 1969, McCormack *et al.* 1996, Johne *et al.* 1995, Fuchs *et al.* 1995).

Par ailleurs, nous avons mis en évidence une légère modification des spectres des fluorophores lorsque ceux-ci étaient liés à une protéine. On observe un léger décalage (quelques nm) des spectres vers le rouge, et une modification de l'allure du spectre d'absorbance attribuée à la présence de dimères de fluorophores qui se forment en fonction du ratio de marquage et du degré de conformation de la molécule, modification dont l'amplitude varie également en fonction du fluorophore. Ce phénomène entraîne une modification du recouvrement des spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur qui peut conduire à une forte modification du R_0 (et donc de l'efficacité du FRET) selon ces différents paramètres.

D'une façon générale, les marquages fluorescents des anticorps semblent conduire à des modifications plus importantes que les marquages enzymatiques avec l'AChE réalisés classiquement au laboratoire. Les marquages à l'AChE sont effectués par réaction d'une fonction maléimide sur les thiols des anticorps sous forme Fab'. La stratégie de marquage des anticorps sur les amines primaires employée pour les marquages fluorescents ne constitue sans doute pas la stratégie idéale. Le nombre et l'emplacement de ces amines primaires varient selon la séquence de chaque anticorps, et leur localisation, aussi bien sur la partie constante que la partie variable, n'exclue pas un marquage au niveau du paratope qui affecterait profondément la reconnaissance. Il faudra donc évaluer dans un proche avenir une méthode de marquage fluorescent similaire à celle développée pour l'AChE, en employant des fluorophores avec une fonction maléimide réagissant au niveau de la fonction SH située sur la région charnière des anticorps sous forme Fab'.

De la même façon, il serait très intéressant de pouvoir maîtriser l'emplacement des sites de fixation des fluorophores sur la molécule de tripode. Nous avons employé différentes stratégies de préparation des tripodes en fonction de la molécule, impliquant des fonctions réactives de type ester actif ou maléimide. Tout d'abord, pour la Substance P, nous avons utilisé un tripode peptidique constitué d'une séquence de 15 acides aminés dont les 5 derniers du côté C-terminal sont reconnus par l'anticorps, qui comporte une Lysine en position N-terminale où a été greffé le fluorophore et une Lysine biotinylée en 4^{ème} position permettant l'immobilisation du tripode sur la neutravidine. Les tripodes protéiques (BLg, Rcm-BLg et Ricine) ont été préparés par couplage simultané du fluorophore et de la biotine sur les fonctions amines libres de la protéine. Enfin, pour les petites molécules chimiques que sont l'Atrazine et l'Aflatoxine, nous avons utilisé un peptide (peptide T) de séquence Gly-Ser-Gly-Ser-Cys-Ser-Gly-Ser-Lys(biot)-CONH₂ permettant le couplage d'une molécule de fluorophore maléimide, une molécule de biotine et une molécule d'analogue. Nous avons constaté la conservation de bonnes propriétés de liaison de l'analogue Ala¹⁰SP à l'anticorps SP31 après marquage fluorescent. Il en est de même pour l'Atrazine. En revanche, nous avons observé une altération importante de l'immunoréactivité de la BLg et de la Ricine après marquage. Dans le cas des protéines, le marquage ayant été directement effectué sur les fonctions amines libres (marquage avec la biotine et avec le fluorophore), il pourrait être intéressant de tester l'emploi d'un peptide ou d'une molécule chimique possédant un fluorophore et une biotine afin de limiter ce phénomène.

Les résultats obtenus avec différents fragments d'anticorps SP31 ont montré que les anticorps monovalents (Fab, Fab' et AcMr) engendraient un *quenching* plus faible que les formes divalentes (AcM entier et F(ab')₂). Différentes hypothèses pourraient expliquer ce résultat : une diminution de la stabilité du complexe Ac-tripode et une limitation de la réassociation dans le cas des anticorps monovalents, et un plus faible ratio d'incorporation du fluorophore sur l'Ac pour les fragments de petite taille (présentant un nombre de fonctions amine libre plus faible).

Dans le cadre du SPIT-FRI, la diminution de l'affinité de l'anticorps envers le tripode provoque une diminution du *quenching*, donc du signal spécifique ce qui affecte évidemment la sensibilité du dosage. De plus, une perte d'affinité de l'anticorps pour le tripode va souvent de paire avec une perte d'affinité envers l'analyte qui peut également conduire à une diminution de la sensibilité et de la spécificité du dosage. En revanche, la seule diminution de l'immunoréactivité du tripode pour l'anticorps peut servir le dosage, favorisant le

déplacement par l'analyte (si l'affinité de l'anticorps pour le tripode est toutefois suffisante pour atteindre un *quenching* élevé).

Avantages et inconvénients du SPIT-FRI.

Les avantages de la méthode sont la facilité de régénération, la lecture sur phase solide permettant la détection simultanée de plusieurs analytes (démontrée ici pour 2 analytes), une augmentation de signal avec l'ajout de l'analyte, un effet cumulatif permettant la détection de faibles concentrations, l'adaptabilité du dosage à de nombreuses molécules de tailles et natures différentes, et à de nombreux couples (donneurs, accepteurs).

Les inconvénients sont principalement le photoblanchiment, le *quenching* limité et dépendant de la concentration en tripode. Par ailleurs, la mesure sur phase solide qui permet la détection multiplots, peut représenter une difficulté de mise en œuvre si l'instrumentation ou le support ne sont pas adaptés (*quenching* de la fluorescence par le support, stratégie de récupération de la fluorescence émise).

Il faudrait donc s'assurer que (1) le photoblanchiment ne contrebalance pas l'intérêt de la régénération de la surface par l'anticorps, de sorte que l'on puisse effectivement utiliser une même puce pour un nombre élevé de cycles, et (2) la limitation de la gamme dynamique par le *quenching* ne contrebalance pas l'effet de détection d'une augmentation de signal, afin que l'on puisse effectivement obtenir un dosage d'une bonne sensibilité.

Perspectives d'optimisation du procédé.

Optimisation du greffage du tripode. Il pourrait être intéressant de bien caractériser la densité de tripode sur le plot, notamment afin d'optimiser le pourcentage de *quenching*. En effet, nous avons observé, avec tous les modèles étudiés, une diminution du pourcentage de *quenching* avec la diminution de la densité de tripode. Cette diminution du pourcentage de *quenching* entraîne donc une diminution de la gamme dynamique qui est déjà restreinte pour les faibles concentrations en tripode. Nous pensons que cette diminution du *quenching* pour les faibles densités en tripode peut être attribuée au fait que le nombre d'accepteurs susceptibles d'interagir avec le donneur est plus faible lorsque les distances inter-tripodes sont élevées que lorsque la densité en tripode sur la phase solide est élevée.

Par ailleurs, il sera nécessaire par la suite de déterminer la taille optimale du plot. Nos résultats montrent que les cinétiques de *quenching* sont d'autant plus rapides que la zone de

mesure est proche du début de la zone fonctionnalisée. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par plusieurs équipes, montrant que les temps de réponse sont d'autant plus brefs que la zone effective du capteur est de petite taille (Holt *et al.*, 2000).

Optimisation du débit et de la microcellule. Certains auteurs montrent dans des systèmes apparentés (immunocapteur en flux) une diminution de l'efficacité du déplacement avec le débit (Wemhoff *et al.*, 1992). D'autres études plus complètes seront nécessaires pour déterminer les conditions à employer (débit, géométrie de la microcellule) afin d'obtenir la meilleure efficacité de déplacement (variation de signal/variation de concentration), le délai et l'erreur dynamiques les plus faibles (Baker & Gough, 1996).

Influence de la matrice de l'échantillon. Nous avons observé une dissociation des complexes tripode-anticorps avec le passage de solutions concentrées de protéines (BLg, BSA). Une étude de l'influence de la matrice devra être réalisée par la suite [présence de protéines, de molécules fluorescentes, de polluants divers (ex : hydrocarbures)], comme effectué par exemple pour le dosage de l'aflatoxine B1 dans différentes matrices alimentaires par Sapsford *et al.* (2006). De même, l'influence du tampon, de la température et du pH devra être étudiée.

Optimisation des techniques de couplages. Une maîtrise des emplacements et nombre des sites de couplage fluorescent sur les molécules de tripode et d'anticorps représente une piste de recherche intéressante pour optimiser l'efficacité du FRET et la préservation de la capacité de reconnaissance immunologique. Le SPI poursuit des travaux dans ce sens cherchant à développer un tripode « universel ».

Utilisation de Quantum Dots. Nous avons choisi d'utiliser comme fluorophores des Alexas qui sont très peu sensibles aux variations de pH entre 4 et 10, et plus résistants au photoblanchiment que les fluorophores « traditionnels » comme la Fluorescéine et la TMR (Panchuk-Voloshina *et al.*, 1999). Toutefois, dans nos conditions de mesure, le photoblanchiment reste très important et limite le nombre potentiel de régénérations de la phase solide.

Nous pensons que l'utilisation de nanocristaux semi-conducteurs fluorescents (ou *Quantum dots*) pourrait améliorer les caractéristiques du capteur, notamment en terme de durée de vie du support. Les *Quantum Dots* présentent un coefficient d'extinction molaire de l'ordre de 10^5 à $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit 10 à 100 fois supérieur à celui des molécules fluorescentes classiques, allié à un rendement quantique élevé, entraînant une fluorescence très intense. De plus et surtout, ils présentent une excellente stabilité au photoblanchiment (Alivisatos, 2004 ; Murphy, 2002). Plusieurs études ont montré la fonctionnalité de ces nanocristaux pour des

dosages par FRET. L'équipe de H. Matoussi a notamment mis en évidence un transfert d'énergie entre des *Quantum Dots* et des protéines marquées avec un fluorophore immobilisées à la surface des nanocristaux [protéine marquée au Cy3 (Clapp et al., 2004) ou à la Rhodamine (Medintz et al., 2004)]. Au regard de tous ces avantages, la faisabilité de l'emploi de *Quantum dots* pour le SPIT-FRI mérite d'être évaluée.

Comparaison avec la mesure en phase liquide. Nous avons souhaité conserver une molécule fluorescente comme Accepteur (et non une molécule quencher n'émettant pas de fluorescence, tel que QSY21 par exemple) pour la possibilité de mesurer sa fluorescence directement (témoin de la présence de l'anticorps). Cela nous a permis de mesurer la fluorescence de l'anticorps au cours du déplacement en flux, soit sur phase solide, soit relargué en solution (résultats non montrés). Il serait intéressant de comparer les performances de ces différentes méthodes de mesure.

Amélioration de l'instrumentation. Le SPI réalise actuellement les premières expériences avec le biocapteur développé par le LETI. Ce système intègre de nombreuses fonctions telles qu'une chambre de réaction à la géométrie optimisée permettant la lecture en continu de quatre plots indépendants via une excitation séquentielle et la collection de la fluorescence par un guide de lumière, une gestion automatique des liquides via des vannes. L'utilisation de ce système peut-être faite en dehors d'une pièce noire et sans la connexion à un ordinateur. Actuellement, le LETI travaille à la mise au point de support de réaction intégrant des sources lumineuses à base de polymères électroluminescents placés directement sous chacun des plots réactionnels.

Modélisation du signal. Comme nous l'avons observé, la fonction de signal est très complexe en raison des nombreux paramètres aussi bien physiques que biochimiques intervenant dans ce signal. Des études sont en cours (menées par l'équipe de François Perraut au LETI) pour modéliser la fonction de signal et la réaction immunologique.

Perspectives d'application au dosage de toxines.

Concernant l'application du SPIT-FRI au dosage de toxines, nous avons rencontré de nombreuses difficultés. Vu la difficulté (voire l'impossibilité) de réaliser une immunisation avec les toxines entières pour la production d'anticorps en raison de la toxicité très élevée des toxines, et vu la complexité de développement d'un tripode à partir d'une protéine présentant un degré élevé de conformation, et afin de limiter la distance entre le donneur et l'accepteur,

nous avons souhaité évaluer la possibilité d'employer des peptides recouvrant une partie de la séquence protéique pour les immunisations.

Pour la toxine botulinique, nous avons effectué des immunisations avec des peptides recouvrant une partie de la séquence de la toxine soit au niveau du fragment Hc1 (peptides PepTB) soit au niveau des extrémités (possédant a priori un faible degré de conformation, peptides TBA C-ter et TBA N-ter). Ces stratégies n'ont pas permis de produire des anticorps reconnaissant la protéine entière. Cependant, nous avons montré qu'un antisérum de lapin immunisé contre le fragment protéique Hc pouvait reconnaître les peptides PepTB 01-04, montrant qu'il devrait être possible d'obtenir des anticorps anti-peptides qui reconnaîtraient la protéine entière. Il serait intéressant de recommencer l'expérimentation sur un nombre plus élevé de lapins avec ces 4 peptides. Finalement, en utilisant le fragment Hc comme immunogène, nous avons pu obtenir 14 anticorps monoclonaux reconnaissant la toxine botulinique entière. Les anticorps AcM TB4 et TB16 ont permis le développement d'un test sandwich très sensible permettant de détecter moins de 0,1 ng/mL de TBA. En revanche, nous avons été confrontés à des résultats en format compétitif peu satisfaisants en terme de sensibilité. Nous avons pu montrer que l'utilisation comme traceur de la toxine entière au lieu du fragment Hc (utilisé comme immunogène) améliore la sensibilité, qui reste cependant insuffisante. L'élaboration d'un tripode Toxine Botulinique permettant la fixation d'un anticorps puis le déplacement par la TB entière avec une sensibilité suffisante paraît compromis avec les anticorps obtenus à l'issue de cette immunisation. Cependant, la détermination des sites épitopiques reconnus par les anticorps, travail long et difficile de part la prévalence de la conformation dans la reconnaissance par les Ac monoclonaux produits, pourrait peut-être permettre d'élaborer un tripode adéquat.

Pour la ricine, la stratégie des immunisations avec RicA et RicB s'est révélée performante, que ce soit avec la chaîne A ou la chaîne B de la protéine. Nous avons pu obtenir des anticorps anti-ricine se liant de façon complémentaire et reconnaissant la protéine entière. Ces anticorps ont pu être employés pour la mise au point de dosages aussi bien en format sandwich que compétitif avec de bonnes limites de détection. Nous avons pu montrer la faisabilité du dosage SPIT-FRI de la ricine. Toutefois, le marquage de la ricine, réalisé avec des ratios de marquage élevé (10 moles d'A532 et 5 moles de biotine/mole de ricine), a conduit à une perte importante de la reconnaissance par les anticorps dont les propriétés de liaison ont de plus été altérées par le marquage à l'A647, conduisant à un *quenching* faible (25% au maximum) et à une détection aux alentours de 3 nM qui n'est pas suffisante.

D'autres expériences seront nécessaires pour optimiser le marquage du tripode et de l'anticorps (ratios réduits et marquages dirigés).

Dans une perspective d'application du SPIT-FRI à l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus*, nous avons effectué au laboratoire des immunisations avec deux peptides dont la séquence couvre une partie de la toxine susceptibles d'être exposés à la surface de la protéine. Les anticorps produits ne reconnaissant malheureusement pas la protéine entière, nous avons initié des immunisations avec la protéine entière injectée à des doses suffisamment faibles pour préserver les souris. Cette dernière stratégie a permis l'obtention d'anticorps reconnaissant la protéine entière ; la caractérisation des anticorps monoclonaux obtenus est en cours au laboratoire.

D'une façon générale, si différents aspects techniques du procédé nécessitent encore des investigations poussées, le problème majeur demeure l'obtention d'anticorps de bonne qualité pour réaliser le SPIT-FRI. Si cette remarque paraît évidente pour la mise au point de tous les dosages immunologiques, les caractéristiques recherchées ne sont pas forcément les plus classiques. Si en effet la spécificité reste un point clé, les anticorps idéaux pour le SPIT-FRI ne sont probablement pas les plus affins (nécessaires habituellement pour l'obtention de bonnes sensibilités pour les dosages par compétition ou sandwich classiques) puisque le complexe formé avec le tripode deviendrait très difficile à dissocier et conduirait à des sensibilités médiocres. Une stratégie d'immunisation avec un analogue (fragment protéique modifié par exemple) ou « screening » avec un tripode apparenté l'immunogène pourrait permettre, tout en conservant une affinité correcte d'obtenir de bons résultats. Des tests afin d'obtenir une stratégie générique applicable aux futurs SPIT-FRI développés au laboratoire devraient être conduits à court terme.

Communications

Volland H.*, **Neuburger L.M.***, Schultz E., Grassi J., Perraut F., Créminon C. (* : both authors contributed equally to this work), Solid-Phase Immobilized Tripod for Fluorescent Renewable Immunoassay. A Concept for Continuous Monitoring of an Immunoassay Including a Regeneration of the Solid Phase. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1896-1904.

Volland H., Créminon C., **Neuburger L.M.**, Grassi J. Procédé de détection en continu d'un analyte, réactif trifonctionnel de détection mis en oeuvre et dispositif de détection. *International Patent*, N° 02 14959, 2002.

Posters

Neuburger L.M., Perraut F., Schultz E., Berthier J., Créminon C., Volland H. New concept for continuous flow immunosensors. *Biosensors 2004, Grenade (Espagne)*.

Berthier J., **Neuburger L.M.**, Volland H., Perraut F. An analytical model for CFIs. *Biosensors 2004, Grenade (Espagne)*.

Berthier J., **Neuburger L.M.**, Volland H., Perraut F. A modified Langmuir equation for microfluidic systems. *Biosensors 2004, Grenade (Espagne)*.

Neuburger L.M., Volland H., Créminon C., Grassi G., Développement de dosages immunologiques par transfert de fluorescence (FRET), *Doctoriales de Paris 6 et de l'Ecole Polytechnique 2003*.

Perraut F., Schultz E., **Neuburger L.M.**, Volland H., Nouvelle méthode de mesure de la fluorescence d'échantillon liquide: application à un dosage immunologique, *Biophotonique Paris 2003*.

Schultz E., **Neuburger L.M.**, Volland H., Perraut F., Etude d'un système de dosage immunologique très haute sensibilité par fluorescence. *Colloque SFO avec actes, Nov. 2003, Belfort*.

Communications orales

Neuburger L.M., Volland H., Créminon C., Grassi G., Détection en temps réel des agents de la guerre biologique, *Journées de l'Ecole Doctorale ABIES, Déc. 2003, INA-PG, Paris*.

Schultz E., Perraut F., **Neuburger L.M.**, Volland H., Créminon C., A rugged fluoro-immunoassay with picomolar to femtomolar detection limits, *Minatec, Sept. 2003, Grenoble*.

Solid-Phase Immobilized Tripod for Fluorescent Renewable Immunoassay. A Concept for Continuous Monitoring of an Immunoassay Including a Regeneration of the Solid Phase

Hervé Volland,^{†,‡} Laure-Marie Neuburger,^{†,‡} Emmanuelle Schultz,[§] Jacques Grassi,[†] François Perraut,[§] and Christophe Créminon^{*†}

CEA, Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Immunoanalyse, DRM/SPI, Bâtiment 136, CEA-Saclay, 91191 Gif sur Yvette Cedex, France, and CEA, Laboratoire des Systèmes de Lecture pour la Biologie, LETI/DSIS/SSBS/SLB, 17 Avenue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France

A new concept of immunoassay based on the use of a trifunctional reagent (tripod) and fluorescence resonance energy transfer (FRET) phenomenon is described. This procedure involves differential steps: (1) the tripod bearing (i) a fluorophore, (ii) a molecule structurally close to the target, and (iii) a linker reacts with the solid phase; (2) the solid phase is further activated with an anti-target antibody labeled with a quencher molecule, generating the decrease of the fluorophore emission via FRET; (3) FRET being distance dependent, the presence of the target by competing with the tripod for binding the quencher-labeled antibody leads to a rise of the fluorescence signal; (4) the solid phase is reactivated simply, by adding the quencher-labeled antibody. This method was evaluated in microtiter plates using the substance P as model while fluorescein and TAMRA were used as donor and acceptor, respectively. Results clearly illustrated the interest of the method, by allowing (i) a simple regeneration procedure, without requiring any drastic treatment, (ii) a direct fluorescence measurement onto the solid support, leading to a localized and cumulative signal, (iii) an increase of the signal when detecting the target, unlike classical competitive immunoassays, and (iv) a real-time monitoring of the competition and regeneration steps.

For more than 40 years since the pioneering work of Berson and Yalow¹ described the first competitive analysis using specific antibodies, the immunoassays have been widely used in numerous application fields. Because of the affinity and selectivity of the specific antibodies and the sensitivity reached by the various labeling methods, the immunoanalytical tools have proved initially mainly successful for biological and clinical applications before enlarging their trials to agro food and industrial purposes. Present

concerns for food security,² environmental pollution,³ or even more recently bioterrorism^{4,5} reinforce the potential of immunosensors, i.e., antibody-based biosensors.⁶ These immunosensors involve, through competitive or sandwich immunoassays, antibodies adsorbed on various types of surface (microtiter plate, capillary, glass surface) and detection via optical or electrochemical methods. If all the immunosensors obviously must present sensitivity and specificity characteristics, some features, depending on the requested application, could be of great interest within the following nonexhaustive list: (i) simultaneous recognition of different analytes, (ii) rapid response (a few minutes), (iii) on-the-field analysis (important autonomy and ruggedness), (iv) continuous-flow analysis (cumulative measurement, and (v) repeated use.

Usually, classical methods involve on-site sample collection further transported to the laboratory to perform the analysis. Important efforts have been made to design automated and portable devices allowing a direct on-site analysis. However, the availability of a reusable immunosensor, i.e., by renewing its binding capacities, allowing a continuous monitoring could be a nice tool for various environmental or biosafety applications. So far the procedures described for the regeneration of immunosensor involve physical or chemical treatments to disrupt the antibody–antigen complex, generally leading to a strong and irreversible alteration of the immunoanalytical system. A soft regeneration process thus appears as totally challenging and poorly compatible with the high-affinity antibodies, apparently condemning immunosensors to a single-use application. In this context, we report here a new concept of immunoassay allowing both a sensitive measurement and a non aggressive regeneration process. This method was named solid-phase immobilized tripod for fluorescent renewable immunoassay (SPIT-FRI) and presents the following basic principles.⁷ During a first step (solid-phase

* Corresponding author. Fax: 33-1 69 08 59 07. E-mail: christophe.creminon@cea.fr.

[†] Laboratoire d'Etudes et de Recherche en Immunoanalyse.

[‡] Both authors contributed equally to this work.

[§] Laboratoire des Systèmes de Lecture pour la Biologie.

(1) Yalow, R. S.; Berson, S. A. *J. Clin. Invest.* **1960**, *39*, 1157–1175.

(2) Alocija, E. C.; Radke, S. M. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 841–846.

(3) Baeumner, A. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 434–445.

(4) Walt, D. R.; Franz, D. R. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 738A–746A.

(5) Hamburg, M. A. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 296–298.

(6) Nakamura, H.; Karube, I. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 446–468.

(7) Volland, H.; Créminon, C.; Neuburger, L. M.; Grassi, J. Fr. Patent 0214959, 2002.

preparation step), an original trifunctional reagent (tripod) is immobilized into a 96-well microtiter plate. This tripod ensures three different functions through three different structural features since it supports (i) the binding to the solid phase, (ii) an epitope similar or close to the target analyte and recognized by a specific antibody, and (iii) a fluorescent dye. The second step (activation step) corresponds to an immunological reaction since a specific antibody labeled with another selected fluorescent dye binds to the tripod to form an immunological complex as observed during a classical ELISA. On the other hand, this binding, via the fluorescent dye bound to the antibody, generates a quench of the signal corresponding to the tripod, i.e., a diminution of the signal, due to a FRET phenomenon. In a third step (competition step), the analyte (standard or sample) competes with the solid-phase tripod for the binding to the specific antibody, further leading to the displacement of the tripod–antibody complex and thus to an increase of the tripod-related fluorescence proportional to the amount of the analyte. In a last step (reactivation step), the original tripod–antibody complex is simply recovered by adding the quencher-labeled antibody.

To assess the functionality of this original approach, we used the neuropeptide substance P (SP) as a model of target analyte to be measured. The choice of this peptide was related to its structural simplicity and the availability of various peptides and monoclonal antibodies produced in the laboratory, as well as a competitive enzyme immunoassay allowing comparison of the results.^{8,9} The different steps of the SPIT-FRI method were evaluated to consider further applications to other molecules.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents. Unless otherwise stated, all reagents were of analytical grade from Sigma (St. Louis, MO). Substance P was from Neosystem Laboratories (Strasbourg, France). Neutravidin was from Pierce (Rockford, IL). The fluorophores, 6-fluorescein-(5-and 6)-carboxamido)hexanoic acid succinimidyl ester (fluorescein SE) and 5-(and-6)-carboxytetramethylrhodamine succinimidyl ester (TAMRA SE) were from Molecular Probes (Eugene, OR). The mouse monoclonal anti-SP antibody (mAb) SP31 was obtained as previously described⁸ and purified from ascitic fluid by the caprylic acid precipitation method.¹⁰ Synthetic analogues of SP (α Ac-SP, K³Ac-SP, tripod-SP) were synthesized in the laboratory using a ABI 433A apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA) and standard Fmoc chemistry. Purification was achieved by HPLC, and the quality of the compound was checked by MALDI-TOF MS using a Voyager DERP apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Apparatus. EIA and SPIT-FRI were performed using specialized equipment, including an automatic plate dispenser (Auto drop) and plate reader (Muliskan EX) from Labsystems (Helsinki, Finland) and an automatic plate washer Biotek ELX 405 (Fisher, Strasbourg, France). Fluorescence measurements were carried out using the Envision multilabel plate reader (Perkin-Elmer)

equipped with excitation and emission filters set at 485 and 535 nm, respectively.

Absorbance measurements were performed with a UV–visible HP 8453 spectrophotometer (Hewlett-Packard). Black opaque and classical polystyrene 96-well microtiter plates (Maxisorp) were from Nunc (Roskilde, Denmark).

Competitive EIA Procedure. The SP EIA was performed as previously described⁸ in poly(vinylpyrrolidone) (PVP) buffer (0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.15 M NaCl, 0.1% PVP, and 0.01% sodium azide) using 96-well microtiter plates coated with goat anti-mouse IgG antibodies. The enzyme tracer (SP-AChE) was prepared by labeling SP with the G4 form of acetylcholinesterase (AChE) enzyme as previously described.⁹ The total reaction volume was 150 μ L, including 50 μ L of each component: enzyme tracer, mAb SP31, and standard. The SP-AChE tracer was used at a concentration of 2 Ellman units (see ref 11 for Ellman unit definition) while mAb SP31 was at 25 ng/mL.

Fluorescent Labeling. The different peptides were labeled with fluorescein SE, which reacts with primary amino groups. To 100 μ L of the peptide (1 mg/mL in 0.1 M borate buffer pH 9) was added 30.8 μ L of fluorescein SE (10 mg/mL in DMF). After an 18-h reaction at +4 °C in the dark, 100 μ L of 1 M Tris-HCl buffer, pH 9, was added to neutralize the remaining active ester. This stock solution of fluorescein-labeled peptide was aliquoted and stored at –20 °C after addition of 1% (v/v) of a 10% sodium azide solution.

MAb SP31 was labeled with TAMRA SE using a 50 molar excess of fluorescent dye versus mAb. Briefly, to 1 mg of mAb SP31 in 970 μ L of 0.1 M bicarbonate buffer, pH 9, was added 170 μ g of TAMRA SE in 30 μ L of DMF. After 18-h reaction at +4 °C in the dark, 100 μ L of 1 M Tris-HCl buffer, pH 9, was added. After 30 min of reaction at 20 °C, the mixture was centrifuged and the pellet discarded. The labeled antibody was purified from the unreacted TAMRA by sieve molecular chromatography (Sephadex G50 column). The labeling yield of the purified TAMRA-labeled mAb was further calculated from the UV–visible spectrum following the manufacturer's instructions. After addition of sodium azide as preservative, the purified TAMRA–mAb solution was stored at +4 °C in the dark.

SPIT-FRI Procedure. Each step (Figure 1) was preceded by a washing procedure achieved by 5 cycles (emptying–filling the wells of the microtiter plate) with washer ELX 405 and 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.05% Tween 20 as washing buffer. During the procedure, unless otherwise specified, all the solutions were prepared in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.5, containing 0.01% sodium azide.

Step 1. Solid-phase preparation step. The 96-well microtiter plates were coated with Neutravidin (100 μ L/well, 5 μ g/mL in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.4) for 18 h at 20 °C and further saturated with 300 μ L of EIA buffer.

Then 100 μ L of a 25 nM tripod-SP solution was added in each well for 18 h of reaction at 20 °C.

Step 2. Activation step. A 100- μ L sample of a 100 nM solution of quencher-labeled mAb SP31 was introduced in each well for 18 h at 20 °C.

(8) Couraud, J. Y.; Frobort, Y.; Conrath, M.; Renzi, D.; Grassi, J.; Drapeau, G.; Regoli, D.; Pradelles, P. *J. Neurochem.* **1987**, *49*, 1708–1719.

(9) Renzi, D.; Couraud, J. Y.; Frobort, Y.; Nevers, M. C.; Geppetti, P.; Pradelles, P.; Grassi, J. In *Trends in Cluster Headache*; Sicuteri, F., et al., Eds.; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 1987; pp 125–134.

(10) Reik, L.; Maines, S.; Ryan, D.; Levin, W.; Bauderia, S.; Thomas, P. *J. Immunol. Methods* **1987**, *100*, 123–130.

(11) Pradelles, P.; Grassi, J.; Chabardes, D.; Guiso, N. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 447–453.

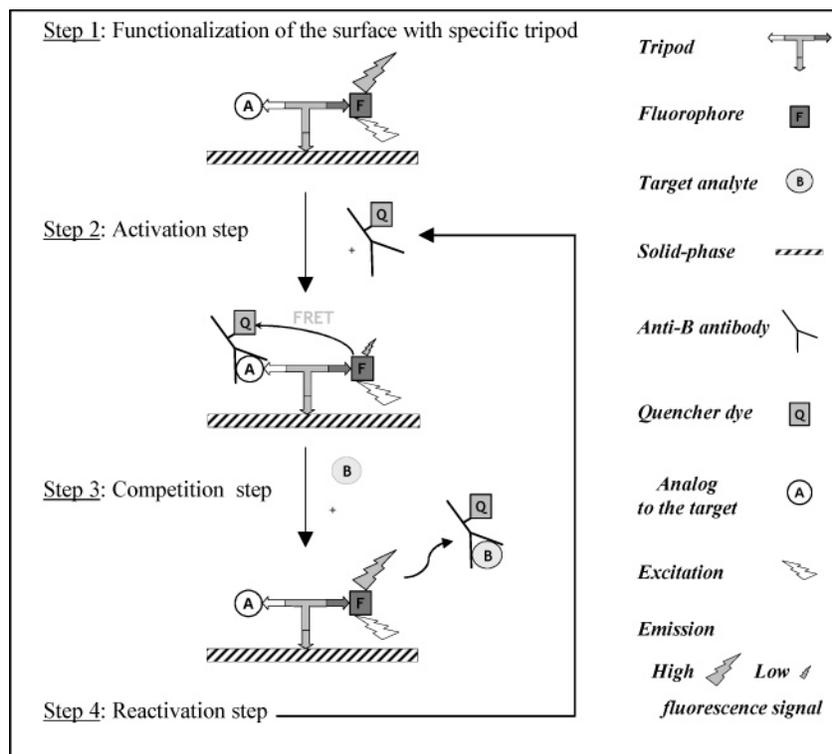


Figure 1. Different steps of the SPIT-FRI procedure.

Step 3. Competition step. A 100- μ L sample of an SP solution at different concentrations (ranging from 1 μ M to 1 pM) was added for 5 h at 20 $^{\circ}$ C under gentle shaking.

Step 4. Reactivation step. This step involves the same protocol as step 2 by adding 100 μ L of a 100 nM solution of quencher-labeled mAb SP31 in each well for 18 h at 20 $^{\circ}$ C.

Fluorescence Measurements. After step 3, the plates were washed and 100 μ L/well dilution buffer was added before measuring the fluorescence of the plate. As a control, fluorescence could also be measured after the two initial steps. For some experiments, real-time measurements were also achieved during the activation and competition step, to follow the formation and the separation of the immunological complex, respectively. Five measurements were performed for each well (scan mode).

Data Analysis. F_{\max} corresponds to the maximum fluorescent signal obtained after step 1 (binding of the tripod to the solid phase). On the other hand, F_{\min} represents the signal obtained at the end of step 2, once the immunological reaction generated the maximal binding of the quencher-labeled antibody to the tripod, allowing a simple calculation of the quenching efficiency: $Q\% = [(F_{\max} - F_{\min}) / (F_{\max})] \times 100$.

For the competition step, F and F_0 correspond to the signal obtained in the presence of the quencher, with and without the competitor, respectively. F marking the specific splitting of the immunological complex always exhibits a value superior or equal to F_0 . The specific competition yield of the quencher-labeled mAb by the target analyte is classically calculated $IC\% = [(F - F_0) / (F_{\max} - F_0)] \times 100$. The minimum detectable concentration was taken as the concentration of standard inducing a significant increase (3 standard deviations) in F_0 while the limit of quantification corresponds to $F_0 + 10SD$. Finally, by comparing the F_{\min} and the F_0 fluorescence values, it is possible to determine the

spontaneous dissociation occurring during step 3: $D\% = [(F_0 - F_{\min}) / (F_{\max} - F_{\min})] \times 100$.

To evaluate the precision characteristics of the method, assaying four different SP concentrations (400, 150, 50, and 15 ng/mL) five times in duplicate on the same day and repeating this experiment on six different days allowed determining the intraassay (within-assay) and interassay (between-assay) coefficients of variation, respectively.

Preparation of Biological Samples. Two Sprague–Dawley rats and three Balb/c mice were killed by inhalation of CO_2 . Brain minus cerebellum and spinal cord were homogenized (5 mL of 1 M acetic acid per gram of tissue) using a Ultra-Thurrax apparatus. The extracts were heated to 95 $^{\circ}$ C for 10 min and centrifuged at 20000g for 45 min. The supernatants were dried under vacuum and reconstituted in the same volume of PVP buffer. SP measurements were achieved on samples diluted in PVP buffer, 2 times for SPIT-FRI and 20 times for EIA, respectively, the standard curve being also diluted in PVP buffer.

RESULTS AND DISCUSSION

Preliminary Analysis of the FRET Process. Preliminary experiments were first performed using the competitive EIA to verify that the fluorescent labeling process was not likely to modify the immunological behavior of either substance P or SP31 mAb. The labeling of SP with fluorescein dye (Fluo) incorporated on the amino function of either α -Arg¹ or ϵ -Lys³ (together with the preliminary acetylation of the other amino function) did not modify the recognition by mAb SP31 as shown by similar standard curves obtained for natural or Fluo-labeled SP (data not shown). This result was globally expected since the epitope bound by the mAb is located at the carboxy terminus of the peptide, mainly corresponding to the five last residues of SP. On the other hand,

labeling of mAb SP31 with TAMRA did not influence the binding characteristics of the mAb as shown by similar dilution curves with enzyme tracer and standard curves obtained with SP (data not shown). The labeling rate was calculated from UV–visible spectrum close to 3 TAMRA/ mAb, and these EIA experiments demonstrate that the TAMRA molecules were not incorporated into the binding sites of the antibody or on amino functions important for the binding properties.

The Fluo and TAMRA dyes were selected because, after excitation at 485 nm, Fluo exhibits emission between 520 and 560 nm while the maximum excitation for TAMRA corresponds to 555 nm (the emission for TAMRA being located at 590 nm). This important overlap should lead to a decrease of the fluorescence measured for Fluo in the presence of TAMRA thus acting as a quencher. However, this quench phenomenon known as FRET only occurs if both fluorescent molecules are close to each other, as obtained after binding of the analyte with its specific antibody. This was verified since mixing of Fluo-SP with TAMRA alone did not modify the fluorescent measurement of Fluo (data not shown). On the other hand, the presence of Fluo did not induce any modification of TAMRA fluorescent measurement. Finally, mixing of Fluo-labeled SP with TAMRA-labeled mAb SP31 leads after 1 h of reaction to a decrease of the fluorescence measured for Fluo. This corresponds to FRET since the decrease appears proportional to the concentration of labeled antibody while the same experiment performed with unlabeled mAb SP31 did not show any observed quench (data not shown). Moreover, simultaneous incubation of different concentrations of unlabeled SP with TAMRA-labeled SP31 (12.5 nM) and Fluo-labeled SP (25 nM) led to a recovery of the fluorescent signal proportional to the SP concentrations, reflecting the effect of the competition between labeled and unlabeled SP to the TAMRA–mAb while a strong quench (more than 50%) is observed in the absence of unlabeled SP (data not shown). These different experiments performed in solution illustrated the potential of the FRET phenomenon to lead after competition to a positive signal, i.e., an increase of the signal, while classical competitive immunoassays whatever the label used generate a decrease of the signal. However, even if interesting, this principle requires important adaptations to obtain an immuno-sensor allowing repeated use after regeneration.

Design of the Tripod. The main necessary modification corresponds to the transposition of the homogeneous assay, i.e., all reagents present in solution to achieve the measurement without any separation step, to a heterogeneous assay allowing separation of the different reagents during washing steps. To this purpose, we decided to adapt the classical ELISA format. However, in addition to the epitope recognized by the antibody, it was also necessary to include the fluorescent dye to achieve the FRET process. Moreover, to be sure that both the epitope and the fluorescent dye remained accessible and useful, we have incorporated a function allowing the selective binding to the solid phase. By selecting the biotin, we knew that the binding with coated Neutravidin would perfectly meet the previous requirements due to the high affinity of the avidin–biotin system. On the other hand, a single type of solid phase, i.e., Neutravidin-coated immunoplate, could allow us to perform different immunoassays. All the different components included in our tripod were then defined: a structure recognized by a specific anti-target antibody, a fluorescent dye,

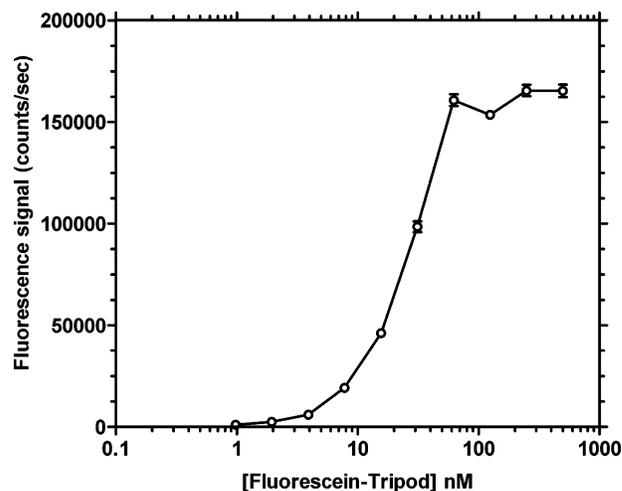


Figure 2. Relationship between the tripod concentration and the specific fluorescent signal measured after reaction. Error bars are the standard error of the mean with $n = 3$.

and a biotin linker allowing binding to the solid phase. The tripod-SP was then prepared in two steps. First, an analogue of SP comprising different modifications was synthesized. By comparison to the SP sequence, i.e., Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-CONH₂, it is worth noting two important changes, (i) the substitutions of the Leu¹⁰ and Lys³ by two Ala residues, (ii) the addition of an amino-terminal sequence including free amino functions, and (iii) a biotin directly incorporated during the peptide synthesis. The resulting tripod-SP sequence corresponds to *Lys-Ser-Ser-Lys (Biotin)-Arg-Pro-Ala-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Ala-Met-CONH₂*. The Ala¹⁰ modification, even if preserving the specific recognition by anti-SP mAb SP31, leads to lower affinity interactions,⁸ further favoring the future competition process after formation of the immunological complex. The Ala³ substitution was made to limit the fluorescent labeling to the amino terminus of the peptide, extended by comparison to the initial sequence by hydrophilic residues to compensate for the hydrophobic character of the biotin and fluorescein incorporated, which could otherwise limit the solubility of the tripod-SP.

Analysis of the Different SPIT-FRI Steps. To demonstrate the potential of this new method, we have evaluated the four different steps involved.

Step 1: This step corresponds to the binding of the tripod to the Neutravidin-coated solid phase. As shown in Figure 2, a clear relationship is observed between the concentration of the tripod-SP and the specific fluorescence signal measured into the microtiter plate wells. A plateau was reached for a 62.5 nM tripod-SP concentration corresponding to a maximum signal of 150 000 counts/s (signal/noise ratio 30). This result clearly demonstrates the binding of the tripod to the solid-phase through Neutravidin–biotin interactions. Moreover, the saturation observed could be related to the limited Neutravidin binding sites initially coated onto the microtiter plate.

It is noteworthy that the use of fluorescein in solid-phase immunoassays is poorly described in the literature.¹² Indeed, only a few immunoassays with direct fluorescence measurement onto

(12) Mastichiadis, C.; Kakabakos, S. E.; Christofidis, I.; Koupparis, M. A.; Willetts, C.; Misiako, K. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 6064–6072.

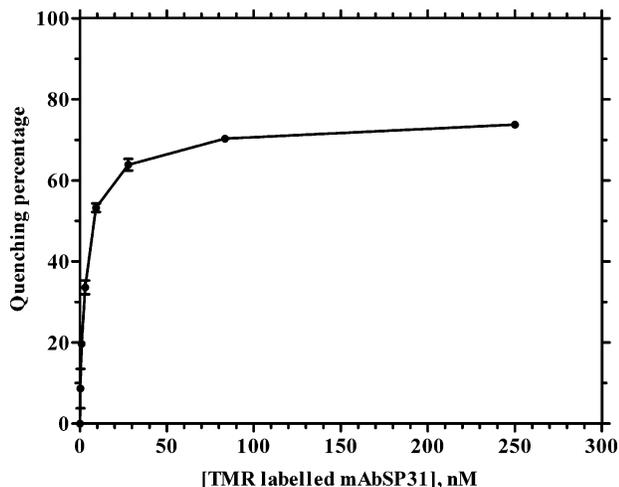


Figure 3. Relationship between the concentration of TAMRA-labeled antibody and the quenching phenomenon. Error bars are the standard error of the mean with $n = 3$.

the solid phase have been so far described using a microtiter plate format.¹³ Different reasons could justify this limited use. First, fluorescein by possessing a relatively small Stokes shift of 25–30 nm and a relative broad emission spectrum presents higher background fluorescence signals compared to many other compounds, mainly due to scattering. Second, plastic supports such as microtiter polystyrene plates used as solid phase generate themselves a fluorescence increasing the background fluorescence.

However, fluorescein was selected during the present method development for labeling because it is the most common and low-cost fluorescent compound. The fluorescence measurements provided here a quite good signal/noise ratio, ~ 30 at the saturation plateau (corresponding to the saturation of the Neutravidin sites). On the other hand, due to the fluorescein sensitivity to pH, i.e., fluorescence intensity significantly reduced above pH 7, all experiments were performed in pH 8.5 phosphate buffer and in opaque black polystyrene plates known to reduce fluorescence background.

By comparison to the fluorescence of the molecule in solution, a decrease of the fluorescent signal is observed when the fluorescent dye is bound to solid phase. Since many proteins could quench fluorescence, this reduction may result from the presence of BSA, Neutravidin, or even the tripod itself. By performing a calibration curve using Neutravidin-coated plates with or without the BSA saturation, we have verified that the presence of BSA molecules did not affect the fluorescence signal. However the impact of the Neutravidin/biotin–tripod system on the fluorescence appears difficult to evaluate.

Improvement of the signal/noise ratio onto the solid phase via a combination of glycerol and thermal treatments has been reported in the literature and will be evaluated in the future.

Step 2: As expected, a decrease in the fluorescence signal was observed during this step. As shown in Figure 3, a relationship was observed between the measured quench and the concentration of TAMRA-labeled antibody introduced. For a 25 nM concentration of fluorescein-labeled tripod, quenching efficiency

corresponds to 68% with 100 nM TAMRA-labeled mAb (Q-mAb) after 18-h incubation. On the other hand, this quenching phenomenon can be measured in a kinetic way. Even for low concentrations of Q-mAb (5 nM to be compared with the 25 nM tripod incubated during step 1), the signal decrease is clearly observed after 15 min of reaction (data not shown). Obviously the time required for reaching the maximal quench is dependent on the concentration of Q-mAb and is observed in less than 1 h for a 250 nM concentration. At this stage, prepared plates can be stored at +4 °C in the dark (sealed with an adhesive covering sheet) for more than 2 months without any modification of the results.

This step involves an antibody directed against the target (the substance P) and labeled with a quencher molecule Q (here the TAMRA dye). The antibody binding to the tripod, i.e., the formation of the immunological complex, induces a significant decrease in the fluorescence emission of the fluorophore F fixed to the tripod (here the fluorescein). This phenomenon in the SPIT-FRI method corresponds to the activation of the solid phase via FRET. FRET involves the transfer of excitation energy from a donor (fluorescein) to an acceptor (TAMRA), mainly related to two parameters: (i) the degree of spectral overlap between the donor and the acceptor and (ii) their dipole–dipole distance. FRET occurs when the donor's emission spectrum overlaps the acceptor's excitation spectrum, fluorescein and tetramethylrhodamine, corresponding to a well-known (donor, acceptor) combination. The other critical requirement is the distance between donor and acceptor since energy transfer works only over distances less than 100 Å. The size of the antigene–antibody complexes formed during immunoassays usually meets this critical criterion.

The FRET phenomenon is widely used to determine or quantify molecular interactions, e.g., protein–protein or interchain interactions and DNA hybridization,^{14,15} or in homogeneous immunoassays (liquid phase), especially with rare earth chelates for a temporally resolved response.¹⁶ However, the application of FRET to the solid-phase immunoassays appears negligible while this technique is often used in microarrays to determine the hybridization of oligonucleotides on biochips.^{17,18} Fluorescence measurements are then carried out directly onto the solid phase, generally on glass or silicate biochip (rarely on a plastic support) and with specific readers.

The maximum quenching efficiency experimentally obtained was close to 70% with the (fluorescein, TAMRA) couple. The plateau corresponds probably to the saturation of all the tripod sites with the quencher-labeled antibodies. The quenching efficiencies reported in the literature for homogeneous FRET immunoassays are quite variable,^{19–23} but this 70% quenching value ranks in the good results. Some authors even reached 86%

(13) Mastichiadis, C.; Christofidis, I.; Koupparis, M. A.; Willetts, C.; Kakabakos, S. E. *Analyst* **2003**, *128*, 404–410.

(14) Lundin, K.; Blomberg, K.; Nordstrom, T.; Lindqvist, C. *Anal. Biochem.* **2001**, *299*, 92–97.

(15) Heyduk, T.; Heyduk, E. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 171–176.

(16) Mathis, G.; Socquet, F.; Viguier, M.; Darbouret, B. *Anticancer Res.* **1997**, *17*, 3011–3014.

(17) Prat, O.; Lopez, E.; Mathis, G. *Anal. Biochem.* **1991**, *195*, 283–289.

(18) Fang, X.; Li, J. J.; Perlette, J.; Tan, W.; Wang, K. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 747A–753A.

(19) Chen, L.; McBranch, D. W.; Wang, H. L.; Helgeson, R.; Wudl, F.; Whitten, D. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 12287–12292.

(20) Feng, J.; Shan, G.; Hammock, B. D.; Kennedy, I. M. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 1055–1063.

(21) Lee, M.; Walt, D. R. *Nugent, P. J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2766–2770.

quenching efficiency for this couple, but for oligonucleotide hybridization experiments, which implied shorter distances than antigen–antibody complexes.²⁴

Comparisons between experiments are not simple, because a large number of parameters could affect the energy transfer efficiency. Among those, the nature of the fluorophore and the quencher (molar extinction coefficient, Stokes shift, quantum yield, and R_0 (Förster radius, i.e., distance at which energy transfer is 50% efficient) between donor and acceptor and their spectral overlap) obviously plays a key role for the quenching efficiency. On the other hand, the ratio acceptor/donor or autoquenching phenomena are also probably crucial as well as many environment factors such as the pH, the presence of certain ions or metals, the temperature, and obviously the matrix of the samples.

Since the dynamic range of possible displacement could be dependent on the quenching efficiency, further studies will be performed by testing other combinations of donor and acceptor molecules, hoping to improve the quenching and eventually the assay performances. We will also perform experiments with antibody fragments (Fab, Fab', or F(ab')₂) or recombinant antibodies (ScFv) for TAMRA labeling to check the effect of the distance on the quenching efficiency. The intrinsic fluorescence of the TAMRA linked to the antibody induces a background noise when binding the tripod using filters set for the fluorescein measurement. Even if this noise was very low, it could bias the quenching efficiency results. Moreover, during the real-time measurements, the fluorescence of the TAMRA–mAb solution must be subtracted from the values to calculate the correct quenching yield. Unfortunately, this operation also introduces a bias in the calculations since, as previously observed for fluorescein dye, the fluorescence of the TAMRA seems more intense in solution than bound to the tripod onto the solid phase.

To improve the fluorescence of the donor onto the solid phase and improve the quenching efficiency, future works will focus on the comparison of different couples of donor and acceptor commercially available presenting an important spectral overlap, a high quantum yield, and extinction coefficient for the donor and acceptor, respectively. Moreover, since the acceptor should ideally present a limited intrinsic fluorescence, nonfluorescent quencher will be tested as acceptor.

Step 3: An increase of the measured fluorescence signal was observed during this step, corresponding to the competitive process occurring between the solid-phase tripod and the target analyte in solution for the binding to the quencher-labeled mAb. This immunological reaction with substance P leads to a displacement of the Q–mAb by the target, resulting in a rise in the fluorescence emission of the Fluo–tripod. As expected and shown in Figure 4, the results demonstrated a reduction of fluorescence quenching phenomenon proportional to the concentration of substance P. We thus observed the classical sigmoid standard curve, showing a dose-dependent modification of the fluorescent signal. On the other hand, using lower concentrations of tripod allows improving the sensitivity of the assay. However, the natural

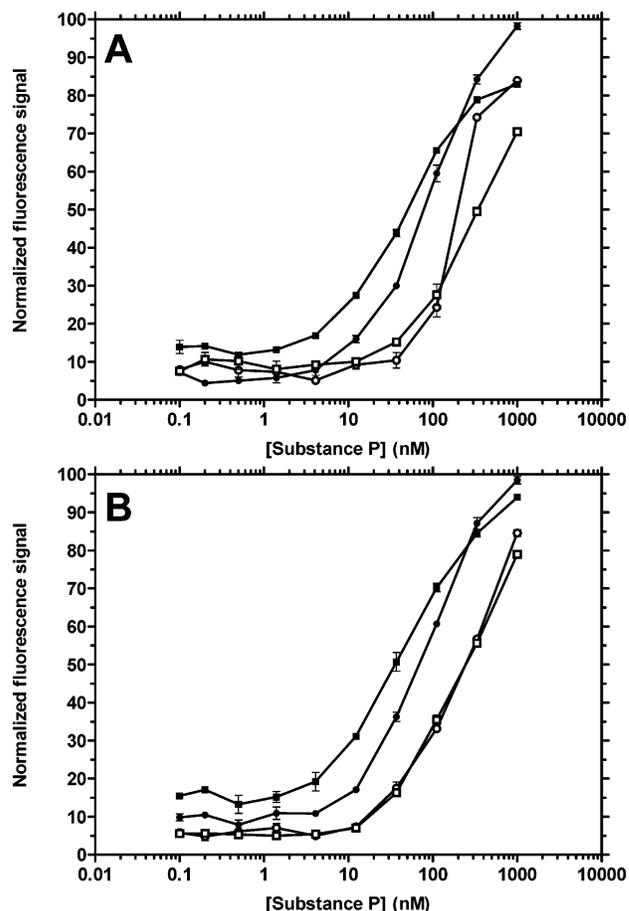


Figure 4. Standard curves for substance P obtained with quencher-labeled mAb SP31 at a concentration of either 20 (A) or 100 nM (B) using various concentrations of tripod (full square, 5 nM; full circle, 15 nM; open square, 50 nM; open circle, 100 nM). Error bars are the standard error of the mean with $n = 3$.

dissociation of the tripod–antibody complex was also found to be more important when the concentration of tripod decreased (data not shown).

Interestingly, unlike traditional competitive immunoassays or even recently developed immunosensors,^{25,26} the SPIT-FRI method measures an increase of the signal from baseline during the competition, and not a decrease, allowing a direct detection of molecular recognition. On the other hand, it should be pointed out that this format do not really favor the recognition of the free analyte and thus the displacement of the Ab since the target is added after the formation of the tripod–mAb immunological complex during step 2. In fact, different parameters could affect the displacement of this complex and thus the sensitivity of the assay, such as (i) the density of the tripod and of the quencher-labeled antibody onto the solid-phase, (ii) the dynamical range of the signal (related to the fluorescence of the donor and the quenching efficiency), (iii) the conditions of incubation (duration, temperature, agitation) and the geometry of the wells (especially the surface/volume ratio), and (iv) obviously the relative affinity of the antibody for the target versus the tripod.

(22) Lichlyter, D. A.; Grant, S. A.; Soykan, O. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *19*, 219–226.

(23) Liu, J.; Tian, J. N.; Zhang, J.; Hu, Z.; Chen, X. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 864–867.

(24) Marras, S. A.; Kramer, F. R.; Tyagi, S. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 122–128.

(25) O'Connell, K. P.; Valdes, J. J.; Azer, N. L.; Schwartz, R. P.; Wright, J.; Eldefrawi, M. E. *J. Immunol. Methods* **1999**, *225*, 157–69.

(26) Eldefrawi, M. E.; Azer, N. L.; Nath, N.; et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *87*, 25–35.

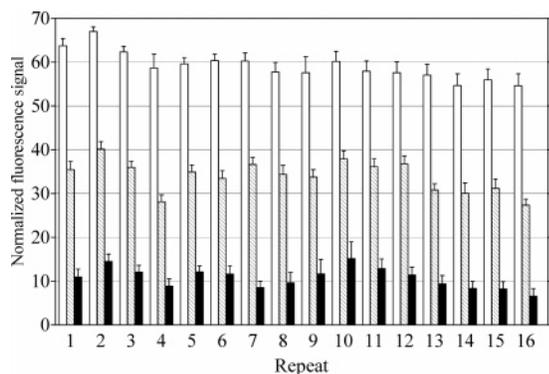


Figure 5. Successive assays (16) for Substance P (open bars, 1 μ M; hatched bars, 100 nM; full bars, 10 nM) performed on the same microtiter plate after regeneration (step 1, tripod 25 nM for 18 h; steps 2 and 4, TAMRA-SP31 25 nM for 18 h; step 3, substance P for 5 h). Error bars are the standard error of the mean with $n = 8$.

According to theoretical considerations on competitive assay, we have observed that the sensitivity of the assay was enhanced when using lower concentrations of tripod while, by comparing two different concentrations of Q-mAb (20 and 100 nM (Figure 4A and B, respectively), we did not notice any significant modification of sensitivity. However, since the naturally occurring dissociation of the tripod-antibody complex was also related to this diminution of the tripod density, reducing the quenching efficiency and thus the signal dynamical range, it could be difficult to use such strategy to really improve the sensitivity of the method. Further testing for tripod concentration less than 5 nM would only be realized with dyes presenting a higher fluorescence intensity and stability than fluorescein.

To improve the sensitivity of the assay, we have specifically designed the epitope of the tripod for which the antibody exhibits a lower affinity than for the true target. This trick was achieved to favor the displacement of antibody by the target since the formation of the complex was performed in the previous step. In the sequence of the present tripod, a single substitution of Leu¹⁰ by an Ala residue inside the epitope constituted by the 5-carboxy-terminal residues recognized by mAb SP31 decreased the affinity of the mAb from ~ 1 order of magnitude. It must be specified that the affinity of mAb SP31 for substance P is quite good (close to 0.1 nM) and thus remains correct for the tripod. If the modification(s) introduced in the sequence of the tripod induced a final too low affinity of the Ab for this analogue, the spontaneous dissociation of the tripod-Ab complex may become very important, resulting in a major loss in the quenching efficiency.

The experimental limit of quantification of the present assay was calculated close to 9 nM after an incubation of 18 h at 4°C with a tripod concentration of 5 nM, whereas the theoretical limit of detection was close to 2.5 nM. Real-time measurements allow detecting the presence of 0.1 pmol of substance P in less than 5 min (see Figure 6). This new concept proved to be only ~ 10 times less sensitive than classical competitive EIA for substance P using mAbSP31, which presents a calculated limit of detection close to 0.66 nM. On the other hand, comparisons to previous results described in the literature with continuous-flow sensors are difficult, since the present experiments were using microtiter plates as solid phase. Indeed, we plan to adapt the system to a capillary format in order to improve both sensitivity and displace-

ment rate, hoping to obtain results close to the sensitivity described by Ligler et al. of 7 fmol of TNT in less than 3 min.^{27,28} However, a very sensitive detection, such as the 0.2 ng/L for estrone recently reported in the literature, always obviously requires the availability of an antibody with a high affinity constant toward the analyte.²⁹

Within-assay coefficients of variation (CVs) were 31.4, 16, 7.3, and 12.4% for 400, 150, 50 and 15 ng/mL SP, respectively, while between-assay coefficients of variation were 37.1, 17.5, 9.1, and 13.6% for the same measured concentrations. These results show that SPIT-FRI presents a correct precision (similar results for within- and between-assay analysis with CV <20%) for the lower part of the standard curve, thus further confirming the capacity of the method to accurately measure the analyte close to the experimental limit of quantification. On the other hand, precise measurement of high concentrations of SP (>300 ng/mL) requires repeating the analysis after dilutions.

Step 4: The regeneration process appeared to work perfectly, as seen in Figure 5. Successive assays after reactivation of the solid phase demonstrated the feasibility of the method. These experiments proved that the solid phase remains stable with a good reproducibility of the quench efficiency (68%) after 16 successive reactivations. Similarly, the 16 successive immunoassays for substance P provided good and reproducible results.

This stability of the solid phase indeed seems logical since by contrast to the chemical or physical treatments usually performed to regenerate the solid phase, which present drastic effects, this step consists of re-forming the immunological complex by adding Q-mAb, which will bind the labeled tripod. Neither the previous competition step nor the present reactivation step could exert any aggressive effect toward the epitope of the tripod recognized by the specific antibody. Theoretically this regeneration process can be reproduced endlessly. However, if the tripod epitope remains stable, the same stability is not always reached for the fluorescent dye, which may suffer from photobleaching. This was observed to a limited extent during the present experiments since fluorescein is quite sensitive to this phenomenon without altering the sensitivity characteristics of the method.

Preliminary experiments were performed by successive incubations onto the same solid phase without including any reactivation between the assays. We then observed a "cumulative" effect of the target (data not shown). Obviously, this effect appears by far much more interesting for low doses of the target, particularly in view of the future development of a continuous-flow method derived from the present concept. Even if this sensitive detection appears of interest, some investigations remain to be performed to verify the correct quantification for this specific application of the method.

Still in view of developing a continuous-flow immunosensor, real-time kinetic measurements were performed by measuring the signal onto the solid phase. As illustrated in Figure 6, this real-time monitoring is correctly achieved and could be useful for detection during the different steps of the method. On the other hand, this monitoring works also during several successive reactivations and subsequent assays (data not shown). Finally, this experiment clearly demonstrates that SPIT-FRI can be rapidly

(27) Narang, U.; Gauger, P. R.; Ligler, F. S. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 1961–1964.

(28) Narang, U.; Gauger, P. R.; Kusterbeck, A. W.; Ligler, F. S. *Anal. Biochem.* **1998**, *255*, 13–19.

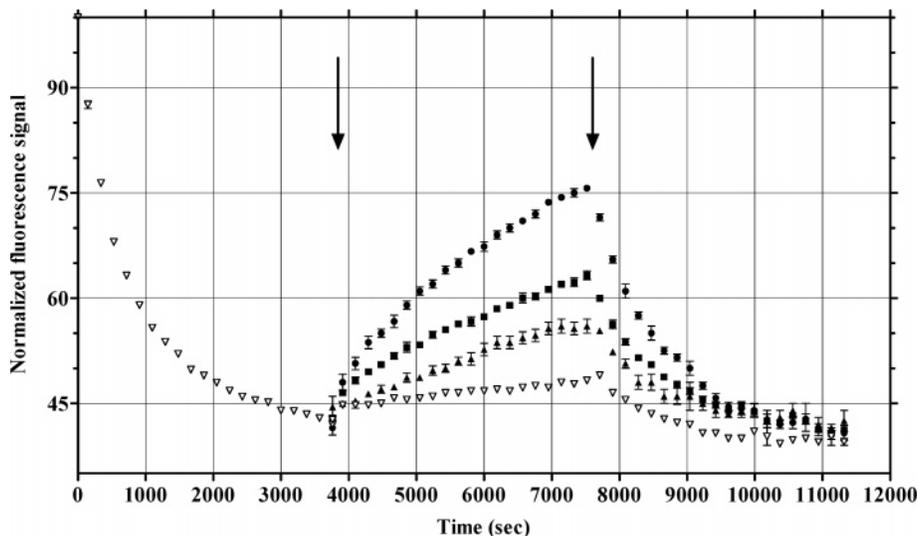


Figure 6. Real-time measurements for the steps 2 (activation), 3 (competition) and 4 (reactivation) of the SPIT-FRI procedure using substance P at three different concentrations (full circles, 1 μ M; full squares, 100 nM; full triangle, 10 nM, control, open triangles). The two arrows indicate the beginning of the competition and reactivation steps, respectively. These results are representative of four similar experiments.

achieved (using previously prepared plates) since results of competition are clearly noticeable after less than 10 min for the three different curves depicted in Figure 6. Obviously, a further regeneration process could also be accelerated by using high amounts of TAMRA-labeled antibody.

Classically, a flow immunosensor^{30,31} is realized with antibodies covalently linked to a solid phase which bound labeled antigen analogue. After injection of the sample into the flow stream, the target if present competes with the labeled antigen for binding to the antibodies. The released labeled antigen and excess sample further move downstream, where a detector measures the label. One of the most important limitations of the flow immunosensors is today the degradation or loss of signal with time and repeated use, together with an increase in the imprecision measurements which limit the sensitivity.³² We want to check if the present method could provide more stable results. However, if the results shown in Figure 5 demonstrate a good reproducibility, the original fluorescence signals show a slight decrease corresponding to the photobleaching of the fluorophore fixed to the tripod. Even if the photobleaching seems to have no effect on the percentages of quenching and displacement, it could limit the number of possible reactivations of the solid phase. The use of other fluorescent dyes with higher stability and quantum yield instead of fluorescein could improve the stability of the signal and reproducibility of the assays. We plan to test Alexa dyes and quantum dots as donor.

By using a fluorescent dye with higher stability, our method could provide an alternative to the present-day limitations of biosensors in terms of regeneration. The use of a quencher-labeled antibody for the regeneration appeared to be both an ingenious and an efficient method.

Table 1. SP-like Immunoreactivity (ng/mL) Measured in Rat Brain ($n = 8$), Rat Spinal Cord ($n = 8$), Mouse Brain ($n = 12$), and Mouse Spinal Cord ($n = 12$) Extracts Using SPIT-FRI and Competitive EIA

	rat brain	rat spinal cord	mouse brain	mouse spinal cord
SPIT-FRI	59.1 \pm 0.2	109.7 \pm 8.4	56.3 \pm 11.9	93.9 \pm 13.1
EIA	38.3 \pm 5.8	63.9 \pm 8.7	34.9 \pm 3.3	72.6 \pm 13.2

Application of SPIT-FRI to SP Measurement in Biological Samples. As mentioned above, this new method (and especially steps 2 and 3) could be affected by numerous environmental factors acting as interferences. To check the applicability of SPIT-FRI as a classical immunoassay, we have compared the performance of this method with classical competitive immunoassay to measure SP content in relevant samples, i.e., spinal cord and brain extracts from rat and mice. SPIT-FRI perfectly allowed detecting SP-like immunoreactivity in all the tested samples. As shown in Table 1, SPIT-FRI amazingly provides almost higher SP-like immunoreactivity than classical EIA. However, both methods measured rat and mice spinal cord and brain extracts in the same range, spinal cord presenting always 2-fold higher concentrations than brain. The discrepancy between both methods probably results from the influence of substance P metabolites or related products, i.e., other neurokinins, which present higher cross-reactivity in SPIT-FRI than in EIA. The use of an Ala¹⁰-substituted analogue for tripod design may explain the enhanced cross-reaction(s), compared to natural labeled-substance P used as tracer for EIA.

We were also interested in checking the possible interference induced on SPIT-FRI by plasma and urine medium, which are the most widely assayed biological fluids. To evaluate this, control plasma and urine were diluted in PVP buffer and spiked with 10 ng/mL SP concentration before assaying with SPIT-FRI and EIA. The results demonstrated that SPIT-FRI was less sensitive than competitive EIA to plasma and urine concentration (data not

(29) Tschmelak, J.; Proll, G.; Gauglitz, G. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 744–745.

(30) Sheikh, S. H.; Mulchandani, A. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 647–652.

(31) Shriver-Lake, L. C.; Charles, P. T.; Kusterbeck, A. W. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 550–555.

(32) Kusterbeck, A.W. 2002. In *Optical Biosensors, Present & Future*; Ligler, F. S., Rowe Taitt, C. A., Eds; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 2002; pp 123–142.

shown). Indeed, recovery of spiked SP was >95% for 33% of either plasma or urine while this result was only observed for 5 and 10% of plasma and urine, respectively, using competitive EIA. This experiment shows that the present new method could be applicable to analyte measurement in urine or plasma samples, which are frequently assayed for physiopathological purposes.

CONCLUSIONS

The present report describes a new concept that may be useful in developing an immunosensor. Basically, the SPIT-FRI approach corresponds to a competitive ELISA involving a trifunctional molecule to prepare the solid phase and FRET phenomenon to achieve measurement. The results obtained on the model of the small neuropeptide substance P demonstrate the feasibility of this immunoanalytical method, which exhibits many advantages, by allowing (i) an easy regeneration, without using any drastic treatment, (ii) a direct measurement of the fluorescence signal onto the wells of the microtiter plate, allowing detection of a localized and cumulative signal, (iii) an increase of the signal when the target is added, instead of the decrease observed for classical competitive immunoassays, and (iv) a real-time monitoring of the displacement and the regeneration steps. Repetitive assays for substance P performed after successive reactivations of the solid phase in microtiter plates demonstrate the good reproducibility of the method. The number of possible regenerations remains to be determined.

(33) Tschmelak, J.; Proll, G.; Gauglitz, G. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *379*, 1004–1012.

Taking the present system as reference, future experiments will focus on different parts. Apart from the useful (fluorescein, TAMRA) combination, several fluorescent dyes may provide better results, particularly in terms of stability and intensity. On the other hand, fragments of antibody could lead to higher quenching yield and enlarge the dynamic range of the assay. In this context, the possible use for polyclonal antibodies, which are by far much easier to obtain, has to be evaluated. Last, applications to other molecules and especially to macromolecules, for which the production of a specific tripod is rather difficult and will thus need direct incorporation of the fluorescent label, must be performed to verify the possible general application of the method. Finally, we want to test other types of solid phase, such as capillary or glass slide, to verify the possible transposition of this new method to continuous-flow immunosensor. In this context, the design of a fully automated immunosensor device such as the original RIANA allowing environmental analysis could then be envisaged in the future.³³

ACKNOWLEDGMENT

The Direction Générale à l'Armement (DGA, French Ministry of Defense) is greatly acknowledged for financial support (L.-M.N.). We thank Dr. Hervé Bernard (INRA) for peptide synthesis and Dr. Eric Ezan for fruitful discussions.

Received for review May 27, 2004. Accepted January 10, 2005.

AC049222W

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la neurotoxine botulinique de <i>Clostridium botulinum</i> (sérotype A).....	22
Figure 2 : Structure tridimensionnelle de la Ricine.....	22
Figure 3 : Structure simplifiée d'une unité de base des immunoglobulines.....	30
Figure 4 : Schéma-type des dosages immunométrique et compétitif (sur phase solide).....	36
Figure 5 : Diagramme partiel des niveaux d'énergie d'un système photoluminescent (diagramme de Perrin-Jablonski).....	40
Figure 6 : Structure chimique et spectres d'excitation et d'émission de la Fluorescéine.....	40
Figure 7 : Principe du transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET).....	42
Figure 8 : Structure d'une sonde à ADN (<i>molecular beacon</i>).....	46
Figure 9 : Principe d'un capteur enzymatique pour la détection d'anticholinestérase.....	46
Figure 10 : Représentation schématique d'un biocapteur.....	50
Figure 11 : Schéma d'un dosage immunologique en flux d'après Sheikh <i>et al.</i>	54
Figure 12 : Principe du dosage proposé basé sur l'utilisation d'un tripode (SPIT-FRI).....	58
Figure 13 : Structure de la Substance P.....	60
Figure 14 : Structure de la β -lactoglobuline bovine A.....	60
Figure 15 : Fonctionnement d'un spectrofluorimètre.....	68
Figure 16 : Fonctionnement d'un fluorimètre.....	70
Figure 17 : Robot de dépôt.....	72
Figure 18 : Montage de la microcellule pour les lames.....	72
Figure 19 : Schéma du microscope à fluorescence.....	74
Figure 20 : Spectres de transmission des filtres des blocs optiques du microscope à fluorescence.....	76
Figure 21 : Spectres des fluorophores et <i>quencher</i> s utilisés.....	81
Figure 22 : Structure et spectre de masse du peptide Ala ¹⁰ SP-biot (support du tripode SP).....	82
Figure 23 : Spectres de masse de la BLgA et la Rcm-BLgA.....	84
Figure 24 : Synthèse du dérivé acide 3-mercaptopropanoïque de l'Atrazine.....	84
Figure 25 : Structures des aflatoxines B1, B2, G1 et G2.....	86
Figure 26 : Synthèse du dérivé oxime de l'aflatoxine B1.....	86

Figure 27 : Réaction d'un ester actif sur une amine primaire	98
Figure 28 : Structure du 5,6-époxyhexyltriéthoxysilane	110
Figure 29 : Protocole de greffage de la neutravidine sur les supports en verre (chimie CEA2)	110
Figure 30 : Principe du SPI-FIA	114
Figure 31 : Profils des éluions HPLC de la Fluorescéine libre et du tripode Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine	122
Figure 32 : Profils d'absorbance et d'immunoréactivité de la purification HPLC du tripode Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine	122
Figure 33 : Profil d'éluion par chromatographie de tamisage moléculaire G25 de AcM SP31 après marquage à la TMR et spectres d'absorbance des pools obtenus.....	124
Figure 34 : Courbes de compétition pour SP, Ala ¹⁰ SP-biot et Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine avec l'anticorps SP31 et le traceur SP-AChE.....	126
Figure 35 : Liaison de l'anticorps SP31 marqué ou non à la TMR avec la SP-AChE	126
Figure 36 : Spectre d'émission de fluorescence de ε ₃ SP-Fluorescéine avec et sans SP31-TMR en solution	127
Figure 37 : <i>Quenching</i> de Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine et de ε ₃ SP-Fluorescéine par SP31-TMR en solution	127
Figure 38 : Suivi de la fluorescence au cours de la fixation du tripode Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine sur la neutravidine.....	129
Figure 39: Comparaison de la mesure de la fluorescence du tripode sur phase solide pour différentes plaques et en phase liquide (lecteur Analyst).....	131
Figure 40 : Signal sur phase solide (Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine) en fonction du volume de tampon de lecture .	133
Figure 41 : Influence du pH du tampon d'incubation et de lecture sur le signal (tripode Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine, anticorps AcM SP31-TMR).....	133
Figure 42 : Test de dilution d'AcM SP31-TMR (<i>quenching</i> du tripode Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine) et courbe d'étalonnage pour la SP (inhibition du <i>quenching</i>).....	135
Figure 43 : Expériences de régénération (Quench/Déplacement successifs sur une même surface)	137
Figure 44 : Influence de la température d'incubation de la SP sur le déplacement.....	138
Figure 45 : Influence de la durée d'incubation de la SP sur le déplacement.....	138
Figure 46 : Influence de la densité de tripode Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine sur le <i>quenching</i> par l'AcM SP31-TMR, comparaison des incubations en séquentiel et en simultané.....	140
Figure 47 : Exemple de normalisation des signaux obtenus après déplacement par rapport aux signaux obtenus après incubation du tripode et de l'anticorps.....	142
Figure 48 : Influence de la concentration en tripode sur la sensibilité du dosage	142
Figure 49 : Incubations successives de la SP sans ajout d'anticorps.....	144
Figure 50 : Influence de la présence d'urine et de plasma dans le tampon sur l'estimation de la concentration en SP (dosage SPIT-FRI <i>versus</i> EIA par compétition).....	146
Figure 51 : Mesures en cinétique pour 4 cycles de régénération/déplacement par la SP	149

Figure 52 : Analyse de la pente initiale des cinétiques de déplacement sur 15 min.....	149
Figure 53 : Cinétiques d'association et de dissociation de l'anticorps SP31-TMR sur le tripode Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine pour différentes concentrations en anticorps	150
Figure 54 : Cinétique de déplacement par la Substance P (14 h).....	150
Figure 55 : Influence du ratio TMR/Ac SP31 sur les capacités de liaison avec la SP-AChE et sur le <i>quenching</i> du tripode Ala ¹⁰ SP(biot)-Fluorescéine	152
Figure 56 : <i>Quenching</i> du tripode Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine par les anticorps SP14, SP19, SP24 et SP31-TMR (mesure en cinétique et en point final).....	154
Figure 57 : Courbe d'étalonnage pour la SP avec les anticorps SP14, SP19, SP24 et SP31-TMR.....	155
Figure 58 : <i>Quenching</i> du tripode Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine avec l'anticorps polyclonal As 418 lié à la TMR ou révélé avec l'anticorps SAL-TMR.....	155
Figure 59 : Electrophorèse des différents fragments de SP31	157
Figure 60 : Capacité de liaison des fragments d'Ac SP31 biotinylés à la SP-AChE et test de déplacement	157
Figure 61 : Cinétique de <i>quenching</i> du tripode Ala ¹⁰ SP-Fluorescéine par l'anticorps SP31-TMR entier ou les fragments F(ab') ₂ , Ac-red, Fab' et Fab	159
Figure 62 : Courbe d'étalonnage de la SP avec l'Ac SP31-TMR entier ou F(ab') ₂ , Ac-red, Fab' et Fab.....	159
Figure 63 : Gammes de tripodes Ala ¹⁰ SP-biot-Fluorescéine, A488, A532, A546, TMR et A647	161
Figure 64 : Effet de la fluorescence de l'anticorps sur le <i>quenching</i> sur phase solide (tripode Fluorescéine)....	163
Figure 65 : Spectres d'absorbance des marqueurs Fluorescéine, QSY7, A647, A680, QSY21 et TMR libres et liés à l'AcM SP31-TMR	164
Figure 66 : Dosage EIA compétitif avec les anticorps AcM ATZ 1, ATZ 2 et ATZ 3	172
Figure 67 : Influence du marquage à l'A647 des anticorps ATZ 1, ATZ 2 et ATZ 3 sur leur capacité de liaison à l'Atz-AChE.....	174
Figure 68 : Comparaison de la fluorescence sur phase solide et du <i>quenching</i> par l'anticorps AcM ATZ 3-A647 pour les tripodes peptide T-Atz-532 , BSA-Atz-A532 et BSA-Atz-TMR	176
Figure 69 : Test de liaison des AcM 1, AcM 2 et AcM 3-A647 avec le tripode T-Atz-A532 avec mesure du <i>quenching</i> ou de la fluorescence de l'anticorps-A647	178
Figure 70 : Influence de la concentration en tripode sur le pourcentage de <i>quenching</i>	180
Figure 71 : Tests SPIT-FRI de <i>quenching</i> et déplacement pour AFB1	182
Figure 72 : Influence de la durée de la réaction de couplage de la BLg sur la reconnaissance par l'AcM 97	191
Figure 73 : Reconnaissance du tripode BLg Fluorescéine (F1, F2, F5, F10 ou F20) fixé sur la phase solide neutravidine par l'anticorps AcM 117-AChE	191
Figure 74 : Influence du rapport de couplage biotine/BLg et fluorescéine/BLg sur la concentration en BLg native (R=1, 2, 5, 10 ou 20).....	192

Figure 75 : Influence du marquage de la BLg par les fluorophores (Fluorescéine, A488, TMR, A532, Cy5.0, A647) sur la reconnaissance par l'antisérum polyclonal GB1	193
Figure 76 : Influence du marquage à la TMR des anticorps AcM BLg 2, 75, 88, 97 et 117 sur leur capacité de reconnaissance de la BLg-AChE	195
Figure 77 : Fluorescence du tripode BLg-Fluorescéine en solution pour des rapports de couplage Fluorescéine/BLg de 1,2,5,10 et 20	198
Figure 78 : <i>Quenching</i> des tripodes BLg-biot-Fluorescéine (F1, F2,F5 et F10) par l'anticorps AcM 75-TMR .	198
Figure 79 : Comparaison des anticorps AcM 75, 88, 97 et 117-TMR pour le <i>quenching</i> du tripode BLg-F1	199
Figure 80 : Courbes de déplacement avec le standard Hc/TBA pour les 14 anticorps AcMTB (traceur Hc-TBA biotinylé).....	206
Figure 81 : Comparaison du déplacement avec Hc/TBA et TBA pour les 14 anticorps AcMTB.....	208
Figure 82 : Dosages par compétition avec les traceurs Hc1 et Hc2 biotinylés.....	210
Figure 83 : Dosages par compétition de RicA, RicB et Ricine entière avec 4 anticorps	214
Figure 84 : Test de liaison des anticorps RCB 1 et 2 -AChE avec RicB-biot et RicB-biot-A532 (en format ELISA sur plaque neutravidine).....	216
Figure 85 : Mise au point du dosage SPIT-FRI de la Ricine.....	218
Figure 86 : Schéma du montage expérimental pour les expériences en circulation de fluide	222
Figure 87 : Gamme de tripode SP-A532 en solution dans un capillaire	224
Figure 88 : Coupe transversale d'un capillaire revêtu de tripode SP-A532 ou contenant le tripode en solution	225
Figure 89 : Images avant et après <i>quenching</i> du tripode SP-Fluorescéine par l'anticorps AcSP31-TMR en capillaire.....	227
Figure 90 : Déplacements successifs en statique.....	230
Figure 91 : Gamme de tripode Ala ¹⁰ SP-A488 en capillaire	231
Figure 92 : Mise en évidence du photoblanchiment.....	231
Figure 93 : Distribution de fluorescence le long d'un capillaire revêtu de tripode SP-A532.....	234
Figure 94 : Cinétique de <i>quenching</i> du tripode Ala ¹⁰ SP-biot-A532 par AcM SP31 A647 en capillaire à 2µL/min	236
Figure 95 : Cinétique de la dissociation et de déplacement du complexe tripode SP-A532/SP31-A647 par la SP à 1 µM à 2 µL / min.....	237
Figure 96 : Influence de la présence de glycérol dans le tampon d'immobilisation sur l'intensité des plots.....	241
Figure 97 : Exemple de plots fluorescents (gamme de concentration de tripode).....	241
Figure 98 : Passage d'une solution de SP à 1 µM sur lame (20 µL/min).....	246
Figure 99 : Suivi cinétique de la fluorescence de FabSP31-Fluorescéine et de la Fluorescéine libre dans des puits lavés ou non	252
Figure 100 : Adsorption de la BLg-A488 dans des puits <i>Maxisorp</i>	254

Figure 101 : Comparaison du signal fluorescent sur phase solide sur plaques noires et blanches	256
Figure 102 : Comparaison des traceurs BLg Fluorescéine, A488, TMR, A532, Cy5.0 et A647 avec l'anticorps polyclonal GB1	260
Figure 103 : Illustration de la méthode d'analyse des courbes cinétiques par régression linéaire sur les 11 premières minutes de réaction.....	261
Figure 104 : Courbes standards du dosage BLg en point final (durée d'incubation = 2 h) et en mode cinétique (11 min), pour 3 concentrations en antisérum.....	262
Figure 105 : Atténuation de fluorescence (%) pour différentes concentrations d'anticorps AFA-A647 et ATB-A647et d'analogue peptideT(biot)-AFB1	264
Figure 106 : Dosage de l'Aflatoxine par mesure de l'atténuation de fluorescence.....	266
Figure 107 : Influence du marquage des anticorps Anti-RicA (RCA 1 et 2) et Anti-RicB (RCB 1 et 2) avec l'Alexa 647 sur la reconnaissance de RicA-biot et RicB-biot.....	269
Figure 108 : Test de combinaisons d'Anticorps anti-ricine (Anticorps de capture / Anticorps traceur) avec mesure de l'atténuation de fluorescence sur phase solide	270
Figure 109 : Gamme d'étalonnage du dosage de la Ricine (mesure en point final après 18 h d'incubation). Comparaison de la mesure de l'atténuation de fluorescence et de la fluorescence sur phase solide.....	272
Figure 110 : Gamme d'étalonnage de la Ricine pour différentes durées d'incubation (t= 3 min à t= 1 h30).	274
Figure 111 : Cinétique obtenue en format sandwich pour 5 concentrations en ricine.....	275
Figure 112 : Courbes d'étalonnage de la Ricine (analyse en point final à t=1h30, analyse sur les données acquises en cinétiques durant 1h30, et analyse sur les données acquises en cinétiques durant 12 minutes).....	278
Figure 113 : Courbe d'étalonnage pour la Ricine entière et les chaînes A et B de la ricine.	279
Figure 114 : Courbe d'étalonnage de la BLg native en format immunométrique.....	281
Figure 115 : Courbe d'étalonnage de la Rcm-BLg en format immunométrique.....	281
Figure 116 : Courbes d'étalonnage de la Rcm-BLg (A) et de la BLg (B) en format immunométrique (dosage simultané).....	283
Figure 117 : Suivi de la dénaturation thermique du lait par le dosage simultané de la BLg sous forme native et sous forme Rcm-BLg.....	285

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux agents du bioterrorisme.....	18
Tableau 2 : Origines de l'immunoanalyse.....	30
Tableau 3 : Récapitulatif des molécules-modèles choisies pour la mise au point du dosage.....	60
Tableau 4 : Jeux de filtres du fluorimètre Envision.....	70
Tableau 5 : Structure et propriétés spectrales des fluorophores et <i>quencher</i> s utilisés.....	80
Tableau 6 : Structure des triazines utilisées.....	84
Tableau 7 : Séquence des peptides PepTB-01 à 11.....	88
Tableau 8 : Coefficients d'extinction molaire et facteurs correctifs des fluorophores et <i>quencher</i> s.....	98
Tableau 9 : Comparaison des lecteurs Spectramax et Analyst pour la mesure de la fluorescence sur phase solide.....	129
Tableau 10 : Analyse de la concentration en Substance P (en ng/mL) d'échantillons de cerveau et de moëlle épinière de souris et de rats (dosage SPIT-FRI <i>versus</i> EIA par compétition).....	146
Tableau 11 : $A_{518\text{ nm}}/A_{555\text{ nm}}$ et ratio TMR/Ac de l'AcM SP31-TMR dans différents rapports de couplage.....	152
Tableau 12 : Valeurs de l'aire de recouvrement J et du R_0 pour les couples (D,A) testés.....	163
Tableau 13 : Pourcentage de <i>quenching</i> maximal des couples (D,A) testés.....	166
Tableau 14 : EC50 (nM) obtenu avec les couples (D,A) sélectionnés.....	166
Tableau 15 : Pourcentages de réaction croisée de différentes triazines par rapport à l'atrazine pour les anticorps ATZ 1, ATZ 2 et ATZ 3.....	172
Tableau 16 : Test combinatoire des anticorps AcM TB avec Hc/TBA.....	202
Tableau 17 : Test combinatoire des anticorps AcMTB avec TBA (10 ng/mL).	204
Tableau 18 : Comparaison des 14 AcM TB pour la reconnaissance de Hc1 et Hc2.....	208
Tableau 19 : Pourcentage de <i>quenching</i> pour différents couples (D, A) en capillaire.....	228

Abréviations

A : Accepteur

Ac : Anticorps (Ac* : anticorps marqué)

AChE : AcétylCholinEstérase

AcM : Anticorps monoclonal

Ag : Antigène (Ag* : antigène marqué)

AFB1 : Aflatoxine B1

Atz : Atrazine

Biot : Biotine

BLg : β -Lactoglobuline bovine

BSA : séralbumine bovine

CAS : anticorps polyclonal de Chèvre Anti-immunoglobulines de Souris

CCD : *Charge Coupled Device*

CV : coefficient de variation

D : fluorophore Donneur

DCC : N,N'-dicyclohexylcarbodiimide

DMF : DiMéthyl Formamide

DO : Densité Optique

DTNB : acide 5,5'-DiThiobis-(2-NitroBenzoïque)

EC50 : concentration d'analyte entraînant 50% d'inhibition du signal (dosages par compétition)

EDC : 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

EIA : *Enzyme ImmunoAssay* ou dosage enzymoimmunologique

F : Fluorophore

FIA : *Fluorescence ImmunoAssay* ou dosage immunofluorescent

FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (transfert d'énergie par résonance de fluorescence)

% IQ : pourcentage d'inhibition du *quenching* correspondant au déplacement du traceur par l'analyte aboutissant à une augmentation du signal (notation utilisée pour le dosage SPIT-FRI).

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography* (chromatographie liquide à haute performance)

IFC : Immunocapteur en Flux Continu

k_{on} : constante cinétique d'association

k_{off} : constante cinétique de dissociation

Ka : constante d'association

Maldi-TOF : *Matrix assisted laser desorption ionization – Time Of Flight*

NG : Niveaux de gris

NHS : N-hydroxysuccinimide

Q : *quencher* ou molécule accepteur capable d'éteindre tout ou partie de la fluorescence du donneur

% Q : pourcentage de *quenching* ou de diminution de la fluorescence de D par A (notation utilisée pour le dosage SPIT-FRI)

Rcm-BLg : β -lactoglobuline réduite et carbamidométhylée

RIA : *RadioImmunoAssay* ou dosage radioimmunologique

Ric : Ricine (protéine entière)
RicA : Chaîne protéique A de la ricine
RicB : Chaîne protéique B de la ricine
RFU : *Relative Fluorescence Unit* (équivalent de la notation UAF en français)
RT : *Room Temperature* ou température ambiante
SAL : anticorps monoclonal de Souris Anti-immunoglobulines de Lapin
SATA : ester N-hydroxysuccinimidique de l'acide S-thioacétyl acétique
SEB : Entérotoxine B de *Staphylococcus aureus*.
SMCC : ester N-hydroxysuccinimidique de l'acide maléimido cyclohexane-1-carboxylique
SP : Substance P
SPI-FIA : *Solid-Phase Inhibited Fluorescence ImmunoAssay*
SPIT-FRI : *Solid-Phase Immobilized Tripod for Fluorescence Renewable Immunoassay*
TBA : Toxine Botulique (*Clostridium botulinum*) de sérotype A
TMR : TetraMéthylRhodamine
TFA : acide trifluoroacétique
UAF : Unité Arbitraire de Fluorescence
UE : Unité Ellman
UV : Ultra-Violets

Références bibliographiques

Adel-Patient K. *Evaluation de la réponse immunitaire à un allergène alimentaire, la bêta-lactoglobuline bovine, chez la souris dans un modèle expérimental de sensibilisation. Influence du mode de présentation de l'allergène sur la polarisation de la réponse.* Thèse de doctorat. Université René Descartes Paris V.

Aizawa M., Morioka A., Suzuki S. & Nagamura Y. Enzyme immunosensor. III. Amperometric determination of human chorionic gonadotropin by membrane-bound antibody. *Anal. Biochem.*, 1979, vol. 94 (1), p.22-28.

Albani J.R. *Absorption et Fluorescence. Principes et applications.* Tec&Doc, 2001, 246 p.

Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat. Biotechnol.*, 2004, vol. 22 (1), p.47-52.

Alocilja E.C. & Radke S.M. Market analysis of biosensors for food safety. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, vol. 18 (5-6), p.841-846.

Amersdorfer P., Wong C., Chen S., Smith T., Deshpande S., Sheridan R. et al. Molecular characterization of murine humoral immune response to botulinum neurotoxin type A binding domain as assessed by using phage antibody libraries. *Infect. Immun.*, 1997, vol. 65 (9), p.3743-3752.

Anderson G.P., King K.D., Gaffney K.L. & Johnson L.H. Multi-analyte interrogation using the fiber optic biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 2000, vol. 14 (10-11), p.771-777.

Arai R., Nakagawa H., Tsumoto K., Mahoney W., Kumagai I., Ueda H. et al. Demonstration of a homogeneous noncompetitive immunoassay based on bioluminescence resonance energy transfer. *Anal. Biochem.*, 2001, vol. 289 (1), p.77-81.

Arnon S.S., Schechter R., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S. et al. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*, 2001, vol. 285 (8), p.1059-1070.

Astles J.R. & Miller W.G. Measurement of free phenytoin in blood with a self-contained fiber-optic immunosensor. *Anal. Chem.*, 1994, vol. 66 (10), p.1675-1682.

Atassi M.Z. & Smith J.A. A proposal for the nomenclature of antigenic sites in peptides and proteins. *Immunochemistry.*, 1978, vol. 15 (8), p.609-610.

Attridge J.W., Daniels P.B., Deacon J.K., Robinson G.A. & Davidson G.P. Sensitivity enhancement of optical immunosensors by the use of a surface plasmon resonance fluoroimmunoassay. *Biosens. Bioelectron.*, 1991, vol. 6 (3), p.201-214.

Bacigalupo M.A., Ius A., Longhi R. & Meroni G. Homogeneous immunoassay of atrazine in water by terbium-entrapping liposomes as fluorescent markers. *Talanta*, 2003, vol. 61 (4), p.539-545.

Baker D.A. & Gough D.A. Dynamic delay and maximal dynamic error in continuous biosensors. *Anal. Chem.*, 1996, vol. 68, p.1292-1297.

Bakker E. & Telting-Diaz M. Electrochemical sensors. *Anal. Chem.*, 2002, vol. 74 (12), p.2781-2800.

Barzen C., Brecht A. & Gauglitz G. Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control. *Biosensors and Bioelectronics*, 2002, vol. 17 (4), p.289-295.

- Baselt D.R., Lee G.U., Natesan M., Metzger S.W., Sheehan P.E. & Colton R.J. A biosensor based on magnetoresistance technology. *Biosensors and Bioelectronics*, 1998, vol. 13 (7-8), p.731-739.
- Bazin H., Preaudat M., Trinquet E. & Mathis G. Homogeneous time resolved fluorescence resonance energy transfer using rare earth cryptates as a tool for probing molecular interactions in biology. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2001, vol. 57 (11), p.2197-2211.
- Bhatnagar D., Yu J. & Ehrlich K.C. Toxins of filamentous fungi. *Chem. Immunol*, 2002, vol. 81, p.167-206.
- Binder P., Attre O., Boutin J.P., Cavallo J.D., Debord T., Jouan A. et al. Medical management of biological warfare and bioterrorism: place of the immunoprevention and the immunotherapy. *Comp Immunol Microbiol. Infect. Dis.*, 2003, vol. 26 (5-6), p.401-421.
- Birbaum S., Uden C., Magnusson C.G. & Nilsson S. Latex-based thin-layer immunoaffinity chromatography for quantitation of protein analytes. *Anal. Biochem.*, 1992, vol. 206 (1), p.168-171.
- Bonnet G., Tyagi S., Libchaber A. & Kramer F.R. Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 1999, vol. 96 (11), p.6171-6176.
- Bravata D.M., Sundaram V., McDonald K.M., Smith W.M., Szeto H., Schleinitz M.D. et al. Evaluating detection and diagnostic decision support systems for bioterrorism response. *Emerg. Infect. Dis.*, 2004, vol. 10 (1), p.100-108.
- Brossier P., Jaouen G., Limoges B., Salmain M., Vessieres-Jaouen A. & Yvert J.P. [Contribution of simultaneous multiple immunoassays to biology] Apport des immunoanalyses multiple simultanees a la biologie. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*, 2001, vol. 59 (6), p.677-691.
- Burke T.J., Loniello K.R., Beebe J.A. & Ervin K.M. Development and application of fluorescence polarization assays in drug discovery. *Comb. Chem. High Throughput. Screen.*, 2003, vol. 6 (3), p.183-194.
- Catt K., Niall H.D. & Tregear G.W. Solid phase radioimmunoassay. *Nature*, 1967, vol. 213 (78), p.825-827.
- Center for Disease Control and Prevention Outbreak of aflatoxin poisoning--eastern and central provinces, Kenya, January-July 2004. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 2004, vol. 53 (34), p.790-793.
- Center for Disease Control and Prevention Bioterrorism Agents/Diseases. Disponible sur le site: <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp#cdef>. 2006, Department of Health and Human Services, United States government, Atlanta, USA.
- Chang M.M. & Leeman S.E. Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P. *J. Biol. Chem.*, 1970, vol. 245 (18), p.4784-4790.
- Chang Y.H., Chang T.C., Kao E.F. & Chou C. Detection of protein A produced by *Staphylococcus aureus* with a fiber-optic-based biosensor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1996, vol. 60 (10), p.1571-1574.
- Christensen D.R., Hartman L.J., Loveless B.M., Frye M.S., Shipley M.A., Bridge D.L. et al. Detection of biological threat agents by real-time PCR: comparison of assay performance on the R.A.P.I.D., the LightCycler, and the Smart Cycler platforms. *Clin Chem.*, 2006, vol. 52 (1), p.141-145.
- Chu F.S., Hsia M.T. & Sun P.S. Preparation and characterization of aflatoxin B₁-1-(O-carboxymethyl) oxime. *J Assoc. Off Anal. Chem.*, 1977, vol. 60 (4), p.791-794.
- Clapp A.R., Medintz I.L., Mauro J.M., Fisher B.R., Bawendi M.G. & Mattoussi H. Fluorescence Resonance Energy Transfer Between Quantum Dot Donors and Dye-Labeled Protein Acceptors. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, vol. 126 (1), p.301-310.

Clark L.C. & Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, vol. 102, p.29-45.

Clayton M.A., Clayton J.M., Brown D.R. & Middlebrook J.L. Protective vaccination with a recombinant fragment of Clostridium botulinum neurotoxin serotype A expressed from a synthetic gene in Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 1995, vol. 63 (7), p.2738-2742.

Clement G., Boquet D., Frobert Y., Bernard H., Negroni L., Chatel J.M.et al. Epitopic characterization of native bovine beta-lactoglobulin. *J Immunol. Methods*, 2002, vol. 266 (1-2), p.67-78.

Cohen J. & Marshall E. Bioterrorism. Vaccines for biodefense: a system in distress. *Science*, 2001, vol. 294 (5542), p.498-501.

Commission Européenne Décision de la Commission du 10 mars 2004 concernant la non-inscription de l'atrazine à l'annexe I de la directive 91/414/CEE du Conseil et le retrait des autorisations accordées aux produits phytopharmaceutiques contenant cette substance active (2004/248/CE). Disponible sur le site: <http://europa.eu.int/eur-lex/fr>, 2004.

Couraud J.Y., Frobert Y., Conrath M., Renzi D., Grassi J., Drapeau G.et al. Monoclonal antibodies to substance P: production, characterization of their fine specificities, and use in immunocytochemistry. *Journal of Neurochemistry*, 1987, vol. 49, p.1708-1719.

Cousino M.A., Jarbawi T.B., Halsall H.B. & Heineman W.R. Pushing down the limits of detection: molecular needles in a haystack. *Anal. Chem.*, 1997, vol. 69 (17), p.544A-549A.

Creminon C., Dery O., Frobert Y., Couraud J.Y., Pradelles P. & Grassi J. Two-Site Immunometric Assay for Substance P with Increased Sensitivity and Specificity. *Anal. Chem.*, 1995, vol. 67 (9), p.1617-1622.

Dandliker W.B., Kelly R.J., Dandliker J., Farquahar J. & Levin J. Fluorescence polarization immunoassay. Theory and experimental method. *Immunochemistry.*, 1973, vol. 10 (4), p.219-227.

Darling R.G., Catlett C.L., Huebner K.D. & Jarrett D.G. Threats in bioterrorism. I: CDC category A agents. *Emerg. Med. Clin North Am.*, 2002, vol. 20 (2), p.273-309.

DasGupta B.R. & Dekleva M.L. Botulinum neurotoxin type A: sequence of amino acids at the N-terminus and around the nicking site. *Biochimie*, 1990, vol. 72 (9), p.661-664.

Davidson M.W. Disponible sur le site: <http://micro.magnet.fsu.edu/>, 2006, National High Magnetic Field Laboratory, Tallahassee, Florida, USA.

Dmitriev D.A., Massino Y.S. & Segal O.L. Kinetic analysis of interactions between bispecific monoclonal antibodies and immobilized antigens using a resonant mirror biosensor. *J. Immunol. Methods*, 2003, vol. 280 (1-2), p.183-202.

Doan L.G. Ricin: mechanism of toxicity, clinical manifestations, and vaccine development. A review. *J Toxicol. Clin Toxicol.*, 2004, vol. 42 (2), p.201-208.

Dubertret B., Calame M. & Libchaber A.J. Single-mismatch detection using gold-quenched fluorescent oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.*, 2001, vol. 19 (4), p.365-370.

Dye D.H. Sensors for Screening and Surveillance (Lawrence Livermore National Laboratory,USA). *Conference on Technology for Preventing Terrorism, Stanford, CA (Mars 2002)*, 2002.

Edelman G.M., Cunningham B.A., Gall W.E., Gottlieb P.D., Rutishauser U. & Waxdal M.J. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1969, vol. 63 (1), p.78-85.

Eitzen E., Facep F. & Takafuji E.T. Historical overview of biological warfare. Dans : *Medical aspects of chemical and biological warfare* (chapitre 18) de F.R.Sidell, E.T.Takafuji et D.R.Franz. TMM Publications, Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center (Washington, DC, USA), 1997.

Ekins R.P. New perspectives in radioimmunoassay. *Nucl. Med. Commun.*, 1993, vol. 14 (9), p.721-735.

Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Jr. & Feather-Stone R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, vol. 7, p.88-95.

Engvall E. & Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.*, 1971, vol. 8 (9), p.871-874.

Eubanks L.M., Dickerson T.J. & Janda K.D. Vitamin B2-mediated cellular photoinhibition of botulinum neurotoxin A. *FEBS Lett.*, 2005, vol. 579 (24), p.5361-5364.

Fivash M., Towler E.M. & Fisher R.J. BIAcore for macromolecular interaction. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1998, vol. 9 (1), p.97-101.

Foster P.L., Eisenstadt E. & Miller J.H. Base substitution mutations induced by metabolically activated aflatoxin B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1983, vol. 80 (9), p.2695-2698.

Foxwell B.M., Detre S.I., Donovan T.A. & Thorpe P.E. The use of anti-ricin antibodies to protect mice intoxicated with ricin. *Toxicology*, 1985, vol. 34 (1), p.79-88.

Franz D.R., Jahrling P.B., Friedlander A.M., McClain D.J., Hoover D.L., Bryne W.R. et al. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *JAMA*, 1997, vol. 278 (5), p.399-411.

Geoghegan K.F., Rosner P.J. & Hoth L.R. Dye-pair reporter systems for protein-peptide molecular interactions. *Bioconj. Chem.*, 2000, vol. 11 (1), p.71-77.

Goldman E.R., Clapp A.R., Anderson G.P., Uyeda H.T., Mauro J.M., Medintz I.L. et al. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents. *Anal. Chem.*, 2004, vol. 76 (3), p.684-688.

Goodrow M., Harrison R. & Hammock B. Hapten synthesis, antibody development and competitive inhibition enzyme immunoassay for s-triazine herbicides. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, vol. 35, p.990-996.

Gottschalk M., Nilsson H., Roos H. & Halle B. Protein self-association in solution: the bovine beta - lactoglobulin dimer and octamer. *Protein Sci.*, 2003, vol. 12 (11), p.2404-2411.

Grassi J. *Etude immunologique des cholinestérases. Utilisation de l'acétylcholinestérase de Gymnote en tant que traceur dans des dosages immunologiques.*, Thèse de doctorat, Université Paris 6, spécialité Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 304 p.

Grassi J., Frobert Y., Lamourette P. & Lagoutte B. Screening of monoclonal antibodies using antigens labeled with acetylcholinesterase: application to the peripheral proteins of photosystem 1. *Anal. Biochem.*, 1988, vol. 168 (2), p.436-450.

Grassi J. & Pradelles P. *Composé marqué par une enzyme ; son procédé de préparation et son utilisation en enzymoimmunologie.* Commissariat à l'Énergie Atomique - Institut de Recherche Fondamentale, 1983, Brevet français n°83-13389.

Hamman B.D., Oleinikov A.V., Jokhadze G.G., Bochkariov D.E., Traut R.R. & Jameson D.M. Tetramethylrhodamine dimer formation as a spectroscopic probe of the conformation of Escherichia coli ribosomal protein L7/L12 dimers. *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271 (13), p.7568-7573.

- Harma H., Soukka T., Lonnberg S., Paukkunen J., Tarkkinen P. & Lovgren T. Zeptomole detection sensitivity of prostate-specific antigen in a rapid microtitre plate assay using time-resolved fluorescence. *Luminescence.*, 2000, vol. 15 (6), p.351-355.
- Harvey R.B., Kubena L.F., Phillips T.D., Corrier D.E., Elissalde M.H. & Huff W.E. Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Am. J. Vet. Res.*, 1991, vol. 52 (1), p.152-156.
- Hassani M., Patel M.C. & Pirofski L.A. Vaccines for the prevention of diseases caused by potential bioweapons. *Clin Immunol*, 2004, vol. 111 (1), p.1-15.
- Hemmila I. Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays. *Clin Chem.*, 1985, vol. 31 (3), p.359-370.
- Hibbs R.G., Weber J.T., Corwin A., Allos B.M., Abd el Rehim M.S., Sharkawy S.E. et al. Experience with the use of an investigational F(ab')₂ heptavalent botulism immune globulin of equine origin during an outbreak of type E botulism in Egypt. *Clin Infect. Dis.*, 1996, vol. 23 (2), p.337-340.
- Hindson B.J., Makarewicz A.J., Setlur U.S., Henderer B.D., McBride M.T. & Dzenitis J.M. APDS: the autonomous pathogen detection system. *Biosens. Bioelectron.*, 2005, vol. 20 (10), p.1925-1931.
- Hisamoto H., Nakashima Y., Kitamura C., Funano S., Yasuoka M., Morishima K. et al. Capillary-assembled microchip for universal integration of various chemical functions onto a single microfluidic device. *Anal. Chem.*, 2004, vol. 76 (11), p.3222-3228.
- Hokfelt T., Pernow B. & Wahren J. Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J Intern. Med.*, 2001, vol. 249 (1), p.27-40.
- Holt D.B., Kusterbeck A.W. & Ligler F.S. Continuous flow displacement immunosensors: a computational study. *Anal. Biochem.*, 2000, vol. 287 (2), p.234-242.
- Idaho Technology RAZOR. Disponible sur le site: <http://www.idahotech.com/razor/index.html>, 2006.
- International Agency for Research on Cancer . [IARC monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans](#). IARC (Lyon, France)[56]. 1996.
- Ishikawa E., Imagawa M., Hashida S., Yoshitake S., Hamaguchi Y. & Ueno T. Enzyme-labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining. *J. Immunoassay*, 1983, vol. 4 (3), p.209-327.
- Jablonski A. Uber den Mechanismus des Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. *Z. Phys.*, 1935, vol. 94, p.38-46.
- Janin J. Principles of protein-protein recognition from structure to thermodynamics. *Biochimie*, 1995, vol. 77 (7-8), p.497-505.
- Kakabakos S.E., Georgiou S., Petrou P.S. & Christofidis I. Heterogeneous fluoroimmunoassays using fluorescein as label with measurement of the fluorescence signal directly onto the solid-phase. *J. Immunol. Methods*, 1999, vol. 222 (1-2), p.183-187.
- Kamel R., Landon J. & Forrest G.C. A fully automated, continuous-flow radioimmunoassay for methotrexate. *Clin. Chem.*, 1980, vol. 26 (1), p.97-100.
- Karlsson R., Michaelsson A. & Mattsson L. Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *J. Immunol. Methods*, 1991, vol. 145 (1-2), p.229-240.
- Karush F. Specificity of antibodies. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, 1958, vol. 20 (7), p.581-592.

- Kientz C.E. Chromatography and mass spectrometry of chemical warfare agents, toxins and related compounds: state of the art and future prospects. *J Chromatogr. A*, 1998, vol. 814 (1-2), p.1-23.
- King K.D., Anderson G.P., Bullock K.E., Regina M.J., Saaski E.W. & Ligler F.S. Detecting staphylococcal enterotoxin B using an automated fiber optic biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 1999, vol. 14, p.163-170.
- Knecht B.G., Strasser A., Dietrich R., Martlbauer E., Niessner R. & Weller M.G. Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk. *Anal. Chem.*, 2004, vol. 76 (3), p.646-654.
- Köhler G. & Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, vol. 256 (5517), p.495-497.
- Kontopidis G., Holt C. & Sawyer L. Invited review: beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *J Dairy Sci.*, 2004, vol. 87 (4), p.785-796.
- Kortepeter M.G. & Parker G.W. Potential biological weapons threats. *Emerg. Infect. Dis.*, 1999, vol. 5 (4), p.523-527.
- Krishnamachari K.A., Bhat R.V., Nagarajan V. & Tilak T.B. Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in Western India. *Lancet*, 1975, vol. 1 (7915), p.1061-1063.
- Kumosinski T.F. & Timasheff S.N. Molecular interactions in beta-lactoglobulin. X. The stoichiometry of the beta-lactoglobulin mixed tetramerization. *J Am. Chem. Soc.*, 1966, vol. 88 (23), p.2635-2642.
- Lacy D.B., Tepp W., Cohen A.C., DasGupta B.R. & Stevens R.C. Crystal structure of botulinum neuro-toxin type A and implications for toxicity. *Nature Structural Biology*, 1998, vol. 5 (10), p.898-902.
- Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press (New York), 1983.
- Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Second edition. Plenum Press (New York), 1999.
- Lebedev A.T. Mass spectrometry in identification of ecotoxicants including chemical and biological warfare agents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, vol. 207 (2 Suppl), p.451-458.
- Lee N.A., Wang S., Allan R.D. & Kennedy I.R. A rapid aflatoxin B1 ELISA: development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and Soybeans. *J Agric. Food Chem.*, 2004, vol. 52 (10), p.2746-2755.
- Leonard J.E., Tanney L.E., Collins M.L., Royston I. & Taetle R. Monoclonal antibodies to purified ricin A-chain: production and properties. *Hybridoma*, 1987, vol. 6 (2), p.135-149.
- Lichlyter D.A., Grant S.A. & Soykan O. Development of a novel FRET immunosensor technique. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, vol. 19, p.219-226.
- Liedberg B., Nylander C. & Lundström I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors Actuators*, 2006, vol. 4, p.299.
- Ligler F.S., Anderson G.P., Davidson P.T., Foch R.J., Ives J.T., King K.D. et al. Remote sensing using airborne biosensor. *Environ. Sci. Technol.*, 1998, vol. 32, p.2461-2466.
- Ling C.M. & Overby L.R. Prevalence of hepatitis B virus antigen as revealed by direct radioimmune assay with 125 I-antibody. *J Immunol.*, 1972, vol. 109 (4), p.834-841.
- Lobmaier C., Hawa G., Gotzinger M., Wirth M., Pittner F. & Gabor F. Direct monitoring of molecular recognition processes using fluorescence enhancement at colloid-coated microplates. *J. Mol. Recognit.*, 2001, vol. 14 (4), p.215-222.
- Lochner N., Lobmaier C., Wirth M., Leitner A., Pittner F. & Gabor F. Silver nanoparticle enhanced immunoassays: one step real time kinetic assay for insulin in serum. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2003, vol. 56 (3), p.469-477.

- Lopez M.A., Ortega F., Dominguez E. & Katakis I. Electrochemical immunosensor for the detection of atrazine. *J. Mol. Recognit.*, 1998, vol. 11 (1-6), p.178-181.
- Lukomska J., Malicka J., Gryczynski I. & Lakowicz J.R. Fluorescence enhancements on silver colloid coated surfaces. *J Fluoresc.*, 2004, vol. 14 (4), p.417-423.
- Maddaloni M., Cooke C., Wilkinson R., Stout A.V., Eng L. & Pincus S.H. Immunological characteristics associated with the protective efficacy of antibodies to ricin. *J Immunol*, 2004, vol. 172 (10), p.6221-6228.
- Marquette C.A. & Blum L.J. State of the art and recent advances in immunoanalytical systems. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, vol. 21 (8), p.1424-1433.
- Mathis G. Les cryptates de terres rares : un nouveau type de marqueur fluorescent. *Isotopics (bulletin d'informations scientifiques de la société Cis bio international)*, 1995, vol. 3, p.2-5.
- Mathis G. & Roux F. La méthode T.R.A.C.E. (Time Resolved Cryptate Emission). *Revue de l'ACOMEN*, 1998, vol. 4 (3), p.220-224.
- McLean M. & Dutton M.F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacol. Ther.*, 1995, vol. 65 (2), p.163-192.
- Medintz I.L., Goldman E.R., Lassman M.E. & Mauro J.M. A fluorescence resonance energy transfer sensor based on maltose binding protein. *Bioconjug. Chem.*, 2003, vol. 14 (5), p.909-918.
- Medintz I.L., Konnert J.H., Clapp A.R., Stanish I., Twigg M.E., Mattoussi H. et al. A fluorescence resonance energy transfer-derived structure of a quantum dot-protein bioconjugate nanoassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, vol. 101 (26), p.9612-9617.
- Middlebrook J.L. & Franz D.R. Dans : *Botulinum Toxins* (chapitre 33). Borden Institute (Washington, DC, USA), 1997, p. 643-654.
- Miles L.E. & Hales C.N. Immunoradiometric assay of human growth hormone. *Lancet*, 1968, vol. 2 (7566), p.492-493.
- Misiakos K. & Kakabakos S.E. A multi-band capillary immunosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 1998, vol. 13 (7-8), p.825-830.
- Moran G.J. Threats in bioterrorism. II: CDC category B and C agents. *Emerg. Med. Clin North Am.*, 2002, vol. 20 (2), p.311-330.
- Moreno-Bondi M.C., Taitt C.R., Shriver-Lake L.C. & Ligler F.S. Multiplexed measurement of serum antibodies using an array biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, vol. 21 (10), p.1880-1886.
- Murphy C.J. Optical sensing with quantum dots. *Anal. Chem.*, 2002, vol. 74 (19), p.520A-526A.
- Nakamura H. & Karube I. Current research activity in biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, vol. 377 (3), p.446-468.
- Narang U., Gauger P.R. & Ligler F.S. Capillary-based Displacement Flow Immunosensor. *Anal. Chem.*, 1997, vol. 69, p.1961-1964.

Negrone L., Bernard H., Clement G., Chatel J.M., Brune P., Frobert Y. et al. Two-site enzyme immunometric assays for determination of native and denatured beta-lactoglobulin. *J Immunol Methods*, 1998, vol. 220 (1-2), p.25-37.

New Horizons Diagnostics Corp. SMART Ticket. Disponible sur le site: <http://www.nhdiag.com/>. 2006, Columbia, MD, USA.

Nicolson G.L. Ultrastructural analysis of toxin binding and entry into mammalian cells. *Nature*, 1974, vol. 251 (5476), p.628-630.

Nolan J.P., DiBenedetto G. & Tarsa N.J. Continuous-flow enzyme immunoassay for thyroxine in serum. *Clin. Chem.*, 1981, vol. 27 (5), p.738-741.

Olsnes S. & Pihl A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry*, 1973, vol. 12 (16), p.3121-3126.

Panchuk-Voloshina N., Haugland R.P., Bishop-Stewart J., Bhalgat M.K., Millard P.J., Mao F. et al. Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. *J. Histochem. Cytochem.*, 1999, vol. 47 (9), p.1179-1188.

Papiz M.Z., Sawyer L., Eliopoulos E.E., North A.C., Findlay J.B., Sivaprasadarao R. et al. The structure of beta-lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, 1986, vol. 324 (6095), p.383-385.

Park D.L. Effect of processing on aflatoxin. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2002, vol. 504, p.173-179.

Paumier G., Immunotest sur Chimie CEA-2 / Fonctionnalisation CEA-2 en phase vapeur, Rapport de stage INSA, CEA Leti, 2005, 81 p.

Pelizzola D., Bombardieri E., Brocchi A., Cappelli G., Coli A., Federghini M. et al. How alternative are immunoassay systems employing non-radioisotopic labels? A comparative appraisal of their main analytical characteristics. *Q. J Nucl. Med.*, 1995, vol. 39 (4), p.251-263.

Perrin F. La fluorescence des solutions. *Ann. Physik.*, 1929, vol. 10 (12), p.169-275.

Piazza R., Pierno M., Iacopini S., Mangione P., Esposito G. & Bellotti V. Micro-heterogeneity and aggregation in beta(2)-microglobulin solutions: effects of temperature, pH, and conformational variant addition. *Eur. Biophys. J.*, 2006, vol. 35 (5), p.439-445.

Pirrung M.C. How to make DNA chip. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 2002, vol. 41, p.1276-1289.

Pittman P.R., Leitman S.F., Oro J.G., Norris S.L., Marano N.M., Ranadive M.V. et al. Protective antigen and toxin neutralization antibody patterns in anthrax vaccinees undergoing serial plasmapheresis. *Clin Diagn. Lab Immunol*, 2005, vol. 12 (6), p.713-721.

Platshon M.C., Rocco R.M., Leung D., Jang L.S. & Kumar A. *Immunoassays in capillary tubes*. Idexx Laboratories I., 1999, United States Patent n°5,976,896.

Pless D.D., Torres E.R., Reinke E.K. & Bavari S. High-affinity, protective antibodies to the binding domain of botulinum neurotoxin type A. *Infect. Immun.*, 2001, vol. 69 (1), p.570-574.

Plowman T.E., Durstchi J.D., Wang H.K., Christensen D.A., Herron J.N. & Reichert W.M. Multiple-analyte fluoroimmunoassay using an integrated optical waveguide sensor. *Anal. Chem.*, 1999, vol. 71, p.4344-4352.

Poljak R.J., Amzel L.M., Avey H.P., Chen B.L., Phizackerley R.P. & Saul F. Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2,8-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1973, vol. 70 (12), p.3305-3310.

- Porter R.R. The structure of immunoglobulins. *Essays Biochem.*, 1967, vol. 3, p.1-24.
- Pradelles P., Grassi J., Creminon C., Boutten B. & Mamas S. Immunometric assay of low molecular weight haptens containing primary amino groups. *Anal. Chem.*, 1994, vol. 66, p.16-22.
- Rabbany S.Y., Donner B.L. & Ligler F.S. Optical immunosensors. *Crit Rev. Biomed. Eng.*, 1994, vol. 22, p.307-346.
- Rainey G.J. & Young J.A. Antitoxins: novel strategies to target agents of bioterrorism. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2004, vol. 2 (9), p.721-726.
- Rasband W.S. ImageJ. Disponible sur le site: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 2006, U.S.National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Rogers K.R., Cao C.J., Valdes J.J., Eldefrawi A.T. & Eldefrawi M.E. Acetylcholinesterase fiber-optic biosensor for detection of anticholinesterases. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1991, vol. 16 (4), p.810-820.
- Rowe C.A., Scruggs S.B., Feldstein M.J., Golden J.P. & Ligler F.S. An array immunosensor for simultaneous detection of clinical analytes. *Anal. Chem.*, 1999, vol. 71 (2), p.433-439.
- Sabelle S., Renard P.Y., Pecorella K., Suzzoni-Dezard S., Creminon C., Grassi J. et al. Design and synthesis of chemiluminescent probes for the detection of cholinesterase activity. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, vol. 124 (17), p.4874-4880.
- Sapsford K.E., Taitt C.R., Fertig S., Moore M.H., Lassman M.E., Maragos C.M. et al. Indirect competitive immunoassay for detection of aflatoxin B1 in corn and nut products using the array biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, vol. 21 (12), p.2298-2305.
- Schobel U., Egelhaaf H.J., Brecht A., Oelkrug D. & Gauglitz G. New donor-acceptor pair for fluorescent immunoassays by energy transfer. *Bioconjug. Chem.*, 1999, vol. 10, p.1107-1114.
- Schultz E., Perraut F., Neuburger L.M. & Volland H. Etude d'un système de dosage immunologique par fluorescence de très haute sensibilité. *Colloque "Méthodes et Techniques optiques pour l'industrie" (Belfort Novembre 2003)*, 2003.
- Scott A.B. & Suzuki D. Systemic toxicity of botulinum toxin by intramuscular injection in the monkey. *Mov Disord.*, 1988, vol. 3 (4), p.333-335.
- Seidel M., Dankbar D.M. & Gauglitz G. A miniaturized heterogeneous fluorescence immunoassay on gold-coated nano-titer plates. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, vol. 379 (7-8), p.904-912.
- Sheikh S.H. & Mulchandani A. Continuous-flow fluoro-immunosensor for paclitaxel measurement. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, vol. 16 (9-12), p.647-652.
- Shyu R.H., Shyu H.F., Liu H.W. & Tang S.S. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin. *Toxicon*, 2002, vol. 40 (3), p.255-258.
- Singh A.K., Kilpatrick P.K. & Carbonell R.G. Application of antibody and fluorophore-derivatized liposomes to heterogeneous immunoassays for d-dimer. *Biotechnol. Prog.*, 1996, vol. 12 (2), p.272-280.
- Singh K.V., Kaur J., Varshney G.C., Raje M. & Suri C.R. Synthesis and characterization of hapten-protein conjugates for antibody production against small molecules. *Bioconjug. Chem.*, 2004, vol. 15 (1), p.168-173.
- Skoog D.A., Holler F.J. & Nieman T.A. *Principes d'analyse instrumentale. Traduction et révision scientifique de la 5^{ème} édition américaine.* De Boeck Université (Paris), 2003, 956 p.
- Slater L.N. & Greenfield R.A. Biological toxins as potential agents of bioterrorism. *J Okla. State Med. Assoc.*, 2003, vol. 96 (2), p.73-76.

- Sokolov K., Chumanov G. & Cotton T.M. Enhancement of molecular fluorescence near the surface of colloidal metal films. *Anal. Chem.*, 1998, vol. 70 (18), p.3898-3905.
- Song L., Hennink E.J., Young I.T. & Tanke H.J. Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.*, 1995, vol. 68 (6), p.2588-2600.
- Spencer R.D., Toledo F.B., Williams B.T. & Yoss N.L. Design, construction, and two applications for an automated flow-cell polarization fluorometer with digital read out: enzyme-inhibitor (antitrypsin) assay and antigen-antibody (insulin-insulin antiserum) assay. *Clin Chem.*, 1973, vol. 19 (8), p.838-844.
- Stark A.A. Threat assessment of mycotoxins as weapons: molecular mechanisms of acute toxicity. *J Food Prot.*, 2005, vol. 68 (6), p.1285-1293.
- Stern M.C., Umbach D.M., Yu M.C., London S.J., Zhang Z.Q. & Taylor J.A. Hepatitis B, aflatoxin B(1), and p53 codon 249 mutation in hepatocellular carcinomas from Guangxi, People's Republic of China, and a meta-analysis of existing studies. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2001, vol. 10 (6), p.617-625.
- Stokes G.G. On the range of refrangibility of light. *Phil. Trans. R. Soc. London*, 1852, vol. 142, p.463-562.
- Suleiman A.A. & Guilbault G.G. Recent developments in piezoelectric immunosensors. A review. *Analyst*, 1994, vol. 119 (11), p.2279-2282.
- Szollosi J., Damjanovich S. & Matyus L. Application of fluorescence resonance energy transfer in the clinical laboratory: routine and research. *Cytometry*, 1998, vol. 34 (4), p.159-179.
- Tempelman L.A., King K.D., Anderson G.P. & Ligler F.S. Quantitating staphylococcal enterotoxin B in diverse media using a portable fiber-optic biosensor. *Anal. Biochem.*, 1996, vol. 233 (1), p.50-57.
- Thevenot D.R., Toth K., Durst R.A. & Wilson G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, vol. 16 (1-2), p.121-131.
- Tregear G.W., Niall H.D., Potts J.T., Jr., Leeman S.E. & Chang M.M. Synthesis of substance P. *Nat. New Biol.*, 1971, vol. 232 (29), p.87-89.
- Trettnak W. & Wolfbeis O.S. A fiberoptic cholesterol biosensor with an oxygen optrode as the transducer. *Anal. Biochem.*, 1990, vol. 184 (1), p.124-127.
- Tschmelak J., Proll G., Riedt J., Kaiser J., Kraemmer P., Barzaga L. et al. Automated water analyser computer supported system (AWACSS) Part I: Project objectives, basic technology, immunoassay development, software design and networking. *Biosens. Bioelectron.*, 2005, vol. 20 (8), p.1499-1508.
- Turner A.P., Chen B. & Piletsky S.A. In vitro diagnostics in diabetes: meeting the challenge. *Clin Chem.*, 1999, vol. 45 (9), p.1596-1601.
- Tyagi S. & Kramer F.R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.*, 1996, vol. 14 (3), p.303-308.
- Ullman E.F. & Khanna P.L. Fluorescence excitation transfer immunoassay (FETI). *Methods Enzymol.*, 1981, vol. 74 Pt C, p.28-60.
- Ullman E.F., Schwarzberg M. & Rubenstein K.E. Fluorescent excitation transfer immunoassay. A general method for determination of antigens. *J. Biol. Chem.*, 1976, vol. 251 (14), p.4172-4178.
- Van Regenmortel M.H. Dans : *The Recognition of Proteins and Peptides by Antibodies*, 1994, p. 277-300.
- Van Regenmortel M.H. Mimotopes, continuous paratopes and hydrophobic complementarity : novel approximations in the description of immunochemical specificity. *J. Dispersion Science and Technology*, 1998, vol. 19(6&7), p.1199-1219.

Vigny M., Bon S., Massoulie J. & Leterrier F. Active-site catalytic efficiency of acetylcholinesterase molecular forms in Electrophorus, torpedo, rat and chicken. *Eur. J. Biochem.*, 1978, vol. 85 (2), p.317-323.

Volland H. *Application du procédé SPIE-IA au dosage du Leucotriène C4, de l'Angiotensine II et de l'Histamine*. Biologie Cellulaire et Moléculaire, Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 266 p.

Volland H., Creminon C., Neuburger L.M. & Grassi J. *Procédé de détection en continu d'un analyte, réactif trifonctionnel de détection mis en oeuvre et dispositif de détection*. Commissariat à l'Énergie Atomique, 28-11-2002, Demande de brevet WOFR0214959.

Walt D.R. & Franz D.R. Biological warfare detection. *Anal. Chem.*, 2000, vol. 72 (23), p.738A-746A.

Wang G., Yuan J., Matsumoto K. & Zhide H. Homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay of bensulfuron-methyl by using terbium fluorescence energy transfer. *Talanta*, 2001, vol. 55, p.1119-1125.

Wang J.S. & Groopman J.D. DNA damage by mycotoxins. *Mutat. Res.*, 1999, vol. 424 (1-2), p.167-181.

Wang Q., Allen J.C. & Swaisgood H.E. Binding of retinoids to beta-lactoglobulin isolated by bioselective adsorption. *J Dairy Sci.*, 1997, vol. 80 (6), p.1047-1053.

Wemhoff G.A., Rabbany S.Y., Kusterbeck A.W., Ogert R.A., Bredehorst R. & Ligler F.S. Kinetics of antibody binding at solid-liquid interfaces in flow. *J. Immunol. Methods.*, 1992, vol. 156 (2), p.223-230.

Wide L., Bennich H. & Johansson S.G. Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies. *Lancet*, 1967, vol. 2 (7526), p.1105-1107.

Wolfbeis O.S. Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors. *Anal. Chem.*, 2002, vol. 74, p.2663-2678.

Xu Y.Y., Pettersson K., Blomberg K., Hemmila I., Mikola H. & Lovgren T. Simultaneous quadruple-label fluorometric immunoassay of thyroid-stimulating hormone, 17 alpha-hydroxyprogesterone, immunoreactive trypsin, and creatine kinase MM isoenzyme in dried blood spots. *Clin. Chem.*, 1992, vol. 38 (10), p.2038-2043.

Yalow R.S. & Berson S.A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *Journal of Clinical Investigation*, 1960, vol. 39, p.1157-1175.

Yolken R.H. & Stopa P.J. Enzyme-linked fluorescence assay: Ultrasensitive solid-phase assay for detection of human rotavirus. *J Clin. Microbiol.*, 1979, vol. 10 (3), p.317-321.

Zhang Y. & Tadigadapa S. Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, vol. 19 (12), p.1733-1743.

Zuber E. *Approche biométrique de la dynamique de réactions antigène-anticorps, cas de deux systèmes automatisés de suivi en temps réel des cinétiques*. Thèse de doctorat : Biochimie, Université Claude Bernard Lyon I, France, 223 p.

RÉSUMÉ

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de la recherche de procédés de détection rapides et sensibles des agents de la menace biologique. Nous avons étudié une nouvelle méthode de dosage immunologique par transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) adaptable à un dosage en flux.

Cette méthode est basée sur l'emploi d'un réactif trifonctionnel (tripode) comportant *i*) un fluorophore Donneur (D), *ii*) un analogue de la molécule à doser (analyte) et *iii*) une fonction permettant son immobilisation sur une phase solide. La liaison d'un anticorps anti-analyte marqué avec un fluorophore Accepteur (A) entraîne une diminution de la fluorescence de D (*quenching*). La présence de l'analyte induit une compétition pour la liaison de l'anticorps avec le tripode et restaure ainsi la fluorescence de D. Le procédé permet d'obtenir un signal localisé et cumulatif et la réalisation de dosages successifs sur une même surface régénérée par ajout d'anticorps.

L'évaluation du procédé a été effectuée en plaque de microtitration sur des petites molécules (substance P, atrazine, aflatoxine) et des protéines (β -lactoglobuline, toxine botulinique, ricine). Les propriétés spectrales des fluorophores, le rapport A/D et la distance A-D conditionnent fortement l'efficacité du FRET et donc la sensibilité du dosage qui dépend toutefois surtout des caractéristiques d'affinité relatives de l'anticorps envers l'analyte et envers le tripode. Idéalement l'anticorps devrait présenter une bonne affinité pour le tripode et une encore meilleure pour l'analyte. Des essais de mesure avec circulation de fluide, effectués dans une microcellule en verre en employant comme détecteur une caméra CCD montée sur un microscope à fluorescence, ont montré la faisabilité d'une détection en flux et permettent d'envisager le développement d'un biocapteur fonctionnant selon ce principe.

Un autre procédé basé sur la discrimination des fluorophores en solution et immobilisés est également présenté, permettant de développer un dosage rapide et simultané de plusieurs composés.

Mots-clés

Dosage immunologique, Fluorescence, FRET, Agents de la menace biologique, Immunodétection en flux

ABSTRACT

This thesis was devoted to the design of fluorescence immunoassays aiming at the detection of biological warfare agents. We developed a new concept of competitive immunoassay for continuous flow detection involving a fluorescence resonance energy transfer (FRET).

This procedure is based on the use of an heterotrifunctional reagent (tripod) bearing *i*) a fluorophore donor (D), *ii*) a molecule structurally close to the target and *iii*) a linker to the solid phase. The binding of an anti-target antibody labeled with an acceptor molecule (A) on the tripod generates the decrease of the donor emission *via* the FRET phenomenon (*quenching*). The presence of the target competing with the tripod for the binding to the antibody leads to an increase of the fluorescence signal. The solid phase can be easily further reactivated by adding the labeled antibody.

This method was evaluated in microtiter plates using small molecules (substance P, atrazine, aflatoxine) and larger proteins (β -lactoglobuline, botulinum toxin, ricin). Spectral properties of the dyes, A/D ratio and A-D distance were demonstrated to have largely influenced FRET efficiency and hereby the sensitivity of the assay. The sensitivity also strongly depends on the binding characteristics of the antibody. The main difficulty lies on the relative affinity characteristics of the antibody towards the tripod and the analyte, since the antibody should exhibit ideally a strong affinity for the tripod and even stronger affinity for the analyte. Assays performed in glass microcells using a CCD camera and a fluorescence microscope allowed continuous-flow detection and are promising for the build-up of a biosensor.

We also present a simple method for performing rapid assays in microtiter plates thanks to the difference in fluorescence signal observed between free and immobilized dyes which proved to be efficient for the design of a simultaneous multiplexed immunoassay.

Keywords

Immunoassay, Fluorescence, FRET, Biological warfare agents, Continuous-flow detection

DISCIPLINE

Biochimie

LABORATOIRE

Laboratoire d'Études et de Recherches en Immunoanalyse
CEA Saclay, Bât.136, DSV/DRM/SPI/LERI, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex.