

Chimie et diagnostic médical

Dix années de synergie entre le CNRS et bioMérieux

Équipe Chimie des supports* de l'unité mixte CNRS-bioMérieux

Summary : *Chemistry and biomedical diagnostic : a ten-year synergy between CNRS and bioMérieux*

Taking the opportunity of the Xth anniversary of the interdisciplinary joint research laboratory between CNRS and bioMérieux, this paper aims at reporting some overview of the main activities developed in the past ten years by the group "Chemistry of Supports " with the purpose to improve diagnostic assays. The following aspects are described : polymers in diagnostic ; immobilisation of biomolecules onto organic or inorganic supports via adsorption or covalent coupling ; implementation and detection methods of biological reactions; prospects.

Mots clés : *Diagnostic médical, supports organiques et inorganiques, chimie des polymères, immobilisation, molécules biologiques, applications, détection.*

Key-Words : *Medical diagnostic, organic and inorganic supports, polymer chemistry, immobilization ; biomolecules applications, detection*

L'unité mixte CNRS-bioMérieux a été créée en mars 1988 conjointement par Serge Feneuille, directeur du CNRS, et Alain Mérieux, président de la société bioMérieux, avec la collaboration de Guy Aubert, directeur de l'École Normale Supérieure de Lyon. Cette unité de recherche, dont la direction depuis son origine est assurée par Bernard Mandrand, avait deux missions importantes : acquérir des connaissances nouvelles dans le domaine de la rétrovirologie et de la chimie des polymères, et les utiliser afin d'améliorer les kits de diagnostic commercialisés par bioMérieux. Si le thème « rétrovirologie » apparaît évident, vu le problème majeur de santé publique que pose le sida et les rétrovirus associés, la filiation avec la chimie des polymères est moins triviale. Pour comprendre pourquoi une société, dont le métier est la biologie, s'intéresse aux polymères, il convient de revenir sur la définition et la pratique du diagnostic médical. En prenant l'exemple de l'inféctiologie, le diagnostic médical consiste à identifier et quantifier l'éventuelle présence d'un agent « pathogène » dans un prélèvement. Ces analyses, qui doivent être à la fois spécifiques et très précises, se déroulent *in vitro* sur des échantillons issus de prélèvements humains, tels que des fluides biologiques (sang, sérum, urine...) c'est-à-dire sur des milieux

complexes, chargés en sels, protéines et autres contaminants. Afin de s'affranchir des effets de matrice et d'avoir des tests sensibles et fiables, on utilise des supports biospécifiques, véritables cannes à pêche, qui vont extraire de ces milieux complexes l'analyte à doser et permettre, par la suite, une quantification précise. C'est sur ce principe en deux étapes, extraction et quantification, que repose la technologie ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), technique la plus couramment employée dans le diagnostic et dont le principe est détaillé en *figure 1*.

La chimie des polymères intervient dans ce schéma au niveau de la synthèse de supports capables de fixer des molécules biologiques (les cannes à pêches), ainsi qu'au niveau de l'étude et du contrôle des interactions supports/molécules biologiques. Ces interactions sont régies par des lois de la physico-chimie des macromolécules en solution. Enfin, grâce à son savoir-faire, le laboratoire est impliqué dans la définition et la réalisation de nouvelles techniques de détection permettant d'accroître la sensibilité des tests.

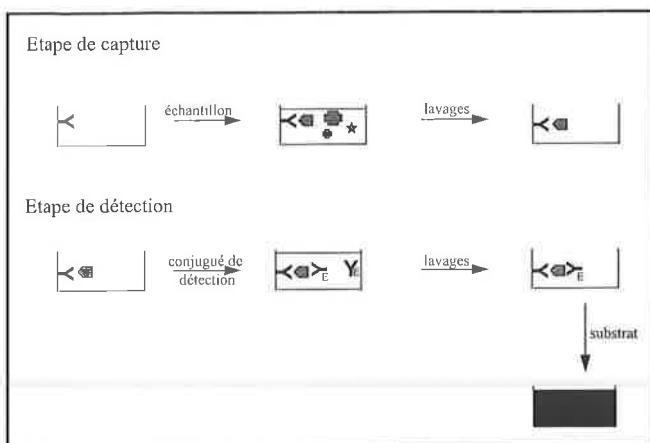
Au début de l'existence de l'unité mixte CNRS-bioMérieux, les supports potentiellement biospécifiques étaient essentiellement des particules de latex. Le laboratoire de chimie des supports, sous la direction de Christian Pichot, directeur de recherche au CNRS, a développé des programmes de recherche sur la synthèse, par polymérisation radicalaire en émulsion et par précipitation, de supports fonctionnels capables d'immobiliser des biomolécules, tout en conservant leur spécificité biologique. Parallèlement, les études des interactions particules/molécules issues du vivant (acides nucléiques, protéines) ont été entreprises afin d'identifier les facteurs physico-chimiques contrôlant la fixation des biomolécules sur les supports et d'évaluer leur confort

* ENS de Lyon, 46, allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07.
Tél. : 04.72.72.85.13. Fax : 04.72.72.85.33.
E-mail: Christian.Pichot@ens-bma.cnrs.fr

• Article proposé par les permanents de l'équipe Chimie des supports : C. Chaix (CNRS), M-H. Charles (bioMérieux), M-T. Charreyre (CNRS), Th. Delair (bioMérieux), A. Elaïssari (CNRS), V. Lanet (bioMérieux), A. Perrin (bioMérieux), C. Pichot (CNRS), A. Theretz (bioMérieux), L. Véron (bioMérieux).

• Cet article est publié à l'occasion du Xe anniversaire de la création de l'unité mixte CNRS-bioMérieux. Il convient aussi de remercier chaleureusement les nombreux étudiants et stagiaires qui ont participé aux activités de l'unité.

Polymères dans le diagnostic



Les tests ELISA se déroulent en deux étapes, la capture et la détection. Dans la première, un anticorps spécifique de la substance à doser a été immobilisé à la surface d'un support solide (tube à essai, particules de latex...). Si l'analyte est présent dans l'échantillon à doser, ce dernier va se poser spécifiquement sur l'anticorps à l'exclusion de tout autre contaminant. Ainsi, en fin d'étape de capture, la substance à doser a été extraite de l'échantillon et immobilisée sur le support solide, par l'intermédiaire de l'anticorps. La seconde étape consiste en la détection et la quantification de l'analyte contenue dans l'échantillon. Pour ce faire, un second anticorps portant une enzyme ira reconnaître un autre site actif de l'analyte immobilisée sur la phase solide, pour constituer un sandwich anticorps de capture/analyte/anticorps de détection. Comme l'anticorps de détection est couplé à une enzyme, en ajoutant son substrat, on initie la réaction enzymatique qui va induire une coloration du milieu. Ainsi, l'intensité de la couleur sera proportionnelle à la quantité d'enzyme fixée en fin d'étape de détection, donc à la quantité d'analyte immobilisé en fin d'étape de capture, et par conséquent sera indicateur de la concentration de cet analyte dans l'échantillon issu du patient. On voit donc bien qu'il est essentiel de bien maîtriser la fixation de molécules biologiques sur des supports pour avoir des tests de diagnostic efficaces.

ELOSA (Enzyme Linked Oligosorbent Assay) : le principe de ce test est le même que pour l'ELISA, en substituant les anticorps par des oligonucléotides (ODN).

Figure 1 - Schéma de principe des tests immunologiques ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

mation à l'état immobilisé. Au fur et à mesure de la croissance de bioMérieux, les besoins en recherche se sont diversifiés. En particulier, nous avons été amenés à développer le concept des « polymères présenteurs » pour aider à la fixation de molécules biologiques sur des supports organiques plans en favorisant leur présentation et leur disponibilité. Ces « polymères présenteurs » ont été obtenus par polymérisation radicalaire en solution, un domaine de compétence qui n'a pu être acquis que via des collaborations. De même, la nature des supports s'est diversifiée, organique principalement, mais aussi inorganique comme l'or et la silice. En ce qui concerne l'étape de détection, les polymères ont été utilisés en solution pour accroître le signal et ainsi améliorer la sensibilité. Au fil de l'évolution du diagnostic, l'exigence de sensibilité s'est régulièrement accrue, il a fallu alors concevoir des systèmes permettant des détections ultrasensibles en associant de nouvelles techniques, en particulier la microscopie à force atomique, à des procédés de concentration spécifique sur des surfaces réduites. Ainsi on s'aperçoit que l'activité du diagnostic lié à la recherche de l'accroissement de la sensibilité des tests s'est diversifiée sur le plan technologique, traduisant une augmentation en complexité de la problématique de la détection d'antigène spécifique et ultrasensible. C'est l'ensemble de notre activité de ces dix dernières années qui va être détaillée ci-dessous.

Polymères particulaires

Pour diverses raisons, les travaux initiaux du laboratoire ont porté sur des latex de polystyrène, car historiquement ces dispersions colloïdales de polymère (de dimension inférieure au micron) ont été à l'origine du développement des tests d'agglutination. Les arguments en faveur de leur utilisation étaient les suivants :

- très grande surface disponible permettant la fixation d'une quantité importante de molécules biologiques ;
- isodispersité en taille des particules garantissant une bonne reproductibilité des performances des immunoessais ;
- forte adsorption des biomolécules (notamment des anticorps) en raison du caractère hydrophobe du polymère.

Les premières études ont eu pour objectif l'élaboration de latex (0,3 et 0,9 μm) à l'aide de procédés de polymérisation radicalaire en émulsion avec ou sans tensioactif. Un résultat intéressant a mis en évidence le rôle important de la densité de charge de surface des particules (généralement des groupes sulfate) sur les performances des tests d'agglutination, un compromis devant être trouvé entre la stabilité colloïdale des particules sensibilisées par des anticorps et l'efficacité de la réaction immunologique (apportée par l'antigène) à induire l'agrégation, par pontage, des particules.

En dix ans, les propriétés de ces latex ont connu une évolution dans leur complexité (cf. *tableau I*), afin de répondre à un cahier des charges plus exigeant, tant vis-à-vis d'un meilleur contrôle de l'immobilisation et de l'orientation des biomolécules que d'autres propriétés (séparation, par exemple). Ainsi, il est apparu tout à fait opportun d'effectuer la fixation des biomolécules (anticorps, sondes nucléiques, peptides, etc.) par couplage chimique, compte tenu de la présence de groupes réactifs sur ces biomolécules (amine, hydroxyle, acide carboxylique). L'élaboration de particules fonctionnalisées a connu un développement significatif, par polymérisation en émulsion sans tensioactif d'un monomère hydrophobe (le styrène) en présence de faibles quantités d'un monomère réactif

Tableau I - Récapitulation des divers types de latex.

Fonctionnalité	Propriété	Exemples
Présence charges ioniques	Stabilité colloïdale	$-\text{SO}_3^-$, $-\text{COO}^-$, amidine
Groupe réactif	Greffage covalent	$-\text{COOH}$, CHO , NH_2 , SH
Interface hydrophile	Biocompatibilité	Carbohydrates
Polymère stimuable	Sensibilité à T, pH, force ionique	Polyalkylacrylamides (NIPAM)
Présence d'un marqueur	Coloration des particules	Colorant azoïque Molécule Fluorescente
Incorporation matière superparamagnétique	Séparation	Oxydes métalliques (Fe, Co, etc)
Complexation d'ions métalliques	Greffage orienté	$-\text{COO}^-/\text{Ni}$, Cu , Co

soit commercial (dérivés d'acides carboxyliques), soit synthétisé au laboratoire (dérivés styréniques porteurs de groupes aldéhyde, amine, thiol) [1].

La caractérisation la plus complète possible de latex finaux a nécessité la mise en place progressive de techniques d'analyses appropriées : diffusion dynamique de la lumière, microscopie électronique à transmission et à balayage, zétamétrie, analyses par RMN et ESCA, etc.

Parallèlement, le groupe s'est aussi intéressé à la synthèse de particules portant une couche hydrophile en raison de deux avantages importants : i) amélioration de la stabilité colloïdale vis-à-vis de la force ionique ; ii) biocompatibilité accrue vis-à-vis des biomolécules fixées, comparativement aux particules hydrophobes, ainsi qu'une diminution des phénomènes de physisorption.

Deux voies ont été explorées, soit par copolymérisation de styrène avec des monomères porteurs de groupes carbohydrates, soit en préparant des particules par polymérisation par précipitation d'alkylacrylamides.

Dans le premier cas, la stratégie a consisté à synthétiser des monomères amphiphiles de façon à favoriser le rendement d'incorporation en surface des particules. Deux types de monomères ont été envisagés, d'une part un méthacrylate d'hexyle à extrémité cellobiose, d'autre part un dérivé styrénique undécanoyle à terminaison maltobionamide [2].

Les travaux menés sur la préparation de latex à base d'alkylacrylamide (l'exemple le plus connu étant le *N*-isopropylacrylamide (NIPAM)) répondaient aux mêmes objectifs que précédemment, avec en plus la possibilité de conférer un caractère thermosensible aux particules. En effet, ces polymères possèdent une température critique limite de solubilité bien définie (LCST) telle qu'au-dessous de cette température, le polymère est hydrophile et largement expansée (> 90 % d'eau) alors qu'au-dessus, il acquiert un caractère hydrophobe par relargage de l'eau d'hydratation (< 15 %). Un résultat remarquable est d'avoir mis en évidence la brusque variation, en fonction de la température, du comportement colloïdal de ces latex (taille des particules, mobilité électrophorétique, stabilité colloïdale), reflétant ainsi le caractère thermosensible du polyalkylacrylamide. De plus, il a été montré lorsque les particules sont fonctionnalisées à l'aide de monomères aminés que ces caractéristiques dépendent également de la force ionique et du pH, conférant ainsi à ces latex un comportement multistimulable [3].

Enfin, les propriétés stimulables des latex cationiques à base de poly(NIPAM) ont été exploitées pour la réalisation de particules magnétiques submicroniques. La stratégie envisagée consiste en l'adsorption de ferrofluides chargés négativement sur des particules de charge opposée, suivie d'une étape d'encapsulation par copolymérisation de NIPAM, de réticulant et d'un comonomère carboxylique. Le contrôle de la synthèse des ferrofluides et des particules cationiques (à structure interfaciale variable) ainsi que des étapes d'adsorption et d'encapsulation, a effectivement permis l'obtention de particules hydrophiles, isodisperses en taille, stimulables (pH, force ionique, température) et superparamagnétiques [4].

Polymères en solution

La synthèse de polymères en solution pour le diagnostic demande de respecter un cahier des charges relativement exigeant. En particulier, il apparaît nécessaire d'assurer :

- Une hydrophilie du polymère synthétisé. Le polymère doit en effet pouvoir être solubilisé en solution aqueuse ou au minimum dans un solvant.

- La présence de sites réactifs permettant la fixation de biomolécules le long de la chaîne polymère. Pour ce faire, l'approche retenue est la polymérisation d'un monomère « fonctionnel » porteur d'une fonction latérale capable de réagir avec un groupe chimique présent sur la biomolécule. Ce monomère fonctionnel pourra être soit homopolymérisé, donnant lieu à une macromolécule possédant autant de sites réactifs que d'unités monomères dans la chaîne, soit copolymérisé avec un autre monomère, assurant un espacement des sites réactifs le long de la chaîne polymère. Il est possible de choisir un comonomère qui apporte une hydrophilie supplémentaire.

- Une longueur de chaîne suffisante pour immobiliser un grand nombre de biomolécules par chaîne, ceci afin d'augmenter la probabilité de reconnaissance des entités biologiques complémentaires, comme il sera expliqué par la suite.

Compte tenu de ces exigences, un certain nombre de monomères fonctionnels ont été synthétisés, présentant un groupe réactif de type ester activé [5] ou aldéhyde (protégé sous forme d'une fonction acétal [6] ou d'un cycle saccharidique [7]). Les paramètres cinétiques de la polymérisation en solution de ces monomères ont été déterminés, en particulier le rapport des constantes de vitesse d'homopropagation (k_p) et de terminaison (k_t), ainsi que les taux de réactivité en copolymérisation avec divers comonomères. En effet, la connaissance de ces paramètres est fondamentale pour prédire la microstructure des copolymères synthétisés.

Immobilisation de molécules biologiques

Comme on peut le voir dans la *figure 1*, pour réaliser des tests de diagnostic performants, il est indispensable d'être capable de fixer de façon efficace, sur des supports solides, des molécules issues du vivant. « Efficace » signifie que le greffage doit être stable au cours du temps, pour répondre en particulier au problème du stockage des kits à bioMérieux, dans ses filiales ainsi que chez les clients, et que le greffage doit avoir lieu en maintenant intactes les propriétés de reconnaissances des biomolécules qui assurent la spécificité du test.

La technique d'adsorption passive des biomolécules sur les supports est la plus simple à mettre en œuvre, mais c'est le greffage chimique qui permet d'atteindre une stabilité optimale. Les deux approches ont été menées en parallèle quand cela était possible, c'est-à-dire lorsque les réactions avaient lieu en phase hétérogène.

Adsorption et couplage sur polymères

Adsorption

Dans le but de l'immobilisation de biomolécules sur supports solides via un greffage chimique efficace, il est indispensable de comprendre au préalable les problèmes liés aux interactions entre ces deux entités (biomolécules et supports). Pour ce faire, il faut prendre en considération l'ensemble des interactions mutuelles qui s'exercent entre les trois constituants essentiels du système (la biomolécule, l'adsorbant et le solvant) et également la complexité du milieu biologique. Dans cette optique, le laboratoire a développé des compétences dans l'étude de l'adsorption et de la désorption des oligonucléotides [8] et des protéines [9] (antigènes, anticorps, enzymes) sur différents types de latex fonctionnels porteurs de groupes amine, amidine, carboxylique, sulfate, saccharidique et/ou stimulables (thermosensibles). L'étude de l'adsorption d'oligonucléotides (ODN) en particulier et d'acides nucléiques en général (ADN et ARN), a permis non seulement de répondre aux exigences du couplage chimique de ces biomolécules, mais également d'aboutir à des résultats fondamentaux sur le mécanisme d'adsorption de ces fragments d'ADN sur les latex. Ces observations ont été corroborées par les prédictions théoriques sur l'adsorption des polyélectrolytes. Dans le cadre de cette étude d'interactions, quelques points relatifs à l'influence du pH et de la force ionique du milieu sur la conformation des oligonucléotides adsorbés ou greffés sur des particules de latex ont fait l'objet d'un travail approfondi en utilisant, soit la diffusion des neutrons aux petits angles, soit la technique du transfert d'énergie de fluorescence [10].

Les études réalisées sur l'adsorption de protéines (albumine humaine ou bovine (HSA, BSA) et protéines recombinantes) sur des particules de latex à base de polystyrène ont permis de montrer que l'interaction gouvernant ce processus d'immobilisation est principalement de type hydrophobe. En revanche, l'adsorption sur les particules thermosensibles apparaît fortement dépendante de la température et de la salinité du milieu [11].

Couplage.

Les polymères utilisés pour le greffage covalent, qu'ils soient sous forme particulière ou en solution, doivent comporter, comme expliqué précédemment, les fonctions chimiques capables de réagir sur les groupes fonctionnels des entités biologiques à coupler [12]. En général, les groupements amine des biomolécules sont employés car ils peuvent former des liaisons peptidiques stables. Si la chimie mise en œuvre est relativement simple, on s'aperçoit que les facteurs qui contrôlent les réactions de greffage sont les paramètres physico-chimiques dont dépendent les interactions molécules biologiques/polymères. Ces interactions régulent la phase d'approche entre le support et la macromolécule naturelle jusqu'à une distance suffisante, pour que la formation de la liaison peptidique soit rendue possible. La qualité d'un greffage chimique s'évalue par le rendement, la stabilité dans le temps et aussi par le niveau d'activité biologique résiduel de la molécule greffée, que ce soit une activité enzymatique ou une capacité de reconnaissance spécifique,

dans le cas des anticorps et des antigènes, par exemple. La répartition des fonctions amine étant aléatoire dans la structure moléculaire des protéines, une perte d'activité due au couplage peut être observée, c'est ce que l'on nomme la dénaturation, qui peut être partielle ou totale. Pour éviter cette dénaturation, l'idée est de « faire en sorte » que la réaction chimique de greffage des protéines ait lieu sur une position bien définie de la macromolécule naturelle, qui ne soit pas impliquée dans l'activité biologique. Deux approches ont été envisagées au laboratoire : d'une part, utiliser des réactions chimiques spécifiques qui ne peuvent se dérouler qu'avec des groupes fonctionnels positionnés sur des sites précis des protéines, tels que les fonctions thiols des fragments d'anticorps situés à l'extrémité opposée du site actif, ou les carbohydrates de glycoprotéines quand ces derniers ne sont pas directement responsables de la spécificité biologique ; la seconde approche a résidé en l'utilisation de protéines génétiquement modifiées porteuses de groupes réactifs sur une position éloignée du site actif. Dans cette dernière approche, les acides aminés utilisés ont été d'une part des histidines et, d'autre part, des lysines. Les histidines permettaient d'envisager une immobilisation via la formation d'un chélate avec des métaux de transition.

Dans le second cas de figure, les lysines ont été introduites pour orienter le couplage tant sur le plan statistique que sur le plan physico-chimique en profitant de la densité locale de charges positives pour jouer sur des interactions électrostatiques favorables [13].

Adsorption et couplage sur supports plans inorganiques

Parallèlement aux supports particuliers adaptés à des formats de tests donnés, les supports plans inorganiques permettent la mise en œuvre de méthodes de détection particulières, allant du simple dosage biologique aux biocapteurs et aujourd'hui aux microsystèmes intégrés.

Dans ce sens, le laboratoire a développé des compétences dans la modification chimique de supports, tels que la silice ou le silicium, afin d'être à même de proposer un éventail de fonctions chimiques ($-CH_3$, $-NH_2$, $-SH...$) et des voies multiples de fonctionnalisation adaptées à la fixation d'oligonucléotides, d'anticorps et de protéines recombinantes. Afin d'améliorer la réactivité de ces surfaces, l'utilisation de copolymères fonctionnels, comme intermédiaire de greffage de biomolécules, a également été envisagé.

Compte tenu de l'ordre de grandeur des concentrations superficielles en fonctions chimiques introduites, le laboratoire a dû recourir à différentes méthodes de caractérisation physico-chimique telles que la mouillabilité (par mesure d'angle de contact), l'ellipsométrie, l'ESCA ou la microscopie à force atomique (AFM). La combinaison des résultats permet d'obtenir une idée précise de la structure des couches ainsi que de déterminer le mécanisme et la nature des interactions entre molécules biologiques et supports plans modifiés.

Par exemple, des profils topographiques établis par AFM sur des molécules isolées ont montré que les anticorps adoptaient une conformation « à plat », sans structure particulière à grande échelle. Le taux de recouvrement maximum (envi-

ron 40 - 50 %) est, par ailleurs, proche de celui d'un modèle d'adsorption séquentiel aléatoire.

De même, l'observation d'une interaction très forte et spécifique entre une protéine recombinante porteuse d'une extrémité poly(histidine) et la silice nue non modifiée nous a conduit à proposer un mécanisme d'interactions multiples de type coopératif, entre la séquence poly(histidine) et les groupements silanols. Cette étude permet d'envisager un mode de fixation et/ou d'orientation des protéines recombinantes et, par extension, de séquences nucléiques portant une séquence poly(histidine).

Mise en œuvre et détection

Le recherche d'une grande sensibilité des tests diagnostic passe par la mise en œuvre de procédés indépendants pouvant être intégrés en un ensemble de procédés successifs. Ainsi, dans le cas d'échantillons présentant un élément recherché en très faible concentration, la mise en œuvre de méthodes de capture et/ou de concentration de cet élément s'avère nécessaire, afin d'en disposer dans un volume faible et en concentration plus élevée. Associée à la mise en œuvre de méthodes de détection ultrasensibles ou de méthodes d'amplification du signal de détection, il devient possible d'atteindre des niveaux de sensibilité très importants.

Extraction et concentration d'acides nucléiques ou de protéines

La concentration des sondes nucléiques revêt un intérêt particulier dans le domaine biomédical, notamment dans le cas où la sensibilité et la spécificité sont requises. Dans ce sens, l'étude exhaustive sur l'adsorption des acides nucléiques et des protéines albumine de sérum humain et bovin (HSA, BSA) a permis de mettre au point les conditions optimales d'extraction sélective des acides nucléiques au détriment des protéines et des débris cellulaires. Cette approche basée sur l'utilisation de particules magnétiques hydrophiles et cationiques permet un gain en sensibilité appréciable. De plus, une étape d'amplification enzymatique des acides nucléiques captés peut être réalisée directement sur les particules (hydrophiles cationiques et thermosensibles) sans étape de relargage préalable.

Une autre approche basée sur l'utilisation de latex magnétiques hydrophiles et thermosensibles pour la concentration de matériel protéique a fait également l'objet d'une étude exploratoire. Cette méthode de concentration est très pratique, car après une incubation de quelques minutes à une température de 37 °C ($T > LCST \approx 32$ °C) où les particules sont hydrophobes, suivie d'une séparation sous l'action d'un champ magnétique, les protéines adsorbées peuvent être désorbées à une température inférieure à la LCST et dans un faible volume (inférieur à 1 mL). L'application des conditions de concentration optimales établies pour les protéines modèles aux prélèvements urinaires a permis d'obtenir des résultats préliminaires encourageants.

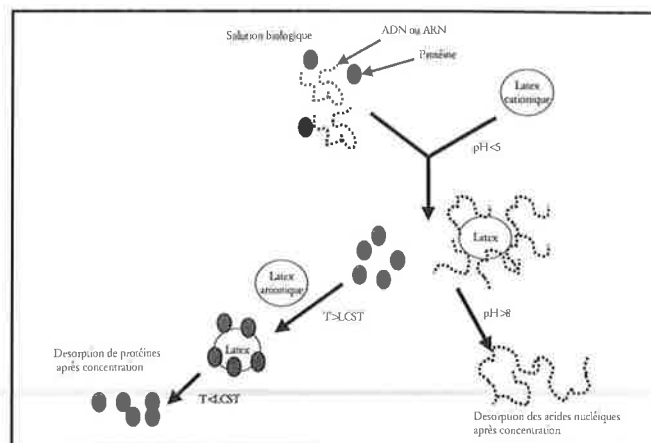


Figure 2 - Principe de la séparation et de la concentration d'acides nucléiques et de protéines.

Méthodes de détection des réactions de reconnaissance biologique

Par amplification chimique

En système ELOSA (Enzyme Linked Oligosorbent Assay) (voir figure 1), le signal de détection a pu être augmenté, comme nous l'avons vu précédemment pour la phase de capture en utilisant des conjugués polymères oligonucléotides (ODN) qui permettaient d'accroître la densité des ODN en surface du support biospécifique. En phase de détection, à la place du conjugué ODN enzyme, l'utilisation d'un polymère de sondes de détection a permis l'accroissement notable du signal de détection.

En combinant les deux approches, polymères en phase capture et en phase détection, pour la détection de l'ADN du virus de l'hépatite B, un facteur 10^3 d'accroissement de sensibilité a été obtenu. Ceci est un exemple d'application du concept d'amplification chimique.

Par microscopie de force atomique (projet SFMIA)

Dans le cadre d'un projet de recherche européen visant à démontrer la faisabilité d'un nouveau type d'immunoessai basé sur la microscopie à force atomique (Scanning Force Microscopic ImmunoAssay ou SFMIA), le laboratoire a dû réaliser des supports biospécifiques ultraplans. En effet, pour que le système soit fiable, il faut que l'immobilisation de l'antigène induise une modification de la topographie de surface suffisamment importante pour pouvoir être distinguée de la surface initiale. L'acquisition d'un microscope nous a également permis d'examiner la détection de réactions anticorps-antigène [14]. La méthode SFMIA a aussi été intégrée dans une méthode de concentration/détection originale expliquée ci-dessous (figure 3).

Immunoconcentration magnétique et détection par AFM

Comme décrit précédemment, cette méthode repose sur la concentration de molécules cibles par des nanoparticules magnétiques. Dans ce cas, la capture est spécifique (fonctionnalisation des particules par des anticorps) et, de plus,

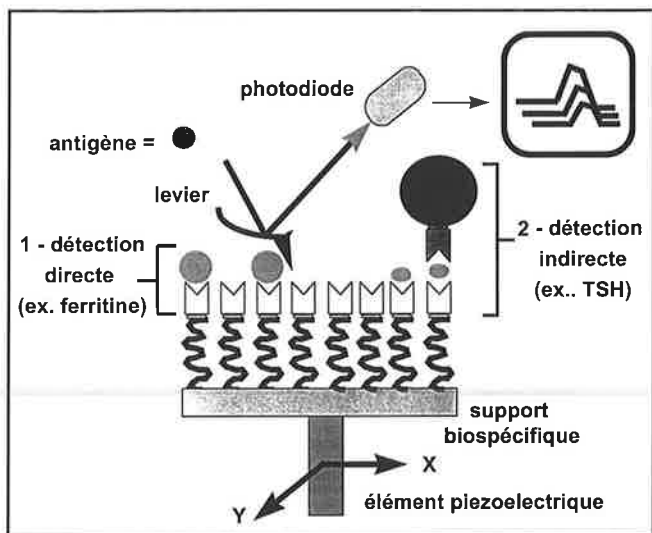


Figure 3 - Le principe du dosage SFMIA.

Après réaction entre le support biospécifique et le prélèvement biologique contenant l'antigène recherché, l'échantillon est placé sur un élément piézoélectrique assurant un balayage selon les directions X et Y. Un levier muni d'une pointe très fine est amené au contact de l'échantillon et les variations topographiques ressenties par la pointe se traduisent par une déflexion du levier selon l'axe Z qui est enregistrée. Il est ainsi possible de reconstruire une image en 3 dimensions avec une excellente résolution. Dans le cas du dosage SFMIA, il existe deux cas de figures :

1 - L'antigène est suffisamment volumineux pour être détecté directement, sans marquage (ex. la ferritine, une protéine d'environ 12 nanomètres). Le dosage SFMIA consiste en l'évaluation du nombre de molécules par unité de surface ou de la rugosité induite par les antigènes.

2 - Dans le cas contraire, l'antigène est trop petit pour être détecté directement par AFM (ex. la TSH, une hormone d'environ 3 nm). L'utilisation de marqueurs topographiques sous forme de conjugués nanoparticules magnétiques/anticorps anti-TSH, capables d'induire une forte variation de topographie en présence de TSH permet de résoudre ce problème. Le dosage SFMIA consiste alors en l'évaluation du nombre de particules par unité de surface en fonction de la quantité de TSH en solution.

ces particules présentent l'avantage de servir de marqueurs topographiques dans des dosages utilisant la microscopie à force atomique comme méthode de détection.

Plusieurs optimisations ont été apportées au procédé : capture des antigènes par les particules en solution, dispositif visant à éliminer les contraintes diffusionnelles, dimension de la surface biospécifique réduite par interposition d'un masque afin d'amplifier le phénomène de concentration sur une zone restreinte, etc. [15].

Une amélioration de la sensibilité de plusieurs décades a ainsi été obtenue, par comparaison avec les automates d'immunoanalyses commerciaux. Nous tentons actuellement d'adapter cette méthode à la concentration/détection de cibles ADN. Si un tel niveau de sensibilité peut être atteint, il sera possible de détecter environ 1 bactérie/mL sans recourir à une méthode d'amplification préalable.

Intégration dans des systèmes et microsystèmes

Le procédé, décrit ci-dessus, est une succession d'étapes qui, compte tenu des méthodes utilisées, peut être envisagé comme un système en ligne, voire même être miniaturisé en un microsystème. Une collaboration avec le CEA-LETI de Grenoble a ainsi consisté en la mesure des paramètres magnétiques du système de séparation utilisé. Après simulation des champs et gradients de champ magnétique, il a

ensuite été réalisé par les procédés de la microtechnologie, de microbobines planaires ayant les mêmes caractéristiques magnétiques sur une surface d'environ $50 \mu\text{m}^2$. Le but de cette collaboration était le confinement des éléments capturés sur une surface de dimensions microniques avant leur détection.

Bilan / collaborations

Le développement de ces diverses activités n'a pu se réaliser que grâce au renforcement du personnel de l'équipe, en dix ans, (actuellement 4 chercheurs CNRS (1 en 1988), 4 chercheurs et 2 techniciens bioMérieux (2 et 1 respectivement en 1988)). Cela a permis d'acquérir des compétences dans divers domaines comme récapitulé dans le *tableau II*.

De plus, mener à bien la plupart des projets de recherche, à caractère souvent pluridisciplinaire, implique à l'évidence un effort important de concertation des participants (tant au sein de l'unité qu'avec les partenaires des divers sites de bioMérieux) et de nombreux séminaires et réunions sont organisés dans cette optique. Ceci doit être nécessairement complété par des collaborations locales (le groupe est partie prenante du Réseau des Polyméristes Lyonnais et a établi des contacts avec d'autres structures de recherche lyonnaises (divers laboratoires de l'ENS, Institut de Biologie et de Chimie des Protéines (IBCP-CNRS), équipe Interface de l'École centrale). De plus, des coopérations nationales et internationales se sont aussi mises en place : appartenance à des groupements concertés de recherche sur une thématique spécifique (programmes européens, GDR, participation de chercheurs de l'équipe dans une unité de recherche entre bioMérieux et le LETI-CEA, etc.) ; acquisition de compétences dans des domaines spécifiques : fluorescence (ENS Cachan), polymérisation cationique (Laboratoire de chimie des polymères organiques (CNRS) à Bordeaux ; études de mouillabilité de surfaces (CPE Lyon, LEMPB, université Lyon I) ; collaborations bilatérales (laboratoires du CNRS, ICS à Strasbourg, OMM à Thiais, Laboratoire de chimie appliquée à Montpellier) ; accès à des moyens d'analyse « lourds » (diffusion des neutrons à Saclay, par exemple).

Enfin, comme illustré dans le *tableau III*, cette activité de recherche finalisée se concrétise par une production scienti-

Tableau II - Domaines de compétences acquises en 10 ans d'activité.

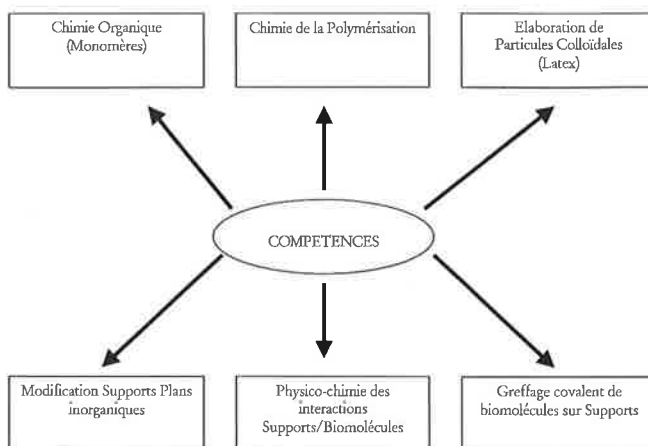


Tableau III - Bilan de l'équipe Chimie des supports.

Tableau III : Bilan Équipe Chimie des Supports		
Production Scientifique	Valorisation	Formation par la Recherche
115 Publications et Revues	Polymères réactifs pour greffage sur phases solides (amplification)	11 Thèses (8 en cours)
25 Brevets	Particules de latex	2 Habilitations Direction de Recherche
90 Conférences invités	Concepts innovants (diagnostic)	>50 Stagiaires divers

fique assez conséquente et la valorisation de divers concepts au sein de bioMérieux. Elle s'accompagne d'une contribution importante des permanents du groupe à la formation par la recherche d'étudiants de cursus varié (thèses de doctorat, stages de DEA, DESS, maîtrises, écoles d'ingénieur, IUT, BTS, etc.). Ce bilan illustre, s'il en est besoin, un assez bon équilibre entre recherche à caractère académique et recherche appliquée ainsi que les effets de synergie que cela entraîne inévitablement.

Perspectives

Polymères d'architecture contrôlée

Afin d'optimiser l'utilisation des polymères non particuliers en tant que support de molécules biologiques, la synthèse de polymères à architecture particulière, tels les copolymères blocs, les copolymères greffés, les polymères hyperbranchés, constitue la thématique de nouveaux programmes de recherche.

En effet, en s'appuyant sur le développement récent de nouvelles techniques de polymérisation, dites « vivantes », il est possible d'envisager la synthèse de polymères de masses et de structure contrôlées, présentant des fonctionnalités latérales et terminales différenciées, ce que ne permettait pas la polymérisation radicalaire classique. Dans ce nouveau processus, les chaînes polymères, au lieu de se former de manière successive, croissent simultanément, ce qui conduit à un ensemble de chaînes très homogènes en longueur. De plus, comme les extrémités de chaîne restent « vivantes » après la consommation totale du monomère, il est possible de les faire réagir avec un agent désactivant porteur d'une extrémité fonctionnelle, ou encore d'ajouter une fraction d'un second monomère, conduisant à l'obtention d'un copolymère bloc.

Ces techniques vivantes, d'abord mises au point en polymérisation anionique, ont ensuite été appliquées à la polymérisation cationique où la famille des éthers vinyliques est particulièrement intéressante pour l'obtention de polymères utilisables dans le diagnostic, compte tenu de la possibilité de fonctionnaliser le groupe latéral. Plus récemment, plusieurs techniques de polymérisation radicalaire vivantes ont aussi vu le jour ; elles s'appliquent à un choix plus large de

monomères et sont moins délicates à mettre en œuvre expérimentalement. Des projets basés sur la polymérisation radicalaire en présence de nitroxydes, de complexes de métaux de transition (technique de polymérisation radicalaire par transfert d'atome, ATRP) ou de dithioesters (technique de transfert de chaîne par addition fragmentation réversible, RAFT) sont aussi en cours au laboratoire.

Synthèse directe de biomolécules sur support (solide ou polymère en solution)

Une nouvelle stratégie d'obtention des conjugués (supports solides ou polymères en solution porteurs de biomolécules) est actuellement développée au laboratoire. Elle consiste en la synthèse directe d'oligomères de nature biologique (oligonucléotides ou peptides) sur différents supports utilisés lors d'applications diagnostiques (polymère en solution, support plan de silice, etc.). Les objectifs de cette approche sont d'améliorer le nombre ainsi que l'orientation des biomolécules immobilisées par rapport aux méthodes classiques de fixation. D'une manière générale, une meilleure accessibilité de ces biomolécules fixées sur support va permettre d'accroître les possibilités d'interactions spécifiques avec une cible biologique potentielle à capturer ou à détecter.

Aide au développement d'outils diagnostic

La spécificité des tests diagnostic est apportée par l'utilisation de molécules biologiques performantes telles que des anticorps monoclonaux ou des antigènes recombinants. Afin d'améliorer l'efficacité de ces molécules biologiques, des programmes de recherches sont en cours, concernant la synthèse et l'utilisation de vecteurs synthétiques d'acides nucléiques en temps qu'aide au clonage en génie génétique ou comme vecteur de vaccination ADN ou ARN pour l'obtention directe d'anticorps monoclonaux chez la souris.

Pour ces applications, le cahier des charges des polymères est différent de celui des applications diagnostiques au sens strict. Outre le fait de protéger les acides nucléiques contre les nucléases du sang qui les détruiraient rapidement, il faut que ces vecteurs synthétiques ne soient pas toxiques pour la cellule hôte ou l'animal et, dans le cas de la vaccination, ces polymères doivent être aisément biorésorbables. Ce dernier cas impose que les chaînes polymères puissent être dégradées dans les conditions physiologiques, mais cependant, avec une durée de vie suffisante pour maintenir et assurer leur rôle de transport d'acides nucléiques.

Physico-chimie des interactions supports-biomolécules

L'aspect concentration spécifique de biomolécules indispensable pour la sensibilité des tests de diagnostic précoces et exploré pour la concentration des acides nucléiques et des protéines sera étendu à la concentration des virus, des bactéries, etc. Dans cette optique, une étude a été initiée en collaboration étroite avec l'Institut Fédérative de Recherche sur la Virologie et l'Immunologie. Ce travail, financé dans le cadre d'un programme européen, mettra à profit l'utilisation de

procédés originaux du laboratoire pour la purification spécifique d'acides nucléiques sur polymères et la quantification d'ARN par amplification enzymatique en conservant l'intégrité de la séquence nucléique.

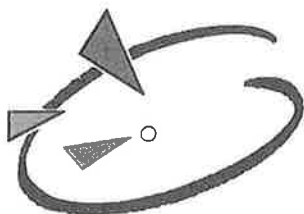
Systèmes intégrés

L'évolution des systèmes diagnostiques vers des formats plus compacts, toujours plus sensibles et plus fiables, amène naturellement à considérer l'intégration de différentes fonctions (fluidique, séparation de molécules, détection de microvolumes...) dans peu d'espace. Ce concept, appelé « lab-on-chip » ou μ TAS (Micro Total Analysis System) par les Anglo-Saxons, fait appel, du point de vue de la recherche, à des compétences multidisciplinaires, allant de la mécanique des fluides à la physico-chimie des surfaces et interfaces. Dans ce cadre, il est clair que la modification des propriétés des surface (équilibre lyphophile-hydrophile, introduction de fonctions chimiques pour le greffage...) et les interactions molécules/surfaces revêtent un aspect déterminant. La nature du matériau-support est un point particulièrement important également, principalement en raison du coût des matériaux inorganiques. Pour cette raison, les supports polymères associés à l'émergence de microtechnologies adaptées à ces supports sont particulièrement indiqués. C'est notamment dans ces perspectives que notre laboratoire envisage le développement de nouvelles thématiques de recherche.

Références

- [1] Pichot C., Delair Th., Elaïssari A., *NATO ASI Serie*, **1997**, 145, p. 515.
 [2] Charreyre M.T., Revilla, J., Elaïssari, A., Pichot C.,

- Gallot, B., *J. of Bioactive and compatible Polymers*, **1999**, 14, n° 1, p. 64.
 [3] Duracher D., Sauzedde F., Elaïssari A., Pichot C., Nabzar L., *Colloid Polym. Sci.*, **1998**, 276, p. 920.
 [4] Sauzedde F. thèse université Claude Bernard, Lyon-I, n°379-97, 1997.
 [5] Erout M.N., Elaïssari A., Pichot C., Llauro M.F., *Polymer*, **1996**, 37, p. 1157.
 [6] Véron L., de Bignicourt M.C., Delair Th., Pichot C., Mandrand B., *J. of Applied Polymer Sci.*, **1996**, 60, p. 235.
 [7] Badey B., Boullanger P., Domard A., Cros Ph., Delair Th., Pichot C., *Macromol. Chem. Phys.*, **1996**, 197, p. 3711.
 [8] Elaïssari A., Pichot C., Delair Th., Cros Ph., Kurfürst R., *Langmuir*, **1995**, 11, p. 1261.
 [9] Betton F., Theretz A., Elaïssari A., Pichot C., *Colloids Surfaces B : Biointerfaces*, **1993**, 1, p. 97.
 [10] Charreyre M.T., Hiver A., Delair Th., Cros P., Pichot C., Mandrand B., Tcherkasskaya O., Winnik M.A., *Langmuir*, **1997**, 13, p. 3103.
 [11] Elaïssari A., Holt L., Voisset C., Pichot C., Mandrand B., Mabilat C., *J. of Biomaterials Science, Polymer Edition*, **1999** (sous presse).
 [12] Delair Th., Marguet V., Pichot C., Mandrand B., *Colloid Polym. Sci.*, **1994**, 272, p. 962.
 [13] Ladavière C., Delair Th., Domard A., Nouvelli-Rousseau A., Mandrand B., Mallet F., *Bioconjugate Chem.*, **1998**, 9, p. 655.
 [14] Perrin A., Lanet V., Theretz A., *Langmuir*, **1997**, 13, p. 2557.
 [15] Perrin A., Theretz A., Lanet V., Vialle S., Mandrand, B., *J. Immunol. Methods*, **1999** (sous presse).



ITECH

Institut Textile et Chimique de Lyon

**VOUS RECHERCHEZ
DES COMPÉTENCES
EN PEINTURES, ENCRES,
ADHÉSIFS, COSMÉTIQUE,
MATÉRIAUX PLASTIQUES, TEXTILES ET CUIR**

Nos laboratoires de recherche peuvent résoudre vos problèmes de formulation, de mise en œuvre, de mise en forme des produits de la chimie.

**Contactez-nous
ITECH**

181 - 203, Avenue Jean-Jaurès - BP 7034
69342 LYON cedex 07

Télécopie 04 78 72 28 31 - Télécopie 04 78 61 03 33

e.mail:itech@asi.fr