

Conception de puces à sucres de nouvelle génération pour la biodétection

Contact : Aurelie BOUCHET-SPINELLI DRF//INAC/SYMMES/CREAB Aurelie.BOUCHET-SPINELLI@cea.fr 04 38 78 48 33

Stage pouvant se poursuivre en thèse : Oui

Résumé :

Les sucres sont des biomolécules omniprésentes dans le monde du vivant comme le prouve leur implication dans de nombreux processus cellulaires comme l'adhésion, la reconnaissance et la communication intercellulaire. L'étude de leurs interactions avec des protéines ou des cellules ou bactéries entières est donc d'un intérêt certain pour le décryptage de ces processus souvent complexes. De plus, les sucres présentent une diversité chimique et structurale supérieure à celle des brins d'ADN (4 bases) ou des protéines (20 acides aminés). Ils sont faciles à manipuler et beaucoup moins onéreux que les anticorps. Le savoir-faire mis en oeuvre pour leur préparation est par contre très spécifique. Nous développons au CREAB depuis une dizaine d'années des approches innovantes pour l'étude d'interactions biomoléculaires, en particulier en utilisant l'imagerie par résonance plasmonique de surface (« Surface Plasmon Resonance imaging », SPRi).

Nous proposons de concevoir lors de ce stage de nouveaux types de biopuces à sucres, en créant des surfaces multivalentes, puis de mettre en évidence par SPRi, des interactions permettant de détecter, voire d'identifier de manière plus sensible et plus efficace des protéines ou des bactéries.

Sujet détaillé :

Les sucres sont des biomolécules omniprésentes dans le monde du vivant comme le prouve leur implication dans de nombreux processus cellulaires comme l'adhésion, la reconnaissance et la communication intercellulaire. L'étude de leurs interactions avec des protéines ou des cellules ou bactéries entières est donc d'un intérêt certain pour le décryptage de ces processus souvent complexes. De plus, les sucres présentent une diversité chimique et structurale supérieure à celle des brins d'ADN (4 bases) ou des protéines (20 acides aminés). Ils sont faciles à manipuler et beaucoup moins onéreux que les anticorps. Le savoir-faire mis en oeuvre pour leur préparation est par contre très spécifique.

Nous développons au CREAB depuis une dizaine d'années des approches innovantes pour l'étude d'interactions biomoléculaires, en particulier en utilisant l'imagerie par résonance plasmonique de surface (« Surface Plasmon Resonance imaging », SPRi). La SPRi est une méthode optique exploitant les ondes électromagnétiques de surface pour sonder des variations de masse, d'indice et d'épaisseur à l'interface métal/diélectrique. Des interactions entre des biomolécules-sondes immobilisées sur support et des biomolécules-cibles en solution peuvent être détectées directement dans des mélanges complexes, sans marquage préalable. L'analyse des cinétiques d'interactions biomoléculaires apporte des informations sur la dynamique de ces interactions et permet d'accéder aux constantes thermodynamiques les caractérisant. Nous avons créé récemment au sein du groupe une activité dans le domaine des puces à sucres pour l'étude d'interactions en utilisant la technique d'imagerie par résonance plasmonique de surface (SPRi). Notre stratégie de conception de ces biopuces est basée sur l'immobilisation de sonde mono-, di- ou oligosaccharidiques sur des supports en utilisant leur conjugaison avec des entités permettant le greffage (thiols ou pyrrole). Nos travaux ont conduit à plusieurs publications et montré tout le potentiel des puces à sucres pour la détection de protéines tout comme pour celle de bactéries pathogènes alimentaires. Cette thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux et le projet sera parfaitement intégré aux projets déjà en cours dans l'équipe.

Il est connu que les sucres interagissent de manière multivalente avec leurs cibles car les liaisons créées sont de faible énergie. Cela explique pourquoi les puces à sucres malgré le grand intérêt qu'elles présentent pour la biodétection, n'ont pas été autant développées que les puces à ADN ou à protéines. Ce paramètre a pour l'heure été peu étudié dans le domaine des biopuces.

Nous proposons de concevoir de nouveaux types de biopuces à sucres, en créant des surfaces multivalentes, puis de mettre en évidence par SPRi, des interactions permettant de détecter, voire d'identifier de manière plus sensible et plus efficace des protéines ou des bactéries. Les stratégies de

fonctionnalisation de surface sélectionnées pourront ensuite être utilisées pour de nombreuses applications comme la conception de dispositifs microfluidiques d'enrichissement de mélanges bactériens complexes, présentée comme exemple dans ce document.

L'objectif est de concevoir des biopuces où l'accessibilité des sucres est la même que dans le contexte physiologique. Les interactions sucres-protéines sont de faible énergie, ce qui les rend difficile à étudier in vitro. Dans la nature, elles compensent cette faiblesse de liaison en étant multivalentes, c'est-à-dire en ayant plusieurs sites d'accroche sur un ligand saccharidique. Il est important pour une bonne détection par une puce à sucres de proposer des surfaces permettant cette multivalence.

La démarche expérimentale sera la suivante :

?Choix des sucres et préparation des « glycoclusters »

Le stage débutera par l'utilisation de « glycoclusters » porteurs de monosaccharides qui sont les entités saccharidiques les plus simples. Nous avons mis en évidence des interactions particulières entre le galactose et la bactérie E. coli O157 :H7 , un pathogène alimentaire très dangereux et donc très intéressant dans le cadre d'une détection rapide sur biopuces. Le galactose sera donc le premier saccharide étudié. Nous utiliserons des « glycoclusters » fournis par nos collaborateurs du DCM et étant tétra-, octa- ou hexadécavalents .

?Immobilisation des sucres sur support et validation de la chimie de surface utilisée

Les glycoclusters étant fonctionnalisés par une fonction amine primaire, ils seront ensuite couplés de manière covalente à un pyrrole ou un thiol porteur d'une fonction ester activé N-hydroxysuccinimide selon des protocoles mis au point au CREAB. Les conjugués pyrrole-glycoclusters pourront ensuite être immobilisés sur surface d'or par co-électropolymérisation avec des monomères pyrrole ou formation de couches auto-assemblées d'alcanes-thiols. Jusqu'à cent dépôts pourront être réalisés sur un prisme, garantissant une grande reproductibilité des interactions sondées.

Différentes formulations seront testées pour optimiser la biodétection et les résultats nous permettront également de choisir la méthode la plus appropriée pour la chimie d'immobilisation sur surface entre le pyrrole et les thiols.

?Détection d'interactions sucres/protéines et sucres/bactéries

La SPRi sera utilisée pour évaluer les reconnaissances et affinités de lectines spécifiques du galactose comme la PNA (Peanut Agglutinin). Les seuils de sensibilités seront évalués en fonction des différentes formulations des dépôts. Par la suite, des hétéroclusters porteurs de différents monosaccharides pourront être testés pour la détection de lectines.

La même méthodologie pourra être appliquée à la détection voire l'identification de souches d'E. coli O157:H7. Le CREAB est équipé d'un laboratoire de classe II pour la manipulation de ces micro-organismes pathogènes. Nous avons montré dans le projet « Glycosurfaces pour la maîtrise de l'adhésion bactérienne » que la détermination d'interactions permettant de différencier des espèces bactériennes telles que E. coli O157 :H7, Listeria monocytogenes et Salmonella spp était un enjeu ambitieux mais s'est avéré réaliste.

Compétences requises :

Ce sujet de stage s'adresse à des candidats motivés par la pluridisciplinarité. Le stagiaire sera impliqué dans toutes les étapes du projet : de la chimie de couplage (déjà mise au point) à la détection SPRi en passant par la physico-chimie des surfaces, la biologie et le traitement de données en SPRi. Le candidat devra être capable de dialoguer avec les collègues chimistes, biologistes et physiciens qui en retour lui enseigneront les compétences dont il aura besoin. Ce sujet sera très instructif pour le stagiaire et contribuera à enrichir sa culture scientifique. Les candidats souhaitant poursuivre en thèse sont encouragés à postuler.