

N° d'ordre : 4260

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX I

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par **Etienne BACO**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : **CHIMIE ORGANIQUE**

**SYNTHÈSE D'HAPTÈNES DE PHYCOTOXINES POUR L'ÉLABORATION D'UN
IMMUNOCAPTEUR**

Soutenue le : 26 Mai 2011

Après avis de :

MM.	P. SONNET	Professeur, Université de Picardie	Rapporteur
	J.-L. MARTY	Professeur, Université de Perpignan	Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

MM.	A. BURGER	Professeur, Université de Nice	Président
	P. SONNET	Professeur, Université de Picardie	Rapporteur
	J.-L. MARTY	Professeur, Université de Perpignan	Rapporteur
	B. SAUTOUR	Professeur, Université Bordeaux 1	Examineur
	B. BENNETAU	Directeur de recherche, CNRS	Directeur de thèse
	M. DEGUEIL	Chargée de recherche, CNRS	Directeur de thèse

« L'erreur n'a rien d'étrange ; c'est le premier état de toute connaissance. »

Alain

A Félix, à mon papi...

Ce manuscrit est la concrétisation de trois années de travail personnel. Néanmoins beaucoup de gens ont contribué, de près ou de loin, scientifiquement ou non à ce que celui-ci aboutisse. J'aimerais donc, par ces quelques lignes, leur adresser mes vifs remerciements.

Merci tout d'abord au Professeur Alain Burger d'avoir accepté de présider mon jury de thèse ainsi qu'aux Professeurs Jean Louis Marty et Pascal Sonnet d'avoir assumé la tâche de rapporteur. Merci enfin au professeur Benoît Sautour d'avoir participé à ce jury en qualité d'examineur.

Je tiens à remercier le Conseil Régional d'Aquitaine pour son support financier grâce aux fonds investis dans la Recherche par la Communauté Européenne (FEDER).

Je souhaiterais ensuite remercier sincèrement mes directeurs de thèse : Bernard pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour le soutien et l'optimisme continuels dont il a fait preuve tout au long de ce projet ; et Marie pour m'avoir encadré, conseillé et guidé, ma thèse doit beaucoup aux longs débats que nous avons pu avoir et je garderai beaucoup de cette rencontre aussi bien d'un point de vue scientifique qu'humain.

Merci aussi à Corinne Dejous et Dominique Rebière du Laboratoire de l'Intégration du Matériau Système (IMS, Université Bordeaux I) pour la riche collaboration menée et à Fabien Fournel pour avoir pris de son temps pour m'expliquer ses travaux. De la même façon j'aimerais remercier Daniel Moynet et Maria Mamani-Matsuda du Laboratoire d'Immunologie et de Parasitologie (Université Bordeaux Segalen) pour m'avoir appris tant de choses dans le domaine de l'Immunologie, résultat d'une collaboration très fructueuse. Merci à Luc, Jean Paul et Laurent pour leur implication dans le projet.

Un grand merci à toutes les personnes dont le travail a permis au mien d'aboutir. Je pense à François Xavier Felpin pour son aide précieuse et sa disponibilité, à l'équipe du CESAMO pour toutes les analyses, notamment Noël pour la RMN, à Wilfried Néri du CRPP pour l'étude NOESY et enfin à Jean Marie Schmitter pour les études MALDI des bioconjugués.

J'aimerais adresser mes remerciements à Phillippe Garrigues et Thierry Toupance pour m'avoir accueilli respectivement à l'ISM et au sein du groupe C2M. Merci à Svitlana et Anne pour leur aide en HPLC, Marc pour sa disponibilité et son aide lors des petits ou gros tracas informatiques et enfin Odile pour son aide quasi quotidienne et sa patience. Je tiens aussi à remercier Daniel, Marc, Hakim, Pascal, Karine et tous mes collègues permanents et non permanents du groupe. De façon globale, j'aimerais aussi remercier tous les personnels de l'ISM qui facilitent le travail des doctorants au quotidien dans tous les « à côté » administratifs ou logistiques.

Cette thèse n'aurait pas été la même sans de nombreuses rencontres. J'aimerais donc dire un grand merci à tous les gens qui ont contribué à remplir ces années de moments inoubliables. Je pense en particulier à Manu, Romain, Iona, Nico, David, Elsa, Nico Nico, Clém, Guillaume, Cédric, Sabine, Yohan, Julien, Damien pour les Pimoussades, Jérém, Alex (et Jennifer) pour les Echappades, Scalp83 et BluffD4ddy qui sont vraiment deux Cheap Types, Nico B et Cindy pour leur intégrité et leur amour de la Picardie, tous les gens avec qui j'ai eu plaisir à partager de bons moments : Med, Cat, Jean Phi, Hélène, Sophie, Phil, Julie, Claire, Abdou, Tibal, David, Nat, Patou, le Sweeney, le Chef et tous les gens que j'oublie mais qui garderont une place à part.

Je voudrais aussi remercier tous mes amis que j'ai eu tant de plaisir à revoir sur Bordeaux ou ailleurs pendant ces trois années : Hub, Françoué, Mat, Guigui, Tom, Séb, PA, Tib, Caro, Bob, Xav, Nico, Alexi(a)&(s), Guitou, Amélie, Anaïs, Nono, Benj... et tous les autres...

Un énorme merci à mes parents qui m'ont soutenu et supporté depuis le début ainsi qu'à mes deux frères Julien et Baptiste qui sont et resteront sources d'inspiration et de motivation.

Merci enfin à Céc d'avoir toujours été là dans les bons comme dans les mauvais moments et de rendre ma vie plus belle tout simplement

MERCI A VOUS TOUS

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
LISTE DES ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION GENERALE	9
CHAPITRE 1 : LES PHYCOTOXINES	13
1.1 Généralités	15
1.2 Les familles de toxines	16
1.2.1 La famille des DSP (groupe de l'acide okadaïque et des dinophysistoxines).....	16
1.2.2 La famille des PSP (groupe des saxitoxines)	21
1.2.3 La famille des ASP (groupe de l'acide domoïque)	22
1.3 Comparaison des méthodes de dosage	26
1.3.1 Techniques chromatographiques.....	26
1.3.2 Tests immunologiques	27
1.4 La France et le Bassin d'Arcachon	29
1.4.1 Episodes toxiques en France	29
1.4.2 Bassin d'Arcachon et crises ostréicoles	31
CHAPITRE 2 : DOSAGES IMMUNOLOGIQUES ET IMMUNOCAPTEURS	33
2.1 Dosages Immunologiques	35
2.1.1 Historique.....	35
2.1.2 Interactions Antigène-Anticorps	35
2.1.3 Les méthodes de dosages	37
2.2 Les biocapteurs	41
2.2.1 Les biorécepteurs	42
2.2.2 Les modes de transductions	43
2.3 Immunocapteurs appliqués à la détection de phycotoxines	45
2.4 Mise en place d'un dosage de petites molécules	47
2.4.1 Haptène et couplage	48
2.4.2 Immunisation	49
2.4.3 Purification des anticorps.....	49
2.4.4 Tests sur le sérum.....	49
2.4.5 Validation du test	49
2.5 Conception de l'haptène	50
2.5.1 Fonctions pour le couplage	50
2.5.2 Bras espaceur	51
CHAPITRE 3 : SYNTHÈSE DES HAPTÈNES ET BIOCONJUGUÉS	53
3.1 Design de l'haptène	55
3.2 Synthèse de l'intermédiaire « clé »	56

3.2.1	Protection des fonctions acide et amine	57
3.2.2	Oxydation de la fonction hydroxyle.....	58
3.2.3	Alkylation	58
3.3	Synthèse de l'haptène 12	69
3.3.1	Réaction de Wittig	69
3.3.2	Réactions de WEH avec le diéthylphosphonoacétate de <i>t</i> -butyle	70
3.3.3	Réduction sélective avant couplage	72
3.3.4	Déprotection de l'ester de <i>t</i> -butyle	73
3.4	Synthèse de l'haptène 19	75
3.4.1	Synthèse du diéthylphosphonocrotonate de <i>t</i> -butyle 17.....	75
3.4.2	Réactions de WEH avec le diéthylphosphonocrotonate de <i>t</i> -butyle.....	75
3.5	Synthèse des bioconjugués	78
3.5.1	Conjugués BSA-Haptène	79
3.5.2	Couplages à la THYR	83
3.5.3	Couplage AD-HRP	84
3.6	Conclusion.....	85
CHAPITRE 4 : IMMUNOLOGIE.....		87
4.1	Immunisation	89
4.2	Caractérisation des anticorps	89
4.2.1	Principe du test ELISA	89
4.2.2	Titration des sérums	91
4.3	Mise en place des dosages	93
4.3.1	ELISA indirect (THYR-Haptène).....	93
4.3.2	ELISA indirect (THYR-AD).....	95
4.3.3	ELISA direct (AD-HRP).....	98
4.3.4	ELISA compétitifs direct et indirect	100
4.4	Conclusion.....	101
CHAPITRE 5 : IMMUNOCAPTEUR.....		103
5.1	Description du dispositif	105
5.2	Résultats / Discussion	107
5.2.1	Expérience préliminaire	107
5.2.2	Expérience de reconnaissance du motif AD.....	107
5.2.3	Mise en place du dosage	109
5.3	Conclusion.....	111
CONCLUSION GENERALE.....		113
CHAPITRE 6 : PARTIE EXPERIMENTALE		117
6.1	Techniques d'analyses.....	119
6.1.1	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	119
6.1.2	Chromatographie.....	119
6.1.3	Spectrométrie de Masse	119
6.1.4	Pouvoir rotatoire	119

6.2 Réactifs et solvants.....	120
6.3 Synthèse et caractérisations des divers composés.....	120
6.4 Réactions de couplage et hydrogénation des conjugués	128
6.4.1 Couplages à la BSA (albumine sérique bovine).....	128
6.4.2 Couplages à la THYR	131
6.4.3 Hydrogénation des conjugués	133
6.4.4 Couplage AD-HRP	135
6.5 Immunologie	135
6.5.1 ELISA indirect : THYR-Haptène.....	135
6.5.2 ELISA indirect : THYR-AD	135
6.5.3 ELISA indirect : THYR	137
6.5.4 ELISA direct : AD-HRP	137
6.5.5 ELISA compétitifs	137
6.6 Mise au point de l'immunocapteur	138
6.6.1 Caractéristiques du dispositif	138
6.6.2 Reconnaissance du motif AD.....	139
6.6.3 Expérience avec préincubation	139
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	141

Liste des abréviations

Dans un souci d'allègement du texte et des schémas, diverses abréviations ont été utilisées

Organismes et institutions

AFSSA :	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
ASCOBAR :	Apports Scientifiques face à la problématique Conchylicole du Bassin d'Arcachon
BRGM :	Bureau de Recherches Géologiques et Minières
CEMAGREF :	Centre Machinisme Agricole Génie Rural Eaux Forêts
CRC	Comités Régionaux de la Conchyliculture
CSOA :	Conseil Scientifique Ostréicole Aquitain
IFREMER :	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
IMS :	Laboratoire d'Intégration du Matériau Système (Université Bordeaux 1)
INRA :	Institut National de la Recherche Agronomique
ISM :	Institut des Sciences Moléculaires (Université Bordeaux 1)
LIP	Laboratoire d'Immunologie et Parasitologie (Université Bordeaux 2)
MAAPAR :	Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales
ONF :	Office National des Forêts
REPHY :	Réseau de surveillance du Phytoplancton et des phycotoxines
RRLA :	Réseau de Recherche Littorale Aquitain
SIBA :	Syndicat Intercommunal du Bassin d'Arcachon
SRC :	Section Régionale Conchylicole
UPPA :	Université de Pau et des Pays de l'Adour

Solvants et produits chimiques

ACN :	Acétonitrile
AD :	Acide Domoïque
AK :	Acide Kaïnique
AO :	Acide Okadaïque
BnBr :	Bromure de benzyle
Cbz :	Carobxybenzyle
CbzCl :	Chloroformate de benzyle
CuBr :	Bromure de cuivre
DBP :	Peroxyde de benzoyle
DCM :	Dichlorométhane
DMF :	Diméthylformamide
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
EDC :	Hydrochlorure de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
Et ₃ N :	Triéthylamine
Et ₃ SiH	Triéthylsilane
K ₂ CO ₃ :	Carbonate de potassium
LiHMDS :	Amidure de bis(triméthylsilyl)lithium
LiOH.H ₂ O :	Hydroxyde de lithium monohydraté
MeOH :	Méthanol

NaBH ₄ :	Borohydrure de sodium
NaH :	Hydrure de sodium
NaHMDS :	Amidure de bis(triméthylsilyl)sodium
NaOH :	Hydroxyde de sodium
NBS :	<i>N</i> -bromosuccinimide
NHS :	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NaI :	Iodure de sodium
NaHCO ₃ :	Hydrogénocarbonate de sodium
OPD :	o-phénylène diamine
PBS :	Tampon phosphate salin. (Phosphate Buffer Saline)
<i>t</i> -BuOK :	<i>t</i> -butoxyde de potassium
TBS :	Tampon salin à base de Tris (Tris Buffered Saline)
TEMPO :	2,2,6,6-Tetraméthyl-1-piperidinyloxy
TFA :	Acide trifluoroacétique
TFAA :	Anhydride trifluoroacétique
THF :	Tétrahydrofurane
TMB :	Tétraméthylbenzidine
Vitride® :	Hydrure de sodium bis(2-méthoxyéthoxy)aluminium

Termes des techniques d'analyse

CCM :	Chromatographie sur couche mince
DPV :	Voltammétrie impulsionnelle différentielle (Differential Pulse Voltammetry)
ELISA :	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
GC/MS :	Chromatographie en phase gaz couplée à la spectrométrie de masse
HMQC :	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC :	Chromatographie liquide à haute performance (High Performance Liquid Chromatography)
LC :	Chromatographie liquide
LC-MS :	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
MALDI :	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
NOESY :	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
QCM :	Microbalance à quartz (Quartz Crystal Microbalance)
RIA :	Radio ImmunoAssay
RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
SAW :	Onde Acoustique de Surface (Surface Acoustic Wave)
SDS-PAGE :	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide du sulfate dodécylque de sodium (Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel)
SPE :	Electrodes imprimées par sérigraphie (Surface-modified screen-Printed Electrodes)
SPR :	Résonance des plasmons de surface (Surface Plasmon Resonance)

Autres abréviations

Ac :	Anticorps
Ag :	Antigène
AMPA :	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate
ASP :	Amnesic Shellfish Poisoning
BSA :	Albumine sérique bovine (Bovin SerumAlbumine)

DO :	Densité Optique
DSP :	Diarrheic Shellfish Poisoning
DTXs :	Dinophysistoxines
éq. :	équivalent
GP :	Groupement protecteur
HRP :	Peroxydase du Raifort (Horse Radish Peroxidase)
HSA :	Albumine sérique humaine (Human Serum Albumine)
IDT :	Transducteur interdigité
Ig :	Immunoglobuline
KLH :	Keyhole Limpet Hemocyanin
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
OVA :	Ovalbumine
PDMS :	PolyDiMéthylSiloxane
PTXs :	Pecténotoxines
PSP :	Paralytic Shellfish Poisoning
Rdt	Rendement
SAM :	Monocouche monoassemblée (Self Assembled Monolayer)
SBBB :	SuperBlock Blocking Buffer
THYR :	Thyroglobuline porcine
YTXs :	Yessotoxines

INTRODUCTION GENERALE

Ces dernières années, différents épisodes d'intoxication de coquillages, notamment les huîtres, ont touché le Bassin d'Arcachon. L'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) est chargé, entre autre, de surveiller le littoral afin d'éviter et, ou de comprendre ces phénomènes. Dans ce cadre, le réseau de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines (REPHY) a été mis en place pour analyser régulièrement les eaux ainsi que les coquillages mis en vente.

A l'heure actuelle, la commercialisation des huîtres est soumise à des tests sanitaires pour définir si les coquillages sont propres à la consommation ou non. Le seul test validé, à l'heure actuelle, est le « test souris ». Celui-ci consiste à injecter à plusieurs rats une dose de broyat d'huîtres et de voir les effets après plusieurs jours sur les animaux. Or, ce type de test a conduit, à plusieurs reprises, à l'interdiction de la mise en vente des huîtres du Bassin. Si ce test a permis de prouver la présence d'une dose anormale de produits toxiques dans les huîtres, ceux-ci ne donnent aucune information sur la ou les toxines responsables de la mort de l'individu. De plus, si il est avéré qu'une présence anormalement importante de *Dinophysis*, principal producteur des toxines diarrhéiques notamment, peut être, la plupart du temps, corrélé avec la mort des souris, ce n'est pas toujours le cas. Cela signifie que d'autres toxines peuvent être responsables de la mort des souris. Il est donc urgent de développer des moyens efficaces permettant d'analyser les coquillages ainsi que les eaux du Bassin.

Le Conseil Régional d'Aquitaine, avec le soutien financier de la Communauté Européenne (Fonds FEDER), a mis en place un vaste projet sur le Bassin d'Arcachon afin d'apporter des réponses à toutes les professions touchées par ces épisodes d'intoxication. Cette vaste campagne de recherche fait intervenir scientifiques et organismes de tous bords et se décompose en 5 axes allant de la microélectronique à la dynamique océanique. Un budget de 800 000 euros a donc été investi de façon à financer les différents volets de ces recherches.

Au sein de ce grand projet, il a été proposé d'étudier la faisabilité d'un biocapteur permettant de détecter la présence de phycotoxines dans l'eau de mer basé sur la liaison anticorps antigène. En effet, jusque-là l'identification se fait par des procédés nécessitant du personnel qualifié et des équipements lourds et coûteux. La mise au point d'un test immunologique couplé à un biocapteur permettrait d'obtenir un test plus rapide, facilement manipulable et très bon marché.

Ce travail nécessite la collaboration de trois groupes de recherche l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM) pour la partie chimique de synthèse de l'haptène, le laboratoire de l'Intégration du Matériau Système (IMS) pour la mise au point de capteur, ainsi que le Laboratoire d'Immunologie et de Parasitologie (LIP) pour tout ce qui concerne la production

d'anticorps. Dans un premier temps la synthèse d'haptènes permettra d'obtenir des anticorps dirigés contre les phycotoxines. Ceux-ci, une fois greffés à la surface du biocapteur permettront d'établir l'efficacité du système. Si ces tests s'avèrent concluants, cet outil novateur pourrait alors être étendu à différentes familles de toxines voire d'autres composés.

Chapitre 1 : Les Phycotoxines

1.1 Généralités

Le mot *toxine* vient du grec *toxikon* qui désignait les poisons utilisés sur les flèches. Il définit aujourd'hui toute substance toxique produite par un être vivant. Par extension on peut trouver les mots phytotoxines ou zootoxines correspondant à des toxines produites, respectivement, par des plantes ou des animaux. Par analogie, les phycotoxines sont donc les toxines produites par les plantes aquatiques et les algues.

Les intoxications périodiques par les phycotoxines sont connues depuis longtemps. L'épisode le plus récent date de 1987 au Canada¹. Après ingestion de moules, cent cinquante personnes furent hospitalisées pour des symptômes allant du simple vomissement à la perte de mémoire, quatre d'entre elles, toutes des personnes âgées, moururent et plusieurs présentèrent des séquelles neurologiques irréversibles. L'agent responsable de cette intoxication lourde de conséquences fut identifié, il s'agissait de l'acide domoïque²⁻⁵.

Certaines algues sont directement toxiques pour la faune aquatique. Par contre, d'autres, peu ou pas toxiques pour les espèces marines, peuvent s'accumuler dans les organes digestifs de celles-ci (mollusques filtreurs notamment). Ce stockage les rend alors impropres à la consommation. Dans le cas où un individu ingère une quantité suffisante de produits marins contaminés, il peut y avoir intoxication. Jusqu'à maintenant, plusieurs types d'empoisonnements ont été identifiés, chacun étant responsable de différents symptômes à partir desquels une classification des familles de toxines a été établie. On distingue donc :

- ⇒ les toxines diarrhéiques liposolubles : Diarrheic Shellfish Poisoning (DSP)
- ⇒ les toxines paralysantes hydrosolubles : Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)
- ⇒ les toxines amnésiantes hydrosolubles : Amnestic Shellfish Poisoning (ASP)
- ⇒ les toxines neurologiques liposolubles : Neurologic Shellfish Poisoning (NSP)

Depuis 2004, la classification de ces familles a évolué pour donner huit nouveaux groupes⁶:

- le groupe de l'acide okadaïque et des dinophysistoxines
- le groupe des saxitoxines ;
- le groupe de l'acide domoïque ;
- le groupe des pecténotoxines ;
- le groupe des yessotoxines ;
- le groupe des brevéttoxines ;
- le groupe des azaspiracides ;

- le groupe des imines cycliques (comprenant les spirolides).

Ces groupes ne sont plus classés par symptômes mais en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

Dans ce document, l'ancienne nomenclature est utilisée (la nouvelle classification est indiquée entre parenthèses) et le paragraphe concernant les DSP inclut les autres toxines lipophiles.

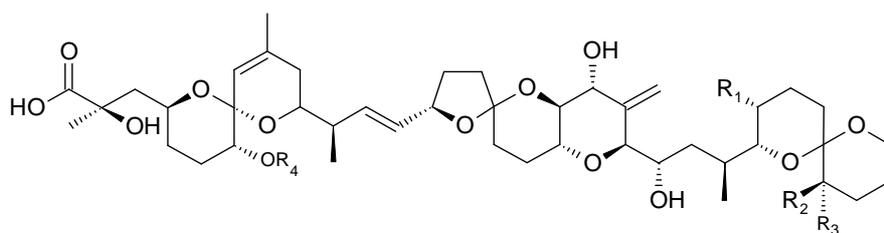
1.2 Les familles de toxines

1.2.1 La famille des DSP (groupe de l'acide okadaïque et des dinophysistoxines)

Suite à des intoxications gastro-intestinales dues à la consommation de coquillages contaminés dans les années 60 (Pays-Bas)⁷ et 70 (Japon)⁸, les travaux des équipes japonaises ont permis d'établir un lien entre la contamination des coquillages et la présence de *Dinophysis fortii* (dinoflagellé) dans l'eau de mer. La toxine responsable a pu être identifiée et a été baptisée Dinophysistoxine-1 (DTX1)⁹.

1.2.1.1 Structure chimique

L'acide okadaïque (AO) et ses dérivés, appelés dinophysistoxines (DTXs), sont des composés lipophiles. L'acide okadaïque a été isolé à partir de deux espèces d'éponges, *Halichondria okadaï* et *H. melanodocia*, provenant respectivement des côtes du Japon et de Floride¹⁰. Les dinophysistoxines 1 et 2 (DTX1 et DTX2) ont, quant à elles, pu être isolées à partir de moules^{11,12}. Les structures de l'acide okadaïque et de ses dérivés¹³ sont représentées Figure 1.



Nom	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Acide okadaïque (AO)	CH ₃	H	H	H
Dinophysistoxine 1 (DTX1)	CH ₃	CH ₃	H	H
Dinophysistoxine 2 (DTX2)	H	H	CH ₃	H
Dinophysistoxine 3 (DTX3)	CH ₃	CH ₃	H	Acyl

Figure 1 : Structure de l'acide okadaïque et de ses dérivés (AO, DTXs).

1.2.1.2 Origine et répartition

L'acide okadaïque et ses dérivés ont été recensés un peu partout dans le monde même si l'Europe¹⁴ et le Japon¹⁵ restent les deux régions principalement touchées. D'autre part, il existe un grand nombre d'espèces productrices des toxines de la famille des DSP. Les algues du genre *Dinophysis*⁹ et *Prorocentrum*¹⁶ sont les plus courantes.

Si la principale toxine présente sur les côtes françaises est l'acide okadaïque, d'autres régions rencontrent d'autres toxines de façon préférentielle. C'est le cas de la DTX2 en Irlande¹² ou de la DTX1 pour les côtes américaines et nippones¹⁰. D'autre part, des variations saisonnières peuvent être observées changeant le degré de risque pour les consommateurs.

1.2.1.3 Symptômes et mode d'action

L'intoxication par les DSP se caractérise par des diarrhées, des nausées, des vomissements ainsi que des douleurs abdominales dans les cas les plus sévères¹¹. Ces symptômes interviennent dans une période de trente minutes à quelques heures après l'ingestion de produits contaminés et peuvent durer pendant plusieurs jours (3-4) avant que l'individu ne retrouve un état normal. Ces intoxications présentent peu de gravité et nécessitent rarement l'hospitalisation. A l'heure actuelle, aucune mort due à ces toxines n'a été recensée.

La toxicité des molécules de la famille des DSP est due à l'inhibition des phosphatases responsables de la déphosphorylation entraînant une accumulation des protéines phosphorylées (Figure 2). Ceci provoque deux phénomènes importants : la production de

tumeurs et la contraction des muscles lisses. C'est ce deuxième effet qui expliquerait les douleurs abdominales et les diarrhées¹⁷.

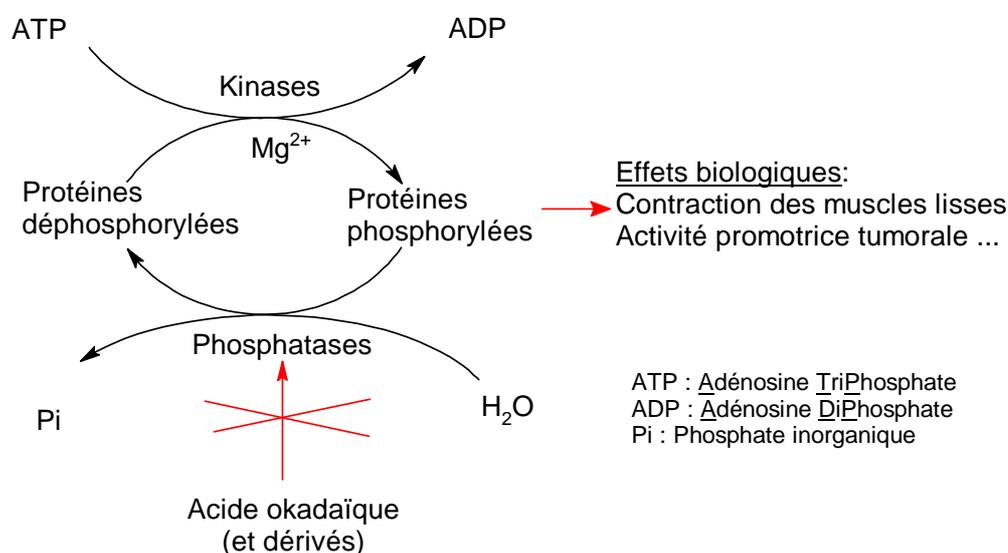


Figure 2 : Mécanisme d'action de l'acide okadaïque (et dérivés).

1.2.1.4 Autres toxines lipophiles

1.2.1.4.1 Les pecténotoxines (PTXs)

Les PTXs sont des polyéthers (Figure 3) qui furent tout d'abord isolés à partir des glandes digestives des coquilles Saint Jacques *Patinopecten yessoensis* cultivées au Japon¹⁸. Dans un premier temps, *Dinophysis fortii* fût identifié comme producteur principal de ces toxines^{19,20} mais plus récemment d'autres espèces du genre *Dinophysis* ont montré la présence de pecténotoxines²¹.

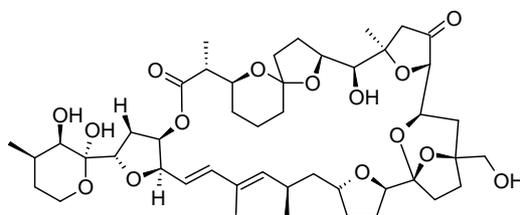


Figure 3 : Structure de la pecténotoxine PTX-1.

De nombreuses études ont été menées sur des souris afin d'étudier leur toxicité. Les résultats ont soulevé une controverse sur la nature des symptômes provoqués (diarrhéiques) qui est

encore d'actualité. Néanmoins, ces travaux ont permis de mettre en évidence un seuil de toxicité de façon à protéger les consommateurs (Tableau 1).

1.2.1.4.2 Les yessotoxines (YTXs)

Les YTXs sont des polyéthers polycycliques disulfatés. La yessotoxine (YTX, Figure 4), chef de file de ce groupe, a été isolée pour la première fois à partir de *Patinopecten yessoensis*²². Il est maintenant clairement établi que son mode d'action est très différent de celui de l'AO (pas d'inhibition des phosphatases, ni d'activité diarrhéique)²³ ce qui explique la distinction de ce nouveau groupe.

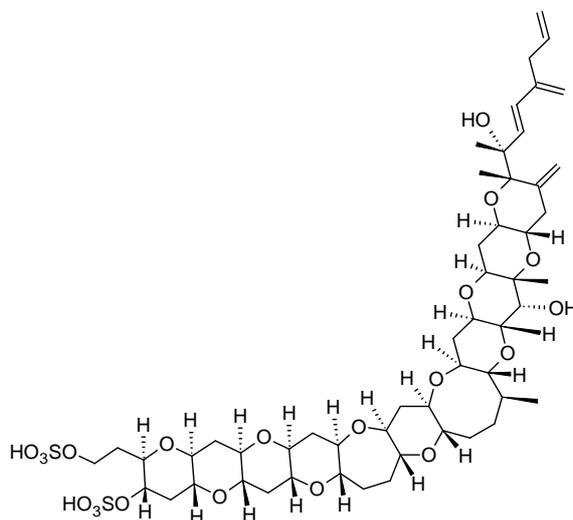


Figure 4 : Structure de la yessotoxine YTX.

Les recherches menées semblent montrer que les YTXs possèdent un degré de toxicité moindre que celui de l'AO et de ses dérivés. Les YTXs ne semblent donc pas être une menace sérieuse pour la santé humaine. Néanmoins des limites de toxicité chez la souris ont, ici aussi, pu être mises en évidence de façon à prévenir tout épisode toxique chez les consommateurs (Tableau 1).

1.2.1.4.3 Les azaspiracides (AZAs)

Les azaspiracides furent identifiés après un épisode d'intoxication aux Pays Bas en 1995²⁴. Leur nom vient de leur structure chimique présentant une amine cyclique (azo), trois éthers cycliques (spiro) et une fonction acide carboxylique (acide) (Figure 5). Les individus

contaminés présentaient les symptômes d'une intoxication aux DSP mais les taux mesurés d'acide okadaïque et de ses dérivés étaient très en dessous des seuils tolérés.

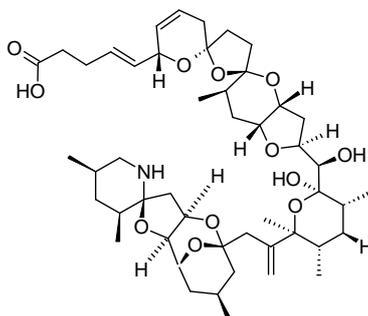


Figure 5 : Structure de l'azaspiracide AZA-1.

Malgré la similitude des symptômes, le mode d'action est différent de celui de l'acide okadaïque mais toujours inconnu à ce jour²⁵.

Les études de toxicité ont permis d'établir une dose maximale tolérée dans les coquillages (Tableau 1).

1.2.1.5 Analyse et réglementation

Toutes les familles de molécules décrites précédemment ne présentent pas la même toxicité. Les valeurs de ces seuils de tolérance sont précisées dans la directive 2002/225/CE par l'Union Européenne²⁶ (Tableau 1).

Le dépistage des toxines liposolubles utilise le test *in vivo*, appelé « test souris », ou encore méthode de Yasumoto *et coll.*, modifiée²⁷. Les glandes digestives du coquillage sont utilisées pour une injection intra péritonéale et les coquillages sont considérés contaminés si la mort de deux des trois souris intervient dans une période de 24 heures. Le fait d'utiliser trois souris permet de prendre en compte la variabilité inter-individuelle de résistance des souris aux toxines.

Toxines	Limite réglementaire en vigueur dans l'UE
Acide okadaïque (AO)	160 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de chair de coquillage
Dinophysistoxines et pecténotoxines	160 $\mu\text{g éq. AO.kg}^{-1}$ de chair de coquillage
Yessotoxines	1 mg éq. YTX.kg ⁻¹ de chair de coquillage
Azaspiracides	160 $\mu\text{g éq. AZA.kg}^{-1}$ de chair de coquillage

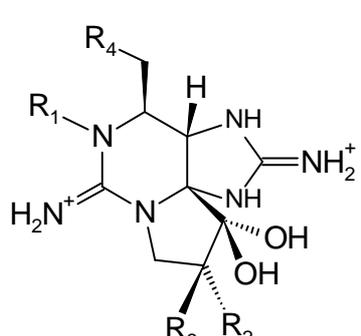
Tableau 1 : Limites maximales des DSP autorisées dans les coquillages.

1.2.2 La famille des PSP (groupe des saxitoxines)

L'empoisonnement par les PSP est dû à la consommation de coquillages contaminés par des dinoflagellés toxiques. Le premier épisode décrit date de 1927 le long des côtes californiennes. L'algue responsable, *Alexandrium catenella*, identifiée par Sommer *et coll*, provoqua une intoxication chez cent deux personnes et causa la mort de six d'entre elles²⁸. En 1987, vingt-six personnes trouvèrent la mort au Guatemala suite à la consommation de mollusques (*Amphichaena kindermani*)²⁹.

1.2.2.1 Structure chimique

La structure de base des PSP est la 3,4-propinoperhydropurine tricyclique. La famille peut être divisée en quatre catégories représentées Figure 6 :



Toxine	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Carbamate				
STX	H	H	H	OCONH ₂
Neo STX	OH	H	H	OCONH ₂
GTX1	OH	OSO ₃ ⁻	H	OCONH ₂
GTX2	H	OSO ₃ ⁻	H	OCONH ₂
GTX3	H	H	OSO ₃ ⁻	OCONH ₂
GTX4	OH	H	OSO ₃ ⁻	OCONH ₂
N-sulfocarbamoyl				
GTX5(B1)	H	H	H	OCONHSO ₃ ⁻
GTX6(B2)	OH	H	H	OCONHSO ₃ ⁻
C1	H	OSO ₃ ⁻	H	OCONHSO ₃ ⁻
C2	H	H	OSO ₃ ⁻	OCONHSO ₃ ⁻
C3	OH	OSO ₃ ⁻	H	OCONHSO ₃ ⁻
C4	OH	H	OSO ₃ ⁻	OCONHSO ₃ ⁻
Decarbamoyl				
deSTX	H	H	H	OH
deNeoSTX	OH	H	H	OH
deGTX1	OH	OSO ₃ ⁻	H	OH
deGTX2	H	OSO ₃ ⁻	H	OH
deGTX3	H	H	OSO ₃ ⁻	OH
deGTX4	OH	H	OSO ₃ ⁻	OH
Deoxydecarbamoyl				
doSTX	H	H	H	H
doGTX2	H	H	OSO ₃ ⁻	H
doGTX3	H	OSO ₃ ⁻	H	H

Figure 6 : Structure des toxines PSP.³⁰

1.2.2.2 Origine et répartition

Les dinoflagellés sont la source des toxines de la famille des PSP. Parmi eux, trois espèces apparaissent prédominantes : *Alexandrium*, *Gymnodium* et *Pyrodinium*³¹. Ces toxines sont présentes sur les cinq continents.

1.2.2.3 Symptômes et mode d'action

Les symptômes sont principalement neurologiques et gastro-intestinaux. Ils apparaissent entre quinze minutes et dix heures après ingestion de nourriture contaminée. Dans les cas graves d'intoxication, se manifestent un désordre musculaire important et un dysfonctionnement respiratoire pouvant entraîner la mort. Ces toxines agissent en bloquant les canaux sodiques ce qui a pour effet de perturber la propagation du potentiel d'action³².

1.2.2.4 Analyse et réglementation

Depuis 1991, la réglementation européenne impose un seuil de tolérance de 800 µg d'équivalent saxitoxine par kg de chair de coquillage³³ et le test en vigueur est le « test souris ». 1 mL d'extrait acide de l'échantillon sont injectés à un lot de cinq souris de 20 grammes. Le temps de survie est mesuré avec précision. Les symptômes présentés par les souris, caractéristiques des toxines paralysantes, sont des sauts, des convulsions, suivis de la mort par arrêt respiratoire. Le temps de survie permet alors la mesure de la concentration en PSP grâce à des tables et des facteurs de conversion afin de donner une réponse en µg d'équivalent saxitoxine.

1.2.3 La famille des ASP (groupe de l'acide domoïque)

La molécule la plus toxique des ASP est l'acide domoïque. L'épisode le plus important d'intoxication dû à cette toxine a eu lieu au Canada en 1987 et causa la mort de quatre personnes¹.

1.2.3.1 Structure chimique

L'acide domoïque a été isolé et identifié pour la première fois en 1958 grâce aux investigations menées par Takemoto et Daigo sur les activités vermicide et insecticide d'extraits de *Chondria armata*³⁴. Sa structure fût confirmée plus tard lors de la synthèse totale réalisée par Ohfuné *et coll.*⁵ (Figure 7).

L'acide domoïque est un acide aminé excitatoire, non protéique, soluble dans l'eau. Sa structure est proche de celle de l'acide kainique. Ces composés possèdent un cycle pyrrolidine tri-substitué en position 2-, 3- et 4-.

Plusieurs isomères de l'acide domoïque ont pu être identifiés (Figure 7)³⁵.

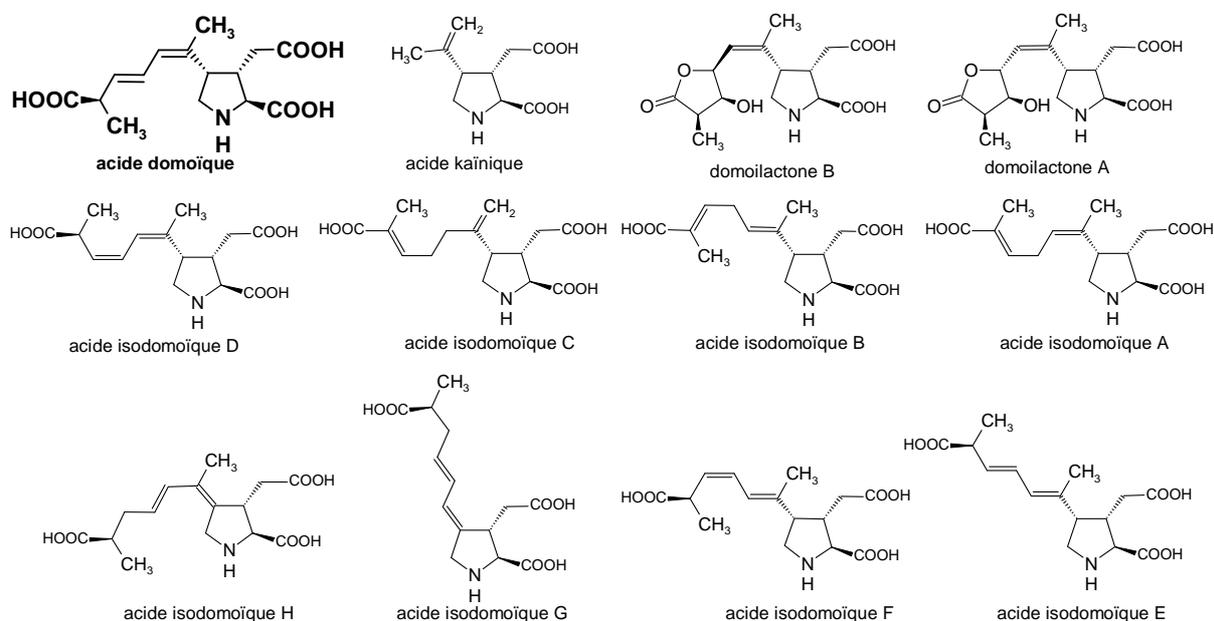


Figure 7 : Structures de l'acide domoïque et de ses dérivés.

L'acide domoïque est relativement stable et ne se dégrade pas à température ambiante. Sa décomposition apparaît lors de températures plus élevées ($>50^{\circ}\text{C}$) ou dans des milieux extrêmement acides ($\text{pH} \leq 2$) ou basiques ($\text{pH} \geq 12$). D'autre part, cette molécule est sensible à la lumière qui est le premier facteur d'élimination de celle-ci en milieu naturel³⁶. Néanmoins, il est à noter que le paramètre température lors de la conservation reste mal maîtrisé.

1.2.3.2 Origine et répartition

Dans un premier temps, une algue, *Chondria armata*, produisant de l'acide domoïque fut isolée. Par la suite, d'autres producteurs de la toxine furent identifiés. Par exemple, *Pseudo-nitzschia multiseries* fut soupçonné d'être à l'origine de la contamination des moules (*Mytilus edulis*) qui entraîna l'épisode canadien de 1987¹. La culture de cette algue montra, en l'absence d'autres organismes dans le milieu, la production d'acide domoïque³⁷. Depuis, les ASP ont été recensées dans le monde entier (Tableau 2) et de nouveaux producteurs ont pu être mis en évidence. En effet d'autres espèces du genre *Pseudo-nitzschia* ont été rencontrées

en Ecosse (*P. seriata*)³⁸ et en Irlande (*P. australis*)³⁹ de même que certaines diatomées et algues rouges³⁶.

Continent	Pays	Références	
Afrique	Angola	Blanco ⁴⁰	
Amérique	Etats-Unis	<i>Floride</i>	Bellinger ⁴¹
		<i>Louisiane</i>	Parsons ⁴²
		<i>Californie</i>	Fritz ⁴³
		<i>Washington</i>	Holtermann ⁴⁴ , Stehr ⁴⁵
	Canada	Bates ¹ , Martin ⁴⁶	
	Mexique	Sierra-Beltran ⁴⁷	
	Argentine	Almandoz ⁴⁸	
	Chili	Alvarez ⁴⁹	
Asie	Vietnam	Kotaki ⁵⁰	
Europe	Irlande		James ⁵¹
			Stobo ⁵²
	Royaume Uni	<i>Ile de Man</i>	Bogan ⁵³
	France		Klein ⁵⁴
	Portugal		Vale ⁵⁵
	Italie		Zingone ⁵⁶
Océanie	Australie	Takahashi ⁵⁷	
	Nouvelle Zélande	Rhodes ⁵⁸	

Tableau 2 : Occurrence mondiale des ASP.

1.2.3.3 Symptômes et mode d'action

Au cours des premières 24 heures, après ingestion de coquillages contaminés, les symptômes rencontrés sont de type gastro intestinal (diarrhées, vomissements, nausées, crampes abdominales...). Les troubles neurologiques n'interviennent qu'entre 24 et 48 heures après l'ingestion. Ils vont des maux de tête persistants à une désorientation dans les cas légers. Il peut apparaître des pertes de mémoire, des dommages cérébraux voire des convulsions et un coma conduisant à la mort dans les cas les plus graves⁵⁹. L'activité des toxines ASP vient de leur analogie structurale avec l'acide glutamique, un neurotransmetteur excitateur du système nerveux central (Figure 8):

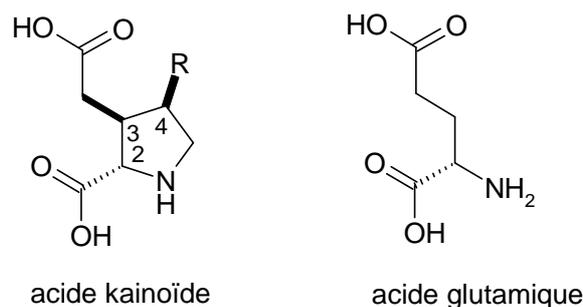


Figure 8 : Analogie structurale entre les dérivés de l'acide kaïnique et l'acide glutamique.

Cette analogie de structure leur permet d'activer trois sous types de récepteurs ionotropiques du glutamate, qui contrôlent l'ouverture des canaux ioniques du neurone post synaptique : les récepteurs AMPA (activés spécifiquement par l' α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate, AMPA), kainate et NMDA (activés spécifiquement par le N-méthyl-D-aspartate, NMDA). Lors de la dépolarisation de la cellule pré synaptique, le glutamate est relâché au niveau de la fente synaptique et interagit avec ses propres récepteurs. Dans le cas des sous récepteurs kainate et AMPA, la fixation des ASP conduit à une perméabilité accrue aux ions Ca^{2+} alors que l'activation des récepteurs NMDA va permettre l'entrée de Na^+ et de Ca^{2+} dans le neurone post synaptique. A la différence du glutamate, les toxines ASP, de par leur rigidité, ne vont pas se détacher facilement du récepteur et donc provoquer un afflux continu de cations⁶⁰. L'excès de Ca^{2+} intracellulaire va conduire à une perturbation du fonctionnement cellulaire, un gonflement de la cellule et enfin à la mort de celle-ci^{61,62}. Les récepteurs du glutamate sont très nombreux dans l'hippocampe qui est le siège de la mémoire, ce qui explique les symptômes observés chez les personnes intoxiquées.

Il faut noter également que la toxicité des molécules est liée aux forces de liaison avec les récepteurs. Celle-ci est largement influencée par la présence et la nature d'un substituant en position 4-, par la stéréochimie du carbone 4 et enfin par la conformation de la molécule⁶³.

1.2.3.4 Analyses et réglementation

La réglementation concernant l'acide domoïque a été mise en place après l'épisode de 1987. Les autorités canadiennes ont établi une limite correspondant à 20 μg de toxines ASP par gramme de chair de coquillage. Cette limite prend en compte un facteur de sécurité de l'ordre de 10 car le seuil de toxicité a été estimé à 200 μg d'acide domoïque par gramme de chair^{35,64}. Cette réglementation est aussi appliquée dans de nombreux pays comme la Nouvelle Zélande, l'Australie, les Etats-Unis ainsi que par l'Union Européenne^{26,36}.

Dans le cas des toxines ASP, le « test souris » en vigueur pour les autres familles de toxines (DSP et PSP) s'avère inefficace à cause de problèmes de sensibilité. L'absence de relation effet/dose fiable oblige l'utilisation d'un test chimique. Depuis 1997, au sein de l'Union Européenne⁶⁵, le test de référence pour quantifier la présence des ASP est donc la chromatographie liquide (LC) couplée à la détection UV^{2,66,67}. La complexité et le coût de l'appareillage sont des raisons pour lesquelles d'autres méthodes sont en cours de développement. Les dosages immunologiques, notamment les tests ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ainsi que les systèmes de détection avec des immunocapteurs sont étudiés⁶⁸.

1.3 Comparaison des méthodes de dosage

La méthode de référence pour le dosage de la majorité des phycotoxines est le test souris. Cependant, il présente des inconvénients tels qu'une spécificité limitée, une sensibilité insuffisante dans les cas des ASP et des problèmes d'éthique. Des méthodes alternatives sont toujours recherchées de façon à assurer une protection maximale du consommateur.

Les méthodes les plus usuelles sont les techniques chromatographiques dites "tests chimiques" et les tests immunologiques.

1.3.1 Techniques chromatographiques

Depuis janvier 2010 en France, la réglementation en vigueur implique l'utilisation des tests chimiques pour vérifier la présence de toxines lipophiles⁶⁹. Malheureusement, la plupart des toxines ne présentent pas de chromophores et nécessitent donc une étape supplémentaire pour les rendre *visibles* par les détecteurs utilisés. La revue de Garthwaite⁷⁰, permet de regrouper les diverses techniques chromatographiques utilisées pour chaque famille de toxines. Celle-ci montre que la chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse (LC-MS) donne de très bons résultats pour les DSP et ASP avec des limites de détection bien en dessous des limites admises (respectivement 8 et 10 ng par gramme de chair de coquillages). Cependant cette méthode est beaucoup moins efficace vis-à-vis de la famille des PSP car il subsiste des problèmes d'effets de matrice ou de purification des échantillons. De plus, les techniques

chromatographiques restent relativement chères, nécessitent un personnel qualifié et sont peu efficaces pour l'analyse d'un large échantillonnage.

1.3.2 Tests immunologiques

Le test immunologique le plus répandu est l'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (*cf* section 2.1.3.1). Celui-ci est développé à partir d'anticorps dirigés contre les toxines. Les premiers anticorps dirigés contre les PSP ont été développés en 1964⁷¹. A l'heure actuelle, il existe des anticorps dirigés contre toutes les familles de toxines et chaque famille possède son kit ELISA (Kit Biosense pour les ASP par exemple). Ces tests présentent une grande sensibilité, une forte sélectivité, un faible coût et une mise en œuvre relativement simple. Néanmoins, aucun d'entre eux n'est pour l'heure reconnu comme méthode officielle d'analyse des toxines.

Une comparaison des différentes méthodes les plus utilisées pour la détection de l'acide domoïque³⁶ est présentée Tableau 3.

Méthode	Sensibilité (ng AD.mL ⁻¹)	Gamme (µg AD.mL ⁻¹)	Matrice ^a	Avantages	Inconvénients
Test souris	NA	> 0,2	SH, PP	Toxicité globale	Insensible, non spécifique, non validée, variation individuelle, problème éthique, faible échantillonnage.
ELISA direct	~0,01	0,00001-0,01	SH, PP, DP, OT, BL, U, B, F	Forte sensibilité, large échantillonnage, sélectif de l'AD avec faible interférence, robuste, large choix de matrice.	Non validée, gamme étroite nécessitant plusieurs essais dans le cas de forte concentration d'AD
Jellett ASP test strips	~200	0,2-15	SH	Portatif, simple d'emploi. Bonne corrélation avec LC-UV	Non quantitatif. Couteux (~27 \$US par échantillon). Non confirmatif
Chromatographie liquide couplée UV_{DAD}	~10	0,01-10	SH, PP, DP, OT, BL, U, B, F	Précis, haute résolution, méthode validée, hautement reproductible	Matériel spécialisé et couteux, coûts de maintenance importants, effets de matrice, purification requise.
Radio ligand	~5	0,005-0,2	SH, PP, DP, OT, BL, U, B, F	Réponse rapide, hautement reproductible, sensibilité élevée, mesure stable.	Utilisation de ligand tritié, nécessité d'un laboratoire habilité avec personnel qualifié dans la radioactivité. Méthode confirmative requise.
LCMS/MS	~2	0,002-10	SH, PP, OT, BL, U, B, F	Confirmation de la structure (MS/MS), sensibilité élevée, haute résolution, quantitatif pour tous les isomères. Analyse multitoxines.	Purification requise, opérateurs qualifiés, faible échantillonnage. Infrastructures couteuses et spécialisées, coûts d'entretien élevés
Electrophorèse capillaire-UV_{DAD}	~150	0,15-8	SH, FS	Pas de purification, simple dilution, haut pouvoir de résolution, faible consommation (solvant et tampons).	Nécessite couplage MS pour confirmation

^a SH : extrait coquillage ; PP : extrait phytoplancton ; DP : phytoplancton dissous ; OT : autre tissu ; BL : sang ; U : urine ; F : fèces ; B : bile ; FS : nourriture ; AD = acide domoïque ; DAD = détection à barrettes de diodes.

Tableau 3 : Comparaison des méthodes les plus employées pour la détection de l'acide domoïque (AD).

1.4 La France et le Bassin d'Arcachon

Les phycotoxines sont une menace permanente pour les organismes filtreurs, type coquillage tels que les huîtres ou les moules. Au cours des dernières années, leur recherche est devenue systématique. Suite à un épisode d'intoxication majeure de consommateurs de coquillages, survenu en France en 1983, l'IFREMER a mis en place, sur l'ensemble du littoral français un Réseau de Surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines (REPHY).

Des prélèvements d'eau sont régulièrement réalisés, et les espèces de phytoplancton identifiées. En cas de présence d'algues toxiques, des prélèvements (d'huîtres par exemple) sont effectués pour détecter et quantifier ces toxines. Ces analyses sont faites à l'aide de biotests (test souris, tests immunologiques...) et de méthodes physico-chimiques (HPLC, spectrométrie de masse...). De ces résultats va dépendre la décision d'interrompre la mise sur le marché.

On mesure donc l'intérêt de développer des méthodes alternatives, plus performantes, moins onéreuses, au délai de réponse relativement court, pour l'impact économique.

1.4.1 Episodes toxiques en France

1.4.1.1 Historique

En France, les risques pour la santé humaine sont le fait de trois groupes d'espèces phytoplanctoniques : les algues *Dinophysis*, *Alexandrium* et *Pseudo-nitzschia* responsables respectivement de la production des toxines DSP, PSP et ASP⁷².

En 1983, les intoxications diarrhéiques ont été liées aux efflorescences de *Dinophysis*. Cette même année, elles ont provoqué 3300 cas de gastro entérites en Bretagne Sud. L'espèce *Dinophysis* affecte une grande partie du littoral français de façon saisonnière et plus régulièrement la Bretagne, la Normandie, le Languedoc Roussillon et la Corse.

L'espèce *Alexandrium minutum* a été identifiée pour la première fois en 1988 dans les Abers en Bretagne nord-ouest. Sa prolifération est régulièrement observée depuis cette date sur la côte de Bretagne nord : Abers, baie de Morlaix et Rance. Les épisodes PSP conduisant à des interdictions de vente des coquillages, sont généralement observés en fin de printemps et en été.

L'espèce *Alexandrium catenella/tamarensis* a été observée pour la première fois en quantité importante en novembre et décembre 1998 dans l'étang de Thau, sur la côte ouest méditerranéenne. Une interdiction de vente pour moules et palourdes y a été prononcée. Une autre souche de l'espèce *A. minutum* a également provoqué un épisode de toxicité PSP en rade de Toulon (est Méditerranée) au printemps 2000.

Des proliférations importantes d'espèces non toxiques de *Pseudo-nitzschia* sont observées depuis longtemps sur l'ensemble du littoral français, en particulier au printemps. Des espèces potentiellement toxiques (*P. pseudodelicatissima* et *P. multiseriis*) avaient été détectées dans différentes régions ces dernières années, mais à des concentrations faibles. En mai 2000, le développement plus important de l'une de ces espèces a conduit à la présence de toxines amnésiantes dans les coquillages de la mer d'Iroise et de la baie de Douarnenez (Bretagne ouest).

1.4.1.2 Stratégie de surveillance

Le REPHY, mis en place en 1984 s'intéressait, au départ, uniquement aux intoxications diarrhéiques (DSP). Ce réseau s'est ensuite étoffé avec la prise en compte des intoxications paralysantes (PSP) et amnésiantes (ASP), suite à la directive européenne de 1997.

Au départ, la stratégie était basée sur la détection des espèces phytoplanctoniques toxiques dans l'eau. Lorsque les abondances de certains genres ou espèces dépassent un certain seuil d'alerte, des analyses de toxicité sont mises en œuvre pour rechercher les phycotoxines correspondantes dans les coquillages (Tableau 4).

Intoxication	Algues concernées	Seuil d'alerte	Analyse
DSP	<i>Dinophysis</i> spp.	500 cellules/L	Test souris
PSP	<i>Alexandrium</i> spp.	10 000 cellules/L	Test souris
ASP	<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	100 000 cellules/L	Analyse chimique

Tableau 4 : Seuil d'alerte pour les algues toxiques.

Les services vétérinaires européens ont estimé que cette stratégie était insuffisante et l'ont donc modifiée, en accord avec le MAAPAR (Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales) et l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments).

En plus de la détection des espèces phytoplanctoniques toxiques, une surveillance hebdomadaire systématique de la toxicité des mollusques dans les zones et périodes à risque définies selon des critères précis⁷² a été mise en place.

Depuis 2005, deux périodes à risque ont été définies pour les toxines DSP : d'avril à août, et en janvier. Par ailleurs, depuis 2002, une surveillance systématique des toxines PSP dans les coquillages du Bassin d'Arcachon pendant la période hivernale a été mise en place.

1.4.2 Bassin d'Arcachon et crises ostréicoles

L'année 2005 a été marquée par plusieurs épisodes de contamination des mollusques du Bassin d'Arcachon par différentes toxines. Les concentrations de *Pseudo-nitzschia* ont dépassé le seuil d'alerte, entre mi-mars et mi-mai, et ont conduit à l'analyse de certains échantillons. Pour la première fois, il a été mis en évidence la présence de toxine amnésiante à des concentrations inférieures à 5 et 3 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de chair (pour les moules et les huîtres respectivement) toutefois en deçà du seuil sanitaire (20 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de chair).

Entre la fin du mois d'avril et le début du mois d'août, les huîtres et les moules du Bassin d'Arcachon ont été contaminées par un mélange de toxines mises en évidence par analyse chimique : OA, DTXs, PTXs et spirolides. Fin avril 2005, une forte teneur en acide okadaïque a été mesurée sur des moules du banc d'Arguin (784 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de chair). Cette contamination a conduit à un arrêté préfectoral interdisant la pêche, le ramassage, le transport, le stockage, l'expédition et la vente de tous les coquillages du Bassin d'Arcachon.

Au cours de l'année 2006, deux périodes ont été marquées par des tests souris DSP positifs conduisant à l'interdiction de la pêche, du ramassage et de la vente des mollusques exploités. Ces tests souris étaient associés à la présence de phycotoxines (AO, PTXs et spirolides) dans les mollusques mais toujours à des concentrations assez faibles.

Ainsi, ces deux années ont été marquées par de fortes menaces sanitaires. Si ces arrêtés préfectoraux ont permis de protéger les consommateurs, les ostréiculteurs ont, quant à eux, été durement touchés. Le Conseil Régional d'Aquitaine a donc tenu à apporter son soutien politique et financier pour tenter de mettre en place un vaste plan de recherche pluridisciplinaire, le programme ASCOBAR (Apports Scientifiques face à la problématique Conchylicole du Bassin d'Arcachon) afin d'apporter des solutions pour éviter de futures

crises. Ce projet interdisciplinaire (Figure 9), dont le Responsable Scientifique est Benoît Sautour (Laboratoire EPOC, Université bordeaux I), a été doté de deux millions d’euros par la Région Aquitaine. Il est mené sous l’égide du RRLA (Réseau de Recherche Littorale Aquitain) dont le coordinateur est aussi Benoît Sautour.

ASCOBAR intègre également des actions multidisciplinaires en concertation avec les professionnels ostréicoles (CSOA, CRC, SRC) et des collectivités territoriales (SIBA, Conseil Général 33, Conseil Régional d'Aquitaine).

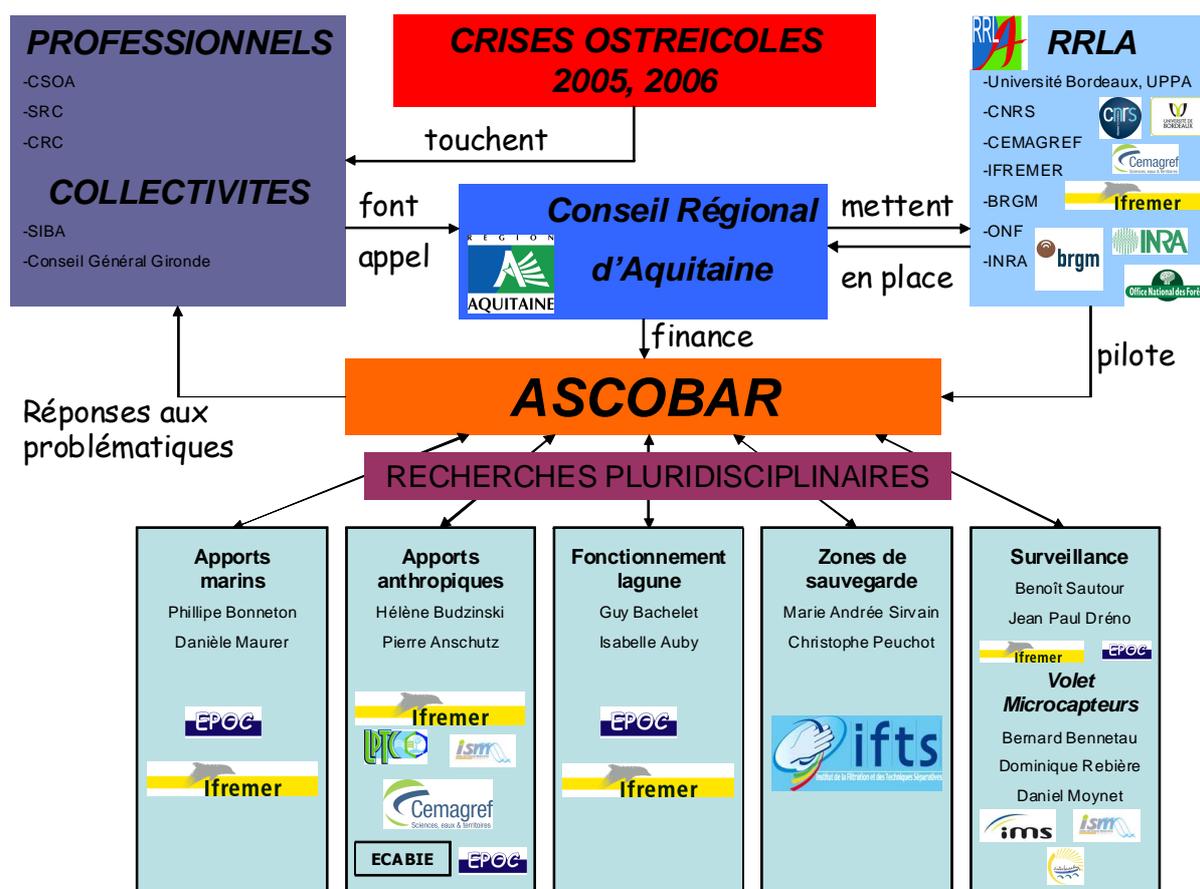


Figure 9 : Organigramme du projet ASCOBAR.

Notre projet de mise au point d'un immunocapteur pour la détection de phycotoxines s'intègre dans le "Volet Microcapteurs".

Le Programme de Recherche mis en place montre bien l’implication de la Région Aquitaine visant à mieux comprendre le fonctionnement de la Lagune, à protéger les consommateurs et à minimiser l’impact des crises sanitaires sur les professionnels de la conchyliculture dans le Bassin d'Arcachon.

Chapitre 2 : Dosages immunologiques et immunocapteurs

2.1 Dosages Immunologiques

2.1.1 Historique

Le premier dosage immunologique a été décrit par Yalow et Berson en 1959⁷³. Ces auteurs avaient remarqué la production d'anticorps chez les patients diabétiques traités avec de l'insuline exogène⁷⁴. Ces anticorps furent purifiés pour développer le premier Radio Immuno Assay (RIA). En 1968, durant le 8^{ème} *Symposium Ouest Européen de Chimie Clinique*, ils présentent leurs travaux sur les RIA sous forme d'une revue publiée dans le journal *Clinical Chimica Acta*⁷⁵. Ces recherches furent couronnées d'un prix Nobel de Médecine en 1977, décerné à R. Yalow, cinq années après la mort du Dr. Berson. Il est à noter la volonté des Drs Berson et Yalow de ne pas breveter le procédé, ce qui permit à de nombreuses équipes de travailler sur le sujet, conduisant ainsi à un développement rapide de la technique et un élargissement du champ de ses applications.

2.1.2 Interactions Antigène-Anticorps

Les dosages immunologiques utilisent la capacité des **anticorps** à reconnaître de façon spécifique une molécule, étrangère à l'organisme, l'**antigène**.

Les anticorps sont des éléments du système immunitaire. Ce sont des glycoprotéines de la famille des immunoglobulines composées de quatre chaînes polypeptidiques (deux légères et deux lourdes) reliées entre elles par des ponts disulfures (Figure 10).

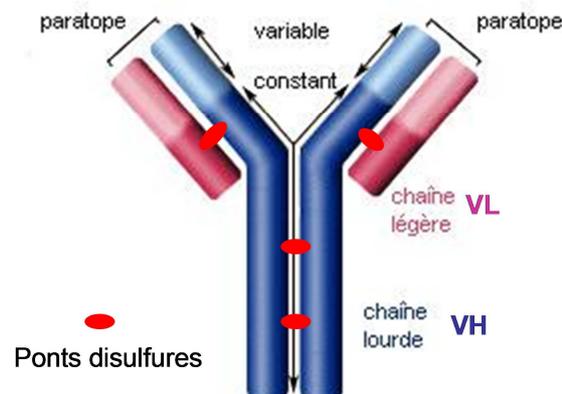


Figure 10 : Schéma d'un anticorps.

2.1.2.1 Epitopes-Paratopes

L'**épitope** est un déterminant antigénique individuel interagissant avec le paratope de l'anticorps. Il correspond à une petite zone (environ 1 à 3 nm de diamètre) de l'antigène. La surface d'un antigène peut présenter plusieurs épitopes différents ou similaires (Figure 11).

Le **paratope** est le site d'un anticorps qui permet le contact avec le déterminant antigénique (épitope). Chaque anticorps possède à sa surface deux paratopes identiques. Dans le cas d'un mélange d'anticorps polyclonaux, les deux paratopes sont différents d'un anticorps à l'autre alors qu'ils sont identiques dans le cas d'anticorps monoclonaux.

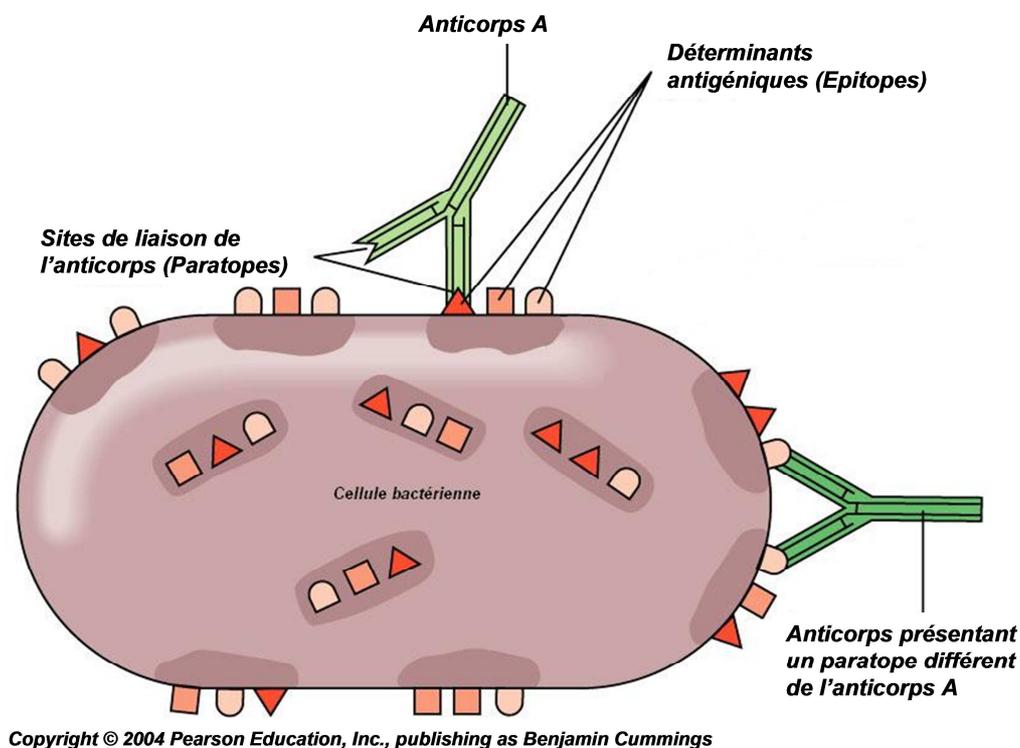


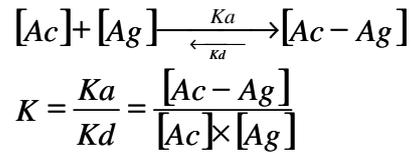
Figure 11 : Illustration des concepts d'épitope et paratope.

De plus, l'épitope et le paratope doivent avoir une bonne complémentarité stérique pour que le maximum d'atomes soit en contact.

2.1.2.2 Affinité, Avidité et titre

L'interaction antigène anticorps est la résultante de quatre types de liaisons non covalentes : les liaisons hydrogène, les liaisons électrostatiques, les forces de van der Waals ainsi que les

interactions hydrophobes. Cette réaction est réversible et permet la mesure de la constante d'association K_a (qui s'exprime en liaisons.mol⁻¹, L.M⁻¹) :



Cette valeur permet de définir l'**affinité** d'un anticorps pour un antigène monovalent (présentant un unique épitope).

La liaison avec l'antigène dépend de l'affinité de l'anticorps et des conditions environnementales (température, pH ...). L'affinité est très variable d'un anticorps à l'autre. Des valeurs de l'ordre de 10⁶ à 10¹⁰ L.M⁻¹ et 10¹⁰ à 10¹³ L.M⁻¹ caractérisent respectivement des anticorps peu affins et de haute affinité.

Généralement, un antigène présente plusieurs épitopes à sa surface. On parle alors de valence de l'antigène, c'est-à-dire le nombre de déterminants antigéniques que compte l'antigène. Dans le cas d'un antigène multivalent, on parlera de l'**avidité** d'un sérum constitué d'anticorps d'affinités différentes. Celle-ci dépend donc de l'affinité des anticorps pour chaque épitope de l'antigène.

Le **titre** d'anticorps est une valeur qualitative par rapport à un antigène ou à un mélange d'antigènes. Il correspond à l'inverse de la dernière dilution donnant une réaction positive. Il reflète à la fois la concentration des anticorps et leur avidité. Le titre est une valeur calculée grâce à un test ELISA. Il est possible de la déterminer graphiquement au croisement de la valeur du blanc et de la courbe de la densité optique en fonction de la dilution (la valeur du *blanc* peut être multipliée par un facteur 2 ou 5)⁷⁶.

2.1.3 Les méthodes de dosages

2.1.3.1 Dosages immunoenzymologiques

ELISA est le sigle anglais pour Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay. Ce terme regroupe les tests utilisant un marqueur enzymatique lié de façon covalente à un anticorps ou à un antigène. A partir d'un substrat chromogène, incolore, spécifique de l'enzyme couplée, celle-ci est capable de catalyser une réaction générant un produit coloré. La densité optique (DO) est proportionnelle à la quantité de substrat ayant réagi.

2.1.3.1.1 ELISA direct (dELISA)

Dans un premier temps, l'antigène à doser est déposé sur un support solide (généralement une plaque de microtitration). L'antigène est reconnu par un anticorps marqué par une enzyme. Les anticorps en excès, non liés à l'antigène, sont éliminés lors de l'étape de rinçage (Figure 12). L'ajout du substrat permet la réaction colorée dont la DO mesurée est proportionnelle à la quantité d'antigène fixée sur le support solide.

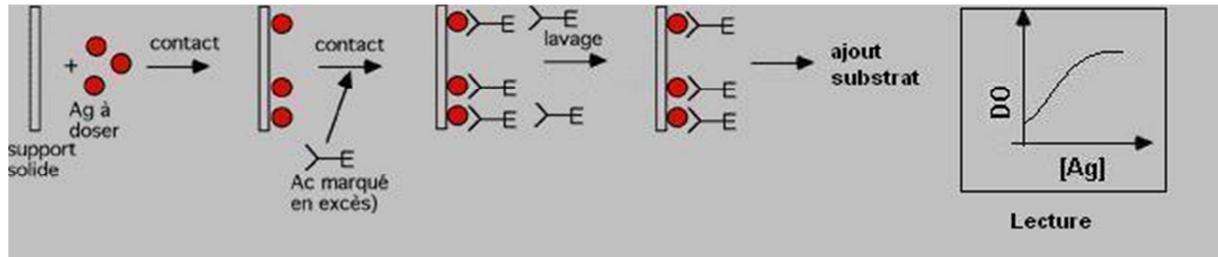


Figure 12 : ELISA direct.

2.1.3.1.2 ELISA indirect (iELISA)

L'antigène à doser est déposé sur le support solide. Un anticorps, dit primaire, se lie à l'antigène. L'excès d'anticorps est éliminé par rinçage et un anticorps spécifique de l'anticorps primaire, l'anticorps secondaire (Ac Anti-Ac marqué par une enzyme), est ajouté au milieu. L'ajout du substrat permet la réaction colorée et la DO mesurée va être proportionnelle à la quantité d'anticorps primaires immobilisés sur le support et donc à la quantité d'antigène à doser (Figure 13).

Cette technique peut aussi être utilisée pour le dosage d'anticorps spécifiques présents dans un sérum.

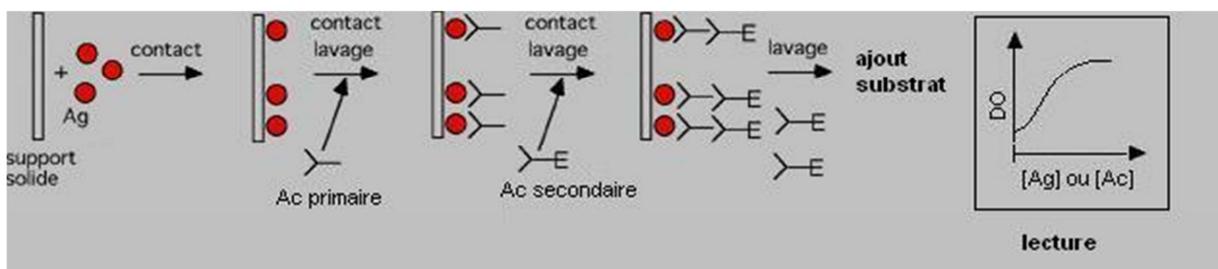


Figure 13 : ELISA indirect.

2.1.3.1.3 ELISA compétitif

Cette section décrit succinctement le principe de la compétition dans deux exemples de dosages compétitifs. Cette liste n'est pas exhaustive mais permet un aperçu de l'ELISA compétitif.

ELISA compétitif direct (cdELISA)

Les anticorps sont fixés sur le support solide. L'antigène à doser est mis en compétition avec des quantités connues d'antigène marqué. Plus la quantité d'antigène à doser sera forte, plus l'activité enzymatique sera faible et la DO mesurée sera faible. Elle sera donc inversement proportionnelle à la quantité d'antigène à doser (Figure 14).

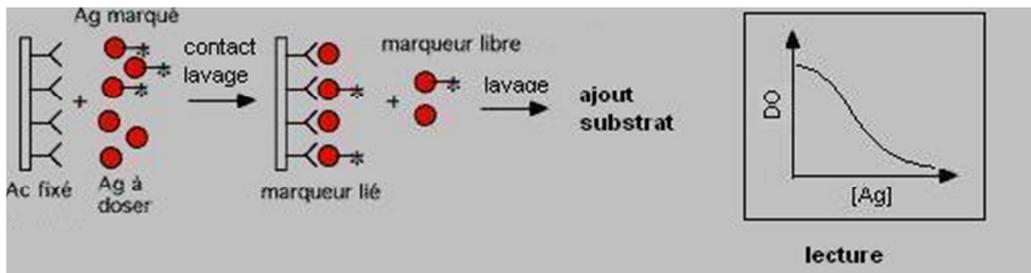


Figure 14 : cdELISA, dosage d'antigènes.

Les cdELISA permettent aussi de mesurer une concentration inconnue d'anticorps (Figure 15). Pour cela, l'antigène est immobilisé sur le support. L'anticorps à doser est mis en compétition avec des quantités connues d'anticorps marqués. L'anticorps marqué se fixera d'autant plus que l'anticorps à doser sera présent en petite quantité. La DO mesurée sera donc inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps à doser.

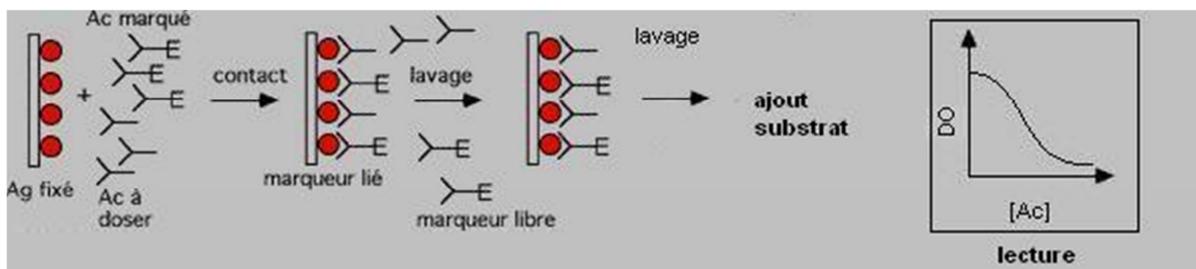


Figure 15 : cdELISA, dosage d'anticorps.

Les différentes techniques décrites ci-dessus sont très utilisées et permettent d'atteindre une sensibilité de l'ordre du ng/mL^{77} .

2.1.3.2 Autres méthodes de marquage

Le dosage radioimmunologique (RIA, pour RadioImmunoAssay) est une des techniques les plus sensibles pour la détection d'un anticorps ou d'un antigène ($0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$)⁷⁷. Cette technique est basée sur la liaison compétitive d'un antigène radiomarqué et d'un antigène non marqué à un anticorps de haute affinité⁷⁸. Plus la concentration en antigène à doser est élevée, plus la quantité de conjugué fixée à l'anticorps est faible. Après lavage, la radioactivité liée est d'autant plus élevée que la concentration en antigène dans le puits est faible. Néanmoins, l'utilisation de la radioactivité impose de lourdes contraintes de sécurité, son principal inconvénient.

Dans le cas de l'immunofluorescence, un marqueur fluorescent est utilisé pour quantifier l'antigène ou l'anticorps. Selon le dosage, la fluorescence sera proportionnelle ou inversement proportionnelle à la quantité d'antigène. Cette dernière technique présente des seuils de détection plus élevés (100 ng.mL^{-1})⁷⁷.

2.1.3.3 Evaluation d'un dosage

Dans le cas d'un dosage compétitif d'un antigène libre (Figure 16), la courbe d'étalonnage obtenue par dilutions successives d'une solution d'antigènes libres de concentration connue permet d'établir la zone de dilution utilisable (partie linéaire de la courbe) ainsi que seuil de détection d'un dosage (plus faible concentration mesurable). Il est aussi possible de déterminer le point d'équilibre, IC_{50} , qui correspond à 50 % d'inhibition de la liaison antigène/anticorps.

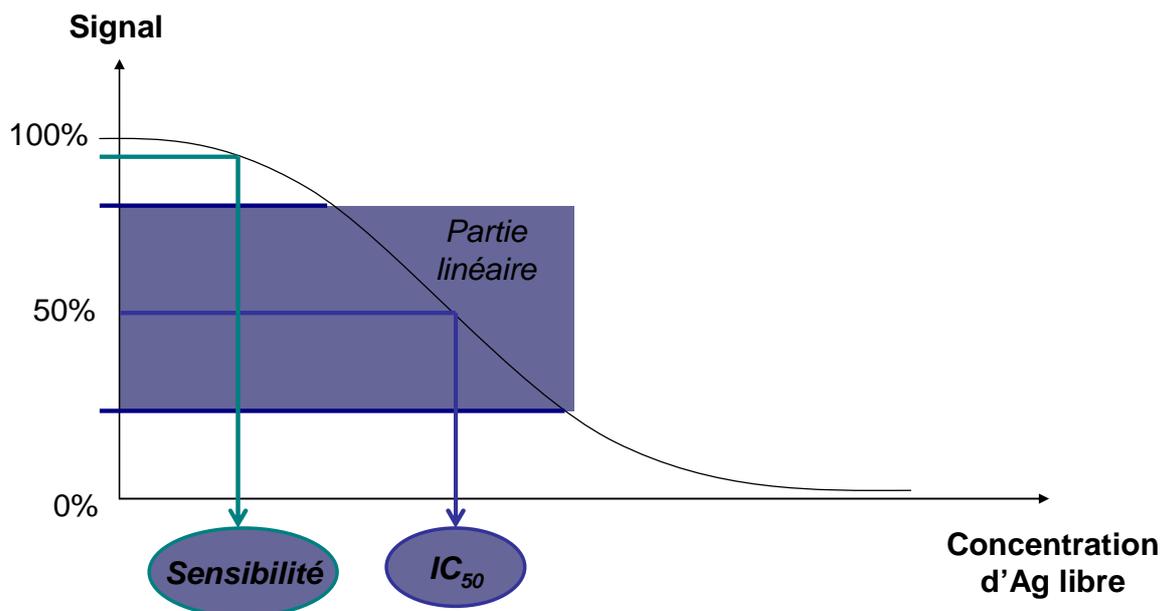


Figure 16 : Courbe d'étalonnage d'un test ELISA.

2.2 Les biocapteurs

Un biocapteur utilise un élément biologique pour détecter sa cible. L'interaction du matériel biologique, le biorécepteur, avec l'analyte est transformée en un signal mesurable par le transducteur. Un biocapteur est la combinaison d'un biorécepteur avec un transducteur de façon à quantifier la réaction de l'analyte avec le biorécepteur (Figure 17).

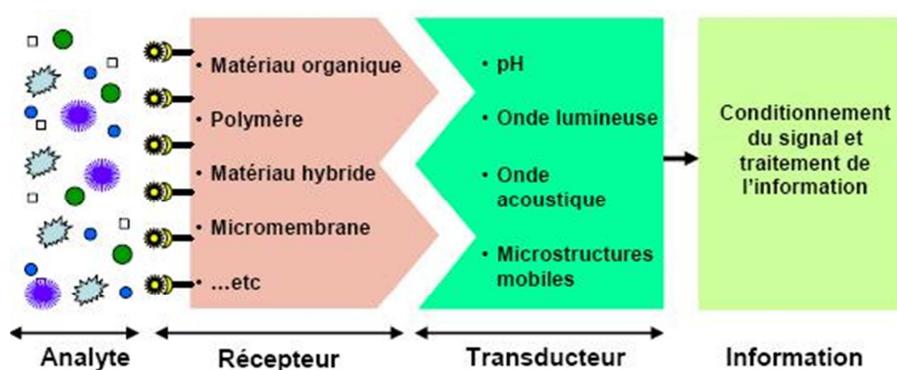


Figure 17 : Schéma d'un biocapteur.

La notion de capteur est à différencier de celle de transducteur qui est un élément d'un instrument de mesure qui transforme une grandeur physique en une autre grandeur physique, fonction de la précédente. Par conséquent, un capteur est, au minimum, constitué d'un transducteur⁷⁹.

2.2.1 Les biorécepteurs

Le premier exemple de biocapteur est décrit en 1962 par Clark sous le nom *Enzyme Electrode*. Il utilisait une enzyme, la glucose oxydase, couplée à une électrode ampérométrique pour suivre la concentration d'oxygène dans le sang^{80,81}. Actuellement, les enzymes ne sont pas les seules entités biologiques mises en œuvre pour mettre au point des biocapteurs. Les biorécepteurs peuvent aussi bien être des molécules biologiques (ADN, anticorps...) que des systèmes biologiques vivants (cellules, tissus ou organismes). Ceux-ci auront tous en commun la mise en jeu d'un mécanisme biochimique pour permettre la reconnaissance. Les biorécepteurs peuvent être classés en deux groupes distincts : les récepteurs biocatalytiques et les récepteurs d'affinité^{82,83}.

2.2.1.1 Les récepteurs biocatalytiques

Ils peuvent être des systèmes à base d'enzymes, des cellules entières (microorganismes, comme les bactéries, les champignons, les cellules eucaryotes ou les levures), des organites cellulaires ou des tissus (animaux ou végétaux)⁸⁴. Ces capteurs sont basés sur la détection de composés assimilés par les microorganismes ou sur le suivi des modifications engendrées par l'activité métabolique. Les enzymes représentent l'outil principal de ces récepteurs biocatalytiques. Elles possèdent une reconnaissance spécifique de leur substrat et une activité catalytique qui permet une détection de l'analyte à de très faibles doses⁸⁵. Le succès des biocapteurs à base d'enzymes repose aussi sur l'importance de la gamme des composantes mesurables au cours d'une réaction enzymatique⁸⁶. En effet, les protons, les ions, la chaleur, la lumière, les électrons et la masse interviennent au cours des processus catalytiques induisant des changements mesurables. La stabilité des systèmes s'étale d'une journée à deux mois⁸⁷.

2.2.1.2 Les biorécepteurs d'affinité

Ils présentent deux grandes classes distinctes, les acides nucléiques et les anticorps :

Les acides nucléiques, acides désoxyribonucléique (ADN) et ribonucléique (ARN), peuvent être considérés comme biorécepteurs grâce à la complémentarité des bases qui les composent.

En effet, l'assemblage par paire adénine-thymine (A/T) et cytosine-guanine (C/G), dans le cas de l'ADN, permettra une reconnaissance spécifique pour les biocapteurs à ADN. Une partie d'un monobrin d'ADN va pouvoir être ciblée en synthétisant la séquence complémentaire de celui-ci. Le désappariement de l'ADN double brin en deux simples brins et leur mise en présence avec leurs séquences complémentaires conduiront à l'hybridation (liaison) de ces deux monobrins⁸².

L'appariement de deux monobrins complémentaires sur la surface du capteur va entraîner la modification de différents paramètres qui pourront être mesurés : augmentation de la masse⁸⁸, modification du comportement rédox, changement de l'indice de réfraction⁸⁹. Ces changements, augmentation de la masse et modification de l'indice de réfraction sont mesurables par un transducteur approprié.

2.2.2 Les modes de transductions

Il existe un grand nombre de transducteurs différents, classés en fonction des propriétés qu'ils utilisent. On distingue trois grands groupes de transducteurs : électrochimiques, optiques et piézoélectriques (propriétés acoustiques)⁹⁰.

2.2.2.1 Electrochimiques

Ces transducteurs font appel une réaction d'oxydoréduction ou une perturbation de la conductivité électrique au niveau de l'interface qui va modifier un signal électrique, suite à la fixation de l'élément à analyser.

Il existe différents types de biocapteurs électrochimiques : les capteurs ampérométriques (intensité du courant à un potentiel imposé)^{91,92}, potentiométriques (différence de potentiel entre électrode de mesure et électrode de référence)^{93,94}, conductimétriques (conductivité d'une solution en électrolyte)⁹⁵.

2.2.2.2 Optiques

Les transducteurs optiques utilisent les propriétés optiques pour traduire une interaction biochimique. Ils sont constitués d'une source lumineuse, capable de générer une lumière aux

caractéristiques désirées, d'un agent entraînant une modulation exploitable de la lumière, d'une zone de détection et d'un photodétecteur. Les capteurs optiques directs ne nécessitent pas de marquage et sont donc plus aisés à utiliser. Néanmoins, l'incorporation d'un marqueur adéquat sur les capteurs optiques indirects en fait un outil très précieux lorsque cette mesure directe n'est pas possible.

Le grand nombre de spectroscopies différentes (absorption, fluorescence, phosphorescence, Raman, SERS, réfraction, dispersion...) permet d'enregistrer des propriétés spectrochimiques différentes (amplitude, énergie, polarisation...) ⁹⁶.

Les techniques les plus couramment employées sont brièvement décrites ci-dessous.

La spectroscopie à interférence réflectométrique (RIFS) : elle utilise l'incidence de la lumière blanche à l'interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents. Elle est notamment appliquée à l'étude des interactions moléculaires. Celles-ci vont provoquer une modification du chemin optique qui va entraîner une modification du motif d'interférence ⁹⁷.

La résonance de plasmons de surface (SPR) : lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique illumine une interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents, une partie de la lumière incidente est réfléchi sur l'interface et l'autre partie est réfractée à travers la surface. Si la réfraction est nulle (réflexion totale de la lumière), une onde évanescente se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance égale à sa longueur d'onde. En présence d'une fine couche de métal riche en électrons, ceux-ci entrent en résonance avec le faisceau incident. Ce phénomène est appelé résonance des plasmons de surface (SPR). La conséquence énergétique de cette résonance est alors visible dans le faisceau réfléchi qui présente une chute d'intensité à un angle défini. Cet angle d'intensité minimum est l'angle de résonance. Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent. L'interaction entre l'analyte et son récepteur modifie cet indice de réfraction et peut donc être facilement observée ⁹⁸.

2.2.2.3 Piézoélectriques

On doit les premiers travaux sur la piézoélectricité à Jacques et Pierre Curie en 1880. Mais c'est en 1885 que Raleigh décrit l'utilité de ses propriétés. L'intérêt d'un matériau

piézoélectrique est sa capacité à produire un stress mécanique interne à la suite de l'application d'un potentiel électrique. Ceci provoque une onde dont la fréquence pourra être mesurée. Typiquement, un signal électrique est converti grâce aux transducteurs interdigités (IDT), en ondes acoustiques se propageant dans le matériau⁹⁹.

Les capteurs piézoélectriques mesurent une variation de masse de surface qui se traduit généralement par une variation de fréquence. Ils peuvent être divisés en deux catégories selon la propagation de l'onde¹⁰⁰.

Dans les microbalances à quartz (QCM), la propagation de l'onde se fait dans l'intégralité du matériau. Pour les capteurs à onde acoustique de surface (SAW), la propagation ne se fait qu'à la surface du matériau¹⁰¹.

Après avoir décrit les différents modes de transductions disponibles pour la mise en place de biocapteurs, la section suivante a pour but de montrer les applications des immunocapteurs pour la détection de phycotoxines.

2.3 Immunocapteurs appliqués à la détection de phycotoxines

L'utilisation des immunocapteurs pour le dosage de phycotoxines s'est développée depuis la fin des années 1990. Elle couvre la majorité des toxines avec un large éventail de transducteurs (Tableau 5).

Carter *et coll.* ont développé en 1993 un biocapteur immunoélectrochimique pour la détection de la saxitoxine (PSP)¹⁰². Celui-ci utilise des anticorps marqués avec une glucose oxydase qui permet de détecter l'eau oxygénée formée lors de l'ajout de glucose dans le milieu. Cette technique a été appliquée aux autres familles de toxines (DSP et ASP) et améliorée grâce à l'utilisation de la phosphatase alcaline et du *p*-aminophényl phosphate respectivement en tant que marqueur et substrat. De cette façon, le potentiel appliqué est plus faible et permet d'obtenir des limites de détection de 1,5 et 2 ng.mL⁻¹ respectivement pour l'acide okadaïque et l'acide domoïque avec un temps d'analyse de trente minutes¹⁰³. Plus récemment, Campàs *et coll.* ont amélioré le système ampérométrique accroché sur une électrode (SPE) pour atteindre une limite de détection de 0,06 ng.mL⁻¹ pour un temps d'analyse de sept à huit heures¹⁰⁴.

En 2004, Micheli *et coll.* ont décrit un immunocapteur capable de détecter la présence d'acide domoïque dans la chair de coquillage¹⁰⁵. Celui-ci utilise des électrodes imprimées par sérigraphie (SPE) comme transducteur pour la voltammétrie impulsionnelle différentielle (DPV) et se base sur un test immunologique de type compétitif à partir d'anticorps monoclonaux. Avec une réponse linéaire entre 5 et 70 ng.mL⁻¹ et une limite de détection de 5 ng.mL⁻¹, le capteur est bien en dessous de la limite maximale autorisée mais d'une efficacité moindre que celle obtenue par Carter et ce avec un temps d'acquisition plus important (trois heures contre trente minutes).

Les immunocapteurs basés sur la résonance des plasmons de surface (SPR) sont aussi très étudiés. C'est le cas pour l'équipe de Yu *et coll.* qui a publié en 2005 ses travaux concernant la détection d'acide domoïque (AD). Elle utilise des anticorps anti-AD monoclonaux et une plateforme SPR. La méthode s'avère quatre fois plus sensible que les tests ELISA effectués avec le même anticorps pour atteindre une limite de détection de 0,1 ng.mL. De plus cette technique permet d'utiliser un même capteur pendant plusieurs cycles et celui-ci reste opérationnel après deux mois de stockage¹⁰⁶.

Si les études précédentes se cantonnent au laboratoire, les travaux de Stevens *et coll.* ont permis de tester un dispositif similaire sur le terrain. Ces dispositifs sont en effet plus facilement miniaturisables. Avec une limite de détection de 3 ng.mL⁻¹, ce système est certes un peu moins sensible mais permet d'analyser les produits marins et l'eau de mer directement sur les lieux de cultures et reste en dessous des seuils réglementaires¹⁰⁷.

Llamas *et coll.* ont développé un dispositif permettant de quantifier la présence des DSP grâce à un dispositif SPR. A partir d'un mélange polyclonal d'anticorps anti acide okadaïque ils ont mis au point une méthode avec une limite de détection de 126 ng.mL⁻¹, ce qui est en dessous mais très proche des limites réglementaires¹⁰⁸.

La dernière classe de transducteur est celle utilisant les propriétés acoustiques. Tang *et coll.* ont élaboré un immunocapteur utilisant une microbalance à quartz (QCM) avec des anticorps monoclonaux anti-acide okadaïque (OA). La limite de détection obtenue est de l'ordre de 1,9 µg.mL⁻¹ ce qui n'est pas satisfaisant pour une limite légale de 160 ng.g⁻¹. Néanmoins après optimisation cette limite a pu être améliorée d'un facteur cinq cents¹⁰⁹.

L'ensemble de ces résultats est regroupé dans le Tableau 5.

Transducteurs		Seuils de détection	Espèces cibles	Références	Commentaires
Electrochimiques	Ampérométrie	2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	STX (PSP)	Carter ¹⁰²	Capteur réutilisable
		1,5 ng.mL^{-1}	AO (DSP)	Kreuzer ¹⁰³	Temps d'acquisition court (30min)
		2 ng.mL^{-1}	AD (ASP)		
		0,06 ng.mL^{-1}	AO (DSP)	Campàs ^{104,110}	Sensibilité élevée
	Voltammétrie	5 ng.mL^{-1}	AD (ASP)	Micheli ¹⁰⁵	Chair testée directement
		0,1 ng.mL^{-1}	AD (ASP)	Yu ¹⁰⁶	Anticorps monoclonal, compétitif, recyclage du capteur
Optiques	SPR	3 ng.mL^{-1}	AD (ASP)	Stevens ¹⁰⁷	Portatif, chair ou eau de mer testées directement
		126 ng.mL^{-1}	AO, DTX1 et 2 (DSP)	Llamas ¹⁰⁸	Anticorps polyclonaux, surestimation
Acoustiques	QCM	1,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (4 ng.mL^{-1})*	AO (DSP)	Tang ¹⁰⁹	Sensibilité faible

* Valeur calculée à partir du facteur d'amélioration indiqué par l'auteur.

Tableau 5 : Comparatif des immunocapteurs pour la détection de phycotoxines.

A l'issue de cette étude bibliographique, nous pouvons faire les remarques suivantes :

Les capteurs électrochimiques montrent une bonne sensibilité et un temps d'acquisition relativement court, 30 minutes au lieu de 24 heures pour les techniques conventionnelles type test souris. De plus, leur miniaturisation leur permet d'être un excellent candidat pour en faire des capteurs capables d'être utilisés sur le terrain.

Les capteurs optiques, et notamment la SPR, sont des outils très efficaces pour la détection de toxines et particulièrement de l'acide domoïque (ASP). La très bonne sensibilité de détection (0,1 ng.mL^{-1}), le développement d'une version portable, la possibilité de régénérer le capteur et leur durée de vie sont autant d'avantages pour cette méthode.

En ce qui concerne les capteurs acoustiques, il n'existe pas, à notre connaissance, d'études de détection de phycotoxines avec un transducteur de type SAW. Si ce type de capteurs reste, à l'heure actuelle, moins performant en terme de sensibilité, il est peu coûteux et parfaitement adapté à la détection de phycotoxines en milieu marin car insensible aux ions.

2.4 Mise en place d'un dosage de petites molécules

La mise en place d'un dosage de petites molécules par un test immunologique ELISA ou par un immunocapteur nécessite d'obtenir préalablement des anticorps spécifiques dirigés contre celles-ci. C'est un processus long faisant intervenir des compétences dans de multiples

domaines allant de la chimie de synthèse à l'immunologie. Les étapes clés décrites ci-dessous¹¹¹ sont représentées sur la Figure 18.

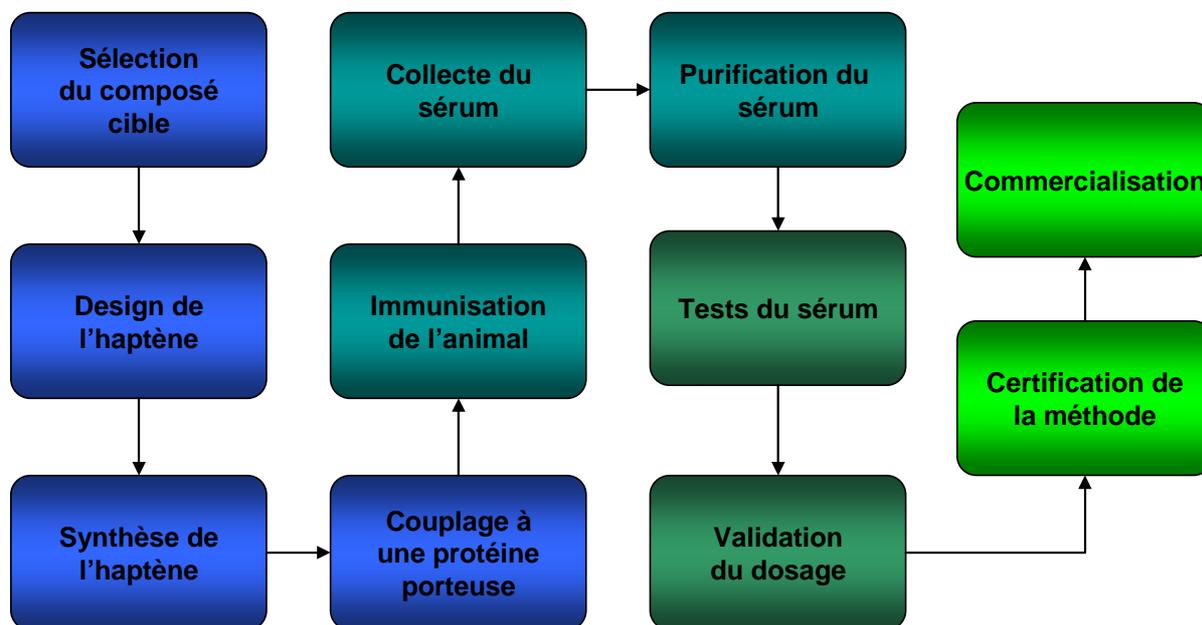


Figure 18 : Différentes étapes de la mise en place d'un dosage immunologique.

2.4.1 Haptène et couplage

Une molécule antigénique est une molécule qui se fixe spécifiquement à un anticorps. Cependant, certains antigènes ne peuvent susciter la production d'anticorps par eux-mêmes. Une molécule est dite immunogène lorsqu'elle peut induire une réponse immunitaire une fois administrée à une personne ou un animal. En pratique, seules les molécules possédant une masse molaire supérieure à 1000 Da sont complètement immunogènes¹¹².

Les petites molécules organiques, comme les phycotoxines ne sont pas immunogènes. Cependant, des anticorps peuvent être produits contre de telles molécules si elles sont couplées de manière covalente à une protéine porteuse.

Ces petites molécules, qui seront couplées à une protéine, ont été appelées haptènes par l'immunologue Landsteiner¹¹³, qui les étudia le premier au début des années 1900. Le mot haptène vient du grec *haptein* qui signifie attacher, nouer. L'haptène est donc un analogue structural synthétique de la molécule à doser.

Le design et la synthèse de l'haptène sont déterminants pour la mise au point d'un dosage (*cf* section 2.5).

Une fois la synthèse de l'haptène achevée, ce dernier est couplé à une molécule porteuse, généralement une protéine porteuse, type BSA (Bovine Serum Albumine), afin d'obtenir un conjugué protéine-haptène et de réaliser ensuite l'immunisation des animaux.

2.4.2 Immunisation

L'étape d'immunisation correspond à l'injection du conjugué protéine-haptène à un animal. Le choix de l'animal hôte n'est pas fondamental ; rats, souris et lapins sont les plus utilisés car facilement manipulables. L'immunisation se fait par injections répétées par voie intradermique ou intramusculaire, à quelques semaines d'intervalle. Lors de ces piqûres de rappel, différents couples protéine-haptène peuvent être utilisés pour améliorer la réponse immunitaire. L'ensemble du processus s'étend généralement sur période de trois mois.

2.4.3 Purification des anticorps

Une fois l'étape d'immunisation terminée, les anticorps polyclonaux dirigés contre le conjugué protéine-haptène sont largement majoritaires. Il s'agit d'immunoglobulines G (IgG). Néanmoins, le sérum peut être purifié de façon à enlever certaines protéines inutiles pour la suite des expériences (IgM, albumine, anticorps anti-protéine porteuse...).

2.4.4 Tests sur le sérum

Les tests sur le sérum permettent de vérifier certaines caractéristiques des anticorps obtenus comme l'affinité, la spécificité ou le titre. Ce sont des données importantes pour déterminer la sensibilité du futur dosage. Ces tests ont aussi pour but d'étudier les réactions croisées à l'origine de faux positifs et de faux négatifs qui peuvent altérer les résultats¹¹⁴.

2.4.5 Validation du test

Pour s'assurer de leurs fiabilités, tous les dosages doivent subir des tests de validation. Les résultats obtenus avec un dosage immunologique sont comparés avec ceux issus d'une autre

méthode de dosage (HPLC, GC/MS...). Le dosage n'est validé que si les résultats sont concordants.

2.5 Conception de l'haptène

Les couplages à une protéine porteuse type BSA, peuvent être réalisés avec une fonction présente sur la molécule cible ou avec un bras espaceur fonctionnel. L'ensemble destiné à être couplé à la protéine porte le nom d'haptène. Il comporte donc : la molécule cible, un bras espaceur et la fonction de couplage (Figure 19). Le nom de molécule cible sera donné aux molécules libres devant être dosées et qui deviennent des antigènes pour les anticorps obtenus à partir des haptènes.

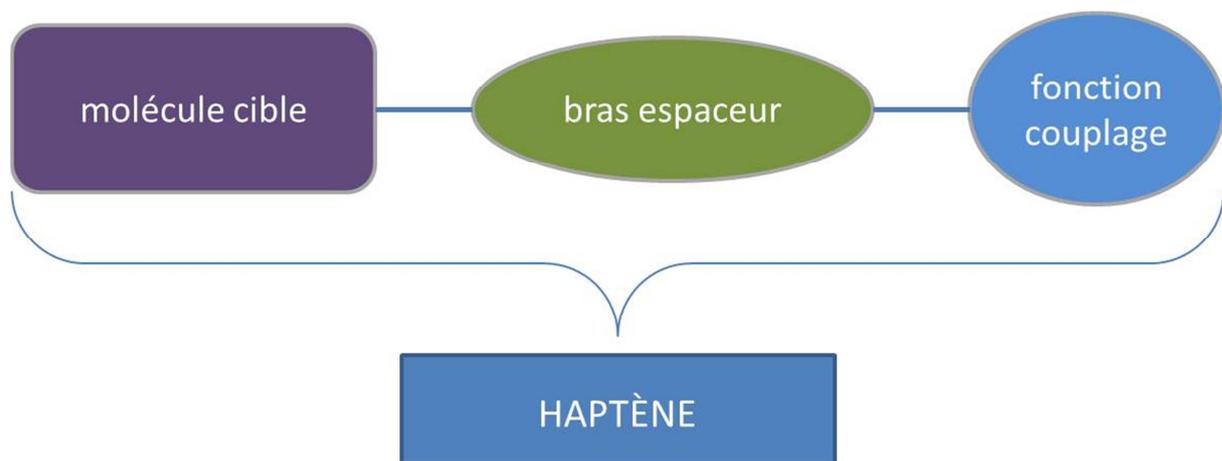


Figure 19 : Schéma d'un haptène.

Pour concevoir ces haptènes, divers paramètres sont à prendre en compte : les fonctions pour le couplage, le bras espaceur (nature, longueur) ainsi que le point de fixation.

2.5.1 Fonctions pour le couplage

Les fonctions amine et acide sont les plus adaptées car elles permettent de créer une liaison peptidique avec respectivement les fonctions acide et amine libres présentes sur les acides aminés lysine, acide aspartique, des protéines porteuses. Les fonctions thiols peuvent elles aussi être utilisées pour former des ponts disulfures¹¹⁵. Dans tous les cas, les fonctions caractéristiques des molécules cibles ne doivent pas être masquées, ce qui entraînerait une diminution de la sélectivité des anticorps.

2.5.2 Bras espaceur

2.5.2.1 Nature et longueur

Le bras espaceur qui éloigne la molécule cible de la protéine doit être constitué d'une simple chaîne hydrocarbonée ni trop longue, ni trop courte, ne présentant pas de groupements reconnaissables par les anticorps.

Si le bras est trop court, il y aura formation d'anticorps qui reconnaîtront le couple protéine-haptène ou la protéine, mais pas la molécule cible.

Un bras espaceur trop long donnera des phénomènes de repliement de l'haptène vers la protéine. Le rôle du bras espaceur est donc d'écarter l'haptène de la protéine afin d'assurer une meilleure présentation de celui-ci.

D'après Szurdoki¹¹⁶, le meilleur compromis est obtenu par un bras espaceur constitué d'une simple chaîne carbonée dont la longueur idéale se situerait entre deux et cinq atomes de carbone.

2.5.2.2 Points de fixation

La nature du bras espaceur étant défini, il faut choisir un point de fixation. Il peut être placé soit sur un hétéroatome, soit sur un atome appartenant au squelette carboné.

La fixation du bras espaceur sur un hétéroatome (N, O...) va à l'encontre d'une bonne spécificité du dosage. En effet, une fonction amine, ou alcool sont des sites de reconnaissance très importants pour les anticorps.

Il est préférable de fixer le bras espaceur sur le squelette carboné. Ceci entraîne des difficultés supplémentaires lors de la synthèse mais la sélectivité et sensibilité optimales pour le dosage en dépendent.

Chapitre 3 : Synthèse des haptènes et bioconjugués

L'objectif de cette thèse, à terme, est de montrer la faisabilité d'un immunocapteur à ondes acoustiques dédié à la détection rapide de phycotoxines de la famille des ASP. Pour cela, il faut disposer d'anticorps dirigés contre l'ensemble des toxines de cette famille. Cependant les anticorps correspondants ne sont pas disponibles commercialement et les quelques exemples décrits dans la littérature¹¹⁷⁻¹²⁰ ne permettent le dosage que de l'acide domoïque. Dans ce travail, nous avons recherché une approche plus globale visant l'obtention d'anticorps dirigés contre la partie commune à toutes les toxines de la famille des ASP (Figure 20) afin de disposer d'anticorps capables de détecter simultanément toutes les toxines (répertoriées ou non) de cette famille.

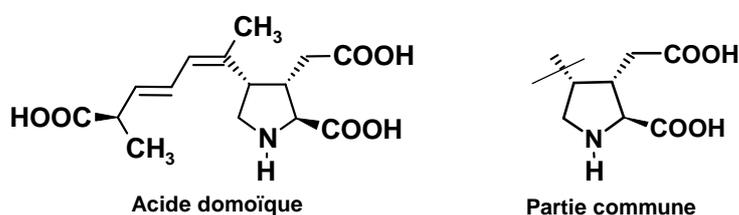


Figure 20 : Acide domoïque et partie commune des ASP.

Comme nous venons de le voir (section 2.5), la production d'anticorps dirigés contre de petites molécules nécessite la synthèse d'haptènes, qui seront ensuite greffés sur une protéine porteuse. La conception et la synthèse de ces haptènes seront présentées dans ce chapitre, ainsi que les réactions de couplage permettant d'obtenir les immunoconjugués correspondants.

3.1 Design de l'haptène

La mise au point d'un dosage immunologique de l'acide domoïque a fait l'objet de divers travaux dans la littérature¹¹⁷⁻¹¹⁹. Cet acide peut être considéré lui-même comme un haptène et donc être greffé directement sur une protéine porteuse pour produire des anticorps spécifiques. La présence de quatre fonctions réactives (trois acides carboxyliques et une fonction amine) aboutit à autant de sites de fixation et donc à une perte de spécificité et de sensibilité. Pour éviter ces inconvénients, l'équipe de Garthwaite a développé une méthode sélective *via* la fonction amine¹²⁰.

Le choix que nous avons fait est de produire des anticorps contre l'ensemble des toxines de la famille des ASP et donc contre la partie commune, dans notre cas le cycle pyrrolidinique fonctionnalisé (Figure 20). Le couplage devra alors s'effectuer grâce à une fonction carboxylique libre autre que celles de la partie commune.

Afin d'optimiser la présentation de l'haptène au système immunitaire, il est nécessaire de l'écarter de la protéine porteuse. C'est le linker, ou bras espaceur, qui assure cette fonction.

L'extrémité du bras espaceur comporte une fonction acide carboxylique qui permettra un couplage sélectif avec la protéine porteuse, sans masquer la partie commune.

La structure théorique de l'haptène envisagé est donc représentée Figure 21.

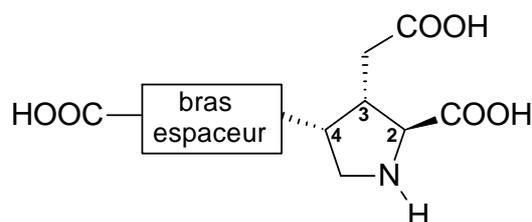


Figure 21 : Structure théorique de l'haptène.

Cette structure pose un problème évident avec la présence de quatre groupements susceptibles de réagir avec la protéine lors de la réaction de couplage. D'un côté les fonctions acide peuvent réagir avec les fragments lysines de la protéine porteuse (par exemple BSA), tandis que la fonction amine peut créer une liaison peptidique avec les carboxyles des résidus glutamate ou aspartate. La synthèse mise en jeu va donc nécessiter la protection des trois fonctions du cycle pour ne conserver qu'un seul site réactif à l'extrémité du linker. De plus, les groupements protecteurs doivent pouvoir être éliminés en une seule étape si possible, sans dénaturer la protéine porteuse.

Ainsi la structure *corrigée* de l'haptène peut être schématisée de la façon suivante (Figure 22).

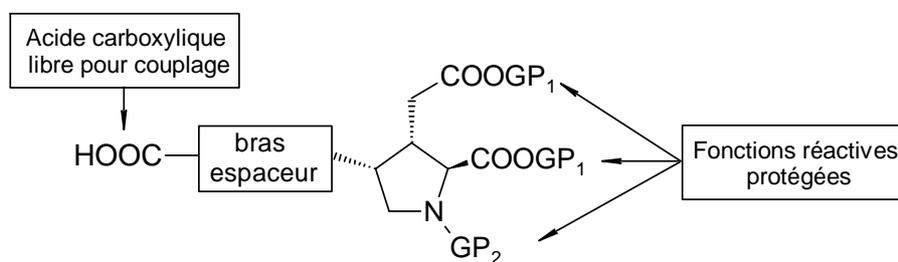


Figure 22 : Structure "corrigée" de l'haptène.

3.2 Synthèse de l'intermédiaire « clé »

L'obtention de l'haptène met en jeu une synthèse multiétapes à partir d'un produit commercial peu coûteux, la *trans*-4-hydroxy-*L*-proline **1**, choisie pour son analogie structurale avec la partie commune des toxines de la famille des ASP (Figure 23). La difficulté de cette synthèse réside dans la présence de trois centres asymétriques C₂, C₃ et C₄ ; seule la stéréochimie du C₂ étant établie sur la molécule de départ. La stratégie repose sur l'obtention d'un intermédiaire « clé » présentant en positions 2- et 3- les groupements équivalents à ceux présents sur la partie commune des ASP, sous leurs formes protégées ainsi qu'une fonction cétone en position 4-. Celle-ci va permettre de créer une liaison C-C par réaction de Wittig afin d'intégrer le bras espaceur à la molécule.

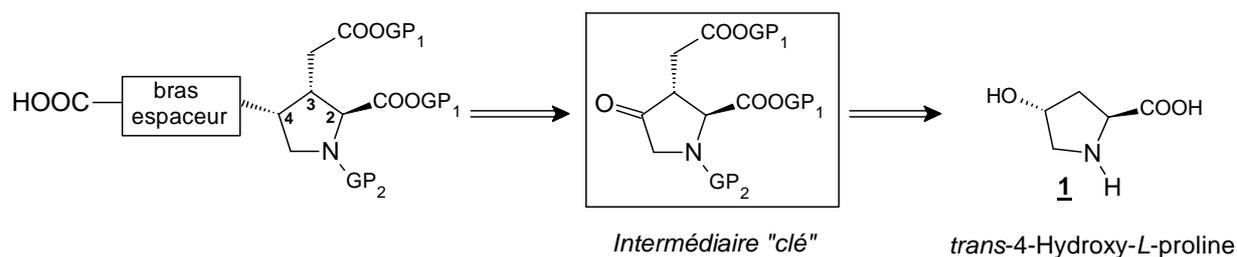


Figure 23 : Rétrosynthèse.

3.2.1 Protection des fonctions acide et amine

Basées sur les travaux de Ganorkar, les premières étapes de synthèse permettent de protéger les fonctions acide et amine de la *trans*-4-hydroxy-*L*-proline¹²¹. Habituellement, les groupes utilisés pour protéger les acides carboxyliques et les amines secondaires sont respectivement les groupements *t*-butyle et benzoyle¹²². Dans notre cas, l'étape de déprotection ayant lieu après couplage sur une protéine porteuse, les conditions de clivage de ces groupes, utilisation d'acide chlorhydrique ou trifluoroacétique, pourraient s'avérer inadéquates car elles risqueraient de dénaturer la protéine. Des conditions plus douces étant nécessaires, les groupes benzyloxy-carbonyl (Cbz) et benzyle (Bn), clivés par simple hydrogénation catalytique, ont été choisis.

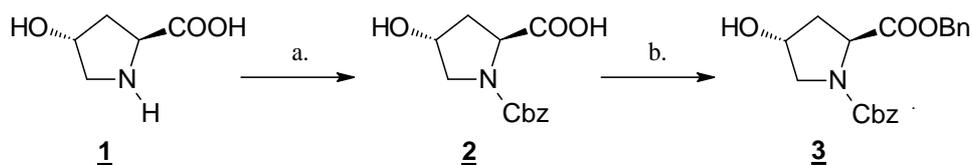


Figure 24 : Etapes de protection.

a.) CbzCl, NaOH/H₂O, 0°C, 5h. 95%; b.) BnBr, NaI, NaHCO₃, DMF, reflux, 12h. 59%.

Dans un premier temps le chloroformate de benzyle est ajouté à la proline **1** dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium. Le composé **2**, obtenu de façon quasi quantitative, est alors mis en présence du bromure de benzyle. Ces deux étapes conduisent au produit **3** avec un rendement global de l'ordre 60%.

3.2.2 Oxydation de la fonction hydroxyle

L'oxydation du groupe hydroxyle est réalisée en présence d'anhydride trifluoroacétique et de diméthylsulfoxyde dans le dichlorométhane en utilisant la triéthylamine comme base selon les conditions de Swern^{123,124}.

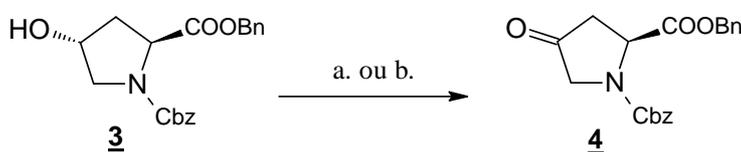


Figure 25 : Oxydations.

a.) TFAA, DMSO, ET_3N , DCM, -78°C , 5h. 55% ; b.) TEMPO, Eau de Javel, NaHCO_3 , DCM, 12h. 37%.

Les rendements moyens (55%) nous ont conduits à tester une méthode alternative mettant en jeu l'eau de Javel¹²⁵. Cette dernière n'a pas apporté d'amélioration notable ni sur le degré de pureté ni sur le rendement du produit obtenu.

3.2.3 Alkylation

L'alkylation est une étape importante dans la synthèse des haptènes car elle permet de conduire à l'*intermédiaire clé* **6** proche de la molécule cible désirée sous sa forme protégée. Il faut que la réaction soit régiosélective sur le carbone C_3 en α - du carbonyle et stéréosélective. En effet, la stéréochimie relative C_2 - C_3 *trans* est déterminante pour une bonne adéquation entre l'haptène et la partie commune des ASP (Figure 20).

3.2.3.1 Régiochimie

La réaction de Stork permet d'accéder au produit **6** par l'intermédiaire d'une énamine (Figure 26)¹²⁶. Les travaux de Baldwin avaient permis d'accéder à des composés similaires ayant pour seule différence la nature des groupements protecteurs¹²⁷.

La formation de l'énamine par réaction de la pyrrolidine sur la cétone **4** est réalisée en présence de tamis moléculaire selon la procédure décrite par Holladay¹²⁸. L'eau formée au cours de la réaction est un facteur limitant de la formation de l'énamine. Diverses techniques existent mais le tamis moléculaire est l'agent déshydratant le plus communément utilisé¹²⁹.

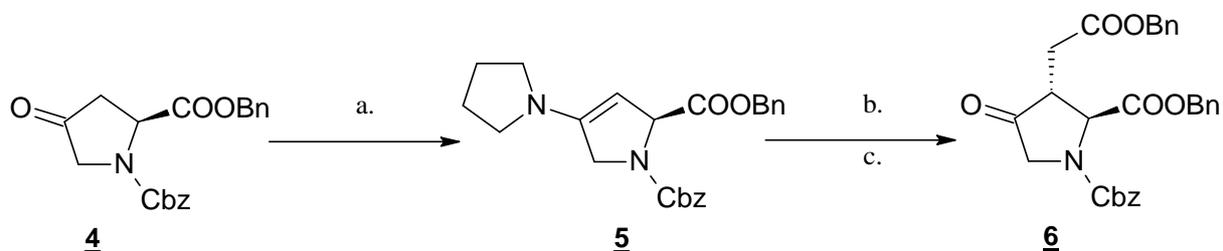


Figure 26 : Alkylation de Stork.

a.) Pyrrolidine, tamis moléculaire (4 Å), benzène. 90% ; b.) Bromoacétate de benzyle, K₂CO₃, ACN, reflux, 30 h ; c.) Acide acétique, chloroforme, 20 h. 28%.

La structure de l'énamine **5** est confirmée par RMN ¹H et ¹³C : le spectre ¹³C montre un pic (CH) à 83 ppm correspondant à un carbone éthylénique. Dans le cas de la formation de l'énamine avec la double liaison en position 4-, ce carbone aurait eu un déplacement chimique très proche de celui du carbone 4 (130-150 ppm). La réaction conduit donc à un unique intermédiaire **5** (Figure 27).

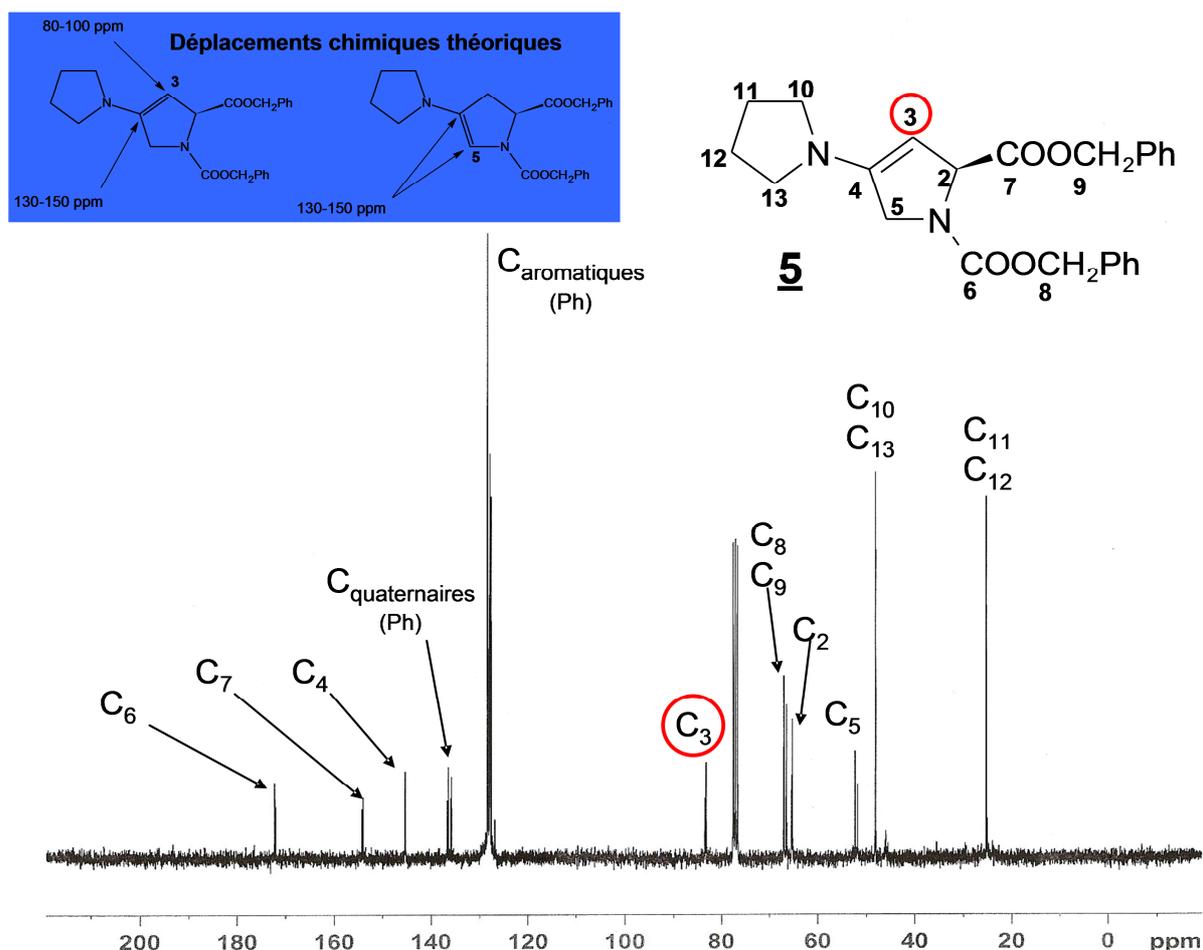


Figure 27 : Spectre RMN ^{13}C du composé **5** (CDCl_3 , 75 MHz).

Par action du bromoacétate de benzyle sur **5**, suivi d'un traitement en milieu acide, on aboutit à la formation d'un seul produit d'alkylation en position 3-, le composé **6**¹³⁰.

3.2.3.2 Stéréochimie $\text{C}_2\text{-C}_3$

Dans la littérature, Holladay *et coll.*¹²⁸ ont décrit l'alkylation de l'ester méthylique de la *N*-Boc-4-oxo-L-proline par le bromure d'allyle et ont obtenu un mélange de produits monoalkylés (*cis/trans* 1:2) déterminé par RMN ^1H .

Par contre, Baldwin *et coll.* montrent qu'une alkylation, par le bromoacétate de *t*-butyle sur des composés similaires, aboutit à la formation d'un unique isomère de configuration $\text{C}_2\text{-C}_3$ *trans*. Ils observent et justifient la particularité des spectres RMN ^{13}C , sous la forme de deux pics pour un même atome de carbone, par la présence de rotamères¹²⁷.

Falk *et coll.* ont montré, par ailleurs, lors d'une étude approfondie sur les conformations de l'acide kaïnique, que celui-ci en solution, se présente sous la forme d'un mélange complexe de conformères avec des stabilités énergétiques très proches : (25 conformères ayant des

différences d'énergies de l'ordre de 2 kcal.mol⁻¹). La présence d'un hétéroatome au sein d'un cycle entraîne une barrière énergétique de pseudo-rotation suffisamment faible (<2 kcal.mol⁻¹) permettant l'équilibre entre les divers conformères. Par contre, la présence d'un groupe encombrant sur l'hétéroatome va conduire à l'augmentation de la barrière énergétique entre les conformères. La distinction de ceux-ci devient alors possible¹³¹.

3.2.3.2.1 Etude RMN ¹³C

Le spectre RMN ¹³C du composé **6** révèle la présence de deux pics pour les atomes de carbone C₂, C₃, C₅ et C₁₀ (Figure 28) ce qui peut laisser supposer la présence des deux stéréoisomères *cis* et *trans*.

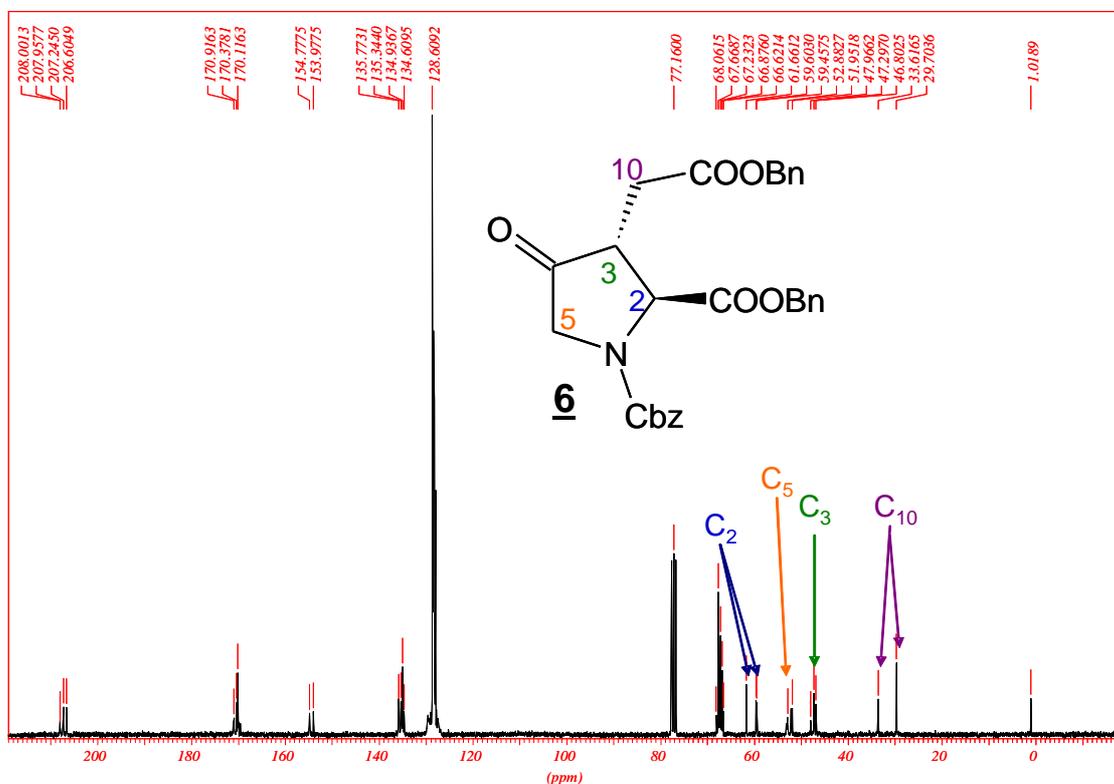


Figure 28 : Spectre RMN ¹³C du composé **6** (CDCl₃, 75 MHz, 25°C).

Afin d'établir la structure du produit d'alkylation **6**, différentes études ont été menées. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au composé **2** pour lequel aucun stéréoisomère *cis/trans* n'est possible. Le spectre RMN ¹³C dans le CDCl₃ à température ambiante montre un dédoublement de plusieurs pics (Figure 29). L'encombrement de l'atome d'azote fonctionnalisé avec le groupement benzyloxycarbonyl conduit à l'apparition de deux conformères.

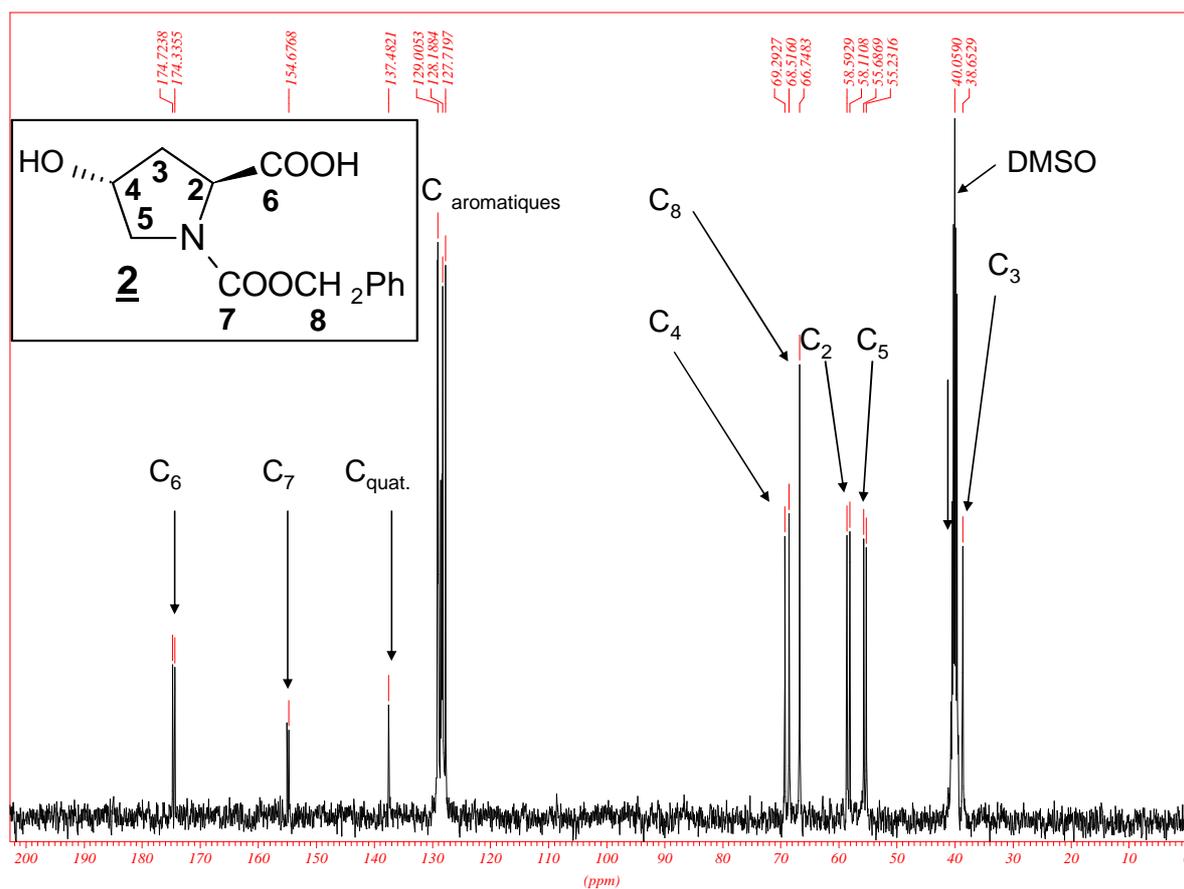


Figure 29 : Spectre RMN ¹³C du composé **2** (DMSO_{d6}, 100 MHz, 25 °C).

Une étude RMN en température du composé **2** dans le DMSO_{d6} montre un phénomène de coalescence des pics au fur et à mesure de la montée en température (Figure 30).

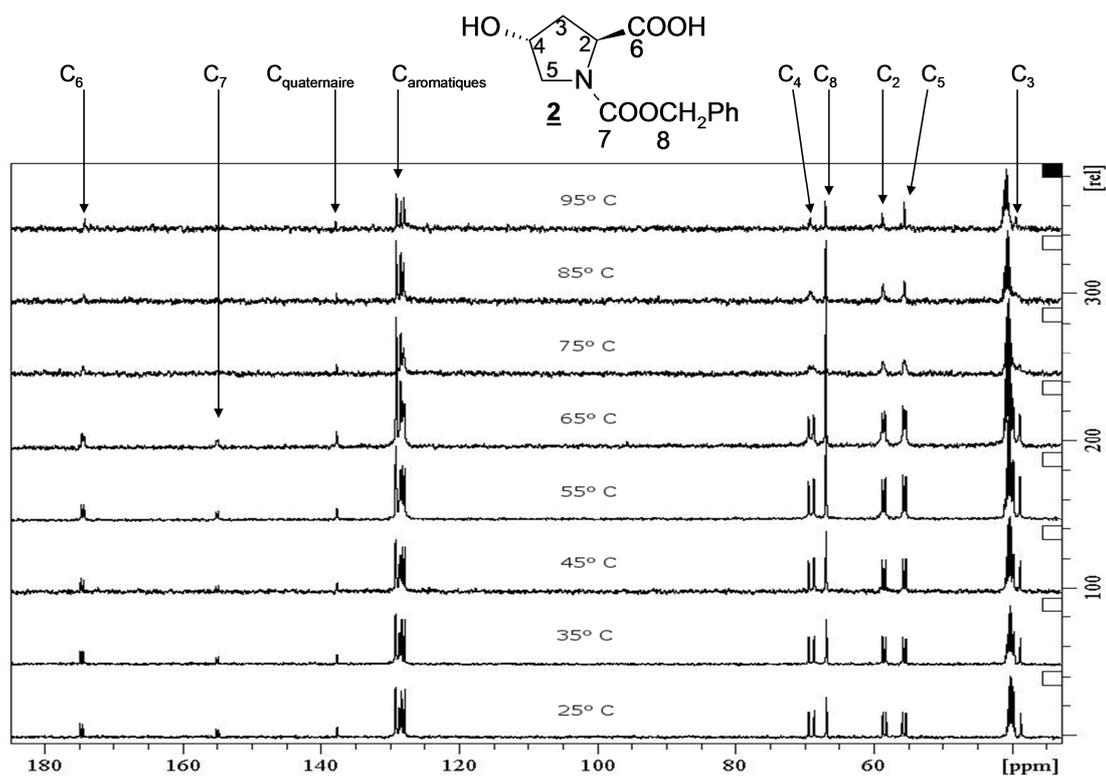


Figure 30 : Effet de la température sur le spectre RMN ^{13}C du composé **2** ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz).

Une analyse similaire a été conduite sur le produit d'alkylation **6** dans le $\text{DMF-}d_7$ (Figure 31). De nouveau, une coalescence des pics d'un même atome de carbone est observée, justifiant la présence de conformères plutôt que celle de diastéréoisomères.

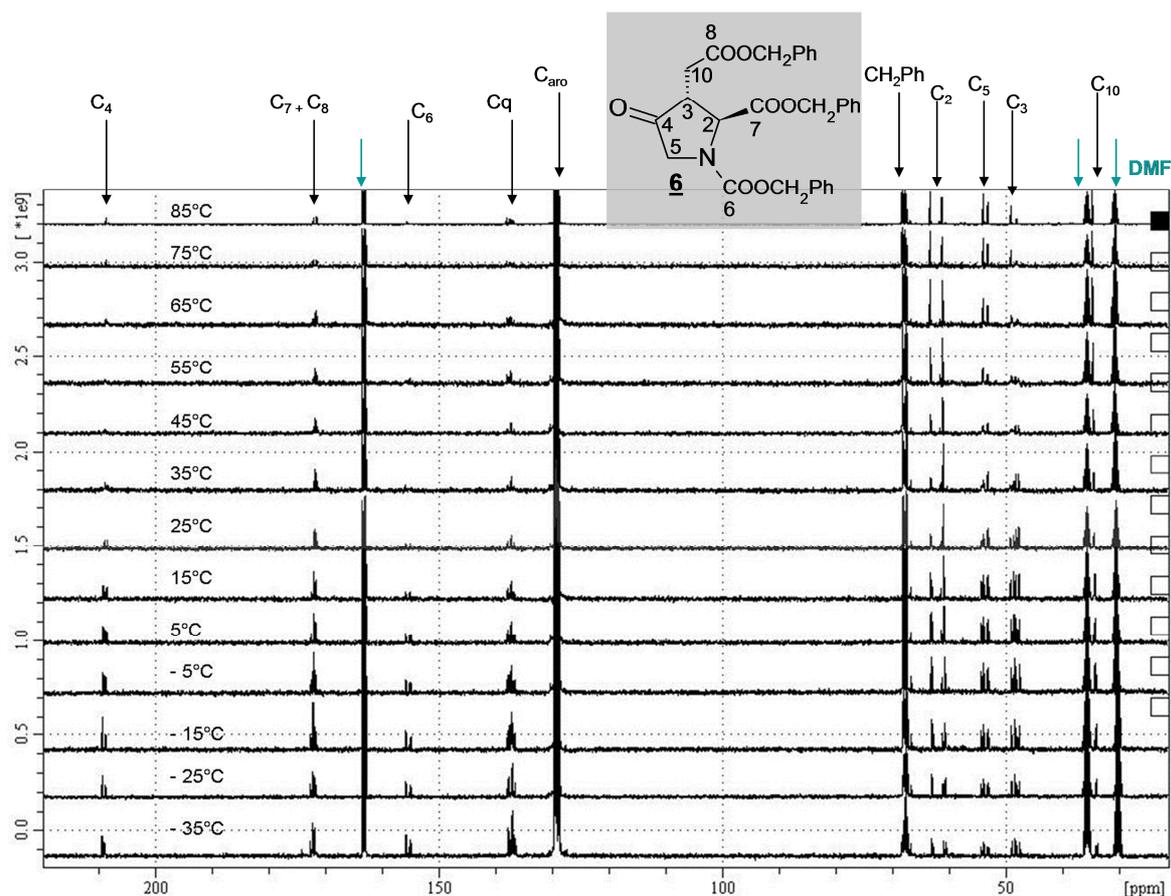


Figure 31 : Effet de la température sur le spectre ^{13}C du composé **6** (DMF_{d7} , 100 MHz).

3.2.3.2.2 Etude RMN ^1H

Une étude RMN 2D a été réalisée dans le cas du composé **6**. La carte de corrélation HMQC ^1H - ^{13}C a permis d'attribuer sans ambiguïté les signaux des différents atomes de carbones et d'hydrogène, notamment ceux des carbones C_2 C_3 ainsi que des protons H_2 H_3 (Figure 32), particulièrement intéressants pour la suite de notre étude.

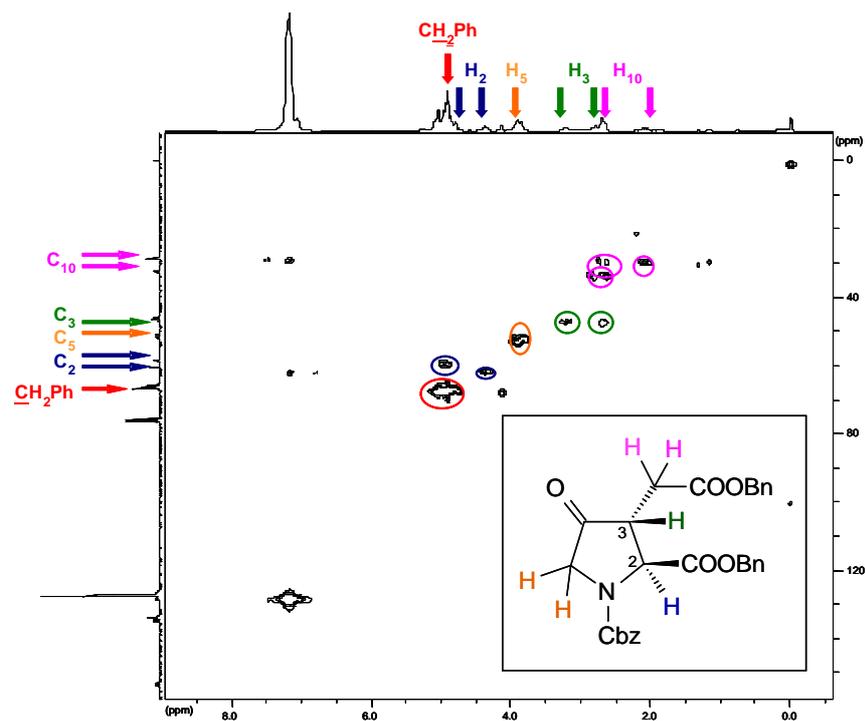


Figure 32 : Corrélation HMQC du composé **6** (CDCl_3 , 300MHz).

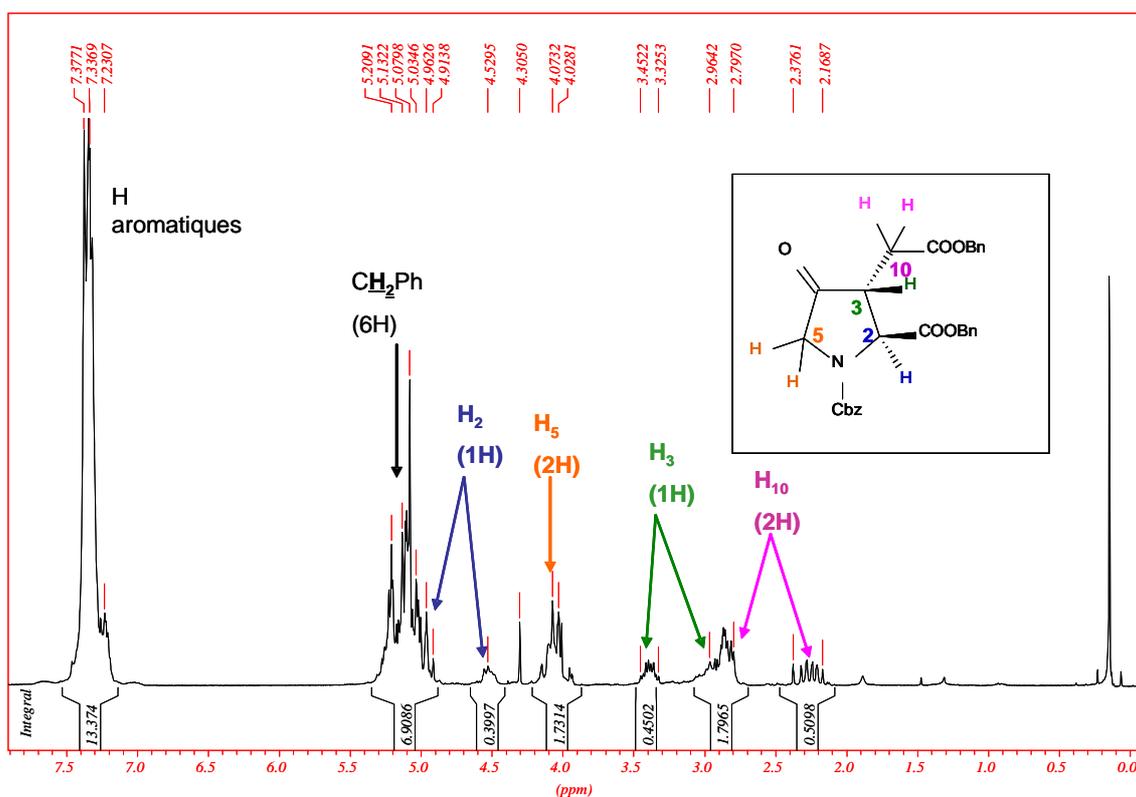


Figure 33: Spectre RMN ^1H du composé **6** (CDCl_3 , 75 MHz, 25°C).

Toutefois, dans ces conditions, il n'a pas été possible d'évaluer la constante de couplage $^3J_{H_2-H_3}$ déterminante pour établir la stéréochimie de l'*intermédiaire clé* (Figure 33).

Une élévation de la température et un enregistrement du spectre à 400 MHz permet d'obtenir une analyse plus fine du spectre RMN 1H . Ainsi, le spectre du produit **6** dans le $CDCl_3$ à 60°C (Figure 34), permet de visualiser un doublet à 4,4 ppm avec une constante de couplage de 5,67 Hz.

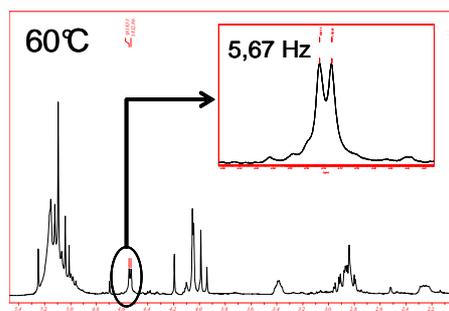


Figure 34 : Spectre 1H du composé **6** à 60°C ($CDCl_3$, 400 MHz).

Les valeurs obtenues dans le $CDCl_3$ sont en accord avec la stéréochimie *trans* du composé pour cette gamme de produits. En effet, on observe habituellement des constantes de couplage comprises entre 2 et 6 Hz pour les isomères *trans* et entre 8 et 9 Hz pour les composés *cis*. Sur une structure chimique très proche, les travaux de Baldwin montrent une constante de couplage mesurée de 5,5 Hz (Figure 35)¹²⁷.

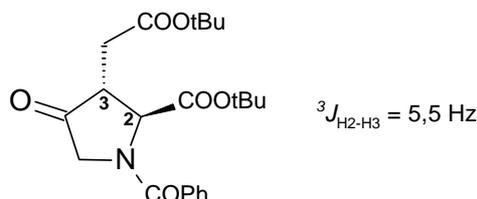


Figure 35 : Travaux de Baldwin.

Il est intéressant de signaler les travaux de Mauger sur la stéréochimie de la 3-méthylproline¹³² pour comprendre les variations des valeurs de couplage, et par conséquent la difficulté d'attribution de la stéréochimie, pour de tels systèmes. En effet, ceux-ci montrent que les composés, *cis* et *trans*, non substitués sur l'atome d'azote possèdent des constantes de couplage très proches (7,2 et 7,7 Hz) (Tableau 6). A l'inverse, en substituant l'hydrogène de l'amine par un groupement acétyle, les constantes de couplage deviennent caractéristiques d'un stéréoisomère. La faible différence de celles-ci pour les formes libres s'explique par la flexibilité du cycle, les valeurs observées correspondant alors à un effet moyen. Par contre l'encombrement de l'atome d'azote donne des structures plus rigides et donc des angles

dièdres suffisamment différents entre les isomères *cis* et *trans* pour conduire à des constantes de couplage $^3J_{H2-H3}$ caractéristiques de chacun des isomères (respectivement 7,9 et 5,1 Hz). Ceci illustre l'importance de la substitution de l'atome d'azote lors de l'étude de ces composés.

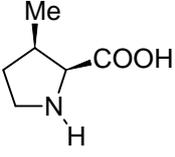
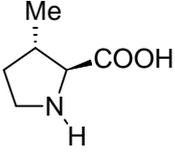
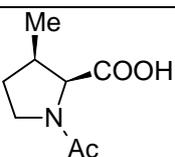
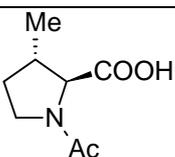
Formes libres		
Constantes de couplage $^3J_{H2-H3}$ (en Hz)	7,2	7,7
Formes substituées (encombrement de l'atome d'azote)		
Constantes de couplage $^3J_{H2-H3}$ (en Hz)	7,9	5,1

Tableau 6 : Etude de Mauger sur la 3-méthylproline.

3.2.3.2.3 Etude RMN NOESY

L'étude RMN NOESY est une méthode classique, largement utilisée, pour déterminer la stéréochimie des composés. Cependant, en série kaïnique, la flexibilité conformationnelle du cycle pyrrolidinique est telle que l'effet NOE peut s'avérer difficilement observable. Ainsi, l'expérience NOESY sur le composé **6** s'est révélée infructueuse.

Le traitement de la cétone **6** par le borohydrure de sodium, dans le méthanol a conduit, stéréosélectivement, à l'alcool **6a** (Figure 36). L'attaque de l'hydrure sur le carbonyle procède du côté le moins encombré (côté opposé au groupement ester en position -2), donnant ainsi un composé à la stéréochimie C₂-C₄ *cis* bien établie par Baldwin sur un dérivé similaire¹³³.

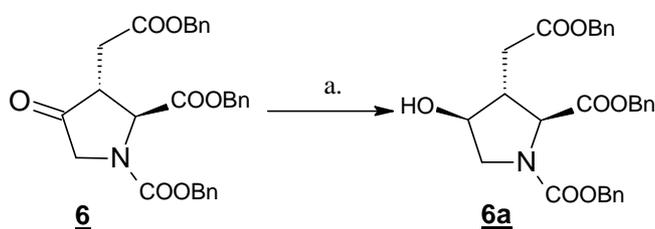


Figure 36 : Réduction du composé **6**.
a.) NaBH₄, MeOH.

L'étude RMN NOESY du composé **6a**, a pu être ensuite réalisée (Figure 37). Elle permet d'observer les corrélations des protons séparés d'une distance de 2 à 4 Å, quel que soit le

nombre de liaisons entre eux, ce qui est le cas pour les protons H_2 , H_3 , H_4 et H_{10} . Le fait d'étudier une petite molécule ainsi que les nombreux conformères possibles rendent l'interprétation particulièrement difficile. Néanmoins, l'analyse de cette étude permet de récolter plusieurs informations importantes. L'attribution des protons est possible grâce à l'utilisation d'une cartographie 2D HMQC 1H - ^{13}C .

Les protons H_{10} montrent une corrélation entre les protons H_2 et H_4 avec une intensité très importante. D'autre part le proton H_3 ne montre pas de tâche de corrélation avec H_4 . On peut aussi noter l'absence de corrélation entre H_2 et H_3 (Figure 37).

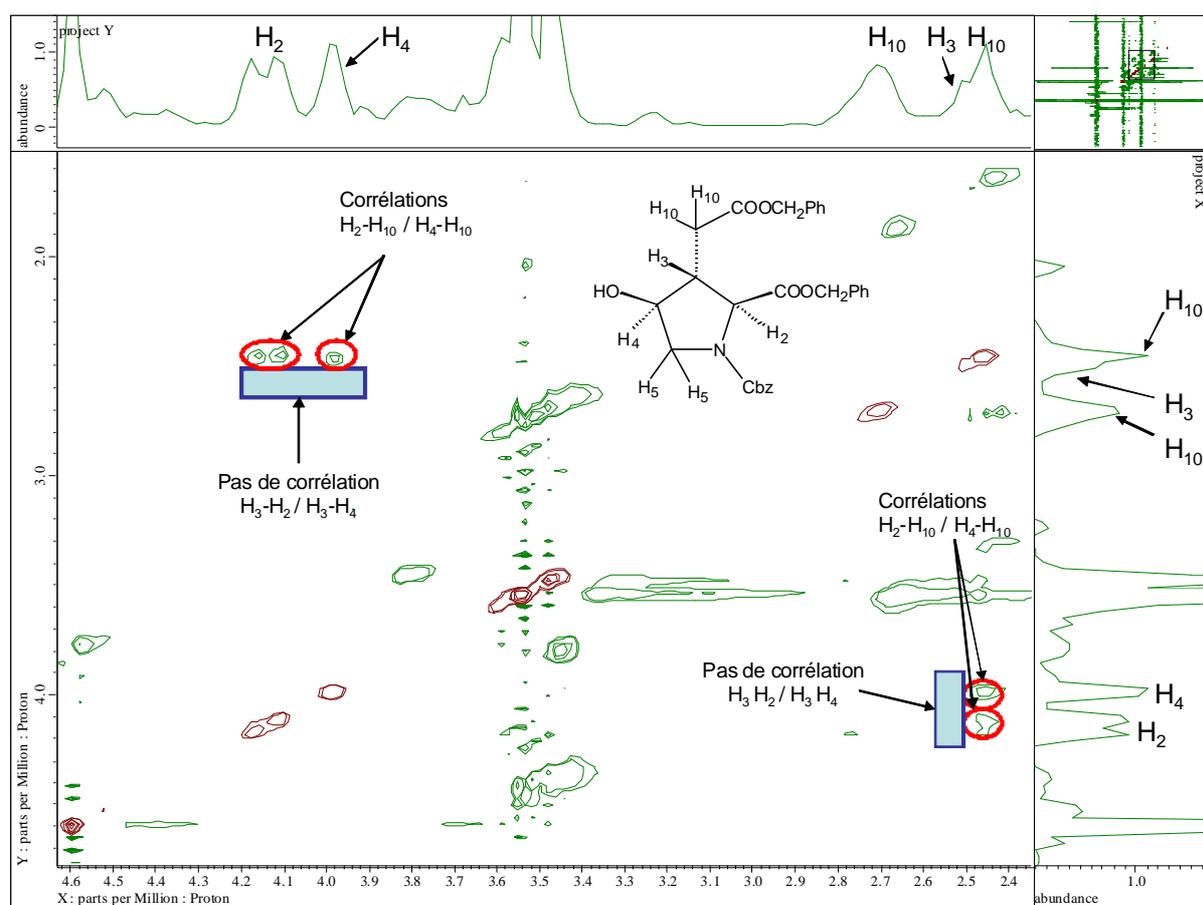


Figure 37 : Expérience NOESY sur le produit **6a**.

Les corrélations sont visibles lorsque les protons sont relativement proches spatialement malgré l'absence de liaisons proches. C'est le cas pour les couples de protons H_2 - H_{10} et H_4 - H_{10} . Ceci permet de confirmer que les protons H_2 , H_4 et H_{10} se trouvent d'un même côté de la molécule. D'autre part, dans le cas d'un composé *cis* C_2 - C_3 , les protons H_{10} seraient éloignés des protons H_2 et H_4 conduisant à l'absence de corrélations. Or celles-ci sont bien visibles.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Baldwin¹³³ réalisés lors de la synthèse d'acides aminés analogues de l'acide kaïnique. Ainsi nous avons pu établir de façon non ambiguë la

stéréochimie relative *trans* C₂-C₃ du composé **6**¹³⁰, déterminante dans l'activité neurotoxique des composés de la famille kaïnoïde.

3.3 Synthèse de l'haptène **12**

A partir de l'intermédiaire clé **6**, il est possible d'introduire un bras espaceur, par création d'une liaison C=C, par réaction de Wittig sur la fonction carbonyle. Ce bras espaceur devra être terminé par une fonction acide carboxylique, pour couplage à la protéine porteuse.

3.3.1 Réaction de Wittig

De la taille du bras espaceur va dépendre l'espacement entre la protéine et la molécule cible. Pour une bonne reconnaissance de celle-ci, la longueur de l'espaceur est généralement comprise entre 2 et 5 atomes de carbone (section 2.5).

Dans la littérature, plusieurs exemples de réactions de Wittig à partir d'ylures de phosphore, de tailles variables, présentant une fonction acide terminale ont été rapportés. Il est donc possible d'envisager l'obtention de plusieurs haptènes en changeant uniquement l'ylure de départ (Figure 38).

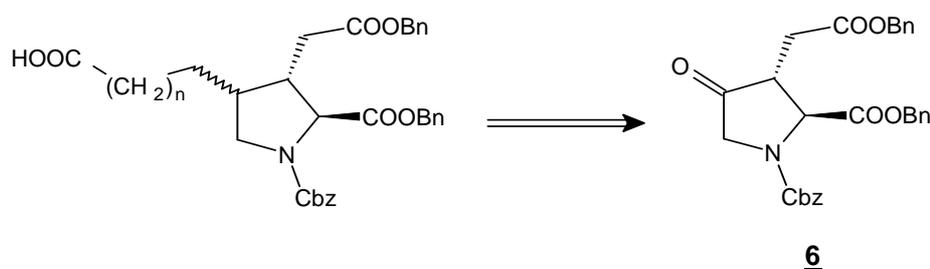


Figure 38 : Réaction de Wittig et réduction

Soper¹³⁴ et Soyka¹³⁵ ont décrit des réactions de bromures de phosphonium tels que le carboxypropyl-, butyl-, pentyl-, hexyl- bromure de triphényl phosphonium, respectivement, sur un aldéhyde et des cétones. Un excès de base, non nucléophile, (NaHMDS et *t*-BuOK) par rapport à l'ylure est utilisé. Les rendements obtenus sont compris entre 70 et 90 % (Tableau 7).

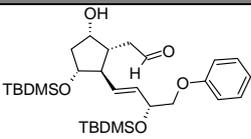
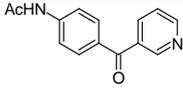
Référence	Produit de départ	Bromure de triphénylphosphonium (éq.)	Base (éq.)	Rendements
Soper ¹³⁴		Carboxypropyl (2,2)	NaHMDS (4,4)	88%
Soyka ¹³⁵		Carboxypropyl (1,2)	<i>t</i> -BuOK (3,6)	74%
		Carboxybutyl (1,2)	<i>t</i> -BuOK (3,6)	86%
		Carboxypentyl (1,2)	<i>t</i> -BuOK (3,6)	72%
		Carboxyhexyl (1,2)	<i>t</i> -BuOK (3,6)	69%

Tableau 7 : Réactions de Wittig.

Nous avons donc effectué des essais préliminaires à partir du bromure de (3-carboxypropyl)triphénylphosphonium, du composé **6** et d'un excès de *t*-BuOK ou de LiHMDS. L'analyse RMN ¹H du mélange brut a montré une absence de groupements benzyle et benzyloxycarbonate. La faible réactivité des ylures peut être à l'origine d'une réaction trop lente pouvant conduire à la disparition des groupements protecteurs par la base, présente en large excès. Cette voie a donc été abandonnée.

3.3.2 Réactions de WEH avec le diéthylphosphonoacétate de *t*-butyle

La réaction de Wadsworth Emmons Horner (WEH)¹³⁶ met en jeu des carbanions formés à partir de phosphonates qui sont plus nucléophiles que les ylures de phosphore et permettent donc une réaction plus rapide. Les conditions opératoires sont relativement douces, et ne nécessitent pas d'excès de base, même avec les cétones.

En 2006, Ganorkar a fait réagir une cétone pyrrolidinique substituée, par un groupe ester de benzyle, avec du cyanométhylphosphonate de diéthyle et du LiHMDS (1,1 : 1) en solution dans le THF. La réaction a lieu avec de très bons rendements (90%) sans dégradation des groupes protecteurs (Figure 39)¹²¹.

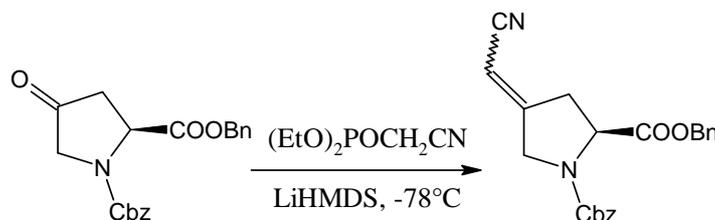


Figure 39 : Réaction de WEH réalisée par Ganorkar.

Nous avons alors étendu ce travail au cas de notre étude et choisi d'utiliser le diéthylphosphonoacétate de *t*-butyle car les esters de *t*-butyle sont clivés en milieu acide, ce qui n'affecte pas les groupements protecteurs benzyloxycarbonate et benzyle (Figure 40).

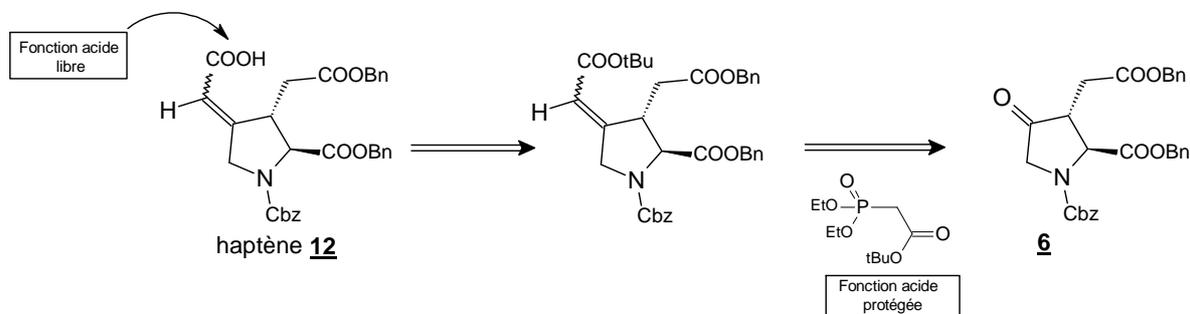


Figure 40 : Rétrosynthèse de l'haptène **12** par réaction de WEH.

Le diéthylphosphonoacétate de *t*-butyle, en présence de LiHMDS à -78°C dans le THF, conduit à la formation d'un carbanion qui réagit sur la cétone **6**, à température ambiante, pour donner un mélange des dérivés éthyléniques isomères **7**, **8** et **9** (Figure 41).

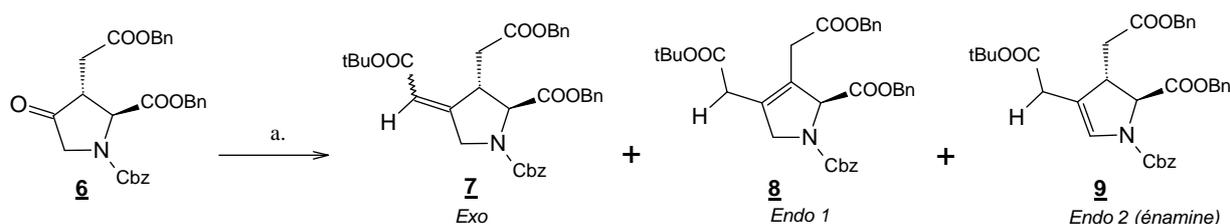
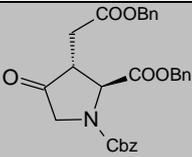
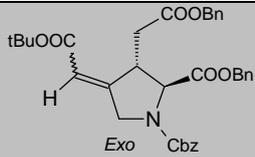
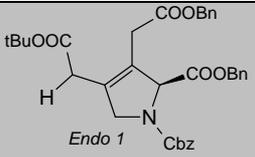
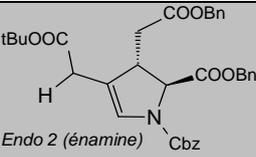


Figure 41 : Réaction de Wadsworth Emmons Horner.
a.) $(\text{EtO})_2\text{POCH}_2\text{COOtBu}$ (1,2 éq.), LiHMDS (1 éq.), THF, -78°C . 28%

Chacun de ces composés a pu être caractérisé par RMN ^1H , ^{13}C ainsi que par RMN 2D (HMQC). La proportion relative de ces composés varie en fonction du temps de réaction (Tableau 8).

Après 3 heures ou 7 heures, on observe la formation du composé éthylénique attendu *exo* **7** et en moindre quantité celle de son isomère *endo* **2** **9**. L'identification et la proportion relative de chacun de ces composés ont été établies par RMN ^1H , à partir du déplacement chimique et de l'intégration des singulets des protons éthyléniques à 5,40 ppm pour l'isomère **9** et 5,60/5,67 ppm pour l'isomère **7** (*Z* et *E*). Une analyse CCM montre des R_f très proches entre celui de la cétone initiale **6** et celui du composé **9**, ce qui ne nous a pas permis de les séparer par chromatographie liquide.

Après 13 heures, la consommation totale du produit de départ est observée. Les composés **7** et **8** sont isolés et purifiés par chromatographie liquide sur colonne ouverte, avec comme éluant un mélange pentane/éther (6:4).

Entrée	Temps de réactions				
		6	7	8	9
1.	3h	11% ^a	26%	-	2% ^a
2.	7h	5% ^a	26%	-	5% ^a
3.	13h	-	28%	13%	-
4.	20h	-	7%	30%	-

a. Evaluation par RMN¹H..

Tableau 8 : Isomères obtenus en fonction du temps de réaction.

L'optimisation des conditions opératoires a conduit à un temps de réaction de 13h pour isoler le produit **7** avec un rendement de 28% (ligne 3 du Tableau 8).

3.3.3 Réduction sélective avant couplage

Afin d'obtenir un haptène présentant la stéréochimie C₃-C₄ *cis/trans* déterminée avant couplage à la protéine, une réduction sélective de la double liaison du composé **7**, par CuH préparé *in situ* en présence l'hydrure de sodium bis(2-méthoxyéthoxy)aluminium (Vitride[®]) a été envisagée. Cette méthode est utilisée pour réduire de façon sélective les esters α - β insaturés en leurs analogues saturés.

La procédure générale est celle décrite par Semmelhack *et coll.* en présence de bromure de cuivre dans le butan-2-ol et le THF¹³⁷ (Figure 42):

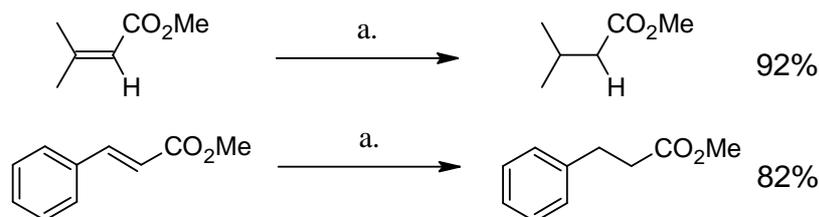


Figure 42 : Exemples de réduction avec le Vitride[®].

a.) CuBr, THF, Vitride[®], butan-2-ol, 0°C puis -78°C.

Plusieurs tentatives de réduction avec le Vitride[®] ont été effectuées (Figure 43) à partir du composé **7**:

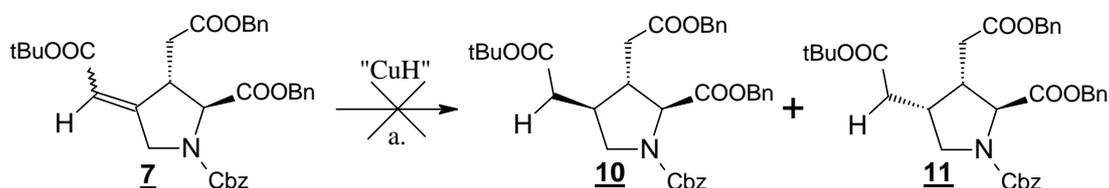


Figure 43 : Réduction sélective de la double liaison avant couplage.

a.) CuBr, THF, Vitride[®], butan-2-ol, 0°C puis -78°C.

Ces essais infructueux nous ont poussés à abandonner cette voie et à envisager la réduction de la double liaison après couplage à la protéine.

3.3.4 Déprotection de l'ester de *t*-butyle

La dernière étape permettant d'accéder à l'haptène **12** désiré, consiste à libérer l'acide carboxylique terminal par traitement à l'acide trifluoroacétique (TFA) en présence de triéthylsilane (Figure 44)¹³⁸. Il s'agit d'une déprotection sélective du groupement *t*-butyle sans dégradation de la molécule, notamment des autres groupes protecteurs. Une simple évaporation du solvant permet de récupérer l'haptène **12** avec des rendements de l'ordre de 70-80%.

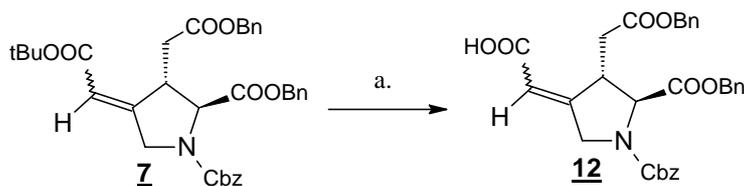


Figure 44 : Déprotection sélective du groupement *t*-butyle.

a.) TFA, Et₃SiH, DCM, température ambiante, 16h. 78%

La disparition du pic caractéristique du groupement *t*-butyle (singulet autour de 1,5 ppm), l'apparition d'un pic large au-delà de 8 ppm, dû au proton acide, ainsi que la présence des pics relatifs aux protons benzyliques et aromatiques (5,5 et 7 ppm) montrent la sélectivité de la déprotection utilisée.

En résumé, deux méthodes ont donc été envisagées pour conduire à un haptène (Figure 45) mais s'est avérée positive.

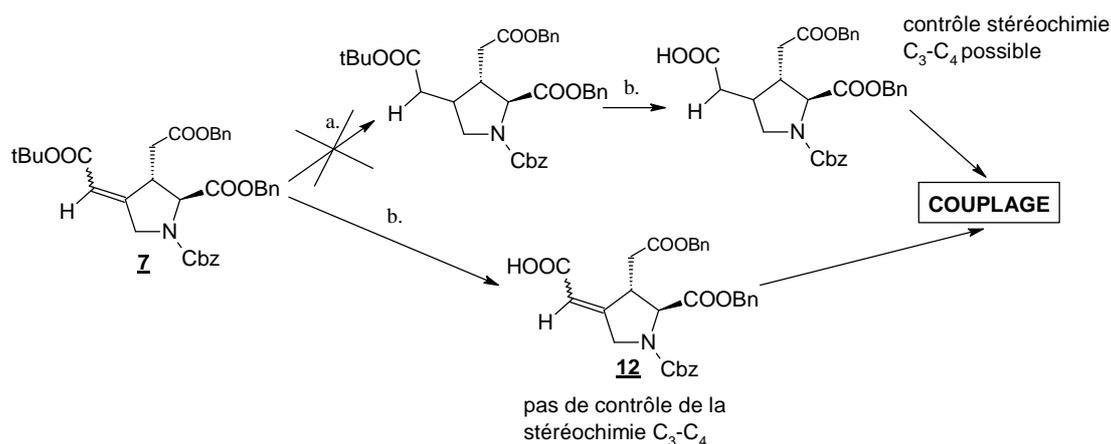


Figure 45 : Schéma des deux méthodes possibles avant le couplage.

a.) CuBr, THF, Vitride[®], butan-2-ol, 0°C puis -78°C ; b.) TFA, Et₃SiH, DCM, température ambiante, 16h.

Par contre, comme il n'est pas possible de vérifier l'étape de déprotection/réduction une fois l'haptène couplé à la protéine, la réaction a été contrôlée sur l'haptène libre **12**, non couplé (Figure 46).

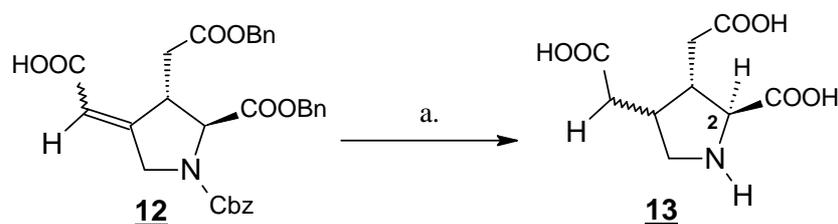


Figure 46 : Essai de déprotection/réduction simultanées.

a.) H₂, Pd/C, MeOH.

L'étude RMN ¹H du composé **13** montre la disparition des pics caractéristiques des protons en α- des benzyles (CH₂Ph), des protons aromatiques (Ph) ainsi que des protons vinyliques. Cette étude a donc permis de confirmer la pertinence de la stratégie mise en place pour la déprotection et la réduction simultanées après le couplage à la BSA.

Remarques : Le proton H₂ sur cette molécule présente un déplacement chimique de 4,07 ppm (Figure 46). Celui-ci apporte une preuve supplémentaire sur la configuration *trans* C₂-C₃ de la molécule. En effet, une règle empirique de Shirahama¹³⁹ permet d'attribuer la stéréochimie des molécules de la famille de l'acide kaïnique en fonction du déplacement chimique observé, supérieur à 4,2 ppm pour les composés *cis* et inférieur pour les composés *trans*.

3.4 Synthèse de l'haptène 19

La chaîne latérale obtenue pour l'haptène 12 étant relativement courte ($n=2$), l'obtention d'un nouveau phosphonate pour augmenter la taille du bras espaceur a été envisagée. Compte tenu des résultats obtenus pour la synthèse du premier haptène, nous avons préparé le phosphonate (17) possédant quatre atomes de carbones.

3.4.1 Synthèse du diéthylphosphonocrotonate de *t*-butyle 17

La synthèse de celui-ci est effectuée, en deux étapes, à partir d'un produit commercial peu coûteux, le crotonate de *t*-butyle (Figure 47)¹⁴⁰⁻¹⁴². Il s'agit de la réaction radicalaire de Wohl-Ziegler.

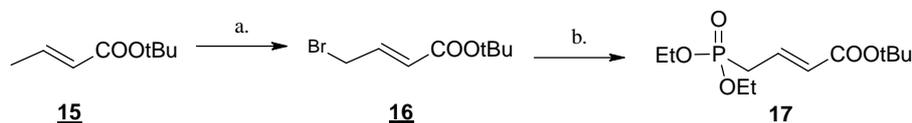


Figure 47 : Synthèse du phosphonocrotonate.

a.) NBS, DBP, CCl₄, reflux, nuit. 55% b.) (EtO)₃P, 120°C, 5h. 48%.

Le crotonate de *t*-butyle subit une bromation par réaction radicalaire à partir du *N*-bromosuccinimide, au reflux dans le tétrachlorure de carbone, en présence de peroxyde de benzoyle (DBP). Ce dernier a été préféré à l'azobisisobutyronitrile (AIBN) dont l'effet initiateur s'est avéré peu efficace¹⁴¹. Le composé 16 est obtenu avec un rendement de 49%.

Pour des raisons de toxicité, des essais pour mener la réaction en milieux aqueux¹⁴³ ont été tentés. Le milieu devenant acide en présence du *N*-hydroxysuccinimide formé, une partie du produit de départ semble se dégrader (perte du groupement *t*-butyle) et la réaction ne conduit pas au produit attendu. Ces essais n'ont donc pas été poursuivis.

Lors de la deuxième étape, la réaction d'Arbuzov^{140,142} entre le triéthylphosphite et le composé 16, par simple chauffage à 120°C, conduit au diéthylphosphonocrotonate de *t*-butyle 17 avec un rendement de 48% (Figure 47).

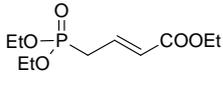
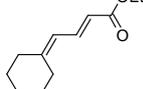
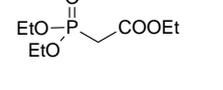
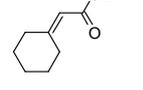
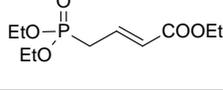
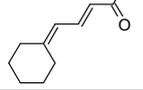
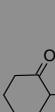
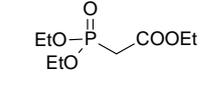
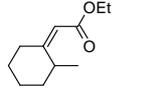
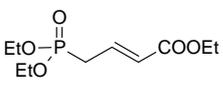
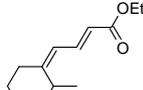
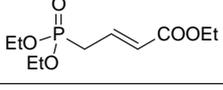
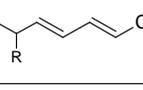
3.4.2 Réactions de WEH avec le diéthylphosphonocrotonate de *t*-butyle.

Si de nombreuses réactions de WEH sont décrites, celles concernant les phosphonocrotonates sont plutôt rares et mettent en jeu plus souvent des aldéhydes que des cétones. De plus, la

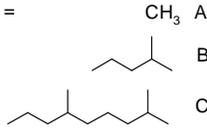
réactivité des phosphonocrotonates semble être moindre que celle des phosphonoacétates. Les bases les plus couramment utilisées, pour la formation du carbanion, sont LiHMDS¹²¹, NaH^{142,144}, BuLi ou encore LDA.

Ainsi, dans la littérature, Robinson *et coll.*¹⁴⁴ présentent des réactions WEH de phosphonoacétates d'éthyle ainsi que de phosphonocrotonates d'éthyle sur la cyclohexanone et la 2-méthylcyclohexanone, en présence de LiHMDS comme base. Les résultats indiquent une moindre réactivité pour les phosphonocrotonates comparés à celle des phosphonoacétates pour un même composé carbonylé (Tableau 9).

Ce manque de réactivité peut s'expliquer par la constante d'équilibre au moment de la formation de l'anion. En effet, les pKa des deux composés diffèrent légèrement. La formation de l'anion est plus rapide dans le cas du diéthylphosphonoacétate d'éthyle (pKa = 11,9) que dans celui du diéthylphosphonocrotonate d'éthyle (pKa = 18,5)¹⁴⁵.

Cétone de départ	Phosphonate	Base (éq.)	Produit	Rendement
		LiOH.H ₂ O (1)		99%
		LiHMDS (1)		74%
		LiHMDS (1)		32%
		LiHMDS (1)		55%
		LiHMDS (1)		21%
		NaH (1,1)		R = A : 47 % B : 39 % C : 44 %

R =



CH₃ A
B
C

Tableau 9 : Travaux de Takacs (LiOH), Robinson (LiHMDS) et Sato (NaH).

Pour synthétiser le phytol, Sato *et coll.*¹⁴² ont utilisé un phosphonocrotonate d'éthyle avec différentes cétones. Les rendements obtenus sont compris entre 39 et 47%.

Au cours de ces divers travaux, la base utilisée est soit le LiHMDS en quantité stœchiométrique, soit NaH en léger excès.

En 1998, Takacks *et coll.*¹⁴⁶ ont publié la synthèse d'esters α,β -insaturés par réaction du diéthylphosphonocrotonate d'éthyle avec LiOH et des composés carbonylés en présence de tamis moléculaire. Avec l'hydroxyde de lithium monohydraté les réactions sur des cétones peuvent atteindre, dans certains cas, des rendements supérieurs à 80%^{146,147}. Néanmoins, si LiOH semble être une base très intéressante en terme de rendement, il existe un risque potentiel de dégradation des groupes protecteurs. En effet, Hungate a décrit la déprotection d'un groupement benzyloxycarbonyle en présence de LiOH¹⁴⁸.

Compte tenu de l'ensemble de ces observations, nous avons choisi d'étudier le comportement du composé **6**, vis-à-vis du phosphonocrotonate de *t*-butyle **17**, en présence de diverses bases (Figure 48).

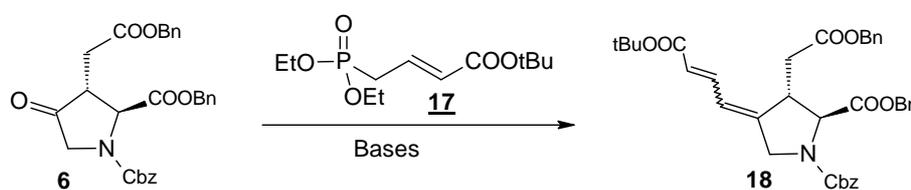


Figure 48: Synthèse du composé **18**.

Le Tableau 10 regroupe les divers résultats obtenus. Seule la réaction avec LiHMDS donne un résultat exploitable, les autres bases utilisées ne conduisent pas au produit attendu. En présence d'hydrure de sodium, on note la disparition de la cétone initiale mais pas la présence du produit final. Comme mentionné précédemment, LiOH déprotège la fonction amine¹⁴⁸.

Les différentes conditions utilisées semblent montrer que les plus efficaces sont celles données ligne 3 du Tableau 10.

	Base (éq.)	Conditions expérimentales		Cétone initiale 6	Rendement Composé 18
		Formation carbanion	Ajout de la cétone		
1.	LiHMDS (1)	30 min à -78°C	4 h à -50°C	16%	-
2.	LiHMDS (1)	30 min à -78°C	14 h à température ambiante	13%	~1,5 %
3.	LiHMDS (1)	2h30 à -20°C	3h au reflux du THF	19%	~22 %
4.	NaH (1,4)	0°C puis 10 h	0°C puis 14 h	-	-
5.	LiOH.H ₂ O (1)	-	Température ambiante puis 16 h au reflux du THF (tamis moléculaire)	Déprotection	-

Tableau 10 : Réactions de WEH avec différentes bases.

Malgré le faible rendement, nous avons choisi cette voie et purifié le composé **18** par chromatographie liquide (HPLC).

Après déprotection de la fonction acide carboxylique par l'acide trifluoroacétique, le composé **18** a conduit au deuxième haptène **19**, sous forme protégée, présentant un bras espaceur possédant quatre atomes de carbone (Figure 49).

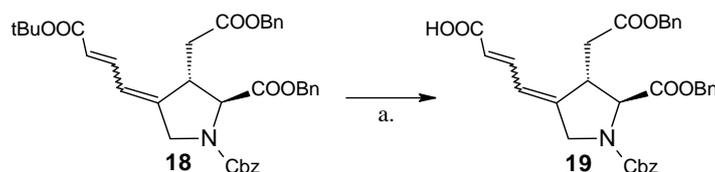


Figure 49 : Déprotection sélective du groupement *t*-butyle.
a.) TFA, Et₃SiH, DCM, température ambiante, 16h. 82%.

En résumé, les différentes synthèses décrites dans ce Mémoire ont permis d'obtenir les deux haptènes **12** et **19**¹³⁰, sous leur forme protégée (Figure 50). Ces deux haptènes présentent une longueur de bras espaceur différente de façon à étudier l'effet de celle-ci sur la qualité des anticorps produits.

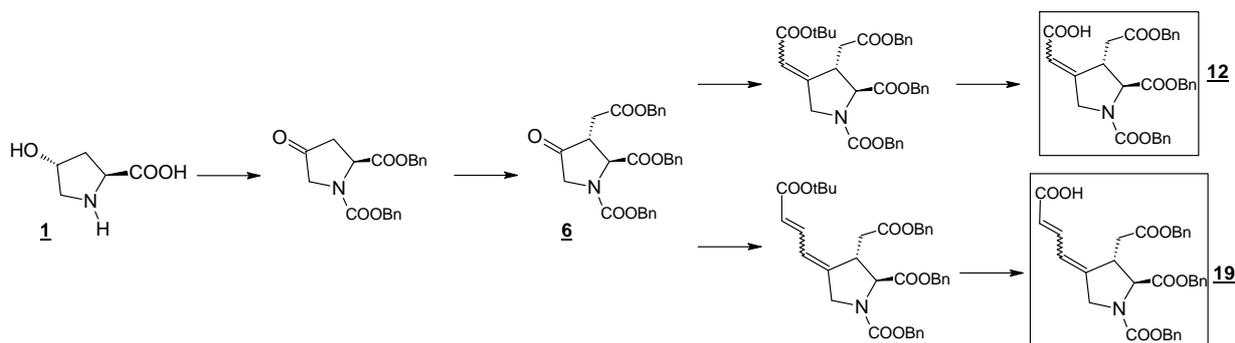


Figure 50 : Synthèses des haptènes **12 et **19**.**

D'autre part, les quantités nécessaires pour l'immunisation étant de l'ordre de quelques milligrammes, nous n'avons pas cherché à optimiser les rendements de ces différentes synthèses.

3.5 Synthèse des bioconjugués

Afin de réaliser l'étape d'immunisation, il faut préparer les conjugués par couplage des haptènes **12** et **19** à une protéine porteuse, la BSA. D'autre part, les haptènes seront aussi couplés à la THYR; ces conjugués THYR-Haptène seront utilisés pour l'étape de coating (*cf* 4.2.1) lors de la mise en place de tests ELISA.

3.5.1 Conjugués BSA-Haptène

3.5.1.1 Couplage

Le couplage à la BSA peut avoir lieu sur les fonctions acide ou amine libres de la BSA par formation d'une liaison peptidique. Etant donnée la structure choisie pour les deux haptènes protégés, cette liaison va se créer entre la fonction amine terminale des résidus lysine libres de la BSA et la fonction acide terminale des haptènes. Ce couplage utilise une méthode classique EDC/NHS^{115,149}, dite des esters activés, rencontrée lors de travaux antérieurs concernant l'acide domoïque^{107,117}.

Les haptènes, **12** et **19**, sont couplés pour donner respectivement les conjugués **BSA-12A**, **BSA-12B** et **BSA-19A**, **BSA-19B**. Après formation de l'ester activé par ajout d'EDC et NHS à l'haptène, celui-ci est additionné goutte à goutte à une solution de BSA dans le tampon borate borique. Le milieu réactionnel est ensuite laissé une nuit à 4°C, dialysé et enfin lyophilisé de façon à récolter quelques milligrammes de bioconjugués.

Les conditions opératoires sont identiques pour les quatre bioconjugués. Seul le rapport BSA/haptène varie (1/25 pour **BSA-12A** et de 1/50 pour les trois autres).

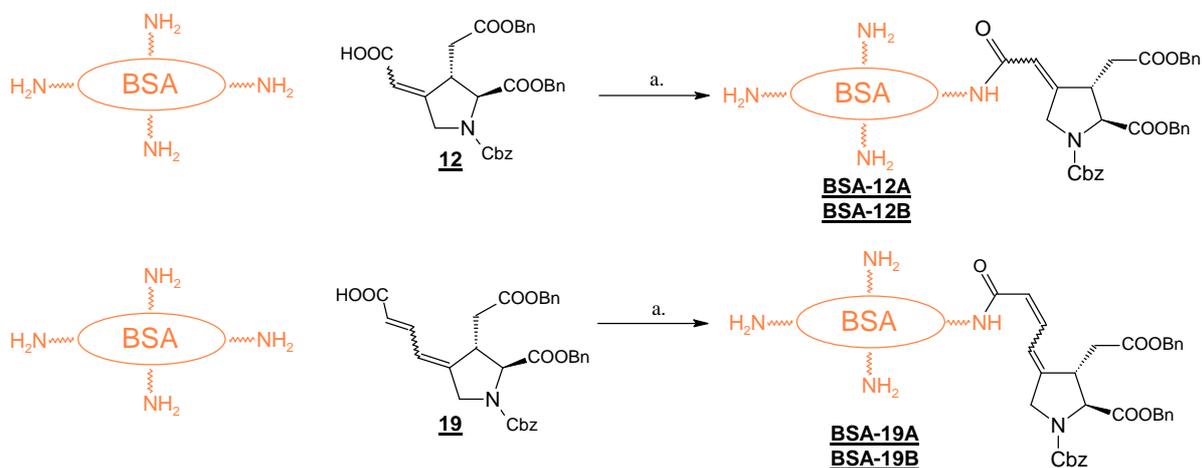


Figure 51 : Couplages à la BSA.

a.) EDC, NHS tampon borate borique (pH 8,7), DMF.

Les taux de couplage sont évalués par électrophorèse. Un gel de polyacrylamide, SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) permet de séparer les molécules selon leur poids moléculaire grâce à la liaison du SDS sur les charges propres des

molécules¹⁵⁰. La révélation utilise le bleu de Coomassie et le gel est ensuite photographié puis analysé avec le logiciel AlphaEaseFC (Figure 52).

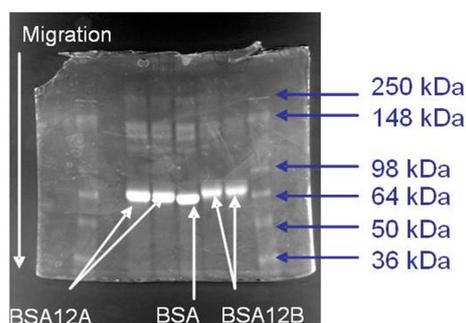


Figure 52 : Gel d'électrophorèse des bioconjugués **BSA-12**.

Cette méthode rapide permet d'évaluer l'augmentation de la masse du conjugué par rapport à celle de la BSA. L'analyse des bioconjugués **BSA-12** montre un décalage des bandes respectives par rapport à la BSA native. Les bandes correspondantes aux bioconjugués sont plus retenues par le gel ce qui implique une augmentation de la masse et par conséquent le greffage d'une certaine quantité d'haptènes à la surface de la protéine. Le logiciel AlphaEaseFC permet d'évaluer le taux de couplage en utilisant les différentes valeurs de Rf des marqueurs de masse, situés aux extrémités du gel. Dans le cas des conjugués **BSA-19**, les électrophorèses effectuées ne donnent pas un gel de qualité suffisante pour permettre une bonne lecture et ont donc été écartées.

La technique de spectrométrie de masse MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation), plus récente, permet aussi de calculer les taux de couplage grâce à l'incrément de masse mesuré après couplage¹⁵¹. Sachant que la masse moléculaire de la BSA de départ et celle de l'haptène sont connues, l'équation suivante permet de calculer le taux de couplage x :

$$x = \frac{M_{conj} - M_{BSA}}{M_{haptène}}$$

Les résultats obtenus avec les deux méthodes (électrophorèse et MALDI), pour les conjugués **BSA12** et **BSA19** sont regroupés dans le Tableau 11¹³⁰.

Conjugués	Ratio BSA : Haptène	Electrophorèse SDS-PAGE (basé sur le Rf)	MALDI (basé sur l'incrément de masse)
BSA-12A	1:25	2-3 haptènes	6,8 haptènes ± 0.2
BSA-12B	1:50	11-13 haptènes	17,9 haptènes ± 0.2
BSA-19A	1:50	-	3 haptènes ± 0.7
BSA-19B	1:50	-	7,5 haptènes ± 0.8

Tableau 11 : Mesures des taux de couplage pour les conjugués **BSA12** et **BSA19**.

Deux observations sont à noter :

La comparaison des essais **BSA-12A** et **BSA-12B** montre que pour l'haptène **12**, le meilleur taux de couplage observé (**BSA-12B**) est celui obtenu à partir d'une quantité d'haptène plus importante (rapport 1/50).

La comparaison des essais **BSA-12B** et **BSA-19A** (ou **BSA-19B**) montre une baisse du taux de couplage pour les conjugués préparés avec l'haptène ayant la chaîne carbonée la plus longue (n=4 au lieu de n=2).

3.5.1.2 Déprotection et réduction

L'haptène couplé étant sous sa forme protégée, il faut libérer les fonctions protégées avant l'immunisation par hydrogénation¹²¹. Celle-ci se fait en présence de palladium sur charbon sous courant de dihydrogène à température ambiante.

La faisabilité de la réaction avait, au préalable, été vérifiée sur le produit **3**, en présence de BSA. En effet, les fonctions amines ou thiols libres de la BSA peuvent empoisonner les catalyseurs et donc inhiber la réaction¹⁵². Afin d'obtenir une réaction totale, deux cycles de dix heures après ajout d'une nouvelle dose de catalyseur ont été nécessaires.

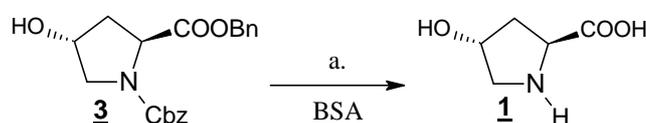


Figure 53 : Essai de déprotection en présence de BSA.

a.) H₂, Pd/C, DMF, 25°C.

L'analyse par CCM montre qu'après hydrogénation, la *trans*-4-hydroxy-L-proline est récupérée.

L'hydrogénation des quatre bioconjugués (Figure 54) a été effectuée dans les mêmes conditions opératoires pour conduire à la déprotection des fonctions acide et amine, ainsi qu'à la réduction des doubles liaisons C=C du bras espaceur.

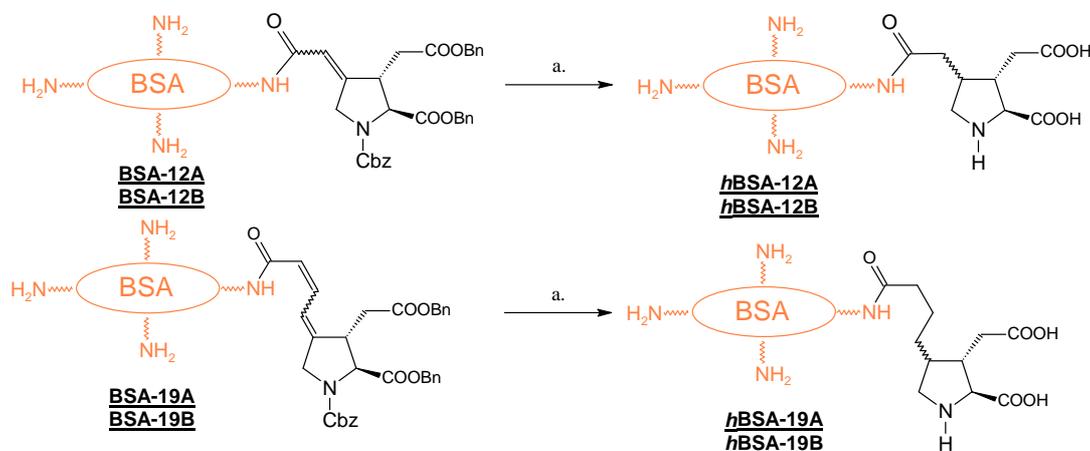


Figure 54 : Hydrogénation.
a.) H₂, Pd/C, MeOH/H₂O (1:1).

Les conjugués subissent ensuite les étapes de dialyse et de lyophilisation.

Par électrophorèse, les conjugués ne montrent aucune variation de migration par rapport à la BSA contrairement aux résultats décrits précédemment (Figure 52). La présence de palladium et de charbon pourrait éventuellement perturber la migration.

Par MALDI, les taux de couplage ont pu être évalués et sont donnés dans le Tableau 12¹³⁰.

Conjugués	Taux de couplage
<i>hBSA12A</i>	19,5 haptènes ± 0,6
<i>hBSA12B</i>	19,7 haptènes ± 1.1
<i>hBSA19A</i>	3,5 haptènes ± 0,8
<i>hBSA19B</i>	Pas de signal

Tableau 12 : Mesure par MALDI des taux de couplage (après hydrogénation).

Les taux de couplage des conjugués, avant et après hydrogénation, sont cohérents pour les échantillons BSA12B/hBSA12B et BSA19A/hBSA19A. Par contre, celui du composé BSA12A est très différent, étant curieusement plus élevé après hydrogénation.

Néanmoins, tous les conjugués ont été envoyés pour la phase d'immunisation afin d'obtenir des sérums contenant les anticorps. Chacun des quatre échantillons sera utilisé pour l'immunisation de deux lapins afin d'éviter les variations inter-individuelles.

3.5.2 Couplages à la THYR

La thyroglobuline est une protéine de 667 kDa sécrétée par la glande thyroïde du porc. Le principal avantage de celle-ci est de ne présenter aucun épitope identique à ceux de la BSA. Ainsi, les anticorps dirigés contre la BSA, produits lors de l'immunisation, ne devraient pas perturber les tests immunologiques utilisant la thyroglobuline.

3.5.2.1 Couplage des haptènes

Dans le but de réaliser les tests ELISA, le couplage entre la THYR et les haptènes **12** et **19** a été effectué en utilisant la méthode classique des esters activés. La thyroglobuline présentant un grand nombre de résidus lysines, l'haptène est donc utilisé en large excès (1:500) de façon à assurer un accrochage maximal à la surface de la protéine. En se basant sur les travaux de Derrien¹⁵³, on peut estimer à 150 le nombre de résidus lysines présents à la surface de la THYR. Ceci permet d'espérer un grand nombre d'haptènes présents à la surface de la protéine après le couplage améliorant ainsi la réponse et donc la lisibilité de ces tests.

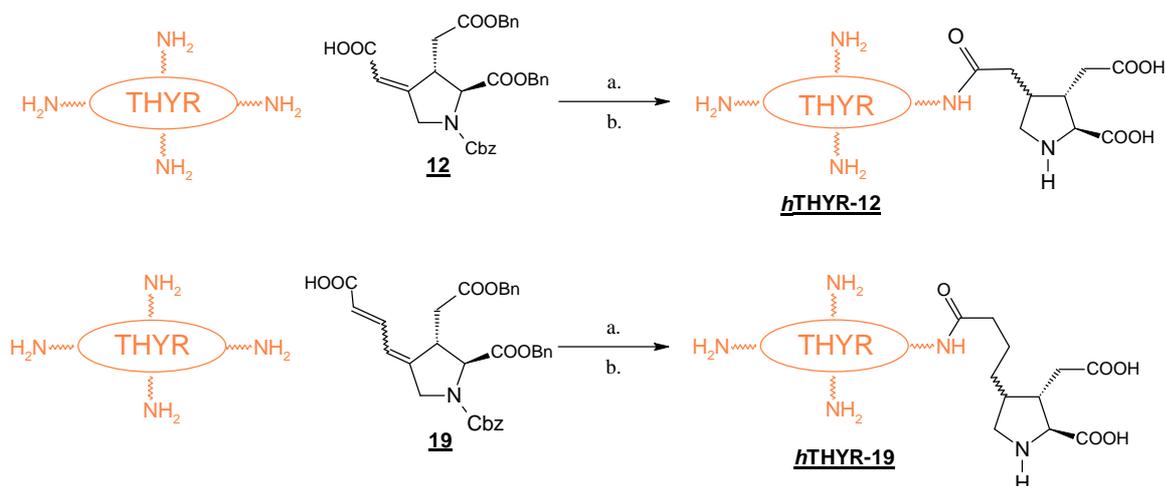


Figure 55 : Couplages à la THYR.

a.) EDC, NHS tampon borate borique (pH 8,7), DMF. b. H₂, Pd/C, MeOH/H₂O (1:1).

Après les étapes préalablement décrites de dialyse et de lyophilisation, les produits couplés subissent une étape d'hydrogénation dans les mêmes conditions que précédemment pour conduire aux conjugués **hTHYR-12** et **hTHYR-19** (Figure 55).

L'analyse de ces composés, avant ou après hydrogénation, n'a pas été possible. La masse de la protéine, trop élevée pour une analyse MALDI ne permet pas d'aboutir à des résultats fiables. Néanmoins, la méthode de couplage mise en jeu est la même que celle utilisée pour les bioconjugués à BSA dont l'efficacité a été clairement établie.

3.5.2.2 Couplage de l'acide domoïque

L'acide domoïque (AD) étant l'élément principal de la famille des ASP, il nous a semblé important de pouvoir tester les anticorps contre cette molécule cible. Comme dans le cas des haptènes, la mise au point du test ELISA nécessite de coupler l'AD à la THYR.

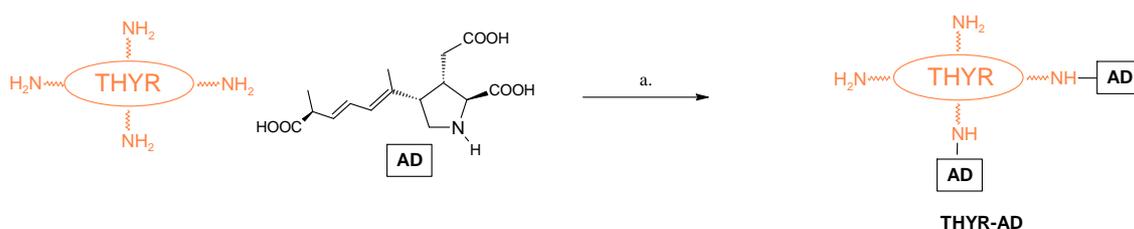


Figure 56 : Couplage THYR-AD.

a.) EDC, NHS, tampon borate borique (pH 8,7), DMSO.

L'acide domoïque se présentant sous forme de solution aqueuse, le protocole de couplage a dû être adapté. En effet l'EDC et le NHS conduisent à un ester qui va réagir avec les fonctions amines libres de la protéine afin de former une liaison peptidique. Un facteur limitant de cette réaction est l'hydrolyse de l'ester. Lors des couplages précédents, l'ajout du NHS et de l'EDC a été réalisé dans le DMF, avec un temps de réaction d'une heure. Ici, l'acide domoïque mis en présence des deux réactifs, dans le DMSO, est ajouté rapidement à la thyroglobuline pour favoriser la formation du conjugué avant l'hydrolyse. Les étapes de dialyse et de lyophilisation sont ensuite nécessaires afin de disposer conjugué **THYR-AD** attendu.

3.5.3 Couplage AD-HRP

La peroxydase du raifort (Horse Radish Peroxidase) est une enzyme communément utilisée lors des tests ELISA. La HRP est une glycoprotéine, d'une masse moléculaire de 44,174 kDa présentant quatre résidus lysine. La procédure de couplage, décrite par Yu *et coll.*¹⁵⁴, a conduit au composé **AD-HRP** (Figure 57):

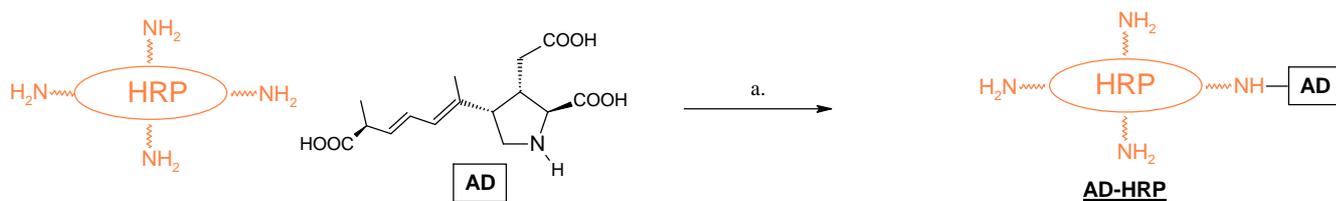


Figure 57 : Couplage de l'AD à l'enzyme HRP.

a.) EDC, NHS, tampon carbonate (pH= 9,6), DMSO.

Le conjugué **AD-HRP** obtenu va permettre de réaliser un test ELISA direct compétitif (Figure 14, section 2.1.3.1.3) et doser l'acide domoïque libre.

3.6 Conclusion

Afin d'obtenir des anticorps dirigés contre la partie commune des ASP, deux haptènes ont été synthétisés.

Ces composés présentent, sur le cycle pyrrolidinique, la stéréochimie C₂-C₃ *trans*, caractéristique de la famille des dérivés kaïnique. Ces haptènes possèdent un bras espaceur de longueur différente, terminé par une fonction acide carboxylique libre permettant le couplage avec une protéine (BSA ou THYR). Pour réaliser un couplage sélectif les fonctions acide et amine du cycle, ont été protégées. Après couplage et déprotection, les taux de greffage ont été évalués par MALDI¹³⁰. Tous les conjugués ont été envoyés pour la phase d'immunisation afin d'obtenir des sérums contenant les anticorps dirigés contre les épitopes communs à la famille des ASP.

Chapitre 4 : Immunologie

Ce chapitre est consacré aux travaux réalisés en collaboration avec le Laboratoire d'Immunologie et de Parasitologie de l'Université Bordeaux 2 (LIP, Daniel Moynet et Maria Mamani-Matsuda). Ces travaux ont pour objet la caractérisation des sérums obtenus après immunisation, avec les conjugués décrits au chapitre 3 afin de connaître l'efficacité et la spécificité de ces différents sérums et de mettre en place des dosages de toxines ASP par ELISA.

4.1 Immunisation

L'immunisation a été réalisée par une société extérieure : S.A. Protéogénix (Oberhausbergen, France). Au cours de cette étape, les animaux hôtes, lapins, subissent plusieurs injections (7 sous cutanées et 1 intradermique sur une période de 90 jours) à partir des conjugués synthétisés (hBSA-12 et hBSA-19). A l'issue de cette période, les sérums contenant les anticorps polyclonaux anti-ASP sont récupérés.

Etant donnée la variation inter-individuelle, deux lapins pour un même conjugué sont utilisés. Les sérums sont testés au fur et à mesure de l'étape d'immunisation de façon à vérifier le bon déroulement de celle-ci et d'avoir un premier élément sur la qualité des sérums. Chaque bioconjugué étant utilisé en double (A et B) sur deux lapins (1 et 2), on obtient 8 sérums qui seront notés : Ser12A1, Ser12A2, Ser12B1, Ser12B2, Ser19A1, Ser19A2, Ser19B1, et Ser19B2.

4.2 Caractérisation des anticorps

Afin de mettre en place un dosage, plusieurs tests préliminaires sont nécessaires. Dans un premier temps il faut s'assurer que l'immunisation ait conduit à des anticorps spécifiques de l'haptène de départ.

4.2.1 Principe du test ELISA

Les tests ELISA sont réalisés sur des plaques de microtitration de 96 puits. Ces tests se font en plusieurs étapes. Dans le cas d'un test **ELISA indirect**, la procédure est la suivante :

1. **Le coating** : il s'agit de recouvrir le fond des puits avec un antigène. Ceci est possible grâce aux liaisons électrostatiques. Dans notre cas, il s'agit d'un

conjugué THYR-haptène ou de la toxine commerciale couplée à la THYR (**THYR-AD**).

2. **Le blocage** : il permet de recouvrir les sites de la plaque restés libres avec un bloqueur (tel que le SBBB) afin d'éviter les faux positifs.
3. **Lavage** : le premier lavage permet d'éliminer l'excès de bloqueur.
4. **L'introduction de l'anticorps primaire** : les sérums à doser sont introduits (2 ou 3 exemplaires) à des dilutions variables.
5. **Lavage** : cette seconde étape de lavage permet d'éliminer l'excès d'anticorps (non accrochés).
6. **L'introduction de l'anticorps secondaire (lié à l'enzyme HRP)** : les anticorps II, ou anticorps de détection couplés à une enzyme sont introduits et se fixent de façon spécifique sur les anticorps primaires.
7. **Lavage** : une nouvelle étape de lavage permet d'éliminer l'excès d'anticorps secondaires.
8. **La révélation** : elle est possible grâce à un réactif chromogène : la tétraméthylbenzidine (TMB) ou l'ortho phénylène diamine (OPD). L'enzyme liée sur l'anticorps secondaire, la peroxydase du raifort (HRP, Horse Radish Peroxidase), catalyse l'oxydation du substrat chromogène pour donner un composé coloré présentant un maximum d'absorbance à 450 nm (TMB) ou 490 nm (OPD).
9. **L'arrêt de la réaction** : après quelques minutes une solution d' H_2SO_4 2N est ajoutée.
10. **La lecture et l'acquisition** : la lecture se fait sur un lecteur automatique de plaque Multiskan EX (Thermo Scientific). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'enzymes présente et donc à la concentration d'anticorps recherchés (Figure 58).

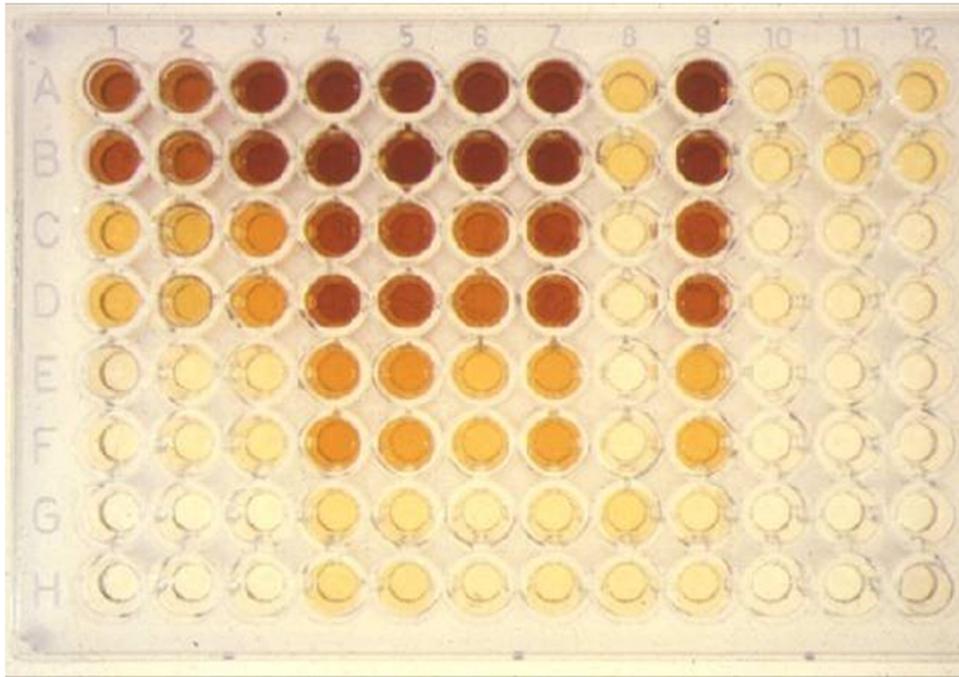


Figure 58 : Exemple d'une plaque de microtitration à 96 puits.

Remarque : Il est important de prendre en considération la stabilité de l'acide domoïque et des bioconjugués pour la réalisation des différents tests ELISA. En effet, les travaux de Quilliam¹⁵⁵ ont attiré l'attention sur les conditions de stockage des produits. D'après les résultats de cette étude, il est préférable de conserver les solutions d'acide domoïque à un pH proche de la neutralité (5-7), sous atmosphère inerte (argon ou azote) et à l'abri de la lumière. L'utilisation de congélateurs est à proscrire (-12°C). Il est préférable d'utiliser un réfrigérateur (+4°C) pour un stockage à court terme et de descendre à des températures de l'ordre de -80°C pour le long terme (au-delà de quelques mois).

4.2.2 Titrage des sérums

Ces premiers tests, réalisés par la société Protéogénix au cours de l'immunisation, ont permis de déterminer les **titres** des sérums (*cf* section 2.1.2.2). Ils correspondent à la dernière dilution à laquelle une densité optique est suffisamment importante par rapport à un test témoin appelé « blanc » qui utilise sur la même plaque, avec un coating BSA-Haptène et une solution de PBS ne contenant pas d'anticorps. Graphiquement, le titre est déterminé par le croisement du double de la valeur du blanc (droite) avec la courbe de la densité optique en fonction de la dilution (Figure 59).

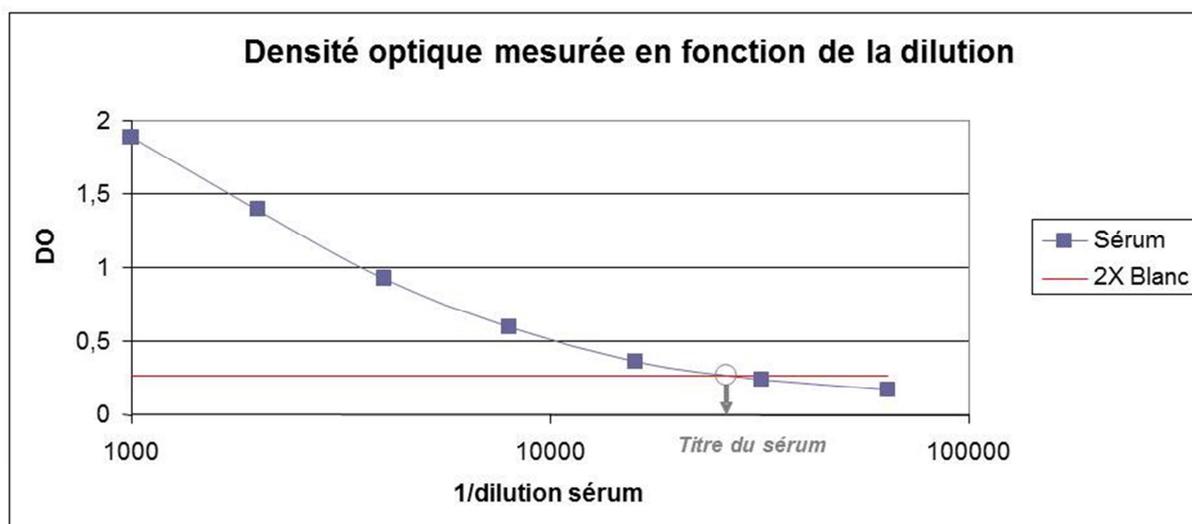


Figure 59 : Détermination graphique du titre d'un sérum.

Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 13. Chaque sérum est testé par rapport au bioconjugué à partir duquel il a été produit.

Bioconjugués		Sérums	Dilutions	Titres
hBSA12A	hBSA12A1	Ser12A1	1/16000	16000
	hBSA12A2	Ser12A2	1/30000	30000
hBSA12B	hBSA12B1	Ser12B1	1/65000	65000
	hBSA12B2	Ser12B2	1/65000	65000
hBSA19A	hBSA19A1	Ser19A1	1/300000	300000
	hBSA19A2	Ser19A2	1/450000	450000
hBSA19B	hBSA19B1	Ser19B1	1/6000	6000
	hBSA19B2	Ser19B2	1/15000	15000

Tableau 13 : Titres des sérums.

Les valeurs obtenues sont très variables et illustrent bien les problèmes liés à la variation inter-individuelle des animaux. Par exemple, avec une méthode d'immunisation identique, les dilutions vont du simple au double pour les **Ser12A1** et **12A2**, produits à partir du même bioconjugué **hBSA12A**.

D'autre part, les sérums **Ser12A1**, **Ser19B1** et **Ser19B2** ont tous un titre inférieur à 16000. Ceux-ci sont donc *a priori* de mauvais candidats pour être utilisés au cours des futurs dosages. Les autres sérums montrent des titres plus élevés avec un maximum pour **Ser19A2** (450000). Les sérums issus du conjugué **hBSA12B**, quant à eux, présentent un titre de 65000.

Le bioconjugué ***hBSA19B***, à l'origine des sérums ***Ser19B1*** et ***Ser19B2***, semble lui inefficace pour l'immunisation. Ces observations sont à corrélées à l'absence de signal en spectrométrie de masse MALDI.

4.3 Mise en place des dosages

Les tests décrits dans les sections suivantes ont pour but de mettre au point les conditions expérimentales optimales pour le dosage des ASP. Il s'agit d'expériences préliminaires pour déterminer les dilutions des sérums les plus adéquates afin de disposer d'un test ELISA fiable.

4.3.1 ELISA indirect (THYR-Haptène)

Les premiers tests effectués sur les sérums obtenus ont pour but de déterminer si ceux-ci reconnaissent l'haptène de façon spécifique, par rapport au reste de la protéine. Généralement, l'haptène est couplé à une protéine différente de celle utilisée pour l'immunisation afin de garantir une réponse du test spécifique de l'haptène et non de la protéine. Les couples immunisant/coating utilisés sont généralement HSA/OVA¹¹⁸, OVA/BSA¹⁵⁶, OVA/KLH¹⁵⁷, BSA/Polylysine ou KLH/Polylysine¹⁰⁶. Au Laboratoire, le couple couramment utilisé est BSA/THYR¹⁵⁸.

Ainsi, l'haptène utilisé lors de l'immunisation est couplé à la thyroglobuline pour l'étape de coating. Les sérums sont ensuite introduits dans les micropuits de la plaque de microtitration. La réponse en densité optique, mesurée à la fin du test, est proportionnelle à la quantité d'anticorps contenus dans le sérum, capables de se fixer au conjugué THYR-Haptène. Ces anticorps sont donc spécifiques de l'haptène synthétisé. Les absorbances mesurées sont celles des sérums avant et après immunisation (préimmuns et immuns). Les résultats sont regroupés sur les graphiques suivants (Figure 60), chaque courbe correspondant à un sérum. Ceci permet à la fois de vérifier si l'étape d'immunisation a été efficace (comparaison sérums préimmuns et immuns) et de voir quels sérums montrent la meilleure réactivité vis-à-vis du conjugué (valeur de l'absorbance).

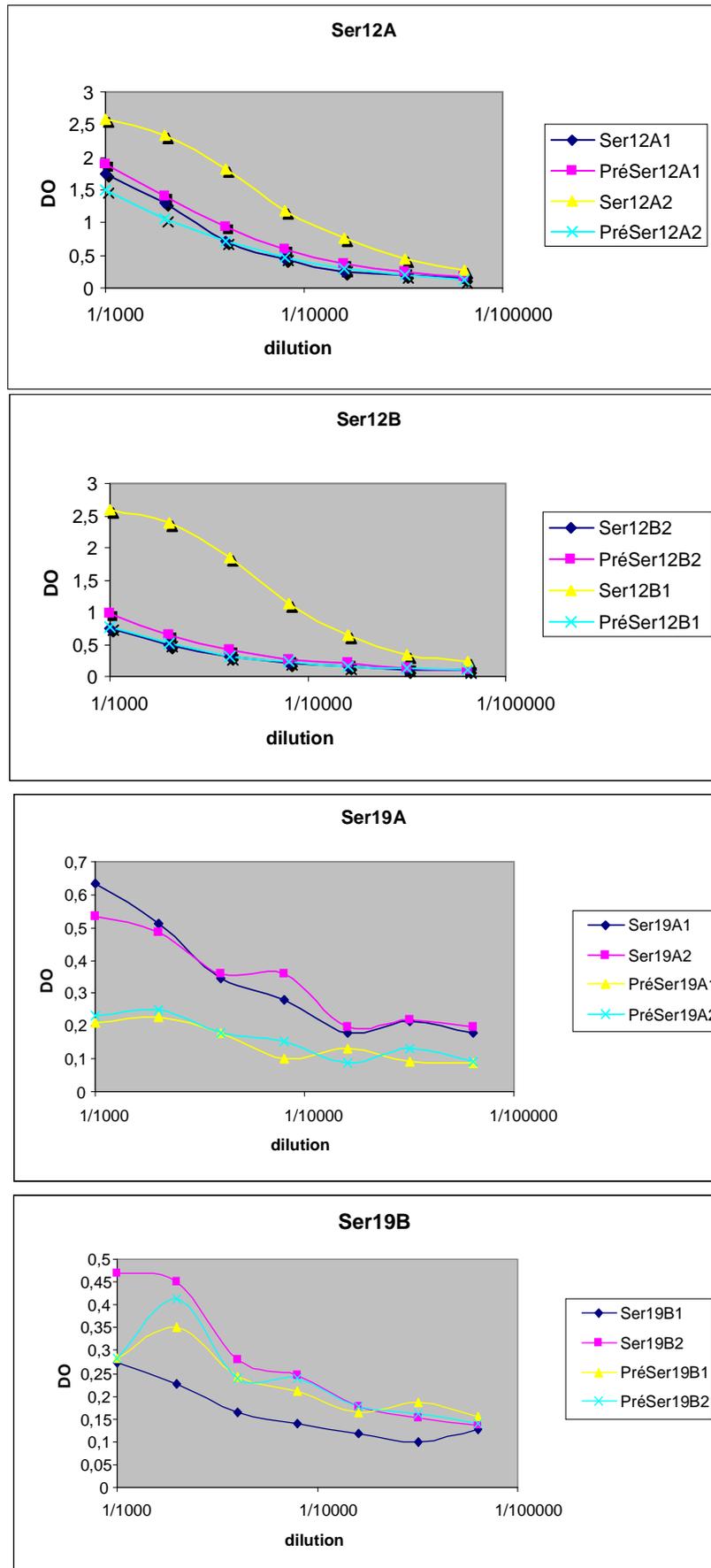


Figure 60 : Tests ELISA, coating THYR-haptène.

Les tests réalisés sur les sérums issus des conjugués **hBSA12** montrent que pour deux des quatre sérums, l'immunisation a conduit à des anticorps spécifiques de l'haptène synthétisé. En effet, pour les sérums **Ser12A2** et **Ser12B1**, la réponse après immunisation est bien supérieure à celle des préimmuns respectifs. Les sérums **Ser12A1** et **Ser12B2** quant à eux se comportent comme leur préimmun ce qui les rend non utilisables pour la suite.

Les sérums obtenus par immunisation à partir des bioconjugués **hBSA19** montrent des résultats différents. Les valeurs de densité optique observées pour ces sérums sont très inférieures à celles de la première série. Dans le cas de l'haptène **19**, seul le bioconjugué **hBSA19A** permet d'obtenir des anticorps (**Ser19A1** et **Ser19A2**) qui reconnaissent l'haptène. Quant au conjugué **hBSA19B**, aucun des deux sérums (**Ser19B1** et **Ser19B2**) ne montrent d'amélioration comparativement aux préimmuns et les valeurs observées confirment une anomalie déjà observée au cours de l'évaluation des titres.

Les résultats obtenus pour cette première série de tests sont regroupés dans le Tableau 14.

Bioconjugués	Sérums	Efficacité du sérum
<i>hBSA12A</i>	<u>Ser12A1</u>	-
	<u>Ser12A2</u>	+
<i>hBSA12B</i>	<u>Ser12B1</u>	+
	<u>Ser12B2</u>	-
<i>hBSA19A</i>	<u>Ser19A1</u>	+
	<u>Ser19A2</u>	+
<i>hBSA19B</i>	<u>Ser19B1</u>	-
	<u>Ser19B2</u>	-

Tableau 14 : Bilan de l'efficacité des sérums.

Les sérums utilisés pour la suite des tests sont ceux montrant une réponse satisfaisante avec les différents bioconjugués THYR-Haptène. Il s'agit des sérums **Ser12A2**, **Ser12B1**, **Ser19A1** et **Ser19A2**.

4.3.2 ELISA indirect (**THYR-AD**)

Afin de vérifier la spécificité des anticorps vis-à-vis de l'acide domoïque, élément principal des toxines de la famille des ASP, un autre test ELISA a été réalisé. L'étape de coating est

effectuée en utilisant le couple **THYR-AD**, les sérums sont introduits à différentes dilutions dans les micropuits et la densité optique est mesurée (Figure 61).

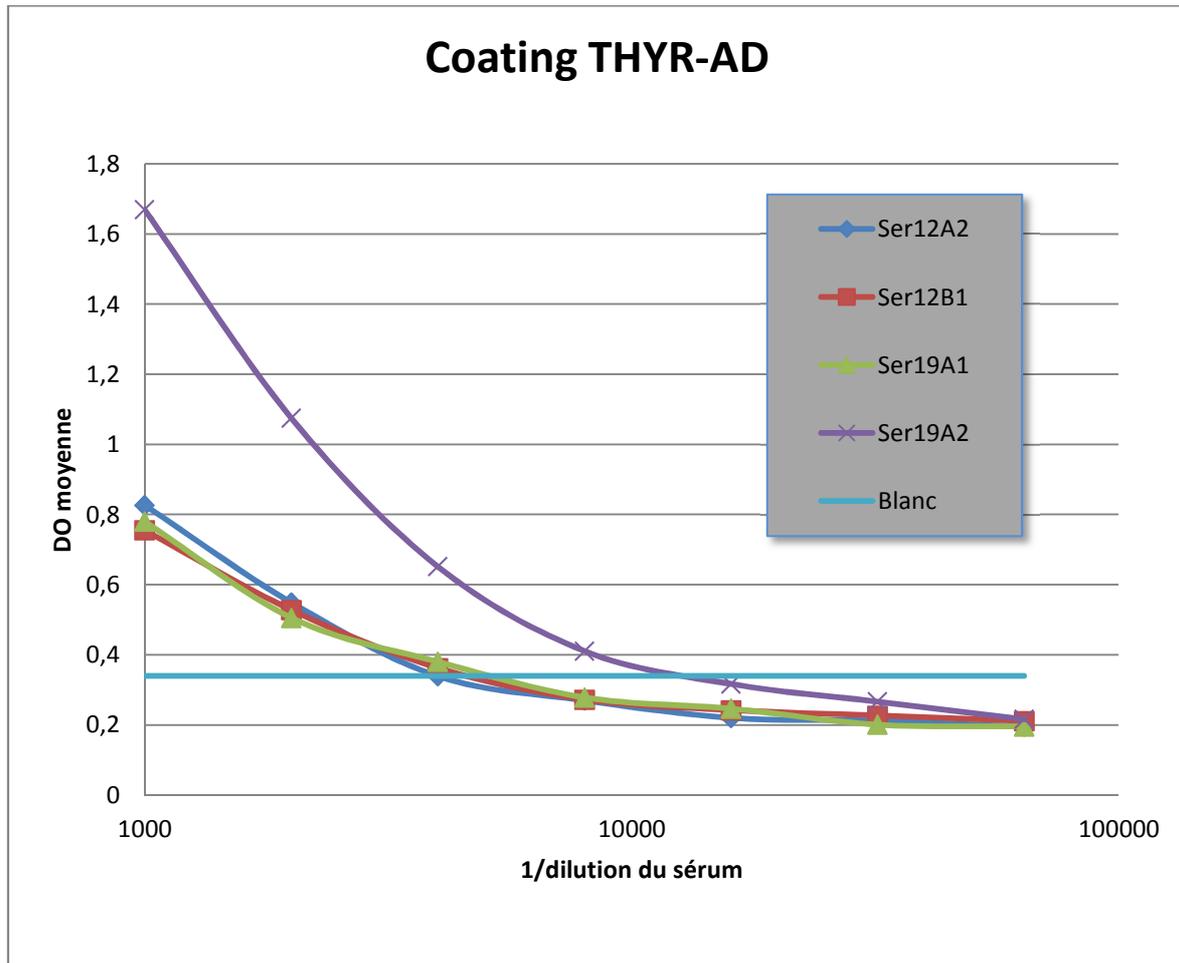


Figure 61 : Tests ELISA, coating **THYR-AD**.

La lecture de la Figure 61 apporte plusieurs indications.

Cette expérience démontre que l'acide domoïque couplé à la THYR est reconnu par tous les sérums. Ce graphique permet aussi de déterminer les conditions optimales de dilution du sérum qui devront être utilisées pour disposer d'un test de dosage fiable. Cette valeur se situe au-dessus de l'intersection de la DO pour le blanc (x2) et des courbes de DO pour les sérums. La valeur retenue pour l'ensemble des sérums est 1/5000.

Une anomalie est enfin observée avec le sérum **SerA192** qui montre une réponse beaucoup plus importante que celles observées pour les autres sérums. Afin de comprendre ce comportement particulier, un autre test a été envisagé. Dans celui-ci, le coating a été effectué avec la THYR seule (Figure 62).

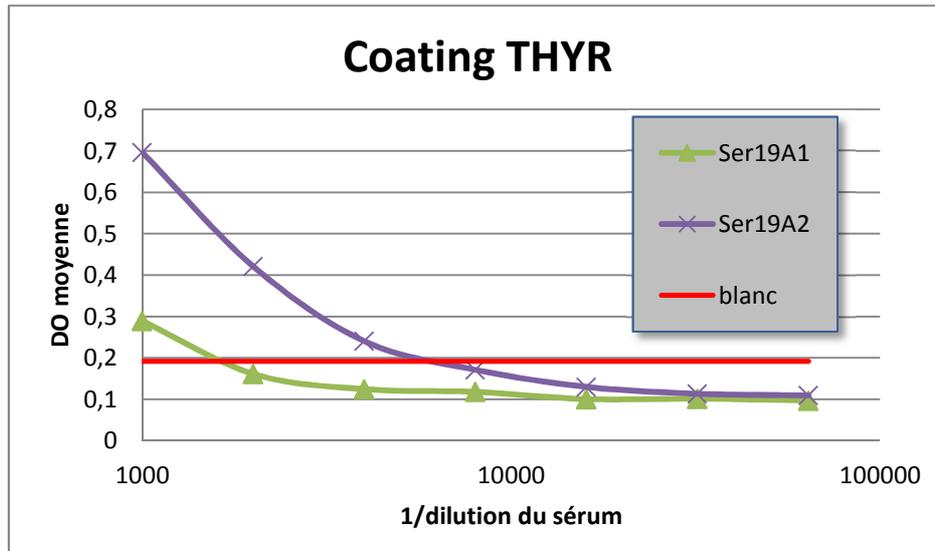


Figure 62 : Test ELISA, coating THYR.

Sur cette courbe, le sérum **Ser19A2** montre de nouveau une densité optique plus importante que pour les autres sérums. Ceci révèle la présence, dans le sérum, d'anticorps dirigés contre la thyroglobuline. Cette hypothèse a été confirmée grâce à une expérience supplémentaire qui utilise la thyroglobuline en préincubation de façon à épuiser les sérums **Ser19A1** et **Ser19A2** en anticorps anti-THYR. Les résultats montrent qu'après cette étape de déplétion des anticorps anti-THYR, la densité optique observée pour le sérum **Ser19A2** revient à une valeur proche de celles observées pour le sérum **Ser19A1**. De plus, la densité optique observée pour ce sérum reste inchangée, avant et après déplétion.

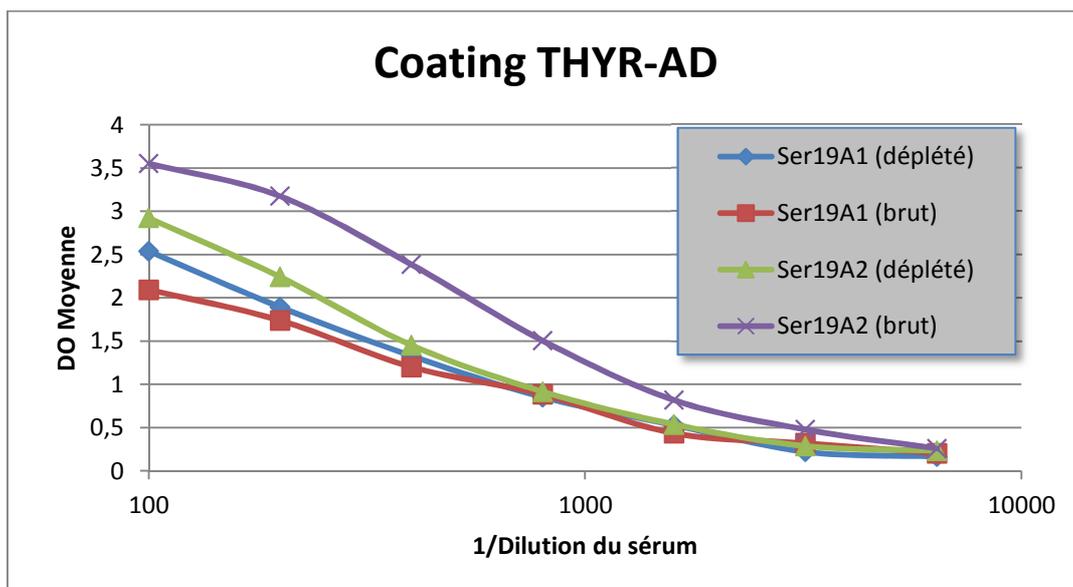


Figure 63 : Déplétion des sérums **Ser19A1** et **Ser19A2**.

En résumé, ces expériences mettent en évidence les points importants suivants:

- La comparaison des sérums **Ser12** et **Ser19** ne montre pas de différence notable de comportement due aux différentes longueurs des bras espaceurs des haptènes respectifs.
- L'anomalie observée pour le sérum **Ser19A2** est attribuée à la présence dans celui-ci d'anticorps non spécifiques dirigés contre la thyroglobuline.
- Ces expériences valident la stratégie mise en place dans cette Thèse puisque les haptènes synthétisés permettent de conduire à des anticorps reconnaissant le bioconjugué **THYR-AD** et par conséquent l'acide domoïque.

4.3.3 ELISA direct (**AD-HRP**)

Afin d'améliorer éventuellement la sensibilité des dosages, un autre type de test ELISA (ELISA direct) a été envisagé. La stratégie est légèrement différente : au cours de l'étape de coating, des anticorps, et non plus l'antigène sont déposés au fond des puits de titration. L'acide domoïque couplé à la peroxydase (**AD-HRP**) se lie aux anticorps spécifiques du sérum puis la révélation permet de voir l'intensité de la réaction enzymatique et donc la quantité d'acide domoïque immobilisée par les sérums.

Une première expérience est réalisée, à des concentrations variables du conjugué **AD-HRP**, afin de définir la concentration optimale de ce conjugué (Figure 64) pour la mise en place des tests. La dilution utilisée pour les anticorps du sérum **Ser19A2** est de 1/5000.

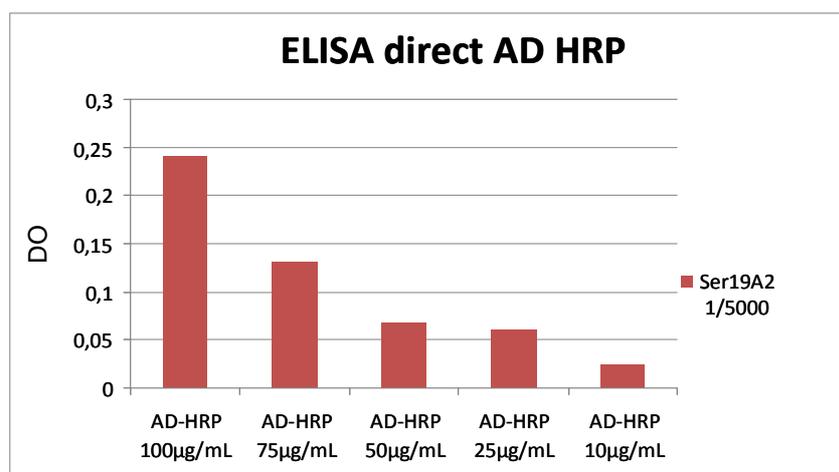


Figure 64 : ELISA direct à différentes concentrations de conjugué **AD-HRP**.

La DO observée entre $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ chute de façon très importante. Entre 100 et $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, la DO est divisée par cinq. Afin d'obtenir une réponse exploitable, il sera nécessaire d'utiliser une concentration minimale d'AD-HRP : $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$

Une deuxième expérience a pour but de définir la concentration idéale du sérum pour les futurs tests. Dans celle-ci, les anticorps sont utilisés à différentes concentrations et on observe la chute de DO en pourcentage de la réponse maximale.

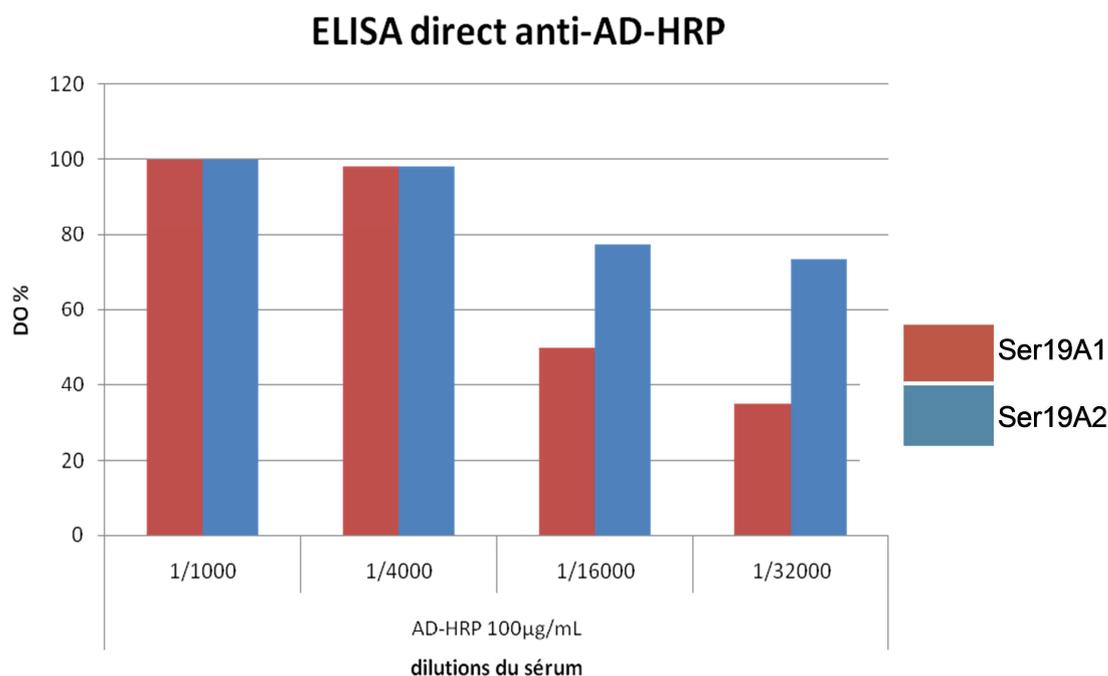


Figure 65 : ELISA direct anti AD-HRP.

La Figure 65 montre que plus le sérum est dilué, plus la DO est faible. Les deux sérums ne se comportent pas de la même façon au-delà d'une dilution de 1/4000. En effet, à une dilution de 1/32000, Ser19A2 donne un signal supérieur à 60% alors que Ser19A1 n'atteint pas les 40%. La réponse est donc fortement diminuée au-delà d'une dilution de 1/4000. Ce facteur de dilution servira donc de référence pour la suite des essais.

Les différents tests effectués permettent de définir des conditions de dilution de sérum et de concentration d'AD-HRP, adéquates pour la mise en place des tests de dosage par ELISA direct compétitif. La concentration en conjugué AD-HRP utilisée sera de l'ordre de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et la dilution de sérum de 1/5000.

4.3.4 ELISA compétitifs direct et indirect

A partir des résultats obtenus dans les paragraphes précédents, nous avons tenté de mettre en place un test ELISA compétitif direct afin de pouvoir doser la quantité de toxines présente dans des échantillons en utilisant la compétition entre l'AD et le conjugué **AD-HRP**.

Le but est d'obtenir une inhibition en fonction de la concentration d'AD utilisée de façon à établir une gamme permettant ensuite le dosage de concentrations inconnues.

L'expérience a été menée avec les sérums **Ser19A1** et **Ser19A2** à la dilution établie précédemment (1/5000). Ceux-ci sont accrochés au fond des puits; l'ajout du bloqueur permet d'éviter les accrochages non spécifiques. Différentes concentrations d'AD sont ensuite utilisées en compétition avec une quantité fixe d'**AD-HRP** ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Les résultats obtenus après révélation sont regroupés sur la (Figure 66).

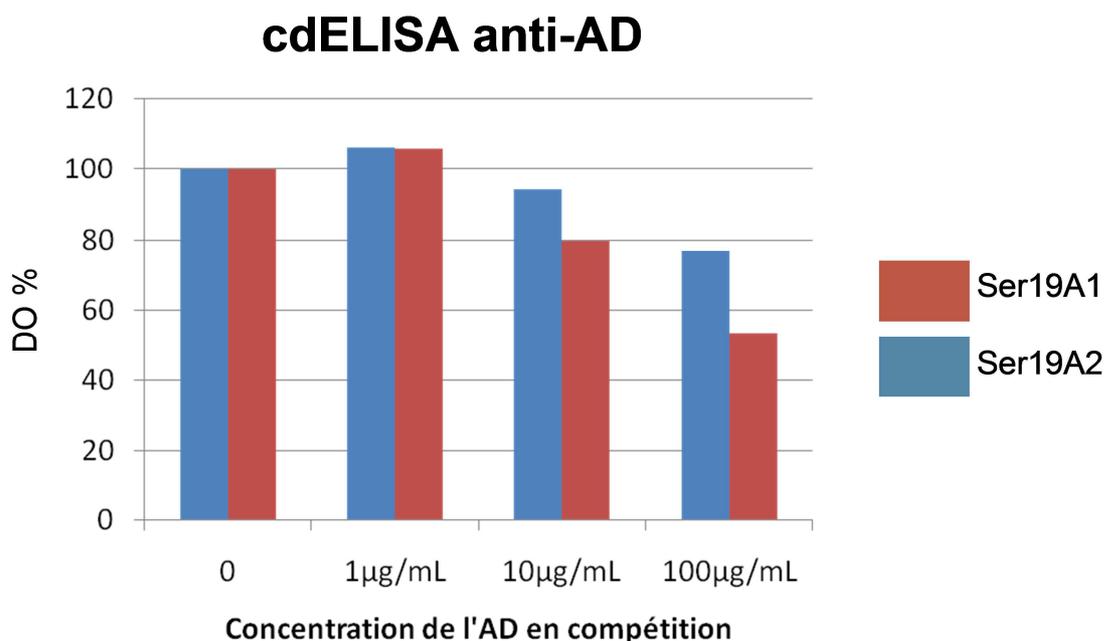


Figure 66 : ELISA direct compétitif, dosage de l'AD.

On observe des valeurs d'inhibition de 5 et 20 % (respectivement pour **Ser19A1** et **Ser19A2**) avec une concentration d'AD de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ puis 12 et 50% à la concentration $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. L'inhibition est relativement faible comparée à la quantité d'AD utilisée pour l'incubation. Les tests en compétition effectués ne permettent pas d'obtenir une relation exploitable entre la concentration d'AD introduite et l'inhibition de signal.

Une deuxième expérience utilise un test ELISA compétitif indirect (ciELISA). Dans celui-ci, le coating utilisé est le conjugué **THYR-AD**. Le sérum **Ser12A2**, à différentes dilutions, est préincubé en présence d'acide kaïnique (200 µg). En parallèle, cette expérience est effectuée sans préincubation avec l'acide kaïnique. Enfin, les deux expériences sont réalisées avec le sérum préimmun.

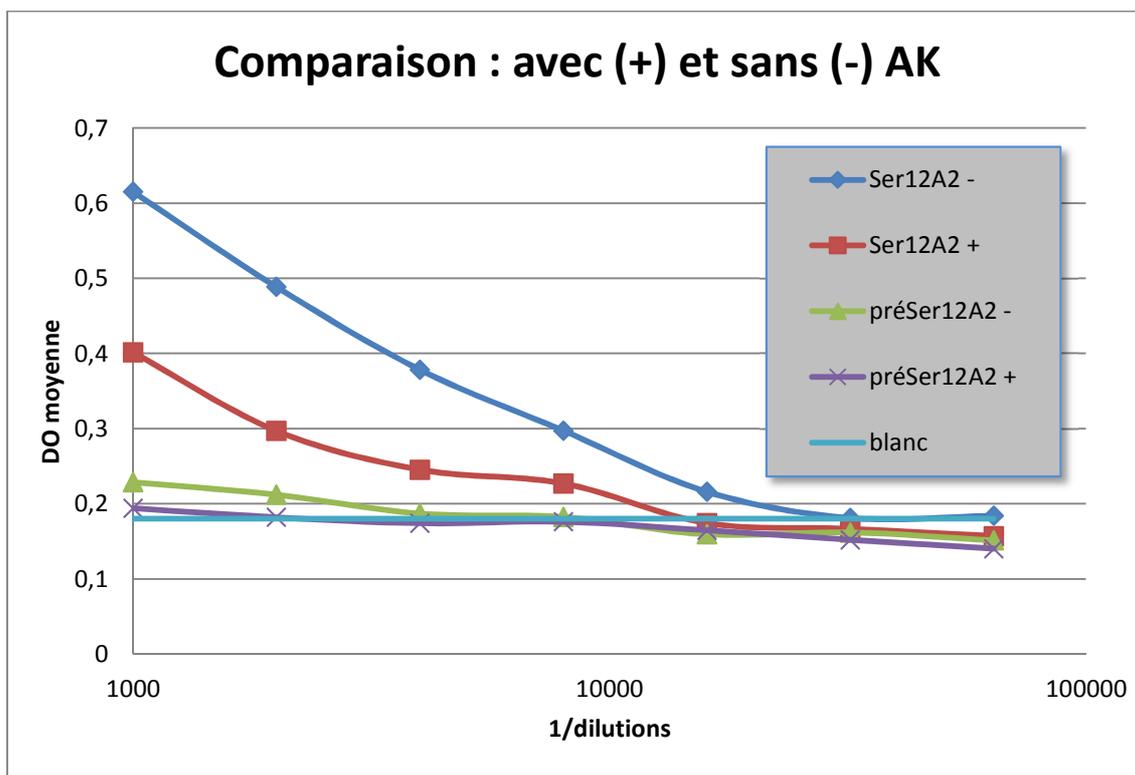


Figure 67 : Test ELISA avec préincubation des sérums en présence d'acide kaïnique.

La figure ci-dessus montre une inhibition du sérum par l'acide kaïnique. En effet, on observe une baisse significative de signal pour les sérums préincubés. Les préimmuns ne montrent pas de modification de signal et peuvent donc être utilisés comme contrôle.

Ainsi, les anticorps du **Ser12A** reconnaissent l'acide kaïnique qui présente la même partie commune que l'acide domoïque.

Cette inhibition permet donc de vérifier la spécificité des anticorps vis-à-vis du cycle pyrrolidinique commun aux toxines ASP.

4.4 Conclusion

Même si des investigations supplémentaires pour la mise au point d'un test ELISA fiable pour le dosage de phycotoxines sont nécessaires, la stratégie retenue pour la synthèse des haptènes

semble concluante. En effet, nous avons montré que les sérums testés étaient capables de reconnaître l'acide domoïque alors qu'un haptène a servi à l'immunisation et non la molécule commerciale. Les résultats obtenus lors du test ELISA compétitif avec l'acide kaïnique permettent d'affirmer que les anticorps reconnaissent la partie commune des ASP, ce qui était le but recherché. La comparaison des différents sérums n'a, par ailleurs pas permis d'établir un lien entre la longueur du bras espaceur et l'efficacité des sérums.

Dans la section suivante, les sérums sont utilisés de façon à mettre au point un immunocapteur capable de détecter la présence de phycotoxines.

Chapitre 5 : Immunocapteur

La mise au point de la plate-forme de lecture, ainsi que du dispositif microfluidique ont été effectués par Fabien Fournel, dans le cadre de sa Thèse au Laboratoire de l'Intégration du Matériau Système (Corinne Dejous et D. Rebière, IMS, Université Bordeaux 1).

5.1 Description du dispositif

Le capteur est constitué d'une plateforme à ondes acoustiques de Love (Figure 68). Le principe d'un tel capteur est d'utiliser la perturbation de la propagation de l'onde émise en surface (SAW). L'onde générée est confinée dans une couche guidante composée de silice. Elle se déplace le long d'une ligne à retard grâce à deux transducteurs interdigités (IDTs) permettant, d'une part, de générer une onde en appliquant une tension à la surface du matériau piézoélectrique (quartz) et d'autre part de mesurer l'onde en sortie.

Le retard de l'onde est proportionnelle à la masse appliquée à la surface du capteur ($\Delta F \sim \Delta m$). L'enregistrement de l'onde en sortie permet d'obtenir une lecture de la modification de la masse en utilisant la variation de fréquence de l'onde (ΔF).

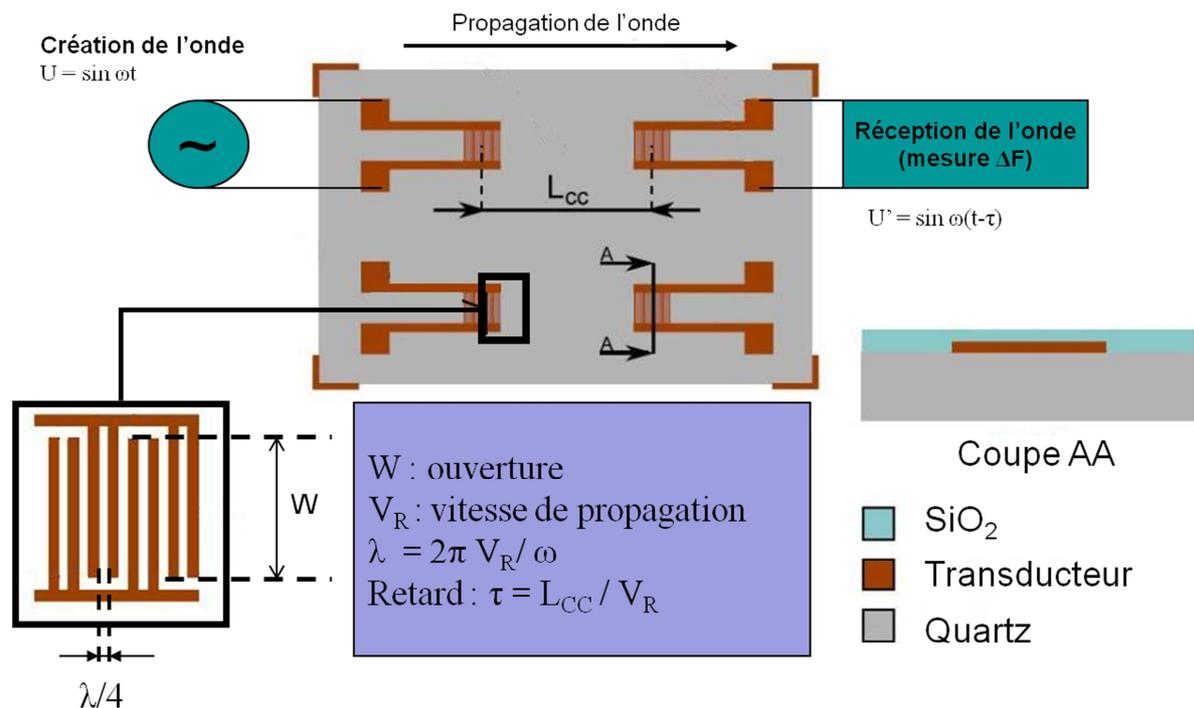


Figure 68 : Transducteur acoustique.

Lorsqu'une masse est immobilisée à la surface du capteur, la variation de fréquence de l'onde en sortie est proportionnelle à la quantité de masse ($\Delta F \sim \Delta m$).

Afin de pouvoir accrocher les anticorps sur la couche guide d'onde, il est nécessaire de la modifier chimiquement. Une monocouche auto-assemblée (Self Assembled Monolayer, SAM) composée de (3-glycidoxypropyl)-triméthoxysilane (GPTS) assure la liaison entre les silanols de surface et les chaînes lourdes des anticorps⁹⁹. Une puce microfluidique a été développée par Fabien Fournel (IMS) de façon à améliorer le dispositif. Celle-ci, positionnée au-dessus de la couche guidante, et à l'intérieur de la cellule de test, permettra de faire passer les liquides sur la surface sensible de l'immunocapteur durant les expériences (Figure 69)¹⁵⁹.

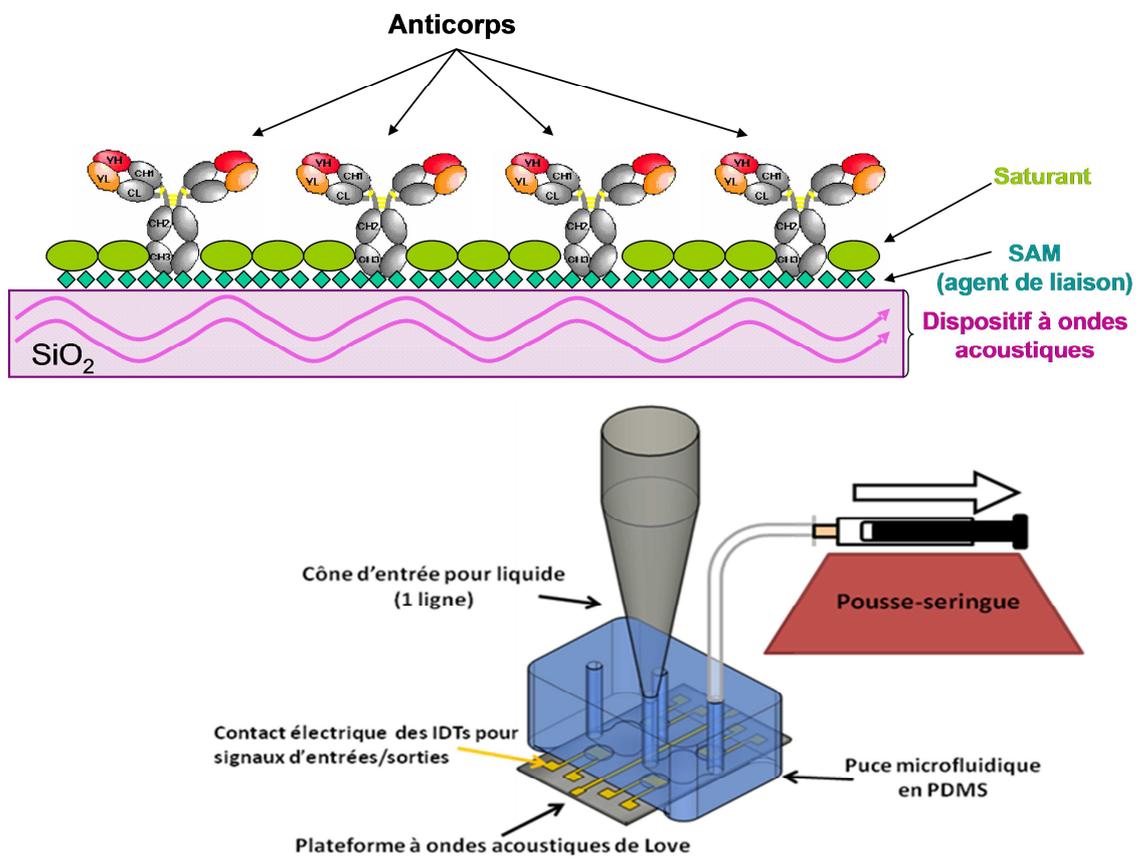


Figure 69 : Représentation simplifiée du dispositif utilisé.

La fréquence de l'onde générée est mesurée en temps réel. Toute modification de masse à la surface de la couche sensible va entraîner une variation de fréquence ($\Delta F \sim \Delta m$)¹⁶⁰. Les expériences suivantes s'appuient sur les travaux de Fabien Fournel sur la détection de l'acide okadaïque. Dans ceux-ci, les résultats obtenus à partir du même dispositif mais en utilisant des anticorps commerciaux ont permis d'aboutir à la détection de l'acide okadaïque de façon satisfaisante¹⁶¹.

5.2 Résultats / Discussion

5.2.1 Expérience préliminaire

Pour cette expérience, 8 µg d'anticorps (**Ser12A2** ou **Ser12B1**) en solution dans le TBS (60 µL) ont été utilisés. Le bloqueur est ensuite ajouté (20 µL) et enfin l'AD (200 ng en solution dans 60 µL de TBS).

Lors du passage de la toxine, aucune chute en fréquence n'a été observée. Les tests ELISA ayant montré l'efficacité des anticorps obtenus pour la reconnaissance de l'AD, nous avons supposé que la sensibilité du capteur ne permettait pas, dans le cas de petites molécules comme les ASP, de mesurer une chute en fréquence significative.

En utilisant des anticorps commerciaux marqués (GAM-PO), il a été possible d'estimer à 14 ng ($m_{déposée}$) la masse d'anticorps accrochés à la surface du capteur. Cette masse correspond à un taux de couverture de 10% de la surface totale. Le poids moyen d'un anticorps (IgG) est de 140 kDa (M_{IgG}), on peut donc en déduire la masse d'une IgG (m_{IgG}) en utilisant le nombre d'Avogadro ($N_A = 6,022 \times 10^{23}$) :

$$m_{IgG} = \frac{M_{IgG}}{N_A} = 2,32 \times 10^{-19} \text{ g}$$

Le nombre de sites libres (paratopes) à la surface du capteur (2 par anticorps) est alors obtenu grâce à la relation suivante :

$$N_{sites} = \frac{m_{déposée}}{m_{IgG}} \times 2 = \frac{14 \times 10^{-9}}{2,32 \times 10^{-19}} \times 2 = 1,2 \times 10^{11}$$

Etant donnée la masse molaire de l'acide domoïque ($M_{AD} = 311 \text{ g.mol}^{-1}$), la masse maximale ($m_{saturation(AD)}$) de toxine qui peut être immobilisée par les anticorps, sur la surface du capteur, est de :

$$m_{saturation(AD)} = N_{sites} \times \frac{M_{AD}}{N_A} = 1,2 \times 10^{11} \times \frac{311}{6,022 \times 10^{23}} = 6,2 \times 10^{-11} \text{ g soit } \mathbf{62 \text{ pg}}$$

Ce faible poids pourrait expliquer l'absence de variations de fréquence après passage de l'acide domoïque.

A partir de ce constat, une autre stratégie a donc été mise en place.

5.2.2 Expérience de reconnaissance du motif AD

Afin de vérifier l'hypothèse du manque de sensibilité du capteur avec des composés à faibles poids moléculaires, nous avons utilisé les conjugués **THYR-AD** (chap. 4 ; masse = 670 kDa). Ceci conduit à multiplier par 2000 environ la masse capturée par les anticorps. Les anticorps **Ser12A2** ou **Ser12B1** sont déposés sur les deux lignes du capteur puis mis en contact avec la THYR sur une ligne et le conjugué **THYR-AD** sur l'autre.

La Figure 70 montre les chutes en fréquence (ΔF) observées après passage de la THYR (2 μg) ou du conjugué **THYR-AD** (2 μg) sur les anticorps présents à la surface du capteur sur chacune des lignes (ici **Ser12A2**).

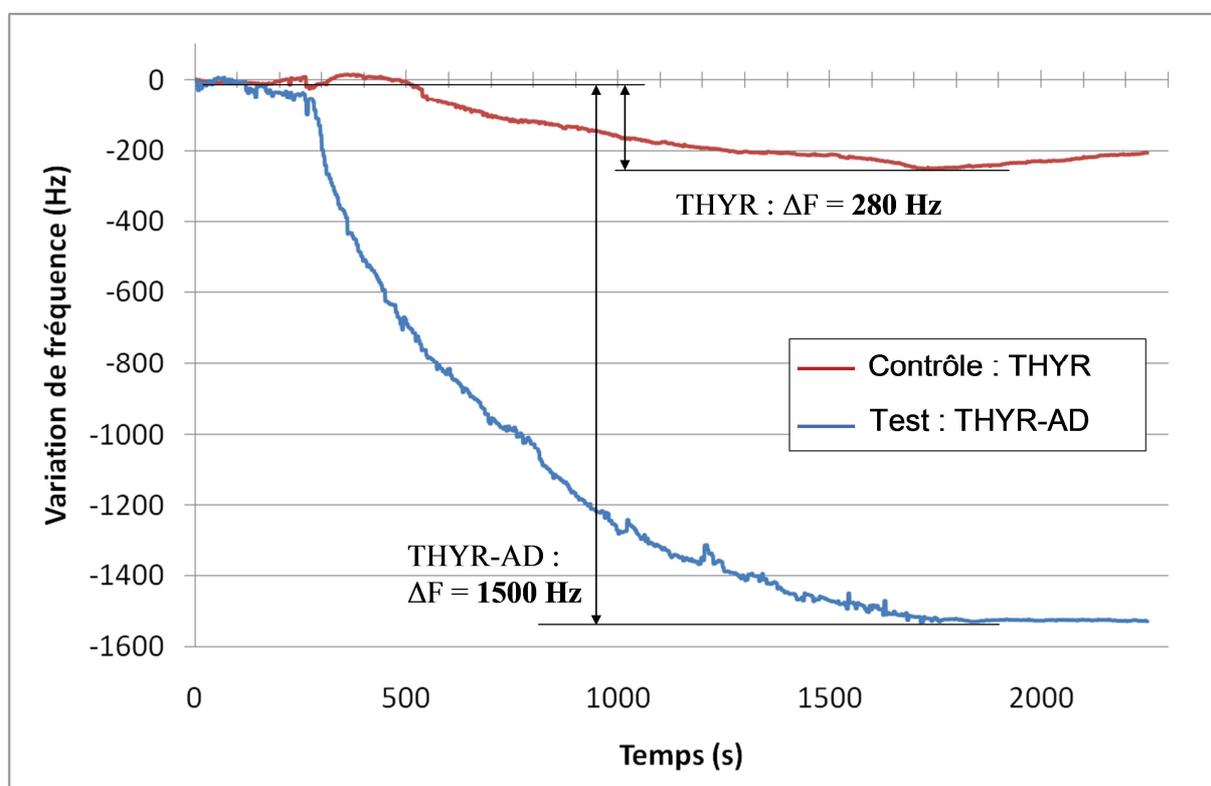


Figure 70 : Comparaison de la réponse du capteur au passage de la THYR et de la **THYR-AD**.

La chute en fréquence est bien plus intense sur la ligne lors du passage du conjugué **THYR-AD** que lors du passage de la protéine seule. Avec une variation maximale de l'ordre de 300 Hz, la quantité de thyroglobuline accrochée à la surface du capteur est donc négligeable en comparaison de la chute de plus de 1500 Hz après passage de la **THYR-AD**.

Cela indique que l'épitope acide domoïque est un élément de reconnaissance bien plus important pour les anticorps que ne l'est la protéine THYR seule ce qui confirme, de manière indépendante (par un autre système de lecture), les tests ELISA présentés au chapitre 4.

Ces résultats démontrent aussi clairement que si ces anticorps reconnaissent bien l'AD, pour l'obtention d'un signal mesurable, il est impératif "d'alourdir" celle-ci en la couplant préalablement à une molécule de haut poids moléculaire. En effet, il faut que la quantité de masse immobilisée sur la surface du capteur soit suffisamment importante pour se traduire par une chute en fréquence ΔF significativement mesurable.

Toutefois, si nous avons montré la faisabilité d'un dosage de l'AD avec la plateforme acoustique, ces essais ne sont pas totalement satisfaisants car ils montrent, si on veut faire un dosage de l'AD libre dans des échantillons de coquillages, qu'il est impératif de coupler l'AD à une protéine de haut poids moléculaire (670 kDa). Cette étape supplémentaire empêche toute utilisation de l'immunocapteur sur le terrain, dans des conditions simples de mise en oeuvre. Nous avons donc envisagé une autre approche, un test en compétition, permettant de doser l'AD libre dans un échantillon.

5.2.3 Mise en place du dosage

Il s'agit ici de comparer les deux lignes du capteur :

- la première utilisant des anticorps préincubés avec l'AD libre (*test*), afin de rendre leurs paratopes inaccessibles.
- la seconde recouverte d'anticorps, sans préincubation (*contrôle*)

Le but est donc d'obtenir, par passage de **THYR-AD** de concentration connue, une réponse significativement différente entre la ligne *test* et la ligne *contrôle*.

5.2.3.1 Expérience

Il s'agit, ici, d'anticorps issus du sérum **Ser12B1** sous forme de solution dans le TBS (8 μg dans 60 μL) préincubés en présence de 200 ng d'acide domoïque. Un agent saturant (le SBBB, 20 μL) est ensuite déposé à la surface du capteur de façon à éviter tout accrochage non spécifique. Enfin, le conjugué **THYR-AD** sous forme de solution dans le TBS (20 μL ; 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) est déposé à la surface du capteur sur les deux lignes.

5.2.3.2 Résultats

La Figure 71 montre les enregistrements pour les deux lignes d'un même capteur, utilisées en parallèle. Les profils des graphes sont relativement comparables.

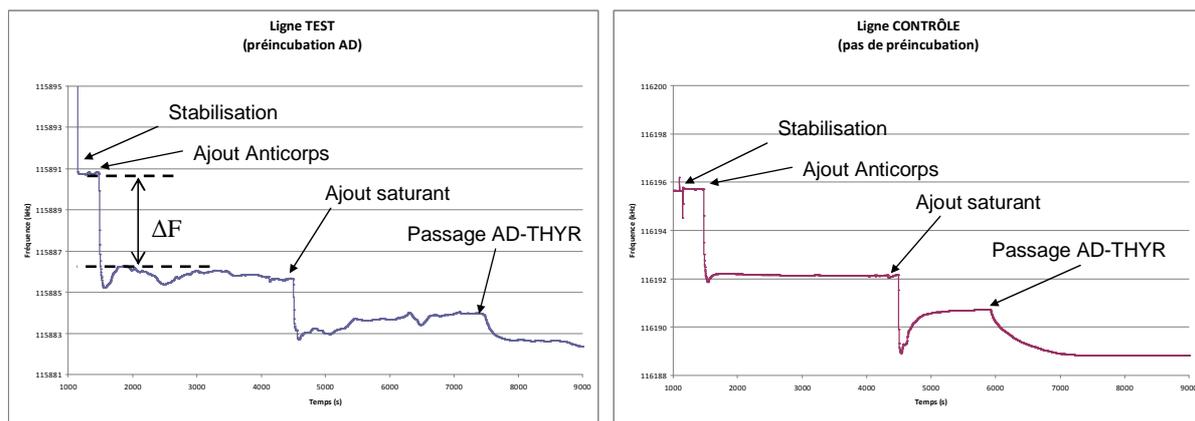


Figure 71 : Enregistrement des fréquences des lignes TEST et CONTROLE en fonction du temps.

Une première chute en fréquence correspondant à l'accrochage des anticorps à la surface du capteur. Puis une légère remontée laisse penser que le lavage, passage de TBS entre la fin de l'ajout d'anticorps et l'ajout de SBBB, permet d'évacuer les anticorps non accrochés. L'ajout d'une couche de saturant a pour effet une deuxième chute en fréquence suivie elle aussi d'une remontée (lavage du SBBB en excès). Une dernière chute de fréquence est observable après ajout du conjugué **THYR-AD**.

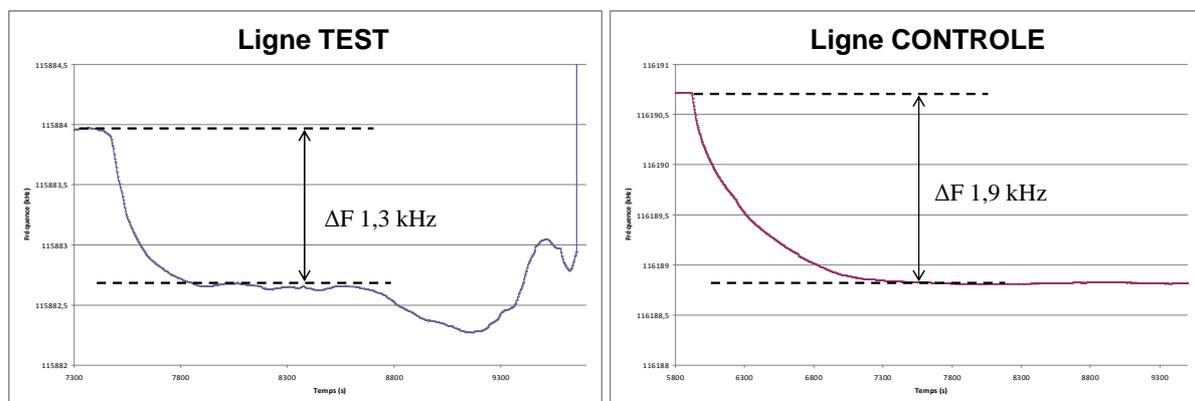


Figure 72 : Détails de l'acquisition au passage du conjugué **THYR-AD**.

Les valeurs observées sont données dans le (Tableau 15).

Les chutes en fréquence, au passage de l'anticorps, sont différentes sur les deux lignes: 4,4 et 3,5 kHz. De même, au passage du SBBB, on observe 1,9 et 1,5 kHz. Cependant les rapports Acs/SBBB, sur les deux lignes, sont comparables, 2,31 et 2,33. Ceci correspond à des taux de couverture du capteur par les anticorps de 70% environ dans les deux cas.

Les deux lignes n'ayant pas la même sensibilité, pour comparer les réponses sur la ligne test et contrôle, il est nécessaire de corriger les valeurs (Tableau 15).

	Lignes		
	Contrôle (ΔF en kHz)	Test (ΔF en kHz)	Test "corrigée" (ΔF en kHz)
<i>Passage Acs</i>	3,5	4,4	3,5
<i>Passage SBBB</i>	1,5	1,9	1,48
<i>Passage <u>THYR-AD</u></i>	1,9	1,3	1,04
Taux de couverture	70%	69%	69%

Tableau 15 : Variation de fréquence au passage des différents composés.

Lors du passage du conjugué THYR-AD, pour une préincubation avec 200 ng d'AD, on observe une différence de chute en fréquence de 860 Hz entre la ligne Contrôle et la ligne Test "corrigée". Par contre, avec une quantité inférieure d'AD libre (20 ng), aucune différence notable n'a été observée.

Le seuil légal de toxines dans les coquillages est de 20 μg par gramme de chair. Or, une réponse significative du capteur est observable avec 200 ng d'AD lors de la préincubation, soit une sensibilité 100 fois inférieure au seuil légal. En se basant sur ces résultats, il devient possible de déterminer, avec seulement 10 mg de chair de coquillages, si ces derniers sont propres ou impropres à la consommation.

5.3 Conclusion

Les résultats obtenus sont encourageants. Si l'acide domoïque ne peut être détectée de façon directe à cause de la sensibilité du capteur, l'alternative utilisant le bioconjugué THYR-AD semble efficace. Néanmoins de nouvelles expériences sont nécessaires afin de confirmer ces premiers résultats.

A terme il est possible d'envisager la mise en place d'une expérience de routine basée sur une réponse de forme OUI/NON du capteur en n'utilisant que quelques milligrammes de chair de coquillage. En cela, ces différentes études sont une réussite en terme de pluridisciplinarité car elles valident, utilisent et complètent les différents travaux réalisés en amont.

Conclusion générale

Au sein du projet ASCOBAR, soutenu par le Conseil Régional d'Aquitaine, nos travaux de thèse ont eu pour but de développer un nouvel outil d'analyse, un immunocapteur, dédié à la détection rapide des phycotoxines.

Afin de proposer un immunocapteur, basé sur une plate-forme à ondes acoustiques, un travail important de chimie de synthèse a été mené pour conduire à des haptènes analogues des phycotoxines choisies (ASP). Cette famille présentant une partie commune, il a été envisagé de produire des anticorps dirigés contre celle-ci, en ciblant le cycle pyrrolidinique, commun à tous ces composés.

Nous avons synthétisé un intermédiaire clé, à la stéréochimie C₂-C₃ *trans* caractéristique de la famille des dérivés kaïnique et présentant une fonction cétone sur la position 4- du cycle. Par réaction de Wadsworth Emmons Horner (WEH), deux bras espaceur, terminés par une fonction acide carboxylique, ont été introduits, ce qui nous a permis d'obtenir deux haptènes différents. Le couplage sélectif de ces haptènes, par formation d'une liaison peptidique, à une protéine, (BSA ou THYR) a été rendu possible par la protection des fonctions (NH et COOH) du cycle pyrrolidinique. L'hydrogénation des conjugués a permis de libérer les fonctions reconnaissables de la partie commune sans dénaturer la protéine.

Une fois les taux de couplage estimés par spectrométrie de masse (MALDI), les conjugués ont tous été utilisés pour l'étape d'immunisation afin d'obtenir des anticorps dirigés contre les toxines ASP.

Les tests ELISA ont montré que la stratégie mise en place pour la synthèse des haptènes semblait concluante. En effet, les sérums produits ont été capables de reconnaître l'acide domoïque, ainsi que l'acide kaïnique. Il est donc possible d'envisager la détection de la totalité de la famille des ASP.

Les anticorps ont ensuite été greffés sur le capteur, après modification chimique de sa surface. Une réponse significative a été observée pour une quantité d'AD de 200 ng lors de la préincubation, soit une sensibilité 100 fois inférieure au seuil légal (20 µg.g⁻¹ de chair de coquillage). Ainsi, il devient envisageable de déterminer, avec seulement 10 mg de chair de

coquillages, si ces derniers peuvent être commercialisés ou non. De plus, des résultats similaires ont été obtenus avec l'AO (DSP).

Ainsi, l'utilisation en parallèle de capteurs sensibles, permettant la détection simultanée de différentes toxines, fournirait un outil simple à utiliser, peu coûteux et rapide afin de déterminer la qualité des coquillages ainsi que la nature du ou des contaminants.

Chapitre 6 : Partie expérimentale

6.1 Techniques d'analyses

6.1.1 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

RMN ^1H : Les spectres ont été enregistrés sur des spectromètres BRUKER DPX 400 (fréquence 400 MHz), BRUKER Avance 300 (fréquence 300 MHz), BRUKER AC 250 (fréquence 250 MHz) et BRUKER DPX 200 (fréquence 200 MHz).

RMN ^{13}C : Les spectres ont été enregistrés sur des spectromètres BRUKER DPX 400 (fréquence 100,6 MHz) BRUKER Avance 300 (fréquence 75,5 MHz), BRUKER AC 250 (fréquence 62,25 MHz) et BRUKER DPX 200 (fréquence 50 MHz).

Les attributions des différents signaux ont été déterminées par la technique de découplage large bande.

Les expériences : DEPT (Distorsion Enhanced by Polarization Transfer), COSY (Correlation Spectroscopy), NOESY* (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) ont également été utilisées pour aider à l'attribution.

Pour décrire les différents spectres, nous utiliserons les notations suivantes : δ , déplacement chimique en ppm ; J , constante de couplage en Hz ; s, singulet ; t, triplet ; q, quadruplet ; m, multiplet.

**L'expérience de NOESY a été effectuée au Centre de Recherche Paul Pascal (CNRS, UPR 8641) avec Wilfried Neri.*

6.1.2 Chromatographie

Chromatographie sur couche mince (CCM) : Les CCM ont été effectuées sur des plaques MERCK de gel de silice (60 F₂₅₄, épaisseur : 0,25 mm).

Chromatographie liquide sur colonne ouverte : les purifications par chromatographie ont été réalisées sur le gel de silice 60 MERCK de granulométrie 70-200 μm (70-230 Mesh).

Chromatographie liquide HPLC : les purifications par HPLC ont été effectuées sur un appareil Beckman Coulter System Gold 125 équipé d'un détecteur UV.

6.1.3 Spectrométrie de Masse

Les masses des composés synthétisés ont été mesurées au sein du CESAMO (Centre d'Etude Structurale et d'Analyse des Molécules Organiques), Université de Bordeaux, avec un appareil QStar (QToF).

Pour la détermination des taux de couplage, les expériences de MADLI ont été réalisées par le Professeur Schmitter au sein de l'IECB (Institut Européen de Chimie et de Biologie), avec un appareil Bruker[®] MALDI-TOF : Reflex[™] III.

6.1.4 Pouvoir rotatoire

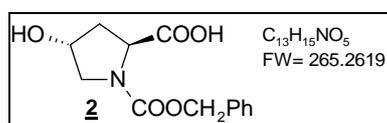
Le pouvoir rotatoire est mesuré sur un appareil MCP 500 (Anton Paar France) avec une cellule de 100 mm de diamètre. La mesure est donnée à 22°C pour la longueur d'onde de la raie jaune du sodium : 589,3 nm.

6.2 Réactifs et solvants

Les solvants utilisés ont été purifiés et séchés, si nécessaire, par distillation, selon des procédures connues¹⁶². Les réactifs commerciaux ont été utilisés sans purification.

6.3 Synthèse et caractérisations des divers composés

(2*S*,4*R*)-4-Hydroxy-pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid 1-benzyl ester (**2**).



A une solution de trans-4-hydroxy-*L*-proline **1** (10 g ; 76,3 mmol) et NaOH (6,1 g ; 152,6 mmol) dans l'eau (70 mL), soumise à agitation, est ajouté le chloroformate de benzyle (11 mL ; 76,3 mmol) à 0°C. Le mélange est laissé sous agitation pendant 5 heures.

Une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (10%) est ensuite additionnée jusqu'à pH = 2. Le mélange est alors extrait à l'acétate d'éthyle (3×70 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution saturée de chlorure de sodium (50 mL) puis séchées sur sulfate de magnésium.

Après évaporation du solvant, 19,34 g d'une mousse blanchâtre sont récupérés (Rdt = 95%).

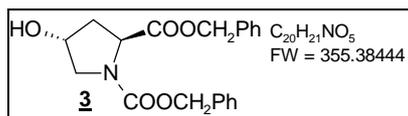
ES MS : m/z valeur calculée 288,0842 [MNa]⁺ ; mesurée 288,0855.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 2,08-2,18 (m ; 1H ; CH₂-CHCOOH) ; 2,23-2,35 (m ; 1H ; CH₂-CHCOOH) ; 3,51-3,62 (m ; 2H ; N-CH₂) ; 4,41-4,52 (m ; 2H ; CH-OH et CH-COOH) ; 5,03-5,15 (m ; 2H ; COO-CH₂Ph) ; 6,74 (s large ; 1H ; CH-OH) ; 7,13-7,36 (m ; 5H ; aromatiques).

RMN ¹³C (75,5 MHz, CDCl₃, δ ppm, 21°C) : 38,0 et 39,0 (CH₂-CHCOOH) ; 54,5 et 55,2 (N-CH₂) ; 57,7 et 58,1 (N-CH-COOH) ; 67,8 (COO-CH₂Ph) ; 69,3 et 70,0 (CH-OH) ; 127,2-128,8 (C aromatiques) ; 136,1 (C_q aromatique) ; 155,1 et 156,1 (N-COOCH₂Ph) ; 175,4 et 176,6 (COOH).

RMN ¹³C (100,6 MHz, DMSO-d₆, δ ppm, 95°C) : 40,7 (CH₂-CHCOOH) ; 55,6 (N-CH₂) ; 58,8 (N-CH-COOH) ; 67,1 (COO-CH₂Ph) ; 69,2 (CH-OH) ; 128,1-129,1 (C aromatiques) ; 137,9 (C_q aromatique) ; 174,2 (COOH).

(2*S*,4*R*)-4-Hydroxy-pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid dibenzyl ester (**3**).



A une solution du composé **2** (17,8 g ; 67,1 mmol) dans le diméthylformamide (40 mL), sont ajoutés l'hydrogénocarbonate de sodium (11,3 g ; 134,2 mmol), l'iodure de sodium (1 g ; 6,7 mmol) ainsi que le bromure de benzyle (12,6 g ; 73,8 mmol). Le milieu est alors laissé sous agitation au reflux du diméthylformamide, durant 16 heures.

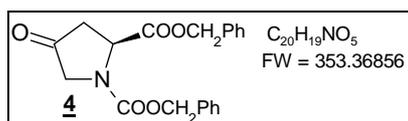
On additionne ensuite une solution aqueuse saturée de bromure de lithium (70 mL) puis une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (10%) (50 mL). Le produit est extrait par le dichlorométhane (3×150 mL). Les fractions organiques sont rassemblées, lavées par une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium et séchées sur sulfate de magnésium. Le solvant est ensuite évaporé pour obtenir 30 g d'une huile jaune foncé.

Le produit est alors purifié sur colonne de silice (éluant dichlorométhane/méthanol 96:4) afin de récupérer 14,1 g d'une huile orange (Rf = 0,45 ; Rdt = 59%).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 2,05-2,15 (m ; 1H ; CH₂-CHCOOCH₂Ph) ; 2,32-2,43 (m ; 1H ; CH₂-CHCOOCH₂Ph) ; 3,03 (s élargi ; 1H ; CHOH) ; 3,61-3,73 (m ; 2H ; N-CH₂) ; 4,46 (s large ; 1H ; CH-OH) ; 4,50-4,71 (2 t ; J = 7,9 Hz ; 1H ; CH-COOCH₂Ph) ; 5,03-5,08 (m ; 2H ; CHCOO-CH₂Ph) ; 5,19-5,26 (m ; 2H ; NCOO-CH₂Ph) ; 7,26-7,42 (m ; 10H ; aromatiques).

RMN ¹³C (62,5 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 38,1 et 39,0 (CH₂-CHCOOCH₂Ph) ; 54,4 et 54,9 (CH₂-N) ; 57,7 et 58,0 (CH-COOCH₂Ph) ; 66,5 et 66,8 (COO-CH₂Ph) ; 68,7-69,4 (CH-OH) ; 126,7-128,8 (C aromatiques) ; 135,2-136,3 (C_q aromatiques) ; 154,3 et 154,9 (N-COOCH₂Ph) ; 172,3 et 172,5 (CH-COOCH₂Ph).

(2S)-4-oxo-pyrrolidine-1,2-dicarboxylic acid dibenzyl ester (**4**).



Une solution d'anhydride trifluoroacétique, préalablement distillé, (2,7 mL ; 18,9 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (4 mL) est ajoutée, goutte à goutte, à un mélange de diméthylsulfoxyde anhydre (1,8 mL ; 25,2 mmol) et de dichlorométhane anhydre (4 mL) à -78°C. Le milieu est laissé sous agitation pendant une heure, en veillant à ce que la température reste inférieure à -50°C. Le composé **3** (4,5 g ; 12,6 mmol) en solution dans le dichlorométhane anhydre (16 mL) est ensuite ajoutée et le milieu réactionnel laissé sous agitation pendant deux heures en maintenant la température inférieure à -50°C. La triéthylamine (4,3 mL ; 30,6 mmol) est ensuite ajouté. Une fois le mélange revenu à température ambiante, la réaction est bloquée avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (10%) (4 mL).

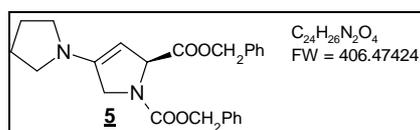
L'extraction est effectuée avec le dichlorométhane (3×80 mL) et les fractions organiques sont récupérées, séchées sur sulfate de magnésium puis concentrées pour donner 8 g de produit brut. Celui-ci est ensuite purifié sur colonne de silice (éluant dichlorométhane/méthanol 98:2) pour donner 2,12 g d'un solide jaune pâle (Rf = 0,85 ; Rdt = 49%).

ES MS : m/z valeur calculée 376,1155 [MNa]⁺ ; mesurée 376,1164.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 2,40-2,47 (m ; 1H ; $\underline{\text{CH}}_2\text{-CHCOOCH}_2\text{Ph}$) ; 2,71-2,81 (m ; 1H ; $\underline{\text{CH}}_2\text{-CHCOOCH}_2\text{Ph}$) ; 3,98 (s large ; 2H ; $\underline{\text{CH}}_2\text{-N}$) ; 4,75-4,81 (dd ; $J = 19,59$ Hz et 9,42 Hz ; 1H ; $\underline{\text{CH}}\text{-COOCH}_2\text{Ph}$) ; 5,11-5,25 (m ; 4H ; $\text{COO-}\underline{\text{CH}}_2\text{Ph}$) ; 7,28-7,40 (m ; 10H ; aromatiques).

RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 40,4 et 41,0 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-CHCOOCH}_2\text{Ph}$) ; 52,5 et 52,7 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-N}$) ; 56,2 ($\underline{\text{CH}}\text{-COOCH}_2\text{Ph}$) ; 67,4 et 67,7 ($\text{COO-}\underline{\text{CH}}_2\text{-Ph}$) ; 127,6-129,7 ($\underline{\text{C}}$ aromatiques) ; 135,0 et 136,0 ($\underline{\text{C}}_q$ aromatiques) ; 154,1 et 154,9 ($\text{N-}\underline{\text{C}}\text{OOCH}_2\text{Ph}$) ; 171,25 ($\text{CH-}\underline{\text{C}}\text{OOCH}_2\text{Ph}$) ; 207,0 et 207,6 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$).

dibenzyl (2S)-4-pyrrolidin-1-yl-2,5-dihydro-1H-pyrrole-1,2-dicarboxylate (5**).**



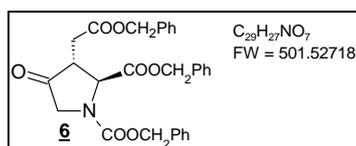
La pyrrolidine (3,26 mL ; 3,6 mmol) est ajoutée à la cétone **4** (1,15g ; 3,3 mmol) diluée dans le benzène anhydre (5 mL). Le tamis moléculaire activé (4 g) est ensuite ajouté et le milieu laissé sous atmosphère inerte, sous agitation, pendant 16 heures. Une simple filtration sur verre fritté et un lavage au benzène (3×5 mL) permettent de récupérer la phase organique. L'évaporation du solvant et de l'excès de pyrrolidine permet d'obtenir 1,16 g d'huile orange foncée (Rdt = 90%).

ES MS : m/z valeur calculée 407,1970 $[\text{MH}]^+$; mesurée 407,1958.

RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 1,75-1,91 (m ; 4H ; $\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2\text{NHCH}_2\text{-}\underline{\text{CH}}_2$) ; 2,95-3,13 (m ; 4H ; $\underline{\text{CH}}_2\text{-N-}\underline{\text{CH}}_2$) ; 3,95 (d ; $J = 13,4$ Hz ; 1H ; $\text{NC=}\underline{\text{CH}}$) ; 4,24-4,51 (m ; 2H ; $\underline{\text{CH}}_2\text{-N}$) ; 5,01-5,33 (m ; 5H ; $\underline{\text{CH}}_2\text{Ph}$ et $\underline{\text{CH}}\text{-N}$) ; 7,22-7,37 (m ; 10H ; aromatiques).

RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 25,3 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-CH}_2\text{NCH}_2\text{-}\underline{\text{CH}}_2$) ; 48,2 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-N-}\underline{\text{CH}}_2$) ; 51,9 et 52,4 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-N-COOCH}_2\text{Ph}$) ; 65,5 ($\underline{\text{CH}}\text{-COOCH}_2\text{Ph}$) ; 66,5 et 67,0 ($\text{N-COO-}\underline{\text{CH}}_2\text{-Ph}$ et $\text{CHCOO-}\underline{\text{CH}}_2\text{-Ph}$) ; 83,3 ($\underline{\text{CH}}=\text{C-N}$) ; 126,9-128,5 ($\underline{\text{C}}$ aromatiques) ; 135,8 et 136,5 ($\underline{\text{C}}_q$ aromatiques) ; 145,4 ($\text{-N-}\underline{\text{C}}=\text{CH-}$) ; 154,1 ($\text{N-}\underline{\text{C}}\text{OOCH}_2\text{Ph}$) ; 172,1 ($\text{CH-}\underline{\text{C}}\text{OOCH}_2\text{Ph}$).

(2S,3R)-3-[2-(benzyloxy)-2-oxoethyl]-4-oxopyrrolidine-1,2-dibenzylester (6**).**



Méthode A :

L'énamine **5** (10,5 g ; 25,8 mmol) est dissoute dans l'acétonitrile anhydre (200 ml). Le carbonate de potassium sec (9,63 g ; 69,66 mmol) est ajouté sous forme de poudre fine. Puis le bromoacétate de benzyle (6,16 mL ; 38,7 mmol) est additionné au mélange qui est alors mis au reflux et sous agitation.

Après 30 heures, l'acétonitrile est évaporé et le résidu repris dans le chloroforme (50 mL). Ensuite une solution aqueuse d'acide acétique à 10% en volume (50 mL) est ajoutée pour donner un mélange biphasique laissé sous agitation, à température ambiante, durant 20 heures. Le mélange est alors extrait au chloroforme (3×40 mL). Les fractions organiques sont récupérées et lavées par une solution saturée d'hydrogencarbonate de sodium (40 mL), puis d'eau distillée (40 mL) et enfin séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et évaporées pour donner 14,8 g de produit brut.

Ce produit est alors purifié sur colonne de silice (pentane/éther 6:4) pour donner 3,6 d'une huile jaune pâle ($R_f = 0,45$; $R_{dt} = 28\%$).

Méthode B :

L'énamine **5** (1 g ; 2,46 mmol) est dissoute dans l'acétonitrile anhydre. Le bromoacétate de benzyle est additionné à la solution (0,4 mL ; 2,46 mmol) puis le mélange soumis à agitation. Le carbonate de potassium (0,6 g ; 4,34 mmol) est ajouté sous forme de poudre très fine. La réaction est alors laissée à température ambiante durant 60 heures avant d'ajouter une nouvelle quantité de bromoacétate de benzyle (0,4 mL ; 2,46 mmol). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante à nouveau pendant 60 heures.

Le solvant est alors évaporé et le résidu repris dans le chloroforme (14 mL). Une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (10 % en volume) (14 mL) est alors ajoutée donnant un milieu biphasique qui est agité pendant 36 heures à température ambiante.

L'extraction se fait par le chloroforme (3×25 mL), les phases organiques sont récupérées et lavées par une solution aqueuse saturée d'hydrogencarbonate de sodium (2×20 mL) puis avec de l'eau distillée (20 mL). Le produit est finalement concentré pour donner 1,66 g d'une huile orange foncée avec des dépôts blanchâtres.

Après purification sur colonnes de silice (toluène/éther 6:4 ; pentane/éther 6:4 ; toluène/éther 6:4) on récupère 30 mg d'une huile jaune pâle ($R_f = 0,45$; $R_{dt} = 3\%$).

ES MS : m/z valeur calculée 524,1679 $[MNa]^+$ valeur mesurée 524,1673

$[\alpha]_D = +0.367^\circ$ (20°C, $CHCl_3$)

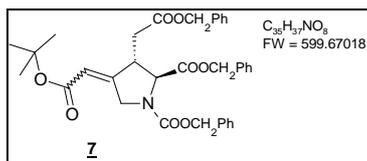
RMN 1H (250 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 2,17-2,38 (m ; 0,5H ; \underline{CH}_2 -COOCH₂Ph) ; 2,79-2,96 (m ; 0,5H ; \underline{CH}_2 -COOCH₂Ph et 0,5H ; \underline{CH} -CH₂COOCH₂Ph et 1H ; \underline{CH}_2 -COOCH₂Ph) ; 3,36-3,41 (m ; 0,5H ; \underline{CH} -CH₂-COOCH₂Ph) ; 3,95-4,15 (m ; 2H ; \underline{CH}_2 -NCOOCH₂Ph) ; 4,52-4,65 (m ; 0,5H ; \underline{CH} -COOCH₂Ph) ; 4,91-5,28 (m ; 6H ; COO- \underline{CH}_2 -Ph et 0,5H ; \underline{CH} -COOCH₂Ph) ; 7,21-7,34 (m ; 15H ; aromatiques).

RMN ^{13}C (75,5MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 29,7 et 33,6 ($\underline{C}H_2$ -COOCH₂Ph) ; 46,8 et 47,3 ($\underline{C}H$ -CH₂-COOCH₂Ph) ; 52,0 et 52,1 ($\underline{C}H_2$ -CO) ; 59,5 et 59,6 ($\underline{C}H$ -COOCH₂Ph) ; 66,6-68,1 (COO- $\underline{C}H_2$ -Ph) ; 127,4-129,5 (\underline{C} aromatiques) ; 134,6-135,9 (\underline{C}_q aromatiques) ; 154,0 et 154,8 (N- $\underline{C}OOCH_2$ Ph) ; 169,5-171,0 (CH- $\underline{C}OOCH_2$ Ph et CH₂- $\underline{C}OOCH_2$ Ph) ; 206,6 et 207,2 ($\underline{C}=\text{O}$).

(2*S*,3*S*)-dibenzyl-3-(2(2benzyloxy)-2-oxoethyl)-4-(2-*tert*-butoxy-2-

oxoethylidene)pyrrolidine-1,2-dicarboxylate (7**) et (*S*)-dibenzyl 3-(2-(benzyloxy)-2-**

oxoethyl)-4-(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)-1*H*-pyrrole-1,2(2*H*,*H*)-dicarboxylate (8**)**



Le tert-butyldiéthylphosphonoacétate (1,13 mL ; 4,79 mmol) est ajouté à une solution de LHMDS (1,06 M) (3,77 mL , 3,99 mmol) dans le THF anhydre (15 mL) à -78°C.

Après 30 minutes, une solution du composé **6** (2 g ; 3,99 mmol) dans le THF anhydre (15 mL) est ajoutée, goutte à goutte, puis le milieu laissé revenir à température ambiante.

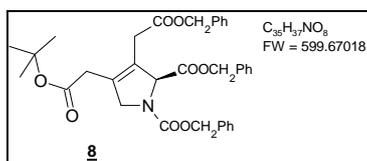
Après 13 heures, le mélange réactionnel est acidifié avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 10 % puis extrait avec l'acétate d'éthyle (3×30 mL). Les phases organiques sont rassemblées puis lavées avec une solution aqueuse saturée en NaCl (20 mL). La phase organique est ensuite séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis concentrée pour donner 3,25 g de produit brut.

Après purification sur colonne de silice (pentane/éther 6:4) 720 mg de l'huile jaune pâle (**7**) sont récupérés (R_f = 0,7 ; Rdt = 28%) ainsi que 340 mg du composé **8** (R_f = 0,5 ; Rdt = 13%).

ES MS : *m/z* valeur calculée 622,2411 [MNa]⁺ valeur mesurée 622,2441

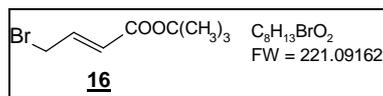
RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃ ; δ ppm) : 1,33 et 1,38 (2 s ; 9H ; C(CH₃)₃) ; 2,40-2,74 (m ; 2H ; CH₂-COOCH₂Ph) ; 3,27-3,32 (m ; 0,5H ; CH-CH₂COOCH₂Ph) ; 4,04-4,09 (m ; 0,5H ; CH-CH₂COOCH₂Ph) ; 4,20-4,24 (m ; 1H ; N-CH₂) ; 4,30-4,55 (m ; 1H ; N-CH-COOCH₂Ph) ; 4,56-4,59 (m ; 1H ; N-CH₂) ; 4,89-5,14 (m ; 6H ; NCOOCH₂Ph et CHCOOCH₂Ph et CH₂COOCH₂Ph) ; 5,60 et 5,67 (2s, 1H ; =CH) ; 7,14-7,26 (m, 15H ; H aromatiques).

RMN ¹³C (75,5 MHz, CDCl₃ ; δ ppm) : 27,1 (COOC(CH₃)₃) ; 36,7 et 38,3 (CH-CH₂-COOCH₂Ph) ; 41,4 42,3 44,0 et 45,0 (CH-CH₂COOCH₂Ph) ; 49,2 49,7 50,1 et 50,7 (N-CH₂-C=) ; 61,8 62,1 63,0 et 63,3 (CH-COOCH₂Ph) ; 65,7-66,5 (NCOOCH₂Ph et CHCOOCH₂Ph et CH₂COOCH₂Ph) ; 79,9 (C(CH₃)₃) ; 115,8 et 116,2 (HC=C) ; 125,9-128,5 (C aromatiques) ; 134,2 et 135,2 (C_q aromatiques) 140,1 (CH=C) ; 153,3-155,9 (NCOOCH₂Ph) ; 163,3-163,7 (=CHCOO(CH₃)₃) ; 168,9-170,1 (CH-COOCH₂Ph et CH₂-COOCH₂Ph).



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃ ; δ ppm) : 1,32 (s ; 9H ; C(CH₃)₃) ; 2,94-3,04 (m ; 3H ; CH₂-COOCH₂Ph et CH₂-COOC(CH₃)₃) ; 3,19 (d ; 1H ; CH₂-COOCH₂Ph) ; 4,31 (s ; 2H ; N-CH₂) ; 4,88-5,15 (m ; 7H ; N-CH-COOCH₂Ph et NCOOCH₂Ph et CHCOOCH₂Ph et CH₂COOCH₂Ph) ; 7,09-7,26 (m, 15H ; H aromatiques).

RMN ¹³C (75,5 MHz, CDCl₃ ; δ ppm) : 26,9 (COOC(CH₃)₃) ; 30 (CH-CH₂-COOCH₂Ph) ; 33 CH-CH₂-COOC(CH₃)₃) ; 54,6 et 55,1 (N-CH₂-C=) ; 65,9-67,8 (CH-COOCH₂Ph et NCOOCH₂Ph et CHCOOCH₂Ph et CH₂COOCH₂Ph) ; 80,7 (C(CH₃)₃) ; 124,6 (HC-CH₂COOCH₂Ph) ; 126,8-128,5 (C aromatiques) ; 131,8 CH-CH₂COOC(CH₃)₃) ; 134,2 et 135,5 (C_q aromatiques) 140,1 (CH=C) ; 152,6 et 153,1 (NCOOCH₂Ph) ; 167,1-168,6 (=CHCOO(CH₃)₃ et CH-COOCH₂Ph et CH₂-COOCH₂Ph).

4-bromo *tert*-butylcrotonate (16)

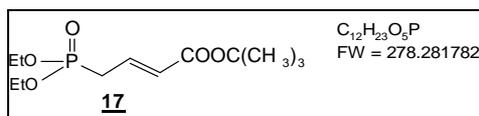
A une solution de crotonate de *tert*-butyle (8 mL ; 50 mmol) dans le tétrachlorure de carbone anhydre (50 mL) est ajouté le *N*-bromosuccinimide (8,9 g ; 50 mmol) en milieu anhydre.

On introduit ensuite le peroxyde de benzoyle, préalablement recristallisé dans le chloroforme (75 mg ; 0,3 mmol), puis la réaction est mise au reflux toute une nuit. Le milieu est refroidi puis filtré de façon à éliminer le *N*-hydroxysuccinimide formé au cours de la réaction.

Le filtrat est alors lavé avec de l'eau (3×15 mL) puis séché sur sulfate de sodium. Finalement, la phase organique est concentrée pour donner 6,13 g d'un liquide orange (Rdt = 55%)

RMN 1H (300 MHz ; $CDCl_3$; δ ppm) : 1,35 (s ; 9H ; C(CH₃)₃) ; 3,88 (d ; $J = 7,33$ Hz ; 2H ; CH₂-Br) ; 5,81 (d ; $J = 15,26$ Hz ; 1H ; CH=CHCOOC(CH₃)₃) ; 6,67-6,82 (2 t ; $J = 15,26$ et 7,33 Hz ; 1H ; CH=CHCH₂Br).

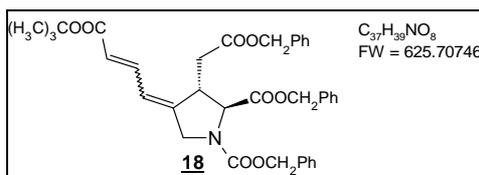
RMN ^{13}C (75,5 MHz, $CDCl_3$; δ ppm) : 27,7 (COOC(CH₃)₃) ; 29,0 (CH₂-Br) ; 80,2 (COOC(CH₃)₃) ; 126,0 (CH₂CH=CH) ; 140,3 (CH₂CH=CH) ; 164,0 (CCOOC(CH₃)₃).

***Tert*-butyl diéthylphosphonocrotonate (17)**

Le *tert*-butyl-4-bromocrotonate (1,09 g ; 4,9 mmol) est additionné très lentement au triéthylphosphite (1 mL ; 5,8 mmol) sous agitation à température ambiante. Le milieu réactionnel est chauffé à 120°C pendant 5 heures.

L'excès de triéthylphosphite est éliminé sous vide et 650 mg d'un liquide jaune sont récupérés (Rdt = 48%).

RMN 1H (300 MHz ; $CDCl_3$; δ ppm) : 1,19 (t ; 6H ; CH₃-CH₂O) ; 1,33 (s ; 9H ; C(CH₃)₃) ; 2,53-2,65 (dd ; $J = 7,53$ et 23 Hz ; 2H ; CH₂-P) ; 3,99 (s élargi ; 4H, CH₃-CH₂-O) ; 5,77 (d ; $J = 14,32$ Hz ; 1H ; CH=CH-COOC(CH₃)₃) ; 6,64 (m ; 1H ; CH=CHCOOC(CH₃)₃).

(2*S*,3*S*,*Z*)-dibenzyl3-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)-4-(*tert*-butoxy-4-oxobut-2-enylidene)pyrrolidine-1,2dicarboxylate (18)

Le *tert*-butyl phosphonocrotonate **15** (1,4 g ; 5,0 mmol) est ajouté, goutte à goutte, à une solution de LHMDS (1,06 M) (4,0 mL ; 4,2 mmol) dans le tétrahydrofurane anhydre (10 mL) à -78°C. Le tamis moléculaire 4Å (5 g) est alors introduit dans le milieu réactionnel maintenu

à -50°C pendant 2h30. La cétone **6** (2,1 g ; 4,2 mmol), en solution dans le tétrahydrofurane anhydre (15 mL), est additionnée à -78°C . Après 20 minutes à température ambiante, le mélange est mis au reflux pendant 2h30.

La réaction est arrêtée par addition d'eau distillée (20 mL). La phase organique est extraite à l'acétate d'éthyle (4×30 mL), lavée par l'eau distillée (25 mL), séchée sur sulfate de sodium puis concentrée pour donner 2,48 g d'une huile orange.

Le produit est purifié par HPLC sur colonne Protéo Jupiter $4\mu\text{m}$ (phase inverse) (éluant eau/acétonitrile 85:15 ; débit $5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). On obtient 560 mg d'une huile jaune (temps de rétention : 18,9 min ; Rdt = 22%).

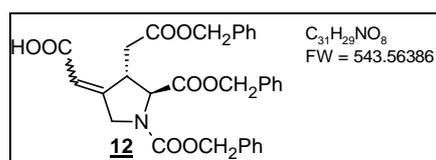
ES MS m/z valeur calculée 648,2567 $[\text{MNa}]^+$ valeur mesurée 648,2543

RMN ^1H (300 MHz ; CDCl_3 ; δ ppm) : 1,42 (s ; 9H ; $\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$) ; 2,44-2,65 (m, 2H ; $\underline{\text{CH}}_2\text{COOCH}_2\text{Ph}$) ; 3,27-3,30 (s ; 0,8H ; $\underline{\text{CH}}\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph}$) ; 3,55-3,65 (s ; 0,2H ; $\underline{\text{CH}}\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph}$) ; 4,17-4,53 (m ; 3H, $\underline{\text{CH}}-\text{COOCH}_2\text{Ph}$ et $\text{N}-\underline{\text{CH}}_2$) ; 4,95-5,10 (m ; 6H ; COOCH_2Ph) ; 5,60 (d ; $J = 15,3\text{ Hz}$; 1H ; $=\underline{\text{CH}}\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$) ; 5,91 (d ; $J = 11,5\text{ Hz}$; 1H ; $\text{CH}_2\text{CCH}=\underline{\text{H}}$) ; 6,92-7,03 (m ; 1H ; $\text{C}=\text{CH}-\underline{\text{H}}=\text{CH}$) ; 7,15-7,24 (m ; 15H ; $\underline{\text{H}}$ aromatiques).

RMN ^{13}C (75,5 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 28,2 ($\text{C}(\underline{\text{CH}}_3)_3$) ; 39,2 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{COOCH}_2\text{Ph}$) ; 41,6 42,5 44,8 et 45,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph}$) ; 48,1 et 48,7 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NCOOCH}_2\text{Ph}$) ; 63,8 ($\underline{\text{C}}\text{H}-\text{COOCH}_2\text{Ph}$) ; 66,9-67,5 (COOCH_2Ph) ; 80,7 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$) ; 122,0 ($=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CH}=\underline{\text{C}}$) ; 124,4 ($=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{COOH}$) ; 127,8-129,2 ($\underline{\text{C}}$ aromatiques) ; 135,5 et 136,2 ($\underline{\text{C}}_q$ aromatiques) ; 138,0 ($=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}$) ; 145,5 et 146,7 ($\underline{\text{C}}=\text{CHCH}=\underline{\text{C}}$) ; 154,6 et 155,1 ($\text{N}-\underline{\text{C}}\text{OOCH}_2\text{Ph}$) ; 165,8 ($\underline{\text{C}}\text{OOC}(\text{CH}_3)_3$) ; 170,2 et 170,8 ($\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{OOCH}_2\text{Ph}$ et $\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{OOCH}_2\text{Ph}$).

- Clivage de l'ester de *tert*-Butyle

Acide 2-((4*S*,5*S*)-4-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)-1,5-bis (benzyloxycarbonyl) pyrrolidin-3-ylidene) acétique (12**)**



Le composé **7** (1 éq) est mis en solution dans le dichlorométhane anhydre (32 éq). Le triéthylsilane (2,5 éq) puis l'acide trifluoroacétique (13 éq) sont alors ajoutés, sous atmosphère inerte, et le milieu laissé à température ambiante toute la nuit.

L'excès de triéthylsilane et le solvant sont alors éliminés par évaporation pour récupérer les produits déprotégés.

Huile jaune très visqueuse

Rendement = 78%

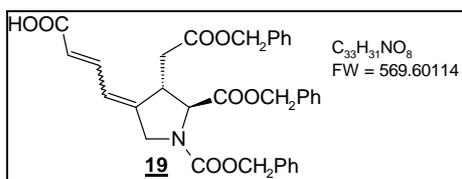
ES MS m/z valeur calculée 566,1785 $[\text{MNa}]^+$ valeur mesurée 566,1770

RMN ^1H (300 MHz ; CDCl_3 ; δ ppm) : 2,61-2,89 (m ; 2H ; $\underline{\text{CH}}_2-\text{COOCH}_2\text{Ph}$) ; 3,40-3,58 (m ; 0,65H ; $-\underline{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph}$) et 4,25-4,35 (m ; 0,35H ; $-\underline{\text{CH}}-\text{CH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph}$) ; 4,42-

4,83 (m ; 3H ; $\underline{\text{CH}}_2\text{-NCOOCH}_2\text{Ph}$ et $\underline{\text{CH}}\text{-COOCH}_2\text{Ph}$) ; 5,07-5,28 (m ; 6H ; $\text{COO}\underline{\text{CH}}_2\text{Ph}$) ; 5,92 (2 s ; 1H ; $=\underline{\text{CH}}\text{COOH}$) ; 7,23-7,55 (m ; 15H ; aromatiques) ; 11,00 (s large ; 1H ; $-\text{COO}\underline{\text{H}}$).

RMN ^{13}C (75,5 MHz ; CDCl_3 ; δ ppm) : 37,5 et 38,9 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-COOCH}_2\text{Ph}$) ; 42,7 43,6 45,1 et 46,0 ($\underline{\text{CH}}\text{-CH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph}$) ; 50,4 51,0 51,4 et 51,8 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-NCOOCH}_2\text{Ph}$) ; 62,8 63,1 63,9 et 64,2 ($\underline{\text{CH}}\text{-COOCH}_2\text{Ph}$) ; 66,7-67,5 ($\text{COO}\underline{\text{CH}}_2\text{Ph}$) ; 114,3 et 114,6 ($\text{C}=\underline{\text{CH}}\text{-COOH}$) ; 127,5-129,2 ($\underline{\text{C}}$ aromatiques) ; 135,0-136,1 ($\underline{\text{C}}_q$ aromatiques et $\text{CH}=\underline{\text{C}}$) ; 154,4-155,0 ($\text{N}-\underline{\text{COOCH}}_2\text{Ph}$) ; 159,9 et 160,9 ($\underline{\text{COOH}}$) ; 169,4-170,8 ($\text{CH}-\underline{\text{COOCH}}_2\text{Ph}$ et $\text{CH}_2-\underline{\text{COOCH}}_2\text{Ph}$).

(2S,3S)-dibenzyl 3-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)-4-(4-(tert-butoxy)-4-oxobut-2-en-1-ylidene)pyrrolidine-1,2-dicarboxylate 19



Le composé 18 subit le mode opératoire décrit pour l'obtention du composé 12 et permet d'aboutir au composé 19.

Huile orange foncée

Rendement = 82%

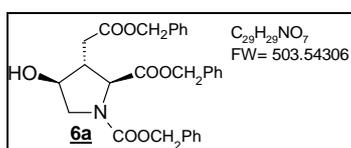
ES MS m/z valeur calculée 592,1941 $[\text{MNa}]^+$ valeur mesurée 592,1926

RMN ^1H (200 MHz ; CDCl_3 ; δ ppm) : 2,56-2,84 (m ; 2H ; $\underline{\text{CH}}_2\text{-COOCH}_2\text{Ph}$) ; 3,31-3,52 (m ; 0,7H ; $\underline{\text{CH}}\text{-CH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph}$) ; 3,65-3,90 (m ; 0,3 H ; $\underline{\text{CH}}\text{-CH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph}$) ; 4,32-4,57 (m ; 3H ; $\underline{\text{CH}}_2\text{-NCOOCH}_2\text{Ph}$ et $\underline{\text{CH}}\text{-COOCH}_2\text{Ph}$) ; 5,01-5,23 (m ; 6H ; $\text{COO}\underline{\text{CH}}_2\text{Ph}$) ; 5,79 (d ; $J = 14,9$ Hz ; 1H ; $=\underline{\text{CH}}\text{CH}=\text{CHCOOH}$) ; 6,07 (d ; $J = 12,2$ Hz ; 1H ; $=\underline{\text{CH}}\text{COOH}$) ; 7,18-7,42 (m ; 15H ; aromatiques et 1H ; $\text{CH}-\underline{\text{CH}}=\text{CH}$) ; 10,00 (s large ; 1H ; $\text{COO}\underline{\text{H}}$).

RMN ^{13}C (50 MHz ; CDCl_3 ; δ ppm) : 38,9 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-COOCH}_2\text{Ph}$) ; 44,9 et 45,8 ($\underline{\text{CH}}\text{-CH}_2\text{COOCH}_2\text{Ph}$) ; 48,3 et 48,9 ($\underline{\text{CH}}_2\text{-NCOOCH}_2\text{Ph}$) ; 63,7 ($\underline{\text{CH}}\text{-COOCH}_2\text{Ph}$) ; 66,5-67,8 ($\text{COO}\underline{\text{CH}}_2\text{Ph}$) ; 121,9 ($\text{C}=\underline{\text{CH}}\text{-COOH}$ et $=\underline{\text{CH}}\text{-CH}=\text{CHCOOH}$) ; 128,4-128,7 ($\underline{\text{C}}$ aromatiques) ; 135,4 et 136,0 ($\underline{\text{C}}_q$ aromatiques) ; 141,3 ($\underline{\text{CH}}=\text{CHCOOH}$) ; 147,7 et 148,7 ($\underline{\text{C}}=\text{CHCH}=\text{CHCOOH}$) ; 154,7 et 155,2 ($\text{N}-\underline{\text{COOCH}}_2\text{Ph}$) ; 170,2-171,4 ($\text{CH}-\underline{\text{COOCH}}_2\text{Ph}$ et $\text{CH}_2-\underline{\text{COOCH}}_2\text{Ph}$).

Réduction

(2S, 3S, 4S)-dibenzyl 3-(2-(benzyloxy)-2-oxoethyl)-4-hydroxypyrrolidine-1,2-dicarboxylate 6a



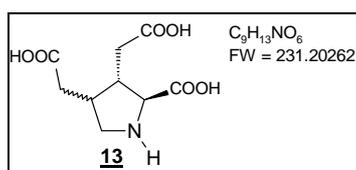
A une solution du composé **6** (577 mg ; 1,14 mmol) dans le MeOH (20 mL) est ajouté le NaBH₄ (48 mg ; 1,26 mmol). Après 2h, le milieu réactionnel est versé dans une solution saturée de chlorure d'ammonium et extrait à l'acétate d'éthyle (4×20 mL). Les fractions organiques sont ensuite lavées avec une solution d'HCl 0,1M (30 mL) puis une solution saturée de NaCl (30 mL) et enfin séché sur MgSO₄. Après évaporation on récupère 530 mg d'un solide légèrement brunâtre (Rdt = 92 %)

RMN ¹H (400 MHz ; CDCl₃ ; δ ppm) : 2,41-2,55 (m, 2H ; CH₂-COOCH₂Ph) ; 2,64-2,79 (m, 1H ; CHCH₂COOCH₂Ph) ; 3,41-3,62 (m, 2H ; CH₂NCOOCH₂Ph) ; 3,99 (s élargi, 1H CHOH) ; 4,10-4,19 (m, 1H ; CHCOOCH₂Ph) ; 4,98-5,03 (m, 4H ; CHCOOCH₂Ph et CH₂COOCH₂Ph) ; 5,09-5,17 (m, 2H ; NCOOCH₂Ph) ; 7,17-7,33 (m, 15 H ; H aromatiques).

RMN ¹³C (100 MHz ; CDCl₃ ; δ ppm) : 35,6 (CH₂COOCH₂Ph) ; 46,8 et 47,7 (CHCH₂COOCH₂Ph) ; 52,7 et 53 (NCH₂CHOH) ; 62,7 et 63,1 (CHCOOCH₂Ph) ; 73 et 73,8 (CHOH) ; 66,5-67,8 (3C, CH₂Ph) ; 127-129 (C aromatiques) ; 135,4 et 136,5 (C_q aromatiques) ; 154,4 et 155 N-COOCH₂Ph) ; 171,6 et 171,9 CH₂COOCH₂Ph et CHCOOCH₂Ph).

Hydrogénation

2,2'-((2*S*,3*R*)-2-carboxypyrrolidine-3,4-diyl)-diacetic acid (**13**)



Le palladium sur charbon (80 mg) est ajouté à une solution du composé **12** (780 mg ; 1,3 mmol) dans le méthanol (10 mL). Après une nuit sous courant de dihydrogène, la solution est alors passée sur un filtre PTFE (0,45 μm) puis le filtre lavé à l'eau (2×5 mL).

Un deuxième ajout de palladium sur charbon (75 mg) est effectué avant de laisser la réaction sous courant de dihydrogène pendant 6 heures.

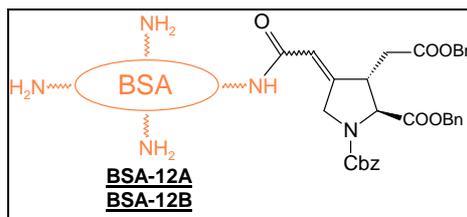
La solution est filtrée (PTFE ; 0,45 μm) et le solvant évaporé pour donner 220 mg d'une huile marron foncé.

RMN ¹H (300 MHz ; CDCl₃ ; δ ppm) : 2,42-2,84 (m, 6 H ; CH₂-COOH et -CH-CH₂COOH) ; 3,14-3,23 (m, 1H ; -NCH₂-) ; 3,63-3,69 (m, 1H ; -NCH₂-) ; 4,07 (d, *J* = 8,33 Hz, 1H ; -CHCOOH).

6.4 Réactions de couplage et hydrogénation des conjugués

6.4.1 Couplages à la BSA (albumine sérique bovine)

Synthèse du composé BSA-12



Avec rapport BSA/Haptène (1:25) **BSA-12A**:

Le composé **12** (12,4 mg ; 26,5 μmol) dissous dans le DMF anhydre (1 mL) est versé dans le ballon 1. Le *N*-hydroxysuccinimide (NHS) (3,9 mg ; 33,5 μmol) est ajouté sous atmosphère inerte (Ar) à 0°C puis l'hydrochlorure de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (5,8 mg ; 32 μmol). Le milieu réactionnel est ensuite laissé sous atmosphère inerte durant 1 heure à 0°C.

La BSA (67,7 mg ; 1 μmol), dissoute dans le tampon borate/borique (pH=8,7) (10 mL) est placée dans le ballon 2.

Le contenu du ballon 1 est ajouté à celui-ci par un goutte à goutte extrêmement lent afin d'éviter au maximum la formation d'un précipité. Il peut être nécessaire d'ajouter, goutte à goutte, de petites quantités de solution tampon et de DMF.

Le milieu réactionnel est ensuite mis à 4°C pendant une nuit.

Avec rapport BSA/Haptène (1:50) **BSA-12B** :

Selon le protocole décrit ci-dessus, une solution du composé **12** (12,4 mg ; 26,5 μmol) dans le DMF (1 mL) contenant NHS (3,9 mg ; 33,5 μmol) et EDC (5,8 mg ; 32 μmol) est ajoutée, goutte à goutte, à la BSA (34,5 mg ; 0,5 μmol) dissoute dans le tampon borate/borique (pH = 8,6) (15 mL) contenant du DMF (1 mL). L'addition se fait par un goutte à goutte très lent (1 mL en 7 heures) en ajoutant de petites quantités de solution tampon et de DMF pour éviter la précipitation. Une fois l'addition terminée, le milieu est mis à 4°C toute une nuit.

- Dialyse

La dialyse s'effectue en utilisant une membrane (Spectra/Por Dialysis Membrane MWCO 25,000) lavée pendant 45 minutes dans l'eau distillée. Le volume contenu dans le boudin est dialysé 2 fois contre le PBS (1X) (avec un rapport 1:100) pendant 8 heures puis 2 fois contre l'eau distillée pendant 8 heures (rapport 1:100) dans un réfrigérateur (4°C).

- Lyophilisation

L'intérieur du boudin de dialyse est mis dans des tubes à hémolyse de 25 mL (5 mL par tube max) puis mis dans un bain éthanol glace de façon à geler la solution sur les parois du tube afin d'accélérer l'étape de lyophilisation. Les échantillons sont laissés une nuit à -80°C avant la lyophilisation. Celle-ci dure, généralement entre 4 et 20 heures.

On récupère pour les conjugués **BSA-12A** et **BSA-12B**, respectivement 26 et 13 mg d'une poudre blanchâtre filamenteuse.

- Electrophorèse

Le taux de couplage est dans un premier temps vérifié et estimé par électrophorèse :

Préparation des différents tampons

Tampon d'électrophorèse 10X Tris-glycine-SDS : 15,14 g de trisbase ; 72,07 g de glycine ; 5 g de SDS dans 500mL d'eau ultra pure. A diluer 10 fois avant utilisation = 10X.

Tampon de charge 2X : 1,52g trisbase ; 20mL glycérol ; 2 g SDS ; 2 mL β mercaptoéthanol ; 1 mg bleu de bromophénol dans 100 mL d'eau dé-ionisée. Ajuster le pH à 6,8.

Tampon de coloration : éthanol 50% ; Acide acétique 10% ; Bleu de Coomassie 0,05% (poid/volume) ; eau 40%.

Tampon de décoloration : éthanol 5% ; acide acétique 7% ; Glycérol 5% ; Eau 83%.

Protocole

Préparer 180 mL de tampon électrophorèse 1X
 Mettre 85 mL dans chaque compartiment du bac
 Sortir le gel de son emballage, rincer la cassette avec de l'eau ultra pure puis enlever le strip blanc
 Positionner le gel dans le bac
 Faire un pré run à 160V avec le gel pendant 12 min.
 Enlever le cache vert et mettre dans les puits 6 mL de tampon électrophorèse
 Déposer en sous marin les échantillons
 Faire migrer à 160V
 Sortir la cassette et l'ouvrir. Couper avec une lame les bords du gel et le mettre dans le tampon de coloration (45 min)
 Récupérer le tampon de coloration et le remplacer par du tampon de décoloration (plusieurs heures)

Le taux de couplage est calculé à l'aide du logiciel AlphaEaseFC.

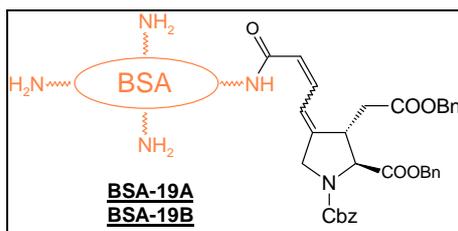
Echantillon	Masse mesurée (2 mesures, Da)	Incrément de masse / BSA (Da)	Masse de l'haptène (Da)	Nb d'haptènes greffés
BSA-12A	62469	1496	526	2,8
BSA-12B	68100	7127	526	13,6

- Spectrométrie de Masse

Le taux de couplage peut aussi être calculé par spectrométrie de masse (MALDI) :

Echantillon	Masse mesurée (moyenne de 6 mesures, Da)	Incrément de masse / BSA (Da)	Masse de l'haptène (Da)	Nb d'haptènes greffés
BSA-12A	70036 \pm 99	3605 \pm 91	526	6.8 \pm 0.2
BSA-12B	75845 \pm 129	9414 \pm 117	526	17.9 \pm 0.2

Synthèse du conjugué BSA-19



Le composé **19** (29,4 mg ; 51,6 μmol) est dissous dans le DMF anhydre (1,8 mL) dans le ballon 1. Le NHS (8,1 mg ; 70,4 μmol) et l'EDC (12,9 mg ; 67,3 μmol) sont ensuite ajoutés sous atmosphère inerte (Ar) à 0°C. Le milieu réactionnel est laissé sous atmosphère inerte durant 1 heure à 0°C.

La BSA (68,5 mg ; 1 μmol), dissoute dans le tampon borate/borique (pH=8,7) (10 mL) est placée dans le ballon 2.

Le contenu du ballon 1 est alors ajouté à celui-ci par un goutte à goutte extrêmement lent (3 heures environ) afin d'éviter au maximum la formation d'un précipité. Il peut être nécessaire d'ajouter, goutte à goutte, de petites quantités de solution tampon et de DMF.

Le milieu réactionnel est alors mis à 4°C pendant 2 nuits.

Dialyse et Lyophilisation

Après les étapes de dialyse et de lyophilisation réalisées selon les conditions décrites à la section (6.4.1, page 128), 50 mg d'une poudre blanchâtre filamenteuse sont récupérés.

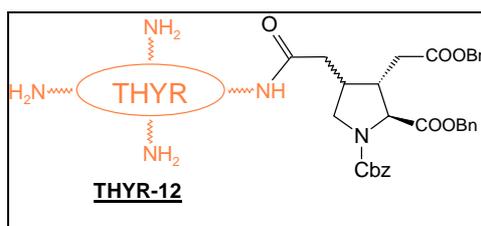
Spectrométrie de masse

Echantillon	Masse mesurée (moyenne de 6 mesures, Da)	Incrément de masse / BSA (Da)	Masse de l'haptène (Da)	Nb d'haptènes greffés
BSA-19A	68060 \pm 135	1659	553	3 \pm 0.4
BSA-19B	70650 \pm 150	4147	553	7,5 \pm 0.3

6.4.2 Couplages à la THYR

6.4.2.1 Synthèse des conjugués THYR-haptène

Synthèse du conjugué **THYR-12**



La molécule **12** (7,8 mg ; 12,5 μmol) est dissoute dans le DMF anhydre (0,5 mL) puis mise dans un bain de glace (0°C). Le NHS (2 mg ; 17,5 μmol) puis, après quelques minutes, l'EDC (3 mg ; 16,3 μmol) sont ajoutés. Le milieu est alors agité pendant 1 heure (ballon 1) à 0°C, sous atmosphère inerte.

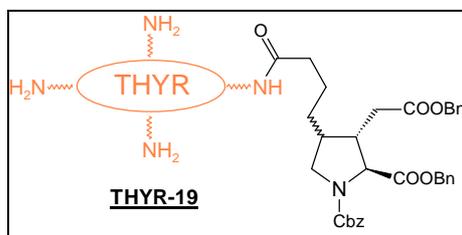
Dans le deuxième ballon, la THYR (15 mg ; 0,022 μmol) est dissoute dans un tampon borate/borique à pH = 8,6 (5 mL).

L'addition du contenu du ballon 1 se fait très lentement (environ 2 heures) avec ajouts de petites quantités de tampon (5 mL au total) afin d'éviter la formation d'un précipité. Le milieu réactionnel est alors placé une nuit au réfrigérateur (4°C).

Dialyse et Lyophilisation

Après les étapes de dialyse et de lyophilisation réalisées selon les conditions décrites précédemment (section 6.4.1, page 128), 11,9 mg d'une poudre blanchâtre filamenteuse sont récupérés.

Synthèse du conjugué THYR-19



Le composé **19** (13 mg ; 22,8 μmol) est dissous dans le DMF anhydre (2 mL) puis mis dans un bain de glace (0°C). Le NHS (4 mg ; 32 μmol) puis, après quelques minutes, l'EDC (6,6 mg ; 34,2 μmol) sont ajoutés. Le milieu est alors agité pendant 1 heure (ballon 1) à 0°C, sous atmosphère inerte.

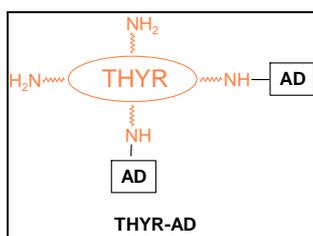
Dans le deuxième ballon, la THYR (15 mg ; 0,022 μmol) est dissoute dans un tampon borate/borique à pH = 8,6 (15 mL).

L'addition du contenu du ballon 1 se fait très lentement (environ 2 heures) avec ajouts de petites quantités de tampon (5 mL au total) afin d'éviter la formation d'un précipité. Le milieu réactionnel est alors placé une nuit au réfrigérateur (4°C).

Dialyse et Lyophilisation

Après les étapes de dialyse et de lyophilisation réalisées selon les conditions décrites à la section (6.4.1, page 128), 10 mg d'une poudre blanchâtre filamenteuse sont récupérés.

6.4.2.2 Synthèse du conjugué THYR Acide Domoïque (THYR-AD)



La THYR (10,9 mg ; μmol) est dissoute dans un tampon borate borique à $\text{pH} = 8,6$ (1 mL). Deux solutions de NHS ($3,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) et d'EDC ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) dans le DMSO, sont alors préparées. L'acide domoïque est utilisé sous forme de solution dans l'eau ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Le DMSO (1 mL) est ajouté à la solution aqueuse d'acide domoïque ($63 \mu\text{L}$). EDC ($290 \mu\text{L}$) et NHS ($80 \mu\text{L}$) sont à leur tour ajoutés au milieu. Après 10 minutes, la THYR est ajoutée et le milieu réactionnel laissé sous agitation pendant 1 heure à température ambiante. Finalement celui-ci est mis pendant une nuit à 4°C .

Dialyse et lyophilisation

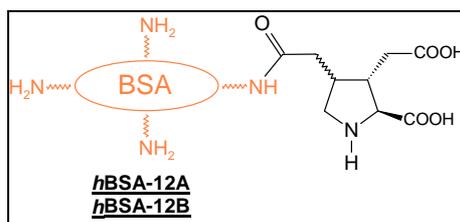
Après les étapes de dialyse et de lyophilisation réalisées selon les conditions décrites à la section (6.4.1, page 128), on récupère 6,8 mg d'une poudre blanchâtre filamenteuse.

Electrophorèse et Spectrométrie de Masse

La structure et le poids moléculaire de la THYR ne permettent pas l'utilisation de ces deux techniques pour la caractérisation des conjugués.

6.4.3 Hydrogénation des conjugués

Synthèse du conjugué hBSA-12



Protocole général

A une solution du conjugué protégé BSA-12 (55 mg) dans un mélange (1/1 v) méthanol/eau (1 mL de solution pour 5 mg de produit environ) est ajouté 50% en masse de palladium sur charbon. La réaction est placée sous un courant de dihydrogène pendant 5 heures. Après ajout de catalyseur (même quantité que lors de la première étape), le milieu réactionnel est laissé une nuit à température ambiante, sous courant de dihydrogène.

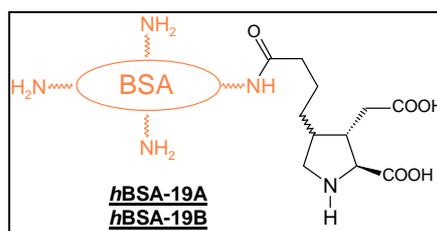
Dialyse et lyophilisation

Les étapes de dialyse et de lyophilisation sont réalisées dans les conditions décrites précédemment (section 6.4.1, page 128) et permettent l'obtention de 50 mg de produit.

Spéctrométrie de Masse

Echantillon	Masse mesurée (moyenne de 6 mesures, Da)	Incrément de masse / BSA (Da)	Masse de l'haptène (Da)	Nb d'haptènes greffés
<u>hBSA-12A</u>	70600 ± 130	4169 ± 133	214	19.5 ± 0.6
<u>hBSA-12B</u>	70656 ± 270	4225 ± 246	214	19.7 ± 1.1

Synthèse du conjugué hBSA-19

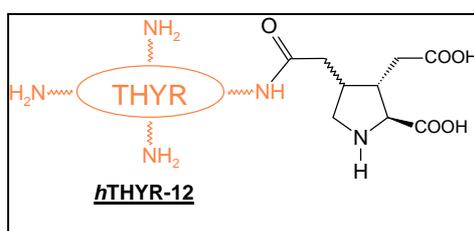


Les étapes de synthèse, dialyse et lyophilisation sont identiques à celles décrites pour le conjugué BSA-12 en utilisant 30 mg de conjugué BSA-19 et permettent de récupérer 30 mg de chaque conjugué.

Echantillon	Masse mesurée (moyenne de 6 mesures, Da)	Incrément de masse / BSA (Da)	Masse de l'haptène (Da)	Nb d'haptènes greffés
<u>hBSA-19A</u>	67330 ± 300	900	243	3,7 ± 0.4
<u>hBSA-19B*</u>	-	-	-	-

*pas de signal obtenu

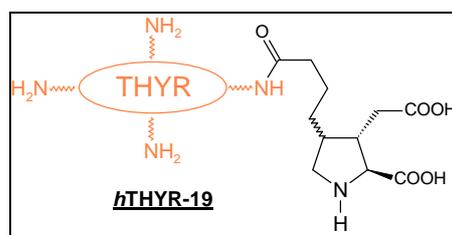
Synthèse du conjugué hTHYR-12



Mode opératoire :

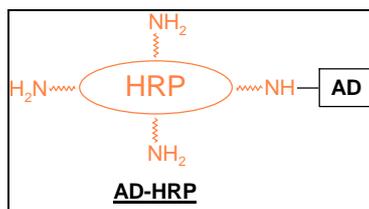
Les étapes de synthèse, dialyse et lyophilisation sont identiques à celles décrites précédemment, à partir de 11,9 mg du composé THYR-12. Elles permettent de récupérer 10,5 mg de produit final.

Synthèse des conjugué hTHYR-19



Les étapes de synthèse, dialyse et lyophilisation sont identiques à celles décrites précédemment, à partir de 10 mg du conjugué THYR-19. Elles permettent l'obtention de 8,2 mg de produit final.

6.4.4 Couplage AD-HRP



EDC (2 mg) et NHS (1,5 mg) sont ajoutés à une solution d'AD (1 mg) dans le DMSO (200 μL). Une solution d'HRP (2,5 mg) dans le tampon carbonate (500 μL ; 0,1M ; pH 9,6) est ajouté puis le tout mélangé pendant 2 heures à température ambiante. Après dialyse et lyophilisation, 2,8 g d'une poudre filamenteuse rougeâtre sont récupérés.

6.5 Immunologie

6.5.1 ELISA indirect : THYR-Haptène.

Les différents conjugués **THYR-Haptène** sont mis sous forme de solution dans le PBS (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Cette solution est alors ajoutée (100 μL) dans les puits des plaques de microtitration Maxisorp (Nunc). Les plaques sont recouvertes d'un adhésif et incubées à 4°C pendant une nuit.

Après 3 lavages au PBS (300 μL par puits), le SBBB (Pierce) est alors ajouté (250 μL par puits). L'incubation dure une heure à température ambiante. Pendant ce temps, les dilutions de sérums sont préparées.

Une prédilution du sérum (1/100) dans le PBS est préparée dans un eppendorf. Celle-ci est ensuite diluée au dixième de façon à obtenir la dilution de départ (1/1000). La dilution est ensuite réalisée en cascade au $\frac{1}{2}$ jusqu'à 1/64000. Une fois l'incubation terminée, trois nouveaux lavages (300 μL par puits) avec une solution de PBS sont effectués.

Les sérums (ou le PBS pour le blanc) sont ajoutés (100 μL par puits de A à G, et ligne H pour le blanc) et incubés pendant une heure à température ambiante. La plaque subit une nouvelle série de 3 lavages (300 μL) avec du PBS Tween (0,05%).

Les anticorps secondaires anti-IgG couplés à la peroxydase du raifort (Anti IgG-HRP, Vector Laboratories) sont dilués dans le PBS (1/10000, 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) puis ajoutés (100 μL par puits). Après une heure d'incubation à température ambiante, trois nouveaux lavages au PBS (300 μL par puits) sont effectués.

Enfin la révélation se fait par ajout d'OPD (100 μL par puits) en solution dans le PBS pour permettre la réaction de coloration. Celle-ci est bloquée après 10-15 minutes par ajout de H_2SO_4 2N (100 μL par puits).

L'absorbance de chaque puits est mesurée à 456 nm par le lecteur automatique de plaque Multiskan EX (Thermo Scientific).

6.5.2 ELISA indirect : THYR-AD

6.5.2.1 Sans déplétion préalable

Le protocole utilisé est le même que celui décrit précédemment (section 6.5.1). Le coating utilisé est le conjugué **THYR-AD** à une concentration de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (100 μL par puits). Les sérums utilisés sont : **Ser12A2**, **Ser12B1**, **Ser19A1** et **Ser19A2**.

La révélation se fait par ajout de TMB (100 μL par puits) en solution dans le PBS pour permettre la réaction de coloration. Celle-ci est bloquée après 10-15 minutes par ajout de H_2SO_4 2N (100 μL par puits).

Deux lectures à 450 et 620 nm sont effectuées automatiquement par le lecteur de plaque.

6.5.2.2 Avec déplétion préalable

- Préparation des billes

La déplétion des sérums en anticorps anti-THYR nécessite l'utilisation de billes DYNAL (Dynabeads M-280 Tosylactivated). Une suspension de billes (50 mg dans 500 μL) est lavée deux fois par le tampon de coating (0,1 M sodium borate à pH = 9,5 ; 1 mL). Les billes sont alors resuspendues dans le tampon de coating (100 μL). La thyroglobuline (1 mg) est ajoutée sous forme de solution dans le tampon de coating (835 μL). Une solution de sulfate d'ammonium 3M est ensuite ajoutée (415 μL). Le milieu réactionnel est alors incubé toute une nuit à 37°C, sous agitation.

Une fois l'incubation terminée, le surnageant est retiré et une solution de PBS-0,05% Caséine-0,05% Tween 20 est alors ajoutée (1250 μL). La solution de billes subit une nouvelle nuit d'incubation à 37°C avec agitation. Les billes sont alors lavées trois fois par une solution de PBS-0,05%-Caséine-0,05% Tween 20 puis mise de nouveau en suspension dans une solution de PBS-0,1% caséine-0,02% azoture de sodium (1 mL). A partir de 1mg de THYR pour 50 mg de billes dans 1 mL de solution, nous disposons de billes ayant une concentration de 1 mg.mL^{-1} de THYR.

- Etape de déplétion des sérums

Les sérums sont dilués dans du PBS (1/100). Les billes sont ajoutées à 5% (v/v) soit 70 μL de billes + 14 μL de sérum dans 1400 μL de solution finale. Les sérums en présence de billes sont alors incubés sous agitation, pendant 15 minutes, à température ambiante. Le surnageant contenant le sérum dépourvu des anticorps anti-THYR est alors prélevé.

- Tests ELISA

Le protocole utilisé est le même que celui décrit précédemment (section 6.5.1). Le coating utilisé est le conjugué **THYR-AD** à une concentration de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (100 μL par puits). Les dilutions de sérum (**Ser19A1** et **Ser19A2**) commencent à 1/100 au lieu de 1/1000 dans le protocole précédent).

La révélation se fait par ajout de TMB (100 μL par puits) en solution dans le PBS pour permettre la réaction de coloration. Celle-ci est bloquée après 10-15 minutes par ajout de H_2SO_4 2N (100 μL par puits).

Deux lectures à 450 et 620 nm sont effectuées automatiquement par le lecteur de plaque.

6.5.3 ELISA indirect : THYR

Le protocole utilisé est le même que celui décrit précédemment (section 6.5.1). Le coating utilisé est la **THYR** (Sigma Aldrich, référence T1126), à une concentration de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (100 μL par puits).

Deux lectures à 450 et 620 nm sont effectuées automatiquement par le lecteur de plaque.

6.5.4 ELISA direct : AD-HRP

6.5.4.1 Variation de la concentration AD-HRP

Les sérums sont préparées à la dilution souhaitée (1/5000) dans du PBS. Celui-ci est alors ajouté (100 μL) dans les puits des plaques de microtitration Maxisorp (Nunc). Les plaques sont recouvertes d'un adhésif et incubées à 4°C pendant une nuit.

Après 3 lavages au PBS (300 μL par puits), le SBBB (Pierce) est alors ajouté (250 μL par puits). L'incubation dure une heure à température ambiante.

Le conjugué **AD-HRP** est ajouté (100 μL par puits) à des concentrations variables (10 à 100 ng.mL^{-1}) et l'incubation dure une heure à température ambiante. La plaque subit une nouvelle série de 3 lavages (300 μL) avec du PBS Tween (0,05%) suivi d'un lavage au PBS (300 μL).

Enfin la révélation se fait par ajout de TMB (100 μL par puits) pour permettre la réaction de coloration. Celle-ci est bloquée après 10-15 minutes par ajout de H_2SO_4 2N (100 μL par puits).

Deux lectures à 450 et 620 nm sont effectuées automatiquement par le lecteur de plaque.

6.5.4.2 Variation de la concentration du sérum

Les sérums sont préparées aux dilutions souhaitées (1/1000 à 1/32000) dans du PBS. Ceux-ci sont alors ajoutés (100 μL) dans les puits des plaques de microtitration Maxisorp (Nunc). Les plaques sont recouvertes d'un adhésif et incubées à 4°C pendant une nuit.

Après 3 lavages au PBS (300 μL par puits), le SBBB (Pierce) est alors ajouté (250 μL par puits). L'incubation dure une heure à température ambiante.

L'**AD-HRP** à la concentration de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (ou le PBS pour le blanc) est ajouté (100 μL par puits) et l'incubation dure une heure à température ambiante. La plaque subit une nouvelle série de 3 lavages (300 μL) avec du PBS Tween (0,05%) suivi d'un lavage au PBS (300 μL).

Enfin la révélation se fait par ajout de TMB (100 μL par puits) pour permettre la réaction de coloration. Celle-ci est bloquée après 10-15 minutes par ajout de H_2SO_4 2N (100 μL par puits).

Deux lectures à 450 et 620 nm sont effectuées automatiquement par le lecteur de plaque.

6.5.5 ELISA compétitifs

6.5.5.1 cdELISA anti AD

Le conjugué **THYR-AD** est mis en solution dans le PBS ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Cette solution est alors ajoutée (100 μL) dans les puits des plaques de microtitration Maxisorp (Nunc). Les plaques sont recouvertes d'un adhésif et incubées à 4°C pendant une nuit.

Après 3 lavages au PBS (300 μL par puits), le SBBB (Pierce) est alors ajouté (250 μL par puits). L'incubation dure une heure à température ambiante. Pendant ce temps, les dilutions de sérums sont préparées.

Les dilutions d'AD et de sérum sont préparées dans du PBS à deux fois la concentration souhaitée. Les échantillons préparés en utilisant un volume de solution d'AD et un volume de solution de sérum sont mis à préincuber. Ils sont alors lavés trois fois avec du PBS (300 μL par puits).

Chaque échantillon (100 μL par puits) est ajouté et l'incubation dure une heure à température ambiante. La plaque subit une nouvelle série de 3 lavages (300 μL) avec du PBS Tween (0,05%).

Les anticorps anti-IgG couplés à la peroxydase du raifort (Anti IgG-HRP, Vector Laboratories) sont dilués dans le PBS ($1/10000$, $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) puis ajoutés (100 μL par puits). Après une heure d'incubation à température ambiante, trois nouveaux lavages au PBS (300 μL par puits) sont effectués.

Enfin la révélation se fait par ajout de TMB (100 μL par puits) pour permettre la réaction de coloration. Celle-ci est bloquée après 10-15 minutes par ajout de H_2SO_4 2N (100 μL par puits).

6.5.5.2 ciELISA avec préincubation dans solution AK

Le conjugué **THYR-AD** est mis en solution dans le PBS ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Celle-ci est alors ajoutée (100 μL) dans les puits des plaques de microtitration Maxisorp (Nunc). Les plaques sont recouvertes d'un adhésif et incubées à 4°C pendant une nuit.

Après 3 lavages au PBS (300 μL par puits), le SBBB (Pierce) est alors ajouté (250 μL par puits). L'incubation dure une heure à température ambiante. Pendant ce temps, les dilutions de sérums sont préparées.

Deux échantillons du sérum **Ser12A2** et de son préimmun sont alors préparés dont l'un est préincubé avec 200 μg d'AK. Une fois l'incubation terminée, subit trois nouveaux lavages (300 μL par puits) avec une solution de PBS.

Chaque échantillon (100 μL par puits) est ajouté et l'incubation dure une heure à température ambiante. La plaque subit une nouvelle série de 3 lavages (300 μL) avec du PBS Tween (0,05%).

Les anticorps secondaires anti-IgG couplés à la peroxydase du raifort (Anti IgG-HRP, Vector Laboratories) sont dilués dans le PBS ($1/10000$, $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) puis ajoutés (100 μL par puits). Après une heure d'incubation à température ambiante, trois nouveaux lavages au PBS (300 μL par puits) sont effectués.

Enfin la révélation se fait par ajout de TMB (100 μL par puits) pour permettre la réaction de coloration. Celle-ci est bloquée après 10-15 minutes par ajout de H_2SO_4 2N (100 μL par puits).

6.6 Mise au point de l'immunocapteur

6.6.1 Caractéristiques du dispositif

Les capteurs proviennent du Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS-CNRS ; Toulouse, France) et possèdent les caractéristiques suivantes :

- Substrat piézoélectrique : quartz
- Transducteur : IDT à structure double doigts en or (épaisseur 80 nm) avec couche de titane entre le quartz et l'or (20 nm) ; Lcc (distance centre à centre) 8,4 mm ; W (ouverture) 1,56 mm ; $\lambda = 40 \mu\text{m}$.
- Couche guidante : silice (6 μm).

La fonctionnalisation a lieu au sein de l'ISM afin d'y déposer la SAM permettant le greffage des anticorps.

La puce microfluidique, développée par Fabien Fournel, est en PDMS.

Le dispositif d'enregistrement se situe au sein du laboratoire d'Immunologie et de Parasitologie (Université Bordeaux 2 Victor Segalen). Ce banc de mesure se compose :

- du capteur et de la cellule
- d'un bloc d'alimentation de l'électronique
- de fréquencemètres qui mesurent la fréquence d'oscillation
- d'un ordinateur d'acquisition pour l'enregistrement des données.

6.6.2 Reconnaissance du motif AD

Les sérums **Ser12A2** ou **Ser12B1** (8 μg) sont mis en solution dans le TBS (60 μL). Une fois le débit fixé à 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ et le capteur stabilisé (passage de TBS), la solution d'anticorps (60 μL) est ajoutée au TBS lorsque le volume restant atteint le niveau de 50 μL . Le SBBB (20 μL) sera lui aussi injecté dans le cône lorsqu'il ne reste plus que 50 μL de TBS.

Enfin, le conjugué **THYR-AD** (2 μg) est à son tour ajouté sous forme de solution dans le TBS (20 μL) dans le cône d'entrée des deux lignes dans les 50 μL de TBS restants après avoir préalablement réduit le débit à 1 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

6.6.3 Expérience avec préincubation

Les anticorps du sérum **Ser12B1** sous forme de solution dans le TBS (8 μg dans 60 μL) sont préincubés en présence de 200 ng d'acide domoïque. Le mélange subit alors une agitation mécanique pendant 40 minutes de façon à assurer un mélange homogène.

Le débit est fixé à 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ et le TBS injecté dans le cône afin de passer à la surface du capteur. Les solutions d'Acs, préincubés ou non, (20 μL) sont injectées dans les cônes d'entrée, respectivement des lignes *test* et *contrôle*, lorsque qu'il ne reste que 50 μL de TBS. Le SBBB (20 μL) sera lui aussi injecté dans le cône lorsqu'il ne reste plus que 50 μL de TBS. Enfin, le conjugué **THYR-AD** (2 μg) est à son tour ajouté sous forme de solution dans le TBS (20 μL) dans le cône d'entrée des deux lignes dans les 50 μL de TBS restants après avoir préalablement réduit le débit à 1 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Références bibliographiques

- (1) Bates, S. S.; Bird, C. J.; De Freitas, A. S. W.; Foxall, R. A.; Gilgan, M.; Hanic, L. A.; R., J. G.; McCulloch, A. W.; Odense, P. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1989**, *46*, 1203-1215.
- (2) Quilliam, M. A.; Wright, J. L. C. *Analytical Chemistry* **1989**, *61*, 1053A-1060A.
- (3) Wright, J. L. C.; Boyd, R. K.; De Freitas, A. S. W.; Falk, M.; Foxall, R. A.; Jamieson, W. D.; Laycock, M. V.; McCulloch, A. W.; McInnes, A. G.; Odense, P.; Pathak, V. P.; Quilliam, M. A.; Ragan, M. A.; Sim, P. G.; Thibault, P.; Walter, J. A.; Gilgan, M.; Richard, D. J. A.; Dewar, D. *Can. J. Chem.* **1989**, *67*, 481-490.
- (4) Iverson, F.; Truelove, J.; Nera, E.; Tryphonas, L.; Campbell, J.; Lok, E. *Food and Chemical Toxicology* **1989**, *27*, 377-384.
- (5) Ohfune, Y.; Tomita, M. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, *104*, 3511-3513.
- (6) AFSSA ¶Saisine n°2008-SA-0268, ¶ AFSSA, 2008.
- (7) Kat, M. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **1983**, *49*, 417-427.
- (8) Yasumoto, T.; Oshima, Y.; Yamaguchi, M. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **1978**, *44*, 1249-1255.
- (9) Yasumoto, T.; Sugawara, W.; Fukuyo, Y.; Oguri, H.; Igarashi, T.; Fujita, N. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **1980**, *46*, 1405-1411.
- (10) Tachibana, K.; Scheuer, P. J.; Tsukitani, Y.; Kikuchi, H.; Van Engen, D.; Clardy, J.; Gopichand, Y.; Schmitz, F. J. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103*, 2469-2471.
- (11) Murata, M.; Shimatani, M.; Sugitani, H.; Oshima, Y.; Yasumoto, T. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **1982**, *48*, 549-552.
- (12) Hu, T.; Doyle, J.; Jackson, D.; Marr, J.; Nixon, E.; Pleasance, S.; Quilliam, M. A.; Walter, J. A.; Wright, J. L. C. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communication* **1992**, 39-41.
- (13) Dominguez, H. J.; Paz, B.; Daranas, A. H.; Norte, M.; Franco, J. M.; Fernández, J. J. *Toxicon*, *56*, 191-217.
- (14) Van Egmond, H. P.; Aune, T.; Lassus, P.; Speijers, G.; Waldock, M. *Journal of Natural Toxins* **1993**, *2*, 41-83.
- (15) Suzuki, T.; Mitsuya, T.; Imai, M.; Yamasaki, M. *Journal of Applied Phycology* **1996**, *8*, 509-515.
- (16) Murakami, Y.; Oshima, Y.; Yasumoto, T. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **1982**, *48*, 69-72.
- (17) Cohen, P.; Holmes, C. F. B.; Tsukitani, Y. *Trends in Biochemical Sciences* **1990**, *15*, 98-102.
- (18) Yasumoto, T.; Murata, M.; Oshima, Y.; Sano, M.; Matsumoto, G. K.; Clardy, J. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1019-1025.
- (19) Draisci, R.; Lucentini, L.; Giannetti, L.; Boria, P.; Poletti, R. *Toxicon* **1996**, *34*, 923-935.
- (20) Lee, J. S.; Igarashi, T.; Fraga, S.; Dahl, E.; Hovgaard, P.; Yasumoto, T. *Journal of Applied Phycology* **1989**, *1*, 147-152.
- (21) Dominguez, H. J.; Paz, B.; Daranas, A. H.; Norte, M.; Franco, J. M.; Fernández, J. J. *Toxicon*, *In Press*, *Corrected Proof*.
- (22) Murata, M.; Kumagai, M.; Lee, J. S.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Letters* **1987**, *28*, 5869-5872.
- (23) Tubaro, A.; Dell'Ovo, V.; Sosa, S.; Florio, C. *Toxicon* **2010**, *56*, 163-172.
- (24) Satake, M.; Ofuji, K.; Naoki, H.; James, K. J.; Furey, A.; McMahon, T.; Silke, J.; Yasumoto, T. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 9967-9968.

- (25) Twiner, M. J.; Rehmann, N.; Hess, P.; Doucette, G. J. *Marine Drugs* **2008**, *6*, 39-72.
- (26) European Commission: 2002; Vol. 2002/225/EC, p 65-66.
- (27) Yasumoto, T.; Murata, M.; Oshima, Y.; Matsumoto, G. K.; Clardy, J. *Diarrhetic shellfish poisoning, ACS Symposium Series*, 1984.
- (28) Sommer, H.; Meyer, K. F. *Arch. Pathol.* **1937**, *24*, 560-598.
- (29) Rodrigue, D. C.; Etzel, R. A.; Hall, S.; de Porras, E.; Velasquez, O. H.; Tauxe, R. V.; Kilbourne, E. M.; Blake, P. A. *Am J Trop Med Hyg* **1990**, *42*, 267-271.
- (30) Van Dolah, F. M. In *Seafood Toxicology: Pharmacology, Physiology and Detection*
Botana, L. M., Ed.; Marcel Dekker: New York, 2000, p 19-43.
- (31) Shumway J. *World Aquac. Soc.* **1990**, *21*, 65-104.
- (32) Lipkind, G. M.; Fozzard, H. A. *Biophysical Journal* **1994**, *66*, 1-13.
- (33) European Commission: 1991; Vol. 91/492/CEE p1-14.
- (34) Takemoto, T.; Daigo, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1958**, *6*, 578-580.
- (35) Jeffery, B.; Barlow, T.; Moizer, K.; Paul, S.; Boyle, C. *Food and Chemical Toxicology* **2004**, *42*, 545-557.
- (36) Lefebvre, K. A.; Robertson, A. *Toxicon* **2010**, *56*, 218-230.
- (37) Douglas, D. J.; Bates, S. S. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1992**, *49*, 85.
- (38) Fehling, J.; Green, D. H.; Davidson, K.; Bolch, C. J.; Bates, S. S. *Journal of Phycology* **2004**, *40*, 622-630.
- (39) Cusack, C. K.; Bates, S. S.; Quilliam, M. A.; Patching, J. W.; Raine, R. *Journal of Phycology* **2002**, *38*, 1106-1112.
- (40) Blanco, J.; Livramento, F.; Rangel, I. M. *Toxicon* **2010**, *55*, 541-546.
- (41) Bellinger, B. J.; Hagerthey, S. E. *Journal of Phycology* **2010**, *46*, 674-678.
- (42) Parsons, M. L.; Scholin, C. A.; Miller, P. E.; Doucette, G. J.; Powell, C. L.; Fryxell, G. A.; Dortch, Q.; Soniat, T. M. *Journal of Phycology* **1999**, *35*, 1368-1378.
- (43) Fritz, L.; Quilliam, M. A.; Wright, J. L. C.; Beale, A. M.; Work, T. M. *Journal of Phycology* **1992**, *28*, 439-442.
- (44) Holtermann, K. E.; Bates, S. S.; Trainer, V. L.; Odell, A.; Virginia Armbrust, E. *Journal of Phycology* **2010**, *46*, 41-52.
- (45) Stehr, C. M.; Connell, L.; Baugh, K. A.; Bill, B. D.; Adams, N. G.; Trainer, V. L. *Journal of Phycology* **2002**, *38*, 55-65.
- (46) Martin, J. L.; Haya, K.; Burrige, L. E.; Wildish, D. J. *Marine Ecology Progress Series* **1990**, *67*, 177-182.
- (47) Sierra-Beltrán, A. P.; Cruz, A.; Núñez, E.; Del Villar, L. M.; Cerecero, J.; Ochoa, J. L. *Toxicon* **1998**, *36*, 1493-1502.
- (48) Almandoz, G. O.; Ferrario, M. E.; Ferreyra, G. A.; Schloss, I. R.; Esteves, J. L.; Paparazzo, F. E. *Harmful Algae* **2007**, *6*, 93-103.
- (49) Álvarez, G.; Uribe, E.; Quijano-Scheggia, S.; López-Rivera, A.; Mariño, C.; Blanco, J. *Harmful Algae* **2009**, *8*, 938-945.
- (50) Kotaki, Y.; Koike, K.; Yoshida, M.; Van Thuoc, C.; Huyen, N. T. M.; Hoi, N. C.; Fukuyo, Y.; Kodama, M. *Journal of Phycology* **2000**, *36*, 1057-1060.
- (51) James, K. J.; Gillman, M.; Amandi, M. F.; López-Rivera, A.; Puente, P. F.; Lehane, M.; Mitrovic, S.; Furey, A. *Toxicon* **2005**, *46*, 852-858.
- (52) Stobo, L. A.; Lacaze, J. P. C. L.; Scott, A. C.; Petrie, J.; Turrell, E. A. *Toxicon* **2008**, *51*, 635-648.
- (53) Bogan, Y. M.; Kennedy, D. J.; Harkin, A. L.; Gillespie, J.; Vause, B. J.; Beukers-Stewart, B. D.; Hess, P.; Slater, J. W. *Harmful Algae* **2007**, *6*, 81-92.

- (54) Klein, C.; Claquin, P.; Bouchart, V.; Le Roy, B.; Véron, B. *Harmful Algae* **2010**, *9*, 218-226.
- (55) Vale, P.; Botelho, M. J.; Rodrigues, S. M.; Gomes, S. S.; Sampayo, M. A. d. *M. Harmful Algae* **2008**, *7*, 11-25.
- (56) Zingone, A.; Siano, R.; D'Alelio, D.; Sarno, D. *Harmful Algae* **2006**, *5*, 321-337.
- (57) Takahashi, E.; Yu, Q.; Eaglesham, G.; Connell, D. W.; McBroom, J.; Costanzo, S.; Shaw, G. R. *Marine Environmental Research* **2007**, *64*, 429-442.
- (58) Rhodes, L.; Scholin, C.; Garthwaite, I. *Natural Toxins* **1998**, *6*, 105-111.
- (59) Perl, T. M.; BÃ©nard, L.; Kosatsky, T.; Hockin, J. C.; Todd, E. C. D.; Remis, R. S. *New England Journal of Medicine* **1990**, *322*, 1775-1780.
- (60) Hampson, D. R.; Huang, X.-p.; Wells, J. W.; Walter, J. A.; Wright, J. L. C. *European Journal of Pharmacology* **1992**, *218*, 1-8.
- (61) Hampson, D. R.; Manalo, J. L. *Natural Toxins* **1998**, *6*, 153-158.
- (62) Mos, L. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2001**, *9*, 79-85.
- (63) Clayden, J.; Read, B.; Hebditch, K. R. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 5713-5724.
- (64) Wekell, J. C.; Hurst, J.; Lefebvre, K. A. *Journal of Shellfish Research* **2004**, *23*, 927-930.
- (65) European Commission: 1997; Vol. 91/492/CEE.
- (66) Lawrence, J. F.; Charbonneau, C. F.; MÃ©nard, C. *Journal of AOAC International* **1991**, *74*, 68-72.
- (67) Wright, J. L. C. *Food Research International* **1995**, *28*, 347-358.
- (68) Campàs, M.; Prieto-Simón, B.; Marty, J.-L. *Talanta* **2007**, *72*, 884-895.
- (69) AFSSA ¶Saisine n°2009-SA-0205, ¶ AFSSA, 2009.
- (70) Garthwaite, I. *Trends in Food Science & Technology* **2000**, *11*, 235-244.
- (71) Johnson, H. M.; Frey, P. A.; Angelotti, R.; Campbell, J. E.; Lewis, K. H. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1964**, *117*, 425-430.
- (72) IFREMER ¶Bulletin de la Surveillance, ¶ LER Arcachon, Edition 2006.
- (73) Yalow, R. S.; Berson, S. A. *Nature* **1959**, *184*, 1648-1649.
- (74) Berson, S. A.; Yalow, R. S.; Bauman, A.; Rothschild, M. A.; Newerly, K. *J Clin Invest* **1956**, *35*, 170-190.
- (75) Berson, S. A.; Yalow, R. S. *Clinica Chimica Acta* **1968**, *22*, 51-69.
- (76) Revillard, J. P. *Immunologie*; 3ème ed.; De Boeck Université, 1998.
- (77) Genetet, N. *Immunologie*; 4 ed.; EM Inter, 2002.
- (78) Espinosa, E.; Chillet, P. *Immunologie*; Ellipses, 2006.
- (79) Eggins, B. R. *Chemical Sensors and Biosensors*; Wiley, 2002.
- (80) Clark, L. C.; Lyons, C. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1962**, *102*, 29-45.
- (81) Clark, L. C.; Wolf, R.; Granger, D.; Taylor, Z. *Journal of applied physiology* **1953**, *6*, 189-193.
- (82) Paddle, B. M. *Biosensors and Bioelectronics* **1996**, *11*, 1079-1113.
- (83) Vo-Dinh, T.; Cullum, B. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **2000**, *366*, 540-551.
- (84) Davis, J.; Huw Vaughan, D.; Cardosi, M. F. *Enzyme and Microbial Technology* **1995**, *17*, 1030-1035.
- (85) Rosenzweig, Z.; Kopelman, R. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 1408-1413.
- (86) Lowe, C. R. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological sciences* **1989**, *324*, 487-496.
- (87) Rechnitz, G. A.; Ho, M. Y. *Journal of Biotechnology* **1990**, *15*, 201-217.

- (88) Fawcett, N. C.; Evans, J. A.; Chien, L. C.; Flowers, N. *Analytical Letters* **1988**, *21*, 1099-1114.
- (89) Downs, M. E. A. *Biochemical Society Transactions* **1991**, *19*, 39-43.
- (90) Conroy, P. J.; Hearty, S.; Leonard, P.; O'Kennedy, R. J. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2009**, *20*, 10-26.
- (91) Li, T.; Yao, Z.; Ding, L. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2004**, *101*, 155-160.
- (92) Tripathi, V. S.; Kandimalla, V. B.; Ju, H. *Biosensors and Bioelectronics* **2006**, *21*, 1529-1535.
- (93) Ghindilis, A. L.; Morzunova, T. G.; Barmin, A. V.; Kurochkin, I. N. *Biosensors and Bioelectronics* **1996**, *11*, 873-880.
- (94) Lakard, B.; Herlem, G.; Lakard, S.; Antoniou, A.; Fahys, B. *Biosensors and Bioelectronics* **2004**, *19*, 1641-1647.
- (95) Bhatia, R.; Dilleen, J. W.; Atkinson, A. L.; Rawson, D. M. *Biosensors and Bioelectronics* **2003**, *18*, 667-674.
- (96) Velasco-Garcia, M. N. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2009**, *20*, 27-33.
- (97) Schmitt, H.-M.; Brecht, A.; Piehler, J.; Gauglitz, G. *Biosensors and Bioelectronics* **1997**, *12*, 809-816.
- (98) Hao, J.; Aiguade, J.; Forsyth, C. J. *Tetrahedron Letters* **2001**, *42*, 821-824.
- (99) Moll, N.; Pascal, E.; Dinh, D. H.; Pillot, J.-P.; Bennetau, B.; Rebière, D.; Moynet, D.; Mas, Y.; Mossalayi, D.; Pistré, J.; Déjous, C. *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, *22*, 2145-2150.
- (100) O'Sullivan, C. K.; Guilbault, G. G. *Biosensors and Bioelectronics* **1999**, *14*, 663-670.
- (101) Bunde, R. L.; Jarvi, E. J.; Rosentreter, J. J. *Talanta* **1998**, *46*, 1223-1236.
- (102) Carter, R. M.; Poli, M. A.; Pesavento, M.; Sibley, D. E. T.; Lubrano, G. J.; Guilbault, G. G. *ImmunoMethods* **1993**, *3*, 128-133.
- (103) Kreuzer, M. P.; Pravda, M.; O'Sullivan, C. K.; Guilbault, G. G. *Toxicol* **2002**, *40*, 1267-1274.
- (104) Campàs, M.; de la Iglesia, P.; Le Berre, M.; Kane, M.; Diogène, J.; Marty, J.-L. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *24*, 716-722.
- (105) Micheli, L.; Radoi, A.; Guarrina, R.; Massaud, R.; Bala, C.; Moscone, D.; Palleschi, G. *Biosensors and Bioelectronics* **2004**, *20*, 190-196.
- (106) Yu, Q.; Chen, S.; Taylor, A. D.; Homola, J.; Hock, B.; Jiang, S. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2005**, *107*, 193-201.
- (107) Stevens, R. C.; Soelberg, S. D.; Eberhart, B.-T. L.; Spencer, S.; Wekell, J. C.; Chinowsky, T. M.; Trainer, V. L.; Furlong, C. E. *Harmful Algae* **2007**, *6*, 166-174.
- (108) Llamas, N.; Stewart, L.; Fodey, T.; Higgins, H.; Velasco, M.; Botana, L.; Elliott, C. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*, 581-587.
- (109) Tang, A. X. J.; Pravda, M.; Guilbault, G. G.; Piletsky, S.; Turner, A. P. F. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *471*, 33-40.
- (110) Campàs, M.; Marty, J.-L. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *605*, 87-93.
- (111) Sherry, J. P.; Clement, R. E. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **1992**, *23*, 217 - 300.
- (112) Van Emon, J. M.; Lopez-Avila, V. *Analytical Chemistry* **1992**, *64*, 78A-88A.
- (113) Landsteiner, K.; van der Scheer, J. *The Journal of Experimental Medicine* **1936**, *63*, 325-339.
- (114) Bouzige, M.; Pichon, V. *Analisis* **1998**, *26*, 112-117.
- (115) Brinkley, M. *Bioconjugate Chemistry* **1992**, *3*, 2-13.

- (116) Szurdoki, F.; Bekheit, H. K. M.; Marco, M.; Goodrow, M. H.; Hammock, B. D. *New Frontiers in Agrochemical Immunoassay*; AOAC International, 1995.
- (117) Kawatsu, K.; Hamano, Y.; Noguchi, T. *Toxicon* **1999**, *37*, 1579-1589.
- (118) Newsome, H.; Truelove, J.; Hierlihy, L.; Collins, P. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **1991**, *47*, 329-334.
- (119) Osada, M.; Marks, L.; Stewart, J. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **1995**, *54*, 797-804.
- (120) Garthwaite, L.; Ross, K. M.; Miles, C. O.; Hansen, R. P.; Foster, D.; Wilkins, A. L.; Towers, N. R. *Natural Toxins* **1998**, *6*, 93-104.
- (121) Ganorkar, R. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 5004-5007.
- (122) Baldwin, J. E.; Fryer, A. M.; Pritchard, G. J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2000**, *10*, 309-311.
- (123) Huang, S. L.; Omura, K.; Swern, D. *The Journal of Organic Chemistry* **1976**, *41*, 3329-3331.
- (124) Omura *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 957-962.
- (125) Adam, W.; Saha-Moller, C. R.; Ganeshpure, P. A. *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 3536-3537.
- (126) Stork, G.; Brizzolara, A.; Landesman, H.; Szmuszkovicz, J.; Terrell, R. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, *85*, 207-222.
- (127) Baldwin, J. E.; Bamford, S. J.; Fryer, A. M.; Rudolph, M. P. W.; Wood, M. E. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5233-5254.
- (128) Holladay, M. W.; Lin, C. W.; May, C. S.; Garvey, D. S.; Witte, D. G.; Miller, T. R.; Wolfram, C. A. W.; Nadzan, A. M. *Journal of Medicinal Chemistry* **1991**, *34*, 455-457.
- (129) Whitesell, J. K.; Whitesell, M. A. *Synthesis* **1983**, 517.
- (130) Baco, E.; Vellutini, L.; Pillot, J. P.; Felpin, F. X.; Schmitter, J. M.; Bennetau, B.; Degueil, M. *Synlett* **2010**, 1943-1946.
- (131) Falk, M.; Sidhu, P.; Walter, J. A. *Natural Toxins* **1998**, *6*, 159-171.
- (132) Mauger, A. B.; Irreverre, F.; Witkop, B. *Journal of the American Chemical Society* **1966**, *88*, 2019-2024.
- (133) Baldwin, J. E.; Pritchard, G. J.; Williamson, D. S. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7991-7997.
- (134) Soper, D. L.; Milbank, J. B. J.; Mieling, G. E.; Dirr, M. J.; Kende, A. S.; Cooper, R.; Jee, W. S. S.; Yao, W.; Chen, J. L.; Bodman, M.; Lundy, M. W.; De, B.; Stella, M. E.; Ebetino, F. H.; Wang, Y.; deLong, M. A.; Wos, J. A. *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, *44*, 4157-4169.
- (135) Soyka, R.; Guth, B. D.; Weisenberger, H. M.; Luger, P.; Muller, T. H. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, *42*, 1235-1249.
- (136) Wadsworth, W. S.; Emmons, W. D. *Journal of the American Chemical Society* **1961**, *83*, 1733-1738.
- (137) Semmelhack, M. F.; Stauffer, R. D. *The Journal of Organic Chemistry* **1975**, *40*, 3619-3621.
- (138) Mehta, A.; Jaouhari, R.; Benson, T. J.; Douglas, K. T. *Tetrahedron Letters* **1992**, *33*, 5441-5444.
- (139) Hashimoto, K.; Konno, K.; Shirahama, H. *The Journal of Organic Chemistry* **1996**, *61*, 4685-4692.
- (140) Boeckman, R. K.; Estep, K. G.; Nelson, S. G.; Walters, M. A. *Tetrahedron Letters* **1991**, *32*, 4095-4098.
- (141) Orsini, F.; Pelizzoni, F.; Ricca, G. *Synthetic Communications* **1982**, *12*, 1147 - 1154.

- (142) Sato, K.; Mizuno, S.; Hirayama, M. *The Journal of Organic Chemistry* **1967**, *32*, 177-180.
- (143) Podgorsek, A.; Stavber, S.; Zupan, M.; Iskra, J. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 1097-1099.
- (144) Robinson, C. Y.; Brouillette, W. J.; Muccio, D. D. *The Journal of Organic Chemistry* **1989**, *54*, 1992-1997.
- (145) Antonioletti, R.; Bonadies, F.; Ciammaichella, A.; Viglianti, A. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4644-4648.
- (146) Takacs, J. M.; Jaber, M. R.; Clement, F.; Walters, C. *The Journal of Organic Chemistry* **1998**, *63*, 6757-6760.
- (147) Lattanzi, A.; Orelli, L. R.; Barone, P.; Massa, A.; Iannece, P.; Scettri, A. *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 1333-1337.
- (148) Hungate, R. W.; Chen, J. L.; Starbuck, K. E.; Macaluso, S. A.; Rubino, R. S. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 4113-4116.
- (149) Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*, 2008.
- (150) Righetti, P. G. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1079*, 24-40.
- (151) Adamczyk, M.; Gebler, J. C.; Mattingly, P. G. *Bioconjugate Chemistry* **1996**, *7*, 475-481.
- (152) Maxted, E. B.; Frankenburg, W. G.; Komarewsky, V. I.; Rideal, E. K.; Emmett P, H.; Taylor, H. S. In *Advances in Catalysis*; Academic Press: 1951; Vol. Volume 3, p 129-178.
- (153) Derrien, Y.; Michel, R.; Pedersen, K. O.; Roche, J. *Biochimica et Biophysica Acta* **1949**, *3*, 436-441.
- (154) Yu, F.-Y.; Liu, B.-H.; Wu, T.-S.; Chi, T.-F.; Su, M.-C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 5334-5339.
- (155) Quilliam, M. A. *Manual on Harmful Marine Microalgae* **2003**, *11*, 247-266.
- (156) Branaa, P.; Naar, J.; Chinain, M.; Pauillac, S. *Bioconjugate Chemistry* **1999**, *10*, 1137-1142.
- (157) Smith, D. S.; Kitts, D. D. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, *43*, 367-371.
- (158) Shinkaruk, S.; Lamothe, V.; Schmitter, J.-M.; Manach, C.; Morand, C.; Berard, A.; Bennetau, B.; Bennetau-Pelissero, C. *Food Chemistry* **2010**, *118*, 472-481.
- (159) Fournel, F.; Baco, E.; Mamani-Matsuda, M.; Degueil, M.; Bennetau, B.; Moynet, D.; Mossalayi, D.; Vellutini, L.; Pillot, J. P.; Dejous, C.; Rebiere, D. *Procedia Engineering*, **2010**, *5*, 831-834.
- (160) Moll, N., Thèse de doctorat, Université Bordeaux 1, 2007.
- (161) Fournel, F.; Baco, E.; Mamani-Matsuda, M.; Degueil, M.; Bennetau, B.; Moynet, D.; Mossalayi, D.; Pillot, J. P.; Dejous, C.; Rebière, D. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2011**, DOI : 10.1016/j.snb.201202.056.
- (162) Gordon, A. J.; Ford, R. A. *The Chemist's Companion*; Wiley Interscience, 1971.

